

CRESCIMENTO E REPRODUÇÃO DE OLIGOQUETAS (*E. andrei*) EXPOSTAS A DEJETOS DE BOVINOS SUBMETIDOS A PROTOCOLO HORMONAL DE INDUÇÃO DE LACTAÇÃO

LUCAS LOURENÇO CASTIGLIONI GUIDONI¹; RUBIANE BUCHWEITZ FICK²;
ÉRICO KUNDE CORRÊA³; BERNARDO GARZIERA GASPERIN⁴; RAFAEL
GIANELLA MONDADORI⁵; THOMAZ LUCIA JR⁶

¹*Universidade Federal de Pelotas – lucaslcg@gmail.com*

²*Universidade Federal de Pelotas – rubiane.fick1@gmail.com*

³*Universidade Federal de Pelotas – ericokundecorrea@yahoo.com.br*

⁴*Universidade Federal de Pelotas – bggasperin@gmail.com*

⁵*Universidade Federal de Pelotas – rgmondadori@gmail.com*

⁶*Universidade Federal de Pelotas – tluciajr@gmail.com*

1. INTRODUÇÃO

Compostos desreguladores endócrino, como estrógenos naturais produzidos por humanos ou animais, como 17 β -estradiol (E2), e hormônios sintéticos, como 17 β -estradiol-3-benzoato (BE), podem estar associadas a impactos negativos no ambiente (ESSID et al., 2021). Entre as fontes antropogênicas de poluição ambiental dessas moléculas, existe a preocupação com medicamentos veterinários, relacionado principalmente com a excreção dos fármacos ou seus metabolitos na urina e fezes (PARK et al., 2021).

Em bovinos, hormônios estão fisiologicamente presentes em diversos órgãos. Em vacas gestantes, a concentração de estrógenos durante o 3º trimestre de gestação pode ser 30 vezes maior do que no 1º trimestre (MALEKINEIAD; REZABAKHSH, 2015). Em relação a fontes exógenas, há uma ampla utilização de protocolos veterinários com hormônios para diversos fins na produção animal. Particularmente no bovino leiteiro, os distúrbios reprodutivos podem resultar em intervalo de parto prolongados, baixa produção de leite e perdas financeiras (PEREIRA et al., 2022). Para evitar custos da substituição prematura de vacas, é comum a aplicação de protocolos que imitam o perfil endócrino durante a gestação e a lactação, por meio da administração de BE e outras substâncias, para indução artificial de lactação (IAL). Nesse cenário, há dúvidas se esses hormônios podem contribuir para contaminação de recursos naturais ou causar outros impactos ambientais.

Os invertebrados, como as oligoquetas (Ex.: minhocas) são frequentemente utilizadas em bioensaios crônicos de ecotoxicidade, envolvendo substâncias químicas ou solos contaminados (NIVA; BROWN, 2019). Esta avaliação pode ocorrer através da mensuração de parâmetros de crescimento corporal, medido pela biomassa dos organismos, e outros parâmetros reprodutivos, como número de juvenis e casulos produzidos por estes organismos em condições controladas. No entanto, trabalhos que avaliem a ecotoxicidade do BE ainda são escassos.

O objetivo deste trabalho foi avaliar o crescimento e reprodução de minhocas expostas a um substrato constituído por amostras de fezes de bovinos submetidos a protocolo de indução artificial de lactação utilizando benzoato de estradiol.

2. METODOLOGIA

As amostras utilizadas neste estudo foram fezes coletadas de novilhas, que receberam protocolo de indução de lactação (G1), e de fêmeas em gestação natural (Gc) ($n=5$, em ambos), em propriedade rural da Rio Grande do Sul (30°S ; 55°W). Os animais são da raça Holandês, com média de 30 meses e 430 kg, mantidas em pasto natural, com suplementação alimentar, acesso a água e sal mineral.

