

Neide Armiliato

**TOXICIDADE CELULAR E BIOQUÍMICA
DO GLIFOSATO SOBRE OS OVÁRIOS DO PEIXE *Danio rerio***

Tese submetida ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e do Desenvolvimento da Universidade Federal de Santa Catarina para a obtenção do Grau de Doutor em Biologia Celular e do Desenvolvimento.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Yara Maria Rauh Müller
Coorientador: Dr. Dib Ammar

**Florianópolis
2014**

Armiliato, Neide

TOXICIDADE CELULAR E BIOQUÍMICA DO GLIFOSATO SOBRE OS OVÁRIOS DO PEIXE *Danio rerio* / Neide Armiliato; orientadora, Yara Maria Rauh Müller; coorientador, Dib Ammar. Florianópolis, SC, 2014.

106 p.

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

Inclui referências

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

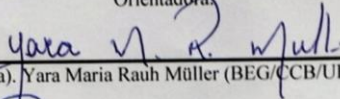
Neide Armiliato

**TOXICIDADE CELULAR E BIOQUÍMICA DO GLIFOSATO
SOBRE OS OVÁRIOS DO PEIXE *Danio rerio***

Esta Tese foi julgada adequada para obtenção do Título de Doutor, e aprovada em sua forma final pelo Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e do Desenvolvimento (PGBCD).

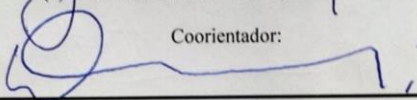
Florianópolis, 11 de agosto de 2014.

Orientadora:



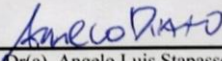
Dr(a). Yara Maria Rauh Müller (BEG/CCB/UFSC)

Coorientador:

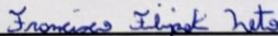


Dr(a). Dib Ammar (PPGBCD/CCB/UFSC)

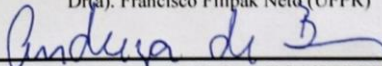
Banca examinadora:



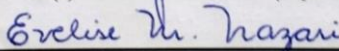
Dr(a). Angelo Luis Stapassoli Piato (UFRGS)



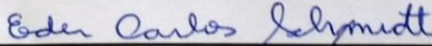
Dr(a). Francisco Filipak Neto (UFPR)



Dr(a). Andrezza Fabro de Bem (BQA/CCB/UFSC)

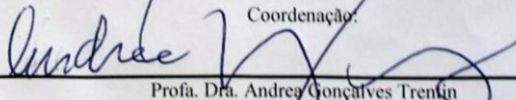


Dr(a). Evelise Maria Nazari (BEG/CCB/UFSC)



Dr(a). Eder Carlos Schmidt (PPGBCD/CCB/UFSC)

Coordenação:



Prof.ª Dra. Andrea Gonçalves Trentin
Subcoordenadora do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e do
Desenvolvimento

Florianópolis, 11 de agosto de 2014.

*Aos meus filhos, Marlon Gabriel e Luis Eduardo,
pelo infinito amor.*

*Ao meu irmão Nelson, pela amizade e
carinho.*

AGRADECIMENTOS

A Deus, por todas as oportunidades concedidas para meu desenvolvimento espiritual, moral e intelectual.

À Universidade do Contestado (UnC), pela incentivo e apoio financeiro.

Em especial à minha orientadora Professora Dra. Yara Maria Rauh Müller pela oportunidade, confiança e colaboração na realização deste trabalho. A senhora é um grande exemplo de dedicação e amor pela ciência.

Ao meu coorientador, Dr. Dib Ammar, pela valiosa e paciente orientação, pelo auxílio na realização das metodologias, pelos importantes momentos de discussão dos resultados e exemplo de perseverança.

De forma não menos especial, quero agradecer também à Prof.^a Dr.^a Evelise Maria Nazari. Obrigada pela sua disponibilidade, paciência e simpatia, opiniões, sugestões, pela revisão crítica do texto, pelos momentos de convivência e exemplo de dedicação à ciência.

Aos queridos colegas e amigos do Laboratório de Reprodução e Desenvolvimento Animal: Karoline, Valquíria, Fabiana, Claudia, Eliane, Heloísa, Manuela, Thaline, Aline, Christian e Michael pelo companheirismo, pela amizade, pela troca de experiências, pelo riso, pelo silêncio, pela convivência e por toda a ajuda. À todos os meus amigos, aqui não citados, mas que sempre serão lembrados, e guardados no coração, pelos momentos divertidos e prazerosos proporcionados na convivência diária.

Em especial aos amigos do coração Gilian e Luciane. Obrigada pelo carinho, pelo incentivo, pela ajuda e também pelos divertidos e deliciosos encontros e passeios. Lu, obrigada pela parceria nos experimentos com o *zebrafish*.

Ao Laboratório Central de Microscopia Eletrônica (LCME) e à técnica Eliana, pelo auxílio durante a realização de metodologias e o uso de equipamentos que possibilitaram o desenvolvimento desta pesquisa.

Aos Laboratórios Multiusuários de Estudos em Biologia (LAMEB I e II) e sua equipe de trabalho, em especial a técnica Chirle e Bibiana, por serem tão atenciosas e prestativas.

À FUMDES, pela concessão da bolsa de estudo.

À Prof.^a Dr.^a Andreza Fabro de Bem e em especial ao doutorando Marcos Raniel Straliozzo pela colaboração nas análises bioquímicas.

À Prof.^a Dr.^a Elisete Barp, pela amizade, pelo incentivo e parceria nas pesquisas do Grupo GEMA.

À minha família, em especial aos meus queridos Marlon Gabriel e Luis Eduardo, Taisa, Neli Elisa e João Pedro pelo amor incondicional, paciência, carinho e compreensão que tiveram comigo durante esta caminhada. Meu filho Marlon Gabriel e minha irmã Neli Elisa, serei sempre grata pela dedicação, carinho e cuidados com o Dudu. Obrigada de coração!

Ao meu amor Joni, pelo carinho, aconchego e compreensão. Obrigada pela sua doce paciência e exemplo de dedicação e perseverança.

Muito obrigada!

RESUMO

Glifosato é um dos herbicidas mais usados no Brasil, sendo altamente solúvel em água e quando aplicado em ambiente terrestre e aéreo pode ocorrer a sua infiltração no solo e a percolação para os corpos d'água, atingindo diferentes organismos aquáticos não-álvos, como invertebrados e vertebrados. O objetivo deste estudo foi avaliar o efeito do glifosato, na concentração de 65 µg/L, sobre a organização estrutural e ultraestrutural, bem como sobre os parâmetros bioquímicos de toxicidade nos ovários do peixe *Danio rerio*. Esta concentração foi estabelecida pelo CONAMA como a máxima permitida para os rios do Brasil. As células germinativas foram caracterizadas em quatro fases: ovogônia, ovócito pré-vitelogênico I, ovócito pré-vitelogênico II e ovócito vitelogênico, baseado em critérios morfológicos já estabelecidos na literatura. Verificou-se um aumento significativo no diâmetro dos ovócitos pré-vitelogênicos I e nos ovócitos vitelogênicos, assim como um aumento significativo no índice gonadossomático (IGS) em ovários de peixes expostos ao glifosato por um período de 15 dias (exposição subcrônica). Na análise estrutural das células germinativas não foram identificadas alterações morfológicas, porém na análise ultraestrutural, observou-se no citoplasma dos ovócitos formações membranosas concêntricas tipo *myelin-like*, associadas aos grânulos de vitelo periféricos, além de alterações nas cisternas dos corpos de Golgi. Houve também redução do número de mitocôndrias e cristas mitocondriais nas células foliculares. Constatou-se maior expressão de SF-1, em ovários expostos ao glifosato. Identificou-se também um aumento significativo no número de células imunomarcadas com o anticorpo anti-Bak, porém um número significativamente menor de células imunomarcadas com o anticorpo anti-Bcl2. Na exposição dos peixes ao glifosato por um período de 96 h (exposição aguda), identificou-se redução nos níveis de tióis não proteicos (NPSH) e um aumento significativo nos níveis de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), caracterizando estresse oxidativo. Na exposição por um período de 360 h (15 dias), não houve a caracterização de estresse oxidativo. Mesmo na concentração de glifosato regulamentada para os rios do Brasil, efeitos subletais foram identificados nos ovários, sendo reconhecidos usando ferramentas bioquímicas e ultraestruturais. Desta forma, estas análises devem ser realizadas em testes toxicológicos na avaliação de parâmetros reprodutivos. Os efeitos adversos do glifosato sobre os ovócitos e as células foliculares demonstradas aqui representam um importante risco para a reprodução de peixes.

Palavras-chave: Glifosato, zebrafish, fator esteroideogênico 1 (SF-1), disruptor endócrino, ultraestrutura.

ABSTRACT

Glyphosate is one of the most commonly used herbicides in Brazil, being highly soluble in water and when applied in aerial and terrestrial environment can occur its infiltration into the soil and the percolation to the bodies of water, reaching different non-target aquatic organisms, such as invertebrates and vertebrates. The main goal of this study was to evaluate the effects of glyphosate, at a concentration of 65 µg/L, on structural and ultra-structural organization, as well as on the biochemical parameters of toxicity on the ovaries of the fish *Danio rerio*. This concentration was established by CONAMA as the maximum allowable for the Brazilian rivers. The germ cells were characterized in four stages: oogonia, previtellogenic I oocyte, previtellogenic II oocyte and vitellogenic oocyte, based on morphological criteria previously established on the literature. A significant increase on the diameter of the previtellogenic I and vitellogenic oocytes was verified, as well as a significant increase in the gonadosomatic index (GSI) in the ovaries of the fish exposed to the glyphosate for a 15 days period (sub-chronic exposure). In the structural analysis of the germ cells, morphologic changes were not identified. However, in ultrastructural analysis, concentric membranous formation of *myelin-like* kind were observed on the cytoplasm of the oocytes, associated to the peripheral yolk granules, and also morphological change Golgi cisterns. In follicular cells reduction on the number of mitochondria and mitochondrial cristae observed. In this analysis, it was also observed with. It was observed greater SF-1 expression in ovaries exposed to glyphosate. It was also identified a significant increase in the number of immunostained cells with the anti-Bak antibody, but a significantly lower number of immunostained cells with antibody anti-Bcl2. On exposure of fish to glyphosate for 96 hours (acute exposure), it was identified a reduction in levels of non-protein sulfhydryl (NPSH) and a significant increase in levels of thiobarbituric acid reactive substances (TBARS), featuring oxidative stress. On exposure of a period of 360 hours (15 days), there was no characterization of oxidative stress. Even with the glyphosate concentration regulated to Brazil's rivers, sublethal effects were identified on the ovaries, being recognized using biochemistry and ultrastructural tools. In this way, these analyses should be carried out in toxicological evaluation of reproductive parameters. The adverse effects of glyphosate on the oocytes and follicular cells shown here represent a major risk for the reproduction of fish.

Keywords: glyphosate, zebrafish, steroidogenic factor 1 (SF-1), endocrine disruptor, ultrastructure.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Fórmula estrutural do herbicida glifosato.	24
Figura 2: Fêmea adulta de <i>D. rerio</i>	27
Figura 3: Secção transversal de fêmea adulta de <i>D. rerio</i>	33
Figura 4: Representação dos folículos ovarianos de <i>D. rerio</i>	35
Figura 5: Organograma dos grupos experimentais	42
Figura 6: Organograma das análises bioquímicas.	42
Figura 7: Fêmea de <i>D. rerio</i> com destaque dos ovários.	43
Figura 8: IGS dos ovários de <i>D. rerio</i>	47
Figura 9: Células germinativas de <i>D. rerio</i>	53
Figura 10: Diâmetro das células germinativas e número de células germinativas por área (NA) em ovários de <i>D. rerio</i>	55
Figura 11: Visão panorâmica de secção de ovário de <i>D. rerio</i>	56
Figura 12: Secção de ovário de <i>D. rerio</i> . Ovogônias e ovócito pré-vitelogênico I.	57
Figura 13: Secção de ovário de <i>D. rerio</i> . Ovócito pré-vitelogênico II.	58
Figura 14: Secção de ovário de <i>D. rerio</i> . Ovócito pré-vitelogênico II, e vitelogênico.	59
Figura 15: Secção de ovário de <i>D. rerio</i> : Células foliculares e envelope vitelínico.	60
Figura 16: Secções ultraestruturais de ovário de <i>D. rerio</i> . Célula folicular e envelope vitelínico.	61
Figura 17: Secções ultraestruturais de ovário de <i>D. rerio</i> . Fêmea não exposta ao glifosato.	62
Figura 18: Secções ultraestruturais de <i>D. rerio</i> . Fêmea não exposta e exposta ao glifosato.	63
Figura 19: Alterações ultraestruturais de ovário de <i>D. rerio</i> expostos ao glifosato.	64
Figura 20: Secções ultraestruturais de ovário de <i>D. rerio</i> . Fêmea não exposta e exposta ao glifosato. Retículo endoplasmático granular.	65
Figura 21: Secções ultraestruturais de ovário de <i>D. rerio</i> . Fêmea não exposta ao glifosato. Corpos de Golgi com morfologia normal.	66
Figura 22: Secções ultraestruturais de ovário de <i>D. rerio</i> . Fêmea exposta ao glifosato. Corpos de Golgi com alterações.	67
Figura 23: Secções ultraestruturais de ovário de <i>D. rerio</i> . Fêmea não exposta e exposta ao glifosato. Mitocôndrias.	68
Figura 24: Secções ultraestruturais de ovário de <i>D. rerio</i> . Fêmea não exposta e exposta ao glifosato. Mitocôndrias.	69

Figura 25: Imuno-histoquímica e <i>immunoblotting</i> da expressão de SF-1	70
Figura 26: Níveis de tióis nos ovários de <i>D. rerio</i>	71
Figura 27: Níveis de TBARS nos ovários de <i>D. rerio</i>	73
Figura 28: Análise das proteínas Bak e Bcl2 por citometria de fluxo. .	75
Figura 29: Análise da proteína SF-1 por citometria de fluxo.	76

LISTA DE QUADROS

Quadro 1: Índice Gonadossomático de fêmeas de <i>D. rerio</i>	40
Quadro 2: Detalhamento dos anticorpos primários utilizados nas técnicas de imuno-histoquímica, <i>Western-blotting</i> e citometria de fluxo.	45
Quadro 3: Detalhamento dos anticorpos secundários utilizados nas técnicas de imuno-histoquímica, <i>Western-blotting</i> e citometria de fluxo.	45
Quadro 4: Distribuição das fêmeas de <i>D. rerio</i> em classes, de acordo com o IGS.	52
Quadro 5: Descrição das células germinativas em ovários de <i>D. rerio</i>	54

LISTA DAS PRINCIPAIS ABREVIATURAS E SIGLAS

ABNT	Associação Brasileira de Normas Técnicas
AMPA	Ácido aminometilfosfônico, do inglês <i>aminomethylphosphonic acid</i>
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
Bak	Proteína pró-apoptótica, do inglês <i>Bcl2-antagonist killer</i>
Bcl2	Proteína anti-apoptótica, do inglês <i>Bcelllymphoma 2</i>
Bcl-XL	Proteína anti-apoptótica, do inglês <i>BcelllymphomaxL</i>
BSA	Albumina sérica bovina, do inglês <i>bovine serum albumin</i>
CONAMA	Conselho Nacional do Meio Ambiente
DAB	3-3, diaminobenzidina
DTNB	5,5' - ditiobis 2-nitrobenzoato
EEC	Comunidade Economica Europeia, do inglês <i>European Economic Community</i>
EROS	Espécies reativas de oxigênio
FAO	Organização para Alimentação e Agricultura, do inglês <i>Food and agriculture organization</i>
GSH	Glutationa reduzida
IGS	Índice gonadossomático
MDA	Malondialdeído
NA	Número de células por área
NPSH	Grupos tióis não proteicos
OMS	Organização Mundial da Saúde
PBS	Tampão fosfato salino, do inglês <i>phosphate buffered saline</i>
SF-1	Fator esteroidogênico 1, do inglês <i>steroidogenic factor 1</i>
SDS	Dodecil sulfato de sódio
StAR	Proteína aguda reguladora da esteroidogênese, do inglês <i>steroidogenic acute regutalory protein</i>
TBA	Ácido tiobarbitúrico
TBS	Tris-glicina
TBARS	Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico
USEPA	Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos da América, do inglês <i>United States Environmental Protection Agency</i>

SUMÁRIO

RESUMO	xi
ABSTRACT	xiii
LISTA DE FIGURAS	xv
LISTA DE QUADROS	xvi
LISTA DAS PRINCIPAIS ABREVIATURAS E SIGLAS	xvii
1 INTRODUÇÃO	21
1.1 Agrotóxicos e a contaminação aquática	22
1.2 O potencial toxicológico do glifosato	23
1.3 <i>Danio rerio</i> como modelo experimental para ensaios de toxicologia	26
1.4 O ovário de peixe como potencial alvo de contaminação	32
2 OBJETIVOS	37
2.1 Objetivo Geral.....	37
2.2 Objetivos Específicos.....	37
3 METODOLOGIA	39
3.1 Animais	39
3.2 Experimento piloto.....	39
3.3 Tratamento com glifosato	40
3.4 Biometria corporal e ovariana	43
3.5 Microscopia de luz.....	43
3.5.1 Morfologia e morfometria dos ovários	44
3.6 Marcações celulares por imuno-histoquímica.....	44
3.7 Microscopia eletrônica de transmissão	46
3.8 Citometria de fluxo	46
3.9 Eletroforese e <i>Western-blotting</i>	47
3.10 Níveis de tióis não proteicos (NPSH) e das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS).....	47
3.10.1 Determinação de NPSH	48

3.10.2	Determinação das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS).....	48
4	ANÁLISES ESTATÍSTICAS	49
5	RESULTADOS	51
5.1	Índice Gonadossomático como parâmetro na avaliação de toxicidade.....	51
5.2	Efeito do glifosato na morfometria, estrutura e ultraestrutura dos ovários	52
5.3	O efeito do glifosato na expressão de SF-1	69
5.4	Glifosato induz ao estresse oxidativo	71
5.4.1	NPSH.....	71
5.4.2	TBARS	72
5.5	O efeito do glifosato na expressão de Bak, Bcl2 e SF-1.....	74
6	DISCUSSÃO.....	77
7	CONCLUSÕES	85
	REFERÊNCIAS.....	87
	ANEXO 1.....	108

INTRODUÇÃO

O nível de compostos xenobióticos nos ecossistemas aquáticos vem aumentando de forma alarmante como resultado da atividade antropogênica, condição que tem contribuído para a redução da qualidade ambiental, bem como para o comprometimento dos seres vivos que habitam os sistemas aquáticos (CAJARAVILLE et al., 2000).

A utilização de agrotóxicos é uma das principais causas de contaminação dos sistemas aquáticos no Brasil, e considerando que a agricultura é o setor que mais consome água doce, pode-se dizer que além de sérios problemas para a saúde dos seres vivos, os agrotóxicos também se transformaram em um grave problema ambiental no país.

O Brasil é o terceiro maior consumidor de agrotóxicos do mundo e o primeiro na América Latina, de acordo com a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), devido ao grande aumento no cultivo de monoculturas (ANVISA, 2013), com destaque das culturas de mercado internacional como a soja, algodão e café. Do volume total de agrotóxicos aplicados nas lavouras, menos de 0,1% entra em contato com os organismos alvos, enquanto o restante 99,9% tem potencial para se mover para outros compartimentos ambientais, tais como águas superficiais e subterrâneas (SABIK et al., 2000).

Dentre os agrotóxicos, os organofosforados são compostos químicos derivados do ácido fosfórico e tiosfosfórico, sendo reconhecidos por sua ampla utilização, destacando-se o herbicida glifosato por ser não seletivo e apresentar meia-vida curta (GIESY et al., 2000). Nas últimas décadas, sua fácil aquisição e rápida manipulação contribuíram significativamente para o aumento efetivo de sua utilização o que tem levado a questionamentos sobre seu efeito tóxico em organismos não-alvos. Com intuito de caracterizar sua toxicidade, estudos utilizando diferentes modelos animais, como aves, camundongos e peixes foram realizados (OLIVEIRA et al., 2007; ASTIZ et al., 2009; MODESTO e MARTINEZ, 2010).

Neste contexto é fundamental reconhecer o mecanismo de ação do herbicida glifosato através de análises celulares e bioquímicas, de maneira a caracterizar seu efeito subletal sobre os organismos expostos, uma vez que esse mecanismo ainda é pouco compreendido nos sistemas reprodutor e endócrino. Assim é importante a realização de trabalhos que investiguem o efeito do herbicida glifosato sobre a organização estrutural e ultraestrutural dos ovários, bem como análises bioquímicas de toxicidade em peixes, pois o comprometimento da maturação das gônadas tem efeito direto sobre a dinâmica reprodutiva das espécies.

1.1 Agrotóxicos e a contaminação aquática

Os ecossistemas aquáticos têm sido alterados de maneira significativa devido aos impactos ambientais resultantes da atividade humana, como mineração, agroindústria, lançamento de efluentes domésticos e industriais não tratados. Praticamente toda a atividade humana constitui uma fonte potencial de contaminantes para os ecossistemas naturais. O sistema aquático é geralmente um acumulador destes produtos que chegam nas águas diretamente ou através do depósito em solos e coberturas vegetais de onde, com as chuvas, são transportados para os corpos d'água (MOZETO e ZAGATTO, 2006).

Desta forma, a descarga de lixos tóxicos provenientes de efluentes industriais, atividades agrícolas, derrames acidentais de lixos químicos e os esgotos domésticos, em rios e mares contribuem para a contaminação do ambiente aquático, com uma diversidade de agentes representados principalmente por metais pesados, agrotóxicos e compostos orgânicos (RASHED, 2001; CHANDRAN et al., 2005; ARIAS et al., 2007). Sendo assim, os organismos aquáticos podem estar expostos às substâncias tóxicas, o que pode ter consequência a curto, médio e longo prazos.

São classificados como agrotóxicos, de acordo com a *Food and Agriculture Organization* (FAO) substâncias ou mistura de substâncias utilizadas para prevenir, destruir ou controlar pragas de origem animal ou vegetal (CALDAS, 2005). O termo agrotóxico inclui herbicidas, inseticidas, fungicidas, fumigantes, moluscidas, além de reguladores de crescimento, desfoliantes e dissecantes (SILVA e FAY, 2004; BAIRD e CANN, 2005).

O uso indiscriminado de agrotóxicos na agricultura desencadeia prejuízos severos para o meio ambiente o que representa uma ameaça para a sobrevivência de ecossistemas. RÜEGG et al. (1986) relatam que o modelo de agricultura adotado no Brasil baseia-se fundamentalmente no uso dos agrotóxicos, sendo que estes compostos são empregados há muito tempo, e a partir da Segunda Guerra Mundial passaram a ser mais intensamente utilizados. Na realidade, os inseticidas sintéticos começaram a ser utilizados em grande escala na década de 1940, durante a Segunda Guerra Mundial, a fim de proteger os soldados da doença-dosono e malária nas regiões tropicais e subtropicais da África e da Ásia. Devido à necessidade de proteger o exército, as pesquisas de novos inseticidas foram impulsionadas, o que resultou no desenvolvimento de

vários agrotóxicos organoclorados e organofosforados (ARAÚJO et al., 2001).

Os herbicidas ocupam uma posição singular dentre os agrotóxicos, uma vez que são adicionados intencionalmente ao ambiente para destruir ou controlar algumas formas de vida que são consideradas indesejáveis, ou seja, as chamadas pestes ou pragas, que representam um grande problema para a agropecuária tradicional e também para a saúde pública (VEIGA et al., 2006). Essas substâncias podem alcançar os ambientes aquáticos através da aplicação intencional da deriva e escoamento superficial a partir de áreas onde ocorreram aplicações, do lançamento de esgoto, por ocorrência de acidentes em depósito, durante o transporte de pesticidas, ou ainda por descarte inadequado de embalagens usadas (BROCK et al., 2006).

