

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS
Centro de Ciências Químicas, Farmacêuticas e de Alimentos
Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Bioprospecção



Dissertação

**Expressão diferencial de genes relacionados ao estresse oxidativo no peixe-
anual Austrolebias charrua (Cypridontiformes: Rivulidae) em resposta à
exposição ao herbicida Roundup Transorb®**

Natiéli Machado Gonçalves

Pelotas, 2021

NATIÉLI MACHADO GONÇALVES

Expressão diferencial de genes relacionados ao estresse oxidativo no peixe-anual *Austrolebias charrua* (Cypridontiformes: Rivulidae) em resposta à exposição ao herbicida Roundup Transorb®

Dissertação apresentada ao
Programa de Pós-graduação em
Bioquímica e Bioprospecção da
Universidade Federal de Pelotas, como requisito
parcial à obtenção do título de Mestre em
Bioquímica e Bioprospecção.

Orientador: Prof. Dr. Vinicius Farias Campos
Coorientadora: Prof^a. Dr^a. Mariana Härter Remião

Pelotas, 2021

Universidade Federal de Pelotas / Sistema de Bibliotecas
Catalogação na Publicação

G635e Gonçalves, Natiéli Machado

Expressão diferencial de genes relacionados ao estresse oxidativo no peixe-anual *Austrolebias charrua* (Cypridontiformes: Rivulidae) em resposta à exposição ao herbicida Roundup Transorb® / Natiéli Machado Gonçalves ; Vinicius Farias Campos, orientador ; Mariana Härter Remião, coorientadora. — Pelotas, 2021.

68 f.

Dissertação (Mestrado) — Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Bioprospecção, Centro de Ciências Químicas, Farmacêuticas e de Alimentos, Universidade Federal de Pelotas, 2021.

1. Expressão gênica. 2. Estresse oxidativo. 3. Killifish. 4. Herbicida. 5. Roundup. I. Campos, Vinicius Farias, orient. II. Remião, Mariana Härter, coorient. III. Título.

CDD : 574.192

Elaborada por Gabriela Machado Lopes CRB: 10/18

Natiéli Machado Gonçalves

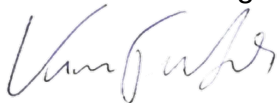
Expressão diferencial de genes relacionados ao estresse oxidativo no peixe-anual *Austrolebias charrua* (Cypridontiformes: Rivulidae) em resposta à exposição ao herbicida Roundup Transorb®

Dissertação aprovada, como requisito parcial, para a obtenção do grau de Mestre em Bioquímica e Bioprospecção do Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Bioprospecção, Centro de Ciências Químicas, Farmacêuticas e de Alimentos, Universidade Federal de Pelotas.

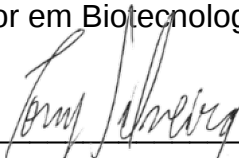
Data da Defesa: 06/08/2021

Banca examinadora:

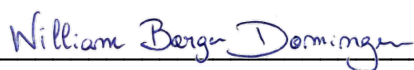
Prof. Dr. Vinicius Farias Campos (Presidente da Banca)
Doutor em Biotecnologia pela Universidade Federal de Pelotas.



Dr. Tony Leandro Rezende da Silveira
Doutor em Biotecnologia pela Universidade Federal de Pelotas



Dr. William Borges Domingues
Doutor em Biotecnologia pela Universidade Federal de Pelotas



Aos meus pais, por todo o amor, carinho, ensinamentos e
apoio, que apesar de todas as
dificuldades sempre me incentivaram a estudar
e a correr atrás dos meus objetivos.

Dedico-lhes mais esta etapa da minha vida!

AGRADECIMENTOS

Agradeço aos meus pais Eli e Ezequiel em primeiro lugar por seu amor, dedicação, ensinamentos, conselhos, acima de tudo por nunca medirem esforços para que eu pudesse ter uma educação de qualidade, sendo presentes em todas as etapas de minha vida.

Ao meu namorado Maurício, por seu amor, amizade, acima de tudo sua compreensão perante minha ausência devido aos meus estudos.

Ao meu orientador, Professor Vinícius Campos, por ter me recebido em seu laboratório, por sua paciência, apoio, ensinamentos, confiança e incentivo.

À minha coorientadora, Professora Mariana Remião, por seus ensinamentos, confiança, paciência, gentileza e incentivo.

A todos colegas do laboratório Genômica Estrutural, em especial Amanda, Eduardo B., Eduardo D. e Willian B. que estiveram presentes em todas as etapas do meu trabalho partilhando ensinamentos e auxiliando diretamente e pelos bons momentos.

Ao professor Tony Silveira, vinculado à Universidade Federal de Rio Grande (FURG) que esteve envolvido desde o início deste projeto e que neste cenário de Pandemia possibilitou o acesso aos laboratórios da FURG, viabilizando a realização deste trabalho.

À professora Silvia Oliveira que me sempre me incentivou.

À minha família pelo incentivo e apoio.

A todos os professores do curso por todo seu conhecimento passados para mim.

A todos que colaboraram de alguma forma para que este trabalho fosse concluído.

Muito Obrigada!

“A persistência é o menor caminho do êxito.”
(Charles Chaplin)

RESUMO

GONÇALVES, Natiéli Machado. **Expressão diferencial de genes relacionados ao estresse oxidativo no peixe-anual *Austrolebias charrua* (Cypridontiformes: Rivulidae) em resposta à exposição ao herbicida Roundup Transorb®.** 2021. 68f. Dissertação de Mestrado . Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Bioprospecção. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, Brasil.

