

Carla Eliana Davico

TÍTULO:

Toxicidade celular do herbicida à base de glifosato, Roundup® WG: impactos sobre a organização morfofuncional dos ovários do peixe-zebra *Danio rerio*, como modelo experimental.

Dissertação submetida ao Programa de Pós-graduação em Biologia Celular e do Desenvolvimento, do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Santa Catarina para a obtenção do Grau de Mestre em Biologia Celular e do Desenvolvimento

Orientadora: Profa. Dra. Yara Maria Rauh Müller

Florianópolis
2017

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

Davico, Carla Eliana
Toxicidade celular do herbicida à base de
glifosato, Roundup® WG: impactos sobre a organização
morfofuncional dos ovários do peixe-zebra *Danio*
rerio, como modelo experimental. / Carla Eliana
Davico ; orientadora, Profa. Dra. Yara Maria Rauh
Müller - SC, 2017.
81 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de
Santa Catarina, Centro de Ciências Biológicas,
Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e do
Desenvolvimento, Florianópolis, 2017.

Inclui referências.

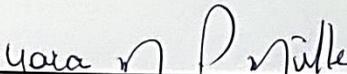
1. Biologia Celular e do Desenvolvimento. 2.
Toxicidade do herbicida Roundup®. 3. Alterações em
ovários de *Danio rerio*. 4. Disruptor endócrino. I.
Rauh Müller, Profa. Dra. Yara Maria . II.
Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de
Pós-Graduação em Biologia Celular e do
Desenvolvimento. III. Título.

"Toxicidade celular do herbicida à base de glifosato, Roundup® WG: impactos sobre a organização morfofuncional dos ovários do peixe-zebra Danio rerio, como modelo experimental"

Por

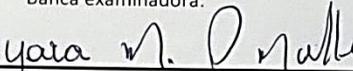
Carla Eliana Davico

Dissertação julgada e aprovada em sua forma final pelos membros titulares da Banca Examinadora (03/PPGBCD/2017) do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e do Desenvolvimento - UFSC.

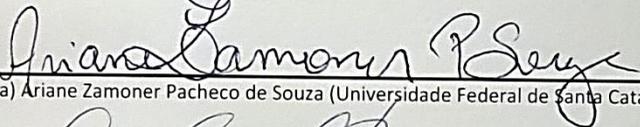


Prof(a). Dr(a). Yara Maria Rauh Müller
Coordenador(a) do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e do Desenvolvimento

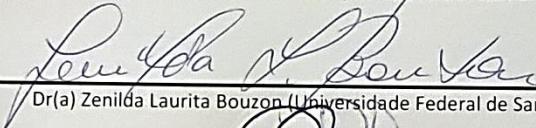
Banca examinadora:



Dr(a) Yara Maria Rauh Müller (Universidade Federal de Santa Catarina)
Orientador(a)



Dr(a) Ariane Zamoner Pacheco de Souza (Universidade Federal de Santa Catarina)



Dr(a) Zenilda Laurita Bouzon (Universidade Federal de Santa Catarina)



Dr(a) Geison de Souza Izidio (Universidade Federal de Santa Catarina)

Florianópolis, 09 de março de 2017.

*Dedico este trabalho aos meus pais
Norma e Omar e a meu irmão Gustavo,
pelo apoio incondicional, e em especial
a minha afilhada, Emilce.*

AGRADECIMENTOS

Agradeço à Universidade Federal de Santa Catarina a oportunidade concedida para minha formação.

Em especial, à minha orientadora, a Profa. Dra. Yara Maria Rauh Müller, que me deu a oportunidade, confiança, generosidade e colaboração na realização deste trabalho.

À Profa. Dra. Evelise Maria Nazari, que me acolheu em seu laboratório pacientemente, ensinando e me apoiando durante o mestrado.

Ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e do Desenvolvimento, que viabilizou a realização deste trabalho, e juntamente agradeço aos professores das disciplinas que compartilharam comigo seus conhecimentos.

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

A todos os colegas do Laboratório de Reprodução e Desenvolvimento Animal, o companheirismo e momentos de agradável convivência. Em especial ao “grupo zebrafish” Aline, Luciane e Michael, que incentivaram e contribuíram para a realização desta pesquisa.

Aos técnicos do LAMEB e LCME, agradeço o atendimento e a colaboração para a realização das análises necessárias.

Aos meus pais Norma e Omar e a meu irmão Gustavo, por tornarem possível esta dissertação. Sua confiança e orgulho de meu trabalho serviram de estímulo para eu seguir em frente. Portanto, esta conquista não é individual, mas sim, o resultado de nossa união.

Ao Martín, aos meus amigos da Argentina, do Brasil e do mundo, que de alguma forma contribuíram para o desenvolvimento deste trabalho. Faço um agradecimento especial à minha prima Gisela. Mesmo longe, ela soube estar presente através de seu estímulo, carinho e apoio em todos os momentos.

Finalmente à CAPES, pela bolsa concedida.

Muito Obrigada! ¡Muchas gracias!

"Hay una fuerza motriz más poderosa que el vapor, la electricidad y la energía atómica: la voluntad"

-Albert Einstein-

RESUMO

O glifosato e os herbicidas à base de glifosato são considerados praguicidas de amplo espectro e pós-emergente, e são os mais utilizados na agricultura mundial para matar uma variedade de ervas daninhas terrestres e aquáticas. Assim, pelo uso excessivo deste agroquímico nas culturas, especialmente quando aplicado por pulverização, pode ocorrer a sua infiltração no solo e a lixiviação para os corpos de água, atingindo diferentes organismos aquáticos não-alvos. Neste contexto, o objetivo deste estudo foi investigar a toxicidade celular do herbicida à base de glifosato, Roundup® WG (0,065; 0,65 e 6,5 mg/L), após 15 dias, sobre a morfologia, ultraestrutura e proteínas envolvidas na fusão e fissão mitocondrial no ovário do peixe-zebra, *Danio rerio*. Primeiramente, foi obtida a concentração letal média (CL₅₀) de 42,61 mg/L em 96 horas para *D. rerio* após exposição ao Roundup® WG. Após exposição de *D. rerio* ao Roundup® WG por 15 dias, as células germinativas foram caracterizadas em três fases: ovócitos pré-vitelogênicos I (PreI), ovócitos pré-vitelogênicos II (Pre II) e ovócitos vitelogênicos (Vit), baseado em critérios morfológicos já estabelecidos na literatura. Uma diminuição no diâmetro dos ovócitos PreI foi observada nas três concentrações do Roundup® WG e uma diminuição do diâmetro dos ovócitos PreII nas duas maiores concentrações avaliadas. Em relação ao conteúdo da proteína vitelina, um aumento foi observado nos ovários das fêmeas expostas, sugerindo uma relação dose-dependente do Roundup® WG. Na análise ultraestrutural, foram observadas zonas de vacuolização nas células foliculares e um aumento do espaço perivitelinico, com presença de macro e micro vesículas, bem como compartimentos mitocondriais comprometidos nos ovários de fêmeas expostas. Também, foi observado uma redução do número de mitocôndrias e um aumento de mitocôndrias alteradas com uma severidade alta nos ovócitos, bem como uma diminuição no conteúdo de Drp1, Mfn1 e Mfn2 envolvidas na fissão e fusão mitocondrial, que pode indicar à mitocôndria como um dos alvos do Roundup® WG. Estes resultados, sugerem que Roundup® WG poderia ser considerado como um possível disruptor endócrino nos ovários de *D. rerio*, afetando à maturação ovariana. No entanto, devem ser realizados mais testes toxicológicos avaliando outros parâmetros reprodutivos e seu impacto nos peixes. Além disso, a menor concentração de glifosato avaliada neste estudo, que é a concentração permitida pelo CONAMA (0,065 mg/L), provocou diminuição no diâmetro dos ovócitos PreI, aumento do conteúdo de vitelina, bem como alteração nas mitocôndrias e diminuição de Drp1 e Mfn2, isso poderia indicar que o

limite máximo permissível de glifosato no Brasil precisa ser reavaliado. Assim, o presente estudo demonstrou diferentes alterações no ovário de *D. rerio* expostos às concentrações do Roundup® WG, indicando a toxicidade reprodutiva deste herbicida.

Palavras-chave: Disruptor endócrino, folículos ovarianos, ovócitos.

ABSTRACT

Glyphosate and glyphosate-based herbicides are considered broad-spectrum and post-emergent pesticides, and are the most widely used in global agriculture to kill a variety of terrestrial and aquatic weeds. Thus, due to the excessive use of this agrochemical in the crops, especially when applied by spraying, infiltration into the soil and leaching into the water bodies can occur, reaching different non-target aquatic organisms. Therefore, the objective of this study was to investigate the cellular toxicity of glyphosate-based herbicide, Roundup® WG (0.065, 0.65 and 6.5 mg/L) on morphology, ultrastructure and proteins involved in fusion and fission mitochondrial in the ovaries of zebrafish, *Danio rerio*. First, the determination of mean lethal concentration (LC₅₀) was 42.61 mg/L in 96 hours for *D. rerio* after exposure to Roundup® WG. After exposure of *D. rerio* to concentrations of Roundup® WG for 15 days, germ cells of ovaries were characterized in three phases: pre-vitellogenic oocytes I (PreI), pre-vitellogenic oocytes II (PreII) and vitellogenic oocytes (Vit), based on morphological criteria already established in the literature. A diameter decrease in the PreI was observed in the three concentrations of Roundup® WG as well as a diameter decrease of the PreII oocytes when two highest concentrations were evaluated. In relation to the content of the vitellin protein, an increase in its content was observed in the ovaries of exposed females, depending on the concentration of the herbicide. In the ultrastructural analysis, zones of vacuolization in follicular cells and an increase of perivitellinic space with presence of macro and micro vesicles were observed, as well as compromised mitochondria compartments in the ovaries of exposed females. In addition, reductions in the number of mitochondria and an increase of altered mitochondria with high severity in oocytes were observed, as well as a decrease in the content of Drp1, Mfn1 and Mfn2 involved in mitochondrial fission and fusion. These may indicate the mitochondria as a Roundup® WG target. These results suggest that Roundup® WG could be considered as a possible endocrine disrupter in the ovaries of *D. rerio*, affecting ovarian maturation. However, further toxicological tests should be performed to evaluate other reproductive parameters and their impact on fish. In addition, the lowest concentration of glyphosate evaluated in this study, which is the concentration allowed by CONAMA (0.065 mg/L), caused a diameter decrease of the PreI, an increase in vitellin content, as well as a change in the mitochondria and a decrease in Drp1 and Mfn2. In this respect, the maximum permissible limit of glyphosate in Brazil needs to be reevaluated. Thus, the present study demonstrated different alterations

in the ovaries of *D. rerio* exposed to concentrations of Roundup® WG, indicating reproductive toxicity of this herbicide.

Keywords: Endocrine disruptor, ovarian follicles, oocytes.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1:	Fórmula estrutural do herbicida glifosato.....	3
Figura 2:	Fêmea adulta de <i>D. rerio</i>	6
Figura 3:	Representação da maturação do folículo ovariano de <i>D. rerio</i>	7
Figura 4:	Curva concentração-resposta 48 e 72 horas: mortalidade de <i>Danio rerio</i> após exposição a diferentes concentrações do Roundup® WG.....	23
Figura 5:	Concentração Letal Média (CL ₅₀) para <i>Danio rerio</i> após exposição ao Roundup® WG por 96 horas.....	23
Figura 6:	Massa corporal das fêmeas de <i>D. rerio</i> após exposição ao Roundup® WG por 15 dias.....	24
Figura 7:	Massa dos ovários de <i>D. rerio</i> após exposição ao Roundup® WG por 15 dias.....	25
Figura 8:	Índice gonadossomático dos ovários de <i>D. rerio</i> após exposição ao Roundup® WG por 15 dias.....	26
Figura 9:	Morfologia dos ovócitos de <i>D. rerio</i> após exposição ao Roundup® WG por 15 dias.....	27
Figura 10:	Classificação dos ovócitos de <i>D. rerio</i>	27
Figura 11:	Número de ovócitos PreI, PreII e Vit em ovários de <i>D. rerio</i> após exposição ao Roundup® WG por 15 dias.....	28
Figura 12:	Diâmetro dos ovócitos PreI, PreII e Vit de <i>D. rerio</i> expostos ao Roundup® WG por 15 dias.....	29
Figura 13:	Secção de ovário de <i>D. rerio</i> : célula folicular e envelope vitelínico da região periférica do folículo ovariano.....	31
Figura 14:	Secção de ovário de <i>D. rerio</i> : mitocôndrias das células foliculares.....	32
Figura 15:	Secções de ovário de <i>D. rerio</i> : mitocôndrias da região cortical dos ovócitos.....	33
Figura 16:	Número de mitocôndrias em ovócitos de <i>D. rerio</i> após exposição a Roundup® WG por 15 dias.....	34
Figura 17:	Número de ovócitos de <i>D. rerio</i> com presença de mitocôndrias alteradas após a exposição ao Roundup® WG por 15 dias.....	34
Figura 18:	Imuno-blotting com marcação para vitelina em ovários de <i>D. rerio</i> após exposição ao Roundup® WG por 15 dias.....	36

Figura 19:	Imuno-histoquímica com marcação para vitelina em ovários de <i>D. rerio</i> após exposição ao Roundup® WG por 15 dias.....	36
Figura 20:	Conteúdo de vitelina em ovários de <i>D. rerio</i> após a exposição ao Roundup® WG por 15 dias.....	37
Figura 21:	Conteúdo de Drp1, Mfn1 e Mfn2 em ovários de <i>D. rerio</i> após a exposição ao Roundup® WG por 15 dias....	38

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Anticorpos primários e secundários utilizados nas técnicas de imuno-histoquímica e *Western blotting*17

Tabela 2: Escore de severidade das alterações mitocondriais nos ovócitos de *D. rerio* após a exposição ao Roundup® WG por 15 dias.....35

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AMPA	Ácido aminometilfosfônico
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
BSA	do inglês <i>bovine serum albumin</i>
CCB	Centro de Ciências Biológicas
CEUA	Comissão de Ética no Uso de Animais/UFSC
CL ₅₀	Concentração letal média
CONAMA	Conselho Nacional do Meio Ambiente
CONCEA	Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal
Drp1	Proteína de fissão mitocondrial, do inglês <i>density-regulated protein 1</i>
EDC	Compostos de disrupção endócrina, do inglês <i>endocrine disrupting chemicals</i>
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
EEC	Comunidade Econômica Européia
EPSPs	Enzima 5-enolpiruvil-chiquimato-3-fosfato-sintase
HE	Hematoxilina-eosina
HBG	Herbicida à base de glifosato
HPG	Eixo hipotálamo-pituitário-gonadal
IBAMA	Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
IGS	Índice gonadossomático
LAMEB	Laboratório Multiusuário de Estudos em Biologia
LRDA	Laboratório de Reprodução e Desenvolvimento Animal
Mfn1	Proteína de fusão mitocondrial, do inglês <i>Mitofusin-1</i>
Mfn2	Proteína de fusão mitocondrial, do inglês <i>Mitofusin-2</i>
OECD	do inglês <i>The Organisation for Economic Co-operation and Development</i>
PBS	Tampão fosfato salino, do inglês <i>phosphate buffered saline</i>
PEP	fosfoenolpiruvato
PreI	Ovócitos pre-vitelogênicos I
PreII	Ovócitos pre-vitelogênicos II
PMSF	Fluoruro de fenilmetilsulfonilo, do inglês <i>phenylmethylsulfonyl fluoride</i>
USEPA	do inglês <i>United States Environmental Protection Agency</i>
Vit	Ovócitos vitelogênicos

SUMARIO

1	INTRODUÇÃO	1
1.1.	USO DE AGROQUÍMICOS NA AGRICULTURA	1
1.2.	HERBICIDA À BASE DE GLIFOSATO	2
1.3.	OVÁRIO DE <i>Danio rerio</i> COMO ALVO DE TOXICIDADE.....	5
1.4.	<i>Danio rerio</i> COMO MODELO EXPERIMENTAL EM ESTUDOS TOXICOLÓGICOS.	9
2	OBJETIVOS	11
2.1	OBJETIVO GERAL	11
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	11
3	MATERIAL E MÉTODOS	13
3.1	OBTENÇÃO DOS ANIMAIS E ACLIMATAÇÃO	13
3.2	DELINEAMENTO EXPERIMENTAL.....	13
3.3	BIOMETRIA CORPORAL E OVARIANA.....	15
3.4	ANÁLISES MORFOLÓGICAS E MORFOMÉTRICAS POR MICROSCOPIA DE LUZ.....	15
3.4.1	Preparo das amostras.....	15
3.4.2	Biometria e classificação dos ovócitos.....	15
3.4.3	Marcações celulares por imuno-histoquímica.....	16
3.5	ANÁLISES ULTRAESTRUTURAIS POR MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO	16
3.6	ANÁLISES POR <i>Western blotting</i>	17
3.7	ANÁLISE ESTATÍSTICA	18
4	RESULTADOS	21
4.1	TOXICIDADE AGUDA DO ROUNDUP® WG PARA <i>D. rerio</i>	21

4.2	TOXICIDADE SUBCRÔNICA DO ROUNDUP® WG EM OVÁRIOS DE <i>Danio rerio</i>	24
4.2.1	Biometria corporal e ovariana e IGS após a exposição ao Roundup® WG.....	24
4.2.2	Morfometria dos ovócitos: Classificação, número e diâmetro após a exposição ao Roundup® WG.	26
4.2.3	Ultraestrutura dos ovários de <i>Danio rerio</i> após a exposição ao Roundup® WG.....	29
4.2.4	Imuno-histoquímica e <i>Western blotting</i> de ovários de <i>Danio rerio</i>	35
5	DISCUSSÃO	39
6	CONCLUSÕES.....	45
7	REFERÊNCIAS.....	47
8	ANEXO A	60

1 INTRODUÇÃO

1.1. USO DE AGROQUÍMICOS NA AGRICULTURA.

Na agricultura moderna o uso de agroquímicos, como praguicidas e fertilizantes, tornou-se uma prática usual. Entre os agroquímicos destacam-se os praguicidas, usados contra organismos comumente chamados de pragas (insetos, fungos, bactérias, etc.), assim como contra ervas daninhas, que contribuíram significativamente para um maior rendimento das culturas, prevenindo, controlando e erradicando a propagação de doenças altamente letais (LASRAM *et al.*, 2014).

Uma forma de classificar os praguicidas é pelo tipo de praga-alvo para a qual são aplicados. Nesse sentido, eles têm diferentes modos de ação ou formas de controlar a praga-alvo. Os inseticidas são capazes de matar os insetos através do contato direto por via oral e/ou respiratória. Alguns fungicidas afetam a divisão celular dos fungos, enquanto outros podem ser eficazes em inibir a síntese de certos compostos. Por sua parte, os herbicidas são utilizados para eliminar ervas daninhas por contato direto e/ou pela absorção através das folhas, caules ou raízes. Assim, alguns herbicidas podem simular a função de reguladores de crescimento das plantas, enquanto outros podem controlar efetivamente a capacidade fotossintética (AZMI e NAQVI, 2011; MNIF *et al.*, 2011).

