

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS  
Instituto de Biologia  
Ciências Biológicas - Bacharelado



Trabalho Acadêmico

**Ações do herbicida Roundup<sup>®</sup> sobre  
tolerância térmica, reprodução, resposta de  
estresse e desenvolvimento embrionário de  
peixes nativos do Rio Grande do Sul, Brasil**

**Yuri Dornelles Zebral**

Pelotas, 2014

**Yuri Dornelles Zebral**

**Ações do herbicida Roundup® sobre tolerância térmica, reprodução,  
resposta de estresse e desenvolvimento embrionário de peixes nativos do  
Rio Grande do Sul, Brasil**

Trabalho de Conclusão de curso  
apresentado ao Instituto de Biologia da  
Universidade Federal de Pelotas, como  
requisito parcial à obtenção do título de  
Bacharel em Ciências Biológicas.

Orientador: Prof. Dr. Ricardo Berteaux Robaldo

Pelotas, 2014

Dados de catalogação na fonte:  
Ubirajara Buddin Cruz – CRB-10/901  
Biblioteca de Ciência & Tecnologia - UFPel

Z41a      Zebral, Yuri Dornelles  
Ações do herbicida Roundup® sobre tolerância térmica, reprodução, resposta de estresse e desenvolvimento embrionário de peixes nativos do Rio Grande do Sul, Brasil / Yuri Dornelles Zebral. – 83f. : il. – Trabalho de conclusão de curso (Graduação em Ciências Biológicas). Universidade Federal de Pelotas. Instituto de Biologia. Pelotas, 2014. – Orientador Ricardo Berteaux Robaldo.

1.Biologia. 2. Esteroidogênese. 3.Estresse oxidativo.  
4.Ecotoxicologia. 5.CTMax. 6.Glifosato. I.Robaldo, Ricardo Berteaux. II.Título.

CDD: 577.27

Banca examinadora:

Prof. Dr. Adalto Bianchini

Prof. Dr. Ricardo Robaldo

Prof. Dr. Vinicius Campos

.

*À minha irmã, quem insiste em me ensinar  
aquilo que a razão me faz esquecer:  
como amar.*

## **Agradecimentos**

Agradeço à minha família antes de todos. Aos meus pais e minha irmã, que sempre me amaram incondicionalmente e me proporcionaram tudo que tenho e que sou hoje. Agradeço também às partes Gaúcha e Baiana da minha família, que sempre me apoiaram e respeitaram o meu jeito oblíquo e, por muitas vezes, descompromissado de ser.

Agradeço aos colegas/amigos de laboratório, que sempre me motivaram a continuar trabalhando e que me proporcionam um ambiente de trabalho fantástico. Em específico ao Robaldo, que muito mais que meu orientador, é um grande amigo. Agradeço em específico às pessoas que me ajudaram a construir esse trabalho – e que suportam meu jeito bagunçado e “cabeça dura” – Bruna Zafalon da Silva, Bruna de Castro Knopp, Luize Real Lansini e Alinca Peres Fonseca.

Agradeço aos amigos do café, dos almoços e das festas. Às meninas Nathália Susin Streher, Natália Simoni Porzio e Ethiene Guerra por ouvirem meus “assuntos chatos e chinelagens” e ao Darlan Rutz Redü por proporcionar tais assuntos. Agradeço a quem dialoga comigo sobre ciência e filosofia e que me ajudam a evoluir nestes assuntos. Cito o Alexandre Schneid Neutzling, o Hélio Leal, o Darlan Rutz Redü e o Robaldo.

Agradeço aos revisores desta monografia, que certamente me ajudarão a torná-la melhor.

Agradeço a todos os funcionários do Instituto de Biologia da UFPel que contribuíram com minha formação. Em especial aos departamentos de Fisiologia e Farmacologia e de Zoologia e Genética.

Agradeço ao Laboratório de Piscicultura da Barragem do Chasqueiro e todos os seus funcionários, que muito me ajudaram.

Agradeço ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico pelo auxílio que ganhei durante a graduação.

Pela certeza de que me esqueci de algumas pessoas, agradeço a todos que cruzaram meu caminho e contribuíram de alguma forma para a formação como biólogo.

*“Sapere aude!”*  
*Immanuel Kant*

## Resumo

ZEBRAL, Yuri Dornelles. **Ações do herbicida Roundup® sobre tolerância térmica, reprodução, resposta de estresse e desenvolvimento embrionário de peixes nativos do Rio Grande do Sul, Brasil.** 2014. 83f. Relatório – Graduação em Ciências Biológicas. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

No Rio Grande do Sul, a prática de monoculturas sustenta grande parte do desenvolvimento econômico do estado, porém a utilização de agrotóxicos pode poluir suas reservas de água doce. Um dos agrotóxicos mais utilizados na região é o herbicida Roundup®. Já foram comprovadas alterações causadas por este herbicida na fisiologia de peixes, como: produção de hormônios esteroides, diminuição no ganho de massa, na atividade da acetilcolinesterase cerebral, dos níveis de glicogênio hepático e aumento de estresse oxidativo. Dentro deste contexto, tivemos por objetivo testar a ação aguda e em concentrações baixas do Roundup® sobre os seguintes processos: 1) Resistência térmica; 2) Reprodução; 3) Resposta fisiológica de estresse; 4) Padrões de diapausa em Rivulidae; 5) Desenvolvimento embrionário. Utilizando peixes nativos do Rio Grande do Sul como modelos experimentais. Também foi objetivo deste trabalho a descrição da CL50<sub>96h</sub> do Roundup® para *Phalloceros caudimaculatus*. Para testar o objetivo 1, embriões de *Austrolebias nigrofasciatus* foram expostos ao Roundup® (1mg/L por 96h) e posteriormente foram feitos testes de temperatura crítica máxima. Para o objetivo 2, foi quantificado o número e diâmetro de ovos produzidos por casais de *A. nigrofasciatus* posteriormente ao Roundup® (1mg/L por 96h). Para o objetivo 3, foi testada a resposta de estresse, a partir do perfil de leucócitos, de juvenis de *Rhamdia quelen* expostos ao Roundup® (0,73mg/L por 96h). Para o objetivo 4, embriões de *A. nigrofasciatus* foram expostos ao Roundup® (1 e 10mg/L por 96h) e foram avaliados: número de somitos e proporção de embriões pigmentados, quantificados 15 dias posteriores à exposição e 30, 35, 40 e 47 posteriores a exposição, respectivamente. Para o objetivo 5, embriões de *Odontesthes humensis* foram expostos ao Roundup® (1, 5, 10 e 15mg/L por 96h) sendo avaliados: estágio de desenvolvimento (após 48h de exposição), diâmetro do olho e espaço entre olhos (72h de exposição) e proporção de embriões pigmentados (96h de exposição). Para a realização da CL50<sub>96h</sub> foram usados 72 indivíduos distribuídos em 6 grupos (controle; 1; 2; 4; 6 e 8mg/L). A mortalidade foi acompanhada diariamente. A CL50<sub>96h</sub> obtida foi de 5,33 mg/L. Os resultados demonstram que exposições a este herbicida geram: prejuízos na tolerância térmica, diminuição na produção de ovos, respostas de estresse potencializadas e alterações de desenvolvimento embrionário. Processos essenciais para a manutenção saudável das populações de peixes.

Palavras-chave: Esteroidogênese. Estresse oxidativo. Ecotoxicologia. CTMax. Glifosato.



## Abstract

ZEBRAL, Yuri Dornelles. **Effects of exposure to the herbicide Roundup® on thermal tolerance, reproduction, stress response and embryonic development of fishes native to Rio Grande do Sul, Brazil.** 2014. 83f. Relatório – Graduação em Ciências Biológicas. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

In the Rio Grande do Sul state, the practice of monoculture represents much of the state's economic development, but the use of pesticides can pollute its freshwater reserves. One of the most widely used pesticides in the region is the herbicide Roundup®. This compound have already been proven to cause deleterious effects to fish physiology, such as production of steroid hormones , decrease in mass gain, decrease in brain acetylcholinesterase activity, decrease in the liver glycogen levels and increased oxidative stress. Within this context, the objective was to test the acute action in low concentrations of Roundup® on the following processes: 1) Thermal tolerance, 2) reproduction, 3) physiological stress response; 4) Patterns of diapause in Rivulidae; 5) Embryonic development, using native fishes of Rio Grande do Sul as experimental models. Another objective for this work was to describe the LC50<sub>96h</sub> of Roundup® for *Phalloceros caudimaculatus*. To meet the first objective, *Austrolebias nigrofasciatus* embryos were exposed to Roundup® (1mg/L for 96h) and later tested for it's critical temperature maximum. To meet the second objective, the number and diameter of eggs produced by couples of *A. nigrofasciatus* after exposure to Roundup® (1mg/L, 96h) was observated. For the third objective, we tested the stress response using the profile of leukocytes of juvenile quelen exposed to Roundup® (1mg/L for 96h). To order objective 4, embryos of *A. nigrofasciatus* were exposed to Roundup® (1 and 10mg/L for 96 hours) and were assessed: number of somites and proportion of embryo pigmented 15 days after exposure and 30, 35, 40 and 47 after the exposure, respectively. To order objective 5, *Odontesthes humensis* embryos were exposed to Roundup® (1, 5, 10 and 15mg/L for 96h) and the following characters were observed: stage of development (after 48 hours of exposure), eye diameter and space between eyes (72h exposure) and proportion of pigmented embryos (96h exposure). For the description of the LC50<sub>96h</sub>, 72 individuals were distributed in six experimental groups (control; 1; 2; 4; 6 e 8mg/L). Mortalities were daily evaluated. The LC50<sub>96h</sub> found was 5,33 mg/L. The results demonstrate that exposure to this herbicide promoted: loss in thermal tolerance, decreased egg production, potentiated stress responses and changes in embryonic development. Essential Processes for the healthy maintenance of fish populations.

Keywords: Ecotoxicology. CTMax. Glyphosate. Oxidative stress. Steroidogenesis.

## Lista de Tabelas

- Tabela 1 Mortalidade de *Phalloceros caudimaculatus* expostos por 96h ao herbicida Roundup transorb R® (1; 2; 4; 6; 8mg/L) e grupo controle..... 28
- Tabela 2 Perfil leucocitário e índice hepatossomático de juvenis de *Ramdia quelen* expostos à Roundup transorb R® (0,73mg/L) por 96h e grupo controle. Médias em negrito denotam diferença significativa entre os tratamentos (teste-t;  $p < 0,05$ ). ..... 47
- Tabela 3 Proporção de embriões pigmentados de *Austrolebias nigrofasciatus* após exposição a duas concentrações de Roundup transorb® (1 e 10mg/L) durante 96h e grupo controle (ANOVA *post hoc* Tukey;  $p < 0,05$ ). Letras distintas denotam diferença significativa em cada linha. .... 56
- Tabela 4 Mortalidade de embriões de *Odontesthes humensis* depois de exposição a quatro concentrações de Roundup transorb® (1, 5, 10 e 15mg/L) por 96h e grupo controle. Números em negrito denotam diferença significativa em relação ao grupo controle na respectiva coluna (Teste de  $\chi^2$ ).....65

## Lista de Figuras

- Figura 1 Temperatura crítica máxima de embriões de *Austrolebias nigrofasciatus* expostos por 96h a 1mg/L de Roundup transorb® e grupo controle. \* denota diferença significativa entre os tratamentos (Teste t,  $p < 0,001$ ).34
- Figura 2 Correlação entre temperatura crítica máxima e taxas médias de aquecimento de embriões de *Austrolebias nigrofasciatus*. (Correlação de Pearson:  $r = -0,03$ ;  $p = 0,90$ )..... 35
- Figura 3 Correlação entre temperatura crítica máxima e taxas médias de aquecimento de embriões de *Austrolebias nigrofasciatus* expostos por 96h a 1mg/L de Roundup transorb®. (Correlação de Pearson:  $r = -0,75$ ;  $p < 0,001$ ). ..... 36
- Figura 4 Número de ovos/g produzidos por casais de *Austrolebias nigrofasciatus* expostos por 96h à Roundup transorb® (1mg/L) e grupo controle. \* denota diferença significativa entre os tratamentos (teste-t;  $p < 0,05$ ). . 41
- Figura 5 Diâmetro de ovos fecundados produzidos por casais de *Austrolebias nigrofasciatus* expostos por 96h à Roundup transorb® (1mg/L) e grupo controle. \* denota diferença significativa entre os tratamentos (Mann-whitney U;  $p < 0,05$ ).....42
- Figura 6 Percentual de linfócitos em juvenis de *Ramdia quelen* expostos ao Roundup transorb® (0,73mg/L, por 96h) e grupo controle. \* denota diferença significativa entre as médias dos tratamentos (teste t;  $p = < 0,05$ ).....48
- Figura 7 Percentual de neutrófilos em juvenis de *Ramdia quelen* expostos ao Roundup transorb® (0,73mg/L, por 96h) e grupo controle. \* denota diferença significativa entre as médias dos tratamentos (teste t;  $p = < 0,05$ ).....49

- Figura 8 Razão entre neutrófilos e linfócitos (N:L) de juvenis de *Ramdia quelen* expostos por 96h à Roundup transorb® (0,73mg/L) e grupo controle. \* denota diferença significativa entre os tratamentos (teste t;  $p < 0,05$ ).....50
- Figura 9 Número de somitos de embriões de *Austrolebias nigrofasciatus* depois de 15 dias pós-exposição (durante 96h) a duas concentrações de Roundup transorb® (1 e 10mg/L), e grupo controle (Kruskal-Wallis;  $p = < 0,05$ ). Letras distintas denotam diferença significativa.....55
- Figura 10 Proporção de embriões de *Austrolebias nigrofasciatus* pigmentados 30 dias pós-exposição a duas concentrações (1 e 10mg/L) de Roundup transorb® durante 96h, e grupo controle (ANOVA *post hoc* Tukey;  $p < 0,05$ ). Letras distintas denotam diferença significativa entre médias.56
- Figura 11 Proporção de embriões *Odontesthes humensis* pigmentados após 72h de exposição a quatro concentrações (1, 5, 10 e 15mg/L) de Roundup transorb® e grupo controle. \* denota diferença significativa em relação ao grupo controle (Teste de  $\chi^2$ )..... 62
- Figura 12 Diâmetro do olho de embriões de *Odontesthes humensis* depois de exposição a quatro concentrações (1, 5, 10 e 15mg/L) de Roundup transorb® por 96h e grupo controle (Kruskal-Wallis;  $p = < 0,05$ ). Letras distintas denotam diferença significativa. .... 63
- Figura 13 Espaço entre olhos de embriões de *Odontesthes humensis* depois de exposição a quatro concentrações (1, 5, 10 e 15mg/L) de Roundup transorb® por 96h e grupo controle (Kruskal-Wallis;  $p < 0,05$ ). Letras distintas denotam diferença significativa. .... 64

## Sumário

1 Introdução .....	13
2 Revisão da literatura .....	15
2.1 Animais modelo de estudo .....	15
2.1.1 O peixe anual <i>Austrolebias nigrofasciatus</i> .....	15
2.1.1.1 Diapausas .....	15
2.1.2 Jundiá <i>Rhamdia quelen</i> .....	17
2.1.3 Peixe-rei <i>Odontesthes humensis</i> .....	17
2.1.4 Barrigudinho <i>Phalloceros caudimaculatus</i> .....	17
2.2 Processos fisiológicos abordados .....	18
2.2.1 Fisiologia termal .....	18
2.2.2 Resposta de estresse.....	19
2.2.3 Reprodução.....	20
2.3 O herbicida Roundup®.....	21
2.3.1 Contextualização histórica.....	21
2.3.2 Uso do Roundup® e determinação do glifosato em águas brasileiras.....	21
2.3.3 Mecanismos de ação em vertebrados.....	23
3 Capítulo I - Toxicidade (CL50 <sub>96h</sub> ) aguda do Roundup Transorb® para <i>Phalloceros caudimaculatus</i> .....	26
3.1 Introdução .....	26
3.2 Material e métodos.....	27
3.3 Resultados .....	27
3.4 Discussão.....	28
4 Capítulo II - Temperatura crítica máxima de embriões de <i>Austrolebias nigrofasciatus</i> expostos ao herbicida Roundup Transorb® .....	30
4.1 Introdução .....	30
4.2 Material e métodos.....	32
4.3 Resultados .....	33
4.3.1 Taxas de aquecimento .....	33

4.3.2 CTMax dos embriões .....	34
4.4 Discussão.....	36
5 Capítulo III - Efeitos da exposição ao Roundup transorb <sup>®</sup> no número e no tamanho de ovos do peixe anual <i>Austrolebias nigrofasciatus</i> .....	38
5.1 Introdução .....	38
5.2 Material e métodos.....	39
5.3 Resultados .....	40
5.4 Discussão.....	42
6 Capítulo IV - Herbicida Roudup Transorb <sup>®</sup> como potencializador da resposta de estresse em juvenis de <i>Rhamdia quelen</i> .....	44
6.1 Introdução .....	44
6.2 Material e métodos.....	45
6.3 Resultados .....	46
6.4 Discussão.....	50
7 Capítulo V - Efeito da exposição aguda ao Roundup <sup>®</sup> na diapausa embrionária do peixe anual <i>Austrolebias nigrofasciatus</i> .....	52
7.1 Introdução .....	52
7.2 Material e métodos.....	53
7.3 Resultados .....	54
7.4 Discussão.....	57
8 Capítulo VI - Alterações no desenvolvimento embrionário de <i>Odonthestes humensis</i> após exposição ao herbicida Roundup Transorb <sup>®</sup> .....	59
8.1 Introdução .....	59
8.2 Material e métodos.....	60
8.3 Resultados .....	61
8.4 Discussão.....	65
9 Considerações finais .....	67
Referências .....	68

## 1 Introdução

No Rio Grande do Sul, as práticas de monoculturas, como o arroz, promovem a descaracterização e degradação do ambiente aquático. Parte desses impactos está relacionada com a utilização de agrotóxicos que podem poluir corpos d'água adjacentes às plantações. Dentre estes compostos, o herbicida Roundup® (RD) é um dos mais populares (SALBEGO et al., 2010). Este composto possui ação não seletiva e contém glifosato (N-fosfometil glicina) como princípio ativo (JIRAUNGKOORSKUL et al., 2002). Este composto atua inibindo o crescimento de plantas por interferência na produção de aminoácidos aromáticos essenciais, inibindo a via do shikimato (enzima enolpiruvilshikimato fosfato sintase). Dessa forma, o glifosato inibe a formação de proteínas promotoras de crescimento e metabólitos de defesa dos vegetais (HELANDER; SALONIEMI; SAIKKONEN, 2012). Portanto, o RD é utilizado para o controle de plantas daninhas e macrófitas que crescem nas áreas de cultivo (WILLIAMS; KROES; MUNRO, 2000).

A ação do glifosato sobre a fisiologia de vertebrados está relacionada à desregulação das vias de esteroidogênese, atuando de duas formas, primeiramente inibindo a transcrição da proteína de esteroidogênese rápida (proteína stAR), responsável pelo transporte de moléculas de colesterol de fora para dentro da membrana mitocondrial (WALSH et al., 2000) e, secundariamente, inibindo por competição a ação da enzima aromatase, responsável pela transformação de testosterona em hormônios estrógenos (RICHARD et al., 2005). Sendo assim, o glifosato pode alterar diversos processos fisiológicos que são modulados por tais hormônios, como a resposta fisiológica de estresse, osmorregulação e reprodução (SOSO et al., 2007; CERICATO et al., 2008; SALBEGO et al., 2010). O glifosato possui também ações sobre a produção de ácido retinóico, importante sinalizador celular durante o desenvolvimento embrionário, dessa forma, efeitos teratogênicos já foram descritos para o composto (PAGANELI et al., 2007).

Além de alterações nas vias esteroidogênicas, o RD pode causar também aumento no estresse oxidativo, pela ação de diversos surfactantes presentes em sua formulação. Estes compostos inibem a ação de enzimas antioxidantes. Dessa forma, promovem danos causados por espécies reativas de oxigênio em estruturas celulares como membrana plasmática, proteínas estruturais e material genético (CAVALCANTE; MARTINEZ; SOFIA, 2008), assim como dano tecidual (GLUSCZAK et al., 2007). O processo de estresse oxidativo também pode estar relacionado a prejuízos sobre a tolerância térmica dos animais (STEVENS et al., 2010).

Em suma, o RD possui dois mecanismos de ação sobre a fisiologia de vertebrados: desregulação endócrina causada pelo seu princípio ativo (glifosato), e estresse oxidativo causado pelos surfactantes usados nas formulações comerciais deste composto.