O protocolo consistiu em i.m. injeções de 30 mg de BE (Gonadiol®) e 300 mg de progesterona (Sincrogest®) diariamente, do 1º ao 8º dia (D-21 a D -14 (D0 foi considerado o primeiro dia de ordenha) do 9º ao 14º (D-13 a D-7), as novilhas receberam apenas doses diárias de 20 mg de BE. Ao longo do protocolo foram administrados ainda cloprosteno sódico (Sincrocio®), dexametasona sódica (Cortiflan®) e somatotropina bovina (Lactotropin®).

Foram realizadas coletadas de amostras de fezes de cada animal em 12 dias distintos ($n=120$), manualmente diretamente do reto ou após espera na mangueira, (1L/vaca). No G1 as coletas foram em paralelo ao protocolo de IAL, previamente à ordenha (Figura 1). Para Gc, as coletas acontecerem no trimestre final da gestação. As amostras foram mantidas congelados a -20°C . Após homogeneização, duas sub amostras por grupo foram analisadas através do bioensaio com minhocas.

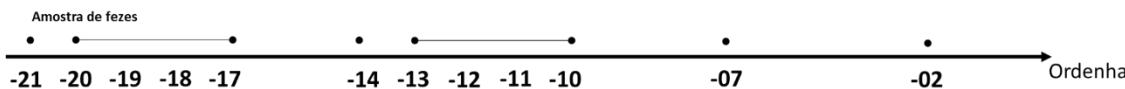


Figura 1. Dias de coleta de amostras de fezes de vacas durante protocolo de IAL.

Para o avaliar o crescimento e testar a reprodução de minhocas (OECD 222, 2016), os organismos-teste foram mantidos durante oito semanas em recipiente-teste contendo substrato constituído de amostras de fezes (G1 ou Gc) e solo artificial (25% amostra:75% solo artificial), ou apenas solo artificial (branco).

O recipiente teste foi becker de vidro de 1 L, coberto com material transparente e perfurado. O solo artificial foi preparado com 10 % turfa, 20 % caulim (mín 30% caulinita); 69% areia quartzosa industrial (mín 50% partículas com 0,05 – 2 mm); 0,3-1% CaCO₃ para ajuste do pH. A umidade foi ajustada (50-60%).

O teste foi conduzido em duplicatas, com 10 organismos e 600 g de substrato (amostra solo artificial) por recipiente. O procedimento também foi realizado apenas em solo artificial, sem adição de amostra. Ao total foram utilizadas 100 minhocas adultas com peso entre 300-400 mg e com clitelo desenvolvido (*Eisenia andrei* Bouché (1972), proveniente de criação no Lab. de Resíduos e Toxicologia Ambiental/UFPel. As matrizes foram doadas pelo minhocário da Embrapa Clima Temperado Estação Experimental Cascata/Pelotas-RS). A incubação foi durante 60 dias, em BOD ($20 \pm 2^{\circ}\text{C}$), com ciclo de luz/escuro de 16/8 hr (400-800 lx). O alimento semanal (5 g/recipiente) foi sobras de alimentos crus, secos em estufas à 65°C e triturados. A umidade foi conferida semanalmente e, quando necessário, adicionado 50 mL de H₂O_d por recipiente.

Após o período de incubação, foram determinados o peso dos organismos adultos em balança (precisão 0,0001 g), e a contagem manual dos juvenis e dos casulos. Para determinar a biomassa dos adultos foi realizado limpeza prévia com H₂O_d e secagem em papel toalha. Para facilitar a contagem dos juvenis foi utilizado banho maria por 20 min., partindo de 40°C para 60°C , forçando os organismos a submergir. Posteriormente, o substrato foi espalhado e examinado duas vezes.

Na análise estatística foi verificado o pressuposto de normalidade e comparado as médias dos grupos através de ANOVA, seguido de teste de Tukey.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

O peso das adultas foi diferente para G1 em relação ao Gc e ao solo artificial ($p<0,05$) (Fig.2.A). O nº de juvenis e de casulos não apresentaram diferenças entre os grupos ($p>0,05$) (Fig. 2. A e B). O registro fotográfico foi apresentado na Fig. 3.