O Roundup Transorb (RDT) é um herbicida à base de glifosato (HBG), sendo atualmente um dos mais populares utilizados na agricultura em todo o mundo. Devido seu crescente uso, os HBG podem acabar atingindo organismos não-alvo, como peixes, gerando uma crescente preocupação acerca dos possíveis danos toxicológicos e ambientais de tais compostos quando presentes nos ambientes aquáticos. *Austrolebias charrua* é um peixe-anual ameaçado de extinção, endêmico do sul do Rio Grande do Sul e Uruguai, que ocorre em regiões próximas às lavouras de soja e arroz. Portanto, o presente estudo visa avaliar os efeitos da exposição de *A. charrua* a diferentes concentrações de RDT 0,065 e 5 mg/L de equivalente ácido de glifosato sobre a expressão de genes relacionados à cadeia transportadora de elétrons e ao sistema antioxidante no fígado e nas brânquias por PCR em tempo real. Os grupos RDT foram expostos durante 96 horas seguidos de 96 horas em água sem contaminantes. Após, os animais foram eutanasiados e os tecidos coletados. No fígado, os resultados mostram que a exposição ao RDT resultou no aumento da expressão gênica dos genes *gclc* e *gsta*, quando o animal foi exposto a 5 mg/L, e supressão da expressão do gene *ucp1* em ambas as concentrações. O resultado encontrado nas brânquias foi de supressão da expressão gênica de *cat* em ambas as concentrações, e aumento da expressão de *ucp1* a 0,065 mg/L. Este é o primeiro trabalho que avalia a modulação gênica gerada pela presença de RDT na espécie *A. charrua*. Tal estudo se faz importante para compreensão dos mecanismos envolvidos na toxicologia de HBG sobre espécies não-alvo e pode gerar subsídios para adequação da legislação a fim de proteger espécies em perigo de extinção.

Palavras-chave: Expressão gênica; Estresse oxidativo; Killifish; Herbicida; Roundup; Glifosato.

ABSTRACT

GONÇALVES, Natiéli Machado. **Differential expression of oxidative stress-related genes in the annual fish *Austrolebias charrua* (Cypridontiformes: Rivulidae) in response to herbicide exposure to Roundup Transorb®.** 2021. 68f. Dissertation of master's. Graduate Program in Biochemistry and Bioprospection. Federal University of Pelotas, Pelotas, Brazil.

Roundup Transorb (RDT) is the most popular glyphosate-based herbicide (GHB), used in agriculture worldwide. Due to its increasing application, GHB may reach non-target environments generating concern about potential toxicological and environmental damage when these compounds are present in aquatic environments, reaching non-target organisms such as fishes. The annual fish *Austrolebias charrua* is an endangered species, endemic in the southern region of Brazil (Rio Grande do Sul) and Uruguay, occurring in regions close to soy and rice crops. The present study aims to evaluate the effects of *A. charrua* exposure to different concentrations of RDT 0.065 and 5 mg/L glyphosate acid equivalent, on gene expression of genes related to electron transport chain and antioxidant system on liver and gills by quantitative real time PCR. The individuals were exposed to RDT during 96 hours, followed by 96 hours of water without contaminants. Afterwards, the animals were euthanized, and the tissues were collected. In liver, the results showed an up-regulation on gene expression of *gcl* and *gst* when animals are exposed to 5 mg/L RDT and a down-regulation of *ucp1* gene expression at both concentrations of RDT. In gills, the gene expression of *cat* was down-regulated at both concentrations of RDT and *ucp1* gene expression was up-regulated at 0.065 mg/L RDT. This is the first study that evaluates the gene modulation after RDT exposure in *A. charrua*. This study is important for understanding the molecular mechanisms involved in toxicology of GHB on non-target species and can generate subsidies for adaptation of legislation in order to protect endangered species.

Keywords: Gene expression; Oxidative stress; Killifish; Herbicide; Roundup; Glyphosate.

Lista de Figuras

Figura 1	Representação do ciclo de vida dos peixes-anuais.....	17
Figura 2	<i>Austrolebias charrua</i> macho e fêmea.....	18
Figura 3	Representação da estrutura química do glifosato.....	21
Figura 4	Representação esquemática da equação química da enzima superóxido dismutase.....	24
Figura 5	Representação esquemática da equação química da enzima catalase	25
Figura 6	Representação do processo de oxirredução da glutathione reduzida em glutathione oxidada mediada pela enzima glutathione peroxidase.	26
Figura 7	Representação esquemática do processo de síntese da glutathione reduzida.....	26

Lista de Abreviaturas e siglas

HGB	Herbicida a base de glifosato
RD	Roundup
RDT	Roundup Transorb
EPSPS	5-enolpiruvil-3-shiquimato fosfato sintase
AMPA	Ácido aminometil fosfônico
CO ₂	Dióxido de carbono
NH ₃	Amônia
POEA	Polioxietileno Amina
mg/L	Miligrama por litro
°C	Graus Celsius
CONAMA	Conselho Nacional do Meio Ambiente
OMS	Organização Mundial da Saúde
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
EROs	Espécies Reativas de Oxigênio
ATP	Adenosina Trifosfato
Sod3	Superóxido dismutase extracelular [Cu/Zn]
Sod2	Superóxido dismutase [Mn]
Sod1	Superóxido dismutase [Cu/Zn]
H	Hidrogênio
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrogênio
O ₂ ⁻	Radical superóxido
OH•	Radical hidroxil
Cat	Catalase
H ₂ O	Molécula de água
GST	Glutathione S Transferase
GSH	Glutathione Reduzida
Gclc	Glutamato cisteína ligase subunidade catalítica
HS	Grupamento sulfídrico
GCL	Glutamato cisteína ligase