Particularmente, o uso de herbicidas, numa tentativa de maior controle das ervas daninhas na silvicultura e na agricultura, associados às atividades de preparo do solo para o cultivo, têm permitido aos produtores agrícolas aumentarem significativamente o rendimento das suas culturas (AKTAR *et al.*, 2009). Além disso, a partir da década de 1990, quando as culturas transgênicas tolerantes a herbicidas foram introduzidas pela primeira vez, o uso de herbicidas tornou-se a opção mais utilizada por muitos produtores. A disponibilidade de culturas transgênicas com resistência a um herbicida, tal como o glifosato, proporcionou o controle de ervas daninhas pelo uso deste herbicida de amplo espectro e ao mesmo tempo, reduziu a necessidade de aplicações repetidas de herbicidas. Ao combinar estas tecnologias de culturas, os produtores conseguiram reduzir ainda mais as despesas de mão-de-obra e aumentar a produtividade (DERPSCH e FRIEDRICH, 2009). Assim, desde a liberação da soja transgênica (*Glycine max L.*) tolerante ao glifosato em 1996, a utilização desta tecnologia tem aumentado em vários países, como nos Estados Unidos, Argentina e Brasil, representando a maioria da soja produzida nesses países (DILL, 2005).

No Brasil, a utilização anual de agroquímicos tem aumentado de forma alarmante. Segundo a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), órgão federal responsável pela avaliação toxicológica para fins de registro de agrotóxicos e pela reavaliação de produtos já registrados. O Brasil se destacou no ano de 2008 no cenário mundial como o maior consumidor de agrotóxicos, correspondendo, na América Latina, a 86% dos produtos vendidos (IBGE, 2012). Além disso, dos herbicidas utilizados no território brasileiro, 62,4% são à base de glifosato, o que torna o Brasil o primeiro no ranking mundial de consumo de glifosato (IBGE, 2015). Cabe ressaltar que, o glifosato é um dos 14 ingredientes ativos de agrotóxicos colocados em reavaliação pela ANVISA em 2008, e a partir de 2015 foi indicado para a reavaliação do seu potencial carcinogênico (ANVISA, 2016).

O uso excessivo dos herbicidas no solo pode contaminar os ecossistemas aquáticos de maneira acidental, por limpeza dos equipamentos de pulverização, escoamento superficial, processos de lixiviação, ou ainda por deriva das aplicações por via aérea (AQUINO NETO e RODRIGUES DE ANDRADE, 2011; MENSAH *et al.*, 2015). Uma vez presentes nos corpos d'água, os herbicidas podem reduzir a qualidade ambiental, influenciar no funcionamento do ecossistema e na estrutura das comunidades. Assim, impactando na fauna aquática, reduzindo a diversidade de espécies, modificando as cadeias alimentares, alterando os padrões de fluxo de energia e ciclagem de nutrientes, bem como alterando a estabilidade e a resiliência dos ecossistemas (FLEEGER *et al.*, 2003; RELYEA, 2005; PÉREZ *et al.*, 2011).

1.2. HERBICIDA À BASE DE GLIFOSATO.

O glifosato (N- (fosfonometil) glicina) introduzido no mercado na década de 1970 (USEPA, 2002), é um herbicida organofosforado de amplo espectro e pós-emergente (Figura 1), empregado para matar uma variedade de ervas daninhas terrestres e aquáticas, sendo considerado o herbicida mais utilizado no mundo (DUKE e POWLES, 2008; ANNETT *et al.*, 2014). No Brasil, o uso de herbicidas à base de glifosato (HBG) está registrado para 26 culturas, como café, cana-de-açúcar, arroz, soja, maçã, citros, entre outras (REBELO *et al.*, 2010). Estes herbicidas também apresentam uso doméstico, como em gramados e jardins (HANKE *et al.*, 2010).

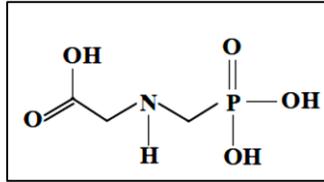


Figura 1: Fórmula estrutural do herbicida glifosato (N-fosfonometil) glicina. Fonte: ANVISA, 2015.

O glifosato é facilmente conduzido através do floema para todas as partes da planta por ser um herbicida sistêmico. As moléculas de glifosato são absorvidas a partir da superfície da folha, onde são transportadas para os meristemas em crescimento. Os sintomas fito tóxicos do glifosato geralmente começam gradualmente, tornando-se visíveis dentro de dois a quatro dias na maioria das ervas daninhas anuais ou, na maioria das ervas daninhas perenes podem ser visíveis até sete dias. Esses sintomas fito tóxicos incluem flacidez e clorose gradual até o deterioramento total, e finalmente, a morte (PÉREZ *et al.*, 2011).

O modo de ação do glifosato está relacionado à biossíntese de aminoácidos aromáticos da via shikimato. O shikimato é um precursor para os aminoácidos aromáticos fenilalanina, triptofano e tirosina nas plantas. A biossíntese destes aminoácidos essenciais é promovida pela enzima 5-enolpiruvil-shikimato-3-fosfato sintase (EPSPs), a enzima alvo do glifosato. Desta forma, o glifosato inibe a EPSPs por competição com o substrato PEP (fosfoenolpiruvato), evitando a transformação do shikimato em corismato, o último precursor comum na biossíntese destes compostos aromáticos. A via do shikimato representa aproximadamente 35% da massa da planta em peso seco e, portanto, qualquer interferência na via é altamente prejudicial para a planta (STENERSEN, 2004; ANNETT *et al.*, 2014).

Uma vez aplicado, o glifosato pode sofrer mineralização, imobilização ou lixiviação, mas não apresenta volatilização em grau significativo porque tem uma pressão de vapor extremamente baixa (AL-RAJAB e SCHIAVON, 2010). A mineralização do glifosato é considerada o mecanismo de degradação primário, resultando na produção de ácido aminometilfosfônico (AMPA), glicina e sarcosina (BAI e OGBOURNE, 2016). No entanto, o glifosato é quimicamente estável em água e não está sujeito a degradação fotoquímica (WHO, 2003). Desta forma, quando aplicado nas áreas agrícolas por pulverização, grande parte do herbicida pulverizado chega ao solo, onde apresenta rápida e alta taxa de adsorção pelos sedimentos e partículas do solo, que pode incidir na sua infiltração

para os corpos da água, atingindo diferentes organismos aquáticos não-alvos (ANNETT *et al.*, 2014). No entanto, a biodegradação microbiana do glifosato pode ocorrer no solo, nos sedimentos aquáticos e na água, sendo o principal metabólito o AMPA. A meia-vida do glifosato no solo varia de poucos dias até alguns meses, dependendo dos conteúdos de argila e matéria orgânica, assim como do nível de atividade microbiana (PESSAGNO *et al.*, 2008; TONI *et al.*, 2006). Uma vez na água, o glifosato passa a apresentar uma meia-vida de 7 a 14 dias (GIESY *et al.*, 2000) e em solução, adere ao material orgânico em suspensão, depositando-se no sedimento, passando a ser absorvido e acumulado pelos organismos aquáticos não-alvo, como peixes e invertebrados (PERUZZO *et al.*, 2008; MENSAH *et al.*, 2015).

A toxicidade do glifosato ainda é uma questão bastante controversa na literatura, pois não há consenso em relação à gravidade da toxicidade desse herbicida nos organismos não-alvo. Existem muitos estudos sobre a presença de glifosato no solo e em águas contaminadas, seu impacto em animais, intoxicação ou risco na saúde dos seres humanos, através da sua detecção em campo ou em estudos de laboratório (ANTONIOU *et al.*, 2012; KWIATKOWSKA *et al.*, 2014; MYERS *et al.*, 2016). Como exemplo desta controvérsia, trabalhos indicam o glifosato como um herbicida seguro com o mínimo de toxicidade humana e ambiental (WILLIAMS *et al.*, 2000; SOLOMON *et al.*, 2003; KIER e KIRKLAND, 2013); enquanto que outros trabalhos demonstram alterações na morfologia, fisiologia e bioquímica em diferentes órgãos de animais, após a exposição ao HBG (LEE *et al.*, 2000; CAVAS e KONEN, 2007; BENACHOUR e SÉRALINI, 2009; MODESTO e MARTINEZ, 2010; MENSAH *et al.*, 2014).

Além disso, estudos demonstram a potencialidade do glifosato como disruptor endócrino (ANKLEY *et al.*, 1998; MYERS *et al.*, 2016), contudo têm sido sugerido novos estudos toxicológicos, epidemiológicos e de biomonitoramento para determinar se os efeitos dos HBG são devidos realmente a atividade de desregulação endócrina.

Neste sentido, os efeitos das formulações à base de glifosato foram estudados em uma variedade de organismos, incluindo anfíbios (LAJMANOVICH *et al.*, 2011), répteis (BURELLA *et al.*, 2017) e aves (OLIVEIRA *et al.*, 2007). Em peixes, os estudos têm sido focados nos efeitos fisiológicos, bioquímicos e comportamentais, demonstrando que exposições subletais ao HBG induzem neurotoxicidade em *Cyprinus carpio* (CATTANEO *et al.*, 2011), danos no DNA em *Prochilodus lineatus* (MORENO; *et al.*, 2014), alterações nas células das brânquias e na expressão de proteínas do fígado em *Poecilia reticulatae* (ROCHA *et*

al., 2015; DOS SANTOS *et al.*, 2016) e mudanças do metabolismo em *Leporinus obtusidens*, *Rhamdia quelen* e *Odontesthes bonariensis* (SALBEGO *et al.*, 2010; GLUSCZAK *et al.*, 2007; MENÉNDEZ-HELMAN *et al.*, 2015).

Cabe destacar que a contaminação por concentrações subletais de HBG nem sempre é reconhecida em estudos toxicológicos, devido a que é difícil que ocorra a morte dos organismos pelo fato de que esse composto está presente em baixas concentrações no meio ambiente (GRISOLIGA, 2005). Além disso, não há consenso sobre as concentrações máximas aceitáveis de glifosato dissolvido na água, sendo que cada país tem sua própria regulamentação dos limites máximos permitidos. Por exemplo, a Comunidade Econômica Europeia (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 (EPA) estabelece o nível máximo de glifosato em água potável de 700 µg/L (USEPA, 2014). No Brasil, o Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA) na Resolução nº 357/05, estabelece que a concentração máxima permitida de glifosato é de 65 µg/L para água destinada ao consumo humano e à proteção das comunidades aquáticas (CONAMA, 2005).

1.3. OVÁRIO DE *Danio rerio* COMO ALVO DE TOXICIDADE.

O peixe-zebra, *Danio rerio* (Teleostei; Cyprinidae) foi descrito pelo médico escocês, Francis Hamilton, com auspícios da *British East India Company* (Hamilton, 1822) e introduzido como modelo animal na pesquisa científica pelo biólogo George Streisinger, professor da Universidade de Oregon (STREISINGER *et al.*, 1981).

É um peixe pequeno de água doce, endêmico de rios, córregos e corpos de águas pouco profundas do sudoeste da Ásia (PARICHY, 2015). Os adultos apresentam um comprimento total entre 3 a 4 cm, com vida média de três anos, atingem a maturidade sexual com 3 meses de vida e se reproduzem em temperatura média de 26-28°C (DAMMSKI e MÜLLER, 2011) (Figura 2 A).

Os ovários do *D. rerio* são órgãos pares alongados, situados bilateralmente entre a bexiga natatória, fígado e alças intestinais (VAN DER VEM E WESTER, 2012) e um oviduto que conduz os ovócitos até a abertura genital (MENKE *et al.*, 2011) (Figura 2 B e 2C).

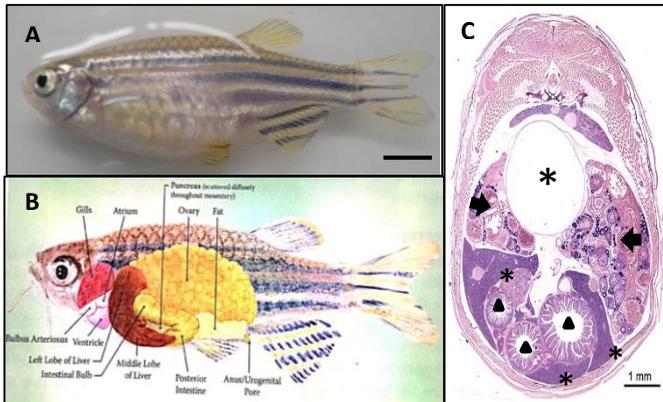


Figura 2: A) Fêmea adulta de *D. rerio*. Fonte: ARMILIATO, 2014. Escala: 0,5 cm. B) Cavidade celômica de fêmea adulta de *D. rerio*. Fonte: The Zebrafish Anatomy Poster. AALAS 2007. C) Secção transversal de fêmea adulta de *D. rerio*. Folículos ovarianos (Setas pretas), fígado (*), alças intestinais (Δ) e bexiga natatória (**). Coloração HE. Fonte: VAN DER VEM E WESTER, 2012.

Por sua vez, são reconhecidos nos ovários os folículos ovarianos, que são constituídos pelos ovócitos (células germinativas) envoltos pelo envelope vitelínico e pelas células foliculares (células somáticas) (LESSMAN, 2009). Além disso, o ovário é um órgão extremamente dinâmico em que os folículos apresentam maturação assíncrona, de maneira que são observados concomitantemente folículos em todos os estágios de maturação ovariana sendo que as células germinativas maduras podem ser geradas durante todo o ano (CLELLAND e PENG, 2009).

A ovogênese dos peixes teleósteos inicia com a diferenciação das células germinativas primordiais em ovogônias e prossegue com os eventos sequenciais de divisão e diferenciação dos ovócitos e da maturação dos folículos ovarianos sendo que ao final do processo a célula germinativa madura é liberada do ovário (LUBZENS *et al.*, 2010).

Nos folículos ovarianos do *D. rerio* podem ser distinguidos dois estágios: de crescimento e maturação, os quais são regulados principalmente através da ação dos hormônios (CLELLAND e PENG, 2009). A etapa de crescimento corresponde a vitelogênese, na qual o acúmulo de vitelo ocorre de forma gradual, acompanhado pelo aumento no diâmetro dos ovócitos e por mudanças nas características do citoplasma. Além disso, na etapa de maturação ocorre o início da formação do envelope vitelínico pela deposição de matriz extracelular

entre o ovócito e as células foliculares. Também, durante essa fase ocorre a incorporação de outras moléculas, tais como lipídeos e proteínas (LESSMAN, 2009; LUBZENS *et al.*, 2010).

Uma dessas proteínas que os ovócitos incorporam através de endocitose mediada por receptor é a vitelina, que serve como fonte nutritiva de aminoácidos e lipídeos para o embrião. A vitelina é produzida a partir da lipoproteína vitelogenina que é sintetizada no fígado nos vertebrados, onde é ligada a lipídeos, fosforilada, glicosilada e transportada à corrente sanguínea. Uma vez internalizada nos ovócitos, a vitelogenina é proteoliticamente clivada em vitelina e fosvitina (ROMANO *et al.*, 2004; SUN e ZHANG, 2015).

Tendo em conta que a vitelogênese desempenha um papel importante no crescimento dos ovócitos, segundo ARMILIATO (2014) podem ser reconhecidas três fases de ovócitos em peixe-zebra: i) ovócitos pré-vitelogênicos I (PreI), que apresentam um núcleo grande com nucléolos e citoplasma homogêneo sem grânulos de vitelo; ii) ovócitos pré-vitelogênicos II (PreII), caracterizados principalmente pela presença de grânulos de vitelo acumulados no citoplasma, núcleo volumoso e com muitos nucléolos periféricos; iii) ovócitos vitelogênicos (Vit), que apresentam uma grande quantidade de grânulos de vitelo no citoplasma, núcleo que pode ou não ser reconhecível, envelope vitelínico com estriações e a organização de duas camadas de células foliculares (Figura 3).

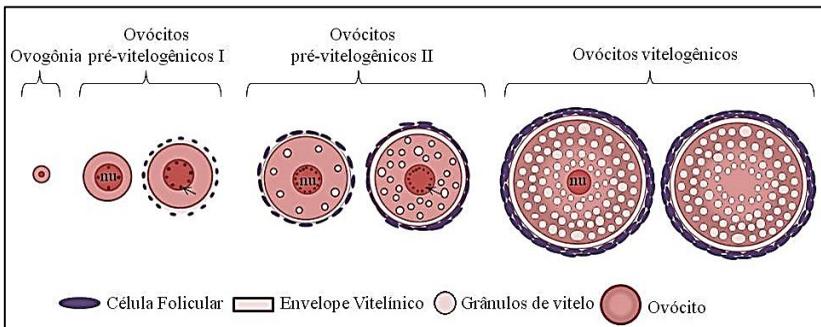


Figura 3: Representação da maturação do folículo ovariano de *D. rerio*. Ovógonia, ovócitos pré-vitelogênicos I, ovócitos pré-vitelogênicos II e ovócitos vitelogênicos. Nucléolos (seta). Núcleo (nu). Fonte: Veloso da Silva, 2017.

Particularmente, os índices sugeridos pela OECD (do inglês, *Organisation for Economic Co-operation and Development*, 2009) para avaliar a toxicidade reprodutiva usando peixe-zebra é focada em: (1)

índice gonadossomático (IGS) (BRION *et al.*, 2004); (2) capacidade de reprodução: quantidade da postura de ovos (DENG *et al.*, 2010) e qualidade do esperma (LOPES *et al.*, 2014); (3) histologia das gônadas (LEAL *et al.*, 2009); (4) expressão da vitelogenina (VUTUKURU *et al.*, 2016); e (5) expressão gênica do eixo hipotálamo-pituitário-gonadal (HPG) (ZHANG *et al.*, 2016)

Embora os indivíduos adultos pareçam ser menos sensíveis do que os embriões à desregulação endócrina, os EDC (compostos de disrupção endócrina) ainda tem um efeito negativo sobre gônadas de peixe-zebra adulto. Estudos analisaram uma série de efeitos resultantes da disrupção endócrina, incluindo baixa percentagem de espermatozoides e aumento no número de espermatócitos (UREN-WEBSTER *et al.*, 2010), diminuição da proporção de ovócitos vitelogênicos (HALDÉN *et al.*, 2011) e aumento do número de folículos atrésicos (DAOUK *et al.*, 2011). Além disso, na geração F1 após exposição parental a EDC, como bifenilos policlorados e o diclorodifeniltricloroetano (DDT), apresentaram gônadas malformadas, diminuição no desenvolvimento dos folículos ovarianos, acompanhado pelo aumento de apoptose de células da granulosa em peixe-zebra (KRAUGERUD *et al.*, 2012). HU *et al.*, (2010) detectaram túbulos seminíferos anormais, produção de espermatozoides reduzida e hiperplasia de células de Leydig na prole de peixes-zebra machos após exposição dos progenitores ao dibutilftalato. Portanto, a transferência materna de EDCs aos ovos tem efeitos prejudiciais sobre a reprodução e a prole.

Além disso, resultados de investigações recentes na espécie *D. rerio* demonstraram que, o HBG atua como um inibidor da acetilcolinesterase no cérebro e no músculo (SANDRINI *et al.*, 2013), induz neurotoxicidade no cérebro de embriões (ROY *et al.*, 2016), bem como efeitos nocivos sobre os parâmetros reprodutivos em machos. Também foi observado danos no DNA dos espermatozoides, reduzindo a integridade da membrana mitocondrial e funcionalidade, diminuição da motilidade, assim como impactos sobre a sobrevivência do embrião com aumento na taxa de mortalidade nos estágios iniciais (UREN-WEBSTER *et al.*, 2014; LOPES *et al.*, 2014). No entanto, revisões de bibliografia mostram escassez de estudos desenvolvidos com o objetivo de avaliar os aspectos morfológicos, bioquímicos e fisiológicos do ovário de peixes expostos ao HBG. Recentemente, no estudo realizado no Laboratório de Reprodução e Desenvolvimento Animal/CCB/UFSC, desenvolvido por ARMILIATO *et al.*, (2014), usando fêmeas da espécie *D. rerio* que foram expostas ao HBG (0,065 mg/L), foi demonstrado que a concentração regulamentada

para os rios do Brasil foi suficiente para causar alterações ultraestruturais e bioquímicas nos ovários deste animal.