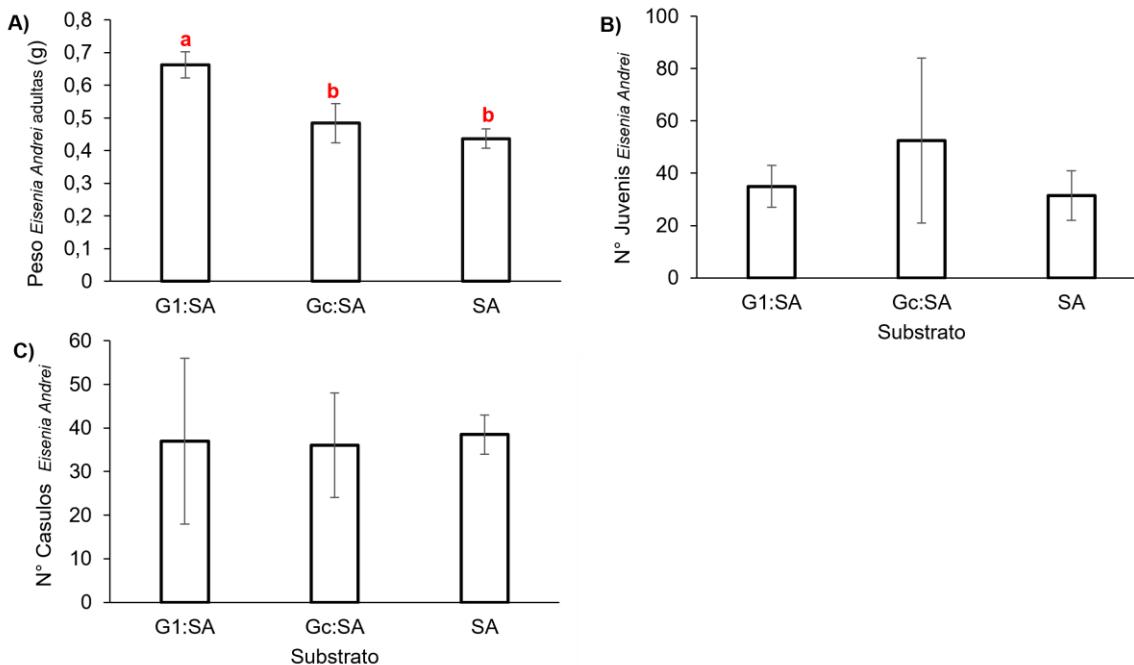


Figura 2. Teste de reprodução (*Eisenia andrei*) em amostra de fezes (25%) com solo artificial (75%) (média \pm EP). A) Peso dos organismos adultos; B) N° de juvenis; C) N°de casulos. ^{a, b}Letras minúsculas indicaram diferença estatística ($p < 0,05$). G1: fezes de vacas submetidas a IAL. Gc (controle): fezes de vacas em lactação natural. SA: solo artificial

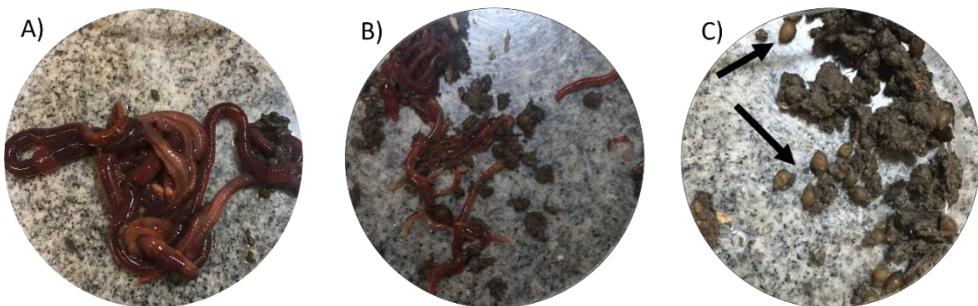


Figura 3 – Registro fotográfico do teste de reprodução com *Eisenia andrei*. A) organismos adultos após 60 dias; B) juvenis; C) casulos.

No caso de mamíferos, como em estudos utilizando camundongos, há registros das associações estrógenos, com a atividade corporal, frequência de alimentação e ganho de peso (WADE, 1972).