GPx	Glutathione oxidase
GSSG	Glutathione oxidized
Ucp1	Protein uncoupler 1
LPO	Lipid peroxidation

Lista de símbolos

®

Marca registrada

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	14
2	OBJETIVOS	
2 1	Objetivo Geral.....	16
2 2	Objetivos Específicos.....	16
3	REFERENCIAL TEÓRICO	
3 1	Características de peixes-anuais.....	17
3 2	Risco de extinção dos peixes-anuais.....	19
3 3	Herbicidas a base de glifosato.....	20
3 4	Contaminação dos ambientes aquáticos por HBG	22
3 5	Genes modulados pela presença de xenobióticos.....	23
4	CAPÍTULO 1	
4 1	Manuscrito.....	28
5	DISCUSSÃO.....	50
6	CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	53
7	REFERÊNCIAS.....	54
8	ANEXOS	
	Anexo 1.....	62
	Anexo 2.....	63
	Anexo 3.....	64
	Anexo 4.....	67

1 INTRODUÇÃO

Herbicidas são moléculas que agem sob processos específicos com finalidade de matar ou inibir o crescimento de plantas daninhas na produção agrícola em larga escala (Dayan, 2019). No Brasil, herbicidas à base de glifosato (HBG) são amplamente utilizados na agricultura com aproximadamente 217.592,21 toneladas de ingrediente ativo comercializados por ano (IBAMA, 2019). Em virtude do crescente uso desse tipo de agrotóxicos, resíduos remanescentes podem se depositar no solo ou na água, e assim atingir organismos não-alvos (Retter et al., 2018). Estudos têm descrito as consequências da exposição de herbicidas à base de glifosato em insetos como *Drosophila melanogaster* (de Aguiar et al., 2016) e *Leptinotarsa decemlineata* (Rainio et al., 2019), moluscos como *Mytilus galloprovincialis* (Milan et al., 2018; Fabrello et al., 2020), crustáceos como *Eriocheir sinensis* (Yang et al., 2019), *Macrobrachium nipponensis* (Yang et al., 2019) e *Macrobrachium potiuna* (de Melo et al., 2020), *Daphnia magna* (Suppa et al., 2020) e peixes como *Prochilodus lineatus* (Cavalcante et al., 2008), *Austrolebias nigrofasciatus* (Zebral et al., 2018), *Oryzias latipes* (Smith et al., 2019) e *Odontesthes humensis* (Martins et al., 2021).

O peixe-anual *Austrolebias charrua* é endêmico da região sul do Brasil, restrito à cadeia de drenagem da Laguna dos Patos-Lagoa Mirim, e do sul do Uruguai, ocorrendo na Bacia do Rio Uruguai (Lanés, 2011). Os peixes pertencentes a família dos anuais, são diferenciados dos demais teleósteos (não anuais), devido a residirem em ambientes efêmeros conhecidos como charcos temporários (Lanés, 2011). As poças ou charcos temporários são um elemento chave para a manutenção do ciclo de vida dos peixes-anuais. Visto que, as poças temporárias são caracterizadas por inundarem-se durante as estações chuvosas do ano, dando início ao período de eclosão, crescimento e reprodução desses animais, contudo nos períodos de escassez de chuva estas poças podem secar totalmente. Consequentemente, o período de seca culmina na morte de toda a população adulta, restando somente os ovos embrionados que são resistentes à dessecação (através do mecanismo denominado de diapausa) enterrados no substrato (Berois et al., 2015; Naumann e Englert, 2018; Zebral et al., 2018). Atualmente o peixe-anual da espécie *A. charrua* encontra-se ameaçado de extinção (MMA, 2014) o que pode estar sendo agravado,

dentre outros motivos, pelas regiões de ocorrência destes animais serem próximas a lavouras que utilizam HBG (Volcan, 2012; Volcan & Lanés, 2018).

O Roundup Transorb® (RDT) é um exemplo de HBG que tem sido amplamente empregado em regiões de ocorrência de *A. charrua*. Já foi relatado que RDT afeta vias relacionadas ao estresse oxidativo e à cadeia transportadora de elétrons de espécies não-alvo como *D. rerio* (Velasques et al., 2016), *Cyprinus Carpio* (Ma et al., 2019), *Oreochromis niloticus* (Zheng et al., 2021) e *O. humensis* (Martins et al., 2021). Portanto neste trabalho se busca a avaliação da modulação de genes relacionados à via antioxidante e à cadeia transportadora de elétrons de *A. charrua*. Pela primeira vez utiliza-se *A. charrua* como modelo para pesquisas toxicológicas utilizando HBG, gerando subsídios para possíveis adequações futuras da legislação ambiental que regulamenta o uso de tais xenobióticos visando a proteção da fauna local.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Avaliar a modulação da expressão de genes do sistema antioxidante e da cadeia transportadora de elétrons no fígado e nas brânquias de peixes-anuais da espécie *Austrolebias charrua* após a exposição ao herbicida Roundup Transorb.