Dentro do contexto apresentado, tivemos por objetivo testar os efeitos da exposição aguda sob baixas concentrações de RD sobre os seguintes processos: Tolerância térmica; Reprodução; Resposta fisiológica de estresse e desenvolvimento embrionário. Utilizando peixes nativos do Rio Grande do Sul como modelos experimentais.



## **2 Revisão da literatura**

### **2.1 Animais modelo de estudo**

#### **2.1.1 O peixe anual *Austrolebias nigrofasciatus***

A família Rivulidae se encontra dentro da ordem Cyprinodontiformes, são peixes de água doce que se distribuem por toda a costa leste da América latina. São animais muito apreciados no aquarismo, onde são conhecidos como peixes anuais. São apelidados dessa forma porque habitam áreas alagáveis temporárias que secam durante o ano, fazendo com que estes peixes tenham desenvolvido adaptações que lhes permite viver nesse ambiente extremo (PODRABSKY; SOMERO, 2004). Essas adaptações instigam a curiosidade de pesquisadores desde a década 70, principalmente no que tange a aspectos embriológicos (WOURMS, 1972a, 1972b, 1972c; MARKOFSKY; MATIAS, 1977; MATIAS; MARKOFSKY, 1978; INGLIMA; PERLMUTTER; MARKOFSKY, 1981; LEVELS et al., 1986; LEVELS et al., 1988), comportamentais (EWING, 1975) e de fisiologia termal (PODRABSKY; SOMERO, 2004).

A maioria das espécies que compõe a família está ameaçada de extinção (MARQUES et al., 2002), frente a isso, o governo do Brasil implementou o Plano de Ação Nacional para a Conservação dos Rivulídeos Ameaçados de Extinção. De acordo com as diretrizes deste plano nacional, *A. nigrofasciatus* é uma espécie modelo para pesquisas sobre conservações e manejo do grupo (ICMBio, 2012). Peixes anuais possuem também algumas características que os torna bons modelos experimentais, como maturação sexual precoce, reprodução contínua e grande capacidade reprodutiva (GARCIA, et al., 2008; GONÇALVES et al., 2011).

##### **2.1.1.1 Diapausas**

As diapausas em Rivulidae se dividem em três estágios, diapausa I, II e III e são de vital importância para a manutenção das populações desses

peixes, visto que apenas os embriões em dormência sobrevivem aos períodos secos do ano, quando todos os indivíduos adultos morrem (PODRABSKY; SOMERO, 2004). A primeira diapausa ocorre ainda no período de gastrulação, logo após o processo de epibolia, sendo em algumas espécies ausente ou não obrigatória. Esse primeiro estado de dormência está associado a um processo único entre os peixes anuais, a dispersão e conseqüente re-agregação de blastômeros antes da formação do eixo embrionário definitivo (WOURMS, 1972b). Pesquisas mais recentes apontam que esses blastômeros, caso sejam células-tronco pluri ou toti-potententes, podem representar a possibilidade de estudar o ciclo e metabolismo celular em populações de células homogêneas adaptadas a suportar longos períodos de anóxia (MELLER et al., 2012), possuindo assim, grande potencial como modelo experimental. O segundo processo de dormência, a diapausa II, ocorre no início da organogênese, logo ao final da neurulação e somitogênese. Um embrião em diapausa II já possui sistema circulatório em formação com coração funcional e partes dos sistemas digestório e sensorial já formados, além das fundações do sistema nervoso central. Esse é o período hipometabólico mais resistente desses animais, portanto, provavelmente é nele em que os embriões permanecem na maioria do tempo em que seu ambiente se encontra seco (PODRABSKY; CULPEPPER, 2012). A diapausa III é o último estágio de dormência pelo qual esses peixes passam, sendo obrigatória em todos os Rivulidae estudados, acontece antes da eclosão, quando o embrião se encontra completamente formado e com boa parte de suas reservas energéticas já consumidas (HAND; PODRABSKY, 2000).

A maioria dos estudos acerca do controle da dormência embrionária de Rivulidae consideram a diapausa II. Aparentemente, hormônios esteróides - testosterona e estradiol - possuem grande influência nesse processo (PRI-TAL et al., 2011), assim como grande produção de proteínas quinase B, as quais aumentam as taxas de sobrevivência celular frente à inibição do processo de apoptose, estado no qual as células entram quando expostas a estresse ambiental severo (MELLER et al., 2012). A regulação da diapausa I sofre forte influência materna, visto que este estado de dormência só é alcançado na presença de fêmeas adultas (WOURMS, 1972b). Provavelmente algum composto produzido nas gônadas e secretado na urina estimule os embriões a

entrar nesse estado, visto que ovos expostos a homogenados de ovários iniciam a diapausa I (INGLIMA; PERLMUTTER; MARKOFKY, 1981).

### **2.1.2 Jundiá *Rhamdia quelen***

O jundiá *R. quelen* (Siluriformes: Heptapteridae) é uma espécie nativa do Rio Grande do Sul (RS) e possui grande relevância para a aquicultura no estado. Esta espécie representa também um importante modelo para estudos toxicológicos (SOSO et al., 2007) e sobre estresse (CERICATO et al., 2008) visto que possui algumas características que a tornam um bom modelo animal, e.g., ampla distribuição geográfica, ser bastante rústica e tolerante ao manejo de cativeiro, reproduzir-se com facilidade em laboratório e aceitar ração industrializada desde os primeiros dias de vida (BALDISSEROTTO et al., 2013).

### **2.1.3 Peixe-rei *Odontesthes humensis***

*Odontesthes humensis* é um peixe sul americano de água doce pertencente à ordem Atheriniformes, família Atherinopsidae, popularmente conhecido como Peixe-rei. São animais introduzidos em países da América Latina (Bolívia e Chile) e Ásia como promissores candidatos à aquicultura continental (TSUZUKI et al., 2000). No Japão, essa espécie possui grande importância comercial onde sua carne é muito apreciada na culinária local. A espécie se distribui naturalmente no Estado do RS, desde o norte, na Lagoa Itapeva, até a região das grandes lagoas na Fronteira Sul, compostas pela Lagoa dos Patos, Mirim e Mangueira (GROSMAN, 2002).

### **2.1.4 Barrigudinho *Phalloceros caudimaculatus***

*Phalloceros caudimaculatus* (Cyprinodontiformes: Poeciliidae) possui ampla distribuição, ocorrendo desde o sul do Brasil até a Bahia. apresenta demarcado dimorfismo sexual, sendo as fêmeas maiores que os machos. Essa espécie é conhecida também por sua viviparidade e fecundação interna, possibilitada por uma estrutura especializada para a inoculação de esperma (gonopódio), presente nos machos (ARAÚJO et al., 2009).

## 2.2 Processos fisiológicos abordados

### 2.2.1 Fisiologia termal

Frente às preocupações acerca de mudanças climáticas globais, os estudos sobre fisiologia termal ganharam grande relevância principalmente no que tange a limites térmicos, visando o esclarecimento dos efeitos do clima, tanto agudos como crônicos, na performance de diversos animais. Pensando que o clima afeta os organismos individualmente, supõe-se que poderão ocorrer impactos em diferentes populações ao redor do globo. A forma como os organismos irão responder a tais efeitos depende de fatores como sua “labilidade evolutiva” (“evolutionary lability”) e a plasticidade de seus limites térmicos (ALLEN; CLUSELLA-TRULLAS; CHOWN, 2012). A ideia de que esses processos ocorrem dentro de limites restritos tem aumentado as especulações sobre a capacidade que algumas espécies possuem para lidar com mudanças climáticas globais. Caso essa capacidade seja sobreposta pelos impactos climáticos, poderão ocorrer processos de extinção (HOFFMANN et al., 2012). Outro fator que têm preocupado os cientistas que trabalham com fisiologia termal se relaciona aos efeitos sinérgicos entre o estresse térmico imposto pelo aquecimento global e outras alterações ambientais como o padrão de chuvas, de secas, de queimadas e processos antrópicos diversos como liberação de substâncias tóxicas no meio ambiente e descaracterização de biomas (LEWIS, 2006; BROOK; SODHI; BRADSHAW, 2008; HOFFMANN et al., 2012). Dentro do contexto apresentado, cientistas procuram entender a fisiologia termal em diferentes espécies, a partir de processos como “acclimation”, “heat shock response” e “hardening” (terminologia discutida em BOWLER, 2005; LOESCHCKE; SØRENSEN, 2005).

A CTmax é caracterizada como a temperatura limite a qual um animal pode ser exposto antes de sofrer danos permanentes (BILYK; EVANS; DEVRIES, 2012; VORHEES; BRADLEY, 2012). Sua medição normalmente depende de “endpoints” comportamentais, como ausência de resposta a estímulos externos, espasmos musculares ou desmaios (VORHEES; BRADLEY, 2012).

### 2.2.2 Resposta de estresse

Estresse pode ser definido como uma condição na qual a homeostasia dos organismos é alterada em resposta a estímulos intrínsecos e/ou extrínsecos reconhecidos como deletérios, são os chamados agentes estressores, *e.g.*, presença de predadores, interações sociais, flutuações ambientais e exposição a agentes tóxicos. Os agentes estressores desencadeiam um grupo de respostas coordenadas (resposta de estresse), tanto fisiológicas como comportamentais, que permitem ao animal superar aquela ameaça. Dessa forma, a resposta de estresse é tida como compensatória e adaptativa. Frente à presença de agentes estressores crônicos e intensos, a resposta de estresse pode perder seu valor adaptativo e se tornar disfuncional, podendo resultar em diminuição no “fitness” das espécies, *e.g.*, diminuição de crescimento, falha na reprodução e imunossupressão (BONGA, 1997; CERICATO et al., 2008; DAVIS et al. 2008).

A resposta de estresse é regulada pelos eixos hipotálamo-hipófise-interrenais (HHI) e hipotálamo-simpático-células cromafins (HSC) e pode ser dividida em três níveis distintos e sucessivos, as respostas primárias, secundárias e terciárias de estresse. As respostas primárias de estresse são caracterizadas pela percepção do estímulo estressante, a ativação de centros cerebrais específicos, como o hipotálamo e a hipófise, e a consequente liberação massiva de catecolaminas (CA) e glicocorticoides (GC) na corrente sanguínea. As respostas secundárias de estresse são os efeitos a nível sistêmico modulados por tais hormônios, como aumento de glicemia, do débito cardíaco, alterações no balanço hidromineral e no padrão de distribuição de leucócitos (ANDERSON et al. 2011). Por sua vez, respostas terciárias de estresse são caracterizadas a partir de efeitos deletérios gerados por estresse crônico e possuem impactos em nível individual e populacional (BONGA, 1997).

O eixo HHI é responsável pelo controle da produção e liberação de GC na corrente sanguínea. O hipotálamo é o primeiro centro cerebral a receber estímulos provindos de agentes estressores e possui importância no ajuste fino da resposta de estresse, feito a partir da regulação sobre a ativação hipofisária, segundo centro cerebral a regular a resposta de estresse. Em teleósteos, o hipotálamo possui inervações diretas sobre a hipófise, dessa forma, a

estimulação hipotalâmica é feita a partir da secreção direta de hormônios em regiões específicas da hipófise. No que tange à resposta de estresse, o hipotálamo regula a atividade hipofisária a partir da secreção do hormônio liberador da corticotrofina (CRH) (BONGA, 1997; TRUDEAU, 1997). A hipófise é centro cerebral responsável por controlar a atividade das células presentes no rim cefálico de teleósteos, a partir da liberação do hormônio adrenocorticotrófico (ACTH) na circulação. Este hormônio estimula as células interrenais, presentes no rim cefálico, a produzirem GCs, no caso de teleósteos, o cortisol (BONGA, 1997). Este hormônio é responsável por modular ajustes metabólicos e iônicos necessários para superar desafios ambientais. Dessa forma, alterações na produção e liberação de cortisol podem diminuir o “fitness” das espécies (CERICATO et al., 2008). O perfil leucocitário e a razão entre neutrófilos:linfócitos (N:L) são alterados em resposta à liberação de glicocorticoides. Portanto, podem ser utilizados como marcadores de estresse confiáveis. Aumentos na razão N:L estão correlacionados à elevações nas concentrações plasmáticas de corticosteroides (DAVIS et al., 2008).

### 2.2.3 Reprodução

A reprodução em peixes é controlada por diferentes hormônios que regulam a ativação do eixo hipotálamo-hipófise-gônada (HHG). O sistema nervoso central possui um importante papel na integração dos sinais externos (ambientais) e internos (hormonais) que regulam a reprodução. Semelhantemente ao eixo HHI, o hipotálamo regula ações sistêmicas através da hipófise. Projeções neuronais hipotalâmicas liberam na hipófise, neuro-hormônios que regulam a reprodução, *i.e.*, hormônio liberador da corticotropina (GnRH), dopamina, neuropeptídeo Y (NPY), ácido gama-aminobutírico (GABA) e as kisspeptinas. Dentre estes neuro-hormônios, GnRH é o mais relevante no que tange a regulação da reprodução. Para peixes já foram descritas três variantes desta molécula, *i.e.*, GnRH-I, GnRH-II e GnRH-III, sendo que cada uma delas provoca respostas hipofisárias diferentes (BONGA, 1997; MIRANDA et al., 2013).

Frente à modulação cerebral, a hipófise libera na corrente sanguínea as chamadas gonadotropinas, *i.e.*, folículo estimulante (FSH) e folículo luteinizante (LH). Essas moléculas estimulam a produção dos hormônios sexuais pela

ativação de enzimas específicas através das rotas esteroidogênicas. São exemplos destes hormônios os andrógenos, estrógenos e progestágenos (NAGAHAMA; YAMASHITA, 2008). Em machos, os andrógenos (*e.g.*, testosterona e 11-cetotestosterona) regulam o processo de espermatogênese. Nas fêmeas, os estrógenos (*e.g.*, estradiol) regulam o processo de oogênese e vitelogenese. Os progestágenos regulam a maturação final e a desova em ambos os sexos (NAGAHAMA, 1997; NAGAHAMA; YAMASHITA, 2008).

## **2.3 O herbicida Roundup®**

### **2.3.1 Contextualização histórica**

O fim da segunda guerra mundial culminada com a vitória dos aliados emplacou o capitalismo como modelo econômico de hegemonia mundial, trazendo profundas mudanças no plano de desenvolvimento agrícola da sociedade do século XX. Por um lado, essas mudanças vieram da tentativa de adaptar a tecnologia de guerra a outros processos essenciais ao modelo capitalista, a partir do desenvolvimento de diversos compostos químicos com alto valor agregado, como fertilizantes, fungicidas, inseticidas e herbicidas. O desenvolvimento desses produtos catalisou a transformação do modelo de agricultura existente, antes baseado em produções com baixo capital financeiro aplicado, transformando-o em produções permeadas por alta tecnologia e grande capital investido. Por outro lado, os processos cada vez mais intensos de globalização e crescimento populacional também induziam a que o antigo e pouco eficiente método de plantio evoluísse no sentido de torná-lo mais eficiente e rentável. Foi nessa economia emergente e extremamente aquecida que o glifosato (princípio ativo do RD) foi desenvolvido, ainda na década de 70. Com o desenvolvimento deste herbicida, a Monsanto começou uma nova era no controle de ervas daninhas, feito a partir de um composto relativamente barato e muito eficiente (TIMMER, 1992).

### **2.3.2 Uso do Roundup® e determinação do glifosato em águas brasileiras**

A indicação de uso do RD (Roundup Transorb R®, Monsanto do Brasil LTDA) é de aplicação total em pré-plantio de culturas como algodão, arroz, milho e soja. No caso de culturas geneticamente modificadas resistentes ao

glifosato, a indicação de aplicação é em área total e em pós-emergência. As concentrações indicadas variam de acordo com o vegetal que se deseja combater. No caso de *Oriza sativa* (arroz-vermelho), tido como a grande praga do arroz no RS, a concentração indicada é de 3l/hectare, mas existem vegetais como *Cynodon dactylon* (capim-seda) para o qual a concentração indicada chega a 4,5l/hectare. Para o uso em pré-plantio recomenda-se duas aplicações, a primeira com maior concentração e com antecedência de 30 dias ao plantio, e uma segunda aplicação em menor concentração próxima ao dia da semeadura. Para culturas transgênicas resistentes ao glifosato, recomenda-se a aplicação após 25-35 dias de plantio.

O Brasil é um dos maiores produtores de soja do mundo, mantendo-se na segunda posição entre os países produtores desse vegetal no período entre 2007 e 2008 (CONAB, 2009). No que diz respeito à adoção de culturas transgênicas, o Brasil se manteve na terceira colocação dentre os países produtores em 2007, tendo plantado aproximadamente 15 milhões de hectares, dos quais 14,5 milhões corresponderam à monocultura da soja resistente ao glifosato (glyphosate-tolerant soybean – Roundup Ready®), a qual é cultivada em combinação ao uso do RD (BRANQUINHO; FERREIRA; CARDARELLI-LEITE, 2010). Com base nesses dados e admitindo-se que os produtores usam a concentração indicada do produto, pode-se inferir que apenas para o plantio da soja tolerante ao glifosato no Brasil foram utilizados aproximadamente 15 milhões de litros de RD no ano de 2007, baseando-se na menor concentração de aplicação indicada na bula do produto (um litro por hectare) (Roundup Transorb R®, Monsanto do Brasil LTDA).

Na orizicultura (produção de arroz) do Rio Grande do Sul, são plantados mais de um milhão de hectares, com produção de cerca de nove milhões de toneladas na safra 2010/11, representando aproximadamente 70% da produção nacional. O sustento desta alta produção está associado ao método de cultivo irrigado o qual envolve alta tecnologia, uso intensificado de insumos e o emprego de grande quantidade de água, a qual retorna com características diferentes às fontes naturais acrescidas de resíduos de fertilizantes e agrotóxicos (ZAFFARONI et al., 1999; SOSBAI, 2011).

Mattos et al. (2002) determinaram a presença do glifosato em amostras de água coletadas em áreas de orizicultura com plantio direto no Arroio



Bretanhas e na Lagoa Mirim, ambos no sudeste do Rio Grande do Sul. As concentrações médias encontradas foram de  $0,14 \pm 2,3\text{mg/L}$  (DP). Silva, Peralba e Mattos (2003) também determinaram concentrações de glifosato em amostras de água do Arroio Passo do Pilão o qual deságua no Arroio Pelotas, que abastece parte da água consumida no município de Pelotas, RS. As determinações foram feitas após 60 dias da aplicação do herbicida na região, mas mesmo assim foram encontradas concentrações de glifosato acima de  $0,10\text{mg/L}$ . Ainda, em São Paulo, amostras analisadas da represa Taquaraçu continham concentração média de  $0,18\text{mg/L}$  deste herbicida (GARCIA; ROLLEMBERG, 2007).

No Brasil, existem duas regulamentações acerca das concentrações permitidas de glifosato nas águas, uma do Ministério da Saúde (portaria MS n.º 518/2004, Capítulo IV – do padrão de potabilidade; Art. 14º - Potabilidade da água), estabelecendo o valor máximo permitido de  $0,5\text{mg/L}$  do herbicida em águas destinadas ao consumo humano e outra do CONAMA (Resolução 357/05), estabelecendo a concentração máxima de  $0,065\text{mg/L}$  em águas de abastecimento para consumo humano e à proteção das comunidades aquáticas. Portanto, todos os valores acima citados estão acima do permitido pela legislação brasileira, visto que a resolução do CONAMA é soberana perante a portaria 518/2004 (Ministério do Meio Ambiente, Conselho Nacional do Meio Ambiente, 2004).

### **2.3.3 Mecanismos de ação do Roundup® nos vertebrados**

O RD possui dois mecanismos de ação básicos sobre a fisiologia de vertebrados, o aumento de estresse oxidativo causado por adjuvantes adicionados à formulação do RD (CAVALCANTE; MARTINEZ; SOFIA, 2008) e desregulação endócrina causada por seu princípio ativo, o glifosato (WALSH et al., 2000; RICHARD et al., 2005). O aumento de estresse oxidativo causado pelo RD se relaciona com a diminuição na produção e atividade de enzimas antioxidantes (MODESTO; MARTINEZ, 2010) potencializando assim, danos celulares causados por espécies reativas de oxigênio (DE MENEZES et al., 2011), resultado em alterações em diversos órgãos como cérebro, fígado, brânquias, músculos, sangue e gônadas (MODESTO; MARTINEZ, 2010; SALBEGO et al., 2010; DE MENEZES et al., 2011; KREUTZ et al., 2011).