Nas últimas décadas, houve um aumento significativo no uso de agrotóxicos, especialmente do herbicida glifosato nos estados da região Sul do Brasil o que leva a preocupações acerca dos potenciais efeitos ambientais, especialmente porque a presença de resíduos nos corpos d'água pode resultar em um comprometimento da fauna e da flora associadas, induzindo alterações significativas na biologia das espécies (IBGE, 2010). No oeste do estado de Santa Catarina, a agricultura é a atividade econômica predominante, tendo destaque as culturas de milho e soja, importantes para a pecuária e a criação de suínos e aves. Nos últimos anos o incremento da produtividade agrícola nesta região pode estar relacionada ao aumento da utilização do glifosato (BAVARESCO, 2006).

O glifosato é altamente solúvel em água (AMARANTE JUNIOR et al., 2002; ÇAVAS e KÖNEN, 2007) e quando aplicado em ambientes terrestre e aéreo, pode ocorrer a sua infiltração no solo e a percolação para os corpos d'água, atingindo diferentes organismos aquáticos não-alvos, como peixes (SZAREK et al., 2000; SANDRINI et al., 2013), anfíbios (RELYEA, 2005; HEDBERG e WALLIN, 2010), répteis (POLETTA et al., 2011), moluscos (SANDRINI et al., 2013) e crustáceos (MENSAH et al., 2011; OSTERBERG et al., 2012).

1.2 O potencial toxicológico do glifosato

Em 1970, a Companhia Monsanto confirmou a atividade herbicida do glifosato e, a primeira formulação comercial foi lançada nos Estados Unidos em 1974, com o nome comercial de *Roundup*®. Este

herbicida é ainda o mais comercializado no mundo para o controle de ervas daninhas (WILLIAMS et al., 2000; MINK et al., 2011).

O organofosforado *Roundup*® é um dos herbicidas mais usados no Brasil, sendo que seu princípio ativo é o glifosato N-(fosfonometil)glicina, que apresenta fórmula molecular $C_3H_8NO_5P$ (Figura 1), cujas propriedades químicas possibilitam que se solubilize facilmente nos ambientes aquáticos (BAIRD e CANN, 2005).

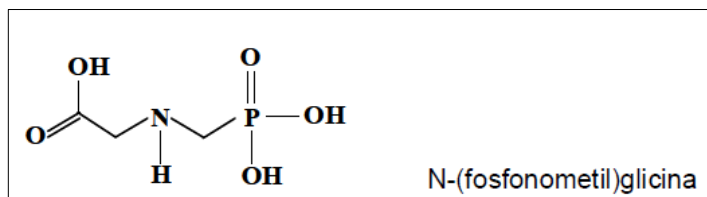


Figura 1: Fórmula estrutural do herbicida glifosato. Fonte: ANVISA, 2013.

O glifosato é um herbicida pós-emergente, pertencente ao grupo químico das glicinas, classificado como não-seletivo e de ação sistêmica. Assim apresenta largo espectro de ação, o que possibilita um excelente controle de plantas daninhas anuais ou perenes (ÇAGLAR e KOLANKAYA, 2008). Sua aplicação em áreas agrícolas pode contaminar o ambiente aquático por meio de derramamentos acidentais, erosão e lixiviação do solo pela chuva, e lavagem de equipamentos e recipientes utilizados nessas pulverizações (MARTINEZ e CÓLUS, 2002).

O herbicida glifosato presente nas águas pode aderir a matéria orgânica em suspensão, depositar no sedimento ou ser absorvido pelos organismos aquáticos, o que pode provocar impactos em múltiplos níveis, desde moléculas até populações e comunidades (GRISOLIA, 2005). A crescente utilização de herbicidas, como o glifosato, na agricultura tem ocasionado uma série de efeitos e modificações no ambiente, como a contaminação e a acumulação nos componentes bióticos e abióticos dos ecossistemas (CALDAS, 2005). A presença do glifosato nos corpos d'água é preocupante, pois tanto afeta os organismos aquáticos, como compromete a sua utilização para o consumo humano.

A Comunidade Econômica Europeia (EEC) estabeleceu em 0,1 $\mu\text{g/L}$ a concentração máxima admissível de qualquer agrotóxico em águas destinados para o consumo humano e em 0,5 $\mu\text{g/L}$ para o total de resíduos (MALLAT e BARCELÓ, 1998).

No Brasil, a Resolução CONAMA 357/05 que classifica os corpos d'água, regulamenta uma variedade de substâncias, estabelecendo a concentração máxima permitida das mesmas, de acordo com as diferentes classes de água. Nas águas das classes 1 e 2, destinadas ao abastecimento para o consumo humano e à proteção das comunidades aquáticas, a concentração máxima permitida de glifosato é de 65 µg/L (BRASIL, 2005). Porém, poucos dados disponíveis na literatura quantificam as concentrações de glifosato em corpos d'água brasileiros. Segundo AMARANTE JUNIOR et al. (2002), em raras ocasiões o herbicida tem sido detectado em amostras de águas, mas em geral, isto ocorre devido à dificuldade de separação do composto e também devido ao fato de não ser considerado um sério contaminante aquático. Isso está relacionado ao fato de que o glifosato é um composto extremamente polar, sendo extraído das amostras aquosas juntamente com cátions e ânions inorgânicos, o que dificulta sua análise.

A grande solubilidade do glifosato na água indica que este seja considerado de elevada mobilidade em água, sendo que a união forte e rápida dos sedimentos e partículas do herbicida, especialmente nas águas pouco profundas e turbulentas, ou naquelas que levam grandes cargas de partículas, removem o glifosato do solo, uma vez que ele pode ser adsorvido pelos sedimentos ou degradado por microrganismos (SOLOMON e THOMPSON, 2003). Sua permanência no ambiente aquático foi estimada por GIESY et al. (2000) entre 7 a 14 dias e por PATTERSON e BRANCH (2004) como sendo de 7 a 21 dias.

Dentre os processos biológicos que contribuem para a persistência dos herbicidas no solo, a degradação microbiana constitui o de maior importância. Entretanto, a complexa interação entre microrganismos, substratos e os constituintes do solo influenciam a magnitude da biodegradação dessas moléculas (SOUZA et al., 1999).

A meia-vida do glifosato no solo varia de poucos dias até alguns meses, dependendo dos teores de argila e matéria orgânica e do nível de atividade microbiana (TONI et al., 2006). Porém o estudo de WAUCHOPE et al. (1992) relata que a meia-vida pode chegar a 174 dias. Enquanto que GIESY et al. (2000) descrevem que a meia-vida do glifosato em solo varia de dois a 197 dias e seu resíduo ácido aminometilfosfônico (AMPA), de 76 a 240 dias.

Em muitos países o reconhecimento de que os herbicidas são contaminantes aquáticos tem levado a um controle mais rígido na fabricação, transporte, utilização e descarte dessas substâncias (RAND et al., 1995). No Brasil, não existe legislação que defina limites máximos de

qualquer pesticida em solos sendo que a legislação estabelece normas e critérios para a realização de testes preliminares para a avaliação ecotoxicológica dos herbicidas (AMARANTE JUNIOR et al., 2002).

Os efeitos dos herbicidas podem ser agudos, subcrônicos ou crônicos e estão na dependência do tempo de exposição, concentração no ambiente, modo de contato com o produto e tipo de degradação, interferindo na dinâmica dos sistemas aquáticos, em especial na população de peixes (AKINGBEMI et al., 2004).

Os peixes são geralmente usados como organismos sentinela por possuírem grande importância na cadeia trófica, acumulando substâncias tóxicas e respondendo a baixas concentrações de moléculas mutagênicas (ÇAVAŞ e ERGENE-GÖZÜKARA, 2005). Assim, o uso de peixes como indicador da ação tóxica de certos compostos é de grande importância, para a análise do ambiente aquático (VAN DER OOST et al., 2003), pois peixes e invertebrados aquáticos podem acumular herbicidas em concentrações muito maiores do que as da água, uma vez que esses compostos podem se ligar à matéria orgânica que é ingerida por esses animais (NIMMO, 1985).

O estudo dos efeitos destes compostos tóxicos sobre a vida aquática pode ser realizado por meio de ensaios biológicos *in loco* ou em condições laboratoriais, sendo estes últimos os mais utilizados, por permitirem um controle mais efetivo dos fatores abióticos, como temperatura e pH da água, duração da exposição e concentração do produto a ser estudado (ABNT, 2006).

1.3 *Danio rerio* como modelo experimental para ensaios de toxicologia

D. rerio (Figura 2), mundialmente conhecido como *zebrafish*, e no Brasil como Paulistinha foi descrito por Hamilton-Buchanan em 1822 e introduzido como modelo animal nas pesquisas científicas por George Streisinger em 1981. É um peixe teleósteo que apresenta comprimento total, quando adulto, entre 3 a 4 cm, pertence à família Cyprinidae. Originário do Sul e Sudeste da Ásia (SCHNEIDER et al., 2009), distribuindo-se naturalmente pelo Paquistão, Índia, Bangladesh e Nepal, sendo encontrado em rios, águas paradas, canais e campos de arroz.

Esta espécie apresenta dimorfismo sexual externo, é ovíparo, de hábito alimentar onívoro, possui alta taxa de fecundidade e, se mantida em ambiente favorável, podem repetir o ciclo de desova a cada 5-7 dias, influenciada pelos fatores ambientais e/ou sazonais. A fêmea pode

colocar de 200-300 ovos por desova, sendo que os machos liberam os espermatozoides logo após a desova, uma vez que estes se tornam inviáveis rapidamente no contato com a água. A fertilização é externa sendo os embriões transparentes, com desenvolvimento rápido de (72 h) e atingindo a maturidade sexual entre três e seis meses (HILL et al., 2005).

D. rerio é um organismo modelo consolidado em estudos científicos, principalmente em toxicologia, devido à sua fácil acomodação a diferentes condições ambientais, tanto naturais quanto artificiais (KNIE e LOPES, 2004). É facilmente mantido em aquário de água doce sob condições controladas de temperatura, pH e fotoperíodo, sendo bastante indicado para estudos experimentais (SEGNER, 2009).



Figura 2: Fêmea adulta de *D. rerio*. Fonte: Laboratório de Reprodução e Desenvolvimento Animal BEG/UFSC. Escala: 0,5 cm.

Esta espécie, em particular, possui características que a torna propícia ao estudo da biologia comportamental, pois apresenta um metabolismo rápido, grande sensibilidade a mudanças ambientais e efeitos tóxicos, os quais provocam mudanças significativas em seu comportamento ou em sua aparência externa, que podem ser facilmente identificadas (GERLAI, 2003; RUBINSTEIN, 2003; RICO et al., 2011).

Além disso, outras características como, porte pequeno, ovos translúcidos com fertilização e desenvolvimento externos e seu rápido desenvolvimento embrionário, contribuem para que seja considerado um modelo consagrado ao estudo de doenças, o que o torna um excelente modelo experimental para estudos genéticos e toxicológicos (LIESCHKE e CURRIE, 2007).

D. rerio apresenta grande sensibilidade quando exposto a produtos químicos, por ser capaz de absorver de forma rápida os compostos que são diretamente adicionados na água e acumulá-los em diferentes tecidos órgãos, como por exemplo no encéfalo para o caso do cobre (GROSELL e WOOD, 2002). Este modelo tem sido utilizado em

estudos genéticos, farmacológicos, comportamentais, e também em estudos com poluentes ambientais, especialmente os disruptores endócrinos que afetam a ligação de receptores de estrógenos (INOHARA e NUNEZ, 2000; LAW, 2001; PARNG et al., 2002; COSTACHE et al., 2005).

Desta forma, a espécie de peixe *D. rerio* mostra-se adequada para trabalhos em condições laboratoriais, devido ao fato de ser amplamente reconhecida como um bom modelo para estudos de toxicidade (CARNEY et al., 2006), destacando a importância de pesquisas relacionadas aos aspectos reprodutivos de organismos aquáticos expostos ao herbicida glifosato.

No estudo desenvolvido por ARMILIATO et al. (2014), fêmeas da espécie *D. rerio* foram expostas ao herbicida glifosato e os autores relatam que a concentração regulamentada para os rios do Brasil foi suficiente para causar alterações ultraestruturais e bioquímicas nos ovários dos peixes, sugerindo comprometimento do processo reprodutivo da espécie.

Dentre os órgãos pouco estudados, destacam-se os ovários dos peixes que podem ser alvos diretos ou indiretos dos herbicidas e de outros poluentes (WILLEY e KRONE, 2001) comprometendo desta forma o processo reprodutivo das espécies.

A ação do glifosato foi demonstrada em ensaios experimentais, pela caracterização do processo de morte celular por apoptose e necrose em células de cordão umbilical, linhagem celular de placenta e células embrionárias renais humanas (BENACHOUR e SÉRALINI, 2009). A exposição a herbicidas a base de glifosato, em concentrações consideradas não tóxicas, induziram danos ao DNA e levaram à ativação de caspases em células de linhagem humana HepG2 (GASNIER et al., 2009).

O potencial de toxicidade do herbicida *Roundup*® e do glifosato também foi avaliado em mitocôndrias hepáticas (PEIXOTO, 2005). O *Roundup*® induziu alterações na bioenergética mitocondrial e estes efeitos não puderam ser atribuídos exclusivamente ao ingrediente ativo, mas a uma possível sinergia entre o glifosato e os demais componentes da formulação, como por exemplo, o surfactante que atua aumentando a dispersão/emulsificação e absorção do herbicida.

O glifosato também pode interferir indiretamente na função reprodutiva, sendo classificado como um disruptor endócrino, interferindo na síntese, secreção, transporte e ação de hormônios (SONNENSCHNEIN e SOTO, 1998; USEPA, 1998), como observado em fêmeas do bagre *Rhamdia quelen* (SOSO et al., 2007).

Os agrotóxicos, largamente utilizados no mundo, constituem o maior grupo de substâncias classificadas como disruptores endócrinos. Na classe dos agrotóxicos considerados disruptores endócrinos estão incluídos herbicidas, como o glifosato, inseticidas, fungicidas e organoclorados empregados na agricultura, aquicultura e uso domiciliar (BILA e DEZOTTI, 2007).

O herbicida glifosato, assim como outros compostos químicos sintéticos, tem propriedades semelhantes aos hormônios endógenos, como os andrógenos e estrógenos, podendo exercer seu efeito mesmo em concentrações baixas. Estes compostos antrópicos são capazes de interferir no sistema endócrino dos vertebrados (COLBORN et al., 1993).

As primeiras evidências dos efeitos adversos dos herbicidas a base de glifosato postularam este composto como um importante disruptor do sistema endócrino. Neste sentido, WALSH et al. (2000) demonstraram que o *Roundup*® inibiu em 94% a esteroidogênese em linhagens de células tumorais de *Leydig*, através da redução na expressão da proteína regulatória esteroidogênica aguda (StAR). Posteriormente, RICHARD et al. (2005) demonstraram que o glifosato, em concentrações 100 vezes mais baixas do que as recomendadas para o uso agrícola, levou a alterações na atividade da enzima aromatase em células de placenta humana da linhagem celular JEG3. BENACHOUR e SÉRALINI (2007), observaram diminuição da atividade da aromatase em cultivos de células placentárias e embrionárias humanas e ROMANO et al. (2010) também mostraram que o *Roundup*® é um potente disruptor endócrino, causando redução na produção de testosterona e alterações morfológicas em testículos de ratos.

Dentre os fatores influenciados pela ação de disruptores endócrinos, destaca-se o fator esteroidogênico 1 (SF-1), por ele ser um regulador essencial do desenvolvimento e função endócrina. Ortólogos deste fator são encontrados em muitos vertebrados e invertebrados por ser altamente conservado entre as espécies. Por esta razão, SF-1 tem sido utilizado como um marcador do sistema endócrino, e a sua suscetibilidade a disruptor químico tem sido demonstrada em ensaios toxicológicos (HOIVIK et al., 2010; KORTNER et al., 2010). As funções de SF-1 incluem também a regulação do desenvolvimento de tecidos nos eixos hipotálamo-hipófise-adrenal e hipotálamo-hipófise-gonadal (IKEDA et al., 1993), além da regulação da diferenciação e função endócrina em vários níveis, em particular em relação à reprodução (PARKER E SCHIMMER, 1997).

Além do SF-1, marcadores celulares como as proteínas Bcl2 e Bak podem apresentar respostas aos efeitos do glifosato, sendo observadas em vários componentes celulares, como as membranas, as organelas e os ácidos nucleicos. As células podem apresentar, desta forma, diferentes respostas moduladas pela expressão de determinadas proteínas anti-apoptóticas e/ou pró-apoptóticas da família Bcl2. Os membros da família Bcl2, como Bcl2 e Bcl-XL inibem a apoptose, pois previnem a liberação de citocromo *c* e outras proteínas do espaço intermembranar mitocondrial, sendo então chamados de reguladores anti-apoptóticos. A expressão de Bcl2 é capaz de inibir a geração de espécies reativas de oxigênio (EROS) e a acidificação intracelular, bem como estabilizar o potencial de membrana das mitocôndrias. Assim, após um estímulo estressor, a Bcl2 pode inibir a permeabilidade da membrana das mitocôndrias (SUSNOW et al., 2009).

Outro componente desta família Bcl2 é a proteína integral de membrana, Bak, que promove a formação de canais na membrana mitocondrial e a liberação de fatores apoptóticos (WEI et al., 2001; LETAI et al., 2002; LEU et al., 2004). As respostas celulares a determinados estímulos/insultos, podem alterar a expressão de determinadas proteínas como as relacionadas à morte e/ou sobrevivência celulares (GRIVICICH et al., 2007).

Além de respostas celulares, a ação do glifosato também pode ser identificada através de análises bioquímicas para avaliação da formação de EROS (AHMAD et al., 2000; SEVGILER et al., 2004). A peroxidação lipídica (lipoperoxidação) induzida por herbicidas tem sido observada em espécies de peixes (SEVGILER et al., 2004). As EROS podem causar danos aos lipídios, proteínas, carboidratos e ácidos nucleicos (PARVEZ e RAISUDDIN, 2005). Assim, como demonstrado por GLUSCZAK et al. (2007) e MODESTO e MARTINEZ (2010) o glifosato pode provocar estresse oxidativo, sobretudo em células de cérebro, músculo e fígado de peixes. Nestes órgãos também foram observadas alterações nos níveis de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), após a exposição por 96 h nas concentrações de 0,2 ou 0,4 mg/L de glifosato (GLUSCZAK et al., 2007). Os níveis elevados de espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico induzidos por contaminantes aquáticos, tais como herbicidas também têm sido observados em estudos realizados por LI et al. (2003) e ÜNER et al. (2005).

Os organismos também apresentam mecanismos de defesa antioxidante que neutralizam o efeito causado pelas EROS, onde se destaca a ação da glutathiona reduzida (GSH), um potente antioxidante natural (VAN DER OOST et al., 2003).

Os antioxidantes não-enzimáticos de baixo peso molecular também podem responder à contaminação ambiental com variações na sua concentração, e serem utilizados como biomarcadores. De acordo com VAN DER OOST et al. (2003), os principais antioxidantes não-enzimáticos para os peixes são as vitaminas C e os grupamentos tióis não-proteicos (NPSH), sendo este último constituído por cerca de 90% de GSH (COOPER e KRISTAL, 1997). A concentração de GSH pode variar em peixes expostos a xenobióticos e o decréscimo da sua concentração pode corresponder a uma reação aguda, enquanto o aumento na sua concentração pode representar uma acomodação fisiológica ao aumento da atividade de destoxificação da contaminação ambiental (MARACINE e SEGNER, 1998).

A GSH pode ser considerada um dos agentes mais importantes na defesa das células contra o estresse oxidativo e possui papel central na biotransformação e eliminação de xenobióticos. Esta molécula apresenta papel redutor em muitas reações, tendo uma função importante na detoxificação do H_2O_2 , outros peróxidos e radicais livres (HUBER et al., 2008).

A enzima glutathiona-S-transferase (GST), por sua vez, pertence a uma família multifuncional de proteínas e também está envolvida no processo de biotransformação celular e correção dos efeitos deletérios de compostos xenobióticos como drogas, herbicidas, compostos químicos carcinogênicos e poluentes ambientais. Essa enzima catalisa a conjugação da GSH com compostos endógenos ou exógenos tornando-os menos tóxicos, mais solúveis em água e mais fáceis de serem excretados. É importante observar que a enzima GST faz parte de um sistema de defesa integrado, e que a eficiência deste sistema depende da ação combinada de outras enzimas do sistema antioxidante, no sentido de fornecer GSH, bem como de transportadores que facilitem a eliminação dos conjugados de GSH (CARLETTI et al., 2008; HUBER et al., 2008).

Os efeitos tóxicos do glifosato ou de herbicidas a base de glifosato parecem envolver a indução ao estresse oxidativo, assim como a modulação de vias de sinalização intracelulares. Neste contexto, GEHIN et al. (2006) mostraram que o glifosato foi capaz de induzir alterações significativas no perfil antioxidante celular levando a depleção da GSH, induzindo modificações na atividade de enzimas antioxidantes como a catalase, glutathiona peroxidase e a superóxido dismutase, assim como promovendo a peroxidação lipídica em linhagens de queratinócitos humanos. Além disso, alterações nas enzimas antioxidantes e em alguns indicadores de estresse oxidativo, como TBARS e carbonilação de

proteínas foram observadas em diferentes tecidos de peixes, após exposição a diferentes concentrações de *Roundup*® (MENEZES et al., 2011).

A contaminação aquática por glifosato nem sempre é reconhecida em estudos toxicológicos, pois esse composto permanece em baixas concentrações no meio ambiente por períodos curtos ou longos, sendo sua identificação dificultada pela fato de normalmente não ocorrer a morte dos organismos (FANTA et al., 2003).

Por outro lado, estudos realizados com peixes demonstraram que a contaminação por organofosforados interfere nos processos bioquímicos e fisiológicos das gônadas e no ciclo reprodutivo (WILLIAMS et al., 2000; CLAIR et al., 2012). Estas alterações podem ser reconhecidas nos ovários dos peixes através da análise estrutural, ultraestrutural e dos processos de proliferação, diferenciação e morte celular, bem como pela avaliação do estresse oxidativo. As gônadas, assim como outros órgãos podem ser alvo de toxicidade, quando da exposição dos organismos a poluentes aquáticos como os organofosforados (WILLEY E KRONE, 2001), comprometendo os órgãos reprodutivos e consequentemente interferindo na reprodução dos organismos expostos.

1.4 O ovário de peixe como alvo potencial de contaminação

Os ovários são órgãos pares, saculiformes e sustentados dorsalmente na cavidade celômica pelo mesovário, onde o direito e o esquerdo unem-se na extremidade caudal para formar o ducto ovariano, que se comunica com a papila urogenital. A forma, o volume, a coloração e a irrigação sanguínea dos ovários pode variar nas diferentes fases do ciclo reprodutivo (COSTA et al., 2004). No tecido de sustentação do ovário, destaca-se a presença de fibras musculares lisas, necessárias para a contração do órgão durante o processo de ovulação (YÖN et al., 2012).

Em *D. rerio* os ovários estão localizados bilateralmente entre a bexiga natatória, fígado e alças intestinais (Figura 3).

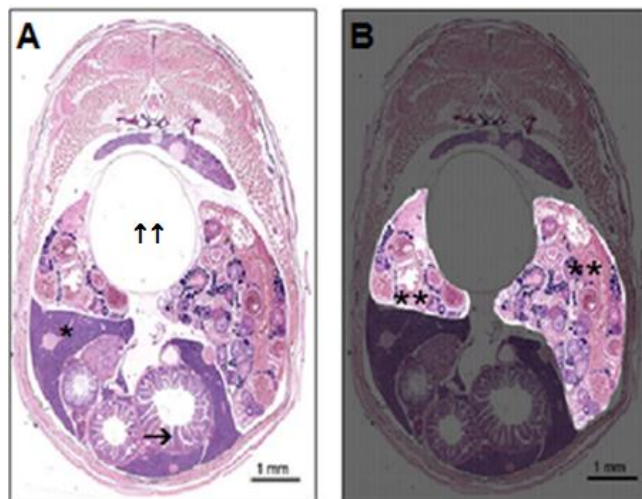


Figura 3: Secção transversal de fêmea adulta de *D. rerio*. Em (A), fígado (*), alça intestinal (→) e bexiga natatória (↑↑). Em (B), ovários direito e esquerdo (**). Coloração por HE. Adaptado de *Histology and histopathology atlas of the zebrafish* (VAN DER VEN E WESTER, 2012).