2.2 Objetivos Específicos

- a) Realizar a exposição de espécimes de *Austrolebias charrua* à diferentes concentrações de Roundup Transorb (0,065 e 5 mg/L) durante um período agudo de 96 horas;
- b) Após a exposição ao contaminante Roundup Transorb avaliá-los quanto à mortalidade;
- c) Clonar e sequenciar os genes catalase (*cat*), superóxido dismutase 2 (*sod2*), glutathione S-transferase alfa (*gsta*), glutamato-cisteína ligase subunidade catalítica (*gclc*) e proteína desacopladora 1 (*ucp1*);
- d) Avaliar a expressão dos genes sequenciados em fígado e brânquia de animais expostos às duas concentrações de Roundup Transorb.

3 REFERENCIAL TEÓRICO

3.1 Características de peixes-anauais

Os peixes-anauais são pertencentes à ordem Cyprinodontiformes, caracterizados por habitarem ambientes inóspitos aos demais teleósteos e por seu rápido ciclo de vida. São animais dulcícolas, de tamanhos reduzidos, geralmente medindo menos que 10 cm, com dimorfismo sexual e ovos resistentes à dessecação (Berois et al., 2015).

Esses peixes habitam charcos temporários, que inundam nas estações chuvosas e secam totalmente durante as estações secas. Algumas semanas após a cheia dos charcos, tem-se o início do período reprodutivo, nos quais esses peixes reproduzem incessantemente até o próximo período de seca. Os embriões gerados são resistentes à dessecação e permanecem enterrados no fundo lamacento dos charcos durante as secas. No próximo período chuvoso, esses embriões eclodem, gerando juvenis com rápido crescimento e maturação sexual que darão início a um novo ciclo reprodutivo (Figura 1) (Lanés, 2011; Berois et al., 2015; Naumann e Englert, 2018; Zebral et al., 2018).

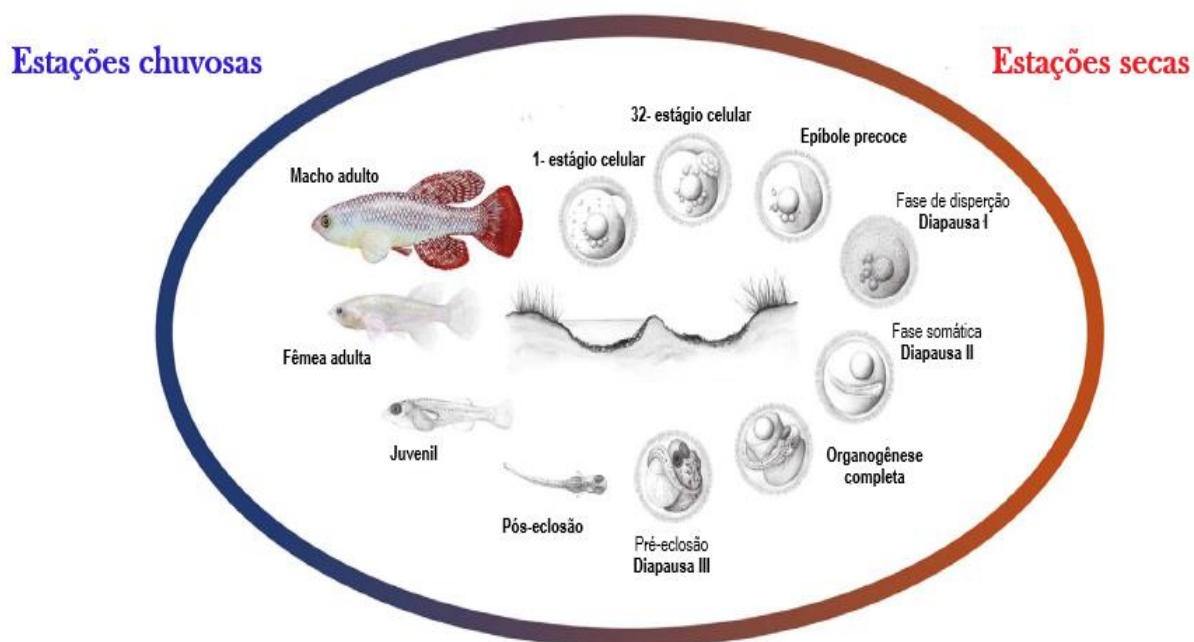


Figura 1- Representação do ciclo de vida dos peixes-anauais. FONTE: adaptado de Naumann e Englert, 2018, p.2.

Como dito anteriormente, estes peixes reproduzem durante as estações chuvosas. Contudo, esse processo é dependente de um cortejar específico e do dimorfismo sexual: as fêmeas escolhem os machos maiores e mais vistosos e possuem uma coorte específica. Os machos são maiores e coloridos, enquanto as fêmeas são menores e apresentam tonalidades marrons (Figura 2) (Berois et al., 2015). Supõem-se que esta característica dos machos tenha relação com o sucesso do acasalamento, uma vez que os machos necessitam despertar o interesse das fêmeas. O acasalamento consiste alguns passos sendo (i) a exibição lateral do macho para a fêmea; (ii) convite para o mergulho do macho para a fêmea; (iii) aceite pela fêmea, quando ambos submergem para um “ninho”; (iv) acasalamento com fertilização externa e (v) os ovos recém fecundados permanecem depositados no substrato protegidos durante a próxima estação seca, resultando na morte dos adultos (García et al., 2008).



Figura 2- *Austrolebias charrua* macho (seta branca) e fêmea (seta preta). Foto de Tony Silveira.