A ação de desregulador endócrino do RD pode ser atribuída ao seu princípio ativo (glifosato) e se relaciona ao processo de esteroidogênese. Este composto atua em diversas fases deste processo. A primeira delas é no transporte de colesterol de fora para dentro da mitocôndria, processo essencial para a produção de hormônios esteroides, visto que o colesterol é a molécula que servirá de esqueleto para a formação deste grupo de hormônios a partir da ação de dois grupos de enzimas, as citocromo P450 e a 3-beta-HSD (WALSH et al., 2000). O RD diminui o aporte de colesterol para o interior mitocondrial a partir da diminuição nos níveis da proteína de regulação aguda da esteroidogênese (StAR), uma proteína de membrana responsável por fazer esse transporte. Exposições *in vitro* de células testiculares (Leydig MA-10) de ratos a 25mg/L de RD diminuíram a produção dessas proteínas em 90%, provavelmente por mecanismos pós-transcripcionais visto que os níveis de mRNA dessa proteína não foram alterados pela exposição (WALSH et al., 2000). O segundo foco de ação do RD no processo de esteroidogênese é na atividade da enzima P450scc (“Cholesterol side-chain cleavage enzyme”) responsável pela conversão do colesterol a pregnenolona. A mesma exposição citada anteriormente causou uma redução de 61% na atividade dessa enzima. Alterações no padrão de transcrição da enzima 3 $\beta$ -HSD (“3- $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase”), responsável pela conversão de pregnenolona para progesterona, também foram comprovadas por Walsh e colaboradores, mostrando uma diminuição de 33% no mRNA desta proteína. Somando-se os efeitos do RD na proteína StAR e nas enzimas P450scc e 3 $\beta$ -HSD, exposições *in vitro* a 25mg/L desse composto diminuíram a esteroidogênese em 94% (WALSH et al., 2000).

Abordando processos mais tardios da produção de esteróides - os quais dependem do correto funcionamento das proteínas anteriormente descritas - Richard e colaboradores (2005) estudaram a ação do glifosato na produção de hormônios estrógenos a partir da atividade da enzima aromatase, a qual é responsável pela transformação de andrógenos (testosterona, principalmente) em estrogênio, o último hormônio produzido dentro da cadeia esteroidogênica. Esses autores demonstraram que exposições ao glifosato, em concentrações 100 vezes menores do que aquelas usadas por agricultores norte-americanos, diminuíram tanto a atividade da aromatase como sua transcrição. Efeitos

teratogênicos também já foram descritos para o glifosato em *Xenopus laevis*, a partir de alterações na produção de ácido retinóico, importante sinalizador celular durante o processo de embriogênese (PAGANELLI et al., 2010).

### **3 Capítulo I - Toxicidade aguda (CL5096h) do Roundup Transorb® para *Phalloceros caudimaculatus***

#### **3.1 Introdução**

Em geral, as técnicas de produção agrícola com grande capital investido fazem uso de agrotóxicos que podem poluir corpos d'água presentes no entorno das áreas de plantio, processo que pode levar a impactos ecológicos (SALBEGO et al., 2010). Dentre os agrotóxicos usados nestes cultivos, o RD possui uma posição de destaque, sendo o herbicida mais usado no mundo (THONGPRAKAI SANG et al., 2013). Frente a essa problemática, estudos acerca da toxicidade aguda deste composto são importantes para a avaliação de sua periculosidade para a vida aquática. A toxicidade aguda do RD já foi descrita para um grande número de teleósteos e a CL5096h varia de 7,3mg/L até 26mg/L (ALBINATI et al., 2007; CERICATO et al., 2008).

Diversos trabalhos demonstram que exposições ao RD potencializam o estresse oxidativo em tecidos como brânquias, fígado e cérebro, podendo levar a alterações histológicas (SALBEGO et al., 2010; MODESTO; MARTINEZ, 2010; DE MENEZES et al., 2011; KREUTZ et al., 2011). O RD também possui ações sobre o metabolismo de hormônios esteroides (WALSH et al., 2000; RICHARD et al., 2005) e sobre a atividade da acetilcolinesterase (SALBEGO et al., 2010).

O barrigudinho *P. caudimaculatus* (Cyprinodontiformes: Poeciliidae) possui algumas características que tornam a espécie um bom bioindicador para estudos ecotoxicológicos, como ampla distribuição, demarcado dimorfismo sexual, fácil reprodução em laboratório, viviparidade e curto ciclo de vida (ARAÚJO et al., 2009).

Nosso objetivo foi testar a toxicidade aguda do RD para *P. caudimaculatus*, uma espécie com elevado potencial para se tornar um bioindicador de poluição ambiental.

### 3.2 Material e métodos

#### *Animais experimentais*

Para a realização dos experimentos foram utilizados 72 indivíduos da espécie *P. caudimaculatus* coletados no Arroio Padre Doutor, localizado no campus Capão do Leão da UFPel. Após a coleta, os animais foram levados para o Laboratório de Fisiologia Aplicada à Aquicultura (UFPel) e permaneceram em aclimação sob condições de laboratório por uma semana. As condições de temperatura ( $20,4\pm 0,2^{\circ}\text{C}$ ) e níveis de amônia ( $\text{NH}_3 - 0,25\pm 0,00\text{ppm}$ ) foram acompanhados diariamente.

#### *Tratamentos, desenho experimental e análise estatística*

Para a realização do experimento, foram utilizados 6 tratamentos: 5 diluições do RD (1, 2, 4, 6 e 8mg/L) e um grupo controle. Todos os tratamentos foram feitos com quatro réplicas, cada uma contendo um trio de animais (duas fêmeas e um macho). As unidades experimentais eram potes com volume 5L. O experimento teve duração de 96h e a mortalidade foi acompanhada a cada 24h. Os indivíduos mortos foram retirados diariamente. Os dados foram analisados com o uso do método de Trimmed-spearman-Karber (versão 1.5) a fim de se obter a  $\text{CL}_{50_{96\text{h}}}$ .

### 3.3 Resultados

As mortalidades observadas durante o teste da  $\text{CL}_{50_{96\text{h}}}$  para *P. caudimaculatus* são apresentadas na tabela 1. A  $\text{CL}_{50_{96\text{h}}}$  que encontrada foi de 5,33mg/L de Roundup Transorb R<sup>®</sup>.

Tabela 1 – Mortalidade de *Phalloceros caudimaculatus* expostos por 96h ao herbicida Roundup transorb R® (1; 2; 4; 6; 8mg/L) e grupo controle.

Concentrações (mg/L)	Mortalidade (%)
Controle	16,7
1	16,7
2	0,0
4	16,7
6	75,0
8	83,4

### 3.4 Discussão

Estudos demonstram que o glifosato, princípio ativo do RD, possui baixa toxicidade. Para a Truta arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*), a  $CL_{50_{96h}}$  descrita para este composto varia de 86 mg/L (NESKOVIC et al., 1996) até 140mg/L (FOLMAR et al., 1979). A toxicidade descrita para o RD é maior, com  $CL_{50_{96h}}$  variando de 7,3 mg/L para *R. quelen* (CERICATO et al., 2008), até 26 mg/L para *O. mykiss* (ALBINATI et al., 2007). A maior toxicidade do RD parece estar relacionada com os adjuvantes adicionados a sua composição (SHIOGIRI et al., 2012). A grande variação nas formulações dos herbicidas a base de glifosato dificultam a comparação da toxicidade destes agrotóxicos, principalmente porque as empresas não especificam quais compostos são usados como adjuvantes. Em comparação às concentrações já descritas como letais (em 96h) para peixes, a  $CL_{50_{96h}}$  que encontrada para *P. caudimaculatus* (5,33mg/L) pode ser considerada baixa. Possivelmente nossa concentração letal foi superestimada, visto que as mortalidades que observamos não foram monotonicamente aumentadas em relação às concentrações de exposição. Observamos, inclusive, mortalidades no grupo controle. Dessa forma, é possível que algum outro fator tenha atuado em sinergismo ao RD durante o experimento (e.g. parasitismo, doenças e idade dos animais). Outro ponto que pode explicar a baixa  $CL_{50_{96h}}$  que observamos é uma maior sensibilidade de peixes nativos do sul do Brasil ao RD. De fato, a  $CL_{50_{96h}}$  (7,3mg/L) descrita para *R. quelen* também é baixa em0 comparação a de espécies mais tropicais.

Concluimos que a CL5096h (5,33mg/L) que encontramos para *P. caudimaculatus* foi baixa em relação aquelas descritas para outras espécies de teleósteos, o que pode indicar que espécies do extremo sul do Brasil são mais sensíveis ao RD. Mais estudos são necessários a fim de se testar essa hipótese.

## **4 Capítulo II - Temperatura crítica máxima de embriões de *Austrolebias nigrofasciatus* expostos ao herbicida Roundup Transorb®**

### **4.1 Introdução**

*Austrolebias nigrofasciatus* é uma espécie de água doce pertencente à família Rivulidae, ordem Cyprinodontiformes. As espécies que constituem a família possuem elevado grau de endemismo e estão, em sua maioria, ameaçadas de extinção (COSTA, 1998). São conhecidos popularmente como peixes anuais, visto que ocorrem em poças alagáveis que secam durante certos períodos do ano. Neste ambiente, estão sujeitos a grandes oscilações diárias de variáveis como pH, oxigênio dissolvido e principalmente temperatura, que chega a apresentar gradientes de até 20°C em um dia (VOLCAN; LANÉS; GONÇALVES, 2010). Para tolerar esta grande amplitude térmica, esses animais despendem elevado gasto energético em processos relacionados com ampla tolerância térmica, como expressão constitutiva das hsp70 indutivas, proteínas chaperonas responsáveis pelo correto “folding” de proteínas que sofreram termodesnaturação (PODRABSKY; SOMERO, 2007).

O Rio Grande do Sul possui forte tradição em monoculturas empregando agrotóxicos, os quais acabam por gerar degradação e descaracterização ambiental. O RD é o agrotóxico mais vendido no mundo e um dos mais utilizados no estado para o controle de plantas daninhas. Possui em sua formulação o glifosato como princípio ativo, acompanhado de adjuvantes. Sua ação é não seletiva e pós-emergente, inibindo uma enzima comum a todos os vegetais (WOODBURN, 2000; HELANDER; SALONIEMI; SAIKKONEN, 2012). No que se relaciona à vertebrados, algumas ações deletérias já foram comprovadas, sendo elas: desregulação endócrina, causada pela ação do glifosato (WALSH et al., 2000), e aumento do estresse oxidativo causado por componentes adjuvantes (CAVALCANTE; MARTINEZ; SOFIA, 2008).



Outro ponto que têm preocupado pesquisadores conservacionistas se relaciona aos efeitos do aquecimento global sobre a fauna e flora. Dentro desse contexto, os estudos sobre fisiologia termal vêm ganhado relevância e notoriedade científica (LEWIS, 2006; BROOK; SODHI; BRADSHAW, 2008; HOFFMANN; CHOWN; CLUSELLA-TRULLAS, 2013). Pressupõe-se que, caso as previsões de aquecimento global sejam realistas, poderão ocorrer processos de extinção em diversos táxons, inclusive em peixes (REZENDE; TEJEDO; SANTOS, 2011). Essas projeções se baseiam única e exclusivamente na plasticidade dos limites térmicos da fauna já estudada em relação às previsões de aquecimento global, mas poucos trabalhos levam em conta processos antrópicos que ocorrerão em conjunto com os processos de aquecimento da terra (LEWIS, 2006; BROOK; SODHI; BRADSHAW, 2008; HOFFMANN; CHOWN; CLUSELLA-TRULLAS, 2013). Dessa forma, é possível que as projeções atuais sejam falsamente otimistas. Dentro deste contexto, estudos sobre o sinergismo entre processos antrópicos, como liberação de agrotóxicos na natureza, e fisiologia termal possibilitam uma abordagem funcional sobre conservação e podem gerar conhecimento relevante para projeções realistas acerca de alterações climáticas globais.

Dentro dos estudos sobre fisiologia termal, a temperatura crítica máxima (CTMax) é classicamente utilizada para inferir desempenho térmico. A CTmax é caracterizada como a temperatura limite a qual um animal pode ser exposto antes de morrer (BILYK; EVANS; DEVRIES, 2012; VORHEES; BRADLEY, 2012). Sua medição normalmente depende de “endpoints” comportamentais como ausência de resposta a estímulos externos, espasmos musculares ou desmaios, após terem sido expostos a um aumento gradual de temperatura (VORHEES; BRADLEY, 2012).

Levando isto em consideração, o nosso objetivo foi estudar a ação do herbicida RD sobre a resistência térmica de *A. nigrofasciatus*, em busca de dados relevantes para estratégias de conservação do grupo.

## 4.2 Material e métodos

### *Animais experimentais*

Os indivíduos de *A. nigrofasciatus* utilizados em nos experimentos foram coletados sob licença do IBAMA/ICMBio (nº. 15108-1). Os embriões foram obtidos a partir das desovas de cinco casais desta espécie, todos criados da mesma forma, sob fotoperíodo 12L:12E e temperatura controlada (20°C). Os embriões eram mantidos em potes com água (5ml) em ambiente escuro e temperatura controlada (20°C).

### *Tratamentos*

Este experimento foi feito com dois grupos, um controle (n=12) que não passou por exposição e um grupo (n=9) que passou por exposição de 96h a 1mg/L de RD (Roundup transorb® - 0,588g/L de glifosato, Monsanto do Brasil).

### *Desenho experimental*

Todos os embriões utilizados no experimento estavam no mesmo estágio de desenvolvimento (estágio 43, pré-eclosão) (WOURMS, 1972c). As exposições tinham duração de 96h e foram feitas todas em triplicata com 3 embriões por repetição. Cada unidade experimental consistia em potes com 5ml de água com ou sem RD. Após o período de exposição, os embriões eram postos individualmente em uma placa de Petri com 14ml de água decolorada, a 20°C e sem RD. Essa placa de Petri com um embrião era então posta em um estereomicroscópio para obtenção do CTMax. As taxas de aquecimento da água e a CTMax experimentadas por cada embrião eram anotadas e posteriormente planilhadas para análise estatística.

### *Obtenção da temperatura crítica máxima*

Para a obtenção da CTMax, os embriões foram individualmente expostos a um aumento gradual de temperatura (1,3±0,4°C/min) até ausência de batimento cardíaco por 5s ("endpoint"), momento no qual foi anotada a temperatura a qual o embrião estava exposto (CTMax). O aquecimento da água onde os embriões se encontravam foi gerado a partir da lâmpada de um estereomicroscópio, pelo qual se observou os batimentos cardíacos do

embrião. Todos os experimentos foram feitos com o mesmo estereomicroscópio e esse era pré-aquecido até alcançar a temperatura constante de 56°C (temperatura máxima fornecida pela luz do estereomicroscópio em ambiente climatizado a 20°C). Dessa forma, a água onde os embriões se encontravam era aquecida pela luz do estereomicroscópio que se encontrava a uma temperatura constante. A temperatura de exposição dos embriões foi anotada a cada 30s com o intuito de testar se todos os embriões foram expostos às mesmas taxas de aquecimento. As observações de cada tratamento foram compostas por testes cegos onde o observador (mesma pessoa durante todo o experimento) não tinha acesso à temperatura na qual a água se encontrava. O intuito do teste cego é minimizar os efeitos do observador sobre o experimento, visto que a interpretação do “endpoint” envolve análise subjetiva do observador.

#### *Análise estatística*

Os dados foram apresentados na forma de média  $\pm$  desvio padrão. As taxas de aquecimento de cada embrião foram testadas mediante ANOVA (uma via), após terem sido feitos os testes de Kolmogorov-Smirnov (normalidade) e Levene (homogeneidade da variância). As médias da CTMax foram testadas a partir de testes t. Regressões lineares também foram feitas a fim de se obter o índice de correlação de Pearson entre as taxas de aquecimento e a CTMax dos diferentes grupos. Todas as análises foram feitas a partir do programa Statistica 7.0<sup>®</sup> e Sigmaplot 11.0<sup>®</sup> considerando um nível de significância de 95% ( $p < 0,05$ ).

### **4.3 Resultados**

#### **4.3.1 Taxas de aquecimento**

Não encontramos diferenças estatísticas para as taxas de aquecimento experimentadas pelos embriões nem entre as repetições de cada tratamento, nem entre os tratamentos. Portanto, qualquer diferença observada entre os tratamentos não foi gerada a partir de diferentes taxas de aquecimento, e sim pela exposição *per se*.

### 4.3.2 CTMax dos embriões

As CTMax médias do grupo controle e da exposição foram  $38,20 \pm 1,26^\circ\text{C}$  e  $36,12 \pm 1,09^\circ\text{C}$  respectivamente e demonstraram correlação negativa em relação aos tratamentos (Correlação de Pearson:  $r = -0,671$ ;  $p = <0,001$ ), além de terem sido estatisticamente diferentes entre si (teste t:  $t=3,947$ ;  $p = <0,001$ ) (Fig.1).

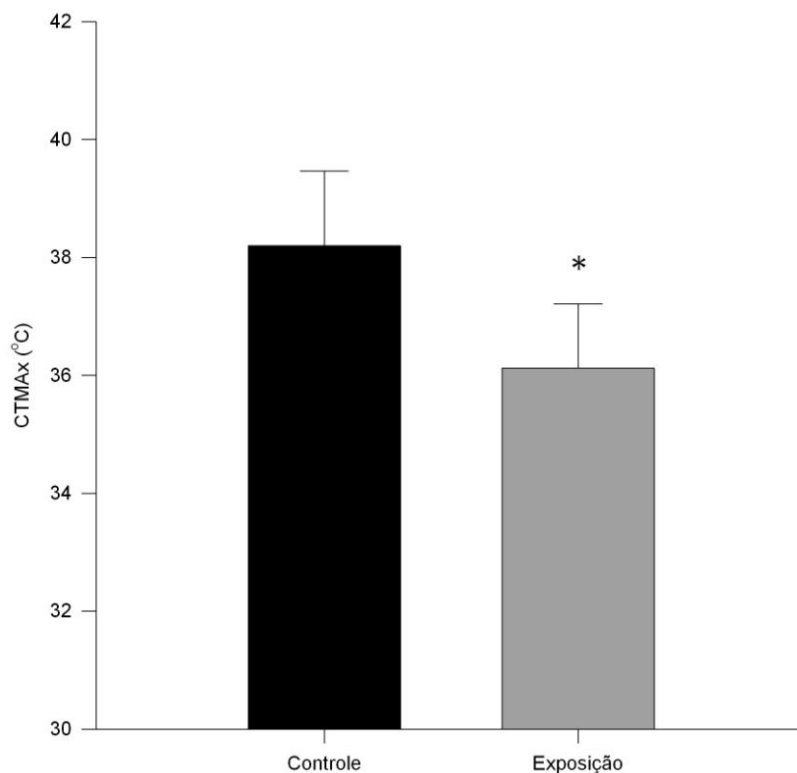


Figura 1 - Temperatura crítica máxima de embriões de *Austrolebias nigrofasciatus* expostos por 96h a 1mg/L de Roundup transorb® e grupo controle. \* denota diferença significativa entre os tratamentos (Teste t,  $p < 0,001$ ).

Apesar de não termos encontrado diferenças significativas entre as taxas de aquecimento, estas influenciaram os grupos controle (Correlação de Pearson:  $r = -0,03$ ;  $p = 0,90$ ) e exposição (Correlação de Pearson:  $r = -0,75$ ;  $p < 0,001$ ) em intensidades diferentes, Fig. 2 e Fig. 3, respectivamente.

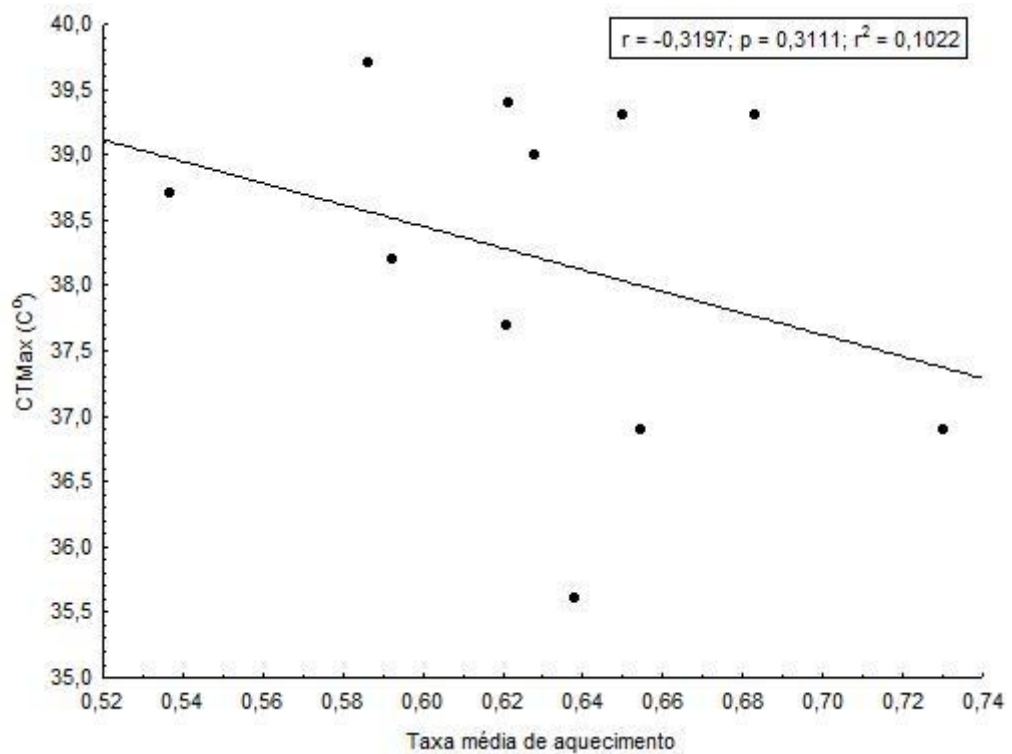


Figura 2 - Correlação entre temperatura crítica máxima e taxas médias de aquecimento de embriões de *Austrolebias nigrofasciatus* em condições de controle (Correlação de Pearson:  $r = -0,32$ ;  $p = 0,31$ ).