A ovogênese dos peixes teleósteos inicia com a diferenciação das células germinativas primordiais em ovogônias e prossegue com os eventos sequenciais de divisão e diferenciação dos ovócitos e da maturação dos folículos ovarianos, sendo que ao final do processo a célula germinativa madura é liberada do ovário (GRIER, 2002, ÇAKICI e ÜÇÜNCÜ, 2007).

As células germinativas presentes nos ovários são semelhantes nas várias espécies de peixes, e, diferentemente do que é observado em aves e mamíferos, as ovogônias são formadas durante toda a fase reprodutiva, pois os peixes tem uma produção contínua de gametas femininos (GRIER, 2002).

Em peixes são reconhecidas duas populações de ovogônias, a ovogônia tipo A que através de mitoses mantém a população de ovogônias no ovário e a ovogônia tipo B, que entra em meiose, dando origem aos ovócitos os quais permanecem interconectados por pontes citoplasmáticas (SCHULZ et al., 2010; QUAGIO-GRASSIOTTO et al., 2013). A meiose progride e estaciona em diplóteno tardio, quando as pontes citoplasmáticas são quebradas pelas células foliculares, sendo

retomada no final da maturação e se completando só com a fertilização (QUAGIO-GRASSIOTTO et al., 2013).

Os folículos ovarianos são constituídos pelos ovócitos e revestidos por duas camadas de células foliculares, a teca externa e a interna, que constituem o epitélio folicular, além de uma camada acelular, o envelope vitelínico, posicionado entre a membrana do ovócito e o epitélio folicular. Os folículos ovarianos desenvolvem-se de forma semelhante entre os teleósteos, havendo variações na composição, distribuição e grau de desenvolvimento das vesículas corticais nos ovócitos, no envelope vitelínico e nas células foliculares, dependendo das estratégias reprodutivas das espécies (BAZZOLI e GODINHO, 1994; RIZZO et al., 1998).

Durante o crescimento do folículo, ocorre a formação do envelope vitelínico pela deposição de matriz extracelular entre ovócito e células foliculares. Na maioria dos peixes, o envelope vitelínico é formado por duas camadas de glicoproteínas permeadas por canais (estriações). A camada interna consiste principalmente de proteínas, sendo considerada homóloga a zona pelúcida de mamíferos (SCAPIGLIATI et al., 1999) e a camada externa apresenta uma combinação de proteínas e polissacarídeos (GURAYA, 1986). As proteínas sintetizadas pelas células foliculares são utilizadas na formação da camada folicular e do envelope vitelínico (GURAYA, 1986).

Moléculas presentes na superfície de ovócitos têm papel determinante na fertilização e na interação do ovo com o meio. A presença de polissacarídeos ácidos no envelope vitelínico torna os ovos adesivos quando em contato com a água (GURAYA, 1986). No processo de fecundação, os espermatozoides ligam-se à parede do canal micropilar como primeiro nível de reconhecimento entre os gametas, ocorrendo a adesão e a fusão das membranas dos gametas na base do canal micropilar (YU et al., 2002). Neste reconhecimento, como em outras interações celulares, há mediação de carboidratos presentes em glicoproteínas do envelope vitelínico com receptores complementares presentes na superfície dos espermatozoides (MENGERINK e VACQUIER, 2001; YU et al., 2002).

De acordo com a descrição da maturação ovariana de *D. rerio* realizada por YÖN et al. (2008), as ovogônias foram caracterizadas como células pequenas, dispostas em conjuntos, com citoplasma reduzido, apresentando núcleo grande com nucléolo único, basófilo e central. O ovócito apresenta um tamanho maior, sendo o citoplasma mais volumoso, mas ainda reduzido em relação ao núcleo, que começa a apresentar fragmentação nucleolar, caracterizando a fase de ovócito pré-

vitelogênico. Nesta fase, o citoplasma é mais volumoso e menos basófilo. Os nucléolos estão dispostos na periferia do núcleo. A fase seguinte é caracterizada pela presença de dois tipos de inclusões citoplasmáticas no ovócito: as vesículas citoplasmáticas e os grânulos de vitelo. O envelope vitelínico apresenta um espessamento com estriações transversais. Na fase vitelogênica o ovócito apresenta um aumento de volume, o citoplasma apresenta-se repleto de grânulos de vitelo, o núcleo mostra o seu contorno irregular contendo diversos nucléolos basófilos na periferia (YÖN et al. 2008) (Figura 4).

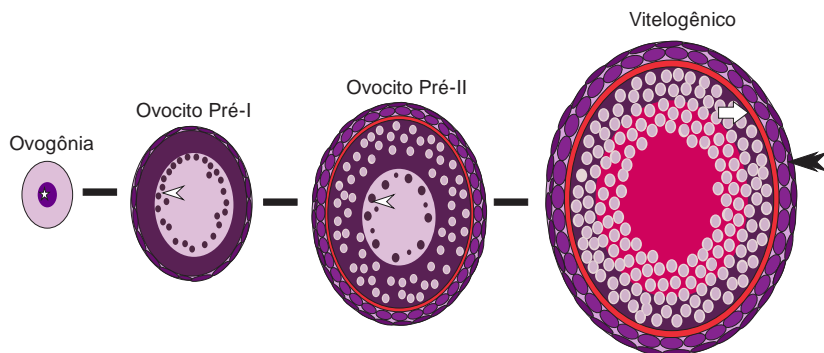


Figura 4: Representação dos tipos de folículos ovarianos de *D. rerio*. Núcleo (*); nucléolos (cabeça de seta); células foliculares (dupla cabeça de seta); envelope vitelínico (seta). Autora: Luciane Nezzi.

As etapas apresentadas acima caracterizam o processo de maturação dos folículos ovarianos, permitindo classificar o ovário como assincrônico, pois ele apresenta concomitantemente ovócitos em todas as fases de maturação, característico de espécies que desovam em diferentes períodos do ciclo reprodutivo.

Durante a maturação ovariana, observa-se que parâmetros biométricos, como massa do ovário apresentam alterações. O cálculo do índice gonadossomático (IGS), que relaciona estes dados, mostra-se como uma ferramenta indicada para este estudo, considerando que este índice é um parâmetro muito utilizado na determinação das etapas do ciclo reprodutivo, devido ao fato de que maturação das células germinativas ocorre concomitante com o aumento da massa das gônadas, considerado assim por DADZIE e WANGILA (1980) o IGS como um bom indicador de desenvolvimento gonadal em peixes.

Revisões de bibliografia mostram que poucos estudos foram desenvolvidos com o objetivo de avaliar os aspectos morfológicos, bioquímicos e fisiológicos do ovário de peixes expostos ao glifosato. Relatos dos efeitos do glifosato no fígado, brânquias, músculos, cérebro e sangue de peixes, mostram que o herbicida causa alterações morfológicas e nas defesas antioxidantes bem como estresse oxidativo (GLUSCZAK et al., 2007; LANGIANO e MARTINEZ, 2008; BORTAGARAY et al., 2010; MODESTO e MARTINEZ, 2010; GUILHERME et al., 2012; SHIOGIRI et al., 2012).

Em relação a ação do glifosato sob os parâmetros reprodutivos, destaca-se o estudo realizado por SOSO et al. (2007) que identificaram alterações nos níveis de hormônios reprodutivos e na viabilidade dos ovos de peixe, como o jundiá, quando expostos ao herbicida na concentração de 3,6 mg/L.

Os efeitos do glifosato, com ênfase nos mecanismos celulares ainda são pouco conhecidos e a ampla utilização deste herbicida na agricultura pode contaminar os mananciais e os reservatórios de água potável e em consequência atingir os organismos aquáticos. Os efeitos subletais do uso deste herbicida em larga escala no Brasil, com destaque na Região Sul necessitam ser urgentemente estudados e compreendidos para que possam subsidiar políticas públicas eficientes, no sentido de proteger os ecossistemas, bem como a população humana dos riscos eminentes advindos do uso abusivo do herbicida glifosato.

Neste contexto, este estudo visa contribuir para o melhor entendimento dos efeitos do glifosato sobre a reprodução dos peixes, bem como a compreensão do processo de toxicidade celular e bioquímico deste herbicida.

1 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Avaliar o efeito do glifosato na concentração de 65 µg/L, permitida para os rios do Brasil, sobre a organização estrutural e ultraestrutural, bem como sobre parâmetros bioquímicos de toxicidade nos ovários de peixe, utilizando *D. rerio* como modelo experimental.

2.2 Objetivos Específicos

- a. Analisar a morfologia e morfometria de ovários de *D. rerio* expostos ao glifosato;
- b. Caracterizar os tipos de células germinativas presentes nos ovários de *D. rerio*;
- c. Descrever o efeito do glifosato sobre a integridade de membranas e das organelas das células foliculares e dos ovócitos;
- d. Investigar a expressão de SF-1 nas células foliculares durante as fases de maturação;
- e. Avaliar a ocorrência de estresse oxidativo ou de alterações nas defesas antioxidante em ovários de *D. rerio* expostos ao glifosato.

2 METODOLOGIA

3.1 Animais

Para este estudo fêmeas adultas de *D. rerio* da linhagem *Wild-Type*, com comprimento médio de 3,3 cm ($\pm 0,09$) e massa de 0,37 g ($\pm 0,02$) foram adquiridas em estabelecimento comercial de animais aquáticos e transportados em embalagens apropriadas ao Laboratório de Reprodução e Desenvolvimento Animal/BEG/CCB/UFSC.

A aclimação das fêmeas foi realizada em aquário de 20 litros com água corrente dechlorada e estocados a densidade de 1 g de peixe /L, por um período de 7 dias, com aeração constante da água, temperatura de 27,5°C ($\pm 0,3$), pH 7,6 e ciclo claro e escuro (14h:10h), condições consideradas ideais para o bem estar e manutenção de *D. rerio* em aquário (LAWRENCE, 2007; HOWELLS e BETTS, 2009). Os parâmetros de qualidade da água, como pH e temperatura, foram monitorados semanalmente e os peixes foram alimentados diariamente com ração comercial para peixe (Tetramin®).

Todos os procedimentos com as fêmeas de *D. rerio* foram aprovados pelo Comitê de Ética para o Uso de Animais (CEUA-UFSC), projeto número 0746/CEUA/UFSC (ANEXO 1).

3.2 Experimento piloto

O experimento piloto teve como objetivo definir a concentração de glifosato que seria utilizada neste estudo, além de padronizar as técnicas de microscopia de luz e eletrônica para ovários de *D. rerio*. As concentrações utilizadas no experimento piloto foram de 32,5 µg/L e de 65 µg/L de glifosato, esta última estabelecida pelo Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA) Resolução nº 357, de 17 de março de 2005, que regulamenta a concentração máxima de glifosato para os rios do Brasil (BRASIL, 2005).

Utilizou-se o IGS como parâmetro de análise para determinação da concentração de glifosato que seria utilizada no estudo. Este índice foi utilizado inicialmente como critério de avaliação da toxicidade das concentrações de glifosato (Quadro 1). O IGS foi obtido através da relação entre a massa corporal (MC) e a massa da gônada (MG) de cada fêmea, utilizando-se a fórmula: $IGS = (MG/MC) \times 100$ (SOSO et al., 2007).

O IGS também foi utilizado como parâmetro para caracterizar as fases de maturação ovariana e inferir sobre os possíveis efeitos do glifosato nas fêmeas expostas.

Quadro 1: Índice Gonadossomático de fêmeas de *D. rerio*.

Classes de IGS			Fêmeas não expostas ao glifosato		Fêmeas expostas ao glifosato			
					32 µg/L		65 µg/L	
			Número	%	Número	%	Número	%
Classe I	2,4	F 15,4	32	71,1	40	88,8	31	68,9
Classe II	15,4	F 28,4	10	22,3	5	11,2	4	8,9
Classe III	28,4	F 41,4	0	0	0	0	3	6,7
Classe IV	41,4	F 54,4	2	4,4	0	0	0	0
Classe V	54,4	F 67,4	0	0	0	0	3	6,7
Classe VI	67,4	F 80,4	0	0	0	0	2	4,44
Classe VII	80,4	F 93,4	1	2,2	0	0	0	0
Classe VIII	93,4	F 106,4	0	0	0	0	2	4,44
Nº fêmeas			45		45		45	

No experimento piloto (Quadro 1) o IGS (%) referente a concentração de 32 µg/L de glifosato, para a maioria das classes (I, II, III, V, VI, VIII) foi semelhante ao percentual de IGS dos ovários não expostos ao glifosato, de maneira que optou-se por não investigar essa concentração. Além disso, reagrupou-se o número de classes de IGS, permitindo assim uma melhor identificação dos efeitos do glifosato.

3.3 Exposição ao glifosato

As fêmeas foram expostas ao glifosato diluído em água do aquário, nas mesmas condições de temperatura, pH, fotoperíodo e alimentação, como no período de aclimação.

Para contemplar os objetivos propostos, foram constituídos 2 grupos experimentais (Figura 5).

Grupo 1: fêmeas expostas a concentração de 65 µg/L de glifosato;

Grupo 2: fêmeas não expostas ao glifosato, as quais foram utilizadas como controle.

As fêmeas de *D. rerio* foram expostas (grupo 1) por 15 dias a uma concentração de 65 µg/L de glifosato [N-(fosfometil)glicina] (Monsanto do Brasil Ltda) diluído na água do aquário. As fêmeas não expostas (grupo 2) ao glifosato foram mantidas em aquários sem adição de glifosato.

Definiu-se um período de 15 dias de exposição das fêmeas de *D. rerio* ao glifosato, baseado nos valores estimados de meia-vida do herbicida na água, que corresponde a um período de 7 a 14 dias (GIESY et al., 2000). Este período de exposição também foi determinado considerando o protocolo da Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos da América (USEPA) que estabelece 14 dias para testes de substâncias com potencial de desregular o sistema endócrino (USEPA, 1998).

Nos estudos bioquímicos e de avaliação do estresse oxidativo, as fêmeas foram expostas ao herbicida glifosato por 48 h, 96 h, 144 h, 168 h e 360 h (Figura 6). Essa sistemática foi adotada baseada no estudo de GLUSCZAK et al. (2007) com a espécie de peixe *Rhamdia quelen*, onde se identificou que a exposição ao glifosato por 96 h alterou os parâmetros metabólicos. Desta forma optou-se por realizar uma análise com tempos diferentes de exposição ao glifosato para avaliar um possível estresse oxidativo agudo e/ou subcrônico nas fêmeas de *D. rerio*.

Após o período de exposição, a água dos aquários com o glifosato diluído, foi armazenada em recipiente plástico, apropriado para descarte, e encaminhada para o Sistema de Gestão de Resíduos Líquidos da Universidade Federal de Santa Catarina/UFSC.

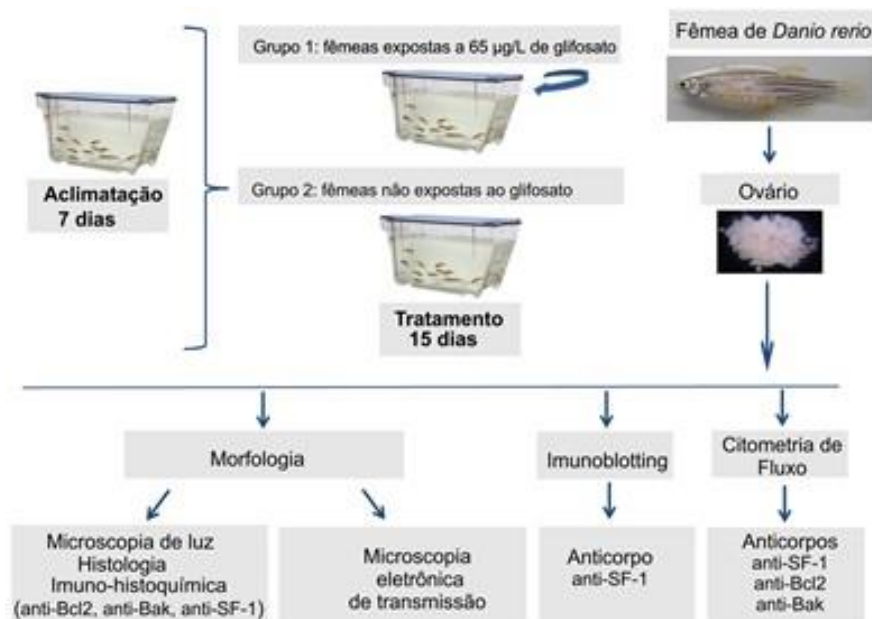


Figura 5: Organograma dos grupos experimentais e metodologias utilizadas no estudo.

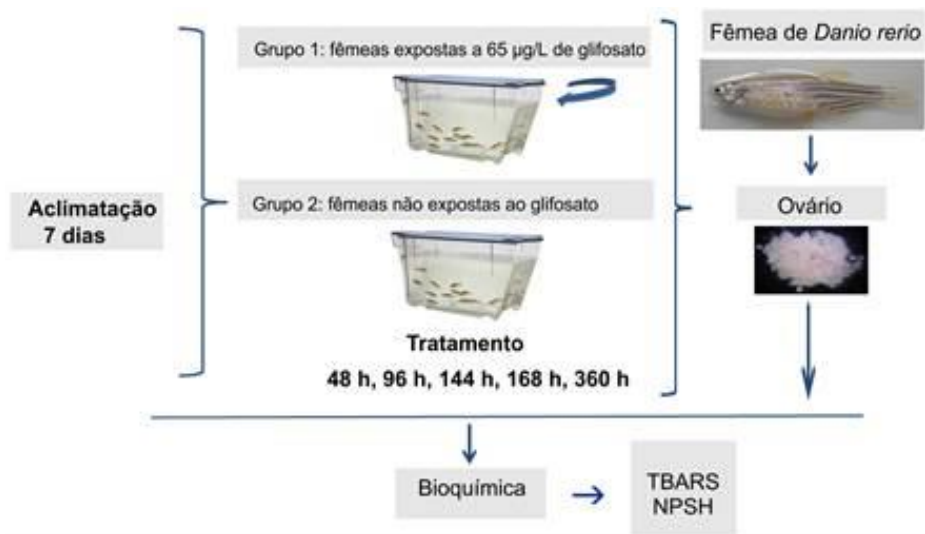


Figura 6: Organograma dos grupos experimentais para análises bioquímicas.

3.4 Biometria corporal e ovariana

Os peixes foram submetidos à eutanásia por imersão em água gelada (4° C) (WILSON et al., 2009) por aproximadamente 5 min e posteriormente foi realizada a dissecação. Para obtenção dos dados biométricos, foram obtidas as medidas de massa corporal (g) e comprimento das fêmeas (cm). Os ovários foram então dissecados e pesados (mg) e o IGS foi calculado (Figura 7).

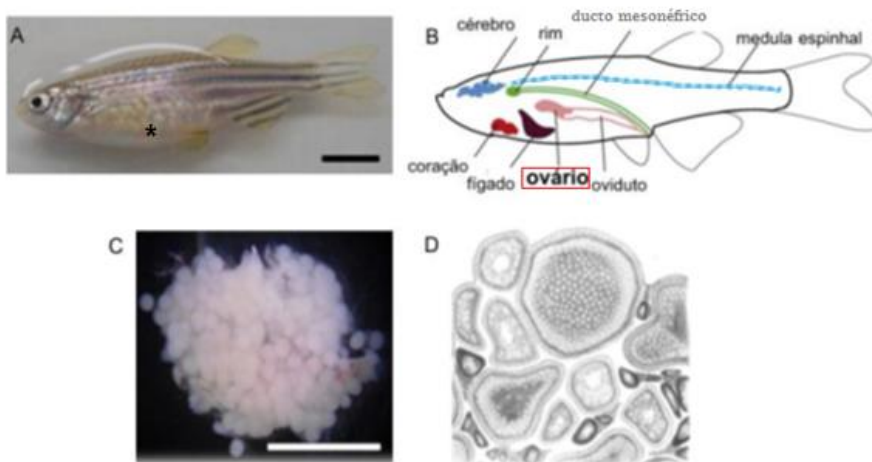


Figura 7: Fêmea de *D. rerio* e representação de ovários. (A) Exemplar de fêmea adulta de *D. rerio*, destacando o volume na região ventral; (B) Representação dos órgãos destacando a localização do ovário; (C) Vista total de ovário dissecado antes da fixação; (D) Esquema de secção de ovário. Barra de escala em A = 0,5 cm; C = 2 cm; volume na região ventral (*). Fonte: Acervo do laboratório de Reprodução e Desenvolvimento Animal BEG/UFSC.

3.5 Microscopia de luz

Para a análise em microscopia de luz os ovários foram fixados em solução de *Bouin* alcoólica por 24 h e conservadas em álcool 70%. Os ovários foram desidratados em série alcoólica crescente 70% - 100% e diafanizados em xilol, incluídos em parafina e seccionados a 7 μ m. As secções foram desparafinizadas em xilol e hidratadas em série alcoólica decrescente 100% - 70%, para posterior realização das colorações com hematoxilina-eosina (HE) e tricrômico de Mallory, bem como as marcações por imuno-histoquímica.

3.5.1 Morfologia e morfometria dos ovários

a. Coloração HE: utilizada como controle histológico e para análise da morfologia dos ovários. Após desparafinização e reidratação, as secções foram lavadas em água destilada e coradas com Hematoxilina de Harris, lavadas com água destilada e coradas com eosina aquosa. Na sequência as secções foram lavadas em água destilada, desidratadas em série alcoólica 70° – 100° e diafanizados em xilol, para posterior montagem das lâminas com Entellan® (Merck, Millipore);

b. Coloração tricrômico de Mallory: utilizada para a identificação de componentes dos folículos ovarianos. Após desparafinização e hidratação, as secções foram lavadas em água destilada e coradas em fucsina ácida 0,5%. Em seguida as secções foram coradas com solução de Mallory e desidratadas em álcool 90° e 100°. Após a desidratação as secções foram diafanizadas em xilol para posterior montagem das lâminas com Entellan® (Merck, Millipore).

As secções coradas com HE e Tricrômico de Mallory foram analisadas ao microscópio de luz (100 X e 1000 X). Para análises morfométricas, o diâmetro das células germinativas (μm) foi obtido usando uma ocular micrométrica acoplada ao microscópio de luz (Olympus). Para quantificar as células germinativas foi realizada análise estereológica das secções utilizando a grátula de Weibel N° 2 (Tonbridge, England) (WEIBEL et al.,1966). O número de células germinativas por área (NA) foi determinada de acordo com MANDARIM-DE-LACERDA (2003).

As características morfológicas, como o tamanho da célula, a presença e localização de grânulos de vitelo, a presença de nucléolos e o envelope vitelínico visível foram utilizadas para a caracterização das células germinativas: ovogônia, ovócito pré-vitelogênico I, ovócito pré-vitelogênico II e ovócito vitelogênico (ARMILIATO et al., 2014).

3.6 Marcações celulares por imuno-histoquímica

Para marcação da técnica de imuno-histoquímica as secções foram desparafinizadas, hidratadas e lavadas em tampão fosfato salino (PBS, do inglês, *phosphate buffered saline*) 0,1 M, pH 7,4, sendo a atividade das peroxidases endógenas bloqueadas pelo peróxido de hidrogênio em metanol (1:2). Em seguida, as secções foram permeabilizadas em PBS + Triton X-100 a 0,3% e incubados com albumina sérica bovina a 5% (BSA, do inglês *bovine serum albumin*) para inativar sítios inespecíficos, por 1 h, para posterior incubação com anticorpo primário a 4° C por 12 h. Para as marcações celulares foi

utilizado o anticorpo primário (Quadro 2) e anticorpos secundários (Quadro 3).

Quadro 2: Detalhamento dos anticorpos primários utilizados nas técnicas de imuno-histoquímica, *Western blotting* e citometria de fluxo.

Anticorpo	Espécies		Isotipo	Diluição		
	Desenvolvida	Origem		Imuno	W. B.	Citometria
Anti-Bcl2 Chemicon®	Camundongo	Humana	IgG 1	1:100*	-	1:1000
Anti-Bak Santa Cruz®	Coelho	Humana	IgG	1:100*	-	1:1000
Anti-SF-1 Gene Tex International Corporation®	Coelho	Humana	IgG	1:30	1:3000	1:1000

Obs: *As análises realizadas com os anticorpos anti-Bcl2 e anti-Bak não foram conclusivas e não serão apresentadas neste trabalho.