Os embriões dos peixes-anuais são resistentes à dessecação, devido a mecanismos protetivos conhecidos como diapausas. A diapausa suspende o desenvolvimento embrionário atrasando a eclosão ou gerando quiescência quando o ambiente é desfavorável, por exemplo, durante a seca dos charcos. Os embriões podem sobreviver de 10 meses a 2 anos com esse mecanismo (Martin e Podrabysk, 2017; Hand et al., 2018; Hu et al., 2020). Dessa forma, a diapausa pode ser considerada como uma adaptação programada de proteção contra intempéries. Entretanto, a diapausa possui 3 etapas que podem ser facultativas, ou seja, o animal

pode pular alguma etapa: diapausa I, começa logo após o início do desenvolvimento embrionário após a epíbole; diapausa II, pode ocorrer após a formação de um coração rudimentar e dos principais componentes do sistema nervoso central; e diapausa III, ocorre no embrião próximo ao período da eclosão (Martin Podrabsky, 2017). Após a eclosão, os alevinos exibem um rápido crescimento e alcançam a maturidade sexual após um ou dois meses (Lanés, 2011).

Os Cyprinodontiformes dividem-se em duas famílias: Nothobranchiidae e Rivulidae, localizados na África e nas Américas, respectivamente (Naumann e Englert, 2018). A família Rivulidae é endêmica da Região Sul do Brasil, Uruguai, Paraguai e Argentina, seu descobrimento data do período de 1980, contando atualmente com cerca de 324 espécies descritas (Lanés, 2011; Volcan et al., 2013). Entretanto, os rivulídeos podem ser classificados em anuais, os quais são restritos às zonas sazonais com períodos de cheia e períodos de seca, e os não anuais, situados em brejos e riachos sendo encontrados durante todas as estações do ano (Volcan, 2012).

Dentre os rivulídeos anuais, o gênero mais estudado é o *Austrolebias* com aproximadamente 50 espécies descritas (de Oliveira Fernandes et al., 2021) sendo considerado o gênero com indivíduos mais longevos dentre os peixes-anuais neotropicais, vivendo cerca de 9 meses e atingindo a maturidade sexual de 8 a 12 semanas após a desova em condições laboratoriais (Volcan et al., 2013). Inclusive, no Rio Grande do Sul podem ser encontrados aproximadamente 50% das espécies de *Austrolebias* descritas, principalmente na Lagoa dos Patos e na Bacia do Rio Uruguai (Lanés, 2011).

Estes animais são bons modelos de estudo, devido aos adultos serem facilmente mantidos em laboratório, apresentarem alta taxa reprodutiva, produzindo ovos diariamente e pela possibilidade de armazenagem desses ovos (Volcan e Lanés, 2018; Volcan et al., 2013). Além disso, podem ser considerados como organismo modelo de contaminação ambiental devido a sua alta sensibilidade a agentes tóxicos (Zebral et al., 2018; Nolorbe-Payahua et al., 2020).

3 2 Risco de extinção dos peixes-anuais

O Brasil possui uma grande importância do ponto de vista global em relação a biodiversidade de peixes de água doce, uma vez que, podem ser encontrados cerca

de 2.122 espécies de peixes de água doce, representando aproximadamente 21% das espécies dulcícolas do planeta (Agostinho et al., 2005; Volcan e Lanés, 2018). Os peixes-anuais, incluindo *A. charrua*, representam o grupo de peixes com o maior perigo de extinção do Brasil. A Portaria nº 445, de 17 de dezembro de 2014, do Ministério do Meio Ambiente classifica o *A. charrua* como “em perigo de extinção” (MMA, 2014), e por isso essa espécie aparece entre as espécies-chave para acompanhamento e proteção dos Rivulidae da Portaria nº 198, de 19 de junho de 2013, do Plano Nacional para a Conservação dos Peixes Rivulídeos Ameaçados de Extinção (MMA, 2013).

As razões pelas quais está havendo um declínio populacional dos peixes- anuais causando sua extinção é principalmente a perda de seu habitat somado com sua localização restrita e sua baixa capacidade de dispersão. A degradação dos charcos através das ações antrópicas tem dado lugar a hidrelétricas, empreendimentos portuários, silvicultura e açudes de irrigação. No Rio Grande do Sul, os charcos têm dado lugar principalmente a lavouras de agricultura extensiva, como orizicultura e sojicultura (Volcan, 2012; Volcan e Lanés, 2018).

Considerando os fatores antrópicos já citados, soma-se a estes o implemento de herbicidas agrícolas ao redor dos charcos, como o RDT. Há a possibilidade de esses químicos afetarem negativamente o ciclo de vida de *A. charrua*, acarretando na diminuição de suas populações.

3 3 Herbicidas a base de glifosato

O glifosato (*N*-[fosfonometil] glicina) (figura 3) de formulação molecular $C_3H_8NO_5P$ foi descoberto na década de 50 pelo farmacêutico Dr. Henri Martin, visando aplicar a molécula na indústria farmacêutica. Contudo, por não haver aplicações farmacêuticas para o glifosato, diversas empresas passaram a pesquisar outra aplicabilidade a esta molécula. Na década de 70, o químico da empresa Monsanto, o Dr. John Franz, descobriu a potencial aplicação do glifosato como herbicida e no ano de 1974 produziram o primeiro HBG denominado Roundup® (RD) (Benbrook, 2016; Dayan, 2019).

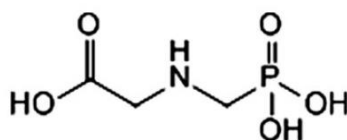


Figura 3- Representação da estrutura química do glifosato. FONTE: Retirado de Annett et al., 2014, p. 2.

