

DA FISIOLOGIA ESPERMÁTICA AO EPIGENOMA: COMO O HERBICIDA ROUNDUP TRANSORB® AFETA A REPRODUÇÃO DO PEIXE-ANUAL *Garcialebias charrua*

ANTÔNIO DUARTE PAGANO¹; LEANDRO SILVA NUNES²; TONY LEANDRO REZENDE DA SILVEIRA³; MARIANA HÄRTER REMIÃO⁴; VINICIUS FARIAS CAMPOS⁵

¹Universidade Federal de Pelotas – antonioduartepagano@gmail.com

²Universidade Federal de Pelotas – leandrotsnunes@gmail.com

³Universidade Federal de Pelotas – silveira.tlr@gmail.com

⁴Universidade Federal de Pelotas – marri.hr@hotmail.com

⁵Universidade Federal de Pelotas – fariascampos@gmail.com

1. INTRODUÇÃO

A poluição química é reconhecida como um dos principais vetores de perda de biodiversidade e de degradação dos serviços ecossistêmicos, impactando diretamente a saúde ambiental. O Brasil, um dos países mais biodiversos do planeta, figura entre os maiores consumidores de pesticidas, com destaque para os herbicidas à base de glifosato (GBHs), amplamente aplicados em monocultivos e culturas transgênicas resistentes a esse composto (IBAMA, 2023). Entre esses produtos, o Roundup Transorb® (RDT) se destaca pela formulação com surfactante polioxietileno amina (POEA), que potencializa a penetração celular e agrava os impactos ecotoxicológicos (DE ARAUJO et al., 2023).

Embora o glifosato atue sobre uma enzima específica das plantas, evidências demonstram que suas formulações comerciais podem gerar efeitos adversos em organismos não alvo, incluindo peixes nativos de ambientes temporários. O peixe-anual *Garcialebias charrua*, criticamente ameaçado e endêmico de áreas do sul do Brasil, é particularmente vulnerável devido ao seu ciclo de vida curto e à dependência de eventos reprodutivos bem-sucedidos para a manutenção populacional (VOLCAN; LANÉS, 2018). Alterações reprodutivas decorrentes da exposição a GBHs já foram reportadas em diferentes espécies, abrangendo estresse oxidativo, desregulação endócrina, alterações histológicas e comprometimento da fertilidade (GROH et al., 2022; PAGANO et al., 2024).

Nos machos, a reprodução pode ser afetada tanto pela fisiologia espermática quanto pela regulação epigenética. A qualidade do sêmen é um fator crítico para o sucesso reprodutivo em peixes anuais, especialmente em espécies com janela reprodutiva restrita. Nesse contexto, análises computadorizadas como o *Computer Assisted Sperm Analysis* (CASA) oferecem parâmetros objetivos e quantitativos de motilidade espermática, período de motilidade e viabilidade seminal. Em paralelo, os microRNAs (miRNAs) emergem como biomarcadores epigenéticos sensíveis, capazes de regular processos celulares e moleculares fundamentais à espermatogênese, esteroidogênese e homeostase celular (GEBERT; MACRAE, 2019). A investigação integrada da fisiologia espermática e da expressão global de miRNAs testiculares em *G. charrua* permite avançar na compreensão dos mecanismos moleculares de toxicidade induzida por herbicidas, além de fornecer subsídios para estratégias de conservação da biodiversidade em ecossistemas altamente sensíveis, como o bioma Pampa.

Este estudo teve como objetivo avaliar os efeitos da exposição aguda ao herbicida RDT em machos de *G. charrua*, por meio da análise da qualidade espermática via CASA e do perfil global de expressão de microRNAs testiculares

por microRNA-Seq, buscando elucidar os mecanismos reprodutivos e epigenéticos associados à exposição.