Quadro 3: Detalhamento dos anticorpos secundários utilizados nas técnicas de imuno-histoquímica, *Western-blotting* e citometria de fluxo.

ANTICORPO	ESPÉCIES DE ORIGEM	ISOTIPO
Anti-camundongo	Cabra	IgG1
Anti-coelho	Cabra	IgG
Anti-camundongo Alexa-fluor 488	Cabra	IgG1
Anti-coelho Alexa- fluor 568	Cabra	IgG

Na sequência, as secções foram lavadas em PBS e incubadas a temperatura ambiente por 90 min com anticorpos secundários compatíveis com o anticorpo primário utilizado. A revelação da reação foi realizada com solução contendo 3-3, diaminobenzidina (DAB) e peróxido de hidrogênio, e as lâminas foram montadas com Entellan® (Merck). Os controles negativos foram tratados da mesma maneira descrita acima, exceto pela incubação com os anticorpos primários, que foram substituídos por PBS.

3.7 Microscopia eletrônica de transmissão

Para avaliação ultraestrutural, os ovários foram fixados em glutaraldeído a 2,5% e paraformaldeído a 4% por aproximadamente 1h em temperatura ambiente, seguida da pós-fixação com solução de tetróxido de ósmio a 1% em tampão cacodilato de sódio a 0,1 M e pH 7,4. Na sequência, a desidratação foi realizada em série crescente de etanol e a infiltração feita em resina Spurr. Após a polimerização da resina, os blocos confeccionados foram cortados em ultramicrótomo para a obtenção de cortes semifinos (500 nm - 1µm) e ultrafinos (60 -70 nm). As secções semifinas foram coradas com solução de azul de toluidina 1% e observados ao microscópio de luz para controle da orientação e observação da qualidade do material para posterior realização das secções ultrafinas. As secções ultrafinas foram coletadas em grades *mesh* (300), contrastadas com citrato de chumbo e acetato de uranila e observados ao microscópio eletrônico de transmissão Jeol JEM 1011 (Laboratório Central de Microscopia Eletrônica/UFSC).

3.8 Citometria de fluxo

Para as análises em citômetro de fluxo, os ovários foram fragmentados e submetidos a três lavagens de PBS. Na sequência, as células foram tripsinizadas durante 30 min a 37° C para a sua dissociação. Foram adicionados 100 µL de BSA às amostras, as quais permaneceram em agitação por 30 min a 37° C. Posteriormente, as amostras foram centrifugadas a 1000 g por 5 min, coletada a fração intermediária, a qual foi ressuspensa em PBS/BSA. As amostras foram incubadas com os anticorpos primários (Quadro 2) durante 1 h, seguidas da incubação com anticorpos secundários (Quadro 3) por um período de 40 min. As leituras foram realizadas no Citômetro de Fluxo FACSCanto II (Laboratório Multiusuário/LAMEB I/UFSC) e as análises dos dados no programa Flowing Software 2.5, com aquisição de 10.000 eventos, utilizando-se uma janela de análise (*gate*) a partir dos parâmetros tamanho, *FSC-A* do inglês - *Forward Scatter* e complexidade, *SSC* do inglês *Side Scatter*. A partir do *gate* das células em estudo, obteve-se histogramas de intensidade de fluorescência. Os resultados foram gerados na forma de percentagem de células positivas, e de forma quantitativa determinados pela intensidade de fluorescência.

3.9 Eletroforese e *Western blotting*

Os ovários foram homogeneizados a 4° C em tampão (Tris HCl 1 mM com Triton X-100 a 1%, NaCl a 2,5 M, ácido etileno diaminotetracético 0,25 M pH 8,0, glicerol, ortovanadato de sódio (Na₃VO₄) 0,1 M, ditioneitol, β glicerolfosfato 1 M) e inibidores de protease (pepstanina, leupeptina, aprotinina). Os homogenatos foram centrifugados durante 20 min a 13.000 g a 4° C. A camada de gordura sobrenadante e o precipitado foram descartados, sendo a fração intermediária separada e armazenada a -20° C. A dosagem das proteínas totais de cada amostra foi estimada pelo método de LOWRY et al. (1951).

Para o ensaio de eletroforese em gel de poli(acrilamida), as amostras foram homogeneizadas e aquecidas a 100° C durante 10 min. As proteínas foram separadas utilizando gel de acrilamida (entrada de 4% e separação a 12%) aplicando uma voltagem de 120 V durante 1,5 h em tampão Tris-glicina (TBS) com dodecil sulfato de sódio (SDS) 0,1% pH 8,3. As proteínas (50 µg/poço) foram separadas por eletroforese em gel de poli(acrilamida) contendo dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE). Os pesos moleculares foram determinados através de padrões de peso molecular médio de proteína de 225-12 kDa (Bio-Rad).

Para o ensaio de *Western blotting*, as proteínas foram transferidas para membranas de nitrocelulose e para o bloqueio de sítios de ligação inespecífica do anticorpo, as membranas foram incubadas em solução TBS 20 mM com 0,05% de Tween 20 contendo leite desnatado durante 1 h a 4° C. Posteriormente as membranas foram lavadas em tampão TBS e incubadas com anticorpo primário anti-SF-1 a 4° C por 12 h sob agitação (Quadro 2). Após incubação, as membranas foram lavadas em TBS e incubadas com anticorpo secundário anti-coelho à temperatura ambiente durante 1 h sob agitação (Quadro 3). As membranas foram reveladas utilizando sistema da Perkin-Elmer ECL. A intensidade das bandas foi quantificada utilizando software QuantityOne (Bio-Rad) e os resultados foram expressos como a razão entre as intensidades de SF-1 e banda de β-actina.

3.10 Níveis de tióis não proteicos (NPSH) e das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS)

Para verificar se a exposição ao glifosato induz estresse oxidativo e/ou altera as defesas antioxidantes nos ovários, as seguintes análises

bioquímicas foram realizadas: determinação dos níveis de proteínas, determinação dos níveis de NPSH e TBARS.

3.10.1 Determinação de NPSH

Os grupamentos tióis não-proteicos (NPSH) os quais são constituídos principalmente por glutatona (cerca de 90%) (COOPER E KRISTAL, 1997) foram determinados a partir da fração obtida após tratamento com ácido tricloroacético, conforme descrito por ELLMAN (1959). Para a realização do ensaio, 40 µL de homogenato (diluído 1:10 em tampão HEPES 20 mM) de ovário foram precipitadas com 40 µL de ácido tricloroacético 10%, seguidas de centrifugação a 5.000 g por 10 min. Após a centrifugação, 50 µL da amostra foi adicionado a 125 µL de tampão fosfato (1 M, pH 7,4) e 25 µL de 5,5'-ditiobis 2-nitrobenzoato (DTNB) a 10mM. A mudança de cor é resultado da reação entre o DTNB e os tióis, a qual ocorre em cerca de 5 min e é estável por mais de 30 min. O monitoramento da concentração dos grupos tióis foi avaliado através da medida da absorbância a 412 nm em um espectrofotômetro (Multileitora Infinite M200 TECAN). Os resultados foram expressos em nmol de NPSH/mg de proteína.

3.10.2 Determinação das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS)

A avaliação da peroxidação lipídica foi realizada a partir da reação de substância reativas com o ácido tiobarbitúrico (TBA). O nível de TBARS foi determinado pelo método de OHKAWA et al. (1979), no qual o malondialdeído (MDA), um produto final da peroxidação lipídica, reage com o TBA para formar um complexo colorido.

Para a detecção do dano causado pela lipoperoxidação, 75 µL do homogenato (diluído 1:10 em tampão HEPES 20 mM) foram adicionados (10 µL de SDS 8,1%, 100 µL de ácido acético pH 3,5 e a 100 µL da solução TBA 0,67 %) e incubadas a 100° C durante 60 min. Após incubação as amostras foram centrifugadas a 15.000 g por 5 min, o sobrenadante foi transferido para uma placa de 96 poços e a leitura foi determinada a 540 nm. Os resultados foram expressos como nmol MDA/mg proteína.

3 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Os resultados quantitativos obtidos a partir das análises estereológicas foram apresentados em média e erro padrão. Diferenças significativas entre os grupos foram avaliadas através da análise de variância *ANOVA* de uma-via, seguida do teste *post hoc* de *Tukey* ($p < 0,05$). As análises foram realizadas no programa estatístico Statistica® versão 6.0 para Windows. Os resultados foram obtidos a partir de três experimentos independentes.

O programa SPSS para estatística descritiva e o Teste *t-Student* foram utilizados para as análises da expressão de SF-1, IGS, NPSH e TBARS.

4 RESULTADOS

Para o estudos dos efeitos do glifosato foram avaliadas fêmeas com massa corporal média de 0,43 g (\pm 0,02) e 0,37 g (\pm 0,02) para os grupos controle e tratado, respectivamente. Quando comparado à massa das gônadas (g), as fêmeas expostas ao glifosato apresentaram valores de 0,095 g (\pm 0,024 g), maior do que as fêmeas não expostas ao herbicida 0,035 g (\pm 0,006).

5.1 Índice Gonadossomático como parâmetro na avaliação de toxicidade

Através do cálculo do IGS, utilizado para caracterização das fases de maturação dos ovários, observou-se que a concentração de 65 μ g/L de glifosato induziu a um aumento significativo deste índice, em comparação aos ovários das fêmeas não expostas, correspondendo respectivamente aos valores de 9,4 (\pm 1,3) e de 20,9 (\pm 3,7) (Figura 8).

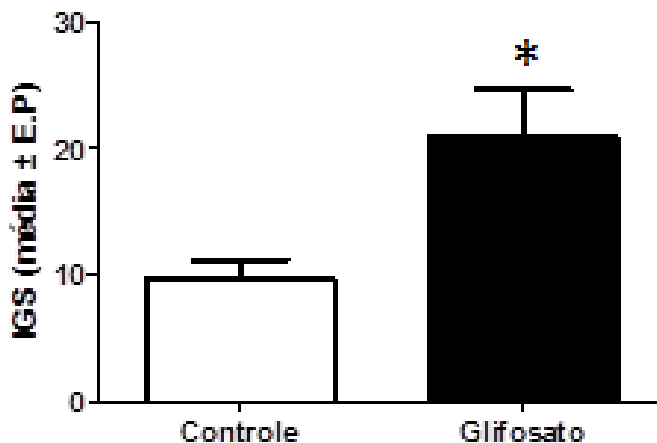


Figura 8: IGS dos ovários de *D. rerio*. Os dados representam a média \pm erro padrão). (*) indica diferença significativa entre os dois grupos (*ANOVA* seguido de teste *post hoc* de Tukey, $p < 0,05$); $n = 20$ ovários em 3 experimentos independentes.

A distribuição de IGS em classes (Quadro 4) mostra que a Classe I foi a mais representativa nos dois grupos, com 42 fêmeas (95,45 %) e

34 fêmeas (77,27 %) para os grupos controle e tratado com glifosato, respectivamente. Nas fêmeas expostas ao herbicida foi observado a presença de classes de maior IGS, na Classe II, correspondendo a 9,09 %, na Classe III o percentual foi de 4,54 % na Classe IV foi de 2,2 % e na Classe V foi de 6,8 %.

Considerando as fêmeas não expostas ao glifosato, observou-se que a Classe I correspondeu a 95,45 % e apenas 2 % corresponderam a Classe II e III, sendo que não foi observado nenhuma fêmea nas classes IV e V.

A análise estatística corrobora com os resultados obtidos em relação ao IGS, onde observou-se diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) entre os grupos de fêmeas não expostas e expostas ao glifosato (Figura 8).

Quadro 4: Distribuição das fêmeas de *D. rerio* em classes, de acordo com o IGS.

Classes de IGS			Número de fêmeas e média do IGS			
			Não expostas ao glifosato		Expostas ao glifosato	
			Número	Média do IGS	Número	Média do IGS
Classe I	0,5	F 20,5	42 95,45%	7,93	34 77,27%	8,79
Classe II	20,5	F 40,5	1 2,27%	27,77	4 9,09%	30,9
Classe III	40,5	F 60,5	1 2,27%	52,73	2 4,54%	56,9
Classe IV	60,5	F 80,5	0	0	1 2,27%	71,9
Classe V	80,5	F 100,5	0	0	3 6,81%	90,0
Nº fêmeas			44		44	

5.2 Efeito do glifosato na morfometria, estrutura e ultraestrutura dos ovários

O desenvolvimento dos folículos ovarianos pode ser caracterizado pela citodiferenciação das ovogônias tipo B em ovócitos e

pela produção de inclusões citoplasmáticas. Durante o processo de maturação do folículo ovariano, podem-se observar mudanças na sua morfologia, que caracteriza fases distintas no seu desenvolvimento. Neste estudo, após análise e avaliação estrutural foi realizada a descrição das células germinativas das fêmeas da espécie *D. rerio* em quatro fases: ovogônias, pré-vitelogênico I, pré-vitelogênico II e vitelogênico (Figura 9; Quadro 5).

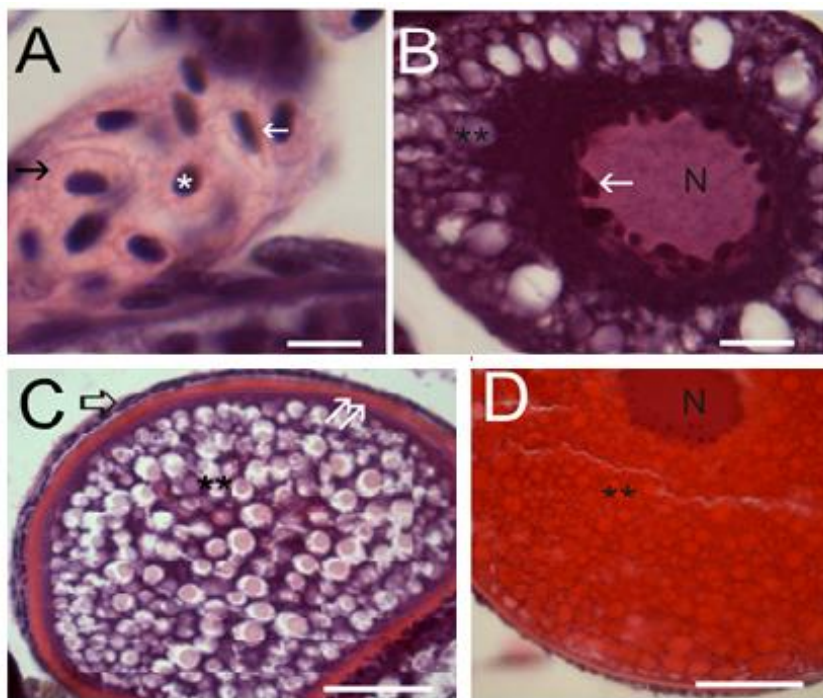


Figura 9: Células germinativas de ovário de *D. rerio*. (A) Conjunto de ovogônias; (B) Ovócito pré-vitelogênico I; (C) Ovócito pré-vitelogênico II; (D) Ovócito vitelogênico. Barra de escalas em A e B = 20 μ m; em C e D = 50 μ m. Em A, ovogônia tipo A (seta branca), ovogônia tipo B (seta preta); núcleo da ovogônia (asterisco branco); em B, grânulo de vitelo (dois asteriscos), núcleo (N), nucléolo (seta branca); em C, células foliculares (seta vazada), envelope vitelínico (seta dupla), grânulos de vitelo (dois asteriscos); em D, núcleo (N), grânulos de vitelo (dois asteriscos).

Quadro 5: Descrição das células germinativas em ovários de *D. rerio*.

Célula germinativa	Características
Ovogônia	Células pequenas, apresentando citoplasma reduzido e núcleo central, organizadas em conjuntos envolvidos por células foliculares achatadas, sendo possível distinguir dois tipos: ovogônia tipo A e ovogônia tipo B
Ovócito pré-vitelogênico I	Ovócitos com nucléolos evidentes e periféricos; vesículas citoplasmáticas na periferia; início da formação do envelope vitelínico; células foliculares envolvendo o ovócito.
Ovócito pré-vitelogênico II	Ovócitos apresentando dois tipos de inclusões citoplasmáticas: as vesículas citoplasmáticas e os grânulos de vitelo; envelope vitelínico mais espesso, com estriações transversais; reconhecimento de duas camadas de células foliculares.
Ovócito vitelogênico	Aumento do volume do ovócito, sendo que o núcleo apresenta o seu contorno irregular e muitas vezes pouco visível. As vesículas citoplasmáticas fundem-se apresentando uma aparência homogênea e o citoplasma encontra-se repleto de grânulos de vitelo. O envelope vitelínico espesso permanece inalterado; as camadas de células foliculares apresentam o núcleo evidente e alongado.

Nos ovários expostos a concentração de 65 µg/L de glifosato não foram observadas alterações no diâmetro das ovogônias e ovócitos pré-vitelogênicos II, quando comparados com os ovários não expostos. No entanto, esta mesma concentração induziu a um aumento significativo no diâmetro dos ovócitos pré-vitelogênicos I ($0,245 \mu\text{m} \pm 0,014$), em comparação com os ovários das fêmeas não expostas ($0,20 \mu\text{m} \pm 0,009$, $p < 0,001$). Um aumento mais evidente no diâmetro das células germinativas induzido pelo glifosato foi observado nos ovócitos vitelogênicos ($0,347 \mu\text{m} \pm 0,001$), em contraste com as fêmeas não

expostas ($0,254 \mu\text{m} \pm 0,001$, $p < 0,0001$) (Figura 10 A). Já com relação ao número de células germinativas por área (NA), não houve diferenças entre os ovários das fêmeas não expostas e expostas ao glifosato (Figura 10 B).

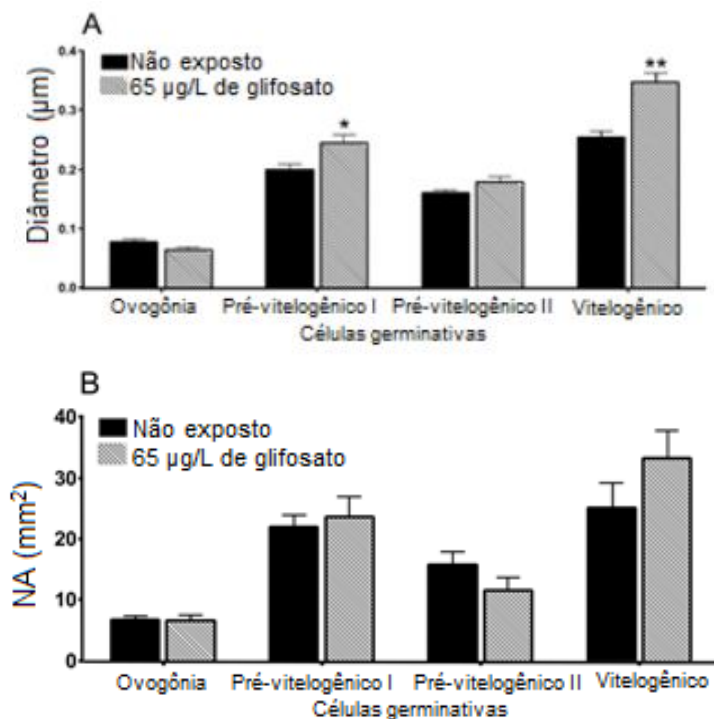


Figura 10: Diâmetro das células germinativas (A) e número de células germinativas por área (NA) em ovários de *D. rerio* (B). Os dados foram expressos em média \pm erro padrão. (ANOVA seguido de teste post hoc de Tukey), (*) representa diferença significativa ($p < 0,01$) e (**) ($p < 0,001$) quando comparados os efeitos nos dois grupos; $n = 6$ ovários, em três experimentos independentes.

A presença de folículos com ovócitos em diferentes fases de maturação, indicam que o processo de maturação é assíncrono em *D. rerio* (Figura 11). Os ovócitos apresentam-se envolvidos por uma cápsula delgada de tecido conjuntivo frouxo emitindo projeções para o interior do ovário, formando lamelas que auxiliam na sustentação das células germinativas. As células foliculares estão bem evidentes revestindo os ovócitos, visualizando-se os folículos ovarianos.

Nos ovários de *D. rerio* de ambos os grupos, fêmea não exposta (Figura 11 A) e exposta ao glifosato (Figura 11 B) não foram identificadas alterações morfológicas.

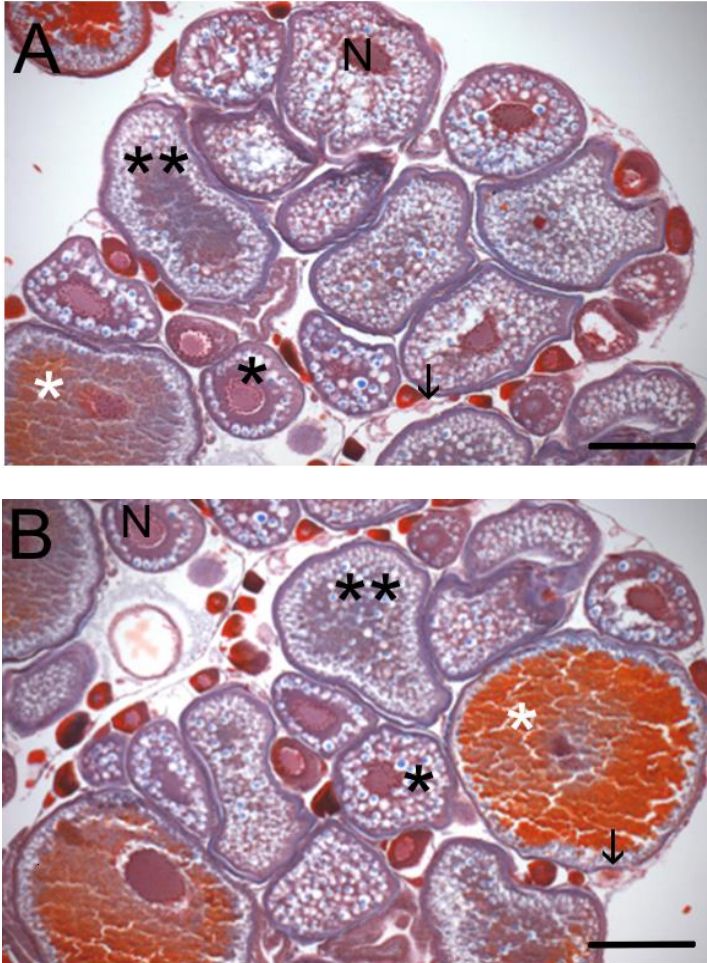


Figura 11: Visão panorâmica de secção de ovário de *D. rerio*. Coloração: tricômico de Mallory. (A) Fêmea não exposta e (B) fêmea exposta a 65 µg/L de glifosato. Conjunto de ovogônias (seta preta); ovócito pré-vitelogênico I (asterisco preto); ovócito pré-vitelogênico II (duplo asterisco preto); ovócito vitelogênico (asterisco branco). Escalas em A e B = 200 µm; $n = 6$ ovários por grupo, em três experimentos independentes.

As ovogônias foram identificadas como as menores células da linhagem germinativa, apresentando citoplasma reduzido, núcleo grande e esférico. As ovogônias encontram-se organizadas em conjuntos localizados próximos aos ovócitos pré-vitelogênicos I. Foram reconhecidas dois tipos de ovogônias, as ovogônias tipo A que apresentam pouco citoplasma e núcleo com contorno irregular e as ovogônias tipo B que apresentam o núcleo volumoso com contorno regular e esférico (Figuras 9 A).

Os ovócitos pré-vitelogênicos I apresentam características como o citoplasma homogêneo e núcleo grande com múltiplos nucléolos dispostos na sua periferia (Figura 12).