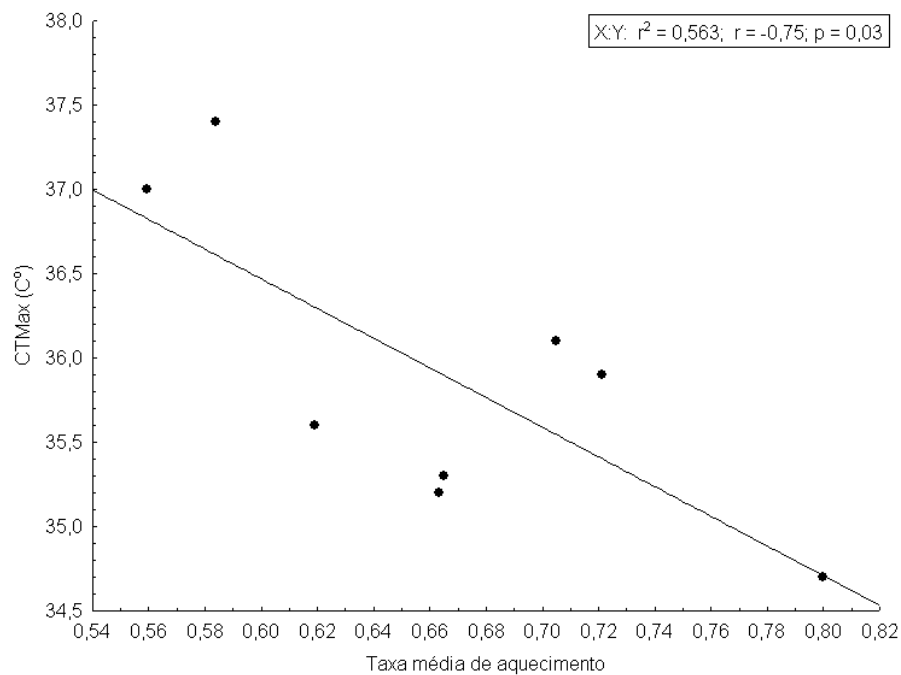


Figura 3 - Correlação entre temperatura crítica máxima e taxas médias de aquecimento de embriões de *Austrolebias nigrofasciatus* expostos por 96h a 1mg/L de Roundup transorb®. (Correlação de Pearson:  $r=-0,75$ ;  $p<0,001$ ).

#### 4.4 Discussão

Os peixes que compõem a família Rivulidae dependem de adaptações que os tornam tolerantes aos ambientes extremos onde ocorrem. Esses ambientes são considerados extremos por apresentar ampla variação diária de propriedades físico-químicas, como a temperatura (VOLCAN; LANÉS; GONÇALVES, 2010). Nosso trabalho focou na ação do RD sobre a tolerância térmica de embriões de *A. nigrofasciatus*, visto ser um caracter importante para a manutenção das populações dos peixes que compõem a família (PODRABSKY et al., 2007; PODRABSKY et al., 2008). As concentrações utilizadas no experimento se basearam em dosagens encontradas em corpos d'água do Estado, logo, podem ser consideradas como ecologicamente relevantes. As exposições foram realizadas em curtos períodos de tempo (96h) de forma a se inserir no tempo de meia vida descrito para o glifosato, principio ativo do RD (SOSO et al., 2007; BRANQUINHO; FERREIRA; CARDARELLI-LEITE, 2010). Portanto, os dados obtidos nesse primeiro experimento podem ser considerados como ecologicamente relevantes.

Nossos resultados demonstram que o herbicida RD diminuiu a CTMax de embriões de *A. nigrofasciatus* em 2,53C° em média. A revisão feita por nosso grupo de pesquisa não achou outro trabalho que demonstrasse a ação deste herbicida sobre a fisiologia termal de peixes. Da mesma forma, trabalhos sobre CTMax em embriões são raros, portanto, os dados aqui apresentados são, até onde se sabe, inéditos dentro do meio científico.

O RD já foi relacionado com o aumento de estresse oxidativo por diversos trabalhos, assim como desregulador endócrino (WALSH et al., 2000; DE MENEZES et al., 2011; GUILHERME et al., 2012). Possivelmente, a ação deste herbicida na CTMax relaciona-se com o processo de estresse oxidativo, visto que este gera aumento na peroxidação da membrana plasmática celular (BREUKELEN et al., 2010). A alteração na fluidez de membrana é uma das principais formas pela qual organismos ectotérmicos lidam com estresse térmico (PODRABSKY; SOMERO, 2004). Possivelmente o RD, ao gerar

estresse oxidativo, gere também danos na membrana plasmática, dificultando o processo de ajuste de sua fluidez, permeabilidade e seletividade. Dessa forma, diminuindo a resistência térmica. De fato, nossos resultados mostram que os animais expostos foram muito mais sensíveis em relação a taxas de aquecimento mais intensas, visto que observamos uma forte correlação entre variações nas taxas médias de aquecimento e a CTMax para os animais da exposição, o que não foi verdade para o grupo controle. Isso mostra que o RD, além de diminuir a CTMax, torna os animais mais sensíveis a variações bruscas de temperatura.

Pensando na importância ecológica que a tolerância térmica desses animais possui e as ações demonstradas do RD nesse processo, concluímos que este herbicida, mesmo em baixas concentrações e sob curto tempo de exposição, pode agir diminuindo o “fitness” de populações de Rivulidae por alterações em sua capacidade em lidar com estresse térmico, fator essencial para o sucesso adaptativo destas espécies.

## **5 Capítulo III - Efeitos da exposição ao Roundup transorb<sup>®</sup> no número e no tamanho de ovos do peixe anual *Austrolebias nigrofasciatus***

### **5.1 Introdução**

*Austrolebias nigrofasciatus* (Cyprinodontiformes: Rivulidae) ocorre em lagos efêmeros presentes no sul do Brasil que passam por períodos anuais de seca e de chuva. As populações desses animais sobrevivem aos períodos de seca completa através da presença de embriões em diapausa resistentes á estresse hídrico (PODRABSKY et al., 2007; PODRABSKY et al., 2008). A maioria das espécies que compõe a família estão ameaçadas de extinção, frente a isso, o governo do Brasil implementou o Plano de Ação Nacional para a Conservação dos Rivulídeos Ameaçados de Extinção. De acordo com as diretrizes deste plano nacional, *A. nigrofasciatus* é uma espécie modelo para pesquisas sobre conservações e manejo do grupo (ICMBio, 2012). Peixes anuais possuem também algumas características que os torna bons modelos experimentais, como maturação sexual precoce, reprodução contínua e grande capacidade reprodutiva (GONÇALVES et al., 2011; GARCIA, et al., 2008).

A reprodução é um “endpoint” clássico em experimentos de ecotoxicologia e permite inferências sobre ações deletérias de agrotóxicos sobre as populações animais, inclusive peixes (SOSO et al., 2007). A regulação do processo reprodutivo se dá através de diversos hormônios que controlam o funcionamento do eixo HHG. O ultimo grupo de hormônios produzidos a partir da ativação deste eixo são os hormônios gonadais, *i.e.* andrógenos, estrógenos e progestágenos, todos produzidos a partir do processo de esteroidogênese. Esses hormônios regulam o crescimento das gônadas, a gametogênese e a liberação de gametas (BONGA, 1997).

O RD é o herbicida mais utilizado no mundo (THONGPRAKAIKANG et al., 2013), possui ação não seletiva e pós emergente. Este agrotóxico é



composto por um princípio ativo glifosato e por adjuvantes que o auxiliam a penetrar no tecido dos vegetais (JIRAUNGKOORSKUL et al., 2002). Já foram descritas ações deletérias deste composto sobre a fisiologia de vertebrados e o corpo de evidências que sustenta a designação do RD como desregulador da reprodução é extenso. Trabalhos realizados *in vitro* já descreveram ações do RD sobre a esteroidogênese, como diminuição na produção da proteína de regulação aguda da esteroidogênese (StAR), diminuição da atividade da enzima “Cholesterol side-chain cleavage enzyme” (P450<sub>scc</sub>) e diminuição na produção da enzima “3-β-hydroxysteroid dehydrogenase” (3β-HSD) (WALSH et al., 2000). Ações *in vitro* do glifosato puro sobre hormônios esteroides também já foram descritas, como diminuição na atividade da enzima aromatase (RICHARD et al., 2005) e ações estrogênicas mediadas por ligação agonista em receptores de estrógeno (ER) (THONGPRAKAI SANG et al., 2013). Algumas ações *in vivo* sobre hormônios esteroides já foram descritas para peixes, como aumento na produção de cortisol e diminuição na produção de E<sub>2</sub> (SOSO et al. 2007) e supressão da resposta de estresse (CERICATO et al. 2008; KOAKOSKI et al., 2013).

Dentro do contexto apresentado, tivemos por objetivo testar o efeito da exposição ao RD sobre a reprodução de *A. nigrofasciatus* a partir da avaliação da fertilidade e do diâmetro dos ovos.

## 5.2 Material e métodos

### *Animais experimentais*

Foram utilizados 12 casais de *A. nigrofasciatus* (peso médio = 0,63±0,10, idade desconhecida) coletados em um banhado no Município de Capão do Leão sob licença do IBAMA/ICMBio (nº. 41907-1) e aclimatados em condições laboratoriais por uma semana antes do ensaio. Durante a aclimação e ensaio, a qualidade da água foi monitorada diariamente através dos parâmetros: pH (7,52±0,06); temperatura (20,75±2,17°C) e NH<sub>3</sub> (0,00±0,25ppm). Os animais eram alimentados *ad libitum* com zooplâncton nativo.

### *Desenho experimental*

Cada casal passou pela exposição no mesmo aquário, mas as fêmeas se encontravam fisicamente isoladas do macho por potes de plástico furados e transparentes. Este procedimento foi realizado para minimizar danos causados por brigas entre o casal, sem impedir a estimulação sexual, tanto visual (comportamentos de corte) como química (liberação de feromônios na água) entre os animais. Após o período de exposição (96h), os casais foram transferidos para aquários com água sem RD e com um ninho de desova (potes padronizados com 100mL de água mais 2 cm do fundo coberto com fibra de coco farelada). Os casais permaneceram fisicamente juntos para reprodução durante 24h. Passado este período, os ovos depositados em cada ninho foram coletados e medidos. O número de ovos produzidos foi relacionado por grama de fêmea (ovos/g), como descrito na literatura (VOLCAN et al. 2012). O experimento foi feito com dois grupos, um controle (n=4) com casais que não foram expostos ao RD e um tratamento (n=4) no qual os animais foram expostos durante 96h à concentração nominal de 1mg/L de Roundup Transorb<sup>®</sup>. Cada casal foi considerado como uma unidade experimental, perfazendo quatro repetições por tratamento. Os animais não foram alimentados durante o experimento.

### *Análise estatística*

Os dados são apresentados na forma de média  $\pm$  desvio padrão. Os dados sobre o número de ovos obtidos foram testados a partir de teste t, após terem sido feitos os testes de Kolmogorov-Smirnov (normalidade) e Levene (homogeneidade da variância). Os dados do diâmetro dos ovos não apresentaram distribuição normal e foram analisados aplicando-se o teste de Mann-whitney U. Todas as análises estatísticas foram processadas nos programas Statistica 7.0<sup>®</sup> e Sigmaplot 11.0<sup>®</sup>, considerando um nível de significância de 95% ( $p < 0,05$ ).

## **5.3 Resultados**

Foram encontradas diferenças significativas no número de ovos/g produzidos pelos grupos controle ( $38,90 \pm 17,17$  ovos/g) e da exposição ( $16,69 \pm 7,41$  ovos/g) (Fig.4), O diâmetro dos ovos fecundados também foi

diferente entre o grupo controle ( $3,31 \pm 0,30\text{mm}$ ) e o da exposição ( $3,50 \pm 0,18\text{mm}$ ) (Fig.5).

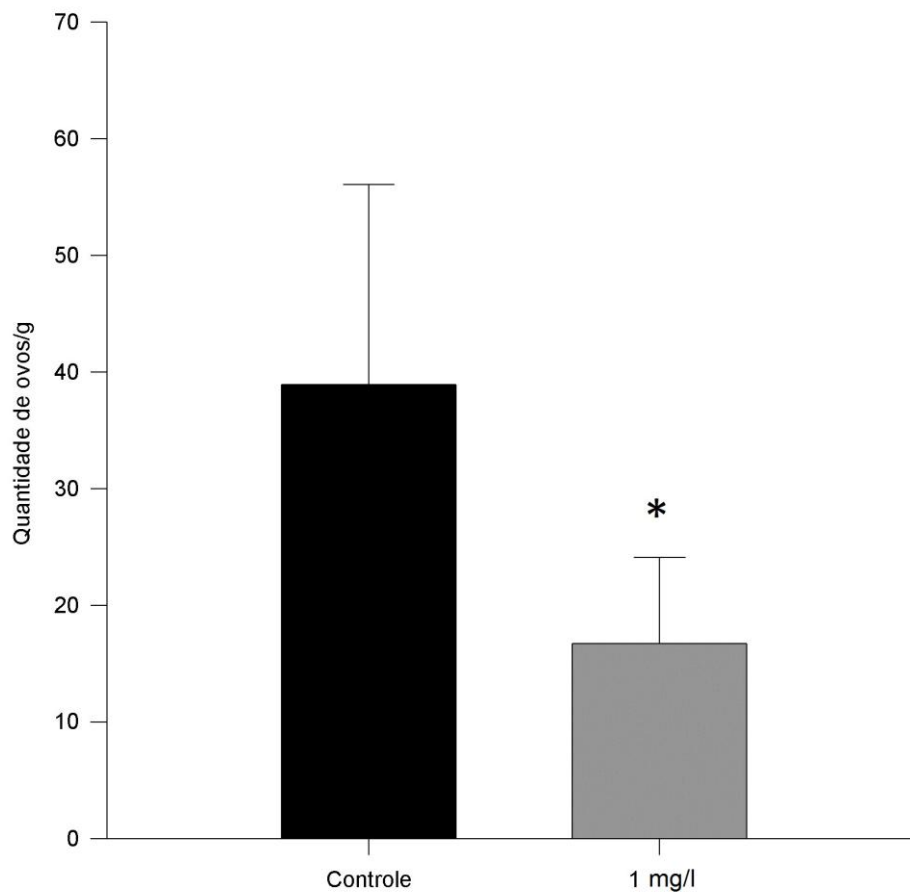


Figura 4 – Número de ovos/g produzidos por casais de *Austrolebias nigrofasciatus* expostos por 96h à Roundup transorb® (1mg/L) e grupo controle. \* denota diferença significativa entre os tratamentos (teste-t;  $p < 0,05$ ).

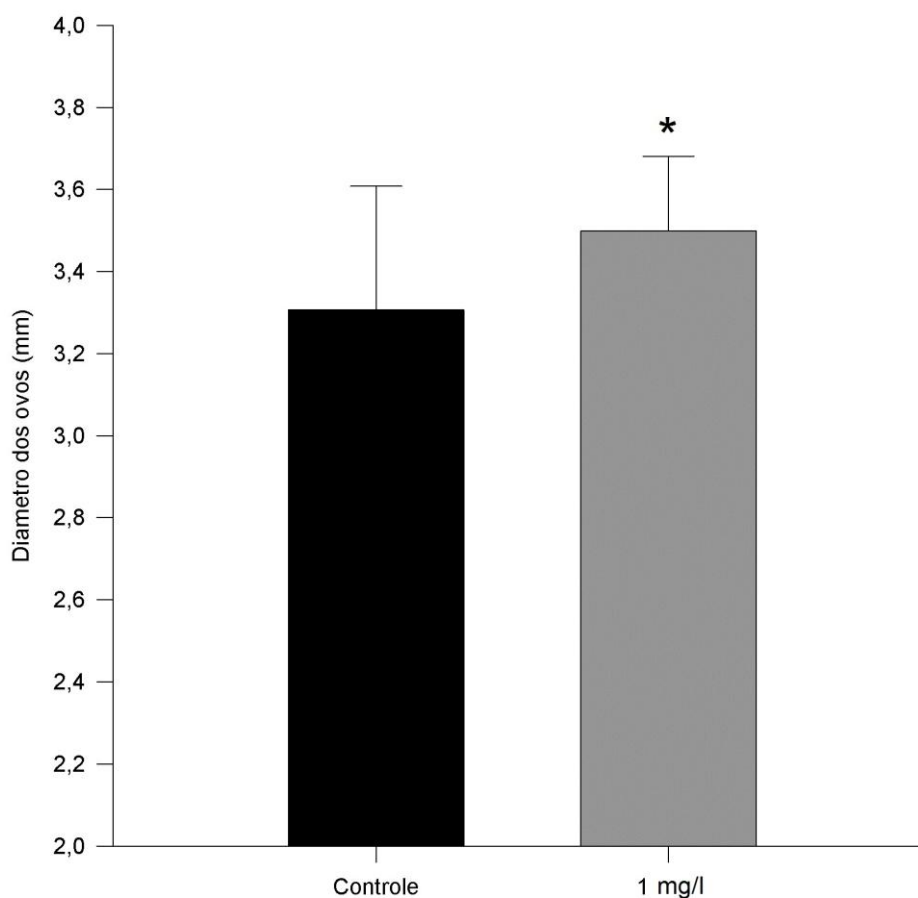


Figura 5 – Diâmetro de ovos fecundados produzidos por casais de *Austrolebias nigrofasciatus* expostos por 96h à Roundup transorb® (1mg/L) e grupo controle. \* denota diferença significativa entre os tratamentos (Mann-whitney U;  $p < 0,05$ ).

#### 5.4 Discussão

Os resultados obtidos no experimento demonstram que a exposição ao RD gerou duas ações sobre a reprodução de *A. nigrofasciatus*, diminuição na quantidade de ovos produzidos e aumento no diâmetro de ovos fecundados. Ambos os processos são regulados pela ativação do eixo HHG, mas são modulados por hormônios diferentes. O diâmetro dos ovos pode estar diretamente ligado à quantidade de reservas energéticas depositada pela fêmea durante o processo de vitelogênese (VG). O principal hormônio que regula a VG é o  $17\beta$ -estradiol ( $E_2$ ), composto produzido pelos ovários frente estimulação hipofisária pelo FSH. O  $E_2$  também possui um papel importante como estimulador da proliferação de oogônias (NAGAHAMA; YAMASHITA, 2008), o que pode influenciar no número final de oócitos produzidos. A

quantidade final de ovos expelidos pelas fêmeas também é controlado pela hipófise, através da liberação de LH. Esse hormônio desloca o processo de esteroidogênese gonadal, fazendo com que ocorra a produção de  $17\alpha,20\beta$ -Dihydroxy-4-pregnen-3-one ( $17\alpha,20\beta$ -DP), composto que estimula a maturação final de oócitos pós-vitelogênicos (NAGAHAMA, 1997). Dessa forma, os resultados observados nesse trabalho podem apontar para ações do RD sobre gonadotropinas (FSH e LH) e/ou produção de hormônios esteroides nas gônadas ( $E_2$  e  $17\alpha,20\beta$ -DP).

Como não fizemos uma abordagem mecanicista das ações do RD sobre a reprodução, podemos apenas hipotetizar sobre a forma como este herbicida agiu sobre os animais do nosso experimento. As hipóteses que formulamos com base nas ações já descritas do RD sobre vertebrados são: 1) ações em nível de sistema nervoso central, alterando a produção de gonadotropinas; 2) ações sobre a esteroidogênese gonadal, alterando padrões de produção de  $E_2$  e/ou  $17\alpha,20\beta$ -DP; 3) ações indiretas sobre a reprodução a partir de aumento na resposta de estresse, mediada por corticosteroides.