1.4. *Danio rerio* COMO MODELO EXPERIMENTAL EM ESTUDOS TOXICOLÓGICOS.

Dentre os organismos aquáticos, o uso de peixes como bioindicadores de efeitos de contaminantes, está sendo cada vez mais frequente, uma vez que tal prática pode ajudar a detectar possíveis impactos ambientais (LASHEEN *et al.*, 2012) assim como no ser humano, já que as respostas celulares, moleculares e bioquímicas nos peixes são similares às aquelas encontradas em mamíferos (HE *et al.*, 2014; DUBINSKA-MAGIERA *et al.*, 2016).

Na atualidade, o *D. rerio* é considerado um organismo modelo de vertebrado amplamente utilizado em ciências biológicas, em diferentes áreas de pesquisa como genética, biologia do desenvolvimento e toxicologia (CARVAN *et al.*, 2005; SEGNER, 2009; BASU e SACHIDANANDAN, 2013). Esse animal tem uma série de características favoráveis para a manipulação experimental, tais como i) porte pequeno, ii) fertilização externa iii) desenvolvimento embrionário rápido, iv) capacidade de se reproduzir a cada 1-4 semanas, v) prole numerosa, onde a desova apresenta cerca de 200-300 ovos, e vi) as larvas e os indivíduos adultos podem ser mantidos a uma densidade elevada em aquários de laboratório (DAMMSKI e MÜLLER, 2011; HILL, 2005; SPENCE *et al.*, 2008). Ao mesmo tempo existe uma grande variedade de ferramentas e informações disponíveis para o estudo desta espécie, incluindo a disponibilidade da sequência do seu genoma (SEGNER, 2009). Além disso, a sua fundamental característica como um organismo modelo é que, como um vertebrado, pode ser mais comparável aos seres humanos do que outros modelos de invertebrados como *Drosophila melanogaster* (BARBAZUK *et al.*, 2000). Também, o uso do *D. rerio* está alinhado com a abordagem "3Rs" (Reduzir, Reciclar e Reutilizar) do uso animal para fins científicos (VLIAGENTHART *et al.*, 2014).

D. rerio possui 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 (CLAIR *et al.*, 2012; ARMILIATO *et al.*, 2014; UREN-WEBSTER *et al.*, 2014). Vários testes de toxicidade e efeitos farmacológicos já foram descritos neste modelo (GOLDSMITH, 2004; CARNEY *et al.*, 2006; DUBINSKA-MAGIERA *et al.*, 2016). Desta forma, a espécie de peixe *D. rerio* mostra-se adequada para trabalhos em condições laboratoriais,

além de ser amplamente reconhecida como um bom modelo para estudos de toxicidade (CARVAN *et al.*, 2005; HILL, 2005; HE *et al.*, 2014).

D. rerio tem sido sugerido também como espécie modelo para estudar EDC, assim como na detecção, avaliação dos efeitos e na identificação dos mecanismos que alteram o sistema endócrino (ANKLEY e JOHNSON, 2004). Considerando que os resultados de muitos estudos dos EDC ambientais mostram a interferência sobre sistema de hormônios sexuais dos vertebrados (SCHOLZ; KLÜVER, 2009), a maioria dos estudos de EDC em *D. rerio* foi direcionado à avaliação do possível comprometimento da diferenciação sexual e da reprodução (HUANG *et al.*, 2014). Neste sentido, o desenvolvimento gonadal é altamente sensível a substâncias que podem perturbar os hormônios sexuais, danificar as gônadas, afetar diretamente a fertilidade e a fecundação dos peixes, de maneira que estudos morfológicos destes órgãos são utilizados para testar os efeitos tóxicos dos EDC sobre a reprodução (LEE *et al.*, 2015).

Assim, o presente estudo tem como hipóteses que as diferentes concentrações do herbicida glifosato Roundup® WG provocam toxicidade reprodutiva induzindo alterações morfológicas e ultraestruturais no ovário de *D. rerio*. Para tal se considera que:

- O glifosato causa alterações nas células foliculares e nos ovócitos de peixes expostos.
- A maior concentração de glifosato utilizada no presente estudo altera o conteúdo da proteína vitelina e proteínas envolvidas na fissão e fusão mitocondrial.

Finalmente, considerando o amplo uso do glifosato no Brasil, sua entrada e permanência em corpos d'água, bem como seu impacto em organismo não alvos, como os peixes, a controvérsia em relação a sua toxicidade e escassez de estudos em ovários de peixes, o presente estudo teve como foco investigar a toxicidade celular do herbicida à base de glifosato, Roundup® WG, nos ovários de *D. rerio*.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Caracterizar a toxicidade do Roundup® WG sobre a morfologia, ultraestrutura e proteínas envolvidas na função ovariana do peixe-zebra, *D. rerio*.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar a toxicidade aguda do Roundup® WG: Concentração letal média (CL₅₀) para *D. rerio*;
- Avaliar a biometria corporal e ovariana de *D. rerio* expostos e não expostos a diferentes concentrações do Roundup® WG;
- Comparar a morfometria dos ovócitos de *D. rerio* expostos e não expostos a diferentes concentrações do Roundup® WG;
- Analisar a ultraestrutura dos ovócitos, das células foliculares e do envelope vitelínico de *D. rerio* após a exposição a diferentes concentrações do Roundup® WG;
- Determinar se o Roundup® WG altera os níveis da proteína vitelina nos ovários de *D. rerio*;
- Determinar se o Roundup® WG altera os níveis das proteínas envolvidas com fissão e fusão mitocondrial nos ovários de *D. rerio*.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 OBTENÇÃO DOS ANIMAIS E ACLIMATAÇÃO.

Neste trabalho foram utilizadas fêmeas adultas da espécie *D. rerio* da linhagem *Wild-Type*, com comprimento médio de 2,4 cm ($\pm 0,6$) e massa corporal de 270 mg (± 11) obtidas 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. Os animais foram mantidos com aeração contínua, em condições controladas de temperatura ($26 \pm 1^\circ\text{C}$), fotoperíodo 12:12 h e pH 7 ($\pm 0,5$). Os parâmetros de qualidade da água dos aquários, como temperatura e pH foram monitorados diariamente e semanalmente, respectivamente, e os peixes foram alimentados diariamente com ração comercial para peixe (Alcon Base®). Antes de cada experimento, os peixes foram aclimatados durante 7 dias.

Todos os experimentos foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA-UFSC), projeto número 5466040416/2016 (ANEXO A). As análises foram realizadas no LRDA, Laboratório Central de Microscopia - LCME/UFSC, e nos Laboratórios Multiusuários de Estudos em Biologia - LAMEBs.

3.2 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL.

Para a determinação da toxicidade do Roundup® WG foram realizados testes de toxicidade aguda por 96h e subcrônica por 15 dias de exposição. Foram desenvolvidos testes de acordo com a OECD (1992) para avaliar a toxicidade aguda através do cálculo da CL_{50} . A CL_{50} é definida como a concentração que mata 50% dos animais expostos. Para isso, os peixes foram expostos ao herbicida à base de glifosato, formulação comercial, Roundup® WG (Monsanto do Brasil Ltda., contendo 720 g de glifosato/Kg) por um período de 96 h em condições semi-estáticas, isto é, com renovação total da solução teste a cada 24 h. Foram utilizados 4 peixes por aquário de 2 L de água dechlorada, em aeração constante, temperatura controlada ($26 \pm 1^\circ\text{C}$) e fotoperíodo 12:12 h. A alimentação foi suspensa 24 h antes e durante o período de exposição ao agrotóxico (OECD, 1992) e os parâmetros físico-químicos da água foram monitorados diariamente.

As concentrações utilizadas para avaliar a toxicidade aguda foram 10, 35, 45, 55 e 65 mg/L de glifosato contidas no herbicida Roundup® WG. O grupo controle foi mantido em água dechlorada e filtrada e submetido às mesmas condições dos grupos tratados sendo renovada a água a cada 24 h. Todos os testes foram realizados em triplicatas independentes. A mortalidade foi registrada em 6, 12, 24, 48, 72 e 96 h após o início do teste, para a determinação da CL₅₀ após 96 h. O valor de CL₅₀ 96 h e os seus correspondentes limites de confiança de 95% foram calculados usando o programa PriProbit versão 1.63 (SAKUMA, 1998).

Por outro lado, para avaliar a toxicidade subcrônica do Roundup® WG, fêmeas de *D. rerio* foram divididas em quatro grupos experimentais/tratamentos: três concentrações de Roundup® WG e um grupo controle não exposto, que foram mantidos nas mesmas condições de temperatura, pH, fotoperíodo 12:12 h e alimentação.

As concentrações utilizadas foram: 0,065 mg/L; 0,65 mg/L e 6,5 mg/L de glifosato contido no herbicida, Roundup® WG. Para preparar as diferentes concentrações, o agroquímico foi diluído a partir de uma solução estoque em água dechlorada. É importante salientar que 0,065 mg/L é a concentração máxima permitida pelo CONAMA (2005). As outras concentrações subletais foram escolhidas multiplicando por um fator de 10 a partir da concentração máxima permitida pelo CONAMA.

As fêmeas foram expostas durante 15 dias, na densidade de 2 peixes/L em aquários de 10 L, contendo água corrente dechlorada. O experimento foi realizado em triplicata e em condição semi-estática, sendo que 50% da água dos aquários foi trocada a cada 4 dias para a renovação das concentrações de glifosato (GHOLAMI-SEYEDKOLAEI *et al.*, 2013). Definiu-se um período de 15 dias de exposição das fêmeas de *D. rerio* ao glifosato, com base nos valores estimados de meia-vida do herbicida em água, que corresponde a um período de 7 a 14 dias (GIESY *et al.*, 2000). Este período de exposição também foi determinado considerando o protocolo da Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos da América (USEPA, do inglês *United States Environmental Protection Agency*) que estabelece 14 dias para testes de toxicidade de substâncias com potencial de desregular o sistema endócrino (ANKLEY *et al.*, 1998).

As fêmeas (n = 5/tratamento em triplicata) expostas ao Roundup® WG por 15 dias foram submetidas à eutanásia por decapitação de acordo com CONCEA (2013). Em seguida, os peixes foram pesados e dissecados para obtenção dos ovários, os quais foram destinados para as diferentes técnicas.

Após cada experimento, a água com Roundup® WG diluído dos aquários 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 OVARIANA.

Para obtenção dos dados biométricos, foram obtidas as medidas de massa corporal (mg) e dos ovários (mg) de 60 fêmeas de *D. rerio* (n = 5/tratamento em triplicatas). Essas medidas foram utilizadas para o cálculo do Índice gonadossomático (IGS), através da fórmula: (massa do ovário/massa da fêmeas) x 100.

3.4 ANÁLISES MORFOLÓGICAS E MORFOMÉTRICAS POR MICROSCOPIA DE LUZ.

3.4.1 Preparo das amostras.

Os ovários (n = 3 fêmeas/tratamento em triplicatas) foram fixados em solução de formol 10% por 24 h e logo conservados em álcool 70%. Os ovários foram desidratados em série alcoólica crescente 70, 80, 90 e 100% e diafanizados em xilol, incluídos em paraplast e seccionados a 8 µm. As secções foram desparafinizadas em xilol e hidratadas em série alcoólica decrescente 100% - 70%, para posterior realização das colorações com hematoxilina-eosina (HE) ou técnica de imuno-histoquímica.

3.4.2 Biometria e classificação dos ovócitos.

Para a análise em microscopia de luz, as secções dos ovários (n = 3 fêmeas/tratamento em triplicatas) foram coradas com HE. Para isso, após desparafinização e reidratação, as secções foram lavadas em água destilada e coradas com Hematoxilina de Harris, lavadas com água destilada e coradas com eosina aquosa. Na sequência, as secções foram lavadas em água destilada, desidratadas em série alcoólica 70 – 100% e diafanizados em xilol, para montagem das lâminas com Entellan® (Merck, Millipore). Após, as secções dos ovários foram analisadas ao microscópio de luz (4X e 10X). Para as análises morfométricas, como o diâmetro das células germinativas (µm), e a quantificação das mesmas, foram realizadas com auxílio do *software* Image-J, NIH (RASBAND, 1997). As características morfológicas, como o tamanho da célula, a presença e distribuição de grânulos de vitelo, a presença de nucléolos e o envelope vitelínico visível foram utilizadas como características

morfológicas para a classificação das células germinativas em três tipos distintos de ovócitos: pré-vitelogênico I, pré-vitelogênico II e vitelogênico, de acordo com ARMILIATO (2014). As lâminas foram analisadas usando o Microscópio Olympus BX41 (Laboratório Central de Microscopia Eletrônica/UFSC).

3.4.3 Marcações celulares por imuno-histoquímica.

Para marcação da proteína Vitelina por imuno-histoquímica, as secções foram desparafinizadas, hidratadas e lavadas em tampão fosfato salino (PBS, do inglês, *phosphate buffered saline*) 0,1 M, pH 7,4, sendo a atividade das peroxidases endógenas bloqueadas pelo peróxido de hidrogênio em metanol (1:2). Em seguida, as secções foram permeabilizadas em PBS + Triton X-100 a 0,3% e incubados com albumina sérica bovina a 5% (BSA, do inglês *bovine serum albumin*) para inativar sítios inespecíficos, por 1 h, para posterior incubação com anticorpo primário (Tabela 1) a 4°C por 12 h. Na sequência, as secções foram lavadas em PBS e incubadas a temperatura ambiente por 90 min com anticorpo secundário compatíveis com o anticorpo primário utilizado. Os controles negativos foram tratados da mesma maneira descrita acima, exceto pela incubação com os anticorpos primários, que serão substituídos por PBS.

3.5 Análises ultraestruturais por microscopia eletrônica de transmissão.

Para avaliação ultraestrutural, os ovários (n = 2 fêmeas/tratamento em triplicata), foram fixados em glutaraldeído a 2,5% e paraformaldeído a 4% por aproximadamente 1h em temperatura ambiente, seguida da pós-fixação com solução de tetróxido de ósmio a 1% em tampão cacodilato de sódio a 0,1 M e pH 7,4. Na sequência, a desidratação foi realizada em série crescente de etanol e a infiltração foi feita em resina Spurr. Após a polimerização da resina, os blocos confeccionados foram cortados em ultramicrótomo para a obtenção de cortes semifinos (500 nm - 1µm) e ultrafinos (60 -70 nm). As secções semifinas foram coradas com solução de azul de toluidina 1% e observadas ao microscópio de luz para controle da orientação e observação da qualidade do material para posterior realização das secções ultrafinas. As secções ultrafinas foram coletadas em grades mesh (300), contrastadas com acetato de uranila 5% e citrato de chumbo 1% por 5 minutos e observadas ao microscópio eletrônico de

transmissão Jeol JEM 1011 (Laboratório Central de Microscopia Eletrônica/UFSC).

A contagem das mitocôndrias foi realizada na região cortical dos ovócitos, onde foram analisados 15 ovócitos em cada tratamento. Em cada ovócitos foram avaliados três campos, de maneira que no total do presente estudo foram examinados 180 campos. Utilizando a mesma metodologia foi avaliada a presença de mitocôndrias alteradas nos ovócitos bem como a obtenção do escore de severidade.

Tabela 1: Anticorpos primários e secundários utilizados nas técnicas de imuno-histoquímica e *Western blotting*.

Anticorpo		Isotipo	Diluição		Marca
			Imuno	W.B.	
Anti-Vitelina	Primário	IgG	1:100	1:500	*
Anti-Coelho	Secundário		1:200	1:2000	Santa Cruz
Anti β -Actina C4	Primário	IgG	-	1:2500	Santa Cruz
Anti-Mouse	Secundário		-	1:3000	Sigma
Anti-Drp1	Primário	IgG	-	1:500	Santa Cruz
Anti-Coelho	Secundário		-	1:2000	
Anti-Mfn1	Primário	IgG	-	1:500	Santa Cruz
Anti-Coelho	Secundário		-	1:2000	
Anti-Mfn2	Primário	IgG	-	1:500	Santa Cruz
Anti-Coelho	Secundário		-	1:2000	

*Doado pela Dra. Esther Lubzens da *Israel Oceanographic and Limnological Research*

3.6 Análises por *Western blotting*.

Inicialmente, a técnica de *Western blotting* foi realizada para verificar a especificidade do anticorpo anti-vitelina utilizando amostras de ovário e músculo de *D. rerio*. Seguidamente, esta técnica foi realizada também, para quantificar os níveis de vitelina nos ovários de *D. rerio* expostos ao Roundup® WG por 15 dias (n = 3 fêmeas/tratamento).

Os ovários foram homogeneizados a 4°C em solução tampão (20mM Tris-HCl, pH 7.5 contendo 100mM NaCl, 10mM EDTA e 1mM PMSF) de acordo com WANG *et al.*, (2015) em uma proporção de 1:10. Após a homogeneização, os homogenatos foram centrifugados durante 20 min a 13.000 g a 4° C. O sobrenadante foi separado e armazenado a -20°C, enquanto que o precipitado foi descartado. A quantificação das proteínas totais de cada amostra foi realizada pelo método LOWRY *et al.*, (1951).

Para a eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE), uma mesma quantidade de proteínas (40 µg/poço) foi misturada com *Loading Buffer* 2x (Para 10 ml: 1,25 ml de Tris-HCl 1M, pH 6,8; 0,6 g de SDS; 2,5 ml de Glicerol; 1 ml de β-mercaptoetanol; 0,01 g de azul de bromofenol) e aquecida em banho seco a 100° C durante 5 min. O marcador de peso molecular utilizado foi Gibco BRL (26-041020). Logo, as proteínas foram separadas utilizando gel de acrilamida (de entrada de 5% e de separação a 12%) aplicando uma voltagem de 120 V durante 1h em tampão de eletroforese (25 mM Tris Base, 192 mM glicina, 0,1% SDS, pH 8,3).

Após a eletroforese, as proteínas foram transferidas para membranas de nitrocelulose e para o bloqueio de sítios de ligação inespecífica do anticorpo, as membranas foram incubadas em solução TBST-T/leite (TBS 1X; 0,1% de Tween20 e 5% leite desnatado) durante 1 h a 4° C. Posteriormente, as membranas foram lavadas em tampão TBS e incubadas com anticorpo primário (Tabela 1) a 4° C por 12 h sob agitação. Após incubação, as membranas foram lavadas em TBST e incubadas com anticorpo secundário (Tabela 1) à temperatura ambiente durante 1 h sob agitação. As membranas foram reveladas utilizando Fotodocumentador ChemiDoc MP (BioRad, LAMEB).

Da mesma forma, a técnica de *Western Blotting* também foi realizada para avaliar o conteúdo de Drp1, Mfn1 e Mfn2 nos ovários de *D. rerio* expostos ao Roundup® WG por 15 dias.

A intensidade das bandas foi quantificada utilizando *software* ImageLab 4.1 (BioRad) e os resultados foram expressos como unidades arbitrárias em relação à intensidade da banda de proteínas totais.

3.7 Análise estatística.

Os resultados obtidos a partir das análises realizadas foram apresentados como média e erro padrão. Foram verificada a normalidade dos dados e a homogeneidade das varianzas. Diferenças significativas entre os grupos foram avaliadas através da análise de variância ANOVA de uma-*via*, seguida do teste *post-hoc* de Tukey ($p < 0,05$). As análises

foram realizadas no programa estatístico R® versão gratuita 3.2.5 para Windows.

