

EFEITO DE DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DO HERBICIDA ROUNDUP® SOBRE A EXPRESSÃO GÊNICA DA ENZIMA CATALASE EM PEIXES-REI (*Odontesthes humenis* DE BUEN, 1953)

BRUNA FAGUNDES BARRETO¹; LUCAS DOS SANTOS DA SILVA¹; AMANDA
WEEGE DA SILVEIRA MARTINS¹; WILLIAM BORGES DOMINGUES¹; TONY
SILVEIRA¹; VINICIUS FARIAS CAMPOS².

¹Laboratório de Genômica Estrutural, CDTec, UFPel – brunaf.barreto@live.com

²Laboratório de Genômica Estrutural, CDTec, UFPel – fariascampos@gmail.com

1. INTRODUÇÃO

O Roundup® é o principal herbicida utilizado à base de glifosato. Os surfactantes presentes em sua composição são de interesse para o controle de sementes de plantas daninhas aquáticas (LUSHCHAK et al., 2009). Dessa forma, o Roundup® é ampla e tradicionalmente utilizado na orizicultura da região sul do Rio Grande do Sul. Mais recentemente, com a inserção da sojicultura na região, a utilização do glifosato tem aumentado significativamente a cada ano. Todavia, o herbicida, altamente solúvel em água, não fica restrito às lavouras e acaba por ser lixiviado para corpos d'água vizinhos e diluído em ambientes naturais (SALBEGO et al., 2010). No passado acreditava-se que os herbicidas à base de glifosato não eram tóxicos aos animais, visto que esses organismos não possuem a via metabólica do shiquimato, onde atua o princípio ativo das formulações comerciais (WHO, 1994). Porém, diversos estudos já mostraram nos últimos anos os efeitos tóxicos dos herbicidas baseados em glifosato em animais, principalmente quando expostos por longos períodos (LUSHCHAK et al., 2009). Tais herbicidas já foram relatados como tóxicos para diversas espécies de organismos aquáticos (PAGANELLI et al., 2010; ROY et al., 2016), inclusive para humanos (GASNIER et al., 2009). Atualmente poucos estudos avaliando a toxicidade de herbicidas à base de glifosato em espécies tipicamente distribuídas no extremo sul do Brasil têm sido realizados.

Uma das espécies animais silvestres que é rotineiramente exposta ao Roundup® oriundo da lixiviação agrícola no sul do Brasil é *Odontesthes humensis*. A espécie ocorre com frequência no sul da América do Sul. Nessa região, tem importância pela pesca esportiva e comercialização da carne. Sua utilização como modelo para estudos toxicológicos é interessante devido à sua alta exigência por qualidade de água. Por isso, se destaca como potencial bioindicador da qualidade da água ambiental no entorno de lavouras.

A fim de se avaliar o estresse sofrido pelos animais expostos a diferentes contaminantes, a mensuração da expressão de genes envolvidos em respostas ao estresse oxidativo é uma ferramenta valiosa. Dentre os genes mais utilizados como biomarcador está o gene da catalase. A catalase é uma enzima antioxidante presente em praticamente todos vertebrados e tem como principal função catalisar a decomposição peróxido de hidrogênio, um agente oxidante nocivo produzido em condições biológicas de estresse. O peróxido de hidrogênio tem de ser rapidamente convertido em uma espécie química que seja inócua ao organismo, devido ao fato do mesmo ser altamente tóxico às células.

Assim, o objetivo do presente estudo foi avaliar os efeitos genotóxicos do herbicida Roundup® sobre a expressão gênica da enzima catalase em *O. humensis*.

2. METODOLOGIA

A coleta de tecidos de peixe-rei foi realizada no município de Arroio Grande (RS), no Laboratório de Piscicultura na Barragem do Chasqueiro - UFPel. Os animais utilizados no estudo foram mantidos em tanques de 1000L, sendo alimentados três vezes ao dia, com controle da qualidade da água. Os peixes foram anestesiados com benzocaína, na dose de 50mg/L e posteriormente eutanasiados, através de secção medular.