Frente aos resultados obtidos, conclui-se que o RD possui ações deletérias sobre a reprodução de Rivulidae, diminuindo a fertilidade desses animais mesmo após exposição aguda e a baixas concentrações. Mais estudos são necessários a fim de se abordar os mecanismos envolvidos nesse processo.

## **6 Capítulo IV - Herbicida Roudup Transorb<sup>®</sup> como potencializador da resposta de estresse em juvenis de *Rhamdia quelen***

### **6.1 Introdução**

A resposta fisiológica de estresse é regulada pelo eixo hipotálamo-hipófise-interrenais (HHI) e sua ativação culmina na liberação de glicocorticoides na corrente sanguínea. Este grupo de hormônios é responsável por modular ajustes metabólicos e iônicos necessários para se lidar com desafios ambientais, dessa forma, alterações prolongadas no funcionamento deste eixo podem diminuir o “fitness” das espécies (CERICATO et al., 2008). O perfil leucocitário e a razão entre neutrófilos:linfócitos (N:L) são alterados em resposta à liberação de glicocorticoides, portanto, podem ser utilizados como marcadores de estresse confiáveis. Aumentos na razão N:L estão correlacionados à elevações nas concentrações plasmáticas de corticosteroides (DAVIS et al. 2008).

No Rio Grande do Sul, as práticas de monoculturas, como o arroz, promovem a descaracterização e degradação do ambiente aquático. Parte desses impactos está relacionada com a utilização de agrotóxicos que podem poluir corpos d’água adjacentes às plantações. Dentre estes compostos, o herbicida Roundup<sup>®</sup> (RD) é um dos mais populares (SALBEGO et al., 2010). Este composto possui ação não seletiva e contém glifosato (N-fosfometil glicina) como seu princípio ativo (JIRAUNGKOORSKUL et al., 2002).

A ação do glifosato sobre a fisiologia de vertebrados está relacionada à desregulação das vias de esteroidogênese. Este composto inibe a transcrição da proteína de esteroidogênese rápida (proteína stAR), responsável pelo transporte de moléculas de colesterol de fora para dentro da membrana mitocondrial. Dessa forma, a produção de hormônios esteróides é diminuída (WALSH et al., 2000). Sendo assim, o glifosato pode alterar diversos processos fisiológicos que são modulados por tais hormônios, como a resposta fisiológica de estresse (SOSO et al., 2007; CERICATO et al., 2008). Além de alterações

nas vias esteroidogênicas, o RD pode causar também aumento no estresse oxidativo pela ação de diversos surfactantes presentes em sua formulação. Estes compostos inibem a ação de enzimas antioxidantes, dessa forma, potencializam danos causados por espécies reativas de oxigênio em estruturas celulares e diversos tecidos (GLUSCZAK et al., 2007). O processo de estresse oxidativo também vem sendo relacionado com a ativação do eixo HHI em diversos estudos (DORVAL et al., 2003; MILLER et al., 2007).

O jundiá *Rhamdia quelen* (QUOY & GAIMARD 1824) é uma espécie nativa do RS e possui grande relevância para a aquicultura no estado. Esta espécie representa também um importante modelo para estudos toxicológicos (SOSO et al., 2007) e sobre estresse (CERICATO et al., 2008).

Dentro do contexto apresentado, tivemos por objetivo testar o sinergismo entre exposição aguda ao RD em baixa concentração e a resposta fisiológica de estresse, utilizando juvenis de *R. quelen* como modelo experimental.

## 6.2 Material e métodos

### *Animais experimentais*

Foram utilizados 24 juvenis de *R. quelen* ( $1,40 \pm 0,46$ g;  $5,76 \pm 0,68$ cm), todos com a mesma idade (60 dias) e criados sob mesmas condições, fotoperíodo 12L:12E, temperatura constante de 20°C e eram alimentados com ração. Os animais foram obtidos junto ao Laboratório de Piscicultura da Barragem do Chasqueiro e os experimentos realizados no Laboratório de Fisiologia Aplicada a Aquicultura, na UFPel. Os alevinos não foram alimentados durante o experimento.

### *Tratamentos*

Foram utilizados dois tratamentos, um controle (n=12) com juvenis que não passaram por exposição e um segundo tratamento (n=12) no qual os animais foram expostos durante 96h à concentração nominal de 10% da CL5096h de Roundup Transorb® (0,73mg/L) descrito para *R. quelen* adulto (CERICATO et al., 2008). Ambos os tratamentos foram divididos em repetições que continham três juvenis. Ambos os tratamentos possuíam quatro repetições. As unidades experimentais eram feitas de aquários com volume de 5L. O

experimento foi feito sobre fotoperíodo controlado (12L:12E), temperatura constante (20°C) e sem renovação da água.

#### *Desenho experimental*

Após o período de exposição ao RD, os animais foram expostos ao ar por 5 min com o intuito de provocar uma resposta de estresse. Após a exposição ao ar, os animais foram postos novamente em seus respectivos tratamentos. Tendo-se passado 1 h, os animais foram crió-anestesiados e sacrificados para a coleta de sangue, feita através de secção do pedúnculo caudal. Após a coleta de sangue, os juvenis foram necropsiados para obtenção do fígado, o qual foi pesado para posterior realização do índice hepatossomático (IHS) [(Peso do Fígado/peso total) x 100]. Foram preparadas extensões sanguíneas, fixadas com metanol e coradas com Giemsa 5%. A partir destas foram quantificados 100 leucócitos por peixe para realização do perfil leucocitário e cálculo da razão N:L. As células observadas foram: linfócitos, neutrófilos, célula granulocítica especial, eosinófilos, monócitos e basófilos (DAVIS et al., 2008).

#### *Análise estatística*

Os dados de cada tipo celular foram comparados com uso de testes t desde que respeitadas as pressuposições da análise paramétrica (distribuição normal e homogeneidade da variância). As análises foram processadas com uso dos softwares Statistica 7<sup>®</sup> e SigmaPlot 11.0<sup>®</sup> sob o nível de significância de 95% ( $p < 0,05$ ).

### **6.3 Resultados**

Os dados do perfil leucocitário e IHS são apresentados na tabela 2. Encontramos diferenças estatísticas apenas nas seguintes medições: número de linfócitos, o qual foi menor nos animais da exposição (Fig.6), número de neutrófilos, o qual foi maior nos animais da exposição (Fig.7) e razão N:L, a qual foi maior nos animais da exposição (Fig.8).



Tabela 2 – Perfil leucocitário e índice hepatossomático de juvenis de *Ramdia quelea* expostos à Roundup transorb R® (0,73mg/L) por 96h e grupo controle. Médias em negrito denotam diferença significativa entre os tratamentos (teste-t;  $p < 0,05$ ).

Medições	Controle (Media±DP)	Exposição (Media±DP)
Neutrófilos (%)	<b>24,00±9,91</b>	<b>39,91±10,31</b>
Linfócitos (%)	<b>71,25±10,79</b>	<b>56,08±10,43</b>
Célula granulocítica especial (%)	0,25±0,45	0,41±0,90
Eosinófilos (%)	0,00±0,00	0,16±0,38
Monócitos (%)	4,41±2,81	3,33±2,53
Basófilos (%)	0,08±0,28	0,08±0,28
Razão N:L	<b>0,36±0,20</b>	<b>0,76±0,33</b>
Índice hepatossomático	3,10±0,81	3,20±1,41

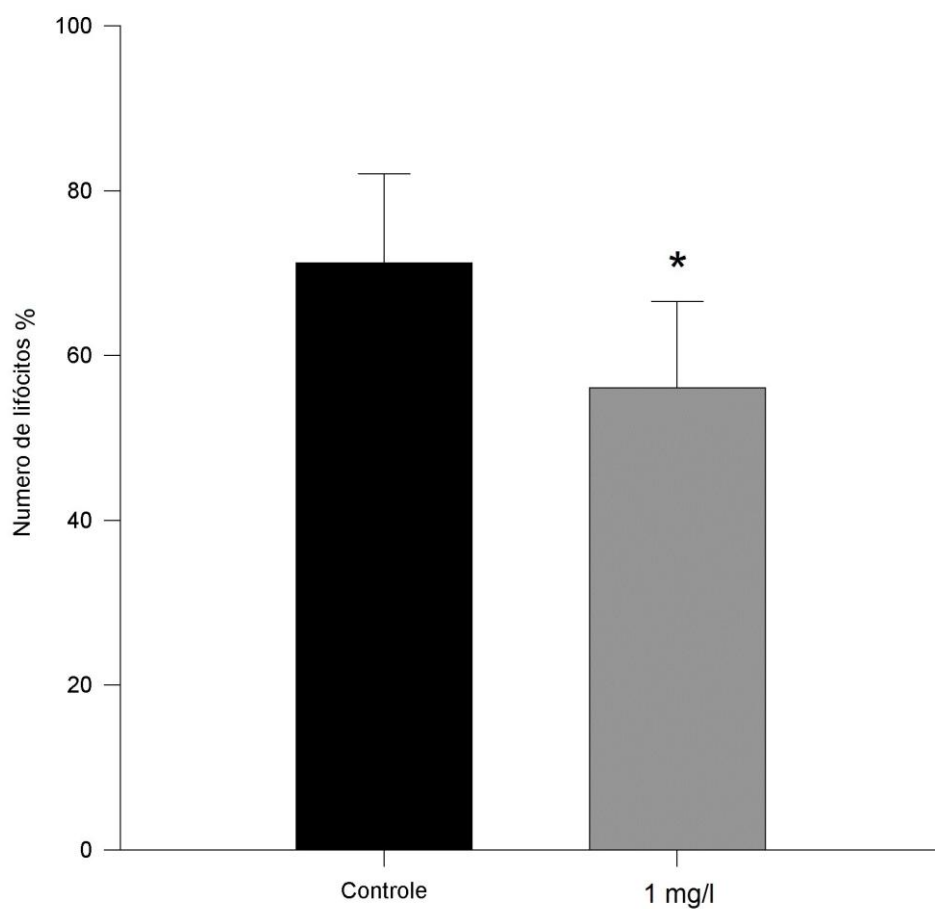


Figura 6 – Percentual de linfócitos em juvenis de *Ramdia quelen* expostos ao Roundup transorb® (0,73mg/L, por 96h) e grupo controle. \* denota diferença significativa entre as médias dos tratamentos (teste t;  $p < 0,05$ ).

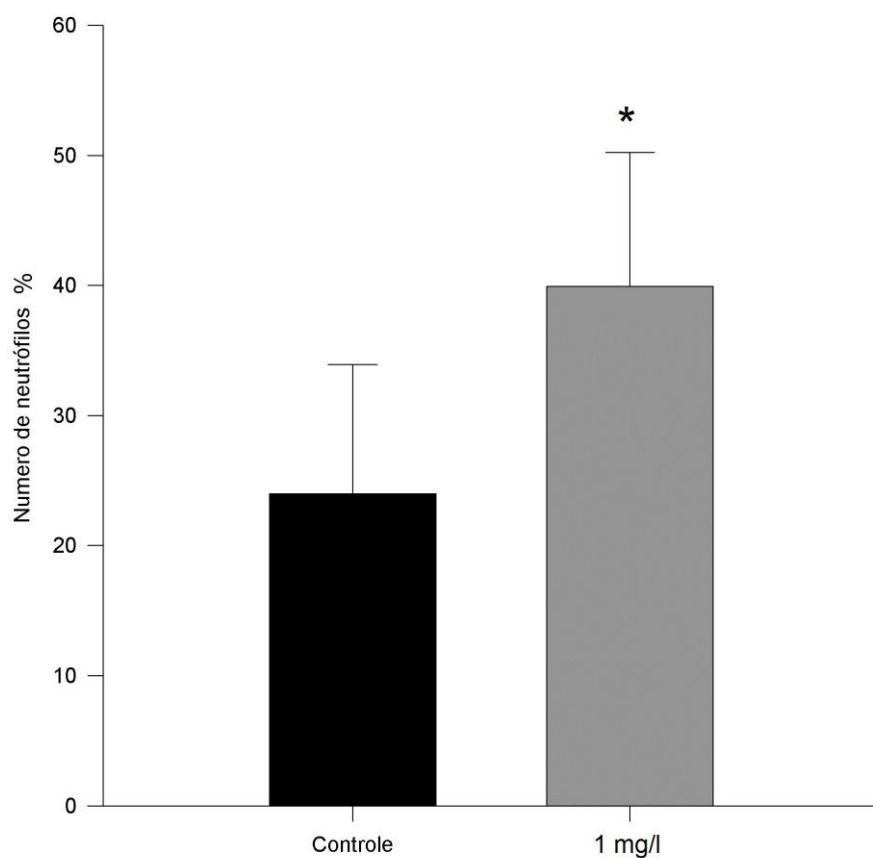


Figura 7 – Percentual de neutrófilos em juvenis de *Ramdia quelen* expostos ao Roundup transorb® (0,73mg/L, por 96h) e grupo controle. \* denota diferença significativa entre as médias dos tratamentos (teste t;  $p < 0,05$ ).

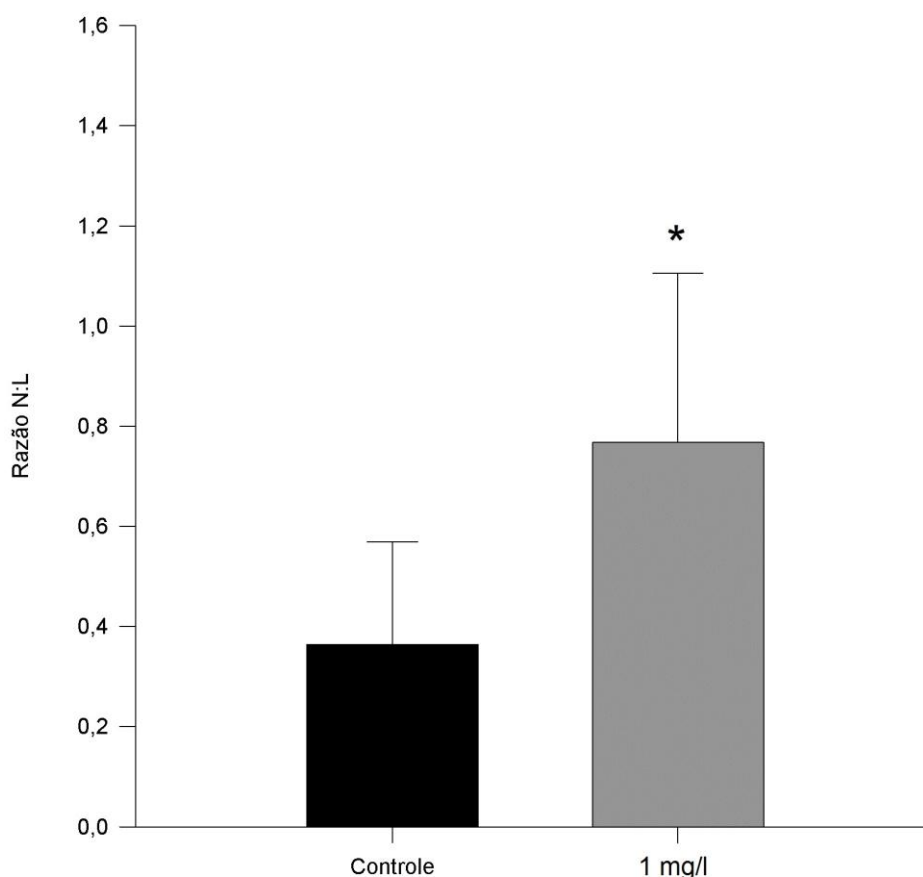


Figura 8 – Razão entre neutrófilos e linfócitos (N:L) de juvenis de *Ramdia quelen* expostos por 96h à Roundup transorb® (0,73mg/L) e grupo controle. \* denota diferença significativa entre os tratamentos (teste t;  $p < 0,05$ ).

#### 6.4 Discussão

As respostas observadas no perfil de leucócitos são moduladas pela liberação de glicocorticóides, estes hormônios alteram as proporções entre leucócitos por ações sobre a distribuição destas células entre a corrente sanguínea e demais tecidos. Em resposta ao estresse, os linfócitos se ligam às células endoteliais e passam para tecidos como o baço, a pele e nódulos linfáticos. Dessa forma, a quantidade de linfócitos na corrente sanguínea diminui. No caso dos neutrófilos, a ação dos glicocorticóides é contrária, já que estas células migram dos tecidos mencionados para a corrente sanguínea, aumentando a quantidade de neutrófilos circulantes (DAVIS et al. 2008).

As diferenças observadas demonstram que a exposição ao RD induziu uma resposta de estresse mais acentuada. No caso da razão N:L, os animais

da exposição exibiram uma resposta duas vezes maior do que a apresentada no controle. De fato, diversos trabalhos demonstram que exposições a baixas concentrações de RD (menores do que 50% da CL5096h) geram respostas de estresse fisiológico (SOSO et al., 2007). Em oposição a isso, exposições mais altas podem inibir a resposta de estresse (CERICATO et al., 2008).

A explicação para o efeito antagônico e dose-dependente do RD sobre a resposta de estresse fisiológico pode ser elucidada pelas ações dos diferentes compostos que constituem este herbicida. O aumento de estresse oxidativo, gerado por seus adjuvantes, pode ser responsável por uma maior ativação do eixo HHI, visto que ambos os processos parecem correlacionar-se (DORVAL et al., 2003; MILLER et al., 2007). Todavia, os efeitos inibitórios do RD sobre a resposta fisiológica de estresse podem ser explicados pelas ações do glifosato como supressor da esteroidogênese (WALSH et al., 2000). Frente às ações deste composto na produção de hormônios esteroides, Cericato et al., (2008) injetaram ACTH exógeno em indivíduos de *R. quelen* que haviam passado por exposições ao RD e em animais que não haviam passado por exposição. Ambos os grupos apresentaram respostas semelhantes de esteroidogênese. Dessa forma, é possível que a ação do glifosato não seja apenas sistêmica sobre a produção de hormônios esteroides, mas também a nível central, sobre a relação entre a interpretação de estímulos estressantes e *feedbacks* entre o hipotálamo e a hipófise (CERICATO et al., 2009).

Independentemente dos mecanismos de ação, nós observamos um aumento na resposta de estresse apresentada por peixes que haviam passado por exposição ao RD. Dessa forma, concluímos que este herbicida, na concentração testada, possui capacidade de potencializar os efeitos fisiológicos causados por agentes estressores a juvenis de *R. quelen*, mesmo sobre curtos períodos de exposição e sob baixas concentrações, tidas como ecologicamente relevantes.

## **7 Capítulo V Efeito da exposição aguda ao Roundup® na diapausa embrionária do peixe anual *Austrolebias nigrofasciatus***

### **7.1 Introdução**

Os peixes da família Rivulidae (Cyprinodontiformes) são conhecidos pelo seu elevado grau de endemismo, risco de extinção e grande diversidade de espécies (COSTA, 1998; MARQUES et al., 2002; ARENZON et al., 2003). Estes animais ocorrem em áreas úmidas temporárias de campos e banhados - verdadeiras poças com baixo volume d'água - que secam sazonalmente. Durante os períodos de estiagem, os indivíduos adultos da população morrem e permanecem vivos apenas seus embriões, os quais entram em estados hipometabólicos de resistência chamados diapausa I, II e III. Esses processos ocorrem em diferentes fases da embriogênese e não são obrigatórios (LAUFER et al., 2009; PODRABSKY; GARRETT; KOHL, 2010). A regulação da entrada e saída desses processos é pouco conhecida, mas fatores ambientais como fotoperíodos longos e altas temperaturas aumentam a proporção de embriões que não entram na diapausa II (HAND; PODRABSKY, 2000). Fatores maternos também influenciam esse processo, assim como exposições a testosterona e estradiol exógenos, apontando assim, hormônios esteroides como fortes candidatos a moduladores da diapausa II (PRI-TAL et al., 2011).

O herbicida RD é o agrotóxico mais utilizado no mundo (SALBEGO et al., 2010) e possui em sua formulação glifosato como princípio ativo acrescido de adjuvantes (JIRAUNGKOORSKUL et al., 2002). As ações deletérias descritas para o RD podem ser divididas de acordo com os compostos que fazem parte de sua formulação. Os adjuvantes usados na formulação do RD estão relacionados com a potencialização do processo de estresse oxidativo (GLUSCZAK et al., 2007; CAVALCANTE; MARTINEZ; SOFIA, 2008). As ações descritas para o glifosato se relacionam com diminuição na produção de acetilcolinesterase cerebral (SALBEGO et al., 2010; SANDRINI et al., 2013), com desregulação na produção de hormônios esteroides *in vitro* (WALSH et al.,

2000; RICHARD et al., 2005) e *in vivo* (SOSO et al., 2007; CERICATO et al., 2008).