4 RESULTADOS

No presente estudo, os resultados da avaliação após exposição ao Roundup® WG em *D. rerio* foram divididos em toxicidade aguda para determinar a CL_{50} e em toxicidade subcrônica para avaliar os efeitos nos ovários após 15 dias de exposição.

4.1 TOXICIDADE AGUDA DO ROUNDUP® WG PARA *D. rerio*.

Para avaliar a toxicidade aguda do Roundup® WG foi registrada a mortalidade de *D. rerio* para cada concentração em 6, 12, 24, 48, 72 e 96 h após o início dos testes. Tanto no grupo controle como nas primeiras 6 horas do experimento não foi observada mortalidade.

Os sintomas apresentados pelos animais antes de morrer foram a perda da capacidade natatória, subsequente a perda do equilíbrio, e perda do movimento ocular. Os animais submetidos à concentração de 10 mg/L em todos os experimentos realizados não morreram nem apresentaram efeitos observáveis descritos acima.

Os resultados obtidos após 48 e 72 h de exposição ao Roundup® WG mostraram um aumento no número de mortos dependente do aumento da concentração do herbicida, mostrando uma relação positiva (Figura 4). No entanto, a mortalidade observada a partir da concentração de 45 mg/L do Roundup® WG em 72 h foi maior quando comparada às 24 h de exposição.

O teste de toxicidade aguda após 96 horas indicou que a maior porcentagem de morte dos animais ocorre na maior concentração de glifosato testada (65 mg/L) a partir das 24 horas e na concentração de 55 mg/L a partir das 48 horas. A concentração letal média (CL_{50}) determinada a 96 h foi de 42,61 mg/L com um intervalo de confiança 95% = [39; 46 mg/L] (Figura 5).

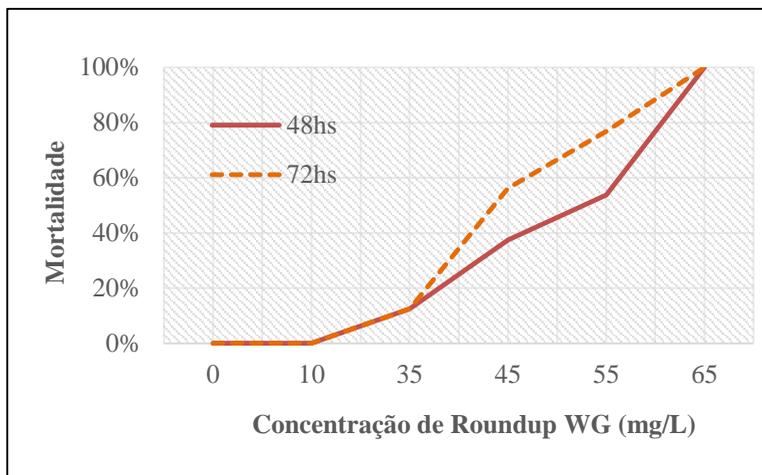


Figura 4: Curva concentração-resposta em 48 e 72 horas. Mortalidade de *D. rerio* após exposição a diferentes concentrações do Roundup® WG.

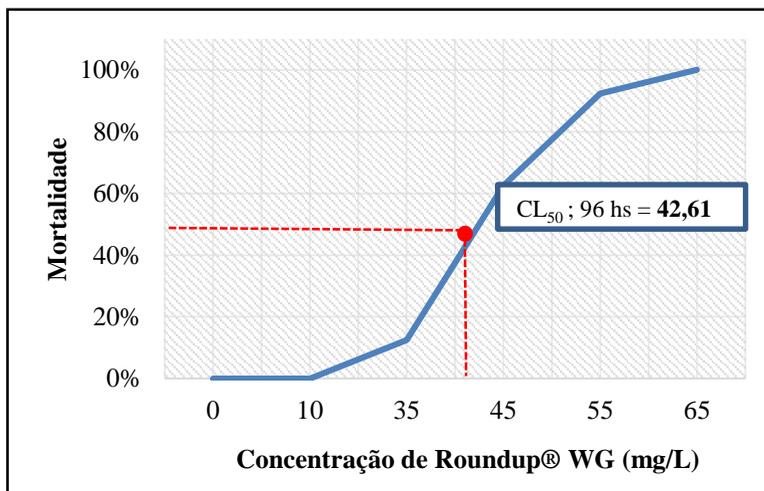


Figura 5: Concentração Letal Média (CL₅₀) para *D. rerio* após a exposição ao Roundup® WG após 96 horas. O cálculo do CL₅₀ foi realizado com o programa PriProbit versão 1,63 (SAKUMA, 1998).

4.2 TOXICIDADE SUBCRÔNICA DO ROUNDUP® WG EM OVÁRIOS DE *Danio rerio*.

Para avaliar a toxicidade subcrônica do Roundup® WG foram utilizadas no total 60 fêmeas com massa corporal média de 270 mg (± 11) e com massa ovariana média de 12,55 mg (± 1).

4.2.1 Biometria corporal e ovariana e IGS após a exposição ao Roundup® WG.

Após a exposição ao Roundup® WG, as fêmeas no grupo controle apresentaram massa corporal média de 276 mg (± 23), que não diferiu dos demais grupos expostos, os quais apresentaram média de 316 mg (± 19) no grupo exposto a 0,065 mg/L, de 254 mg (± 21) no grupo exposto a 0,65 mg/L e de 233 mg (± 21) no grupo exposto a 6,5 mg/L (Figura 6).

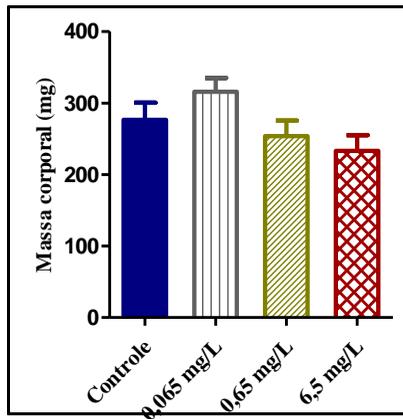


Figura 6: Massa corporal das fêmeas de *D. rerio* após exposição ao Roundup® WG por 15 dias. Os dados representam a média \pm erro padrão. (ANOVA de uma via, $p > 0,05$); $n = 5$ fêmeas/tratamento em triplicata independentes.

Em relação à massa dos ovários após os 15 dias do experimento, o grupo controle apresentou uma massa de 11,30 mg ($\pm 1,05$) que não diferiu dos demais grupos, que apresentaram média de 15,60 mg ($\pm 2,79$) no grupo exposto a 0,065 mg/L, de 11,48 mg ($\pm 1,91$) no grupo exposto a 0,65 mg/L e de 11,82 mg ($\pm 1,84$) no grupo 6,5 mg/L (Figura 7).

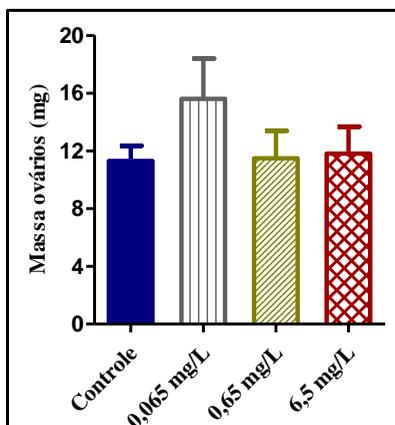


Figura 7: Massa dos ovários de *D. rerio* após exposição ao Roundup® WG por 15 dias. Os dados representam a média \pm erro padrão. (ANOVA de uma via, $p > 0,05$); $n = 5$ fêmeas/tratamento em triplicata independentes.

Em consequência, quando calculado o IGS, foi observado que os grupos expostos ao Roundup® WG (0,065 mg/L = $4,69 \pm 0,55$; 0,65 mg/L = $4,49 \pm 0,45$; 6,5 mg/L = $5,5 \pm 0,78$) também não diferiram em relação ao grupo controle $4,45 (\pm 0,58)$ (Figura 8).

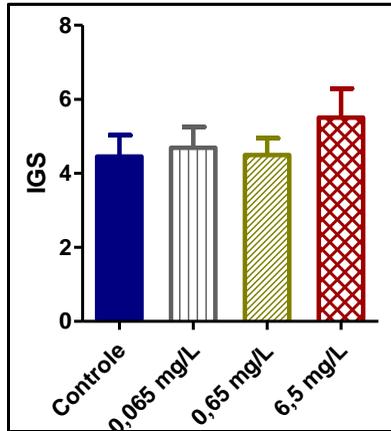


Figura 8: Índice gonadosomático dos ovários de *D. rerio* após exposição ao Roundup® WG por 15 dias. Os dados representam a média \pm erro padrão. (ANOVA de uma via, $p > 0,05$); $n = 5$ fêmeas/tratamento em triplicata independentes.

4.2.2 Morfometria dos ovócitos: Classificação, número e diâmetro após a exposição ao Roundup® WG.

Devido a que o processo de maturação dos ovócitos em *D. rerio* é assincrônico, foram observados folículos com ovócitos em diferentes fases de maturação em todos os grupos analisados. Em relação à morfologia e estrutura dos ovócitos, não foram identificadas alterações morfológicas nos ovócitos das fêmeas expostas ao Roundup® WG (Figura 9).

Os ovócitos presentes nos folículos ovarianos de *D. rerio* foram classificados em três tipos distintos: pré-vitelogênico I (Pre-I), com um grande núcleo com vários nucléolos e citoplasma homogêneo; pré-vitelogênico II (Pre-II) caracterizados principalmente pela presença de grânulos de vitelo acumulado no citoplasma; e vitelogênicos (Vit), com grande quantidade de grânulos de vitelo no citoplasma, e um núcleo não distinguíveis (Figura 10).

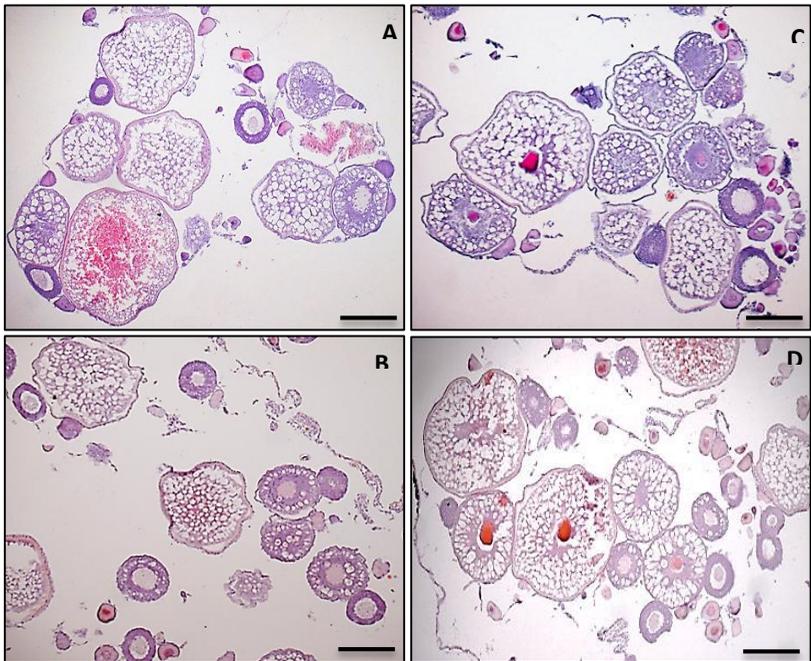


Figura 9: Morfologia dos ovócitos de *D. rerio* após exposição ao Roundup® WG por 15 dias. A: Controle. B: 0,065 mg/L. C: 0,65 mg/L. D: 6,5 mg/L. HE. Escala: 200 µm.

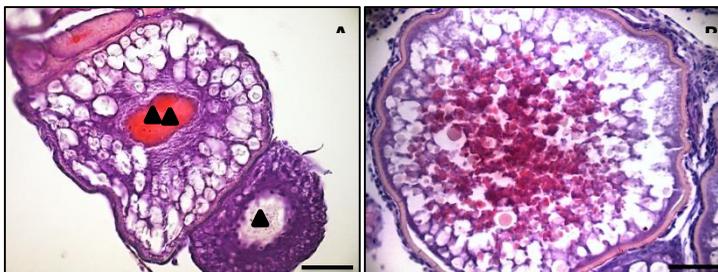


Figura 10: Classificação de ovócitos de *D. rerio*. A) Pré-vitelogênico I (▲) e Pré-vitelogênico II (▲▲); B) Vitellogênico. HE. Escala: 50 µm.

Contudo, o número médio de ovócitos (pré-vitelogênico I, pré-vitelogênico II e vitelogênicos) nos grupos expostos ao Roundup® WG não diferiu significativamente em relação ao grupo controle (Figura 11).

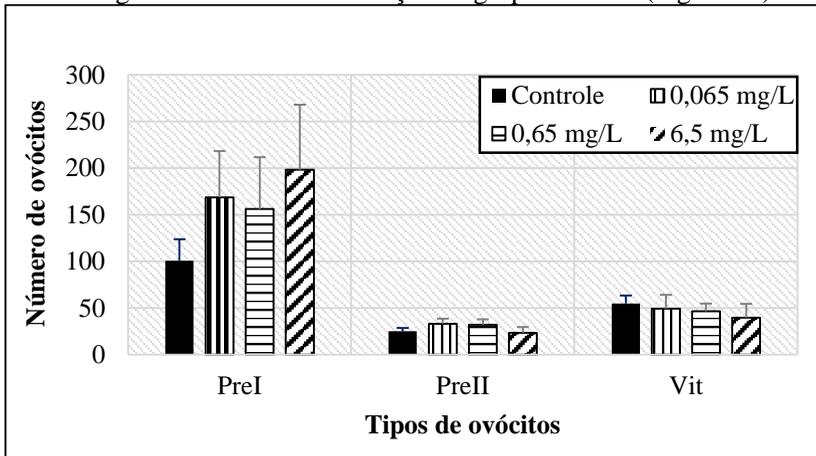


Figura 11: Numero de ovócitos PreI, PreII e Vit em ovários de *D. rerio* após exposição ao Roundup® WG por 15 dias. Os dados foram expressos como média \pm erro padrão (ANOVA); $n = 3$ fêmeas/tratamento em triplicata independentes.

Adicionalmente, a análise da morfometria dos ovócitos demonstrou uma diminuição significativa no diâmetro dos ovócitos pré-vitelogênico I das fêmeas expostas a 0,065 mg/L ($57,41 \mu\text{m} \pm 0,72$; $p < 0,001$), 0,65 mg/L ($52,90 \mu\text{m} \pm 0,71$; $p < 0,0001$) e 6,5 mg/L ($50,02 \mu\text{m} \pm 0,64$; $p < 0,00001$), quando comparados com o grupo controle ($61,53 \mu\text{m} \pm 1,08$).

Os diâmetros dos ovócitos pré-vitelogênico II apresentaram diminuição significativa no grupo exposto a 0,65 mg/L ($133,32 \mu\text{m} \pm 2,70$; $p < 0,0001$) e 6,5 mg/L ($134,91 \mu\text{m} \pm 3,28$; $p < 0,001$), quando comparados com o grupo controle ($149,824 \mu\text{m} \pm 3,7$). Enquanto que, o grupo tratado com 0,065 mg/L ($149,80 \mu\text{m} \pm 2,90$; $p = 0,99$) não diferiu do grupo controle.

Por último, os ovócitos vitelogênicos apresentaram diminuição significativa apenas no diâmetro dos ovócitos das fêmeas expostas a 0,65 mg/L ($220,73 \mu\text{m} \pm 4,87$; $p < 0,001$), quando comparados com o grupo controle ($251,07 \mu\text{m} \pm 3,37$). Contudo, nos outros dois grupos expostos a 0,065 mg/L ($250 \mu\text{m} \pm 4,76$; $p = 0,99$) e 6,5 mg/L ($240,07 \mu\text{m} \pm 5,68$; $p = 0,34$) não foram observadas diferenças significativas quando comparados com o grupo controle (Figura 12).

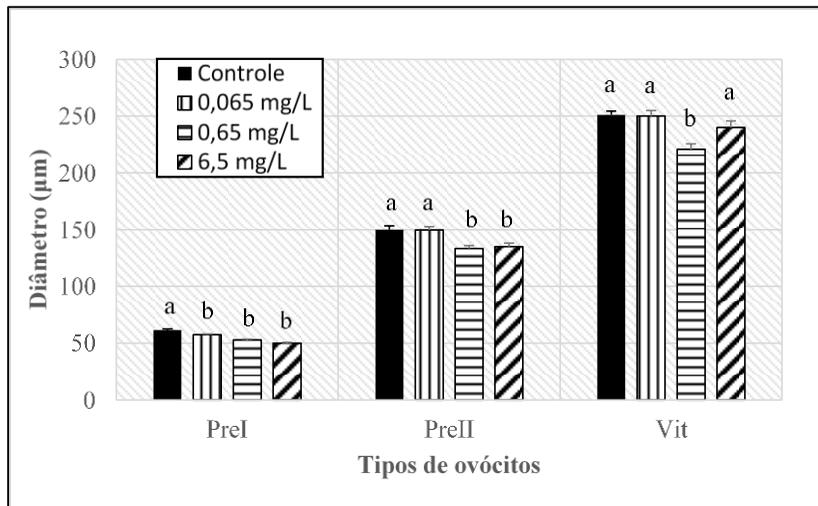


Figura 12: Diâmetro dos ovócitos PreI, PreII e Vit de *D. rerio* após a exposição ao Roundup® WG por 15 dias. Os dados foram expressos como média \pm erro padrão (ANOVA de uma via seguido de teste post hoc de Tukey). Letras diferentes entre os grupos indicam diferenças estatísticas ($p < 0,05$); $n = 3$ fêmeas/tratamento em triplicata independentes.

4.2.3 Ultraestrutura dos ovários de *Danio rerio* após a exposição ao Roundup® WG.

A partir das análises ultraestruturais realizadas nos folículos ovarianos de *D. rerio* após a exposição ao Roundup® WG, foram reconhecidas as células foliculares localizadas na periferia dos folículos, caracterizadas por serem alongadas, organizadas em dupla camada e apresentar núcleo evidente. Próximo às células foliculares foi identificado o envelope vitelínico com estriações, o qual permite a comunicação entre as células foliculares e o ovócito. Por um lado, foi observada a presença de zonas de vacuolização nas células foliculares dos animais expostos ao Roundup® WG quando comparado com o grupo controle. Por outro lado, no grupo exposto à maior concentração (6,5 mg/L) foi observado um aumento do espaço perivitelínico (espaço entre o ovócito e as células foliculares) com presença de macro e micro vesículas (Figura 13).

Além disso, não foram evidenciadas alterações na morfologia das mitocôndrias das células foliculares quando comparados os grupos expostos com o grupo controle (Figura 14).

Em relação à ultraestrutura das mitocôndrias dos ovócitos, foram observados os compartimentos mitocôndrias comprometidos, evidenciados pela perda da integridade das cristas e maior eletrodensidade nos grupos expostos quando comparado com o grupo controle (Figura 15).

Além disso, na contagem de número de mitocôndrias dos ovócitos em cada grupo experimental, o número de mitocôndrias foi similar entre o grupo exposto a 0,065 mg/L e o grupo controle, enquanto que, foi observada uma diminuição de cerca de 50% do número de mitocôndrias nos grupos expostos as duas concentrações maiores (0,65 e 6,5 mg/L). Também, foi observado um aumento da presença de mitocôndrias alteradas e da severidade da alteração em função da concentração (Figura 16, 17 e Tabela 2).