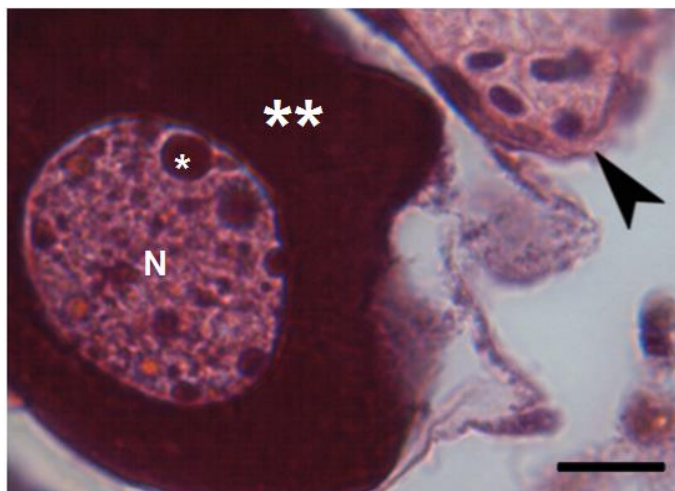


Figura 12: Secção de ovário de *D. rerio*, destacando um conjunto de ovogônias e um ovócito pré-vitelogênico I. Coloração: HE. Conjunto de ovogônias (cabeça de seta), ovócito pré-vitelogênico I (dois asteriscos), núcleo (N), nucléolo (asterisco). Escala = 20 μ m; n = 6 ovários, em três experimentos independentes.

Os ovócitos pré-vitelogênicos II foram reconhecidos pelo acúmulo de grânulos de vitelo no seu citoplasma, o que acarretou um aumento do diâmetro destas células. Os ovócitos apresentam-se envoltos pelo envelope vitelínico acelular e pelo epitélio folicular, sendo este constituído por duas camadas, a interna formada por células cúbicas e a externa formada por células pavimentosas (Figura 13).



Figura 13: Secção de ovário de *D. rerio*. Ovócito pré-vitelogênico II. Coloração: HE. Grânulos de vitelo (seta). Escala = 50 μm ; $n = 6$ ovários, em três experimentos independentes.

Os ovócitos vitelogênicos foram caracterizados pelo aumento do diâmetro devido ao acúmulo expressivo de vitelo no seu citoplasma. A deposição de vitelo ocorreu na forma de grânulos, formados pela fusão das vesículas menores, que apareceram inicialmente no citoplasma periférico e que gradualmente preencheram todo o citoplasma do ovócito vitelogênico (Figura14).

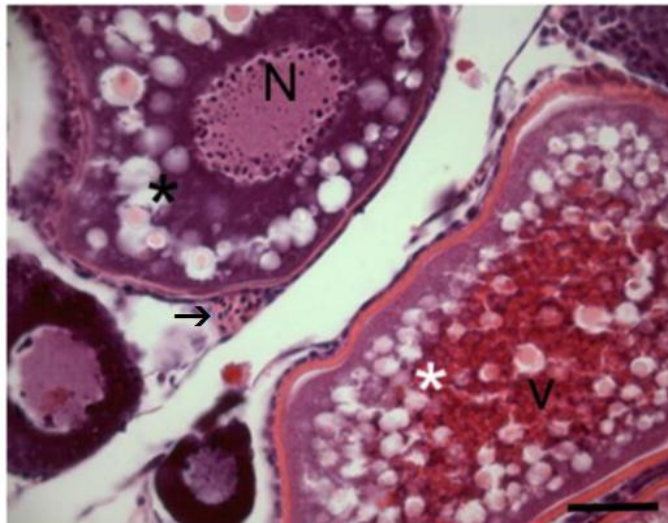


Figura 14: Secção de ovário de *D. rerio*. Coloração: HE. Ovócito pré-vitelogênico II (asterisco preto); ovócito vitelogênico (asterisco branco); conjunto de ovogônias (seta preta); grânulos de vitelo (v); núcleo (N). Escala = 50 μ m; $n = 6$ ovários, em três experimentos independentes.

Nos ovócitos vitelogênicos foram identificadas as células foliculares facilmente reconhecida a sua organização em duas camadas. A camada interna de células foliculares constitui a teca interna e a camada externa de células foliculares constitui a teca externa. Nos ovócitos vitelogênicos o envelope vitelínico acelular apresentou-se mais espesso o que o torna mais evidente (Figura 15).

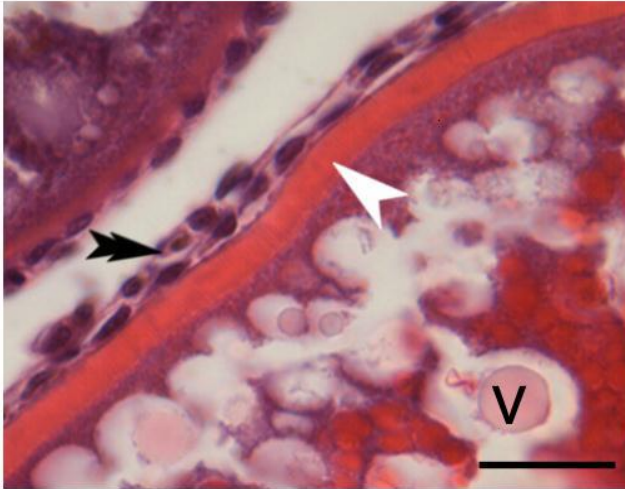


Figura 15: Secção de ovário de *D. rerio*. Coloração: HE. Células foliculares e envelope vitelínico. Células foliculares (dupla cabeça de seta preta); envelope vitelínico (cabeça de seta branca); grânulos de vitelo (v). Escala = 20 μ m; $n = 6$ ovários, em três experimentos independentes

Na análise ultraestrutural dos ovários de *D. rerio*, observou-se duas camadas de células foliculares separadas do ovócito pelo envelope vitelínico (Figura 16 A e B). Nos folículos com ovócitos pré-vitelogênicos e vitelogênicos o epitélio folicular, assim como o envelope vitelínico evidenciaram-se mais espessos.

As células foliculares foram reconhecidas como células alongadas, núcleo evidente com cromatina distribuída de forma irregular, organizadas em camadas, sendo que próximo a estas células observou-se o envelope vitelínico com a presença de estriações. Estas estriações são longas e se projetam para dentro do espaço que se forma entre o ovócito e as células foliculares (Figura 16 C e D).

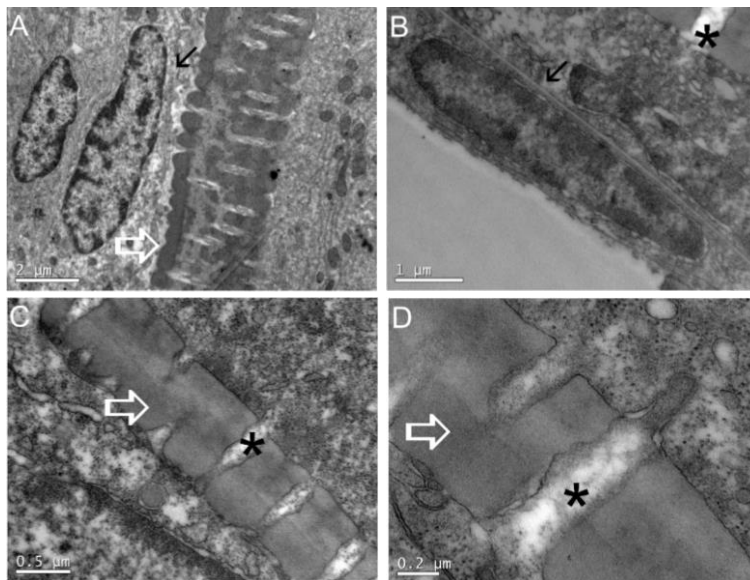


Figura 16: Secção de ovário de *D. rerio*. Célula folicular e envelope vitelínico da região periférica do folículo ovariano. Células foliculares (seta preta); envelope vitelínico (seta branca); estriações no envelope vitelínico (asterisco). Escala em: A = 2 μm ; B = 1,0 μm ; C = 0,5 μm ; D = 0,2 μm ; 6 ovários por grupo, em três experimentos independentes.

Com a maturação dos folículos o vitelo em forma de grânulos vai sendo incorporado no citoplasma do ovócito e o acúmulo dos grânulos no citoplasma dos ovócitos contribuem para o aumento significativo do tamanho destas células.

Na análise ultraestrutural dos folículos ovarianos de *D. rerio*, os grânulos de vitelo apresentaram um formato arredondado e uma região interna mais elétron densa, indicando a deposição de vitelo. Grânulos de tamanhos, formas e material elétron denso diferentes foram observados.

Em ovócitos de fêmeas não expostas, os grânulos de vitelo apresentaram uma região escura (deposição de vitelo) e uma região clara, onde ainda existe espaço para armazenamento de vitelo. Os grânulos estão dispersos no citoplasma do ovócito desde a região periférica (grânulos corticais) próxima ao envelope vitelínico, até a região central da célula (Figura 17 A e B).

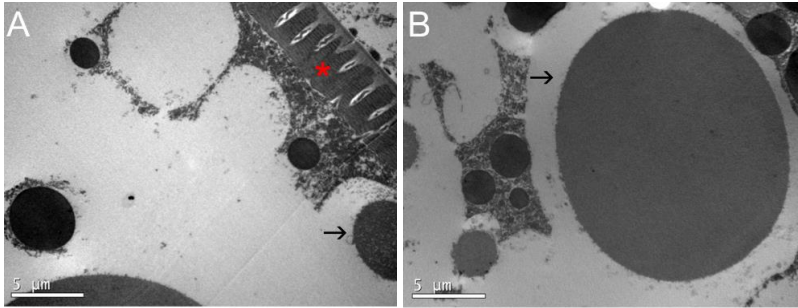


Figura 17: Secções de ovário de *D. rerio*. Folículo ovariano com grânulos de vitelo de fêmea não exposta ao glifosato (A e B). Em A, envelope vitelínico (*); grânulo de vitelo (seta preta). Escalas em: A e B = 5 µm; n = 6 ovários por grupo, em três experimentos independentes.

As fêmeas expostas ao glifosato apresentaram alteração ultraestrutural em comparação às fêmeas não expostas, relacionadas a formação de membranas concêntricas, do tipo *myelin-like*, nas regiões corticais dos ovócitos e associadas aos grânulos de vitelo (Figura 18 B e 19 A). Além disso, esse tipo de membrana concêntrica também foi observado associado com a membrana externa das mitocôndrias (Figura 19 B).

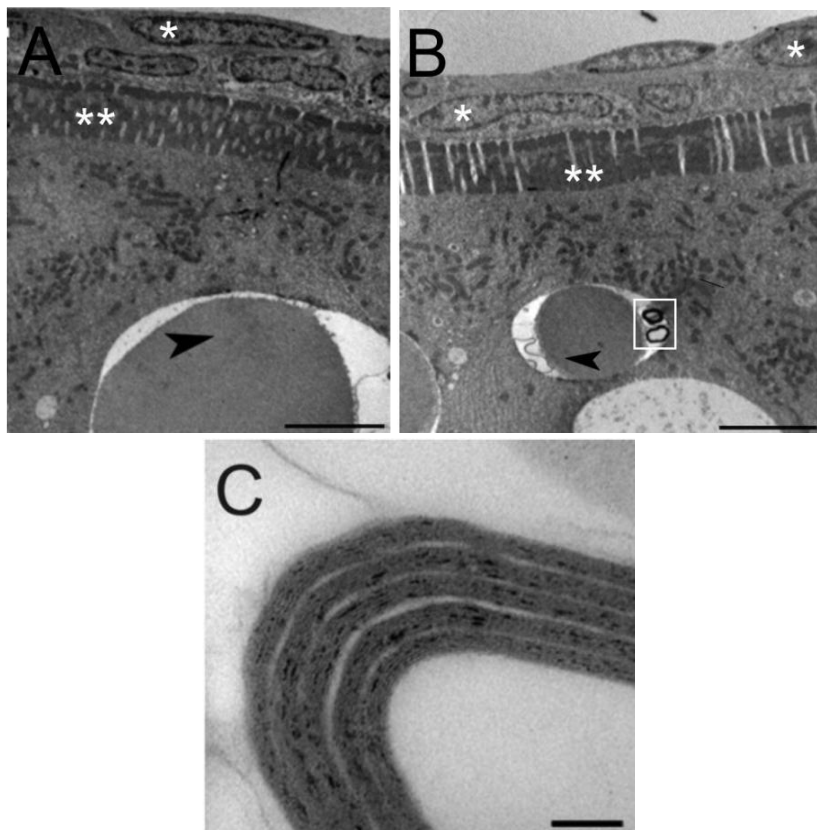


Figura 18: Secções de ovário de *D. rerio*. (A) fêmea não exposta; (B e C) fêmea exposta ao glifosato (A e B) visão geral do citoplasma cortical, envelope vitelínico e células foliculares dos ovócitos; (C) detalhe das estruturas myelin-like destacado no quadro branco na figura B. Células foliculares (um asterisco); estruturas myelin-like (seta branca); envelope vitelínico (dois asteriscos); grânulos de vitelo (cabeça de seta preta). Escalas em: A e B = 5 μm ; C = 0,5 μm ; n = 6 ovários por grupo, em três experimentos independentes.

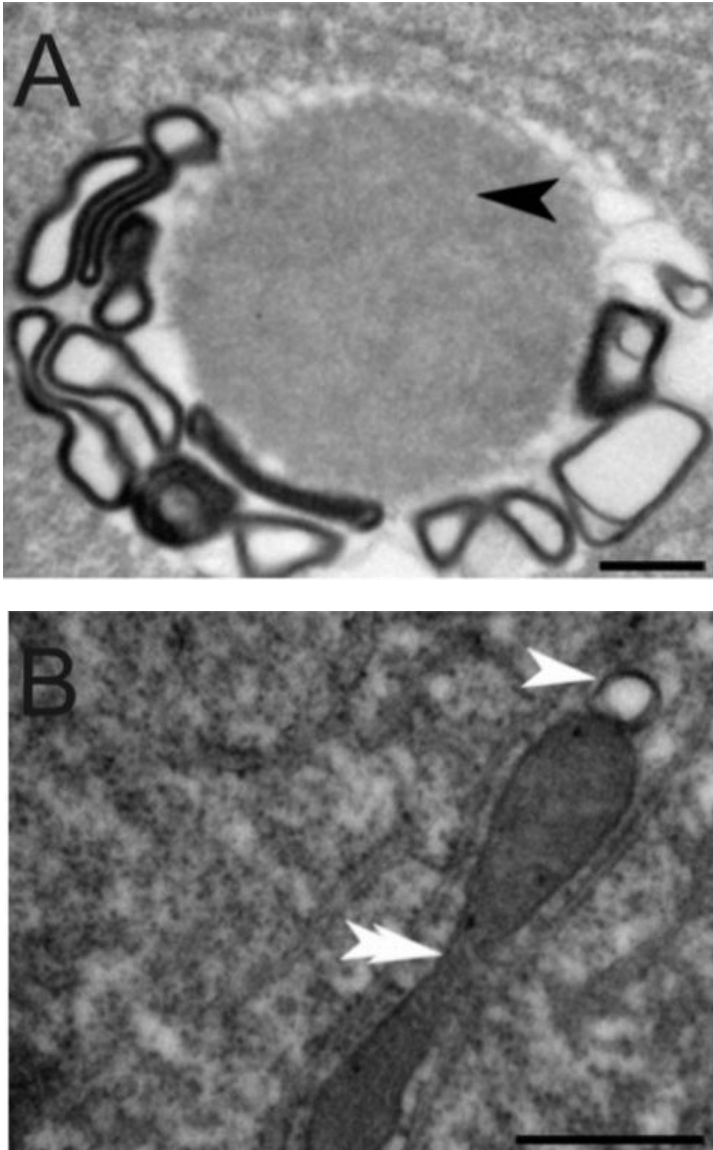


Figura 19: Alterações ultraestruturais de ovário de *D. rerio* expostos ao glifosato. (A) Grânulo de vitelo com estruturas *myelin-like*; (B) detalhe da mitocôndria com estruturas *myelin-like*. Grânulos de vitelo (seta preta); mitocôndria (dupla seta branca); estruturas *myelin-like* (seta branca). Escalas em: A e B = 0,5 μm ; C = 0,1 μm ; n = 6 ovários por grupo, em três experimentos independentes.

O retículo endoplasmático granular foi observado próximo aos grânulos de vitelo, sem alterações morfológicas, sendo possível identificar uma rede intercomunicante contínua de cisternas achatadas e túbulos, caracterizado também por possuir ribossomos em sua superfície citosólica (Figura 20 A e B).

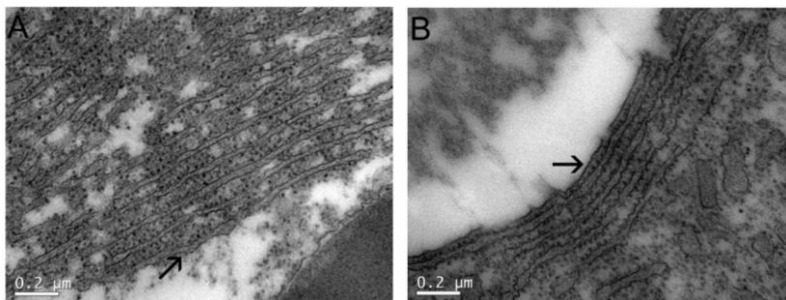


Figura 20: Secções ultraestruturais de ovário de *D. rerio*. (A) fêmea não exposta ao glifosato, (B) fêmea exposta. Retículo endoplasmático granular (seta). Escalas em: A e B = 0,2 μm; n = 6 ovários por grupo, em três experimentos independentes.

Nas fêmeas não expostas ao glifosato, não foram identificadas alterações morfológicas no corpos de Golgi, sendo possível reconhecer as vesículas achatadas e alongadas que compõe a morfologia normal da organela (Figura 21 A e B). Já nos ovócitos das fêmeas expostas ao glifosato, essas organelas apresentaram alteração morfológica em algumas cisternas, identificadas como dilatações na sua estrutura (Figura 22 A e B).

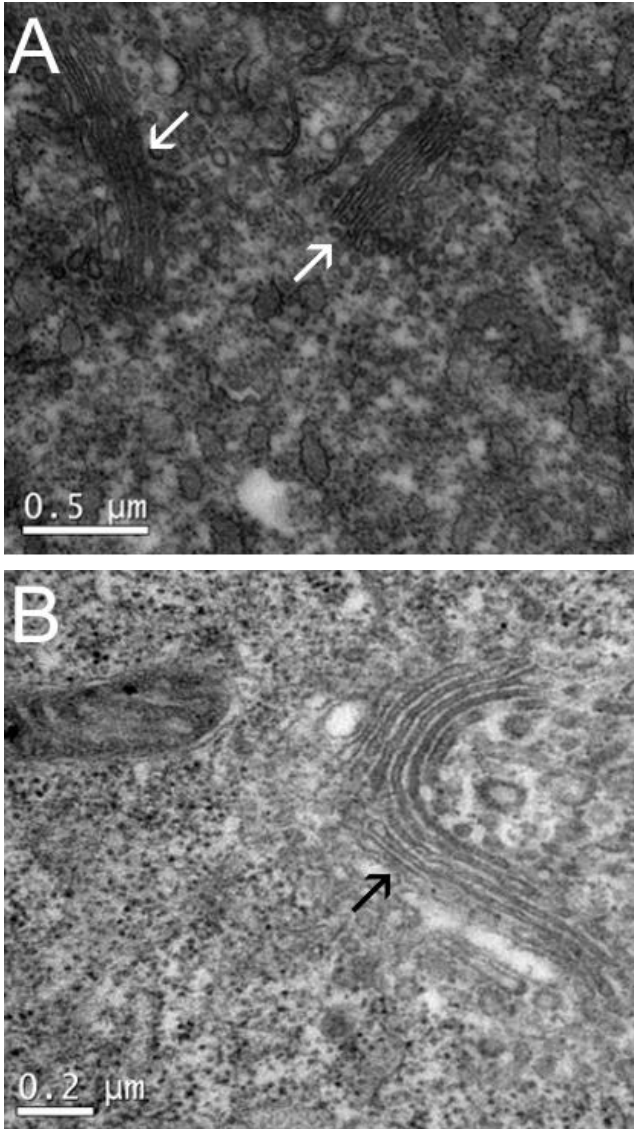


Figura 21: Secções de ovário de *D. rerio*. (A e B) fêmea não exposta ao glifosato. Corpos de Golgi com morfologia normal (seta branca e preta). Escalas em: A = 0,5 μm; B = 0,2 μm; n = 6 ovários por grupo, em três experimentos independentes.

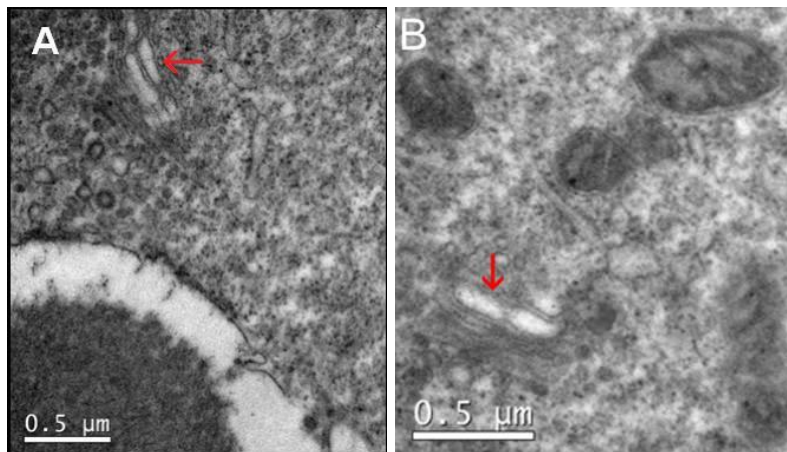


Figura 22: Secções ultraestruturais de ovário de *D. rerio*. (A e B) fêmea exposta ao glifosato. Corpos de Golgi com morfologia alterada, apresentando cisternas dilatadas (setas vermelhas). Escalas em: A, B = 0,5 μm ; n = 6 ovários por grupo, em três experimentos independentes.

Nas células foliculares das fêmeas não expostas ao glifosato foi observado um maior número de mitocôndrias (Figura 23 A, B e C), quando comparado a mesma região celular das fêmeas expostas ao glifosato. Além do maior número foram também identificadas alterações morfológicas nesta organela.

As mitocôndrias apresentaram um padrão morfológico alterado, reconhecido pela presença de constrictões e alterações nas membranas da sua estrutura, bem como redução nas cristas mitocondriais (Figura 23 D, E e F).

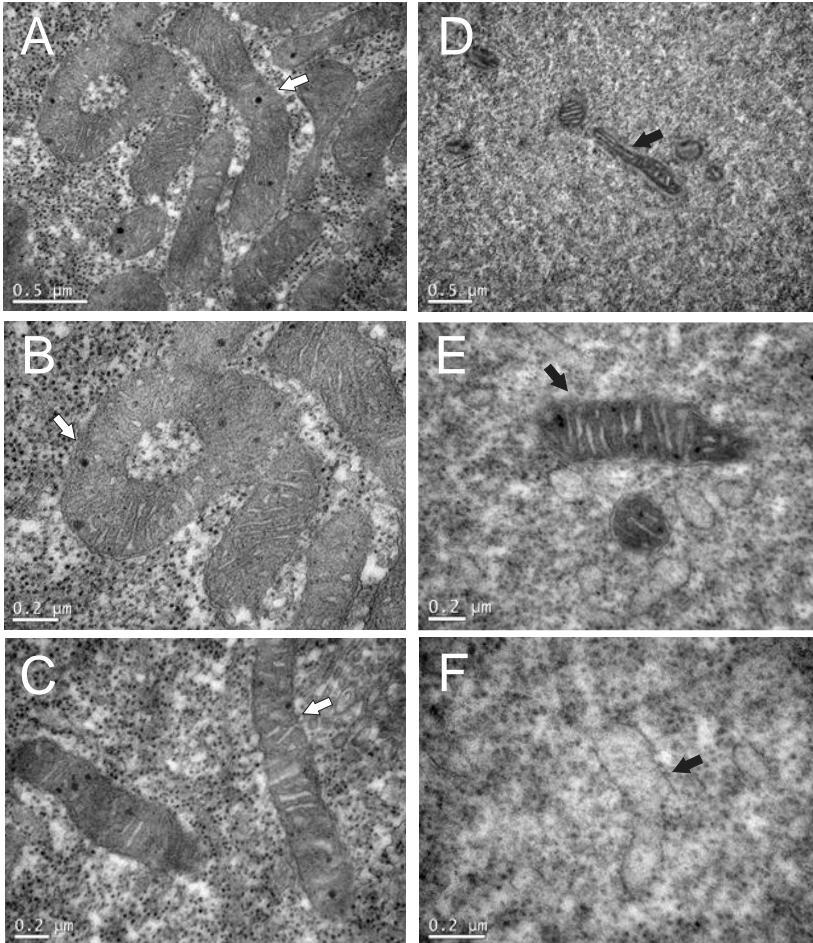


Figura 23: Secções de ovário de *D. rerio*. (A, B e C) fêmea não exposta; (D, E e F) fêmea exposta ao glifosato. Mitocôndrias nas células foliculares com cristas mitocondriais bem visíveis assim como as membranas externas e internas (A, B e C). Número reduzido de mitocôndrias nas células foliculares com morfologia alterada (D e E); Mitocôndrias com morfologia alterada e ausência de cristas mitocondriais (F). Mitocôndrias (setas brancas e pretas). Escalas em: A e D = 0,5 μm ; B, C, E e F = 0,2 μm ; n = 6 ovários por grupo, em três experimentos independentes.