Considerando o papel dos esteróides sexuais na modulação da diapausa II e as ações do glifosato nas vias esteroidogênicas, hipotetizamos que exposições ao RD iram alterar a entrada e saída deste estado. Sendo assim, o objetivo do trabalho foi testar a ação do RD sobre os padrões de diapausa II em embriões de *A. nigrofasciatus*.

## 7.2 Material e métodos

### *Animais experimentais*

Para a realização do experimento foram utilizados 120 embriões de *A. nigrofasciatus* obtidos a partir de reprodutores do laboratório de Fisiologia Aplicada à Aquicultura (UFPEl). Todos estavam na mesma fase de desenvolvimento embrionário (dispersão/reagregação) (WOURMS, 1972c) e estavam estocados da mesma forma, dentro de potos com 5ml no escuro e temperatura constante (20°C).

### *Tratamentos*

Foram utilizados três grupos, um controle (n=40) com embriões que não passaram por exposição e dois tratamentos (n=40 cada) no qual os animais foram expostos durante 96h às concentrações nominais de 1mg/L e 10mg/L de Roundup Transorb®. Os tratamentos foram realizados com quatro repetições feitas com 10 embriões em cada.

### *Desenho experimental*

Após exposição por 96h ao RD, os embriões foram observados em sete períodos para acompanhamento de seu desenvolvimento embrionário (estereomicroscópio). A primeira observação foi feita logo após as 96h de exposição e a segunda observação feita cinco dias pós-exposição (DPE). Em ambos os períodos foi observado o estágio de desenvolvimento dos embriões. A terceira observação foi feita 15DPE, quando se quantificou o número de somitos de cada embrião. Nos períodos de observação restantes (30, 35, 40 e 47DPE) foi observada a taxa de embriões pigmentados (nº de animais

pigmentados/ n<sup>o</sup> total de embriões). A observação destas características foi feita com o intuito de se avaliar a proporção de embriões em diapausa II, visto que embriões neste estado permanecem no período de somitogênese, dessa forma, ainda não apresentam a formação de melanócitos, células responsáveis pela produção do pigmento melanina.

#### *Análise estatística*

Os dados são apresentados na forma de média  $\pm$  desvio padrão. Os dados referentes à razão de embriões pigmentados foram testados mediante ANOVA (uma via), após terem sido feitos os testes de Kolmogorov-Smirnov (normalidade) e Levene (homogeneidade da variância). Diferenças significativas entre médias foram determinadas pelo emprego do teste *post hoc* de Tukey. Os dados acerca do número de somitos foram analisados pelo teste de Kruskal-Wallis, seguido do teste *post-hoc* de Tukey. Todas as análises do trabalho foram feitas a partir dos programas Statistica 7.0<sup>®</sup> e Sigmaplot 11.0<sup>®</sup>. Todos os testes foram considerados sob um nível de significância de 95% ( $p < 0,05$ ).

### **7.3 Resultados**

O número de somitos dos embriões após 15 DPE não foram diferentes entre os tratamentos (controle:  $13,72 \pm 5,95$ ; 1mg/L:  $13,95 \pm 6,90$ ; 10 mg/L:  $14,17 \pm 7,41$ ) (Fig.9). Entretanto, encontramos diferenças na taxa de embriões pigmentados 30 DPE, visto que o tratamento de 10mg/L apresentou menos animais pigmentados em relação ao controle (Fig.10). A taxa de embriões não pigmentados na menor concentração de RD não apresentou diferença em relação ao controle, independentemente do tempo pós exposição (Tab.3).



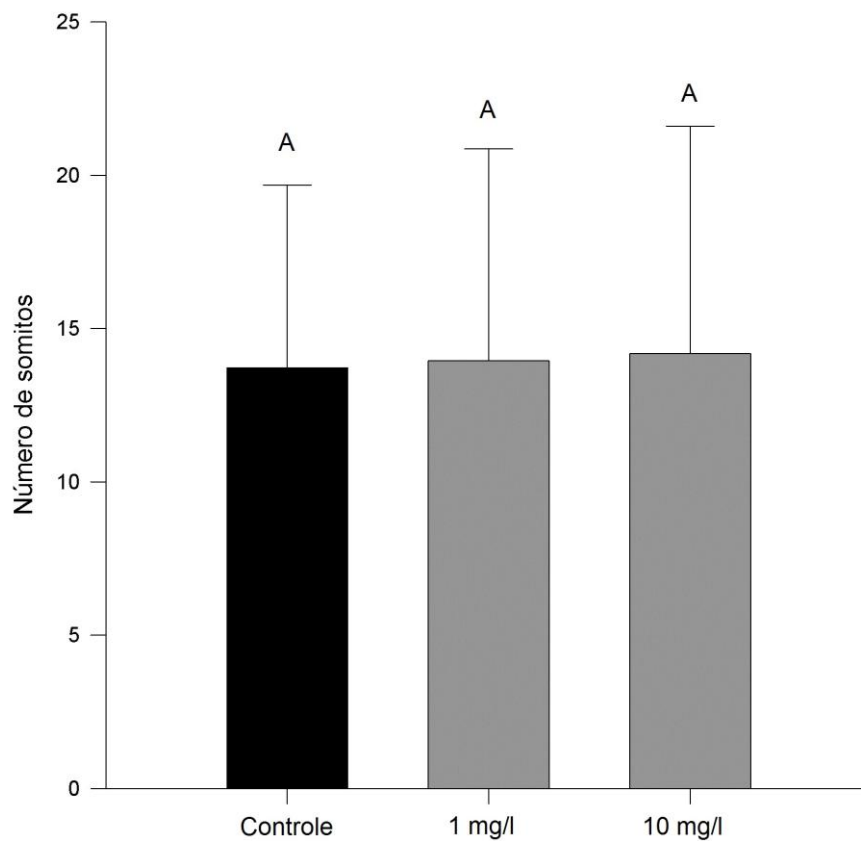


Figura 9 – Número de somitos de embriões de *Austrolebias nigrofasciatus* depois de 15 dias pós-exposição (durante 96h) a duas concentrações de Roundup transorb® (1 e 10mg/L), e grupo controle (Kruskal-Wallis;  $p < 0,05$ ). Letras distintas denotam diferença significativa.

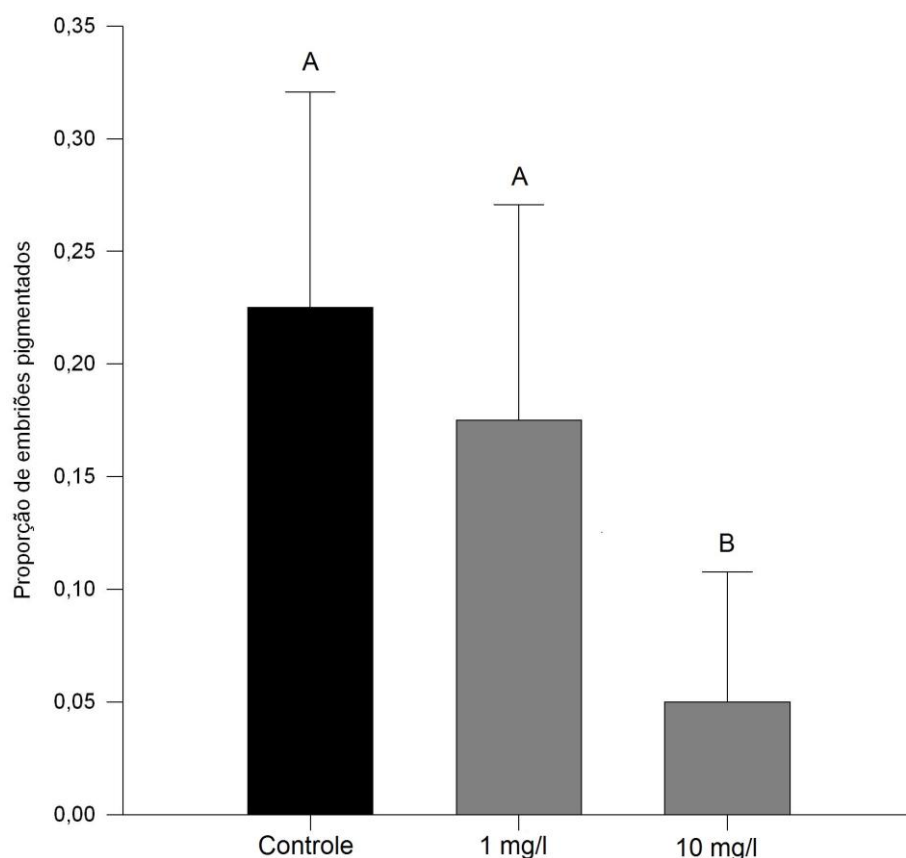


Figura 5 – Proporção de embriões de *Austrolebias nigrofasciatus* pigmentados 30 dias pós-exposição a duas concentrações de Roundup transorb® (1 e 10mg/L) durante 96h, e grupo controle (ANOVA *post hoc* Tukey;  $p < 0,05$ ). Letras distintas denotam diferença significativa.

Tabela 3 - Proporção de embriões pigmentados de *Austrolebias nigrofasciatus* após exposição a duas concentrações de Roundup transorb® (1 e 10mg/L) durante 96h e grupo controle (ANOVA *post hoc* Tukey;  $p < 0,05$ ). Letras distintas denotam diferença significativa em cada linha.

Dias pós-exposição	Controle (Media±DP)	1mg/L (Media±DP)	10mg/L (Media±DP)
30	0,22±0,09 <sup>a</sup>	0,17±0,09 <sup>a</sup>	0,05±0,05 <sup>b</sup>
35	0,32±0,15 <sup>a</sup>	0,22±0,17 <sup>a</sup>	0,15±0,12 <sup>a</sup>
40	0,42±0,15 <sup>a</sup>	0,37±0,15 <sup>a</sup>	0,35±0,12 <sup>a</sup>
47	0,47±0,12 <sup>a</sup>	0,37±0,15 <sup>a</sup>	0,42±0,09 <sup>a</sup>

## 7.4 Discussão

Os estudos acerca dos processos de diapausa em Rivulidae são dificultados pela ausência de características morfológicas que permitam a identificação de tais processos. Frente a isso, Podrabsky et al. (2010) Descreveram características morfológicas e fisiológicas para diferenciar embriões de *Austrofundulus limnaeus* que seguiriam ou não rotas de desenvolvimento passando por diapausas, porém ainda faltam trabalhos que demonstrem se estas características são aplicáveis para todo o *taxon* Rivulidae. Frente a isso, tentamos avaliar a entrada e saída das diapausas a partir de sucessivas análises morfológicas ao longo do desenvolvimento dos embriões, dessa forma, foi possível avaliar se os animais de todos os tratamentos seguiram um mesmo padrão de desenvolvimento ao longo do tempo.

Nossa primeira análise, feita 15 após o período de exposição ao RD, demonstrou que os embriões dos diferentes grupos possuíam um mesmo número de somitos. Sendo assim, se desenvolveram da mesma forma durante esses 15 dias, demonstrando que a exposição ao RD provavelmente não teve efeito sobre os padrões de diapausa I. Nossa segunda análise, feita 30 dias após o período de exposição ao RD, demonstrou que os embriões do grupo da exposição a 10mg/L possuíam uma proporção menor de embriões pigmentados. Isso nos leva a crer que o desenvolvimento desses animais estava atrasado em relação aos outros grupos. Este atraso pode demonstrar que a exposição ao RD aumentou a quantidade de embriões que entraram na diapausa II, ou fez com eles permanecessem por mais tempo nesta fase. Todas as análises feitas após 30 DPE demonstram que a proporção de embriões pigmentados foi igual entre os tratamentos. Dessa forma, as proporções de embriões que permaneceram na diapausa II de cada grupo se igualaram com o passar do tempo (35 dias em diante).

Pouco se sabe sobre os fatores endógenos que regulam os processos de diapausa em peixes anuais, mas hormônios esteroides parecem ter influência sobre este processo, principalmente sobre a diapausa II (PODRABSKY et al. 2010). Portanto, ações do RD sobre a esteroidogênese podem explicar as alterações na proporção de embriões na diapausa II observadas no nosso trabalho. É interessante observar que as exposições

neste estudo foram impostas a embriões que se encontravam na diapausa I, portanto, no início de seu desenvolvimento. As alterações observadas foram perceptíveis muitos dias após a exposição (30 dias), demonstrando que exposições agudas ao RD podem gerar alterações de longo prazo.

Alterações sobre os processos de diapausa em Rivulidae podem ter consequências importantes para suas populações, considerando o valor adaptativo desse processo no que tange a sua sincronia com os ritmos de cheia/seca do ambiente onde esses animais ocorrem. Dessa forma, as alterações observadas pós exposição ao RD sobre o desenvolvimento de *A. nigrofasciatus* podem diminuir o “fitness” de suas populações, mesmo sobre exposições agudas. Mais trabalhos são necessários para elucidar essas ações, principalmente no que tange a produção e metabolismo de hormônios esteroides, prováveis hormônios reguladores da diapausa II.

## **8 Capítulo VI - Alterações no desenvolvimento embrionário do peixe-rei *Odonthestes humensis* após exposição ao herbicida Roundup Transorb®**

### **8.1 Introdução**

O peixe-rei *Odonthestes humensis* é um peixe Sul Americano de água doce pertencente à ordem Atheriniformes, família Atherinopsidae, popularmente conhecido como Peixe-rei. São animais introduzidos em países da América Latina (Bolívia e Chile) e Ásia como promissores candidatos à aquicultura continental (TSUZUKI et al., 2000). No Japão essa espécie possui grande importância comercial onde sua carne é muito apreciada na culinária local. Os Atherinopsidae se distribuem naturalmente no Estado do Rio Grande do Sul, desde o norte, na Lagoa Itapeva, até a região das grandes lagoas na Fronteira Sul, onde existem reservas de água doce, composta pela Lagoa dos Patos, Mirim e Mangueira (GROSMAN, 2002).

A prática de monoculturas como o arroz, a aveia e a soja, é muito importante na economia do Rio Grande do Sul, porém a utilização de agrotóxicos nessas plantações pode poluir as reservas de água doce do estado (SALBEGO, 2010). A produção de peixes no Sul do Brasil é abastecida a partir destas reservas, portanto, os contaminantes provenientes destas plantações podem acabar por interferir na vida de animais de criação como também em espécies nativas da região.

O Roundup® é um dos agrotóxicos mais utilizados no mundo (SALBEGO, 2010), possui ação não seletiva e atua no controle de plantas daninhas indesejadas que crescem junto às plantações (WILLIAMS et al., 2000). Este praguicida é composto por um princípio ativo glifosato e por adjuvantes que auxiliam o glifosato a penetrar no tecido dos vegetais (JIRAUNGKOORSKUL et al., 2002). Estudos mostram que esses componentes possuem ações deletérias sobre a fisiologia de vertebrados. A ação dos adjuvantes está relacionada ao aumento do processo de estresse oxidativo (CAVALCANTE et al., 2008), já o glifosato possui duas ações deletérias

comprovadas, atuando como desregulador endócrino pela inibição da transcrição de proteínas importantes para o processo de esteroidogênese e também aumentando a atividade do ácido retinóico durante o desenvolvimento embrionário, levando a alterações crânio-faciais (PAGANELLI et al., 2010).

Levando-se em consideração a importância econômica dos estoques pesqueiros de *O. humensis*, assim como a grande quantidade de Roundup® que é lixiviada para as reservas de água doce do estado, o objetivo do trabalho foi avaliar a ação do Roundup® sobre o desenvolvimento embrionário desta espécie a partir da avaliação da morfologia crânio-facial e da pigmentação de seus embriões.

## 8.2 Material e métodos

### *Animais experimentais*

Para a realização dos experimentos, foi utilizado um total de 4158 embriões recém fertilizados de *O. humensis* provenientes de reprodutores capturados por pescadores da Lagoa Mangueira. Os experimentos foram realizados na Estação de Piscicultura da Barragem do Chasqueiro, durante o mês de setembro.

### *Desenho experimental*

No experimento foram utilizadas quatro tratamentos (1, 5, 10 e 15 mg/L Roundup Transorb R®) feitos em triplicata, e um controle feito com quatro repetições. Os experimentos foram feitos em recipientes com volume de 4L, aeração constante, temperatura ambiente e fotoperíodo natural. Cada repetição possuía 2g de ovos (aproximadamente 250 embriões). O experimento teve duração de 96h e foram observados 10 embriões de cada repetição (esteriomicroscópio) em três períodos distintos: 48h, 72h e 96h de exposição, sendo observada a fase do desenvolvimento, a proporção de embriões pigmentados (%), o diâmetro dos olhos (DO) e o espaço entre os olhos (EO). Embriões mortos foram retirados diariamente das repetições e ao final do experimento foi calculada a mortalidade diária acumulada. As diluições do RD foram feitas com água desclorada e a qualidade da água foi controlada diariamente (temperatura  $22,8 \pm 0,12^{\circ}\text{C}$ ; pH  $6,4 \pm 0,17$ ;  $\text{NH}_3$   $0,25 \pm 0,00\text{ppm}$ ).

### *Análise estatística*

Os dados da DO e do EO não possuíam distribuição normal, dessa forma, foram analisados a partir do teste de Kruskal-Wallis, seguido do teste *post-hoc* de Dunn. Os dados referentes às proporções de embriões pigmentados e mortalidade foram analisados com testes de  $\chi^2$ . As análises foram feitas com uso dos softwares Statística 7<sup>®</sup> e SigmaPlot 11.0<sup>®</sup> sob o nível de significância de 95% ( $p < 0,05$ ).

### **8.3 Resultados**

O primeiro caractere observado foi o estágio do desenvolvimento no qual os animais se encontravam após 48h de exposição ao RD. Os embriões de todos os tratamentos se encontravam na mesma fase (nêurula). Tendo-se completado 72h de exposição, observou-se a proporção de embriões pigmentados. As proporções de embriões pigmentados de todos os tratamentos foram diferentes da proporção observada para o grupo controle (Fig.6).

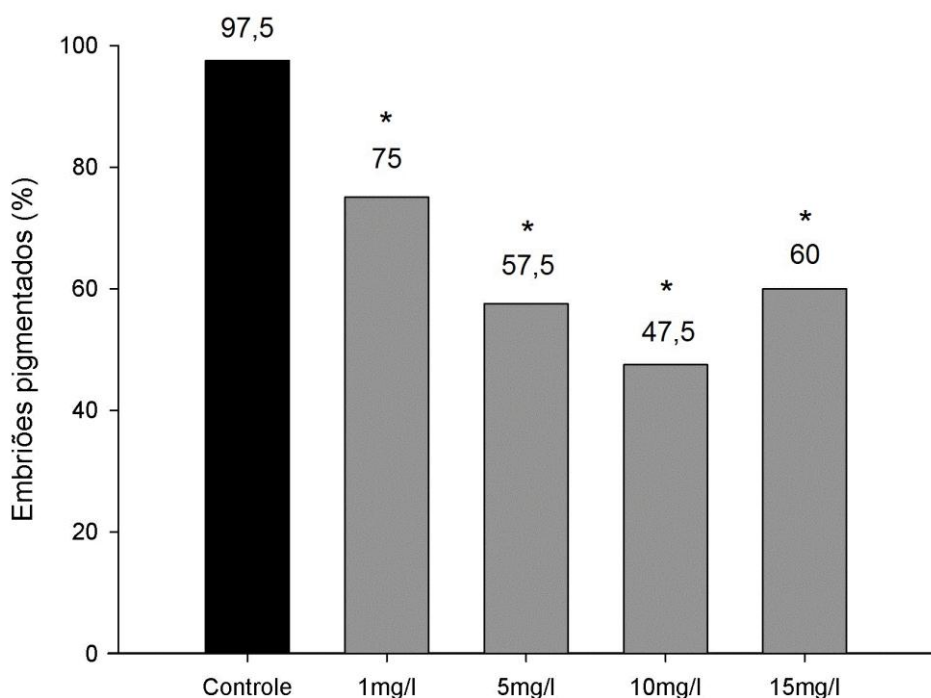


Figura 6 – Proporção de embriões *Odontesthes humensis* pigmentados após 72h de exposição a quatro concentrações de Roundup transorb® (1, 5, 10 e 15mg/L) e grupo controle. \* denota diferença significativa em relação ao grupo controle (Teste de Chi<sup>2</sup>).