No estudo de MARKMAN et al. (2007), foram encontrados teores de aprox. 5 ng/g de estradiol (E_2) no tecido de minhocas expostas a esgoto doméstico, demonstrando que este organismo é capaz de assimilar este tipo de hormônio.

Porém, no estudo de HEGER et al. (2015), na exposição de *E. fetida* à concentrações pré-definidas de E_2 com solo artificial, não foi identificado aumento de biomassa corporal. No entanto foi registrado um aumento na capacidade reprodutiva de 24% na 50 ng/g e, de modo inverso, inibição 25% com 80 ng/g.

O nº mínimo de juvenis esperado para o teste com 10 organismos adultos é igual ou superior à 30 indivíduos (OECD 222, 2016). Enquanto para o nº de casulos, a média encontrada em solos-controle é próxima a 4 por organismo adulto (*E. andrei*), em teste controle (LIWARSKA-BIZUKOJC et al., 2023). No presente estudo, ambos parâmetros atingiram valores compatíveis com a literatura.

4. CONCLUSÕES

Foi identificada uma alteração no peso de minhocas adultas, após exposição de 60 dias a um substrato constituído por fezes de vacas que receberam um protocolo hormonal para indução de lactação com benzoato de estradiol. Não foi constatada nenhuma alteração na reprodução desses organismos em comparação com o teste realizado com fezes de bovinos em lactação natural.

Sugere-se que estudos sejam realizados, conhecendo com precisão os teores existentes de substâncias/hormônios nos substratos utilizados nos bioensaios.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ESSID, N.; FAIZA, M.; HEDFI, A.; ALMALKI, M.; URKMEZ, D.; BOUFAHJA, F. Toxicity of synthetic endocrine disrupting compounds on meiofauna: estradiol benzoate as a case study. **Environmental Pollution**, v. 286, 117300, 2021.
- HEGER, Z.; MICHALEK, P.; GURAN, R.; HAVELKOVA, B.; KOMINKOVA, M.; CERNEI, N.; RICHTERA, L.; BEKLOVA, M.; ADAM, V.; KIZEK, R. Exposure to 17 β -oestradiol induces oxidative stress in the nonoestrogen receptor invertebrate species *Eisenia fetida*. **PLoS ONE**, v. 10, e0145426, 2015.
- LIWARSKA-BIZUKOJC, E.; BERNAT, P.; JASIŃSKA, A. Effect of bio-based microplastics on earthworms *Eisenia andrei*. **Science of The Total Environment**, v. 898, p. 165423, 2023.
- MALEKINEJAD, H.; REZABAKHSH, A. Hormones in dairy foods and their impact on public health - a narrative review article. **Iranian Journal of Public Health**, v. 44, p. 742–758, 2015.
- MARKMAN, S., GUSCHINA, I. A., BARNSLEY, S., BUCHANAN, K. L., PASCOE, D., MÜLLER, C. T. Endocrine disrupting chemicals accumulate in earthworms exposed to sewage effluent. **Chemosphere**, v. 70, n. 1, p. 119-125, 2007.
- NIVA, C. C.; BROWN, G. G. **Ecotoxicologia terrestre: métodos e aplicações dos ensaios com oligoquetas**. Brasília, DF : Embrapa, 2019.
- OECD. Guideline for the testing of chemicals: **Test No. 222: Earthworm Reproduction Test (*Eisenia fetida/Eisenia andrei*)**. 2016
- PARK, Y.; PARK, J.; LEE, H. S. Endocrine disrupting potential of veterinary drugs by in vitro stably transfected human androgen receptor transcriptional activation assays. **Environmental Pollution**, 286, 2021. 117201.
- PEREIRA, M. H. C.; CAPPELLOZZA, B. I.; COSTA, W. M.; BARBOSA, L., CERRI, R. L. A.; VASCONCELOS, J. L. M. Effects of estradiol cypionate dose as an ovulatory stimulus on reproductive performance of lactating dairy cows during the summer season. **Theriogenology**, 182, 110-118, 2022
- WADE, G. N. Gonadal hormones and behavioral regulation of body weight. **Physiology & behavior**, v. 8, n. 3, p. 523-534, 1972.