2. METODOLOGIA

2.1 Coleta e aclimação

Foram coletados 54 espécimes de *G. charrua* (27 machos e 27 fêmeas) em áreas úmidas temporárias no distrito de Santa Isabel do Sul (Rio Grande, RS). Os espécimes foram coletados sob a licença IBAMA/SISBIO Nº 71072-4. Após a aclimação em laboratório, os peixes foram distribuídos nos experimentos. Os procedimentos de experimentação e manejo dos animais foram aprovados pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da UFPEL (119/2021/CEUA/REITORIA).

2.2 Experimento 1: Qualidade espermática

Machos foram expostos por 96 h ao RDT em duas concentrações: 0,065 mg·L⁻¹ (referência ambiental segundo CONAMA) e 5 mg·L⁻¹ (concentração desafio). A análise da qualidade espermática foi realizada por meio de CASA, avaliando parâmetros como motilidade, período de motilidade e porcentagem de células móveis.

2.3 Experimento 2: microRNAs testiculares

No segundo ensaio, os animais foram expostos à concentração de 5 mg·L⁻¹ de RDT e amostras testiculares foram submetidas ao sequenciamento de nova geração (NGS) na plataforma Illumina NovaSeq6000, visando identificar perfis de expressão diferencial de microRNAs.

2.4 Análises estatísticas

Os dados foram analisados por ANOVA seguida de teste de Tukey, enquanto a expressão diferencial de miRNAs foi determinada com DESeq2, considerando significância em $p < 0,05$ e FDR $< 0,05$.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A exposição aguda ao RDT resultou em efeitos adversos sobre a reprodução de *G. charrua* (Figura 1). No Experimento 1, a análise por CASA revelou que a concentração mais elevada (5 mg·L⁻¹) reduziu significativamente parâmetros de qualidade seminal. Esses achados reforçam a vulnerabilidade dos peixes anuais a contaminantes agrícolas, ressaltando a poluição química como um fator decisivo para a perda da biodiversidade e degradação dos serviços ecossistêmicos.

No Experimento 2, a análise NGS revelou um conjunto de microRNAs testiculares diferencialmente expressos após a exposição ao RDT. Esses miRNAs estão relacionados a vias biológicas críticas, incluindo espermatogênese, esteroidogênese, metabolismo energético e respostas ao estresse celular, indicando que o herbicida interfere não apenas na fisiologia espermática, mas também na regulação epigenética de processos-chave para a reprodução.

A identificação desses biomarcadores moleculares amplia a compreensão sobre os mecanismos de toxicidade do glifosato em peixes anuais, revelando potenciais impactos populacionais. Alterações tanto na qualidade espermática quanto na regulação epigenética sugerem que os efeitos do herbicida podem

comprometer o sucesso reprodutivo em curto prazo e, em perspectiva ecológica, agravar o risco de extinção de espécies sensíveis como *G. charrua*.

Além disso, os resultados obtidos dialogam com a literatura recente em ecotoxicologia, reforçando que biomarcadores epigenéticos, como os miRNAs, representam ferramentas estratégicas para avaliação precoce de danos ambientais (RAZA et al., 2022).

