

EFEITOS DO HERBICIDA ROUNDUP TRANSORB® NA EXPRESSÃO DE GENES ESTEROIDOGÊNICOS EM *Garcialebias charrua*

RAFAELA BOTELHO HACKBART¹; ANTÔNIO DUARTE PAGANO²; NATIÉLI MACHADO GONÇALVES³; KAYLANE VASCONCELOS PIEPER⁴; TONY LEANDRO REZENDE DA SILVEIRA⁵; MARIANA HÄRTER REMIÃO⁶

¹Universidade Federal de Pelotas – rafaela.ufpel24@gmail.com

²Universidade Federal de Pelotas – antonioduartepagano@gmail.com

³Universidade Federal de Pelotas – natielimgoncalves@gmail.com

⁴Universidade Federal de Pelotas – kaylanepvasconcelos@gmail.com

⁵Universidade Federal de Pelotas – silveira.tlr@gmail.com

⁶Universidade Federal de Pelotas – mh.remiao@gmail.com

1. INTRODUÇÃO

Atualmente, nos sistemas de produção agrícola em grandes propriedades rurais, é comum o uso de estratégias para reduzir as perdas de produtividade, entre elas, os tratamentos com uso de pesticidas. Dentre esses compostos, destacam-se os herbicidas à base de glifosato (GBHs), que figuram entre os defensivos agrícolas mais utilizados no mundo para o controle de ervas daninhas.

Entre os produtos disponíveis, destaca-se o Roundup Transorb® (RDT), um GBH amplamente empregado devido à sua elevada eficácia, atribuída à presença do surfactante Polioxietileno amina (POEA) em sua formulação, o qual potencializa a penetração do glifosato nos tecidos vegetais (MESNAGE et al., 2019). Entretanto, estudos recentes têm demonstrado que o RDT pode causar efeitos deletérios em espécies não-alvo, especialmente aquelas que habitam ecossistemas aquáticos. Isso ocorre porque, apesar de ser aplicado em ambientes terrestres, o produto pode ser lixiviado para corpos d'água, promovendo impactos ambientais significativos.

Entre as espécies possivelmente afetadas está *Garcialebias charrua*, um peixe-anual em grau de perigo de extinção (GROH et al., 2022, Portaria N° 445, 2022). O nome popular da espécie se deve ao seu ciclo de vida curto, já que esta espécie costuma viver em charcos temporários de água doce. Nessas poças, os indivíduos depositam seus ovos, que possuem a capacidade de se manter em diapausa em períodos de seca, eclodindo quando a água retorna. Entretanto, esses ambientes naturais encontram-se cada vez mais ameaçados por ações antrópicas, uma vez que os charcos temporários frequentemente se localizam em áreas como banhados urbanos e, principalmente, valas utilizadas para irrigação de plantações (VOLCAN, 2018).

Sendo assim, diante dos potenciais impactos ambientais associados ao uso do RDT e da vulnerabilidade da espécie *G. charrua*, estudos que investiguem os efeitos desse herbicida sobre organismos não-alvo são essenciais para compreender os riscos ecológicos e subsidiar estratégias de conservação. Nesse contexto, o presente trabalho teve como objetivo avaliar os efeitos da exposição ao RDT sobre genes envolvidos na esteroidogênese de *G. charrua*, por meio da análise de expressão gênica utilizando a técnica de PCR quantitativa (qPCR).

2. METODOLOGIA

2.1. Coleta dos animais, exposição e coleta de tecidos

Foram coletados 24 indivíduos adultos, sendo 12 machos e 12 fêmeas, da espécie *G. charrua* em charcos temporários no Distrito de Santa Isabel do Sul, Rio Grande do Sul, sob licença de coleta IBAMA/SISBIO 71072. Os peixes foram levados até o biotério em tanques com água do ambiente. No biotério os peixes foram alocados em aquários maturados de 7 litros com volume útil de 4 litros. Cada aquário contou com um casal, que era mantido separado fisicamente por uma divisória. Após período de aclimatação de 10 dias, os animais foram expostos ao herbicida RDT a 5mg/L durante 96h. Passado este período, os animais foram anestesiados com tricaina e eutanasiados por secção espinhal para a coleta de ovários e testículos. O uso animal, bem como as práticas de manejo foram aprovadas por comitês de ética em experimentação animal (CEEA UFPEL 145/2019).