As células foliculares localizadas próximas ao envelope vitelínico, foram caracterizadas por serem alongadas, apresentarem núcleo evidente e cromatina distribuída de forma irregular por toda a sua

extensão. Em fêmeas expostas ao glifosato, observou-se um número reduzido de mitocôndrias nestas células (Figura 24 A e B).

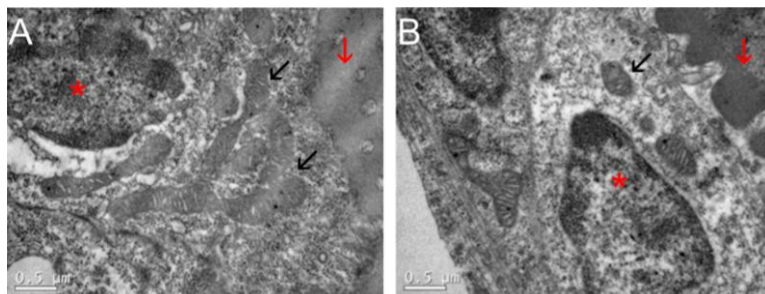


Figura 24: Secções de ovário de *D. rerio*. (A) fêmea não exposta; (B) fêmea exposta ao glifosato. Mitocôndrias nas células foliculares com morfologia normal (A). Número reduzido de mitocôndrias nas células foliculares com morfologia alterada (B). Núcleo da célula folicular (asterisco); mitocôndrias (seta preta); envelope vitelínico (seta vermelha). Escalas em: A e B = 0,5; n = 6 ovários por grupo, em três experimentos independentes.

5.3 Glifosato aumenta a expressão de SF-1 (fator esteroideogênico)

Fêmeas expostas ao glifosato apresentaram maior expressão de SF-1, evidenciado pela marcação de imuno-histoquímica e *immunoblotting*. A imunolocalização revelou a presença do anticorpo anti SF-1 nas células foliculares, que exibiram menor reatividade nas fêmeas não expostas (Figura 25 C) em relação às células foliculares das fêmeas expostas ao glifosato (Figura 25 D). A análise das bandas de SF-1 por *Western blotting* indicou uma maior expressão deste fator em ovários das fêmeas expostas diferindo significativamente das fêmeas não expostas ($p < 0,05$) (Figura 25 E).

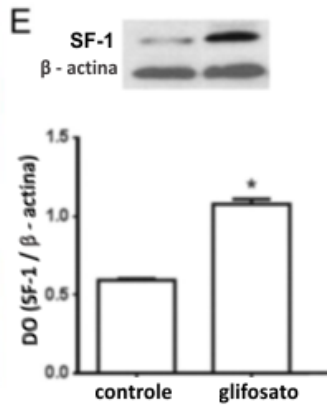
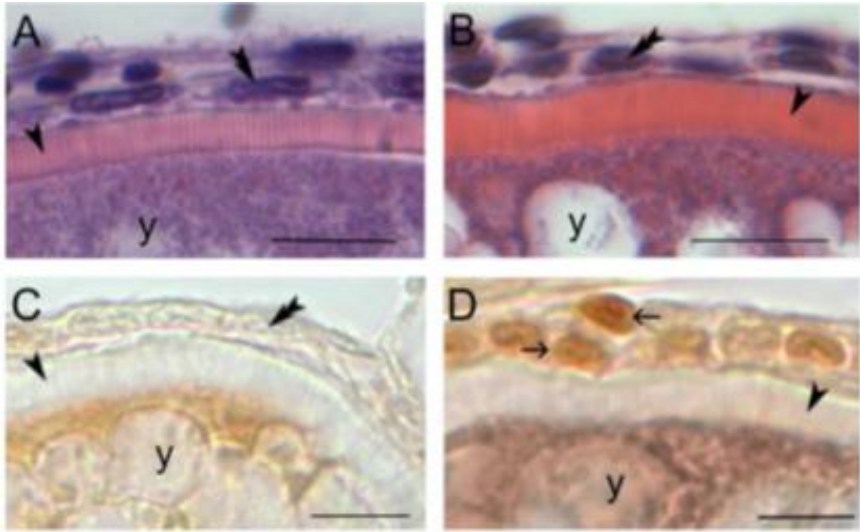


Figura 25: Imuno-histoquímica e *imunoblotting* da expressão de SF-1 em ovário de *D. rerio*. Detalhe da região cortical dos ovócitos, coloração de HE, mostrando as células foliculares e o envelope vitelínico de fêmeas não expostas (A) e fêmeas expostas a 65 µg/L de glifosato (B). Detalhe das células foliculares reativas ao anticorpo anti-SF-1 em fêmeas não expostas (C) e fêmeas expostas a 65 µg/L de glifosato (D). *Western-blotting* e densitometria para os níveis de β-actina normalizados na mesma faixa de SF-1 (E). Células foliculares (dupla cabeça de seta); células foliculares reativas ao anti-SF-1 (seta preta); envelope vitelínico (cabeça de seta preta); grânulos de vitelo (y). Os resultados foram representados pela média ± erro padrão. (*) indica diferença significativa (*Teste t-Student*, $p < 0,05$), entre os dois grupos. Escalas em: A-D = 10 µm; n = 4 ovários por grupo.

5.4 Glifosato induz estresse oxidativo

5.4.1 NPSH - tióis não proteicos

Os dados analisados apresentaram diferença nos níveis de tióis não proteicos em ovários expostos a concentração de 65 $\mu\text{g/L}$ de glifosato, quando comparado ao grupo não exposto (Figura 26). Nas fêmeas expostas ao glifosato por um período subcrônico de 15 dias, não foram identificadas alterações nos níveis de tióis. Porém na exposição aguda por um período de 96 h identificamos redução nos níveis de tióis não proteicos, sendo constatado uma relação tempo dependente de exposição, pois a partir de 96 h os níveis aumentaram, evidenciando uma recuperação dos níveis anteriores, caracterizando possivelmente um dos mecanismos de defesa em relação ao dano provocado pelo herbicida.

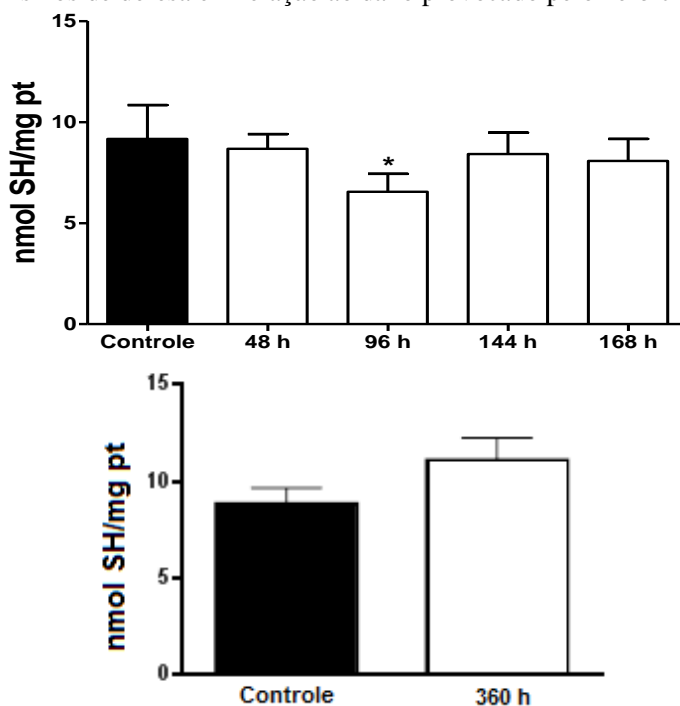


Figura 26: Níveis de tióis nos ovários de *D. rerio* em diferentes períodos. (*) indica diferença significativa (*Teste t-Student*, $p < 0,05$) entre os dois grupos; $n = 8$ ovários, em três experimentos independentes.

5.4.2 Peroxidação lipídica

Foi estimado o dano em lipídios nos ovários de *D. rerio* através do ensaio de TBARS. Houve um aumento significativo nos níveis de produtos finais de lipoperoxidação nos ovários expostos a 65 µg/L de glifosato por um período de 96 h, caracterizando estresse oxidativo agudo (Figura 27).

Nossos resultados caracterizaram uma relação tempo dependente de exposição ao glifosato, assim como identificado para os tióis não proteicos, verificando-se que houve um aumento significativo nos produtos finais de peroxidação lipídica em 96 h, e a partir de 144 h e 168 h de exposição ao glifosato, constatou-se a redução destes produtos de lipoperoxidação. Na exposição subcrônica, realizada por um período de 360 h (15 dias), não houve a caracterização de estresse oxidativo.

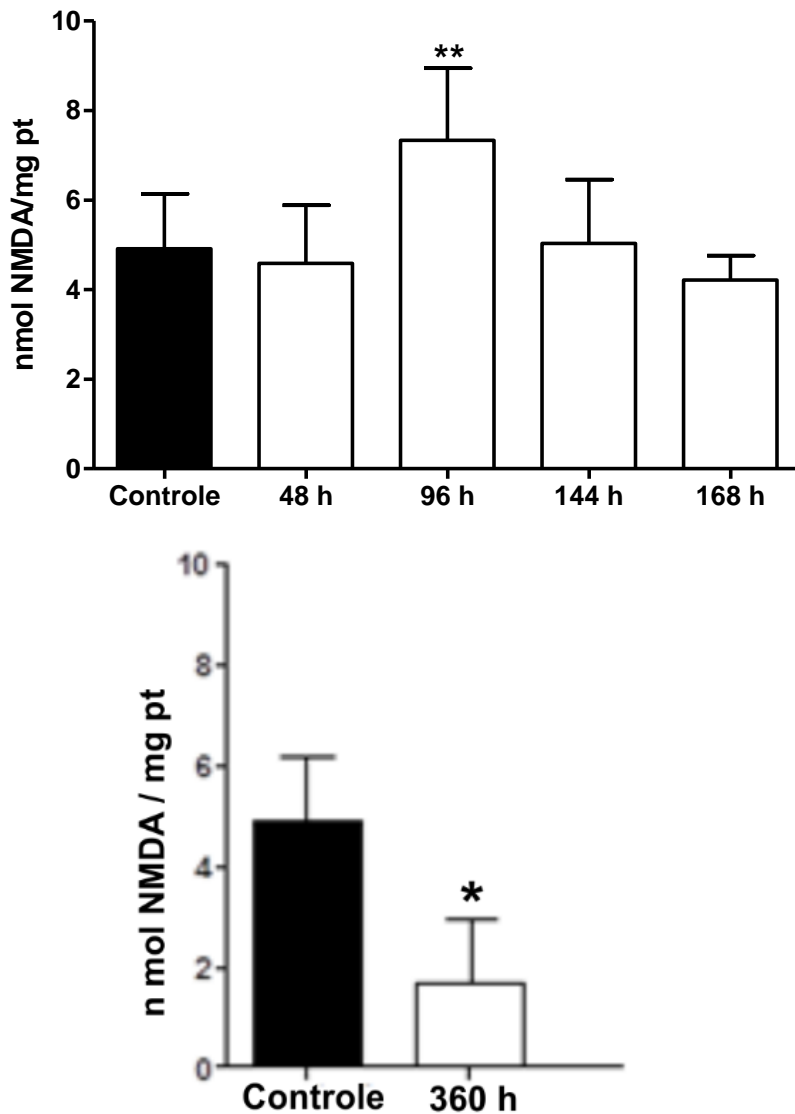


Figura 27: Níveis de TBARS nos ovários de *D. rerio* em diferentes períodos. Produtos finais da lipoperoxidação dos ovários. (*) (**) indicam diferença significativa (*Teste t-Student*, $p < 0,05$) entre os dois grupos; $n = 8$ ovários, em três experimentos independentes.

A utilização de diferentes metodologias empregadas neste estudo permitiram reconhecer e quantificar os efeitos decorrentes da exposição ao herbicida glifosato sobre os ovários de *D. rerio*. Foi observado que não houve alteração na morfologia dos folículos ovarianos em análise realizada em microscopia de luz. As análises ultraestruturais evidenciaram alterações principalmente no complexo de Golgi e mitocôndrias, além da presença de estruturas membranosas (*myelin-like*) na região cortical dos ovócitos. Os testes bioquímicos demonstraram a ocorrência de estresse oxidativo induzido pelo tratamento com o glifosato.

5.5 O efeito do glifosato na expressão de Bak, Bcl2 e SF-1

O número de células imunomarcadas com a proteína Bak apresentou-se significativamente maior nos ovários de fêmeas expostas ao glifosato, correspondente a 18,15% ($\pm 27,9$, $p < 0,05$), quando comparadas aos ovários de fêmeas não expostas, cujo percentual foi de 10,47% ($\pm 7,9$) (Figura 28 B e D).

Em relação a proteína Bcl2, verificou-se que o número de células imunomarcadas foi significativamente menor nas fêmeas expostas ao glifosato, 10,13% ($\pm 9,0$, $p < 0,05$), quando comparadas aos ovários de fêmeas não expostas, 21,47% ($\pm 101,2$) (Figura 28 C e E).

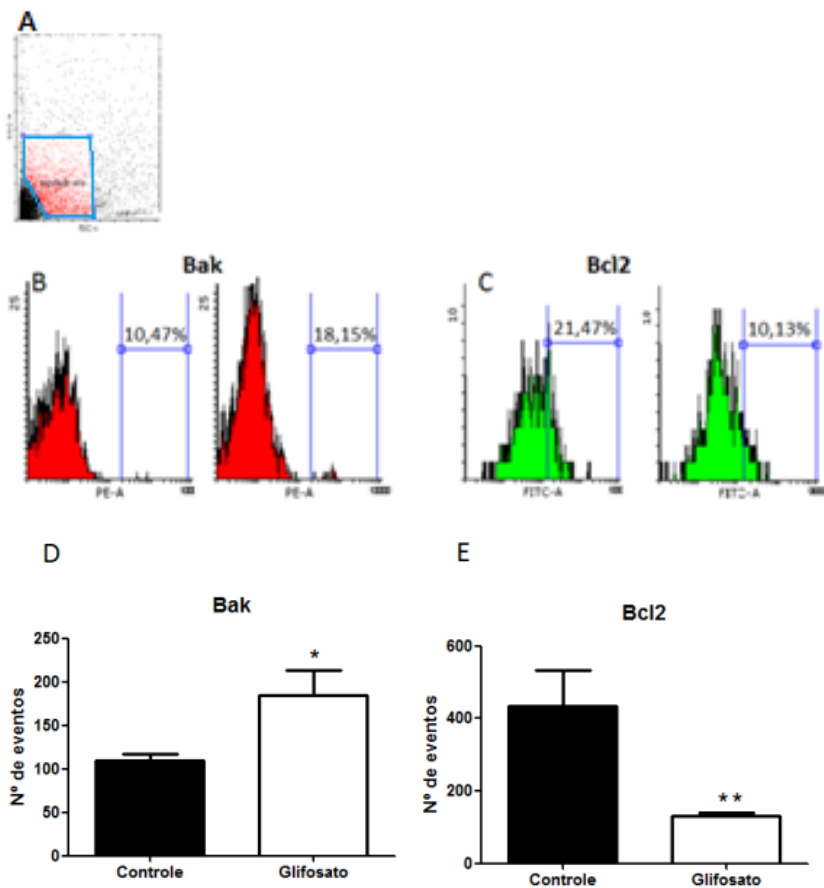


Figura 28: Análise das proteínas Bak e Bcl2 por citometria de fluxo. As características de tamanho (FSC) e complexidade interna (SSC) foram utilizadas para distinguir e definir a população para quantificação das proteínas Bak e Bcl2. (A) gráfico representando a população de células totais (preto) e a população de células foliculares de ovários de *D. rerio* analisadas (destacado em vermelho). Histogramas de intensidade de fluorescência indicando a porcentagem de células imunomarcadas (entre as barras) (B e C). Gráficos de barras representando a média \pm erro padrão do número de eventos marcados. Asterisco indica diferença significativa quando comparado fêmeas não expostas e fêmeas expostas ao glifosato (*ANOVA* seguido de teste *post hoc de Tukey*, $p < 0,05$) (D e E); $n = 5$ ovários em 3 experimentos independentes.

Nos ovários de fêmeas expostas ao glifosato observou-se que o percentual de células imunomarcadas com a proteína SF-1 foi significativamente maior, correspondendo a 62,88% ($\pm 154,9$, $p < 0,05$), quando comparadas aos ovários de fêmeas não expostas ao glifosato, cujo percentual foi de 3,29% ($\pm 17,3$) (Figura 29 B e C).

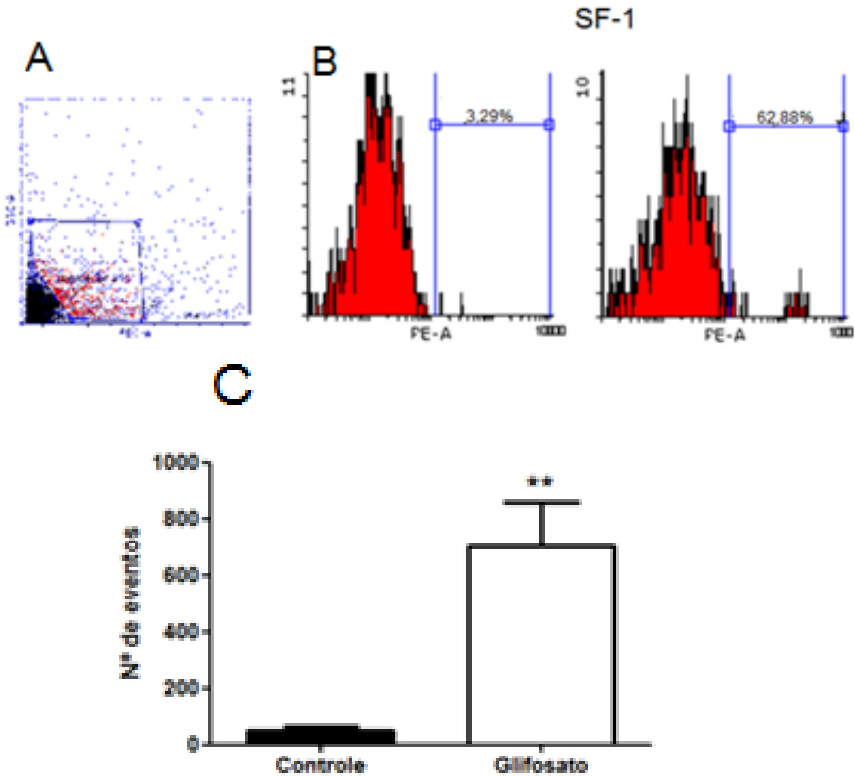


Figura 29: Análise da proteína SF-1 por citometria de fluxo. As características de tamanho (FSC) e complexidade interna (SSC) foram utilizadas para distinguir e definir a população para quantificação do fator esteroidogênico 1 (SF-1). (A) gráfico representando a população de células totais (preto) e a população de células foliculares de ovários de D. rerio analisadas (destacado em vermelho). Histogramas de intensidade de fluorescência indicando a porcentagem de células imunomarcadas (entre as barras) (B). Gráfico de barras representando a média \pm erro padrão do número de eventos marcados. Asterisco indica diferença significativa quando comparado fêmeas não expostas e fêmeas expostas ao glifosato (ANOVA seguido de teste *post hoc* de Tukey, $p < 0,05$) (D e E); $n = 5$ ovários em 3 experimentos independentes.

5 DISCUSSÃO

A maturação ovariana na maioria dos peixes segue um padrão semelhante, onde os folículos ovarianos são formados pelos ovócitos que estão dispostos no seu interior e externamente envolvidos pelas células foliculares associadas a uma membrana basal (GRIER et al., 2002; PATIÑO e SULLIVAN, 2002). Os nossos resultados evidenciaram que tanto o grupo tratado com o glifosato como o grupo controle apresentaram morfologia das ovogônias e dos ovócitos semelhante ao descrito na literatura (YÖN et al., 2008), sendo possível sugerir que na concentração de herbicida utilizada neste estudo, parece não haver comprometimento do padrão morfológico de organização dos ovários.

De acordo com a literatura, a maturação ovariana pode ser determinada considerando as dimensões das células germinativas, a visualização do núcleo e do nucléolo e a distribuição de inclusões citoplasmáticas (BARDAKCI et al., 2000) de modo que o processo de ovogênese em peixes pode ser classificado entre quatro a nove fases (SELMAN e WALLACE, 1989; FISHELSON et al., 1996; GÖKÇE et al., 2003). Contudo em estudos anteriores, ARMILIATO et al. (2014) adotaram a descrição em quatro fases, sendo possível reconhecer e caracterizar diferenças marcantes nas etapas do processo de maturação. Observamos também que os ovários de *D. rerio* apresentam desenvolvimento assincrono, o que já havia sido descrito por CASADEVALL et al. (1993), e que consiste em identificar concomitantemente no ovário as quatro fases de maturação das células germinativas.

As ovogônias, as menores células germinativas, correspondem à primeira fase de maturação e foram observadas em agrupamentos próximos aos ovócitos pré-vitelogênicos I. Estes últimos apresentam o núcleo evidente, com tamanho reduzido em relação às demais células germinativas e estão envolvidos pelas células foliculares, caracterizando assim a estrutura do folículo ovariano. O aumento do número de grânulos de vitelo e vesículas, bem como a presença do envelope vitelínico mais espesso, quando comparadas aos estágios iniciais de maturação, constituem indícios da formação dos ovócitos pré-vitelogênicos II.

Do mesmo modo, YÖN et al. (2008) observou que durante o processo de maturação de *D. rerio* ocorreu um aumento no tamanho dos ovócitos e o início da formação do envelope vitelínico, bem como seu espessamento durante a vitelogênese. No que se refere as características dos ovócitos pré-vitelogênicos como núcleo grande, presença de

nucléolos e de grânulos de vitelo, assim como o envelope vitelínico com estriações e um epitélio folicular espesso foram também observadas por FISHELSON et al. (1996) e por ÜNAL et al. (2005).

Na fase de ovócito vitelogênico, o envoltório nuclear inicia o processo de fragmentação e a migração do núcleo para a periferia, e de acordo com o tamanho dos ovócitos, o número de nucléolos pode variar entre as espécies. Além disso, nesta fase o citoplasma apresenta-se repleto de grânulos de vitelo, vesículas e células foliculares com núcleo evidente e alongado. Padrão semelhante foi observado no nosso estudo.

Nos ovários de fêmeas expostas a concentração de 65 µg/L de glifosato, não foram observadas alterações no diâmetro das ovogônias e ovócitos pré-vitelogênicos II. Entretanto, houve aumento no diâmetro dos ovócitos pré- vitelogênicos I e ovócitos vitelogênicos, bem como um aumento do IGS e expressão de SF-1.

O IGS é um parâmetro relevante para avaliação e determinação das fases do ciclo reprodutivo, principalmente em peixes, pelo fato da maturação das células reprodutivas ocorrer simultaneamente ao aumento da massa das gônadas sendo que alterações no IGS são as consequências mais comuns observadas em peixes expostos a poluentes (KIME, 1955).

Os resultados apresentados neste trabalho revelaram que a média do IGS das fêmeas de *D. rerio* expostas a 65 µg/L de glifosato foi maior quando comparada com as fêmeas não expostas ao herbicida. Esse aumento da média do IGS foi evidente nas classes de valores maiores (Quadro 5), sugerindo uma resposta das células germinativas.