O glifosato é um herbicida de amplo espectro e não seletivo, que após a absorção pela planta através de suas folhas a leva à morte com o passar de alguns dias (Okada et al., 2016). O glifosato atua na via do shiquimato, ligando-se a enzima 5-enolpiruvil-3-shiquimato fosfato síntase (EPSPS), localizada nos cloroplastos (Panetto, 2019). A EPSPS é uma via presente somente em plantas, algas e algumas bactérias, responsável pela produção dos aminoácidos aromáticos essenciais para o crescimento e defesa das plantas, como fenilalanina, triptofano e tirosina (Annett et al., 2014). O ácido aminometil fosfônico (AMPA), é o principal metabólito gerado após a degradação do glifosato, gerando ao final de sua degradação dióxido de carbono (CO₂) e amônia (NH₃) (Annett et al., 2014).

Nos últimos anos, o aumento da utilização do glifosato em formulações de herbicidas foi devido à expiração da patente da Monsanto no ano de 2000 liberando companhias privadas para produzir e comercializar produtos à base de glifosato (Ibrahim, 2015). Entretanto, o implemento de HBG nas lavouras, deve-se às tecnologias de melhoramento genético que possibilitaram a produção de plantas resistentes ao glifosato (Duke, 2018). As primeiras plantas resistentes ao glifosato foram a soja (*Glycine max*) e a canola (*Brassica napus*) em 1996, o algodão (*Gossypium hirsutum*) em 1997 e o milho (*Zea mays*) em 1998 (Duke, 2015). No Brasil, o aumento do uso de HBGs ocorreu a partir da safra de 2004, quando o cultivo de soja geneticamente modificada foi autorizada pelo Governo Federal (Peres, 2009).

O RD é o principal HBG, e o mais utilizado atualmente na agricultura mundial (Benbrook, 2016). Esses herbicidas possuem em suas formulações o surfactante Polioxietileno Amina (POEA), responsável por promover uma absorção mais rápida pelas plantas aumentando assim sua eficiência (Panetto et al., 2019). No extremo sul do Brasil, o RD é amplamente utilizado em monoculturas de arroz e de soja nos campos sulinos do entorno da Lagoa Mirim, a maior lagoa do Brasil, e de outras lagoas

costeiras menores. Nessas áreas, alguns agricultores usam sobredoses objetivando diminuir as perdas por volatilização, além de não respeitarem os períodos de carência do produto. Devido a essas más condutas, o uso desse herbicida tem uma grande relevância para a ecotoxicidade de ambientes aquáticos gerando preocupações (Lushchak et al., 2009; Salbego et al., 2010).

3.4 Contaminação dos ambientes aquáticos por herbicidas a base de glifosato

HBGs são altamente hidrosolúveis (12 mg/L na temperatura de 25 °C) (Amarante Junior et al., 2002) e o alcance destes xenobióticos ao ambiente aquático depende de fatores como a forma de aplicação (exemplo, por pulverização), a quantidade de produto aplicado, a proximidade das lavouras com a água, a quantidade de chuva na região, o manejo na limpeza dos equipamentos utilizados pelos agricultores e a composição do solo (Annett et al., 2014; Van Bruggen et al., 2018). HBGs possuem uma meia vida consideravelmente longa, podendo ser encontrados em águas por cerca de 45 - 60 dias após sua aplicação (Bridi et al., 2017). De acordo com a resolução do Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA, 2005), o limite máximo permitido de glifosato em águas destinadas ao consumo humano e à proteção de comunidades aquáticas é de 0,065 mg/L. Entretanto, já foram relatadas no Brasil concentrações de GLI em águas próximas a plantações de 0,36 - 2,16 mg/L e na Argentina de 0,10 – 0,7 mg/L (Zebral et al., 2018). Concentrações de glifosato de até 10 mg/L podem ser consideradas ambientalmente realistas (Langiano e Martinez, 2008; Topal et al., 2015). Assim, altas concentrações desse produto podem estar presentes em corpos d'água poucas horas após a aplicação do herbicida, representando picos de contaminação.

De acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS) o glifosato é considerado como possível carcinogênico para humanos e animais (Murussi et al., 2016), entretanto, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária reclassificou o glifosato de extremamente tóxico para improvável de causar dano agudo (Anvisa, 2019). Visto que os sistemas aquáticos são usualmente receptores de poluentes lançados no ambiente, os animais aquáticos acabam altamente expostos a HBGs (Carriquiriborde e Ronco, 2006; Ayoola S.O, 2008; Retter et al., 2018).

Alguns estudos já foram realizados demonstrando os efeitos adversos causados por glifosato e HBGs sobre peixes, tais como: diminuição da atuação da enzima acetilcolinesterase (Modesto e Martinez, 2010; Sánchez et al., 2017), aumento da mortalidade, eclosão prematura e diminuição da reprodução pela modulação gênica (Uren Webster et al., 2014), diminuição da qualidade espermática (Sánchez et al., 2017; Silveira et al., 2019), alterações morfológicas em embriões (Zebral et al., 2017), modulação do sistema de defesa antioxidante (Lushchak et al., 2009; Modesto e Martinez, 2010; Velasques et al., 2016; Zheng et al., 2021), neurotoxicidade (Faria et al., 2021) e geração de estresse oxidativo (Guilherme et al., 2010; Sánchez et al., 2017; Ma et al., 2019; Silveira et al., 2019; Faria et al., 2021). Se tratando especificamente de peixes-anuais, no caso da espécie *A. nigrofasciatus*, animais expostos ao RD produziram menos embriões viáveis e com menor taxa de pigmentação, além destes apresentarem diminuição da tolerância térmica de 38,7 °C para 36,12 °C (Zebral et al., 2018).