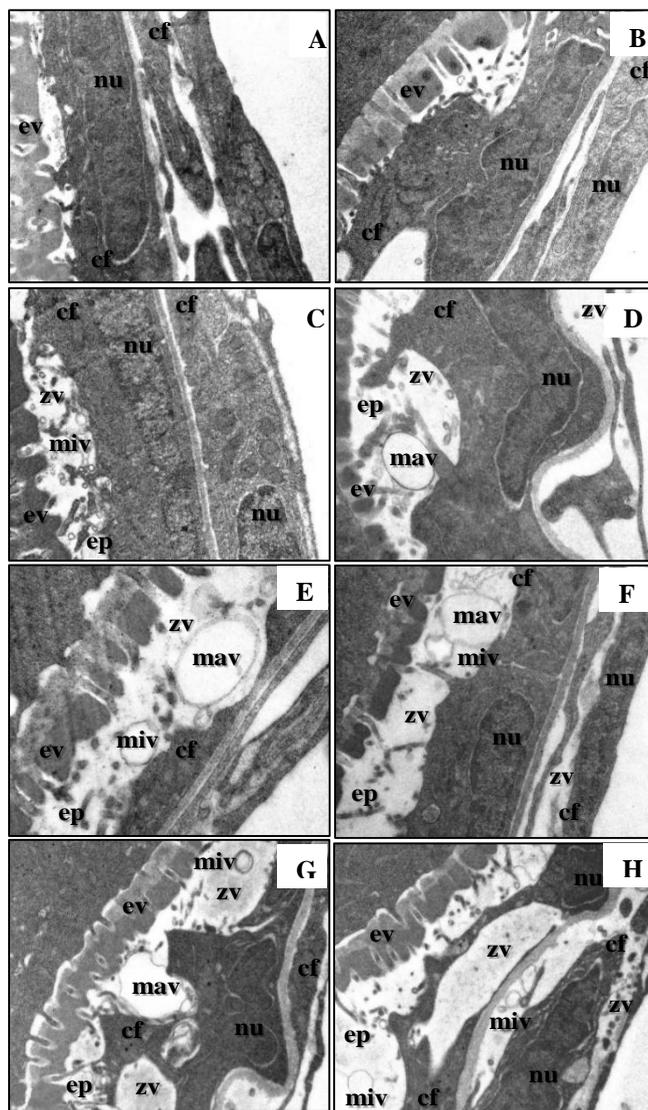


Figura 13: Secção de ovário de *D. rerio*. Célula folicular e envelope vitelínico do foliculo ovariano. A, B: Controle. C, D: 0,065 mg/L. E, F: 0,65 mg/L. G, H: 6,5 mg/L. cf: células foliculares; nu: núcleo; ev: envelope vitelínico; zv: zona de vacuolização; ep: espaço perivitelínico; mav: macro vesículas; miv: micro vesículas. Escala: 1 μ m. n = 2 fêmeas/tratamento em triplicata.

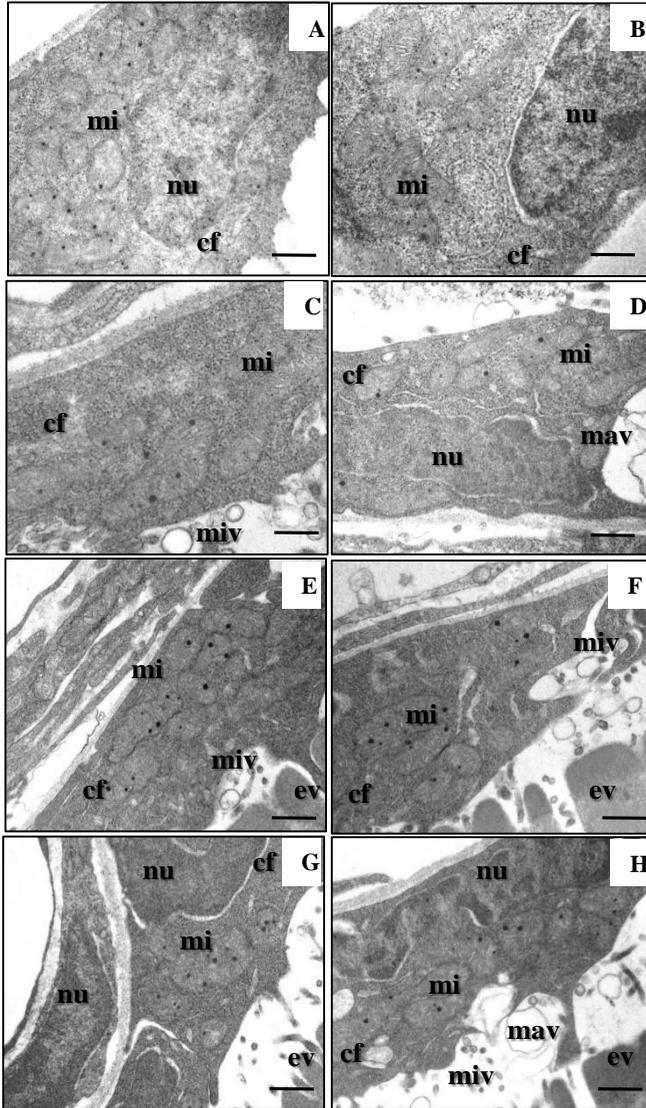


Figura 14: Secção de ovário de *D. rerio*. Mitocôndrias das células foliculares. A, B: Controle. C, D: 0,065 mg/L. E, F: 0,65 mg/L. G, H: 6,5 mg/L. cf: células foliculares; nu: núcleo; ev: envelope vitelínico; mi: mitocôndrias; mav: macro vesículas; miv: micro vesículas. Escala: 0,5 μ m. n = 2 fêmeas/tratamento em triplicata.

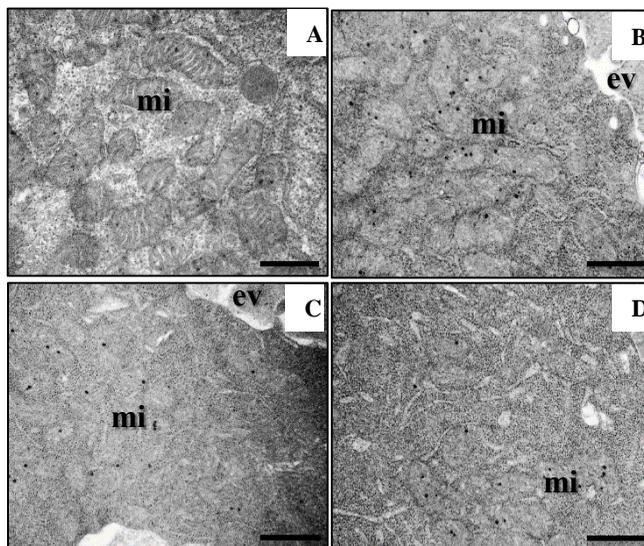


Figura 15: Secções de ovário de *D. rerio*. Mitocôndrias da região cortical do folículo ovariano. A: Controle. B: 0,065 mg/L. C: 0,65 mg/L. D: 6,5 mg/L em triplicata. ev: envelope vitelínico; mi: mitocôndrias. Escala: 0,5 μm . n = 2 fêmeas/tratamento.

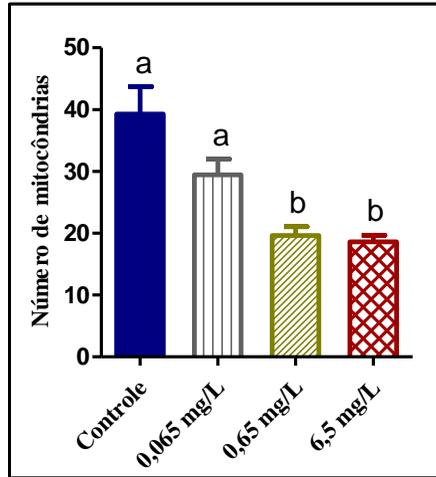


Figura 16: Número de mitocôndrias em ovócitos de *D. rerio* após exposição ao Roundup® WG por 15 dias. Os dados foram expressos como média \pm desvio padrão (ANOVA de uma via seguido de teste post hoc de Tukey). Letras diferentes entre os grupos indicam diferenças estatísticas ($p < 0.05$); $n = 2$ fêmeas/tratamento em triplicata.

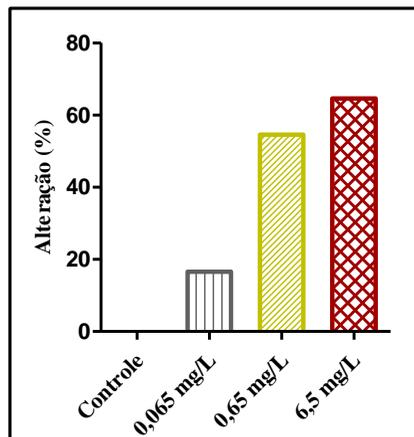


Figura 17: Número de ovócitos de *D. rerio* com presença de mitocôndrias alteradas após a exposição ao Roundup® WG. Os dados foram expressos em porcentagem de ovócitos com mitocôndrias alteradas. $n = 2$ fêmeas/tratamento em triplicata.

Tabela 2: Escore de severidade das alterações mitocondriais nos ovócitos de *Danio rerio* após a exposição ao Roundup® WG por 15 dias.

Tratamento	N ovócitos com mitocôndrias alteradas/ N ovócitos analisados	Escore de severidade
Controle	0/16	0 (0%)
0,065 mg/L	3/17	+ (17,6%)
0,65 mg/L	8/15	++ (50,3%)
6,5 mg/L	11/17	+++ (64,7%)

*O escore de severidade foi obtido a partir das análises de 3 regiões diferentes de cada ovócito por tratamento.

4.2.4 Imuno-histoquímica e *Western blotting* de ovários de *Danio rerio*.

Primeiramente, a especificidade do anticorpo anti-vitelina utilizado no presente estudo, foi demonstrada em ovários de *D. rerio* e em músculo de machos e fêmeas como controles negativos (Figura 18A e 18B). Além disso, a proteína vitelina foi imunolocalizada no citoplasma dos ovócitos e das células foliculares de *D. rerio* no grupo controle bem como nos grupos expostos a concentrações do Roundup® WG por 15 dias (Figura 19).

Depois de verificar a especificidade e a localização da vitelina, foi determinado o conteúdo da proteína vitelina nos ovários de *D. rerio* expostos ao Roundup® WG por 15 dias. O conteúdo da proteína vitelina aumentou significativamente (23,09; 24,17; e 27,38%) nos ovários de *D. rerio* nas três concentrações testadas 0,065; 0,65 e 6,5 mg/L, respectivamente, quando comparados com o grupo controle (Figura 20). Os níveis de vitelina foram relativizados em relação aos níveis de proteínas totais devido as variações dos níveis de actina encontradas nas amostras analisadas.

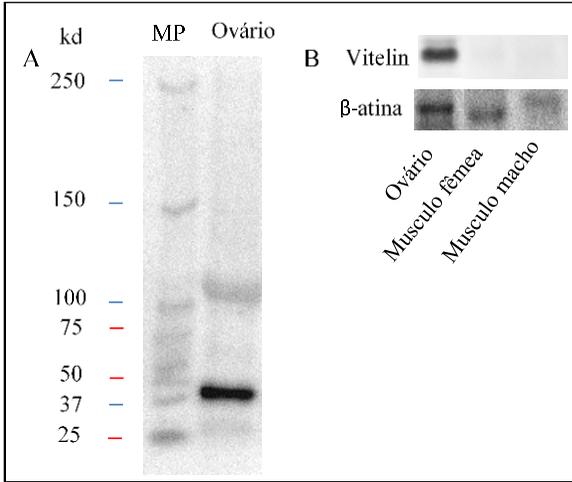


Figura 18: Imuno-blotting com marcação para vitelina em ovários de *D. rerio* após exposição ao Roundup® WG por 15 dias. A) SDS-PAGE do anticorpo vitelina. MP: marcador de peso molecular. B) Especificidade do anticorpo vitelina normalizado em relação aos níveis da proteína β-actina.

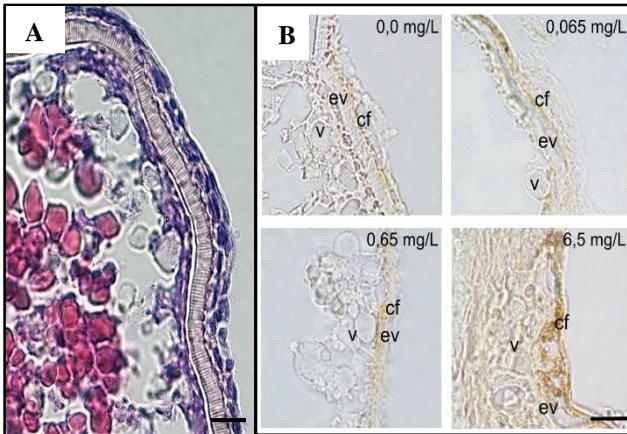


Figura 19: Imuno-histoquímica com marcação para vitelina em ovários de *D. rerio* após exposição ao Roundup® WG por 15 dias. A) Ovócito vitelogênico. Coloração HE. Escala: 10 μ m. B) Imuno marcação para vitelina para os distintos tratamentos (Controle, 0,065; 0,65; 6,5 mg/L). ev: envelope vitelínico. cf: células foliculares. v: vitelo. Escala: 1 μ m.

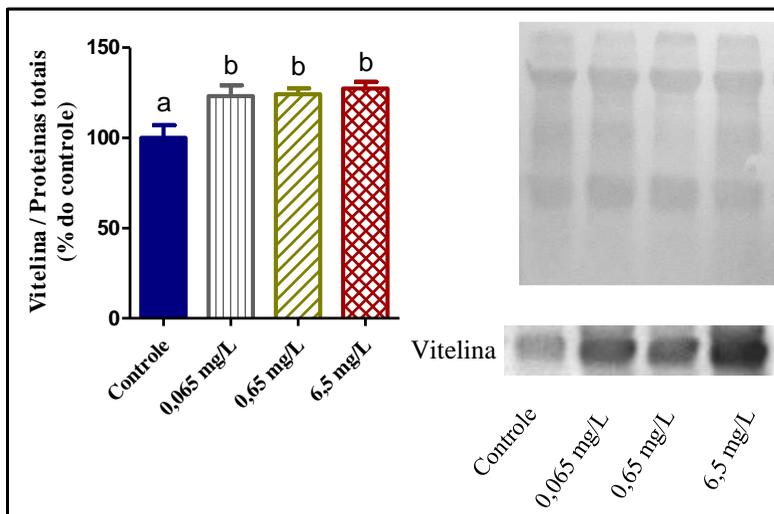


Figura 20: Conteúdo de vitelina em ovários de *D. rerio* após a exposição ao Roundup® WG por 15 dias. Os níveis de vitelina foram relativizados em relação aos níveis de proteínas totais. Os dados foram expressos como média \pm erro padrão (ANOVA de uma via seguido de teste post hoc de Tukey). Letras diferentes entre os grupos indicam diferenças estatísticas ($p < 0.05$); $n = 3$ fêmeas/tratamento.

Devido às alterações nas mitocôndrias encontradas na análise da ultraestrutura dos ovócitos nos ovários de *D. rerio* expostos com Roundup® WG por 15 dias, foi determinado o conteúdo das proteínas mitocondriais Drp1, Mfn1 e Mfn2. O conteúdo de Drp1 diminuiu significativamente nas três concentrações testadas (0,065; 0,65 e 6,5 mg/L) quando comparado com o grupo controle (Figura 21A). Em relação às proteínas Mfn1 e Mfn2, o conteúdo de Mfn1 diminuiu significativamente apenas na maior concentração (6,5 mg/L) em comparação ao grupo controle (Figura 21B), enquanto que, o conteúdo de Mfn2 diminuiu significativamente na menor concentração de 0,065 mg/L e na maior concentração de 6,5 mg/L, quando comparado com o grupo controle e com o grupo 0,65 mg/L (Figura 21C). Os níveis das proteínas mitocondriais Drp1, Mfn1 e Mfn2 foram também relativizados em relação aos níveis de proteínas totais (Figura 21D e 21E).

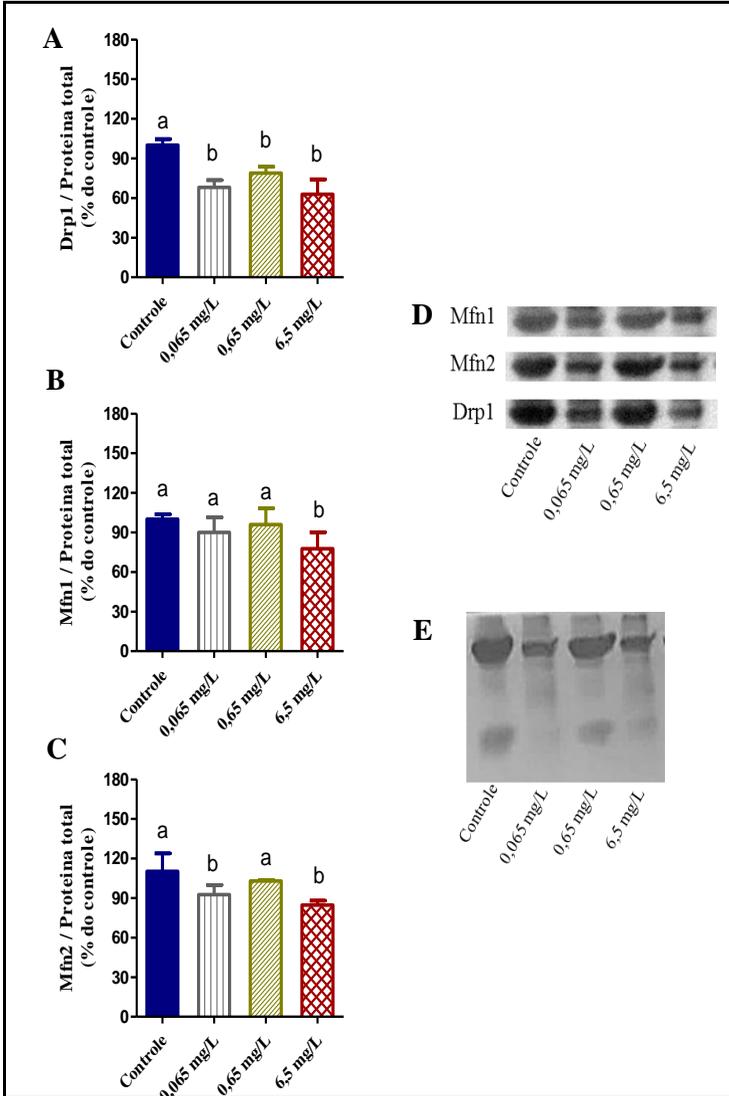


Figura 21: Conteúdo de A) Drp1, B) Mfn1 e C) Mfn2 em ovários de *D. rerio* após a exposição ao Roundup® WG por 15 dias. D e E) Os níveis das proteínas Drp1, Mfn1 e Mfn2 foram relativizados em relação aos níveis de proteínas totais. Os dados foram expressos como média \pm erro padrão (ANOVA de uma via seguido de teste post hoc de Tukey). Letras diferentes entre os grupos indicam diferenças estatísticas ($p < 0.05$); $n = 3$ fêmeas/tratamento.