Tendo-se completado 96h de exposição, foram medidos o DO e o EO. As medidas do DO de todos os tratamentos foram diferentes do grupo controle. Diferenças também foram encontradas entre os tratamentos (Fig.7). Da mesma forma, as medidas do EO de todos os tratamentos foram diferentes do grupo controle. Diferenças também foram encontradas entre os tratamentos, visto que o tratamento de 1mg/L diferiu de todos os outros (Fig.8). Por fim, diferenças na mortalidade dos embriões foram observadas apenas no tratamento de 15mg/L, a qual foi maior que a do grupo controle em todos os dias (48h, 72h e 96h) (Tab. 4).



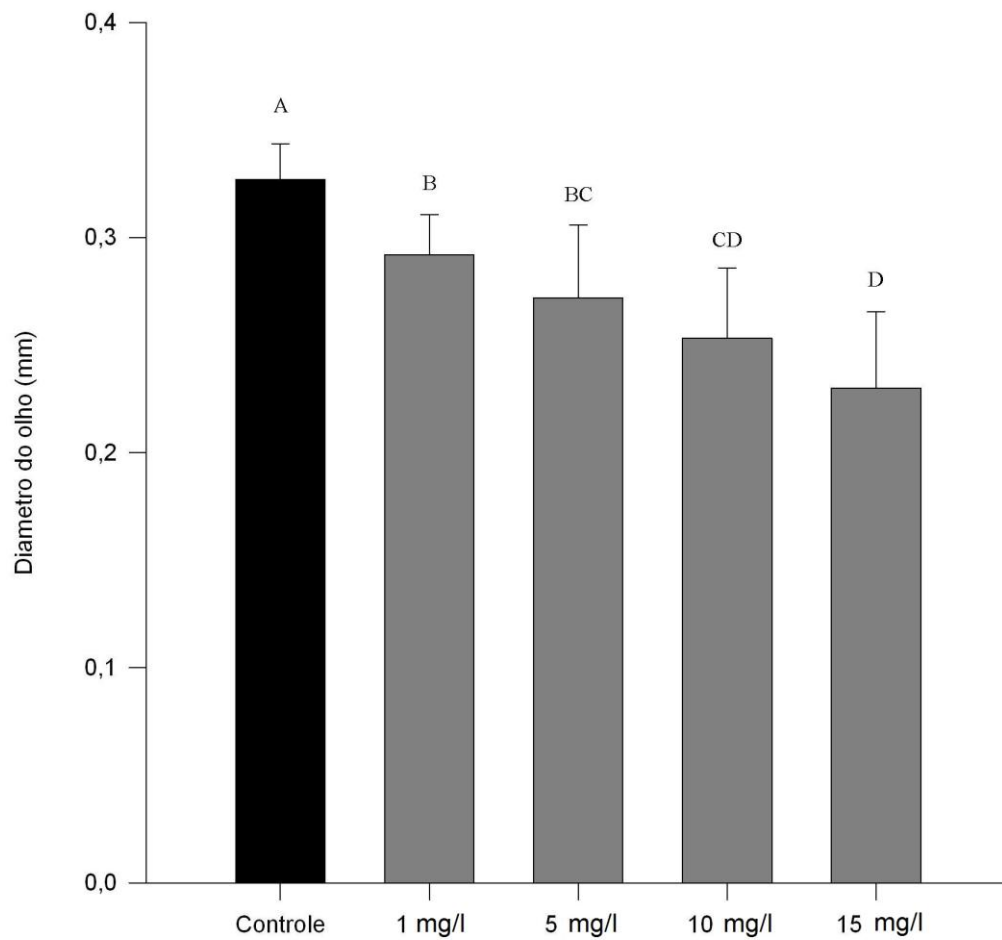


Figura 7 - Diâmetro do olho de embriões de *Odontesthes humensis* depois de exposição a quatro concentrações de Roundup transorb® (1, 5, 10 e 15mg/L) por 96h e grupo controle (Kruskal-Wallis;  $p < 0,05$ ). Letras distintas denotam diferença significativa.

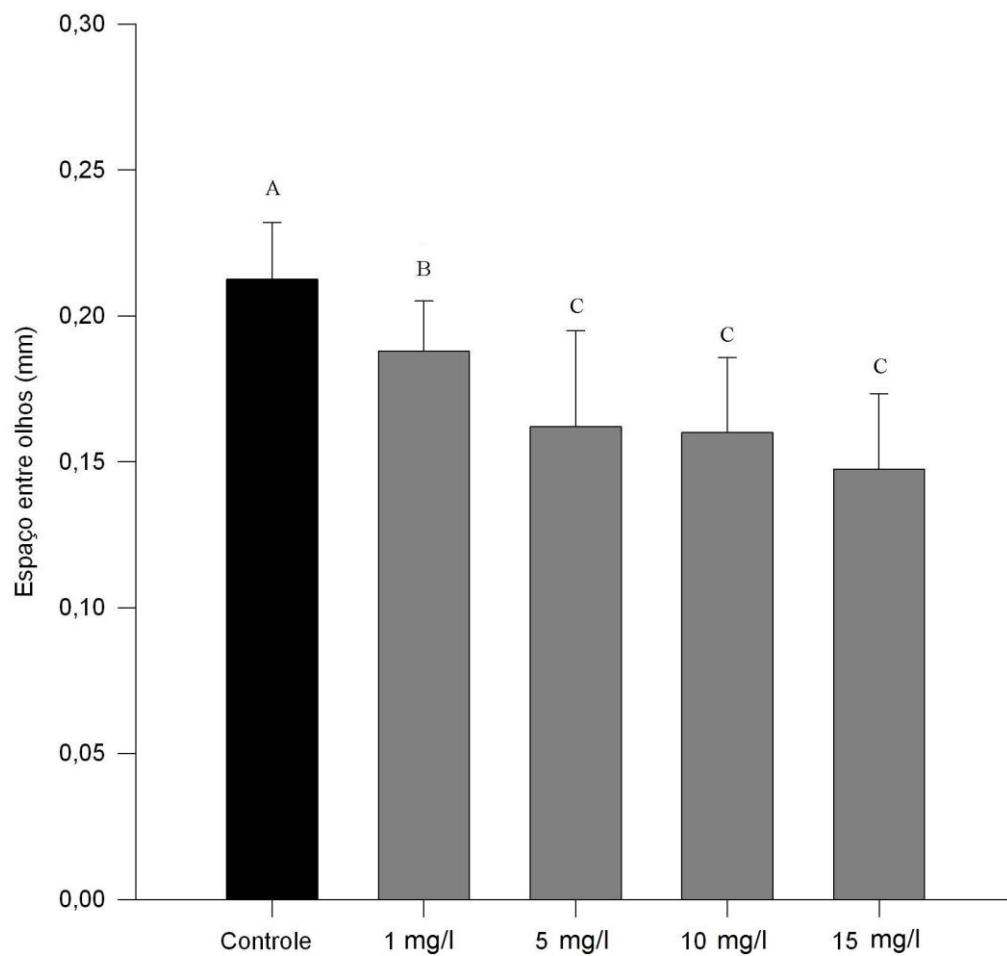


Figura 8 – Espaço entre olhos de embriões de *Odontesthes humensis* depois de exposição a quatro concentrações de Roundup transorb® (1, 5, 10 e 15mg/L) por 96h e grupo controle (Kruskal-Wallis;  $p < 0,05$ ). Letras distintas denotam diferença significativa.

Tabela 4 - Mortalidade de embriões de *Odontesthes humensis* depois de exposição a quatro concentrações de Roundup transorb® (1, 5, 10 e 15mg/L) por 96h e grupo controle. Números em negrito denotam diferença significativa em relação ao grupo controle na respectiva coluna (Teste de Chi<sup>2</sup>).

Tratamentos	Número amostral	Mortalidade acumulada 48h (%)	Mortalidade acumulada 72h (%)	Mortalidade acumulada 96h (%)
Controle	982	30	37	40
1mg/L	815	28	35	37
5mg/L	734	32	39	40
10mg/L	791	34	40	43
15mg/L	836	<b>47</b>	<b>68</b>	<b>74</b>

#### 8.4 Discussão

Os resultados obtidos no trabalho proporcionaram a elaboração de duas hipóteses sobre a ação do RD na embriogênese, são elas: 1) A exposição ao RD atrasa o desenvolvimento embrionário; 2) A exposição ao RD provoca alterações morfológicas durante a formação do embrião.

A primeira hipótese é sustentada pela interpretação de que as diferenças encontradas nas taxas de pigmentação demonstram atraso no desenvolvimento embrionário. Dessa forma, os embriões expostos chegaram ao estágio de formação de pigmentos mais tardiamente. Seguindo a mesma lógica, as diferenças encontradas nas medidas do DO e no EO, feitas após 96h do início do experimento, demonstram que os embriões das exposições possuíam tecidos menos desenvolvidos, evidenciando atraso no processo de organogênese.

A segunda hipótese é sustentada pelas ações teratogênicas já descritas para o RD. Em relação a esta hipótese, as alterações encontradas nas medidas do DO e no EO se relacionam com os efeitos do glifosato sobre a produção do ácido retinóico (aumento na produção), sinalizador celular importante para o desenvolvimento embrionário. De fato, a super produção de ácido retinóico já foi relacionada com a diminuição no tamanho do olho e

alterações crânio-faciais (PAGANELLI et al. 2010). Em relação a esta hipótese, as diferenças observadas nas taxas de pigmentação podem ser explicadas por danos gerados pelo estresse oxidativo. Este processo pode resultar na morte dos melanócitos ou na destruição do pigmento melanina (KUMAR, et al. 2012) causando pigmentação menos intensa nos embriões. Portanto, a segunda hipótese é considerada interpretando-se as diferenças observadas em DO e EO como alterações morfológicas do desenvolvimento embrionário e não como resultados de atraso no desenvolvimento, ideia sustentada pela primeira hipótese.

Independentemente das hipóteses elaboradas para a explicação dos mecanismos de ação do RD, conclui-se que este herbicida gera alterações embrionárias de forma concentração-dependente, mesmo em exposições agudas. Porém, é necessário testar as hipóteses levantadas assim como as possíveis implicações que essas alterações podem ter sobre a sobrevivência desses animais.

## **9 Considerações finais**

Ao fim da apresentação dos resultados obtidos no presente estudo, alguns pontos merecem maior consideração. O primeiro deles é o fato de que foram usadas espécies nativas do sul do Brasil. O uso de herbicidas a base de glifosato na região é grande, mas em contraste a isso, poucos são os estudos que procuraram testar as ações destes herbicidas em espécies nativas da região. Em resposta a isso, nosso trabalho traz resultados para quatro espécies da região, sendo o primeiro relato de ações do RD para animais das famílias Atherinopsidae e Rivulidae.

Outro ponto que merece ser ressaltado são as ações sobre *A. nigrofasciatus*, teleósteo modelo de estudo para peixes anuais. A família Rivulidae constitui um desafio no que tange à biologia da conservação. Ao mesmo tempo, este grupo se demonstra como excelente modelo biológico para estudos, tanto ecológicos como fisiológicos e ecotoxicológicos. Nossos resultados preliminares sobre uma possível ação do RD nos processos de diapausa merecem continuidade visto a importância da diapausa para o grupo.

As ações observadas do RD sobre a tolerância térmica são dados inéditos no meio científico. Considerando as preocupações com o aquecimento global e as grandes quantidades de RD usadas no mundo, essa linha de pesquisa possui grande potencial na construção de conhecimento aplicável à conservação.

Considerando todos os resultados que foram apresentados no trabalho, podemos concluir que o RD, mesmo em baixas concentrações, pode interferir em diversos aspectos da história de vida de teleósteos, sendo eles sobrevivência (diminuição da tolerância térmica e potencialização da resposta de estresse), desenvolvimento embrionário e reprodução, processos importantes para o mantimento saudável das populações animais.

## **Licenças**

As coletas animais foram realizadas com licença do IBAMA/ICMBio (nº. 41907-1) e os experimentos realizados de acordo com o Comissão de Ética em Experimentação Animal (CEEA) da instituição, processo Nº. 23110.001655/2012-03.

## Referências

ALLEN, J. L.; CLUSELLA-TRULLAS, S.; CHOWN, S. L. The effects of acclimation and rates of temperature change on critical thermal limits in *Tenebrio molitor* (Tenebrionidae) and *Cyrtobagous salviniae* (Curculionidae). **Journal of insect physiology**, v. 58, n. 5, p. 669–678, 2012.

ANSALDO, M.; LUQUET, C. M.; EVELSON, P. A.; POLO, J. M.; LLESUY, S. Antioxidant levels from different Antarctic fish caught around South Georgia Island and Shag Rocks. **Polar Biology**, v. 23, n. 3, p. 160-165, 2000.

ARAUJO, FG.; PEIXOTO, MG.; PINTO, BCT. and TEIXEIRA, TP. Distribution of guppies *Poecilia reticulata* (Peters, 1860) and *Phalloceros caudimaculatus* (Hensel, 1868) along a polluted stretch of the Paraíba do Sul River, Brazil. **Brazilian Journal of Biology**, v. 69, n. 1, 41-48, 2009.

ARENZON, A.; LEMOS, C. A.; BOHRER, M. B. C. The influence of temperature on the embryonic development the annual fish *Cynopoecilus melanotaenia* (Cyprinodontiformes, Rivulidae). **Brazilian Journal of Biology**, São Carlos, v. 62, n. 4b, p. 123-130, 2002.

ARENZON, A.; PINTO, R. F.; COLOMBO, P.; RAYA-RODRIGUEZ, M. T. Assessment of the freshwater annual fish *Cynopoecilus melanotaenia* as a toxicity test organism using three reference substances. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 22, n. 9, p. 2188-2190, 2003.

BASS, C. S.; KHAN, S.; WEIS, J. S. Morphological changes to the gills of killifish associated with severe parasite infection. **Journal of Fish Biology**, v. 71, n. 3, p. 920–925, 2007.

BEUTLER, Ernest. The preparation of red cells for assay. In: Beutler E, ed, **Red Cell Metabolism: A manual of biochemical methods**. V. 344, n. 54, p. 8-18. 1975.

BILYK, K.T.; EVANS, C.W.; DEVRIES, A.L. Heat hardening in Antarctic notothenioid fishes. **Polar Biology**, v. 35, n. 9, p. 1447–1451, 2012.

BOWLER, Kenneth. Acclimation, heat shock and hardening. **Journal of Thermal Biology**, v. 30, n. 2, p. 125–130, 2005.

BRANQUINHO, M. R.; FERREIRA, R. T. B.; CARDARELLI-LEITE, P. Survey of compliance with labeling legislation in food containing GMOs in Brazil. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 23, n. 3, p. 220–225, 2010.

BROOK, B. W.; SODHI, N. S.; BRADSHAW, C. J. Synergies among extinction drivers under global change. **Trends in ecology & evolution**, v. 23, n. 8, p. 453–460, 2008.

CARLETTI, E.; LUCA, A.; URBANI, A.; SACCHETTA, P.; DI ILIO, C. Sigma-class glutathione transferase from *Xenopus laevis* molecular cloning, expression, and site-directed mutagenesis. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 419, n. 2, p. 214–221, 2003.

CAVALCANTE, D. G. S. M.; MARTINEZ, C. B. R.; SOFIA, S. H. Genotoxic effects of Roundup on the fish *Prochilodus lineatus*. **Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 655, n. 1-2, p. 41-46, 2008.

CERICATO, L.; NETO, J. G.; FAGUNDES, M.; KREUTZ, L. C.; QUEVEDO, R. M.; FINCO, J.; DA ROSA, J. G.; KOAKOSKI, G.; CENTENARO, L.; POTTKER, E.; ANZILIERO, D.; BARCELLOS, L. J. Cortisol response to acute stress in jundia *Rhamdia quelen* acutely exposed to sub-lethal concentrations of agrichemicals. **Comparative Biochemistry and Physiology. Part C**, v. 148, n. 3, p. 281–286, 2008.

CHIDAWANYIKA, F.; TERBLANCHE, J. S. Rapid thermal responses and thermal tolerance in adult codling moth *Cydia pomonella* (Lepidoptera: Tortricidae). **Journal of insect physiology**, v. 57, n. 1, p. 108–117, 2011.

CONAB – National Company of Food Supply, 2009. Brazilian Crop Assessment: Grains: Sixth Estimate.

COSTA, Wilson J. E. M. Phylogeny and classification of Rivulidae revisited: origin and evolution of annualism and miniaturization in rivulid fishes (Cyprinodontiformes: Aplocheiloidei). **Journal of Comparative Biology**, v. 3, n. 1, p. 220–225, 1998.

DAVIS, A. K.; MANEY, D. L.; MAERZ, J. C. The use of leukocyte profiles to measure stress in vertebrates: a review for ecologists. **Functional Ecology**, v. 22, n. 43, p. 760–772, 2008.

DE MENEZES, C. C.; DA FONSECA, M. B.; LORO, V. L.; SANTI, A.; CATTANEO, R.; CLASEN, B.; PRETTO, A. Roundup effects on oxidative stress parameters and recovery pattern of *Rhamdia quelen*. **Archives of environmental contamination and toxicology**, v. 60, n. 4, p. 665–671, 2011.

DELLEGRAVE, E.; MANTESE, F. D.; COELHO, R. S.; PEREIRA, J. D.; DALSENTER, P. R.; LANGELOH, A. The teratogenic potential of the herbicide glyphosate-Roundup in Wistar rats. **Toxicology Letters**, v. 42, n.1-2, p. 45-52, 2003.

DORVAL, J.; LEBLOND, V.S.; HONTELA, A. Oxidative stress and loss of cortisol secretion in adrenocortical cells of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) exposed in vitro to endosulfan, an organochlorine pesticide. **Aquatic Toxicology** v.63, p.229–241, 2003.

DOUCET, D.; WALKER, V. K.; QIN, W. The bugs that came in from the cold: molecular adaptations to low temperatures in insects. **Cellular and molecular life sciences**, v. 66, n. 8, p. 1404–1418, 2009.



EWING, A. W. Studies On the Behaviour of Cyprinodont Fish. II the Evolution of Aggressive Behaviour in Old World Rivulins. **Behaviour**, v. 52, n. 3-4, p. 172–195, 1975.

FOLMAR, L.C.; SANDERS, J.Q.; JULIN, A.M. Toxicity of the herbicide glyphosate and several of its formulations to fish and aquatic invertebrates. **Archives of Environmental Contamination Toxicology**. V.8, n. 5, p. 269-278. 1979.

FRIDOVICH, Irwin. The biology of oxygen radicals. **Science**, v. 201, n. 4359, p. 875-880, 1978.

GARCIA, A. F.; ROLLEMBERG, M. C. Determinação voltamétrica do herbicida glifosato em águas naturais utilizando eletrodo de cobre. **Química Nova**, v. 30, n. 7, p. 1592-1596, 2007.

GARCÍA, G.; LOUREIRO, M.; BEROIS, N.; AREZO, M. J.; CASANOVA, G.; CLIVIO, G.; OLIVERA, A. Pattern of differentiation in the annual killifish genus *Austrolebias* (Cyprinodontiformes: Rivulidae) from a biosphere reserve site in South America: a multidisciplinary approach. **Biological Journal of the Linnean Society**, v. 98, n. 3, p. 620–635, 2009.

GIESY J. P.; DOBSON, S.; SOLOMON K. R.. Ecotoxicological risk assessment for Roundup herbicide. **Environmental Contamination and Toxicology**, v. 167, n.32, p. 35–120, 2000.

GLUSCZAK, L.; MIRON, D. S.; CRESTANI, M.; FONSECA, M. B.; PEDRON, F. A.; DUARTE, D. F.; VIEIRA, V. L. P. Effect of glyphosate herbicide on acetylcholinesterase activity and metabolic and hematological parameters in piava (*Leporinus obtusidens*). **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 65, n. 34, p. 237-241, 2006.

GLUSCZAK, L.; MIRON, D. 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. Part C**, v. 146, n. 4, p. 519-524, 2007.

GROSMAN, F.G. 2002. Fundamentos Biologicos, Economicos y Sociales para una Correcta Gestion del Recurso Pejerrey. Ed. Astyanax, Prov. Bs. As., Argentina. 246p.

GUILHERME S.; SANTOS M. A.; BARROSO, C.; GAIVÃO, I.; PACHECO M. Differential genotoxicity of Roundup(®) formulation and its constituents in blood cells of fish (*Anguilla anguilla*): considerations on chemical interactions and DNA damaging mechanisms. **Ecotoxicology**, v. 21, n. 5, p. 1381–1390, 2012.

HABIG, W. H.; PABST M. J.; JAKOBY W. B. Glutathione S- transferases: the first enzymatic step in mercapturic acid formation. **Biological Chemistry**, v. 249, n. 22, p. 7130-7139, 1974.