A extração de RNA foi realizada com reagente TRIzol® a partir dos tecidos cerebrais coletados. Foram coletadas amostras de animais expostos por 9 dias a 2mg/L, a 4mg/L e a 8mg/L de glifosato e amostras controle (0mg/L de glifosato). A seguir ocorreu a medição de concentração e pureza das amostras de RNA através de espectrofotometria, para posterior confecção do DNA complementar (cDNA) através do *kit* comercial High-Capacity cDNA Reverse Transcription (Applied Biosystems, EUA).

Primers foram desenhados com o auxílio da ferramenta *online* PriFi (<http://cgi-www.daimi.au.dk/cgi-chili/PriFi/main>), tendo como base a análise de alinhamentos de sequências gênicas da Catalase de outros organismos, já depositadas no *GenBank*.

Para a amplificação do gene, foi utilizado como *template* o cDNA confeccionado. Foram realizadas reações de PCR com gradiente de temperatura na etapa de anelamento dos *primers*, variando de 50,2°C a 60°C. A confirmação da amplificação se deu através de eletroforese em gel de agarose 1,2%, seguida da purificação do produto, utilizando colunas com membrana de sílica para lavagem e precipitação, sendo o mesmo eluído com água estéril livre de enzimas DNase e RNase. O produto purificado foi posteriormente sequenciado através do método de Sanger automatizado, no Laboratório de Genômica Estrutural do CDTec - UFPel.

Após, foi realizado o alinhamento das sequências obtidas no sequenciamento, com o auxílio da ferramenta *ContigExpress* (Vector NTI Software, Thermo Fisher Scientific, EUA), obtendo-se, assim, uma sequência consenso do gene, a qual foi utilizada como base para o desenho de *primers* específicos para análise de expressão gênica.

A expressão relativa do gene da catalase foi avaliada por meio de reações de PCR em tempo real (RT-qPCR) no equipamento Agilent Mx3005P (Agilent Technologies, RU), utilizando o método matemático $2^{-\Delta\Delta C_t}$, o gene normalizador utilizado foi o da β -Actina.

Os dados obtidos foram submetidos ao teste estatístico de Kruskal-Wallis, seguido do teste post hoc de Dunns. O nível de significância adotado foi de $p < 0,05$. As análises estatísticas foram realizadas usando o pacote estatístico Statistix 8.0.

Todos os procedimentos descritos acima foram aprovados pelo Conselho de Ética em Experimentação animal da UFPel, sob o nº de processo 7018/2015-85.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Com o auxílio da ferramenta PriFi, foi obtido um par de *primers* senso e antisenso com 19 e 20 nucleotídeos, respectivamente.

A partir das reações de PCR e da visualização em gel de agarose 1,2%, foi possível definir uma temperatura ótima de anelamento dos *primers* de 55,2°C. Após o sequenciamento, obteve-se uma sequência consenso, a qual revelou 89% de

identidade com o gene da catalase de *Oplegnathus fasciatus*. O fragmento sequenciado foi depositado no *GenBank* sob o número de acesso KX184718.

Como demonstrado na Figura 1, os resultados do PCR em tempo real (RT-qPCR) revelaram que a expressão gênica da catalase não variou de acordo com as concentrações utilizadas neste estudo, quando comparadas ao controle sem exposição ao Roundup® ($p > 0,05$).

O estudo de Velasques et al. (2016) avaliando a expressão gênica e a atividade enzimática da catalase no fígado e em tecidos branquiais de *zebrafishes* (*Danio rerio*) expostos a 5 e 10mg/L de Roundup® por períodos de 24, 48, 72 e 96h, revelou que a expressão gênica da catalase também não demonstrou diferença significativa. Da mesma forma, Lushchak et al. (2009), avaliando a atividade enzimática da catalase em tecido encefálico de *goldfishes* (*Carassius auratus*) expostos a 2,5, 5, 10 e 20mg/L de Roundup® por 96h, não encontraram diferenças entre o grupo controle e os grupos expostos às diferentes concentrações do herbicida.