5 DISCUSSÃO

Considerando o amplo uso de glifosato no Brasil, sua entrada e permanência nos corpos d'água, bem como a controvérsia sobre seus efeitos em organismos não alvos, o objetivo no presente estudo foi avaliar a toxicidade celular do herbicida à base de glifosato, Roundup® WG nos ovários de *D. rerio*.

Em estudos toxicológicos, a concentração letal média (CL₅₀), definida como a concentração de um composto químico que causa mortalidade de 50% dos organismos aquáticos expostos, dentro de um determinado tempo (24, 48 ou 96 h) (GEYER *et al.*, 1993), é geralmente usada como um índice de toxicidade aguda de substâncias químicas em organismos aquáticos. Nesse sentido, foi determinada a CL₅₀ do herbicida à base de glifosato (HBG) Roundup® WG, para *D. rerio*, considerando que é um índice de toxicidade aguda importante que deve ser determinado para o composto que está sendo estudado, antes que se proceda a análise de seus efeitos em concentrações subletais. Neste estudo, a CL₅₀ (96 h) para fêmeas de *D. rerio* expostas ao Roundup® WG foi de 42,6 mg/L de glifosato. De acordo com a classificação de toxicidade aguda para organismos aquáticos proposta por GIESY *et al.* (2000), a toxicidade da formulação comercial do Roundup® WG para *D. rerio* é considerada como leve (concentração entre 10 e 100 mg/L).

Estudos descrevem que a CL₅₀ (96 h) do herbicida Roundup® para diferentes peixes varia entre 2 a 55 mg/L, dependendo da espécie, do estágio de vida e das condições experimentais (HILDEBRAND *et al.*, 1982; JIRAUNGKOORSKUL; *et al.*, 2002). Por exemplo, a CL₅₀ (96h) obtida para *Channa punctatus* exposto ao Roundup® foi de 32,54 mg/L (NWANI *et al.*, 2010), enquanto que para *Prochilodus lineatus* a CL₅₀ (96h) foi de 13,69 mg/L (LANGIANO e MARTINEZ, 2008) e para *Leporinus macrocephalus* CL₅₀; 96h foi de 15,8 mg/L (ALBINATI *et al.*, 2007). No presente estudo, a CL₅₀ (96 h) registrada para *D. rerio* está dentro da faixa de CL₅₀ descrita para peixes. A toxicidade de produtos químicos em organismos aquáticos pode ser afetada pela temperatura, pH, oxigênio dissolvido, tamanho e idade dos indivíduos, tipo de espécie e qualidade da água (NWANI *et al.*, 2010). Neste contexto, as possíveis explicações desta diferenças de CL₅₀ (96 h) do Roundup® podem ser devido a: a) diferentes estirpes da mesma espécie; b) diferentes formulações de glifosato de uma mesma marca Roundup® contendo distintas concentrações do princípio ativo e c) diferentes condições experimentais. Assim, considerando as diferenças observadas na CL₅₀ (96

h), é importante determinar CL_{50} do herbicida que se está analisando na espécie estudada, e também é importante ressaltar que a partir do CL_{50} obtido no presente estudo, evidencia que as concentrações testadas para avaliar os efeitos do Roundup® WG nos ovários de *D. rerio* foram subletais.

Após exposição das fêmeas à concentrações subletais do Roundup® WG, não foram encontradas diferenças significativas no IGS dos animais expostos quando comparados com o grupo controle. O IGS é um parâmetro reprodutivo importante para estimar a condição reprodutiva, considerando que os estudos em peixe têm indicado que a exposição aos EDC podem levar à alteração no tamanho dos ovários (BRION *et al.*, 2004; YANG *et al.*, 2006) e que os HBG podem agir como disruptores endócrinos. Assim, no presente estudo era esperada a diminuição do IGS, a qual não foi encontrada. De modo semelhante, em outros estudos não foram encontradas diferenças no IGS de *D. rerio* após a exposição a xenoestrógenos (nonylphenol e 17 σ -ethinylestradiol) (LIN e JANZ, 2006) e a bifenilos policlorados (PCB) (DAOUK *et al.*, 2011). Neste sentido, embora o IGS seja um parâmetro relevante para avaliação e determinação das fases do ciclo reprodutivo, principalmente em peixes, e uma ferramenta mensurável à exposição a contaminantes, a avaliação toxicológica de um composto deve ser complementada através de análise histopatológica das gônadas (MENSAH *et al.*, 2014).

Os folículos ovarianos de *D. rerio*, expostos a diferentes concentrações de Roundup® WG e analisados por microscopia de luz, não apresentaram alterações morfológicas. Adicionalmente foram feitas análises morfométricas mais detalhadas em relação ao número, diâmetro e classificação dos ovócitos. Nessas análises, não foram encontradas diferenças significativas no número total de ovócitos. Também, após a exposição do Roundup® WG, foi encontrado uma maior quantidade de ovócitos PreI, com um menor diâmetro nas três concentrações testadas, enquanto que os ovócitos PreII e Vit estavam em menor quantidade e apresentavam um diâmetro menor nas concentrações maiores do Roundup® WG. Esses resultados sugerem que a exposição ao herbicida atingiu principalmente as fases iniciais de maturação dos ovários, afetando os ovócitos PreI e não permitindo o avanço da maturação. Cabe ressaltar que não há dados anteriores ao presente estudo avaliando o impacto de diferentes concentrações de HBG sobre a morfologia e morfometria dos ovários de peixes adultos. No entanto, a exposição de *D. rerio* a outros químicos como o flúor produz um aumento no número de folículos iniciais e uma diminuição do diâmetro dos folículos (LI *et al.*, 2016), assim como foi observado no presente estudo.

HBG nos ovários de *D. rerio* pode estar agindo como um disruptor endócrino, já que os resultados do presente estudo coincidem com os de um estudo realizado em *D. rerio* expostos a EDC (nonilfenol e 17- σ -etinilestradiol) (WEBER *et al.*, 2003), no qual foi demonstrada uma supressão ou maturação tardia dos ovários, evidenciada por uma maior quantidade de folículos ovarianos iniciais. Também, semelhante a nossos resultados, a exposição de *D. rerio* adultos à EDC como o 17- σ -etinilestradiol provocou uma diminuição no tamanho dos folículos ovarianos e um atraso na maturação folicular (VAN DEN BELT *et al.*, 2002), sugerindo que a maturação ovariana pode ser alvo dos EDC, e mostrando um efeito em peixe-zebra, independentemente da fase de vida na qual são expostos. Assim, no presente estudo, considerando os efeitos similares do HBG sobre os folículos ovarianos quando comparados a outros EDC, se sugere um possível efeito de disrupção endócrina nos ovários de *D. rerio*. No entanto, outros estudos mais detalhados precisariam ser realizados no futuro.

Considerando que nas análises morfológicas por microscopia de luz não tenham sido evidenciadas alterações nos folículos ovarianos após a exposição ao Roundup® WG, uma análise mais detalhada foi realizado por microscopia eletrônica de transmissão. Assim, foi possível visualizar os folículos ovarianos com as células foliculares, o envelope vitelínico e os ovócitos. Diferentes estudos demonstram que a análise ultraestrutural dos tecidos após tratamentos com compostos químicos permite identificar alterações nas mitocôndrias (YANG *et al.*, 2016), na membrana nuclear (HASSAN *et al.*, 2016), e no citoplasma (ZHANG *et al.*, 2014), entre outras. Neste contexto, nossos resultados mostraram alterações na ultraestrutura dos ovários de *D. rerio* expostos ao Roundup® WG, no qual corroboram a hipótese inicial de que o glifosato causa alterações nas células foliculares e nos ovócitos de peixes expostos. Uma das principais alterações do Roundup® WG foi a presença de zonas de vacuolização nas células foliculares, degradação do envelope vitelínico, além de um aumento do espaço perivitelínico. Respostas similares foram observadas em ovários de *D. rerio* após exposição ao EDC, 2,3,7,8-Tetraclorodibenzo-p-dioxina (TCDD) (PATRIGNANI *et al.*, 2014) e ao bisfenol-A (MOLINA *et al.*, 2013). Além disso, recentemente, resultados semelhantes ao presente estudo foram publicados por Veloso da Silva (2017), no qual foi observada uma diminuição no número e diâmetro de células foliculares, bem como uma diminuição na espessura do envelope vitelínico nos folículos ovarianos de *D. rerio* após a exposição a 0,065 mg/L do Roundup® WG.

As células foliculares são importantes por estarem envolvidas na maturação dos ovócitos, de forma que são responsáveis pela síntese de diferentes moléculas, além de receberem proteínas do meio extracelular, serem precursoras de vitelo e terem a função de transferi-lo para o ovócito, e também serem responsáveis pela síntese do envelope vitelínico (HAMLET *et al.*, 1999). Desta forma, os comprometimentos observados nas células foliculares poderiam estar afetando as funções de endocitose/exocitose para o translado adequado de substâncias e, conseqüentemente, atrasando ou impedindo a maturação dos ovócitos. Neste sentido, a presença de zonas de vacuolização nas células foliculares poderia indicar um intenso transporte de substâncias em resposta à toxicidade do Roundup® WG.

Estudos sugerem que as mitocôndrias e sua distribuição no citoplasma podem servir como biomarcadores da viabilidade dos ovócitos (ZHANG *et al.*, 2008; MAY-PANLOUP *et al.*, 2016). No presente estudo, nos ovários das fêmeas expostas ao Roundup® foram observadas alterações nas mitocôndrias dos ovócitos bem como a redução de seu número. As principais alterações observadas nas mitocôndrias foram a perda da integridade das cristas e uma maior eletrodensidade. Além disso, foi observado um aumento de mitocôndrias alteradas e da severidade da alteração. A redução do número de cristas mitocondriais foi descrito por SZAREK *et al.* (2000) em hepatócitos de carpa expostos ao Roundup®. Também, a redução de mitocôndrias funcionais no esperma de *Poecilia vivípara* foi relacionada com concentrações crescentes do Roundup® (HARAYASHIKI *et al.*, 2013). Foi observado dano mitocondrial no fígado de camundongos, no estudo desenvolvido por PEIXOTO, (2005), no qual foi demonstrada a capacidade do Roundup® em prejudicar a permeabilidade das membranas mitocondriais e alterar a atividade bioenergética. Neste sentido, esses estudos sugerem que as mitocôndrias podem ser um alvo do HBG e do Roundup®. Além disso, no presente estudo estas alterações mitocondriais podem indicar uma disfunção mitocondrial e conseqüente alteração na qualidade dos ovócitos, já que a ovogênese é acompanhada por um aumento na viabilidade das mitocôndrias, principalmente nos últimos estádios da maturação folicular (SPIKINGS *et al.*, 2007). Outras alterações mitocondriais, não observadas no presente estudo, foram descritas por ARMILIATO *et al.* (2014), que descreveram a ocorrência de estruturas *myelin-like* associadas à membrana externas da mitocôndria em ovários de *D. rerio* expostos a concentração de 0,065 mg/L de HBG.

A partir das alterações ultraestruturais observadas nas mitocôndrias dos ovócitos de fêmeas expostas ao Roundup® WG, foram investigados

os níveis das proteínas relacionadas com os eventos de fissão e fusão mitocondrial. A Drp1 (proteína relacionada à dinamina-1) é uma proteína citoplasmática que é recrutada por receptores externos da mitocôndria para o processo de fissão mitocondrial. Enquanto que, Mfn1 (mitofusina-1) e Mfn2 (mitofusina-2) são proteínas da membrana mitocondrial externa envolvidas com a fusão mitocondrial. No presente estudo, o conteúdo de Drp1 diminuiu significativamente nas três concentrações testadas do Roundup® WG e o conteúdo das proteínas Mfn1 e Mfn2 diminuíram significativamente apenas na maior concentração.

As mitocôndrias estão envolvidas com a respiração celular, na biogênese de esteróides (MILLER, 2007), bem como no controle da homeostase de cálcio intracelular (NICHOLLS e AKERMAN 1982), desempenhando um papel importante na via de sinalização apoptótica (GREEN e REED, 1998). Poucos estudos abordam a função das mitocôndrias em folículos ovarianos, e se sugere que sua função varia durante as diferentes fases da maturação folicular do ovário, o qual pode ser relacionado ao aumento de tamanho dos ovócitos. O comportamento mitocondrial na fase inicial da maturação dos ovócitos de *D. rerio* foi descrito previamente por ZHANG *et al.* (2008), mas pouco se sabe sobre a distribuição e função mitocondrial em fases posteriores da maturação folicular. A fissão mitocondrial é essencial no crescimento e divisão celular para manter o número adequado de mitocôndrias nas células (ELGASS *et al.*, 2013). Enquanto que o processo de fusão mitocondrial é necessário durante o desenvolvimento embrionário e para a sobrevivência das células em fases posteriores (CHEN *et al.*, 2010).

YOULE e BLIEK (2012) sugerem que a fusão mitocondrial ajuda a reduzir o estresse celular, misturando o conteúdo de mitocôndrias parcialmente danificadas como forma de atenuar o dano. Por outro lado, a fissão mitocondrial é necessária para criar novas mitocôndrias, mas também contribui para o controle de qualidade, permitindo a remoção das mitocôndrias danificadas, facilitando à autofagia durante o estresse celular. Desta maneira, considera-se que eventos de fissão e fusão mitocondrial no ovário podem estar comprometidos, em resposta ao estresse causado pela exposição ao Roundup® WG, observando-se a diminuição de proteínas envolvidas nestes processos (Drp1, Mfn1 e Mfn2). Esses resultados verificam a hipótese inicial que a maior concentração de Roundup® WG altera o conteúdo das proteínas Drp1, Mfn1 e Mfn2. Assim, a alteração dos eventos de fusão e fissão mitocondrial após a exposição ao herbicida, pode explicar o menor número de ovócitos PreII e Vit encontrado nos folículos ovarianos, uma vez que é necessário um equilíbrio entre fissão/fusão para a continuidade

da maturação dos ovócitos. A diminuição de Drp1, Mfn1 e Mfn2 após exposição ao Roundup® WG, pode explicar ou estar relacionada ao menor número de mitocôndrias encontradas, com o aumento da concentração do Roundup® WG, bem como a presença de mitocôndrias alteradas.

Além disso, considerando a potencialidade dos herbicidas à base de glifosato atuarem como disruptores endócrinos e que a vitelogenese é considerada um biomarcador de contaminação estrogênica em ambientes aquáticos (SUMPTER e JOBLING, 1995), foram avaliados os níveis da proteína vitelina nos ovários de *D. rerio* expostos ao Roundup® WG. Nossos resultados mostraram um aumento de vitelina nos grupos tratados com Roundup® WG, verificando a hipótese inicial que a maior concentração de Roundup® WG se observa alteração do conteúdo da proteína vitelina. A vitelina é uma proteína do vitelo, que é acumulada nos ovócitos com o avanço da maturação folicular (ARCOS *et al.*, 2009), e que servirá como fonte nutritiva de aminoácidos e lipídeos para o futuro embrião. Essa proteína tem sua origem a partir de uma proteína precursora chamada vitelogenina (BYRNE *et al.*, 1989). Assim, os níveis de vitelina poderiam ser relacionados com os níveis de vitelogenina, um parâmetro que é sugerido pela OECD para avaliar a toxicidade reprodutiva utilizando *D. rerio* como modelo animal.

Vários estudos avaliam os níveis de vitelogenina/vitelina após a exposição a produtos químicos e EDC. Por exemplo, a exposição de *D. rerio* a efluentes industriais aumentou a produção de vitelogenina e reduziu a fecundidade (TETA e NAIK, 2017). Também em *D. rerio*, a exposição a 17 σ -etinilestradiol resultou num aumento dose-dependente da produção de vitelogenina (ÖRN *et al.*, 2003). No estudo de ZENG e WANG (2010) no ácaro *Tetranychus cinnabarinus* expostos ao inseticida imidaclopride, foi observado um incremento no conteúdo de vitelina, que por sua vez, levou a um aumento na velocidade de eclosão dos ovos e da proporção de eclosão total. Cabe ressaltar que existe uma escassez de estudos em peixes, avaliando a vitelina após a exposição a contaminantes químicos. Assim, o resultado obtido no presente estudo poderia indicar que o Roundup® WG em *D. rerio* atuou como disruptor endócrino, diminuindo o processo de vitelogenese nos ovócitos e, em consequência, levando a uma diminuição no diâmetro e no número de ovócitos maduros (Vit) nos grupos tratados.

6 CONCLUSÕES

Os resultados obtidos a partir da exposição de fêmeas de *D. rerio* ao herbicida à base de glifosato, Roundup® WG, permitem concluir que:

✓ A concentração letal média (CL₅₀) em 96 horas para *D. rerio* após a exposição ao Roundup® WG foi de 42,61 mg/L, o qual está dentro da faixa de CL₅₀ descrita para peixes expostos ao Roundup®.

✓ Após a exposição por 15 dias a 0,065; 0,65 e 6,5 mg/L de glifosato contido no Roundup® WG:

❖ Na biometria corporal e nos ovários das fêmeas expostas, não houve diferenças e em consequência não ocorreu alteração no IGS.

❖ Não houve alteração no número médio de ovócitos, entanto que o diâmetro dos ovócitos PreI e ovócitos PreII diminuiu nos ovários das fêmeas expostas, o que indica que o Roundup® WG atinge principalmente nas fases iniciais da maturação dos ovários. Estes efeitos somados ao aumento do conteúdo da proteína vitelina nos ovários das fêmeas expostas ao herbicida, considerando os índices sugeridos pela OECD para avaliar a toxicidade reprodutiva usando peixe-zebra, podem indicar que o Roundup® WG pode ter atuado como disruptor endócrino.

❖ As alterações encontradas nas análises ultraestruturais dos folículos ovarianos, como zonas de vacuolização nas células foliculares e aumento do espaço perivitelinico, pode comprometer as células foliculares e em consequência afetar a função ovariana.

❖ Os compartimentos mitocondriais comprometidos nos folículos ovarianos, bem como a diminuição no conteúdo de Drp1, Mfn1 e Mfn2 envolvidas em fissão e fusão mitocondrial, podem indicar que as mitocôndrias nos ovários de *D. rerio* podem ser um dos alvos do Roundup®.

❖ Os danos observados nos ovários de *D. rerio* expostas à concentração do glifosato (0,065 mg/L) contida no Roundup® WG permitida pelo CONAMA, indicam que o limite máximo permissível de glifosato no Brasil precisa ser reavaliado.