Deste modo, sugere-se que o aumento do IGS foi resultante do aumento da expressão do SF-1, envolvido na biossíntese de hormônios esteroides. Como o sistema endócrino reprodutivo é composto pelo eixo hipotálamo-hipófise-gonadal, os resultados encontrados neste estudo permitem supor que a exposição por 15 dias ao herbicida glifosato interferiu neste eixo, estimulando a maturação dos ovários, sem que houvesse prejuízo ao funcionamento geral do organismo. O efeito do glifosato como disruptor endócrino em organismos e linhagens celulares apresenta-se bem caracterizado em estudos experimentais realizados em ratos e camundongos (WALSH et al., 2000; ASTIZ et al., 2009; ROMANO et al., 2009; CLAIR et al., 2012).

Em estudos realizados *in vitro* com células de placenta humana (RICHARD et al., 2005), verificou-se que o Roundup® reduziu a atividade da enzima aromatase, responsável pela síntese dos estrogênios e reduziu a expressão da proteína regulatória esteroideogênica aguda (StAR). O glifosato pode alterar o perfil dos hormônios esteroides, que estão diretamente relacionados a maturação gonadal, sendo este um

processo complexo e influenciado por fatores de crescimento e hormonais (HOKANSON et al., 2007; SOSO et al., 2007; GASNIER et al., 2009).

A concentração de glifosato utilizada neste estudo foi suficiente para induzir mudanças nos ovários em *D. rerio* associadas com uma maior expressão de SF-1, o que pode ser o fator responsável pelo aumento de diâmetro dos ovócitos e do IGS pois é uma das principais proteínas envolvidas na diferenciação e maturação gonadal. Ortólogos deste fator são encontrados em muitos vertebrados e invertebrados por ser altamente conservado entre as espécies de modo que pode ser considerado um bom marcador na avaliação da expressão da proteína mitocondrial StAR (SUGAWARA et al., 1996; CARON et al., 1997).

A proteína SF-1 tem papel fundamental na capacidade esteroidogênica de células das gônadas e do córtex adrenal. Desta forma torna-se evidente que SF-1 é um marcador de grande interesse na avaliação da função endócrina. O mesmo já foi relatado por WARMAN et al. (2011), onde a disfunção na expressão de SF-1 afetou os ovários reduzindo o número de células germinativas, alterando a integridade do estroma, a foliculogênese e a esteroidogênese. No entanto, não há dados anteriores a este estudo avaliando o impacto do glifosato sobre a expressão de SF-1, e em particular sobre a maturação ovariana em peixes, o que dificulta a compreensão do seu mecanismo de ação.

Os efeitos do glifosato ou herbicidas a base de glifosato sobre o fígado, brânquias e sangue são bem documentados (NESKOVIC et al., 1996; GUILHERME et al., 2012), todavia estudos direcionados à toxicidade reprodutiva usando SF-1 como um marcador da biossíntese de hormônios esteroides e do processo de maturação em ovários de peixe são pouco conhecidos. Neste sentido, torna-se necessário investigações à respeito deste marcador e a toxicidade do glifosato, uma vez que ele pode alterar a reprodução e comprometer a comunidade de organismos aquáticos.

Em relação ao número de células germinativas por área, não foram observadas diferenças entre os grupos estudados. Contudo, no estudo de ANSARI e KUMAR (1987), após a exposição ao herbicida organofosforado malation, em concentrações que variam entre 0,5 a 1,1 mg/L, por um período de 7 dias, observou-se um retardo no processo inicial de maturação ovariana.

Na avaliação morfológica dos ovócitos pré-vitelogênicos de *D. rerio*, foram reconhecidas células foliculares com núcleo evidente e o envelope vitelínico com estriações ou poros na sua estrutura acelular. Reconheceu-se também na periferia dos ovócitos uma incidência maior

de grânulos de vitelo, e um aumento na espessura do envelope vitelínico relacionado a fase de maturação.

Segundo o estudo de McMILLAN (2007), a formação do envelope vitelínico inicia-se antes da fase de ovócito pré-vitelogênico e o aumento gradual na espessura e organização do envelope vitelínico deve-se a sua importância no transporte de substâncias essenciais para a síntese de vitelo (CELIUS e WALTHER, 1998), uma vez que, a vitelogênese em *D. rerio* é um processo complexo, sendo necessário a síntese e transporte de matéria-prima para o desenvolvimento dos ovócitos (ÇAKICI e ÜÇÜNCÜ, 2007).

Os grânulos corticais de vitelo estão associados ao corpos de Golgi e ao retículo endoplasmático e são facilmente reconhecidos por serem formados pelo acúmulo de pequenas vesículas, preenchendo a maior parte do citoplasma do ovócito (SHACKLEY e KING, 1977).

Nossos resultados mostraram importantes alterações na análise ultraestrutural dos ovários de *D. rerio*, expostos ao glifosato. Uma das principais alterações foi a presença de membranas concêntricas, conhecidas como *myelin-like*, próximas aos grânulos de vitelo, nas regiões corticais dos ovócitos e associadas a membrana mitocondrial externa. Estas membranas provavelmente afetam as funções dos ovócitos durante a fertilização, pois o acúmulo destas estruturas atípicas podem comprometer a disponibilidade do conteúdo dos grânulos de vitelo. Além disso, também podem afetar a liberação destes grânulos para o espaço perivitelínico, envolvidos em reações corticais, interferindo no bloqueio da polispermia.

Durante a reação cortical, o conteúdo dos grânulos é liberado no espaço perivitelínico, entre a superfície do ovócito e o envelope vitelínico (WEST, 1990; PATIÑO e SULLIVAN, 2002), sendo que esta reação tem importância para o sucesso reprodutivo das espécies (OHTA et al., 1990; PATIÑO e SULLIVAN 2002).

Estudos que relatam a formação dessas estruturas com exposição ao glifosato, ainda são escassos, contudo sugerimos que em *D. rerio* as estruturas *myelin-like* podem estar relacionadas a toxicidade do glifosato.

Respostas similares em exposição a herbicidas a base de glifosato foram demonstradas por SZAREK et al. (2000) em hepatócitos da carpa *Cyprinus carpio*. Além disso, estas estruturas anormais podem servir como marcadores ultraestruturais em condições citotóxicas (MIGUET-ALFONSI et al., 2002; CASTEJÓN e CASTEJÓN, 2008) e portanto auxiliar na avaliação da toxicidade de herbicidas.

Os corpos de Golgi dos ovócitos de fêmeas expostas ao glifosato apresentaram alterações ultraestruturais, caracterizadas como expansões

(dilatações) de algumas cisternas que compõem esta organela celular. SZAREK et al. (2000) também observaram dilatações nas cisternas de Golgi, em hepatócitos de carpa expostos ao herbicida.

Nas fêmeas expostas foram observadas alterações nas mitocôndrias das células foliculares bem como redução do seu número. As principais alterações observadas nas mitocôndrias foram a constrição na sua estrutura e a redução no número de cristas mitocondriais. Estas constrições podem reduzir a área superficial da mitocôndria, comprometendo as funções de membrana, como também observado por HARAYASHIK et al. (2013), em peixes expostos a herbicida a base de glifosato. Em estudos de cultura de queratinócitos por HEU et al. (2012), identificou-se a redução da integridade da membrana plasmática e alterações na funcionalidade mitocondrial, assim como alterações no potencial de membrana mitocondrial.

A redução do número de cristas mitocondriais também foi descrito por SZAREK et al. (2000) em hepatócitos de carpa expostos a herbicida a base de glifosato. Na investigação de PEIXOTO (2005), foi identificado em fígado de ratos expostos ao glifosato, a permeabilização das membranas mitocondriais e alteração na atividade bioenergética. Desta forma a concentração de 65 µg/L de glifosato, pode ter comprometido a integridade, a funcionalidade e o potencial de membrana das mitocôndrias, induzindo a toxicidade celular.

No presente estudo utilizamos a concentração de glifosato regulamentada para uso no Brasil e mesmo assim várias alterações foram identificadas nas células germinativas e foliculares de *D. rerio*, como: estruturas *myelin-like*, redução do número de mitocôndrias e cristas mitocondriais, constrição da mitocôndria e dilatação das cisternas de Golgi. Estes efeitos são considerados subletais, pois não são capazes de induzir a morte dos peixes, porém podem alterar significativamente processos fisiológicos e bioquímicos.

Partindo desse pressuposto, foram investigadas neste estudo proteínas anti e pró-apoptóticas, Bcl2 e Bak, respectivamente. Nossos resultados apontaram um aumento na expressão da proteína Bak, em ovários expostos ao glifosato. Entretanto, em relação a Bcl2, houve uma redução na expressão desta proteína, sugerindo que uma das vias apoptóticas possa ter sido ativada pelo herbicida glifosato. No estudo realizado por CLAIR et al. (2012) observou-se a toxicidade do glifosato sobre células testiculares de ratos adultos, com degradação das membranas das células de Leydig, assim como apoptose em células germinativas e de Sertoli.

BENACHOUR e SERÁLINI (2009) verificaram que o glifosato pode induzir apoptose em células humanas embrionárias, umbilicais e placentária e em cultura de queratinócitos (HEU et al., 2012) e que pode também alterar o potencial de membrana mitocondrial, sugerindo indução à apoptose. Os estímulos pró-apoptóticos, como exposição a agentes químicos pode gerar estresse oxidativo, pela indução da expressão da proteína Bak. Em contraponto, a Bcl2 parece funcionar como importante via do sistema antioxidante, inibindo a formação de EROS (GRIVICICH, 2007). Os estudos realizados por McCULLOUGH et al. (2001) evidenciam que a redução da expressão da Bcl2 está relacionada com a depleção celular de NPSH. Desta forma, observou-se que a Bcl2 pode modular o mecanismo de apoptose por intermédio do metabolismo do NPSH, como analisado neste estudo através de ferramentas bioquímicas, onde registrou-se um aumento progressivo nos níveis de NPSH, no período de 15 dias de exposição ao glifosato.

Sugere-se então que as células germinativas responderam a toxicidade através da acomodação celular e não a apoptose, pois para ativar as caspases e conseqüentemente induzir a apoptose, é necessário um decréscimo de glutathiona (THOMPSON e FRANKLIN et al., 2010). Assim, a concentração de 65 µg/L de glifosato foi suficiente para alterar a expressão de proteínas envolvidas nos mecanismos apoptóticos nas fêmeas de *D. rerio* expostas por um período de 15 dias.

O glifosato pode provocar estresse oxidativo em organismos aquáticos, levando a um aumento na produção EROS (AHMAD et al., 2000; WEBSTER et al., 2014). Estas espécies reativas são capazes de reagir com biomoléculas causando diferentes tipos de danos biológicos, como peroxidação lipídica e carbonilação de proteínas, alterações significativas no metabolismo, colapso celular e apoptose (BAGNYUKOVA et al., 2006), como também demonstrado no estudo de HARDERSEN e WRATTEN (1998), onde verificou-se um aumento na formação de espécies reativas de oxigênio, alterando macromoléculas e as defesas antioxidantes em peixes.

Os níveis de TBARS têm sido usados como biomarcadores eficazes de poluentes tóxicos em peixes (LIVINGSTONE, 2001; PARVEZ e RAISUDDIN 2005; CRESTANI et al., 2007; GLUSCZAK et al., 2007). Houve níveis significativamente elevados de TBARS nos ovários expostos a concentração de 65 µg/L de glifosato, onde a exposição das fêmeas induziu a um estresse oxidativo que está intimamente relacionado ao tempo de exposição.

Na exposição das fêmeas de *D. rerio* ao glifosato por 96 h observou-se estresse oxidativo, com aumento nos níveis de TBARS nos

ovários, porém na exposição por um período de 15 dias não foi caracterizado estresse oxidativo, já que os níveis de TBARS reduziram neste período de exposição. Do mesmo modo, GLUSCZAK et al. (2007) verificou que nos peixes expostos ao glifosato por 96 h, houve um aumento na produção de TBARS no tecido muscular. Porém, semelhante aos nossos resultados, os cérebros de peixes testados apresentaram uma redução de TBARS após 96 h de exposição.

No estudo de MENEZES et al. (2011), após a exposição por um período de 8 dias ao herbicida a base de glifosato, os peixes foram transferidos para água potável, também por 8 dias, para avaliação de uma possível resposta de recuperação. O herbicida produziu um aumento dos níveis de TBARS no fígado e músculo, entretanto houve redução nos níveis de NPSH nos peixes expostos. Durante o período de recuperação (exposição dos peixes a água potável) algumas enzimas como a glutationa-S-transferase aumentou a sua atividade, indicando uma resposta compensatória contra as condições tóxicas.

Nossos resultados indicaram uma recuperação dos níveis de NPSH e uma redução dos níveis de TBARS, com a exposição dos peixes por um período de 15 dias, sugerindo desta forma que os ovários de *D. rerio* expostos a longo prazo ao herbicida glifosato são capazes de recuperar os parâmetros oxidativos. Porém o perfil oxidativo e antioxidante na exposição aguda, por 96 h ao herbicida glifosato foi capaz de causar estresse oxidativo nas fêmeas de *D. rerio*, provavelmente devido ao aumento da peroxidação lipídica. Nossos achados mostraram similaridade com os resultados obtidos por CRESTANI et al. (2007), que observaram o aumento dos níveis de TBARS em cérebro e fígado de *Rhandia quelen* expostas ao herbicida clomazone.

Portanto, o glifosato pode induzir ao estresse oxidativo, conduzindo assim à geração de radicais livres, bem como causar peroxidação lipídica e alteração nas defesas antioxidantes, caracterizando desta forma um mecanismo envolvido na toxicidade do herbicida.

O aumento da peroxidação lipídica nos tecidos sugere que o glifosato medeia a produção de radicais livres, o que pode ser a causa do estresse oxidativo. No entanto, neste estudo as alterações observadas nos ovários de *D. rerio*, relativas a estes parâmetros parecem ser transitórias, porque com a exposição prolongada (subcrônica), os níveis de TBARS e NPSH retornaram de forma similar aos valores iniciais da exposição aguda. Desta forma, a curto prazo a exposição ao glifosato é capaz de causar estresse oxidativo em ovários de *D. rerio* e como resposta protetora

os peixes passam a produzir um aumento nas defesas antioxidantes, sugerindo assim a ativação destas defesas após exposição ao herbicida.

A partir do presente estudo, sugere-se que a exposição ao glifosato, mesmo na concentração mínima regulamentada pelo CONAMA, correspondente a 65 µg/L, pode afetar negativamente a curto e longo prazo a reprodução de peixes.

6 CONCLUSÕES

Os resultados apresentados neste trabalho contribuem para a compreensão da organização estrutural e ultra estrutural dos ovários de *D. rerio*, bem como elucidam aspectos bioquímicos de toxicidade do herbicida glifosato. Estes resultados permitiram concluir que mesmo na concentração de glifosato regulamentada para os rios do Brasil, efeitos subletais foram identificados nos ovários das fêmeas de *D. rerio*. Os efeitos adversos do glifosato sobre os ovócitos demonstrados aqui são uma importante preocupação com a reprodução de peixes. Portanto estes resultados indicam a necessidade de outras investigações no sentido de contribuir para a avaliação completa dos efeitos do glifosato sobre a reprodução.

REFERÊNCIAS

ABNT. **Associação Brasileira de Normas Técnicas - NBR 15088 – Ecotoxicologia aquática – Toxicidade aguda – Método de ensaio com peixes**. ABNT: Ed. ABNT. 2006.

AHMAD, I. et al. Induction of hepatic antioxidants in freshwater catfish (*Channa punctatus Bloch*) is a biomarker of paper mill effluent exposure. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects**, v. 1523, n. 1, p. 37-48, 2000.

AKINGBEMI, B. T. et al. Phthalate-induced Leydig cell hyperplasia is associated with multiple endocrine disturbances. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 101, n. 3, p. 775-780, 2004.

AMARANTE JUNIOR, O. P. D. et al. Glifosato: propriedades, toxicidade, usos e legislação. **Química Nova**, v. 25, p. 589-593, 2002.

ANSARI, B. A.; KUMAR, K. Malathion toxicity: effect on the ovary of the zebra fish *Brachydanio rerio* (Cyprinidae). **Internationale Revue der gesamten Hydrobiologie und Hydrographie**, v. 72, n. 4, p. 517-528, 1987.

ANVISA. **Programa de Análise de Resíduos de Agrotóxicos em Alimentos (PARA) - Relatório de Atividades de 2011 e 2012** - Gerencia-Geral de Toxicologia. Brasília: Agência Nacional de Vigilância Sanitária, 2013.

ARAÚJO, S. M. M. et al. Uso de inseticidas organofosforados nos pólos de produção na Ilha de São Luis–MA: condições de trabalho e contaminação de hortaliças. **Pesticidas**, n. 11, p. 159-179, 2001.

ARIAS, A. R. L. et al. Utilização de bioindicadores na avaliação de impacto e no monitoramento da contaminação de rios e córregos por agrotóxicos. **Ciência & Saúde Coletiva**, v. 12, n. 1, p. 61-72, 2007.

ARMILIATO, N. et al. Changes in ultrastructure and expression of steroidogenic factor-1 in ovaries of zebrafish *Danio rerio* exposed to glyphosate. **Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A**, v. 77, n. 7, p. 405-414, 2014.

ASTIZ, M.; DE ALANIZ, M. J. T.; MARRA, C. A. The impact of simultaneous intoxication with agrochemicals on the antioxidant defense system in rat. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 94, n. 2-3, p. 93-99, 2009.

BAGNYUKOVA, T. V.; CHAHRAK, O. I.; LUSHCHAK, V. I. Coordinated response of goldfish antioxidant defenses to environmental stress. **Aquatic Toxicology**, v. 78, n. 4, p. 325-331, 2006.

BAIRD, C.; CANN, M. **Environmental Chemistry**. 2. Nova Yorker: Freeman, 2005.

BARDAKCI, F.; OZANSOY, Ü.; KOPTAGEL, E. A comparison of oogenesis under constant and fluctuating temperatures in Doctor fish, *Garra rufa* Heckel, 1843 (Teleostei: Cyprinidae). **World Wide Web Journal of Biology**, p. 2-9, 2000.

BAVARESCO, P. R. Colonização do extremo oeste catarinense: contribuições para a história campesina da América Latina. **Artigo apresentado no doutorado em Ciências Sociais pela Universidade do Vale do Rio dos Sinos–UNISINOS**, 2006.

BAZZOLI, N.; GODINHO, H. P. Cortical alveoli in oocytes of freshwater neotropical teleost fish. **Bolletino di Zoologia**, v. 61, n. 4, p. 301-308, 1994.

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

BILA, D. M.; DEZOTTI, M. Desreguladores endócrinos no meio ambiente: efeitos e consequências. **Química nova**, v. 30, n. 3, p. 651, 2007.

BORTAGARY, V. et al. Embryotoxicity and teratogenesis in zebrafish embryos exposed in vitro to glyphosate-type herbicides. **Jornal of Toxicology Developmental**: <http://drithurralde.wordpress.com>, 2010.

BRASIL. Resolução Conama, Nº 357, de 17 de março de 2005: Dispõe sobre a classificação dos corpos de água e diretrizes ambientais para o seu enquadramento, bem como estabelece as condições e padrões de lançamento de efluentes, e dá outras providências. **Diário Oficial da União**, v. 18, n. 03, p. 1-9, 2005.

BROCK, T. C. M. et al. Aquatic risks of pesticides, ecological protection goals, and common aims in european union legislation. **Integrated Environmental Assessment and Management**, v. 2, n. 4, p. e20-e46, 2006.

CAJARAVILLE, M. P. et al. The use of biomarkers to assess the impact of pollution in coastal environments of the Iberian Peninsula: a practical approach. **Science of The Total Environment**, v. 247, n. 2-3, p. 295-311, 2000.

CALDAS, E. D. É veneno ou é remédio? Agrotóxicos, saúde e ambiente. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 21, n. 1, p. 339-341, 2005.

CARLETTI, E. et al. Glutathione transferases from *Anguilla anguilla* liver: Identification, cloning and functional characterization. **Aquatic Toxicology**, v. 90, n. 1, p. 48-57, 2008.

CARNEY, S. A. et al. Understanding dioxin developmental toxicity using the zebrafish model. **Birth Defects Research Part A: Clinical and Molecular Teratology**, v. 76, n. 1, p. 7-18, 2006.

CARON, K. M. et al. Characterization of the promoter region of the mouse gene encoding the steroidogenic acute regulatory protein. **Molecular Endocrinology**, v. 11, n. 2, p. 138-147, 1997.

CASADEVALL, M.; BONET, S.; MATAILLANAS, J. Description of different stages of oogenesis in *Ophidion barbatum* (Pisces, Ophidiidae). **Environmental Biology of Fishes**, v. 36, n. 2, p. 127-133, 1993.

CASTEJÓN, O. J.; CASTEJÓN, H. V. Electron microscopy of myelin figures in normal and pathological tissues. A review. **Acta Microscopica.**, v. 17, n. 2, p. 13-19, 2008.

CELIUS, T.; WALTHER, B. Oogenesis in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) occurs by zonagenesis preceding vitellogenesis *in vivo* and *in vitro*. **Journal of Endocrinology**, v. 158, n. 2, p. 259-266, 1998.

CHANDRAN, R. et al. Effect of cadmium and zinc on antioxidant enzyme activity in the gastropod, *Achatina fulica*. **Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology**, v. 140, n. 3-4, p. 422-426, 2005.

CLAIR, É. et al. A glyphosate-based herbicide induces necrosis and apoptosis in mature rat testicular cells *in vitro*, and testosterone decrease at lower levels. **Toxicology in Vitro**, v. 26, n. 2, p. 269-279, 2012.

COLBORN, T.; VOM SAAL, F. S.; SOTO, A. M. Developmental effects of endocrine-disrupting chemicals in wildlife and humans. **Environmental Health Perspectives**, v. 101, n. 5, p. 378-384, 1993.

COOPER, A.; KRISTAL, B. Multiple roles of glutathione in the central nervous system. **Biological Chemistry**, v. 378, n. 8, p. 793-802, 1997.

COSTA, L. G. et al. Developmental neuropathology of environmental agents. **Annual Review of Pharmacology and Toxicology**, v. 44, p. 87-110, 2004.

COSTACHE, A. D. et al. Homology-modeled ligand-binding domains of zebrafish estrogen receptors α , β 1, and β 2: from *in silico* to *in vivo* studies of estrogen interactions in *Danio rerio* as a model system. **Molecular Endocrinology**, v. 19, n. 12, p. 2979-2990, 2005.

CRESTANI, M. et al. Effect of clomazone herbicide on biochemical and histological aspects of silver catfish (*Rhamdia quelen*) and recovery pattern. **Chemosphere**, v. 67, n. 11, p. 2305-2311, 2007.

ÇAĞLAR, S.; KOLANKAYA, D. The effect of sub-acute and sub-chronic exposure of rats to the glyphosate-based herbicide Roundup. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 25, n. 1, p. 57-62, 2008.

ÇAKICI, Ö.; ÜÇÜNCÜ, S. İ. Oocyte development in the zebrafish, *Danio rerio* (Teleostei: Cyprinidae). **Journal of Fisheries & Aquatic Science**, v. 24, n. 1-2, p. 137-141, 2007.

ÇAVAŞ, T.; ERGENE-GÖZÜKARA, S. Induction of micronuclei and nuclear abnormalities in *Oreochromis niloticus* following exposure to petroleum refinery and chromium processing plant effluents. **Aquatic Toxicology**, v. 74, n. 3, p. 264-271, 2005.

ÇAVAŞ, T.; KÖNEN, S. Detection of cytogenetic and DNA damage in peripheral erythrocytes of goldfish (*Carassius auratus*) exposed to a glyphosate formulation using the micronucleus test and the comet assay. **Mutagenesis**, v. 22, n. 4, p. 263-268, 2007.

DADZIE, S.; WANGILA, B. C. C. Reproductive biology, length-weight relationship and relative condition of pond raised *Tilapia zilli* (Gervais). **Journal of Fish Biology**, v. 17, n. 3, p. 243-253, 1980.

ELLMAN, G. L. Tissue sulfhydryl groups. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 82, n. 1, p. 70-77, 1959.

FANTA, E. et al. Histopathology of the fish *Corydoras paleatus* contaminated with sublethal levels of organophosphorus in water and food. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 54, n. 2, p. 119-130, 2003.