Dentre os órgãos afetados pela toxicidade de herbicidas à base de glifosato em peixes, o fígado se mostra o mais sensível e o mais afetado negativamente, e o cérebro se mostra mais resistente (LUSHCHAK et al., 2009). Dentre os órgãos avaliados por MODESTO E MARTINEZ (2010), o fígado se mostrou mais sensível, de fato. Seguindo essa máxima, a falta de resposta do tecido encefálico de *O. humensis* quanto aos níveis de expressão do gene da catalase sugere que o encéfalo de *O. humensis* é relativamente bem protegido contra a intoxicação por Roundup®.

Até o momento, nenhum estudo avaliando a toxicologia do herbicida Roundup® sobre a expressão gênica da Catalase havia sido realizado em nenhuma espécie de peixe-rei.

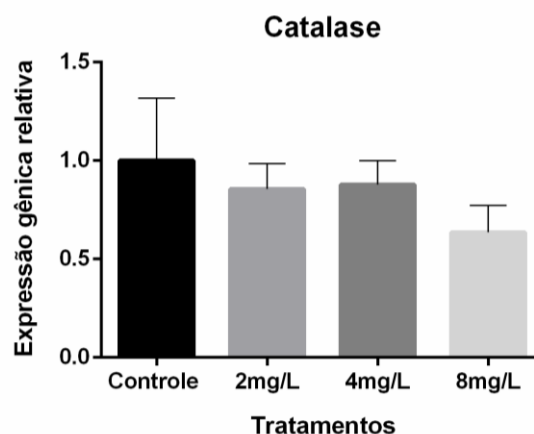


Figura 1. Expressão relativa do gene da catalase de espécimes de *Odontesthes humensis* submetidos a 0, 2, 4 e 8 mg/L de glifosato por 9 dias. Valores expressos como média \pm erro médio padrão.

4. CONCLUSÕES

O presente estudo fundamentou a hipótese de que o encéfalo de organismos aquáticos expostos ao herbicida Roundup®, podem não apresentar alterações na expressão do gene da catalase em decorrência do estresse oxidativo. Todavia, isso não significa afirmar que o herbicida não é tóxico para *O. humensis*, visto que apenas um gene de apenas um órgão foi avaliado. Mais avaliações estão sendo realizadas por nosso grupo de pesquisa a fim de esclarecer as respostas de *O. humensis* à exposição ao Roundup®.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

GASNIER, C.; DUMONT, C.; BENACHOUR, N.; CLAIR, E.; CHAGNON, M.; SERALINI, G. Glyphosate-based herbicides are toxic and endocrine disruptors in human cell lines. **Toxicology**, v. 262, n. 3, p. 184–191, 2009.

LUSHCHAK, V.; KUBRAK, I.; STOREY, M.; STOREY, B.; LUSHCHAK, I. Low toxic herbicide Roundup induces mild oxidative stress in goldfish tissues. **Chemosphere**, v. 76, n.7, p. 932-937, 2009.

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

PAGANELLI, A.; GNAZZO, V.; ACOSTA, H.; L. LÓPEZ, S.; E. CARRASCO, A. Glyphosate-Based Herbicides Produce Teratogenic Effects on Vertebrates by Impairing Retinoic Acid Signaling. **Chemical Research in Toxicology**, v. 23, n.10, p. 1586–1595, 2010.

SALBEGO, J.; PRETTO, A.; GIODA, C.; MENEZES, C.; LAZZARI, R.; NETO, J.; BALDISSEROTTO, B.; LORO, V. Herbicide Formulation with Glyphosate Affects Growth, Acetylcholinesterase Activity, and Metabolic and Hematological Parameters in Piava (*Leporinus obtusidens*). **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 58, n.3, p. 740-745, 2010.

ROY, N.; CARNEIRO, B.; OCHS, J. Glyphosate induces neurotoxicity in zebrafish. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 42, n.1, p. 45–54, 2016.

VELASQUES, R.; SANDRINI, J.; ROSA, C. Roundup in Zebrafish: Effects on Oxidative Status and Gene Expression. **Zebrafish**, v.0, n.0, p.1-10, 2016.

WHO. Glyphosate. **Environmental Health Criteria**. Geneva: World Health Organization, n. 159, 1994.