7 REFERÊNCIAS

- AKTAR, W.; SENGUPTA, D.; CHOWDHURY, A. Impact of pesticides use in agriculture: their benefits and hazards. **Interdisciplinary toxicology**, v. 2, n. 1, p. 1–12, 2009.
- ALBINATI, C. L.; MOREIRA, E. L. T.; ALBINATI, R. C. B.; CARVALHO, J. V.; SANTOS, G. B.; LIRA, A. D. Toxicidade aguda do herbicida Roundup® para piauçu (*Leporinus macrocephalus*). **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal**, v. 8, p. 184–192, 2007.
- AL-RAJAB, A. J.; SCHIAVON, M. Degradation of 14C-glyphosate and aminomethylphosphonic acid (AMPA) in three agricultural soils. **Journal of Environmental Sciences**, v. 22, n. 9, p. 1374–1380, 2010.
- ANKLEY, G. T.; JOHNSON, R. D. Small fish models for identifying and assessing the effects of endocrine-disrupting chemicals. **National Research Council, Institute of Laboratory Animal Resources**, v. 45, n. 4, p. 469–483, 2004.
- ANKLEY, G.; FRANCIS, E.; GRAY, E.; KAVLOCK, R.; MCMASTER, S.; REESE, D.; SAYLES, G.; SERGEANT, A.; VALLERO, D. **Research plan for endocrine disruptors. Office of research and development.** USEPA. Washington, DC, v. EPA/600/R-98/087, 1998.
- ANNETT, R.; HABIBI, H. R.; HONTELA, A. Impact of glyphosate and glyphosate-based herbicides on the freshwater environment. **Journal of Applied Toxicology**, v. 34, n. 5, p. 458–479, 2014.
- ANTONIOU, M.; HABIB, M.; HOWARD, C.; JENNINGS, R.; LEIFERT, C.; NODARI, R.; ROBINSON, C.; FAGAN, J. Teratogenic effects of glyphosate-based herbicides: divergence of regulatory decisions from scientific evidence. **Journal of Environmental & Analytical Toxicology**, v. S4, n. 6, p. 1–13, 2012.
- ANVISA. Reavaliação de agrotóxicos. Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br/>. 2016. (Acesso em 20/01/17).
- AQUINO NETO, S.; RODRIGUES DE ANDRADE, A. Cap 19: Electrochemical oxidation of herbicides. In: Soloneski, S. e Larramendy, M.L. 2011. **Herbicides, theory and applications**, pp. 622, 2011.
- ARCOS, F. G.; IBARRA, A. M.; RODRÍGUEZ-JARAMILLO, M. D. C.; GARCÍA-LATORRE, E. A.; VAZQUEZ-BOUCARD, C. Quantification of vitellin/vitellogenin-like proteins in the oyster *Crassostrea corteziensis* (Hertlein 1951) as a tool to predict the degree of gonad maturity. **Aquaculture Research**, v. 40, n. 6, p. 644–655, 2009.
- ARMILIATO, N. 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, pp 96, 2014.

▪ARMILIATO, N.; AMMAR, D.; NEZZI, L.; STRALIOTTO, M.; MULLER, Y.M.R.; NAZARI, E.M. Changes in ultrastructure and expression of steroidogenic factor-1 in ovaries of zebrafish *Danio rerio* exposed to glyphosate. **Journal of Toxicology and Environmental Health A**, v. 77, p 405–14, 2014.

▪AZMI, M. A., NAQVI, S. N. H. Pesticide pollution, resistance and health hazards. **Pesticides: the impacts of pesticide exposure.** Stoytcheva, M. (Ed). New Delhi, India, p 1-24. 2011.

▪BAI, S. H.; OGBOURNE, S. M. Glyphosate: environmental contamination, toxicity and potential risks to human health via food contamination. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 23, n. 19, p. 18988–19001, 2016.

▪BARBAZUK, W. B.; KORF, I.; KADAVI, C.; HEYEN, J.; TATE, S.; WUN, E.; BEDELL, J.; MCPHERSON, J. D.; JOHNSON, S. L. The syntenic relationship of the zebrafish and human genomes. **Genome Research**, v. 10, n. 9, p. 1351–1358, 2000.

▪BASU, S.; SACHIDANANDAN, C. Zebrafish: A multifaceted tool for chemical biologists. **Chemical Reviews**, v. 113, n. 10, p. 7952–7980, 2013.

▪BENACHOUR, N.; SÉRALINI, G. E. Glyphosate formulations induce apoptosis and necrosis in human umbilical, embryonic, and placental cells. **Chemical Research in Toxicology**, v. 22, n. 1, p. 97–105, 2009.

▪BRION, F.; TYLER, C.; PALAZZI, X.; LAILLET, B.; PORCHER, J.; GARRIC, J.; FLAMMARION, P. Impacts of 17 β -estradiol, including environmentally relevant concentrations, on reproduction after exposure during embryo-larval-, juvenile- and adult-life stages in zebrafish (*Danio rerio*). **Aquatic Toxicology**, v. 68, n. 3, p. 193–217, 2004.

▪BURELLA, P. M.; SIMONIELLO, M. F.; POLETTA, G. L. Evaluation of stage-dependent genotoxic effect of Roundup® (glyphosate) on *Caiman latirostris* embryos. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 72, n. 1, p. 50–57, 2017.

▪BYRNE, B. M.; GRUBER, M.; AB, G. The evolution of egg yolk proteins. **Progress in Biophysics and Molecular Biology**, v. 53, p. 33–69, 1989.

▪CARNEY, S. A.; PRASCH, A. L.; HEIDEMAN, W.; PETERSON, R. E. Understanding dioxin developmental toxicity using the zebrafish

model. **Birth Defects Research A: Clinical and Molecular Teratology**, v. 76, n. 1, p. 7–18, 2006.

▪CARVAN, M. J.; HEIDEN, T. K.; TOMASIEWICZ, H. The utility of zebrafish as a model for toxicological research. **Biochemistry and Molecular Biology of Fishes**, v. 6, p. 3–41, 2005.

▪CATTANEO, R.; CLASEN, B.; LORO, V. L.; DE MENEZES, C. C.; PRETTO, A.; BALDISSEROTTO, B.; SANTI, A.; DE AVILA, L. A. Toxicological responses of *Cyprinus carpio* exposed to a commercial formulation containing glyphosate. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 87, n. 6, p. 597–602, 2011.

▪CAVAS, T.; KONEN, S. 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**, v. 22, n. 4, p. 263–268, 2007.

▪CHEN, H.; CHAN, D. C. Physiological functions of mitochondrial fusion. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1201, p. 21–25, 2010.

▪CLAIR, É.; MESNAGE, R.; TRAVERT, C.; SÉRALINI, G. É. A glyphosate-based herbicide induces necrosis and apoptosis in mature rat testicular cells *in vitro*, and testosterone decrease at lower levels. **Toxicology in Vitro**, v. 26, n. 2, p. 269–279, 2012.

▪CLELLAND, E.; PENG, C. Endocrine/paracrine control of zebrafish ovarian development. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 312, n. 1–2, p. 42–52, 2009.

▪CONAMA. Conselho Nacional do Meio Ambiente. **Resolução N° 357**. Publicada no DOU n° 053, de 18/03/2005, p. 58–63, 2005.

▪CONCEA. Conselho nacional de controle de experimentação animal. Diretrizes da prática de eutanásia do CONCEA. Brasília/DF: **Ministério da Ciência, Tecnologia e Inovação**, pp 54, 2013.

▪DAMMSKI, A. P.; MÜLLER, B. R. **Zebrafish: Manual de criação em biotério**. Zebrafish, pp. 107, 2011.

▪DAOUK, T.; LARCHER, T.; ROUPSARD, F.; LYPHOUTA, L.; RIGAUDA, C.; LEDEVINC, M.; LOIZEAU, V. X. C. Long-term food-exposure of zebrafish to PCB mixtures mimicking some environmental situations induces ovary pathology and impairs reproduction ability. **Aquatic Toxicology**, v. 105, n. 3–4, p. 270–278, 2011.

▪DENG, J.; LIU, C.; YU, L.; ZHOU, B. Chronic exposure to environmental levels of tribromophenol impairs zebrafish reproduction. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 243, n. 1, p. 87–95, 2010.

▪DERPSCH, R.; FRIEDRICH, E. T. Development and current status of no-till adoption in the world. Proceedings on CD, **18th Triennial**

Conference of the International Soil Tillage Research Organization (ISTRO), June p. 15-19, 2009.

▪DILL, G. M. 2005. Glyphosate-resistant crops: history, status, and future. **Pest Management Science**, v. 61, n. 3, p. 219-224.

▪DOS SANTOS, A. P. R.; ROCHA, T. L.; BORGES, C. L.; BAILÃO, A. M.; DE ALMEIDA SOARES, C. M.; DE SABÓIA-MORAIS, S. M. T. A glyphosate-based herbicide induces histomorphological and protein expression changes in the liver of the female guppy *Poecilia reticulata*. **Chemosphere**, v. 168, 2016.

▪DUBINSKA-MAGIERA, M.; DACZEWSKA, M.; LEWICKA, A.; MIGOCKA-PATRZALEK, M.; NIEDBALSKA-TARNOWSKA, J.; JAGL, K. Zebrafish: A model for the study of toxicants affecting muscle development and function. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 17, p 1–22, 2016.

▪DUKE, S.; POWLES, S. Glyphosate: a once-in-a-century herbicide. **Pest Management Science**, v. 64, p. 319–325, 2008.

▪ELGASS, K.; PAKAY, J.; RYAN, M. T.; PALMER, C. S. Recent advances into the understanding of mitochondrial fission. **Biochimica et biophysica acta**, v. 1833, n. 1, p. 150–61, 2013.

▪FLEEGER, J. W.; CARMAN, K. R.; NISBET, R. M. Indirect effects of contaminants in aquatic ecosystems. **Science of the Total Environment**, v. 317, n. 1–3, p. 207–233, 2003.

▪GEYER, H. J.; STEINBERG, C. E.; SCHEUNERT, I.; BRÜGGEMANN, R.; SCHÜTZ, W.; KETTRUP, A.; ROZMAN, K. A review of the relationship between acute toxicity (LC₅₀) of gamma-hexachlorocyclohexane (gamma-HCH, Lindane) and total lipid content of different fish species. **Toxicology**, v. 83, n. 1–3, p. 169–79, 1993.

▪GHOLAMI-SEYEDKOLAEI, S. J.; MIRVAGHEFI, A.; FARAHMAND, H.; KOSARI, A. A. Optimization of recovery patterns in common carp exposed to Roundup® using response surface methodology: Evaluation of neurotoxicity and genotoxicity effects and biochemical parameters. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 98, p. 152–161, 2013.

▪GIESY, J.; DOBSON, S.; SOLOMON, K. Ecotoxicological risk assessment for Roundup® herbicide. New York: **Reviews of Environmental Contamination and Toxicology**. v. 167., 2000.

▪GLUSCZAK, L.; MIRON, D. dos S.; MORAES, B. S.; SIMÕES, R. R.; SCHETINGER, M. R. C.; MORSCH, V. M.; LORO, V. L. Acute effects of glyphosate herbicide on metabolic and enzymatic parameters of silver catfish (*Rhamdia quelen*). **Comparative Biochemistry and**

Physiology C: Toxicology & Pharmacology, v. 146, n. 4, p. 519–524, 2007.

▪GOLDSMITH, P. Zebrafish as a pharmacological tool: The how, why and when. **Current Opinion in Pharmacology**, v. 4, n. 5, p. 504–512, 2004.

▪GREEN, D.R.; REED, J. C. Mitochondria and apoptosis. **Science**, v. 281, p. 1309–12, 1998.

▪GRISOLIA, C.K. 2005. Agrotóxicos: mutações, reprodução e câncer. In: (Ed.). **Agrotóxicos: mutações, reprodução e câncer**. Brasília: UNB, pp 388, 2005.

▪HALDÉN, N.; ARNOLDSSON, K.; HAGLUND, P.; MATTSSON, A.; ULLERÅS, E.; STURVE, J.; NORRGREN, L. Retention and maternal transfer of brominated dioxins in zebrafish (*Danio rerio*) and effects on reproduction, aryl hydrocarbon receptor-regulated genes, and ethoxyresorufin-O-deethylase (EROD) activity. **Aquatic toxicology**, v. 102, n. 3–4, p. 150–61, 2011.

▪HAMLET, W. C.; JEZIOR, M.; SPIELER R. Ultrastructural analysis of folliculogenesis in the ovary of the yellow spotted stingray *Urolophus jamaicensis*. **Annals of Anatomy**, v. 181, p. 159-172, 1999.

▪HANKE, I.; WITTMER, I.; BISCHOFBERGER, S.; STAMM, C.; SINGER, H. Relevance of urban glyphosate use for surface water quality. **Chemosphere**, v. 81, n. 3, p. 422–429, 2010.

▪HARAYASHIKI, C. A. Y.; JUNIOR, A. S. V.; MACHADO, A. A. de S.; CABRERA, L. da C.; PRIMEL, E. G.; BIANCHINI, A.; CORCINI, C. D. Toxic effects of the herbicide Roundup® in the guppy *Poecilia vivipara* acclimated to fresh water. **Aquatic Toxicology**, v. 142–143, p. 176–184, 2013.

▪HASSAN, S. A.; FAROUK, S. M.; ABBOTT, L. C. Transmission electron microscopic evaluation of neuronal changes in methylmercury-exposed zebrafish embryos (*Danio rerio*). **Ultrastructural Pathology**, v. 0, n. 0, p. 1–9, 2016.

▪HE, J.H.; GAO, J.M.; HUANG, C.J.; LI, C.Q. Zebrafish models for assessing developmental and reproductive toxicity. **Neurotoxicology and Teratology**, v. 42, p 35–42, 2014.

▪HILDEBRAND, L. D.; SULLIVAN, D. S.; SULLIVAN, T. P. Experimental studies of rainbow trout populations exposed to field applications of Roundup® herbicide. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 11, n. 1, p. 93–98, 1982.

▪HILL, A. J. Zebrafish as a model vertebrate for investigating chemical toxicity. **Toxicological Sciences**, v. 86, n. 1, p. 6–19, 2005.

- Hu, X.; Li, W.; Tian, F.; Wang, Y.; Song, W.; Li, R.; Ding, X.; Jin, T. Study on gonadal developmental toxicity of dibutyl phthalate in male zebrafish of F1 generation. **Wei Sheng Yan Jiu**, v. 39, p. 231–234, 2010.
- HUANG, Y.; WANG, X. L.; ZHANG, J. W.; WU, K. S. Impact of endocrine-disrupting chemicals on reproductive function in zebrafish (*Danio rerio*). **Reproduction in domestic animals**, p. 1–6, 2014.
- IBGE. Indicadores de desenvolvimento sustentável - Brasil 2012. **Estudos e Pesquisas - Informações Geográficas**, v. 9, pp. 350, 2012.
- IBGE. Indicadores de desenvolvimento sustentável. Brasil 2015. **Estudos e Pesquisas. Informação Geográfica**, v. 10, pp. 348, 2015.
- JIRAUNGKOORSKUL, W.; UPATHAM, E. S.; KRUA TRACHUE, M. Histopathological effects of Roundup®, a glyphosate herbicide, on Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). **Scienceasia**, v. 28, p. 121–127, 2002.
- KIER, L. D.; KIRKLAND, D. J. Review of genotoxicity studies of glyphosate and glyphosate-based formulations. **Critical Reviews in Toxicology**, v. 43, n. 4, p. 283–315, 2013.
- KRAUGERUD, M.; DOUGHTY, R. W.; LYCHE, J. L.; BERG, V.; TREMOEN, N. H.; ALESTRØM, P.; ALEKSANDERSEN, M.; ROPSTAD, E. Natural mixtures of persistent organic pollutants (POPs) suppress ovarian follicle development, liver vitellogenin immunostaining and hepatocyte proliferation in female zebrafish (*Danio rerio*). **Aquatic toxicology**, v. 116–117, p. 16–23, 2012.
- KWIATKOWSKA, M.; HURAS, B.; BUKOWSKA, B. The effect of metabolites and impurities of glyphosate on human erythrocytes (*in vitro*). **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 109, n. 1, p. 34–43, 2014.
- LAJMANOVICH, R. C.; ATTADEMO, A. M.; PELTZER, P. M.; JUNGES, C. M.; CABAGNA, M. C. Toxicity of four herbicide formulations with glyphosate on *Rhinella arenarum* (Anura: Bufonidae) tadpoles: β -esterases and glutathione S-transferase inhibitors. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 60, n. 4, p. 681–689, 2011.
- LANGIANO, V. d C.; MARTINEZ, C. B. R. Toxicity and effects of a glyphosate-based herbicide on the Neotropical fish *Prochilodus lineatus*. **Comparative Biochemistry and Physiology - C Toxicology and Pharmacology**, v. 147, n. 2, p. 222–231, 2008.
- LASHEEN, M. R.; ABDEL-GAWAD, F. K.; ALANENY, A. A.; EL BARY, H. M. H. A. Fish as bio indicators in aquatic environmental pollution assessment: A case study in abu-rawash Area, Egypt. **World Applied Sciences Journal**, v. 19, n. 2, p. 265–275, 2012.

- LASRAM, M. M.; DHOUIB, I. B.; ANNABI, A.; EL FAZAA, S.; GHARBI, N. A review on the molecular mechanisms involved in insulin resistance induced by organophosphorus pesticides. **Toxicology**, v. 322, p. 1–13, 2014.
- LEAL, M. C.; CARDOSO, E. R.; NOBREGA, R. H.; BATLOUNI, S. R.; BOGERD, J.; FRANCA, L. R.; SCHULZ, R. W. Histological and stereological evaluation of zebrafish (*Danio rerio*) spermatogenesis with an emphasis on spermatogonial generations. **Biology of Reproduction**, v. 81, n. 1, p. 177–187, 2009.
- LEE, H. L.; CHEN, K. W.; CHI, C. H.; HUANG, J. J.; TSAI, L. M. Clinical presentations and prognostic factors of a glyphosate-surfactant herbicide intoxication: a review of 131 cases. **Official journal of the Society for Academic Emergency Medicine**, v. 7, n. 8, p. 906–10, 2000.
- LEE, S.; JUNG, D.; KHO, Y.; JI, K.; KIM, P.; AHN, B.; CHOI, K. Ecotoxicological assessment of cimetidine and determination of its potential for endocrine disruption using three test organisms: *Daphnia magna*, *Moina macrocopa*, and *Danio rerio*. **Chemosphere**, v. 135, p. 208–216, 2015.
- LESSMAN, C. A. Oocyte maturation: Converting the zebrafish oocyte to the fertilizable egg. **General and Comparative Endocrinology**, v. 161, n. 1, p. 53–57, 2009.
- LI, M. Y.; CAO, J.; CHEN, J.; SONG, J.; ZHOU, B.; FENG, C.; WANG, J. Waterborne fluoride exposure changed the structure and the expressions of steroidogenic-related genes in gonads of adult zebrafish (*Danio rerio*). **Chemosphere**, v. 145, p. 365–375, 2016.
- LIN, L. L.; JANZ, D. M. Effects of binary mixtures of xenoestrogens on gonadal development and reproduction in zebrafish. **Aquatic Toxicology**, v. 80, n. 4, p. 382–395, 2006.
- LOPES, F. M.; VARELA JUNIOR, A. S.; CORCINI, C. D.; DA SILVA, A. C.; GUAZZELLI, V. G.; TAVARES, G.; DA ROSA, C. E. Effect of glyphosate on the sperm quality of zebrafish *Danio rerio*. **Aquatic Toxicology**, v. 155, p. 322–326, 2014.
- LOWRY, O.; ROSEBROUGH, N.; FARR, A.; RANDALL, R. Protein measurement with the Folin phenol reagent. **Journal of Biological Chemistry**, v. 193, n. 2, p. 265–275, 1951.
- LUBZENS, E.; YOUNG, G.; BOBE, J.; CERDÀ, J. Oogenesis in teleosts: How fish eggs are formed. **General and Comparative Endocrinology**, v. 165, n. 3, p. 367–389, 2010.
- MALLAT, E.; BARCELÓ, D. 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**, v. 823, p. 129–136, 1998.

▪MAY-PANLOUP, P.; BOUCRET, L.; DE LA BARCA, J. M. C.; DESQUIRET-DUMAS, V.; FERRÉ-L'HOTELLIER, V.; MORINIERE, C.; DESCAMPS, P.; PROCACCIO, V.; REYNIER, P. Ovarian ageing: The role of mitochondria in oocytes and follicles. **Human Reproduction Update**, v. 22, n. 6, p. 725–743, 2016.