2.2. Extração de RNA, síntese de cDNA e qPCR

Os tecidos coletados foram submetidos à extração do RNA utilizando o método clássico de TRIzol® Reagent (Invitrogen, USA) seguindo as instruções do fabricante. Em seguida, procedeu-se a síntese do DNA complementar (cDNA) utilizando kit comercial High Capacity cDNA Reverse Transcription (Applied Biosystems, USA). As amplificações dos genes alvo aromatase (*cyp19a1a*), receptor de estrogênio (*esr2a*), hydroxy-delta-5-steroid dehydrogenase (*hsd3b1*) e hydroxysteroid dehydrogenase 12a (*hsd17b12a*) foram realizadas por PCR em tempo real (qPCR), utilizando o equipamento QuantStudio™ 3 (Applied Biosystems, EUA) e o reagente GoTaq® qPCR Master Mix (Promega, EUA).

As condições de amplificação foram as seguintes: pré-incubação a 95 °C por 10 min; 40 ciclos de desnaturação a 95 °C por 15 s, anelação e extensão a 60 °C por 60 s, e, por fim, a etapa necessária para calcular a curva de fusão. O valor Ct foi determinado pelo número de ciclos necessários para atingir o limiar de fluorescência. O método 2- $\Delta\Delta CT$ (LIVAK E SCHMITTGEN, 2001) foi empregado, usando 18 s e *ef1α* como genes de referência para a normalização dos níveis de expressão de mRNA.

2.3. Análise estatística

A distribuição normal dos dados quantitativos da expressão gênica relativa foi analisada utilizando o teste de Shapiro-Wilk. A homogeneidade entre os grupos foi avaliada por meio do teste F. Em seguida, a diferença estatística entre os grupos foi determinada utilizando o teste t de Student não pareado. Os resultados foram expressos como valores médios para cada conjunto de dados \pm erro padrão da média (SEM). O limiar de significância estatística foi estabelecido no nível de probabilidade de $p < 0,05$.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A expressão gênica de *G. charrua* exposto ao RDT revelou alterações marcantes na esteroidogênese. Nos ovários, observou-se aumento significativo de *cyp19a1a* e *esr2a* (Figura 1A e 1B), genes que codificam, respectivamente, a aromatase e o receptor de estrogênio, fundamentais para a conversão de andrógenos em estrógenos e para a sinalização estrogênica. Esses achados sugerem uma ativação do eixo estrogênico, em concordância com estudos em

Danio rerio, nos quais a modulação de *cyp19a1a* compromete a diferenciação ovariana e a ativação de *esr2a* intensifica a resposta tecidual a estrógenos (YU et al., 2025). Resultados semelhantes foram relatados por LU et al. (2023), que observaram o aumento desses genes após exposição ao glifosato em embriões de *D. rerio*.

O gene *hsd3b1*, associado às etapas iniciais da síntese de hormônios esteroides, mostrou expressão aumentada tanto em ovários quanto em testículos, indicando estímulo à produção de precursores esteroides (Figura 1C e 1G). Este efeito também já foi relatado em ovários de camundongos expostos ao Roundup (CHITOLINA et al., 2023).

Nos testículos, entretanto, o aumento de *hsd3b1* foi acompanhado pela redução de *hsd17b12a*, gene ligado à conversão final de esteroides e ao metabolismo lipídico (Figura 1H). Essa assimetria sugere um desbalanço esteroidogênico, que pode limitar a produção de estradiol e prejudicar a espermatogênese. Alterações semelhantes em vias estrogênicas já foram descritas em peixes expostos a GBHs, reforçando o caráter de disruptores endócrinos desses compostos (LU et al., 2023).