3 5 Genes modulados pela presença de xenobióticos

A análise molecular dos genes através da expressão gênica, pode favorecer um entendimento mais amplo das vias afetadas pela exposição a xenobióticos, uma vez que existem tecnologias que se utilizam da avaliação da expressão de genes em modelos biológicos para monitorar a contaminação ambiental aquático (Velasques et al., 2016). Os genes são moléculas constituídas por ácido desoxirribonucleico (DNA) que contém um código para produção de proteínas específicas para o funcionamento correto das células (Zaha, Ferreira e Passaglia, 2014). Os xenobióticos, são substâncias químicas não produzidas pelo organismo (exógenas) como os agentes poluentes (Dicio, 2021), presentes nos ambientes aquáticos podem alterar a fisiologia e a bioquímica dos animais aquáticos (Pandey et al., 2008; Zheng et al., 2021).

As espécies reativas de oxigênio (EROs) são geradas normalmente nas células em decorrência do metabolismo celular aeróbio. Em condições fisiológicas normais estes radicais não são prejudiciais à saúde, uma vez que participam da defesa contra agentes patológicos. As EROs encontram-se envolvidas nos processos de apoptose celular, ativação de genes, fertilização de óvulos, participam da geração de adenosina trifosfato (ATP), ou seja, produção de energia para as atividades celulares.

Entretanto, em excesso eles podem se tornarem tóxicos aos organismos (Barbosa et al., 2010a). O estresse oxidativo oriundo do excesso de EROs no organismo, ocorre devido ao desequilíbrio entre os compostos oxidantes e antioxidantes celulares, ocasionando distúrbio de sinalização celular e posterior dano oxidativo. O dano oxidativo é caracterizado principalmente por oxidações de biomoléculas como lipídeos processo denominado de peroxidação lipídica LPO, modificações de proteínas e danos ao DNA (mutações e deleções), através da perda de suas funções biológicas e assim alterando o estado redox celular (Smith, Marks e Lieberman, 2007).

O gene da superóxido dismutase [Mn] (*sod2*) codifica a enzima superóxido dismutase (SOD), a qual faz parte do sistema enzimático de defesa antioxidante celular e que é responsável pela redução do radical do radical superóxido (O_2^-) (MacMillan-Crow e Thompson, 1999; Kumar et al, 2016; Khalid et al., 2020). Além da *sod2*, a superóxido dismutase se apresentam em outras 2 isoformas distintas, a *sod1* e *sod3* (ambas dependentes de cobre e zinco) presentes no citoplasma e nas mitocôndrias, respectivamente (Ghneim et al., 2016). Em *zebrafish* (*Danio rerio*) tem sido observado a modulação da *sod2* após a exposição ao herbicida atrazina nos ovários e no fígado (Jin et al., 2010), embriões (Glisic et al., 2016), espermatozoides (Bautista et al., 2018), contudo embriões de *D.rerio* expostos ao herbicida diquat não demonstraram modulação da *sod2* (Wang et al., 2018). A expressão de *sod2* tem sido modulada em ratos após a exposição a paraquat nos condrócitos (Koike et al., 2015), células sanguíneas da medula óssea e do baço (Bhardwaj e Singh, 2018). Referente ao herbicida glifosato, foi observado a super expressão de *sod2* em moscas da fruta *D. melanogaster* expostas durante 24 horas ao Roundup na concentração de 5 mg/L (de Aguiar et al., 2016).

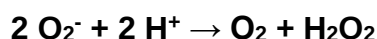


Figura 4- Representação esquemática da equação química da enzima superóxido dismutase (SOD).

O gene da catalase (*cat*) é um gene conservado entre diferentes espécies (Glorieux et al., 2015), o qual codifica para a enzima catalase (CAT), a qual faz parte do sistema de defesa antioxidante protegendo as células contra os danos causados pelo estresse oxidativo, reduzindo a espécie reativa peróxido de hidrogênio (H_2O_2) em água (H_2O) e O_2 (Mueller et al., 1997; Sellaththurai et al., 2019). A modulação da

expressão do gene *cat* tem sido mensurada após exposição ao ácido 2,4 Diclorofenoxiacético em larvas de *zebrafish* (Gaaied et al., 2019), larvas de *zebrafish* expostas a diourum e diazinon (Velki, 2017), no fígado de *Clarias gariepinus* após a exposição a oxifluorfen (Abd El-Rahman et al., 2019), em *zebrafish* expostos ao RD e ao glifosato houve modulação de *cat* nos testículos (Uren Webster et al., 2014), no fígado após a exposição ao herbicida glifosato em *Oncorhynchus mykiss* juvenis (Topal et al., 2015a; Weeks Santos et al., 2019), machos e fêmeas de *Macrobrachium potiuna* (de Melo et al., 2020) e juvenis de *C. carpio* (Liu et al., 2021).

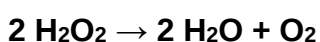


Figura 5- Representação esquemática da equação química da enzima catalase (CAT).