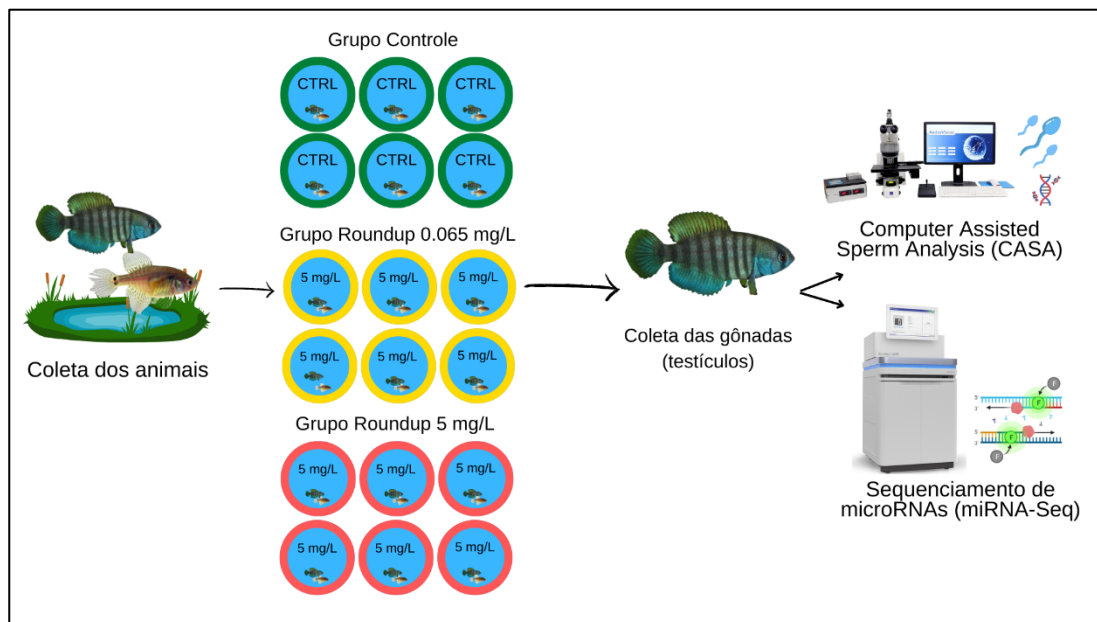


Figura 1. Delineamento experimental do estudo

4. CONCLUSÕES

O estudo evidencia, de forma inédita, os efeitos reprodutivos e epigenéticos do RDT em machos de *G. charrua*. A integração entre análises de qualidade espermática e perfis de microRNAs testiculares representa uma abordagem inovadora, com potencial para consolidar os miRNAs como biomarcadores-chave em ecotoxicologia. No contexto da conservação de peixes-anuais, compreender a resposta reprodutiva desses peixes frente à contaminação química é fundamental para proteger ecossistemas vulneráveis do Pampa, bioma criticamente ameaçado pela expansão agrícola intensiva.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

IBAMA. Relatórios de Comercialização de Agrotóxicos. **Boletim 2021. Os 10 IAs mais vendidos 2021.** Disponível em: <<https://www.gov.br/ibama/pt-br/assuntos/quimicos-e-biologicos/agrotoxicos/relatorios-de-comercializacao-de-agrotoxicos/relatorios-de-comercializacao-de-agrotoxicos#sobreosrelatorios>>, 2023. Acesso em 23/09/2024

DE ARAUJO, L.G., ZORDAN, D.F., CELZARD, A., FIERRO, V.M. Glyphosate uses, adverse effects and alternatives: focus on the current scenario in Brazil. **Environ. Geochem. Health.** 45(12), 9559-9582, 2023.

VOLCAN, M.V., LANÉS, L.E.K. Brazilian killifishes risk extinction. **Science**. 361(6400), 340–341, 2018.

GROH, K., VOM BERG, C., SCHIRMER, K., TILILI, A. Anthropogenic Chemicals As Underestimated Drivers of Biodiversity Loss: Scientific and Societal Implications. **Environ. Sci. Technol.** 56(2), 707-710, 2022.

GEBERT, L.F.R., MACRAE, I.J. Regulation of microRNA function in animals. **Nat. Rev. Mol. Cell Biol.** 20(1), 21-37, 2019.

RAZA, S.H.A., et al. MicroRNAs mediated environmental stress responses and toxicity signs in teleost fish species. **Aquaculture**. 546, 737310, 2022.

Pagano A.D., et al. Assessing reproductive effects and epigenetic responses in *Austrolebias charrua* exposed to Roundup Transorb®: Insights from miRNA profiling and molecular interaction analysis. **Environ Toxicol Pharmacol.** 110:104539, 2022.