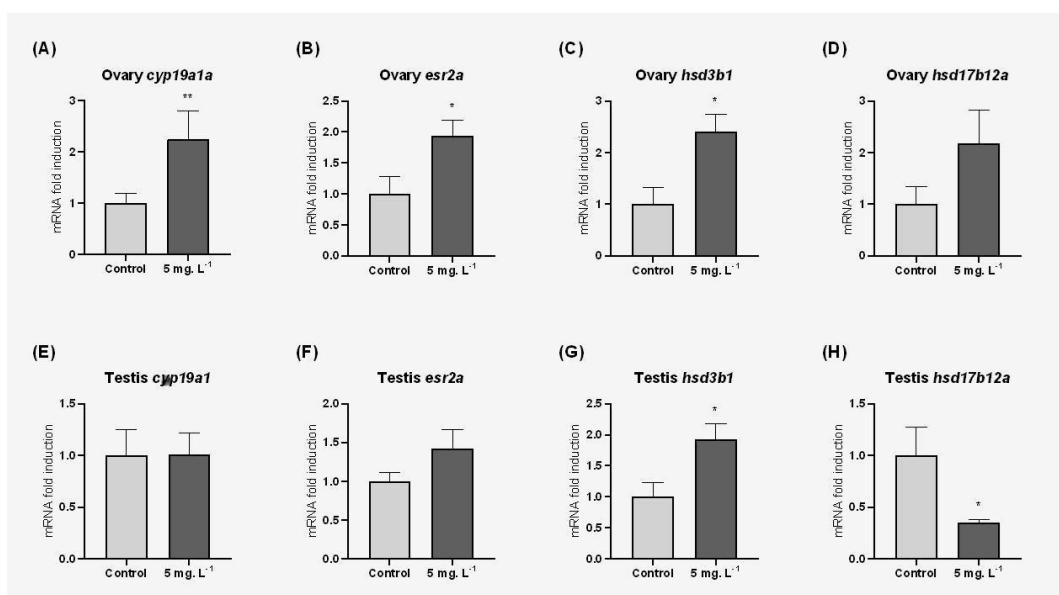


Figura 1. Efeitos da exposição a 5 mg·L⁻¹ de RDT na expressão de genes relacionados à esteroidogênese e sinalização estrogênica em ovários (A–D) e testículos (E–H) de *Garcialebias charrua*.

4. CONCLUSÕES

Este estudo pioneiro demonstra que o RDT interfere em genes-chave da esteroidogênese de *G. charrua*, revelando potenciais mecanismos de desregulação endócrina. As alterações observadas apontam para impactos diretos sobre a fisiologia da reprodução, o que é especialmente crítico em peixes anuais, grupo com o maior risco de extinção no Brasil. Ao integrar biologia molecular e ecotoxicologia, o trabalho oferece subsídios inovadores para o biomonitoramento ambiental baseado em tecnologias genômicas, como a qPCR, e reforça a necessidade de estratégias de conservação voltadas a ecossistemas frágeis e espécies ameaçadas.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- CHITOLINA, R. et al. **Subacute exposure to Roundup® changes steroidogenesis and gene expression of the glutathione-glutaredoxin system in rat ovaries: Implications for ovarian toxicity of this glyphosate-based herbicide.** *Toxicology and Applied Pharmacology*, 473, 116599, 2023.
- 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.
- 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.
- LACROIX, R.; KURRASCH, D. M. **Glyphosate toxicity: in vivo, in vitro, and epidemiological evidence.** *Toxicological Sciences*, v. 192, n. 2, p. 131-140, 2023.
- LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN, T. D. **Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2-ΔΔCT method.** *Methods*, San Diego, v. 25, n. 4, p. 402–408, 2001.
- LU, J. et al. **Developmental toxicity and estrogenicity of glyphosate in zebrafish in vivo and in silico studies.** *Chemosphere*, v. 343, p. 140275–140275, 25 set. 2023.
- MESNAGE, R., BENBROOK, C., ANTONIOU, M.N. **Insight into the confusion over surfactant co-formulants in glyphosate-based herbicides.** *Food Chem. Toxicol.* 128, 137-145, 2019.
- Portaria N° 445: **Lista de espécies ameaçadas de extinção—peixes e invertebrados aquáticos** (2022). Disponível em: <<http://simat.mma.gov.br/acomweb/Media/Documentos/abbd1ad0-4aca-448b-a.pdf>>. Acesso em 19 ago. 2025.
- VOLCAN, M. V.; LANÉS, L. E. K. **Brazilian killifishes risk extinction.** *Science* (New York, N.Y.), v. 361, n. 6400, p. 340–341, 2018b, 2018.
- YU, T. et al. **Reproductive toxicity of glyphosate and its main metabolite aminomethyl phosphonic acid (AMPA) on zebrafish (*Danio rerio*).** *Chemosphere*, v. 385, p. 144548–144548, 1 jul. 2025.