▪MENÉNDEZ-HELMAN, R. J.; MIRANDA, L. A.; DOS SANTOS AFONSO, M.; SALIBIÁN, A. Subcellular energy balance of *Odontesthes bonariensis* exposed to a glyphosate-based herbicide. **Ecotoxicology and environmental safety**, v. 114, p. 157–63, 2015.

▪MENKE, A. L.; SPITSBERGEN, J. M.; WOLTERBEEK, A. P. M.; WOUTERSEN, R. Normal anatomy and histology of the adult zebrafish. **Toxicologic pathology**, v. 39, n. 5, p. 759–775, 2011.

▪MENSAH, P.; PALMER, C.; MULLER, W. Lethal and sublethal effects of pesticides on aquatic organisms: the case of a freshwater shrimp exposure to Roundup®. **Agricultural and Biological Sciences: Pesticides - Toxic Aspects**, p. 163–185, 2014.

▪MENSAH, P. K.; PALMER, C. G.; ODUME, O. N. Ecotoxicology of glyphosate and glyphosate-based herbicides- toxicity to wildlife and humans. **Agricultural and Biological Sciences: Toxicity and Hazard of Agrochemicals**, pp 93, 2015.

▪MILLER, W. L. Steroidogenic acute regulatory protein (StAR), a novel mitochondrial cholesterol transporter. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1771, p. 663–676, 2007.

▪MNIF, W.; HASSINE, A. I. H.; BOUAZIZ, A.; BARTEGI, A.; THOMAS, O.; ROIG, B. Effect of endocrine disruptor pesticides: A review. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 8, n. 6, p. 2265–2303, 2011.

▪MODESTO, K. A.; MARTINEZ, C. B. R. Roundup® causes oxidative stress in liver and inhibits acetylcholinesterase in muscle and brain of the fish *Prochilodus lineatus*. **Chemosphere**, v. 78, n. 3, p. 294–299, 2010.

▪MOLINA, A. M.; LORA, A. J.; BLANCO, A.; MONTERDE, J. G.; AYALA, N.; MOYANO, R. Endocrine-active compound evaluation: qualitative and quantitative histomorphological assessment of zebrafish gonads after bisphenol-A exposure. **Ecotoxicology and environmental safety**, v. 88, p. 155–62, 2013.

▪MORENO, N. C.; SOFIA, S. H.; MARTINEZ, C. B. R. Genotoxic effects of the herbicide Roundup® Transorb and its active ingredient

glyphosate on the fish *Prochilodus lineatus*. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 37, n. 1, p. 448–54, 2014.

▪MYERS, J. P.; ANTONIOU, M. N.; BLUMBERG, B.; CARROLL, L.; COLBORN, T.; EVERETT, L. G.; HANSEN, M.; LANDRIGAN, P. J.; LANPHEAR, B. P.; MESNAGE, R.; VANDENBERG, L. N.; VOM SAAL, F. S.; WELSHONS, W. V; BENBROOK, C. M. Concerns over use of glyphosate-based herbicides and risks associated with exposures: a consensus statement. **Environmental health: a global access science source**, v. 15, n. 1, p. 19, 2016.

▪NICHOLLS, D.; AKERMAN, K. Mitochondrial calcium transport. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 683, p. 57–88, 1982.

▪NWANI, C.D., NAGPURE, N.S., KUMAR, R., KUSHWAHA, B., KUMAR, P., LAKRA, W. S. Lethal concentration and toxicity stress of Carbosulfan, Glyphosate and Atrazine to freshwater air breathing fish *Channa punctatus*. **International Aquatic Research**, v. 2, p. 105–111, 2010.

▪OECD. Fish, acute toxicity test, guideline for the testing of chemicals No 203. **Organisation for Economic Co-operation and Development**, pp 10, 1992.

▪OECD. Test N° 229: Fish short term reproduction assay. **Guidelines for the Testing of Chemicals**, Section 2. Publishing. Paris, 2009.

▪Oliveira, A. G.; Telles, L. F.; Hess, R. A.; Mahecha, G. A. B.; Oliveira, C. A. Effects of the herbicide Roundup® on the epididymal region of drakes *Anas platyrhynchos*. **Reproductive Toxicology**, v. 23, n 2: 182–191, 2007.

▪ÖRN, S.; HOLBECH, H.; MADSEN, T. H.; NORRGREN, L.; PETERSEN, G. I. Gonad development and vitellogenin production in zebrafish (*Danio rerio*) exposed to ethinylestradiol and methyltestosterone. **Aquatic Toxicology**, v. 65, n. 4, p. 397–411, 2003.

▪PARICHY, D. M. Advancing biology through a deeper understanding of zebrafish ecology and evolution. **eLIFE**, p. 1–11, 2015.

▪PATRIGNANI, N.; MOLINA, A.; BLANCO, A.; AYALA, M.; MOYANO SALVAGO, R. Structural and ultrastructural evaluations of zebrafish ovaries after exposure to 2, 3, 7, 8 -Tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD). **Acta Adriatica**, v. 55, n. 1, p. 57–64, 2014.

▪PEIXOTO, F. Comparative effects of the Roundup® and glyphosate on mitochondrial oxidative phosphorylation. **Chemosphere**, v. 61, n. 8, p. 1115–1122, 2005.

▪PÉREZ, G. L.; VERA, M. S.; MIRANDA, L. A. Effects of herbicide glyphosate and glyphosate-based formulations on aquatic ecosystems. **Herbicides and the Environment**, p. 343–368, 2011.

▪PERUZZO, P. J.; PORTA, A. A.; RONCO, A. E. Levels of glyphosate in surface waters, sediments and soils associated with direct sowing soybean cultivation in north pampasic region of Argentina. **Environmental Pollution**, v. 156, n. 1, p. 61–66, 2008.

▪PESSAGNO, R. C.; TORRES SÁNCHEZ, R. M.; DOS SANTOS AFONSO, M. Glyphosate behavior at soil and mineral-water interfaces. **Environmental Pollution**, v. 153, p. 53-59, 2008.

▪RASBAND, W.S., ImageJ, U. S. **National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA, 1997-2016**

▪REBELO, R.; VASCONCELOS, R.; BUYS, B. 2010. Produtos agrotóxicos e afins comercializados em 2009 no Brasil: uma abordagem ambiental. **Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis – Ibama**. Disponível em: http://www.ibama.gov.br/phocadownload/qualidadeambiental/relatorios/produtos_agrotoxicos_comercializados_brasil_2009.pdf (Acesso em 26/01/17).

▪RELYEA, R. The impact of insecticides and herbicides on the biodiversity and productivity of aquatic communities. **Ecological Applications**, v. 15, n. 2, p. 618–627, 2005.

▪ROCHA, T. L.; SANTOS, A. P.; YAMADA, Á. T.; SOARES, C. M. de A.; BORGES, C. L.; BAILÃO, A. M.; SABÓIA-MORAIS, S. M. T. Proteomic and histopathological response in the gills of *Poecilia reticulata* exposed to glyphosate-based herbicide. **Environmental toxicology and pharmacology**, v. 40, n. 1, p. 175–186, 2015.

▪ROMANO, M.; ROSANOVA, P.; ANTEO, C.; LIMATOLA, E. Vertebrate yolk proteins: A review. **Molecular Reproduction and Development**, v. 69, n. 1, p. 109–116, 2004.

▪ROY, N. M.; OCHS, J.; ZAMBRZYCKA, E.; ANDERSON, A. Glyphosate induces cardiovascular toxicity in *Danio rerio*. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 46, p. 292–300, 2016.

▪SAKUMA, M. Probit analysis of preference data. **Applied Entomology and Zoology**, v. 33, n. 3, p. 339–347, 1998.

▪SALBEGO, J.; PRETTO, A.; GIODA, C. R.; DE MENEZES, C. C.; LAZZARI, R.; RADÜNZ NETO, J.; BALDISSEROTTO, B.; LORO, V. L. Herbicide formulation with glyphosate affects growth, acetylcholinesterase activity, and metabolic and hematological parameters in Piava (*Leporinus obtusidens*). **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 58, n. 3, p. 740–745, 2010.

▪SANDRINI, J. Z.; ROLA, R. C.; LOPES, F. M.; BUFFON, H. F.; FREITAS, M. M.; MARTINS, C. D. M. G.; DA ROSA, C. E. Effects of

glyphosate on cholinesterase activity of the mussel *Perna perna* and the fish *Danio rerio* and *Jenynsia multidentata*: *In vitro* studies. **Aquatic Toxicology**, v. 130–131, p. 171–173, 2013.

▪SCHOLZ, S.; KLÜVER, N. Effects of endocrine disrupters on sexual, gonadal development in fish. **Sexual Development**, v. 3, p. 136–151, 2009.

▪SEGENER, H. Zebrafish (*Danio rerio*) as a model organism for investigating endocrine disruption. **Comparative biochemistry and physiology. Toxicology & pharmacology: CBP**, v. 149, n. 2, p. 187–195, 2009.

▪SOLOMON, K. R.; THOMPSON, D. G.; PEST, F.; MARIE, S. S. Ecological risk assessment for aquatic organisms from over-water uses of Glyphosate. **Journal of Toxicology and Environmental Health B**, v. 6, n. 3, p. 289–324, 2003.

▪SPENCE, R.; GERLACH, G.; LAWRENCE, C.; SMITH, C. The behaviour and ecology of the zebrafish, *Danio rerio*. **Biological Reviews of the Cambridge Philosophical Society**, v. 83; n. 1, p.13-34, 2008.

▪SPIKINGS, E. C.; ALDERSON, J.; ST JOHN, J. C. Regulated mitochondrial DNA replication during oocyte maturation is essential for successful porcine embryonic development. **Biology of Reproduction**, v. 76, p. 327–335, 2007.

▪STENERSEN, J. **Chemical pesticides: mode of action and toxicology**. CRC Press, New York. 1 ed, pp 274. 2004

▪STREISINGER, G.; WALKER, C.; DOWER, N.; KNAUBER, D.; SINGER, F. Production of homozygous diploid zebra fish (*Brachydanio rerio*). **Nature**, v. 291, p. 293–296, 1981.

▪SUMPTER, J. P.; JOBLING, S. Vitellogenesis as a biomarker for estrogenic contamination of the aquatic environment. **Environmental Health Perspectives**, v. 103, n. 7, p. 173–178, 1995.

▪SUN, C.; ZHANG, S. Immune-relevant and antioxidant activities of vitellogenin and yolk proteins in fish. **Nutrients**, v. 7, n. 10, p. 8818–8829, 2015.

▪SZAREK, J.; SIWICKI, A.; ANDRZEJEWSKA, A.; TERECH-MAJEWSKA, E.; BANASZKIEWICZ, T. Effects of the herbicide Roundup® on the ultrastructural pattern of hepatocytes in carp (*Cyprinus carpio*). **Marine Environmental Research**, v. 50, n. 1–5, p. 263-266, 2000.

▪TETA, C.; NAIK, Y. S. Vitellogenin induction and reduced fecundity in zebrafish exposed to effluents from the City of Bulawayo, Zimbabwe. **Chemosphere**, v. 167, p. 282–290, 2017.

▪TONI, L. R. M.; SANTANA, H. de; ZAIA, D. a M. Adsorção de glifosato sobre solos e minerais. **Química Nova**, v. 29, n. 4, p. 829–833, 2006.

▪UREN-WEBSTER, T. M.; LEWIS, C.; FILBY, A. L.; PAULL, G. C.; SANTOS, E. M. Mechanisms of toxicity of di(2-ethylhexyl) phthalate on the reproductive health of male zebrafish. **Aquatic Toxicology**, v. 99, n. 3, p. 360–369, 2010.

▪UREN-WEBSTER, T. M.; LAING, L. V.; FLORANCE, H.; SANTOS, E. M. Effects of glyphosate and its formulation, Roundup®, on reproduction in zebrafish (*Danio rerio*). **Environmental Science and Technology**, v. 48, n. 2, p. 1271–1279, 2014.

▪USEPA 2014. Basic information about Glyphosate in drinking water. Disponível em: <https://www.epa.gov/ground-water-and-drinking-water/table-regulated-drinking-water-contaminants> (Acesso em 25/01/17).

▪USEPA. Occurrence summary and use support document for the six-year review of national primary drinking water regulations, **EPA-815-D-02-006**, pp. 453, 2002.

▪VAN DEN BELT, K.; WESTER, P. W.; VAN DER VEN, L. T. M.; VERHEYEN, R.; WITTERS, H. Effects of ethynylestradiol on the reproductive physiology in zebrafish (*Danio rerio*): time dependency and reversibility. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 21, n. 4, p. 767–775, 2002.

▪Van Der Ven, L.; Wester, P., 2003. **Histology and histopathology atlas of the zebrafish** 2003. Disponível em: <http://zfishtoxpat.comoj.com/> (Acesso: 15/02/2017)

▪VELOSO DA SILVA, S. C. Efeito do herbicida glifosato sobre a morfologia e morfometria dos folículos ovarianos do peixe *Danio rerio*. **Trabalho de Conclusão de Curso. Universidade Federal de Santa Catarina**. Florianópolis, 43 pp., 2017.

▪VLIEGENTHART, A. D. B.; TUCKER, C. S.; DEL POZO, J.; DEAR, J. W. Zebrafish as model organisms for studying drug-induced liver injury. **British Journal of Clinical Pharmacology**, v. 78, n. 6, p. 1217–1227, 2014.

▪VUTUKURU, S. S.; GANUGAPATI, J.; GANESH, V.; ATHEEKSHA, P.; POTTI, R. B. Endocrine disruption by Bisphenol A, polychlorinated biphenyls and polybrominated diphenyl ether, in zebra fish (*Danio rerio*) model: an in silico approach. **Fish Physiology and Biochemistry**, p. 1–15, 2016.

▪WANG, J.; WANG, W.; ZHANG, X.; TIAN, H.; RU, S. Development of a lipovitellin-based goldfish (*Carassius auratus*)

vitellogenin ELISA for detection of environmental estrogens. **Chemosphere**, v. 132, p. 166–171, 2015.

▪WEBER, L. P.; HILL, R. L.; JANZ, D. M. Developmental estrogenic exposure in zebrafish (*Danio rerio*): Histological evaluation of gametogenesis and organ toxicity. **Aquatic Toxicology**, v. 63, n. 4, p. 431–446, 2003.

▪WHO. Glyphosate and AMPA in drinking-water. **World Health Organization. Guidelines for Drinking-water Quality, 3rd edition**, p. 4–6, 2003.

▪WILLIAMS, G. M.; KROES, R.; MUNRO, I. C. Safety evaluation and risk assessment of the herbicide Roundup® and Its active ingredient, Glyphosate, for humans. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, v. 31, n. 2, p. 117–165, 2000

▪YANG, F.-X.; XU, Y.; HUI, Y. Reproductive effects of prenatal exposure to nonylphenol on zebrafish (*Danio rerio*). **Comparative Biochemistry and Physiology C: Toxicology and Pharmacology**, v. 142, n. 1–2, p. 77–84, 2006.

▪YANG, Y.; QI, S.; WANG, D.; WANG, K.; ZHU, L.; CHAI, T.; WANG, C. Toxic effects of thifluzamide on zebrafish (*Danio rerio*). **Journal of Hazardous Materials**, v. 307, p. 127–136, 2016.

▪YOULE, R.; BLIEK, A. Van Der. Mitochondrial fission, fusion, and stress. **Science**, v. 337, n. 6098, p. 1062–1065, 2012.

▪ZENG, C. X.; WANG, J. J. Influence of exposure to imidacloprid on survivorship, reproduction and vitellin content of the carmine spider mite, *Tetranychus cinnabarinus*. **Journal of Insect Science**, v. 10, n. 20, p. 20, 2010.

▪ZHANG, Y. Z.; OUYANG, Y. C.; HOU, Y.; SCHATTEN, H.; CHEN, D. Y.; SUN, Q. Y. Mitochondrial behavior during oogenesis in zebrafish: A confocal microscopy analysis. **Development Growth and Differentiation**, v. 50, n. 3, p. 189–201, 2008.

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

▪ZHANG, Q. F.; LI, Y. W.; LIU, Z. H.; CHEN, Q. L. Reproductive toxicity of inorganic mercury exposure in adult zebrafish: Histological damage, oxidative stress, and alterations of sex hormone and gene expression in the hypothalamic-pituitary-gonadal axis. **Aquatic Toxicology**, v. 177, p. 417–424, 2016.

8 ANEXO A

Certificado da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA-UFSC)



Universidade Federal
de Santa Catarina

Comissão de Ética no
Uso de Animais



CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "Toxicidade do herbicida glifosato: impactos sobre a organização morfofuncional dos sistemas cardio-respiratório, nervoso e reprodutor, utilizando o peixe-zebra *Danio rerio* como modelo experimental", protocolado sob o CEUA nº 5466040416, sob a responsabilidade de **Yara Maria Rauh Müller** e equipe; *Aline Guimarães Pereira; Carla Eliana Davico; Luciane Nezzi; Evelise Maria Nazari* - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovado** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de Santa Catarina (CEUA/UFSC) na reunião de 06/05/2016.

We certify that the proposal "Toxicity of glyphosate: impacts on the morpho-functional organization of the cardio-respiratory, nervous and reproductive systems, using the zebrafish *Danio rerio* as an experimental model.", utilizing 1176 Fishes (males and females), and protocol number CEUA 5466040416, under the responsibility of **Yara Maria Rauh Müller** and team; *Aline Guimarães Pereira; Carla Eliana Davico; Luciane Nezzi; Evelise Maria Nazari* - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **approved** by the Ethic Committee on Animal Use of the Federal University of Santa Catarina (CEUA/UFSC) in the meeting of 05/05/2016.

Finalidade da Proposta: **Pesquisa**

Vigência da Proposta: de **08/2016** a **07/2019**

Área: **Beg (Biologia Celular, Embriologia E Genética)**

Procedência: **CCB - Biotério para manutenção de animais para pesquisa**

Espécie: **Peixes**

sexo: **Machos e Fêmeas**

idade: **50 a 90 dias**

N: **1176**

Linhagem: **Danio rerio-Wild-Type**

Peso: **0 a 1 g**

Resumo: A proposta do presente projeto está focada para o uso de agroquímicos e seus efeitos em organismos não-alvo. Este projeto dará continuidade às pesquisas realizadas no Laboratório de Reprodução e Desenvolvimento Animal, iniciadas em 2011. Os resultados obtidos até o momento demonstram que o glifosato induz importantes alterações morfológicas nos ovários. No entanto, os mecanismos específicos pelos quais as células respondem ao insulto do glifosato ainda são desconhecidos. Desta forma, o projeto ora proposto investigará principalmente os efeitos exposição aguda e crônica do glifosato sobre a proliferação, ciclo celular e apoptose nos sistemas cárdio-respiratório, nervoso e reprodutor, utilizando o peixe-zebra como modelo experimental. Para a realização deste projeto propõe-se um repertório diversificado de metodologias que permita compreender de um modo mais abrangente e integrado, as respostas teciduais, celulares e moleculares frente à exposição ao glifosato. Este projeto contribuirá igualmente para a consolidação da linha de pesquisa em Citotoxicidade e Genotoxicidade, conforme o Diretório de Grupos CNPq, contribuindo também para o fortalecimento da linha de pesquisa em no Programa de Pós-graduação em Biologia Celular e do Desenvolvimento (M/D)/UFSC.

Local do experimento: Laboratório de Reprodução e Desenvolvimento Animal - sala 310B/BEG/CBB/UFSC

Florianópolis, 06 de maio de 2016

Prof. Dr. Carlos Rogério Tonussi

Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade Federal de Santa Catarina

Vice-Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade Federal de Santa Catarina