HALLIWELL B.; GUTTERIDGE J. M. C. **Free radicals in biology and medicine**. United Kingdom: Oxford University Press, 1999. 976p.

HAND, S. C.; PODRABSKY, J. E. Bioenergetics of diapause and quiescence in aquatic animals. **Thermochimica Acta**, v. 349, n.1-2, p.31–42, 2000.

HELANDER, M.; SALONIEMI, I.; SAIKKONEN, K. Glyphosate in northern ecosystems. **Trends in plant science**, v. 17, n. 10, p. 569–574, 2012.

HOFFMANN, A. A.; CHOWN, S.L.; CLUSELLA-TRULLAS, S. Upper thermal limits in terrestrial ectotherms: how constrained are they?. **Functional Ecology**, v. 27, n. 4, p. 934–949, 2013.

HOFFMANN, A. A.; SØRENSEN, J. G.; LOESCHCKE, V. Adaptation of *Drosophila* to temperature extremes: bringing together quantitative and molecular approaches. **Journal of Thermal Biology**, v. 28, n. 3, p. 175–216, 2003.

HOFMANN, G. E.; TODGHAM, A. E. Living in the now: physiological mechanisms to tolerate a rapidly changing environment. **Annual Review of Physiology**, v. 72, n. 13, p. 127–145, 2010.

INGLIMA, K.; PERLMUTTER, A.; MARKOFFSKY, J. Reversible stage-specific embryonic inhibition mediated by the presence of adults in the annual fish *Nothobranchius guentheri*. **The Journal of experimental zoology**, v. 215, n. 1, p. 23–33, 1981.

JIRAUNGKOORSKUL, W.; UPATHAM, E. S.; KRUAETRACHUE, M.; SAHAPHONG, S.; VICHASRI-GRAMS, S.; POKETHITIYOOK P. Histopathological effects of Roundup, a glyphosate herbicide, on Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). **Science Asia**, v. 28, n. 12, p. 121–127, 2002.

KREUTZ, L. C.; BARCELLOS, L. J. G.; DE FARIA VALLE, S.; DE OLIVEIRA SILVA, T.; ANZILIERO, D.; DAVI DOS SANTOS, E.; PIVATO, M. Altered hematological and immunological parameters in silver catfish (*Rhamdia quelen*) following short term exposure to sublethal concentration of glyphosate. **Fish & shellfish immunology**, v. 30, n. 1, p. 51–57, 2011.

KREUTZ, L. C.; BARCELOS, L. J. G.; MARTENINGHE, A.; SANTOS, E. D.; ZANATTA, R. Exposure to sublethal concentration of glyphosate or atrazine-based herbicides alters the phagocytic function and increases the susceptibility of silver catfish fingerlings (*Rhamdia quelen*) to *Aeromonas hydrophila* challenge. **Fish & Shellfish Immunology**, v. 29, n. 4, p. 694-697, 2010.

KUMAR, R.; PARSAD, D. Melanocytorrhagy and apoptosis in vitiligo: Connecting jigsaw pieces. **Indian J Dermatol Venereol Leprol.** V. 78, n. 5, p.19-23, 2012.

LANGIANO, V. C; MARTINEZ, C. B. R.; Toxicity and effects of a glyphosate based herbicide on the Neotropical fish *Prochilodus lineatus*. **Comparative Biochemistry and Physiology.** C, v.147, n. 2, p. 222-231, 2008.

LAUFER, G.; ARIM, M.; LOUREIRO, M.; PIÑEIRO-GUERRAI, J. M.; CLAVIJO-BAQUET, S.; FAGÚNDEZ, C. Diet of four annual killifishes: an intra and interspecific comparison. **Neotropical ichthyology**, v. 7, n. 1, p. 77-86, 2009.

LEVELS, P. The effect of the presence of adult fishes, gonad homogenates, and embryo homogenates on the dispersion-reaggregation phase during early embryonic development of the annual fish *Nothobranchius korthausae*. **Journal of Experimental Zoology**, v. 240, n. 2, p. 259–264, 1986.

LEVELS, P.; DENUCÉ, J. Intrinsic variability in the frequency of embryonic diapauses of the annual fish *Nothobranchius korthausae*, regulated by light: dark cycle and temperature. **Environmental biology of fishes**, v. 22, n. 3, p. 211–223, 1988.

LEWIS, Owen T. Climate change, species-area curves and the extinction crisis. **Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences**, v. 361, n. 1465, p. 163–171, 2006.

LOESCHCKE, V.; SØRENSEN, J. G. Acclimation, heat shock and hardening—a response from evolutionary biology. **Journal of Thermal Biology**, v. 30, n. 6, p. 255–257, 2005.

MADEIRA, D.; NARCISO, L.; CABRAL, H.N.; VINAGRE, C.; DINIZ, M.S.; Influence of temperature in thermal and oxidative stress responses in estaurine

fish. **Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology**, v.166, n. 5, p.237-243, 2013.

MAHROOF, R.; YAN ZHU, K.; NEVEN, L.; SUBRAMANYAM, B.; BAI, J. Expression patterns of three heat shock protein 70 genes among developmental stages of the red flour beetle, *Tribolium castaneum* (Coleoptera: Tenebrionidae). **Comparative biochemistry and physiology. Part A, Molecular & integrative physiology**, v. 141, n. 2, p. 247–256, 2005.

MARKOFSKY, J.; MATIAS, J. R. The effects of temperature and season of collection on the onset and duration of diapause in embryos of the annual fish *Nothobranchius guentheri*. **The Journal of experimental zoology**, v. 202, n. 1, p. 49–56, 1977.

MARQUES, A. A. B.; FONTANA, C. F.; VÉLEZ, E.; BENCKE, G. A.; SCHNEIDER, M.; REIS, R. E. **Lista de Referência da Fauna Ameaçada de Extinção no Rio Grande do Sul. Decreto no 41.672, de 11 junho de 2002.** Porto Alegre: FZB/MCT–PUCRS/PANGEA, 2002. 52p

MATIAS, J.; MARKOFSKY, J. The survival of embryos of the annual fish *Nothobranchius guentheri* exposed to temperature extremes and the subsequent effects on embryonic diapause. **Journal of Experimental Zoology**, v. 204, n. 2, p. 219–227, 1978.

MATTOS, M. L. T.; PERALBA, M. C. R.; DIAS, S. L. P.; PRATA, F.; CAMARGO, L. Monitoramento ambiental do glifosato e do seu metabólito ácido aminometilfosfônico na água de lavoura de arroz irrigado. **Pesticidas: Revista de Ecotoxicologia e Meio Ambiente**, v. 12, n. 0, p. 145-154, 2002.

MCCORD, J. M.; FRIDOVICH, I. Superoxide dismutase: an enzymatic function for erythrocuprein (hemocuprein). **Journal of Biological Chemistry**, v. 244, n. 6, p. 6049-6055, 1969.

MELLER, C. L.; MELLER, R.; SIMON, R. P.; CULPEPPER, K. M.; PODRABSKY, J. E. Cell cycle arrest associated with anoxia-induced quiescence, anoxic preconditioning, and embryonic diapause in embryos of the annual killifish *Austrofundulus limnaeus*. **Journal of comparative physiology. B, Biochemical, systemic, and environmental physiology**, v. 182, n. 7, p. 909–920, 2012.

MILLER, L.L.; WANG, F.; PALACE, V.P.; HONTELA, A. Effects of acute and subchronic exposures to waterborne selenite on the physiological stress response and oxidative stress indicators in juvenile rainbow trout. **Aquatic Toxicology** v. 83, n. 6, p. 263–271, 2007.

MIRANDA, L. A.; CHALDE, T.; ELISIO, M.; STRÜSSMANN, C. A. Effects of global warming on fish reproductive endocrine axis, with special emphasis in pejerrey *Odontesthes bonariensis*. **General and Comparative Endocrinology**, v. 192, n. 4, 45–54, 2013.

MODESTO, K. A.; MARTINEZ, C. B. R. Effects of Roundup Transorb on fish: Hematology, antioxidant defenses and acetylcholinesterase activity. **Chemosphere**, v. 81, n. 6, p. 781-787, 2010.

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.

NAGAHAMA, Y.  $17\alpha,20\beta$ -Dihydroxy-4-pregnen-3-one, a maturation-inducing hormone in fish oocytes: Mechanisms of synthesis and action. **Steroids**, v. 62, n. 1, p. 190–196, 1997.

NAGAHAMA, Y., YAMASHITA, M. Regulation of oocyte maturation in fish. **Development, growth & differentiation**, v. 50, n. 1, p. 195–219, 2008.

NEŠKOVIĆ, N.K.; POLEKSIĆ, V.; ELEZOVIĆ, I.; KARAN, V.; BUDIMIR, M. Biochemical and histopathological effects of glyphosate on carp, *Cyprinus carpio* L.. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 56, n. 6, p. 295-302, 1996.

NIEHAUS, A. C.; ANGILLETTA, M. J.; SEARS, M. W.; FRANKLIN, C. E.; WILSON, R. S. Predicting the physiological performance of ectotherms in fluctuating thermal environments. **The Journal of experimental biology**, v. 215, n. 4, p. 694–701, 2012.

, S. L.; CARRASCO, A. E. Glyphosate-Based Herbicides Produce Teratogenic Effects on Vertebrates by Impairing Retinoic Acid Signaling. **Chemical research in toxicology**, v. 23, n. 10, p. 1586–1595, 2010.

PODRABSKY J. E; GARRETT I.D; KOHL Z.F. Alternative developmental pathways associated with diapause regulated by temperature and maternal influences in embryos of the annual killifish *Austrofundulus limnaeus*. **The Journal of experimental biology**, v. 213, n. 9, p. 3280–3288, 2010.

PODRABSKY, J. E.; CLELEN, D.; CRAWSHAW, L. I. Temperature preference and reproductive fitness of the annual killifish *Austrofundulus limnaeus* exposed to constant and fluctuating temperatures. **Journal of comparative physiology. A, Neuroethology, sensory, neural, and behavioral physiology**, v. 194, n. 4, p. 385–393, 2008.

PODRABSKY, J. E.; CULPEPPER, K. M. Cell cycle regulation during development and dormancy in embryos of the annual killifish *Austrofundulus limnaeus*. **Cell cycle**, v. 11, n. 9, p. 1697–1704, 2012.

PODRABSKY, J. E.; SOMERO, G. N. An inducible 70 kDa-class heat shock protein is constitutively expressed during early development and diapause in

the annual killifish *Austrofundulus limnaeus*. **Cell stress & chaperones**, v. 12, n. 3, p. 199–204, 2007.

PODRABSKY, J. E.; SOMERO, G. N. Changes in gene expression associated with acclimation to constant temperatures and fluctuating daily temperatures in an annual killifish *Austrofundulus limnaeus*. **The Journal of experimental biology**, v. 207, n. 13, p. 237–254, 2004.

PRI-TAL, B. M.; BLUE, S.; PAU, F. K.; PODRABSKY, J. E. Hormonal components of altered developmental pathways in the annual killifish, *Austrofundulus limnaeus*. **General and comparative endocrinology**, v. 174, n. 2, p. 166–174. 2011.

REGOLI, F.; CERRANO, C.; CHIERICI, E.; BOMPADRE, S.; BAVESTRELLO, G. Susceptibility to oxidative stress of the mediterranean demosponge *Petrosia ficiformis*: role of endosymbionts and solar irradiance. **Marine Biology**, v. 137, n. 3, p. 453-461, 2000.

REZENDE, E. L.; TEJEDO, M.; SANTOS, M. Estimating the adaptive potential of critical thermal limits: methodological problems and evolutionary implications. **Functional Ecology**, v. 25, n. 1, p. 111–121, 2011.

RIBEIRO, P. L.; CAMACHO, A.; NAVAS, C. A. Considerations for assessing maximum critical temperatures in small ectothermic animals: insights from leaf-cutting ants. **PloS one**, v. 7, n. 2, p. 920–925, 2012.

RICHARD, S.; MOSLEMI, S.; SIPAHUTAR, H.; BENACHOUR, N.; SERALINI, G. E. Differential Effects of Glyphosate and Roundup on Human Placental Cells and Aromatase. **Environmental Health Perspect**, v. 113, n. 6, p. 716–720, 2005.



ROMANO, R. M.; ROMANO, M. A.; MOURA, M. O.; OLIVEIRA, C. A. A exposição ao glifosato-Roundup causa atraso no início da puberdade em ratos machos. **Brazilian Journal Veterinary Reserch**, São Paulo, v. 45, n. 6, p. 481-487, 2008.

ROMANO, R. M.; ROMANO, M. A.; OLIVEIRA, C. A. Glifosato como desregulador endócrino químico. **Ambiência - Revista do Setor de Ciências Agrárias e Ambientais**, Guarapuava, v. 5, n. 2, p. 359-372, 2009.

SALBEGO, J., PRETTO, A., GIODA, C. R., DE MENEZES, C. C., LAZZARI, R., RADÜNZ NETO, J., BALDISSEROTTO, B. 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.; BIANCHINI, A.; TRINDADE, G. S.; NERY, L. E.; MARINS, L. F. Reactive oxygen species generation and expression of DNA repair-related genes after copper exposure in zebrafish (*Danio rerio*) ZFL cells. **Aquatic Toxicology**, Amsterdam, v. 95, n. 4, p. 285-291, 2009.

SANDRINI, J. Z., ROLA, R. C., LOPES, F. M., BUFFON, H. F., FREITAS, M. M., MARTINS, C. DE 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, n. 9, p. 171-173, 2013.

SHEEHAN, D.; MEADE, G.; FOLEY, V. M. M.; DOWD, C. A.. Structure, function and evolution of glutathione transferases : implications for classification of non-mammalian members of an ancient enzyme superfamily. **Biochemical Journal**, v. 360, n. 1, p. 1-16, 2001.

SHIOGIRI, N. S.; PAULINO, M. G.; CARRASCHI, S. P.; BARALDI, F. G.; DA CRUZ, C.; FERNANDES, M. N. Acute exposure of a glyphosate-based herbicide affects the gills and liver of the Neotropical fish, *Piaractus mesopotamicus*. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 34, n. 2, p. 388–396, 2012.

SIES H.; KOCH O. R.; MARTINO E.; BOVERIS A. Increased biliary glutathione disulfide release in chronically ethanol treated rats. **Federation of European Biochemical Societies letters**, v. 103, n. 2, p. 287-290, 1979.

SIES, Helmut. Oxidative stress: from basic research to clinical application. **American Journal of Medicine** v. 91, n.3, p. 31-38, 1991.

SILVA, M. D.; PERALBA, M. C. R.; MATTOS, M. L. T. Determinação de glifosato e ácido aminometilfosfônico em águas superficiais do Arroio Passo do Pilão. **Pesticidas: Revista de Ecotoxicologia e Meio Ambiente**, Curitiba, v.13, n. 6, p. 19-28, 2003.

SOSO, A. B.; BARCELLOS, L. J. G.; RANZANI-PAIVA, M. J.; KREUTZ L. C.; QUEVEDO R. M.; ANZILIERO, D.; LIMA, M.; SILVA, L. B.; RITTER, F.; BEDIN, A. C.; FINCO, J. A. Chronic exposure to sub-lethal concentration of a glyphosate-based herbicide alters hormone profiles and affects reproduction of female jundia (*Rhamdia quelen*). **Environment Toxicology Pharmacology**. v. 23, n. 3, p. 308–313, 2007.

THONGPRAKASANG, S.; THIANANAWAT, A.; RANGKADILOK, N.; SURIYO, T.; SATAYAVIVAD, J. Glyphosate induces human breast cancer cells growth via estrogen receptors. **Food and Chemical Toxicology**. V. 59, n. 3, p. 129–136, 2013.

STEVENS, M. M.; JACKSON, S.; BESTER, S. A; TERBLANCHE, J. S.; CHOWN, S. L. Oxygen limitation and thermal tolerance in two terrestrial arthropod species. **The Journal of experimental biology**. v. 213, n. 13, p. 2209–2218, 2010.

STOREY, K. B. Oxidative stress: animal adaptations in nature. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 29, n.8, p. 1715–1733, 1996.

TIMMER, Charles Peter. Agriculture and economic development revisited. **Agricultural Systems**, v. 40, n. 1-3, p. 21–58, 1992.

TRUDEAU, V.L. Neuroendocrine regulation of gonadotrophin II release and gonadal growth in the goldfish, *Carassius auratus*. **Reviews of Reproduction**, v. 2, n. 4, p. 55-68, 1997.

TSUI, M. T. K.; CHU, L. M. Environmental fate and non-target impact of glyphosate-based herbicide (Roundup) in a subtropical wetland. **Chemosphere**. v. 71, n. 3, p. 439–446, 2008.

TUSUZUKI, M. Y.; AIKAWAI, H.; STRUSSMAN, C. A.; TAKASHIMAO, F. Comparative survival and growth of embryos larvae and juveniles of pejerrey *Odontesthes bonariensis* and *O. hatcheri* at different salinities. **Journal Applied Ichthyology**, v. 16, n. 16, p. 126-130, 2000.

VAN BREUKELEN, F.; KRUMSCHNABEL, G.; PODRABSKY, J. E. Vertebrate cell death in energy-limited conditions and how to avoid it: what we might learn from mammalian hibernators and other stress-tolerant vertebrates. **Apoptosis: an international journal on programmed cell death**, v. 15, n. 3, p. 386–399, 2010.

VOLCAN, M. V.; FONSECA, A. P.; ROBALDO, R. B. Reproduction of the threatened Annual Killifish *Austrolebias nigrofasciatus* (Cyprinodontiformes: Rivulidae), confined in a natural environment. **Journal of Threatened taxa**, v. 3, n. 6, p.1864–1867, 2011.

VOLCAN, M. V.; LANÉS, L. E. K.; GONÇALVES, Â. C. Threatened fishes of the world: *Austrolebias univentripinnis* Costa and Cheffe 2005 (Cyprinodontiformes: Rivulidae). **Environmental Biology of Fishes**, v. 87, n. 4, p. 319–320, 2010.

VOLCAN, M. V.; LANÉS, L. E. K.; GONÇALVES, A. C.; CHEFFE, M. M. First record of annual killifish *Austrolebias melanoorus* (Amato, 1986) (Cyprinodontiformes: Rivulidae) from Brazil, with data on habitat and conservation. **Journal Applied Ichthyology**, v. 27, n. 4, p. 1120–1122, 2011.

VOLCAN, M. V.; SAMPAIO, L. A.; BONGALHARDO, D. C.; ROBALDO R. B. Reproduction of the annual fish *Austrolebias nigrofasciatus* (Rivulidae) maintained at different temperatures. **Journal of Applied Ichthyology**, v. 29, n. 3, p. 648–652, 2013.

VOLCAN, Matheus Vieira. **Crescimento e fecundidade do peixe anual *Austrolebias nigrofasciatus* (Cyprinodontiformes: Rivulidae) sob condições de laboratório**. 2009. 50 f. Dissertação (Mestrado em Aquicultura) - Fundação Universidade do Rio Grande, Rio Grande.

VORHEES, A. S.; BRADLEY, T. J. Differences in critical thermal maxima and mortality across life stages of the mealworm beetle *Tenebrio molitor*. **The Journal of experimental biology**. v. 215, n. 13, p. 2319–2326, 2012.

WALFORD, R. Alterations in soluble/insoluble collagen ratios in the annual fish, *Cynolebias bellottii*, in relation to age and environmental temperature. **Experimental Gerontology**, vl. 4, n. 2, p. 103–109, 1969.

WALSH, L. P.; MCCORMICK, C.; MARTIN C.; STOCCO D. M. Roundup inhibits steroidogenesis by disrupting steroidogenic acute regulatory (StAR) protein expression. **Environmental health perspectives**, v. 108, n. 8, p. 769–776, 2000.

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 Pharmacology**, v. 31, n. 9, p. 117–165, 2000.

WOODBURN, Allan T. Glyphosate: production, pricing and use worldwide. **Pest Management Science**, v. 56, n. 4, p. 309–312, 2000.

WOURMS, John P. Developmental biology of annual fishes. I. Stages in the normal development of *Austrofundulus myersi* Dahl. **Journal of Experimental Zoology**, v. 182, n. 2, p. 143–167, 1972.

WOURMS, John P. The developmental biology of annual fishes. II. Naturally occurring dispersion and reaggregation of blastomeres during the development of annual fish eggs. **Journal of Experimental Zoology**, v. 182, n. 2, p. 169–200, 1972b.

WOURMS, John P. The developmental biology of annual fishes. III. Pre-embryonic and embryonic diapause of variable duration in the eggs of annual fishes. **Journal of Experimental Zoology**, v. 182, n. 3, p. 389–414, 1972.