FISHELSON, L. et al. Some aspects of the reproductive biology of *Barbus spp.*, *Capoeta damascina* and their hybrids (Cyprinidae, Teleostei) in Israel. **Hydrobiologia**, v. 317, n. 1, p. 79-88, 1996.

GASNIER, C. et al. Glyphosate-based herbicides are toxic and endocrine disruptors in human cell lines. **Toxicology**, v. 262, n. 3, p. 184-191, 2009.

GEHIN, A.; GUYON, C.; NICOD, L. Glyphosate-induced antioxidant imbalance in HaCaT: the protective effect of vitamins C and E. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 22, n. 1, p. 27-34, 2006.

GERLAI, R. *Zebra Fish: an uncharted behavior genetic model*. **Behavior Genetics**, v. 33, n. 5, p. 461-468, 2003.

GIESY, J.; DOBSON, S.; SOLOMON, K. Ecotoxicological Risk Assessment for Roundup® Herbicide. In: WARE, G. (Ed.). **Reviews of Environmental Contamination and Toxicology**: Springer New York, v.167,. cap. 2, p.35-120, 2000.

GLUSCZAK, L. et al. Acute effects of glyphosate herbicide on metabolic and enzymatic parameters of silver catfish (*Rhamdia quelen*). **Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology**, v. 146, n. 4, p. 519-524, 2007.

GÖKÇE, M. A.; CENGİZLER, İ.; ÖZAK, A. A. Gonad Histology and Spawning Pattern of the White Grouper (*Epinephelus aeneus*) from İskenderun Bay (Turkey). **Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences**, v. 27, n. 4, p. 957-964, 2003.

GRIER, H. J. The germinal epithelium: its dual role in establishing male reproductive classes and understanding the basis for indeterminate egg production in female fishes. Proceedings of the fifty-third Annual of the Gulf and Caribbean. Fisheries Institute, p.537-552, 2002.

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

GRIVICICH, I.; REGNER, A.; ROCHA, A. B. Apoptosis: programmed cell death. **Revista Brasileira de Cancerologia**, v. 53, n. 3, p. 335-343, 2007.

GROSELL, M.; WOOD, C. M. Copper uptake across rainbow trout gills mechanisms of apical entry. **Journal of Experimental Biology**, v. 205, n. 8, p. 1179-1188, 2002.

GUILHERME, S. et al. DNA damage in fish (*Anguilla anguilla*) exposed to a glyphosate-based herbicide – Elucidation of organ-specificity and the role of oxidative stress. **Mutation Research**, v. 743, n. 1–2, p. 1-9, 2012.

GURAYA, S. S. **The cell and molecular biology of fish oogenesis**. Switserland: Karger Medical and Scientific Publishers, 1986.

HARAYASHIKI, C. A. Y. et al. Toxic effects of the herbicide Roundup in the guppy *Poecilia vivipara* acclimated to fresh water. **Aquatic Toxicology**, v. 142–143, n. 0, p. 176-184, 2013.

HARDERSEN, S.; WRATTEN, S. The effects of carbaryl exposure of the penultimate larval instars of *Xathocnemis zealandica* on emergence and fluctuating asymmetry. **Ecotoxicology**, v. 7, n. 5, p. 297-304, 1998.

HEDBERG, D.; WALLIN, M. Effects of Roundup and glyphosate formulations on intracellular transport, microtubules and actin filaments in *Xenopus laevis* melanophores. **Toxicology in Vitro**, v. 24, n. 3, p. 795-802, 2010.

HEU, C. et al. A step further toward glyphosate-induced epidermal cell death: Involvement of mitochondrial and oxidative mechanisms. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 34, n. 2, p. 144-153, 2012.

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

HOIVIK, E. A. et al. Molecular aspects of steroidogenic factor 1 (SF-1). **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 315, n. 1–2, p. 27-39, 2010.

HOKANSON, R. et al. Alteration of estrogen-regulated gene expression in human cells induced by the agricultural and horticultural herbicide glyphosate. **Human & Experimental Toxicology**, v. 26, n. 9, p. 747-752, 2007.

HOWELLS, L.; BETTS, T. A beginner's guide to the zebrafish (*Danio rerio*). **Animal Technology and Welfare**, v. 8, n. 3, p. 117-163, 2009.

HUBER, P. C.; ALMEIDA, W. P.; FATIMA, A. D. Glutathione e enzimas relacionadas: papel biológico e importância em processos patológicos. **Química Nova**, v. 31, n. 5, p. 1170-1179, 2008.

IBGE. **Indicadores de Desenvolvimento Sustentável**. Rio de Janeiro: 2010.

IKEDA, Y. et al. Characterization of the mouse FTZ-F1 gene, which encodes a key regulator of steroid hydroxylase gene expression. **Molecular Endocrinology**, v. 7, n. 7, p. 852-860, 1993.

INOHARA, N.; NUNEZ, G. Genes with homology to mammalian apoptosis regulators identified in zebrafish. **Cell Death And Differentiation**, v. 7, n. 5, p. 509-510, 2000.

KIME, D. E. The effects of pollution on reproduction in fish. **Reviews in Fish Biology and Fisheries**, v. 5, n. 1, p. 52-95, 1995.

KNIE, J. L.; LOPES, E. W. **Testes ecotoxicológicos: métodos, técnicas e aplicações**. FATMA/GTZ, 2004.

KORTNER, T. M.; PAVLIKOVA, N.; ARUKWE, A. Effects of tributyltin on salmon interrenal CYP11beta, steroidogenic factor-1 and glucocorticoid receptor transcripts in the presence and absence of second messenger activator, forskolin. **Marine Environmental Research**, v. 69, p. 56-58, 2010.

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

LAW, J. M. Mechanistic considerations in small fish carcinogenicity testing. **ILAR Journal**, v. 42, n. 4, p. 274-284, 2001.

LAWRENCE, C. The husbandry of zebrafish (*Danio rerio*): A review. **Aquaculture**, v. 269, n. 1, p. 1-20, 2007.

LETAI, A. et al. Distinct BH3 domains either sensitize or activate mitochondrial apoptosis, serving as prototype cancer therapeutics. **Cancer Cell**, v. 2, n. 3, p. 183-192, 2002.

LEU, J. J. et al. Mitochondrial p53 activates Bak and causes disruption of a Bak-Mcl1 complex. **Nature Cell Biology**, v. 6, n. 5, p. 443-450, 2004.

LI, W.-M. et al. 3, 4-Dichloroaniline-induced oxidative stress in liver of crucian carp (*Carassius auratus*). **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 56, n. 2, p. 251-255, 2003.

LIESCHKE, G. J.; CURRIE, P. D. Animal models of human disease: zebrafish swim into view. **Nature Reviews Genetics**, v. 8, n. 5, p. 353-367, 2007.

LIVINGSTONE, D. Contaminant-stimulated reactive oxygen species production and oxidative damage in aquatic organisms. **Marine Pollution Bulletin**, v. 42, n. 8, p. 656-666, 2001.

LOWRY, O. H. et al. Protein measurement with the Folin phenol reagent. **Journal of Biological Chemistry**, v. 193, n. 1, p. 265-275, 1951.

LUSHCHAK, O. V. et al. Low toxic herbicide Roundup induces mild oxidative stress in goldfish tissues. **Chemosphere**, v. 76, n. 7, p. 932-937, 2009.

MALLAT, E.; BARCELÓ, D. Analysis and degradation study of glyphosate and of aminomethylphosphonic acid in natural waters by means of polymeric and ion-exchange solid-phase extraction columns followed by ion chromatography–post-column derivatization with fluorescence detection. **Journal of Chromatography A**, v. 823, n. 1–2, p. 129-136, 1998.

MANDARIM-DE-LACERDA, C. A. Stereological tools in biomedical research. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 75, p. 469-486, 2003.

MARACINE, M.; SEGNER, H. Cytotoxicity of metals in isolated fish cells: Importance of the cellular glutathione status. **Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology**, v. 120, n. 1, p. 83-88, 1998.

MARTINEZ, C. B. R.; CÓLUS, I. M. S. Biomarcadores em peixes neotropicais para o monitoramento da poluição aquática na bacia do rio Tibagi. **Londrina, PR: ME Medri**, p. 551-577, 2002.

McCULLOUGH, K. D. et al. Gadd153 sensitizes cells to endoplasmic reticulum stress by down-regulating Bcl2 and perturbing the cellular redox state. **Molecular and Cellular Biology**, v. 21, n. 4, p. 1249-1259, 2001.

McMILLAN, D. B. **Fish histology: female reproductive systems**. New York: Springer Science & Business Media, 2007.

MENEZES, C. D. et al. 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.

MENGERINK, K. J.; VACQUIER, V. D. Glycobiology of sperm-egg interactions in deuterostomes. **Glycobiology**, v. 11, n. 4, p. 37R-43R, 2001.

MENSAH, P. K.; MULLER, W. J.; PALMER, C. G. Acute toxicity of Roundup^(R) herbicide to three life stages of the freshwater shrimp *Caridina nilotica* (Decapoda: Atyidae). **Physics And Chemistry Of The Earth**, v. 36, n. 14-15, p. 905-909, 2011.

MIGUET-ALFONSI, C. et al. Analysis of oxidative processes and of myelin figures formation before and after the loss of mitochondrial transmembrane potential during 7beta-hydroxycholesterol and 7-ketocholesterol-induced apoptosis: comparison with various pro-apoptotic chemicals. **Biochemistry and Pharmacology**, v. 64, n. 3, p. 527-541, 2002.

MINK, P. J. et al. Epidemiologic studies of glyphosate and non-cancer health outcomes: A review. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, v. 61, n. 2, p. 172-184, 2011.

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

MONTEIRO, D. A. et al. Oxidative stress biomarkers in the freshwater characid fish, *Brycon cephalus*, exposed to organophosphorus insecticide Folisuper 600 (methyl parathion). **Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology**, v. 143, n. 2, p. 141-149, 2006.

MOZETO, A.; ZAGATTO, P. Introdução de agentes químicos no ambiente. In: (Ed.). **Ecotoxicologia Aquática: Princípios e Aplicações**. São Carlos: Rima Editora, 2006. cap. 2, p.295-320.

NEŠKOVIĆ, N. K. et al. biochemical and histopathological effects of glyphosate on carp, *Cyprinus carpio* L. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 56, n. 2, p. 295-302, 1996.

NIMMO, D. R. Pesticides. In: RAND, G. M. e PETROCELLI, S. R. (Ed.). **Fundamentals of Aquatic Toxicology: Methods and Applications**. New York: Hemisphere Publishing, 1985. p.335-373.

OHKAWA, H.; OHISHI, N.; YAGI, K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. **Analytical Biochemistry**, v. 95, n. 2, p. 351-358, 1979.

OHTA, T. et al. Cortical alveolus breakdown in the eggs of the freshwater teleost *Rhodeus ocellatus ocellatus*. **The Anatomical record**, v. 227, n. 4, p. 486-496, 1990.

OLIVEIRA, A. G. et al. Effects of the herbicide Roundup on the epididymal region of drakes *Anas platyrhynchos*. **Reproductive Toxicology**, v. 23, n. 2, p. 182-191, 2007.

OSTERBERG, J. S. et al. Acute toxicity and sub-lethal effects of common pesticides in post-larval and juvenile blue crabs, *Callinectes sapidus*. **Journal of Experimental Marine Biology and Ecology**, v. 424–425, n. 0, p. 5-14, 2012.

PARKER, K. L.; SCHIMMER, B. P. Steroidogenic Factor 1: A Key Determinant of Endocrine Development and Function. **Endocrine Reviews**, v. 18, n. 3, p. 361-377, 1997.

PARNG, C. et al. Zebrafish: a preclinical model for drug screening. **Assay And Drug Development Technologies**, v. 1, n. 1, p. 41-48, 2002.

PARVEZ, S.; RAISUDDIN, S. Protein carbonyls: novel biomarkers of exposure to oxidative stress-inducing pesticides in freshwater fish *Channa punctata* (Bloch). **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 20, n. 1, p. 112-117, 2005.

PATIÑO, R.; SULLIVAN, C. Ovarian follicle growth, maturation, and ovulation in teleost fish. **Fish Physiology and Biochemistry**, v. 26, n. 1, p. 57-70, 2002.

PATTERSON, M.; BRANCH, E. F. Analysis of risks to endangered and threatened salmon and steelhead 2004.

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

POLETTA, G. L. et al. Genetic, enzymatic and developmental alterations observed in *Caiman latirostris* exposed *in ovo* to pesticide formulations and mixtures in an experiment simulating environmental exposure. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 74, n. 4, p. 852-859, 2011.

QUAGIO-GRASSIOTTO, I.; WILDNER, D. D.; ISHIBA, R. Gametogênese de peixes: aspectos relevantes para o manejo reprodutivo. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 37, n. 2, p. 181-191, 2013.

RAND, G.; WELLS, P.; MCCARTY, L. Introduction to aquatic toxicology. In: (Ed.). **Fundamentals of Aquatic Toxicology Effects, Environmental Fate, and Risk Assessment**. 2. North Palm Beach, Florida, USA: Taylor and Francis Publishers, 1995. p.3-67.

RASHED, M. N. Monitoring of environmental heavy metals in fish from Nasser Lake. **Environment International**, v. 27, n. 1, p. 27-33, 2001.

RELYEA, R. A. The lethal impact of Roundup on aquatic and terrestrial amphibians **Ecological Applications**, v. 15, n. 4, p. 1118-1124, 2005.

RICHARD, S. et al. Differential effects of glyphosate and roundup on human placental cells and aromatase. **Environmental Health Perspectives**, v. 113, n. 6, p. 716-720, 2005.

RICO, E. P. et al. Chronic ethanol treatment alters purine nucleotide hydrolysis and nucleotidase gene expression pattern in zebrafish brain. **NeuroToxicology**, v. 32, n. 6, p. 871-878, 2011.

RIZZO, E. et al. Oocyte surface in four teleost fish species postspawning and fertilization. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 41, p. 37-48, 1998.

ROMANO, R. M.; ROMANO, M. A.; DE OLIVEIRA, C. A. Glifosato como desregulador endócrino químico **Ambiência**, v. 5, n. 2, p. 359-372, 2009.

ROMANO, R. M.; ROMANO, M. A.; BERNARDI, M. M.; FURTADO, P. V.; OLIVEIRA, C. A. Prepubertal exposure to commercial formulation of the herbicide glyphosate alters testosterone levels and testicular morphology. **Archives of Toxicology**, v. 84, n. 4, p. 309-317, 2010.

RUBINSTEIN, A. L. Zebrafish: from disease modeling to drug discovery. **Current Opinion in Drug Discovery and Development**, v. 6, n. 2, p. 218-223, 2003.

RUEGG, E. F. et al. **O impacto dos agrotóxicos sobre o ambiente, a saúde ea sociedade**. Ícone, 1986.

SABIK, H.; JEANNOT, R.; RONDEAU, B. Multiresidue methods using solid-phase extraction techniques for monitoring priority pesticides, including triazines and degradation products, in ground and surface waters. **Journal of Chromatography A**, v. 885, n. 1-2, p. 217-236, 2000.

SANDRINI, J. Z. et al. Effects of glyphosate on cholinesterase activity of the mussel *Perna perna* and the fish *Danio rerio* and *Jenynsia multidentata*: *In vitro* studies. **Aquatic Toxicology**, v. 130-131, n. 0, p. 171-173, 2013.

SCAPIGLIATI, G.; MELONI, S.; MAZZINI, M. A monoclonal antibody against chorion proteins of the sea bass *Dicentrarchus labrax* (Linnaeus, 1758): studies of chorion precursors and applicability in immunoassays. **Biology of Reproduction**, v. 60, n. 4, p. 783-789, 1999.

SCHNEIDER, A. C. R. et al. Implementação de um Novo Modelo de Experimentação Animal-Zebrafish. **Clinical and Biomedical Research**, v. 29, n. 2, p. 100-103, 2009.

SCHULZ, R. W. et al. Spermatogenesis in fish. **General and Comparative Endocrinology**, v. 165, n. 3, p. 390-411, 2010.

SEGNER, H. Zebrafish (*Danio rerio*) as a model organism for investigating endocrine disruption. **Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology**, v. 149, n. 2, p. 187-195, 2009.

SELMAN, K.; WALLACE, R. A. Cellular aspects of oocyte growth in teleosts. **Zoological Science**, v. 6, n. 2, p. 211-231, 1989.

SEVGILER, Y.; ORUÇ, E. Ö.; ÜNER, N. Evaluation of etoxazole toxicity in the liver of *Oreochromis niloticus*. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 78, n. 1, p. 1-8, 2004.

SHACKLEY, S. E.; KING, P. E. Oogenesis in a marine teleost, *Blennius pholis* L. **Cell and Tissue Research**, v. 181, p. 105-128, 1977.

SHIOGIRI, N. S. et al. 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.

SILVA, C. M. M. D. S.; FAY, E. F. **Agrotóxico e ambiente**. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, 2004.

SOLOMON, K.; THOMPSON, D. Ecological risk assessment for aquatic organisms from over-water uses of glyphosate. **Journal of Toxicology and Environmental Health, Part B**, v. 6, n. 3, p. 289-324, 2003.

SONNENSCHNEIN, C.; SOTO, A. M. An updated review of environmental estrogen and androgen mimics and antagonists. **The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology**, v. 65, n. 1–6, p. 143-150, 1998.

SOSO, A. B. et al. Chronic exposure to sub-lethal concentration of a glyphosate-based herbicide alters hormone profiles and affects reproduction of female Jundiá (*Rhamdia quelen*). **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 23, n. 3, p. 308-313, 2007.

SOUZA, A. P. D. et al. Respiração microbiana do solo sob doses de *glyphosate* e de *imazapyr*. **Planta Daninha**, v. 17, n. 3, p. 387-398, 1999.

SUGAWARA, T. et al. Steroidogenic factor 1-dependent promoter activity of the human steroidogenic acute regulatory protein (StAR) gene. **Biochemistry**, v. 35, n. 28, p. 9052-9059, 1996.

SUSNOW, N. et al. Bcl-2 family proteins as regulators of oxidative stress. **Seminars in Cancer Biology**, v. 19, n. 1, p. 42-49, 2009.

SZAREK, J. et al. Effects of the herbicide Roundup™ on the ultrastructural pattern of hepatocytes in carp (*Cyprinus carpio*). **Marine Environmental Research**, v. 50, n. 1–5, p. 263-266, 2000.

THOMPSON, J. A.; FRANKLIN, C. C. Enhanced glutathione biosynthetic capacity promotes resistance to As^{3+} - induced apoptosis. **Toxicology Letters**, v. 193, n. 1, p. 33-40, 2010.

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

ÜNAL, G.; KARAKIŞI, H.; ELP, M. Ovarian follicle ultrastructure and changes in levels of ovarian steroids during oogenesis in *Chalcalburnus tarichi* Pallas, 1811. **Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences**, v. 29, n. 3, p. 645-653, 2005.

ÜNER, N.; ORUÇ, E.; SEVGILER, Y. Oxidative stress-related and ATPase effects of etoxazole in different tissues of *Oreochromis niloticus*. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 20, n. 1, p. 99-106, 2005.

USEPA. **Research Plan for Endocrine Disruptors**. AGENCY, U. S. E. P. Washington 1998.

VAN DER OOST, R.; BEYER, J.; VERMEULEN, N. P. E. Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 13, n. 2, p. 57-149, 2003.

VAN DER VEN, L.; WESTER, P. Histology and histopathology atlas of the zebrafish 2003. Disponível em: < <http://zfishtoxpat.comoj.com/> >. Acesso em: 02/03/2014.

VEIGA, M. M. et al. Análise da contaminação dos sistemas hídricos por agrotóxicos numa pequena comunidade rural do Sudeste do Brasil. **Caderno Saúde Pública**, v. 22, n. 11, p. 2391-2399, 2006.

WALSH, L. P. et al. Roundup inhibits steroidogenesis by disrupting steroidogenic acute regulatory (StAR) protein expression. **Environmental Health Perspectives**, v. 108, n. 8, p. 769-776, 2000.

WARMAN, D. M. et al. Three new SF-1 (*NR5A1*) gene mutations in two unrelated families with multiple affected members: within-family variability in 46,XY subjects and low ovarian reserve in fertile 46,XX subjects. **Hormone Research in Paediatrics**, v. 75, n. 1, p. 70-77, 2011.

WAUCHOPE, R. D. et al. The SCS/ARS/CES pesticide properties database for environmental decision-making. In: WARE, G. (Ed.). **Reviews of Environmental Contamination and Toxicology**: Springer New York, v.123., cap. 1, p.1-155,1992.

WEBSTER, T. M. U. et al. Effects of Glyphosate and its Formulation, Roundup, on Reproduction in Zebrafish (*Danio rerio*). **Environmental Science & Technology**, v. 48, n. 2, p. 1271-1279, 2014.

WEI, M. C. et al. Proapoptotic BAX and BAK: a requisite gateway to mitochondrial dysfunction and death. **Science**, v. 292, n. 5517, p. 727-730, 2001.

WEIBEL, E. R.; KISTLER, G. S.; SCHERLE, W. F. Practical stereological methods for morphometric cytology. **The Journal of Cell Biology**, v. 30, n. 1, p. 23-38, 1966.

WEST, G. Methods of Assessing Ovarian development in Fishes: a Review. **Marine and Freshwater Research**, v. 41, n. 2, p. 199-222, 1990.

WILLEY, J. B.; KRONE, P. H. Effects of endosulfan and nonylphenol on the primordial germ cell population in pre-larval zebrafish embryos. **Aquatic Toxicology**, v. 54, n. 1-2, p. 113-123, 2001.

WILLIAMS, G. M.; KROES, R.; MUNRO, I. C. Safety evaluation and risk assessment of the herbicide roundup and its active ingredient, glyphosate, for humans. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, v. 31, n. 2, p. 117-165, 2000.

WILSON, J. M.; BUNTE, R. M.; CARTY, A. J. Evaluation of rapid cooling and tricaine methanesulfonate (MS222) as methods of euthanasia in zebrafish (*Danio rerio*). **Journal of the American Association for Laboratory Animal Science**, v. 48, n. 6, p. 785-789, 2009.

YU, S. et al. Binding of rainbow trout sperm to egg is mediated by strong carbohydrate-to-carbohydrate interaction between (KDN)GM3 (deaminated neuraminyl ganglioside) and Gg3-like epitope. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 99, n. 5, p. 2854-2859, 2002.

(YÖN), N. D. Y. K.; AYTEKIN, Y.; YÜCE, R. Ovary maturation stages and histological investigation of ovary of the Zebrafish (*Danio rerio*). **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 51, p. 513-522, 2008.

ANEXO 1

200813

file:///C:/br/igf/ceua/ufsc/48626669911088325702060755330917570833713c7383257a14006e6e7f?OpenDocument

Resultado de Solicitação de Protocolo

Protocolo
PP00746

Título

AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE CELULAR E BIOQUÍMICA DO GLIFOSATO SOBRE AS GÔNADAS DO PEIXE *Danio rerio* (Ham.Bon., 1822)

Data de Entrada

19/04/2012

Resultado:

Aprovado

Data/Prazo

01/06/2012

Considerações

Ofício nº 43/CEUA/PRPE/2012

Do: Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais-CEUA

Ao(s): Prof(a) Dr(a) Yara Maria Rauh Müller, Departamento de Biologia Celular, Embriologia e Genética - CCB

Prezado(a) Professor(a),

Em relação ao protocolo de pesquisa sob sua responsabilidade a CEUA deliberou o seguinte:

- APROVADO, por dois anos para a utilização de cento e quarenta e quatro peixes (*Danio rerio*).
- Procedência do animal: Lojas de animais aquáticos

Por ocasião do término desse protocolo, DEVERÁ SER APRESENTADO RELATÓRIO detalhado relacionando o uso de animais no Projeto desenvolvido aos resultados obtidos, conforme formulário ON LINE CEUA.

Atenciosamente,

Relatório Final previsto para (90 dias após término da vigência do protocolo ou no momento da apresentação de um novo protocolo)

Data 05/09/2014

Data: 05/06/2012

Parecer(es):



Prof. Assoc. Carlos Rogério Tonussi, D.Sc.
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS – PRPE – UFSC
PRESIDENTE