O gene da glutathione S Transferase (*gsta*) o qual codifica para a proteína glutathione S transferase (GST). A enzima GST pode ser dividida em três famílias: a mais conhecida GST citossólica (subdivida em alfa, mu, pi, ômega, theta e zeta), a GST microssomal e a GST mitocondrial. A GST possui ação de detoxificação de compostos endógenos, como os metabólitos oriundos da LPO, e exógenos tóxicos, como os xenobióticos presentes no ambiente. O processo de detoxificação pela GST ocorre através da conjugação da reação catalisada entre glutathione reduzida (GSH, do inglês *glutathione reduced*) e xenobióticos com substâncias eletrofílicas como átomos de carbono, nitrogênio ou enxofre, facilitando a excreção das substâncias tóxicas pelas células (Huber et al., 2008; Modesto e Martinez, 2010; Bašica et al., 2019). A expressão gênica das GSTs têm sido avaliadas no fígado, cérebro, rim e brânquias de *C. carpio* expostos à atrazina, clorpirifós e a mistura de ambos (Xing et al., 2012); Larvas de *zebrafish* expostos a diazinon e diuron (Velki, 2017) e ao ácido 2,4 Diclorofenoxiacético (Gaaied et al., 2019); Exposição a paraquat no fígado *C. carpio* (Ma et al., 2018) e em larvas machos e fêmeas de *O. latipes* submetidas a fluridone (Jin et al., 2020). Estudos recentes têm analisado a modulação das GSTs após a exposição de animais a GHBs como em larvas de *O. mykiss* (Weeks Santos et al., 2019), no fígado de *M. potiuna* (de Melo et al., 2020) e no fígado, brânquias e baço de *O. niloticus* (Zheng et al., 2021)

O gene glutamato cisteína ligase-subunidade catalítica (*gclc*) é responsável pela síntese do antioxidante não enzimático GSH, um tripeptídeo formado por

glutamato, glicina e cisteína conjugada com o grupamento sulfídrico (-HS) (White et al., 2003), demonstrado na figura 6. A síntese da GSH ocorre a partir de combinação da cisteína com o glutamato produzindo γ -glutamato-cisteína, reação catalisada pela enzima glutamato cisteína ligase (GCL) com gasto de ATP. A GSH é formada pela união da glicina com o γ -glutamato-cisteína (Forman et al., 2009).

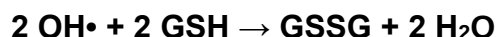
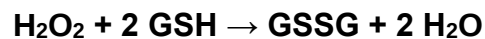


Figura 6- Representação do processo de oxirredução da glutathiona reduzida (GSH) em glutathiona oxidada (GSSG) mediada pela enzima glutathiona peroxidase (GPX).

A GSH durante o processo de estresse oxidativo é responsável por reduzir as espécies reativas, H_2O_2 e radical hidroxil ($\text{OH}\cdot$) reação catalisada pela enzima glutathiona peroxidase (GPX) gerando glutathiona oxidada (GSSG) e água, demonstrado 7 (Barbosa et al., 2010a). Alguns trabalhos têm avaliado a expressão do *gclc* após exposição a diquat no fígado de ratos do tipo selvagem (Wu et al., 2012), em *D. melanogaster* (de Aguiar et al., 2016) e *zebrafish* (Velasques et al., 2016) expostos ao herbicida glifosato.

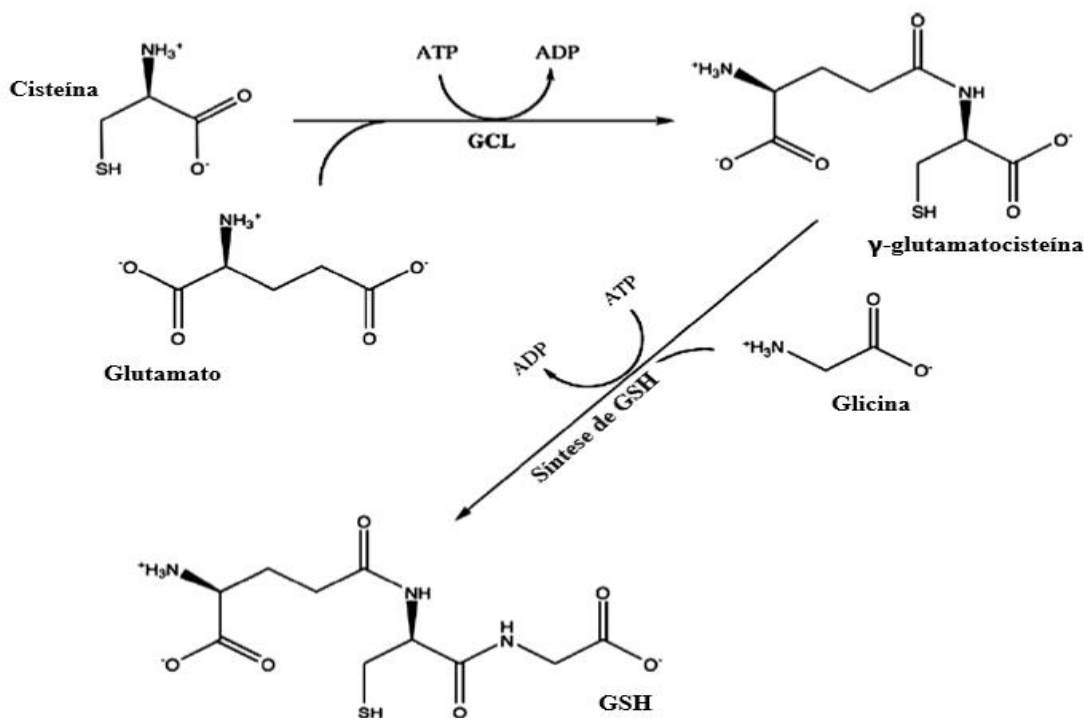


Figura 7- Representação esquemática do processo de síntese da glutathiona reduzida (GSH). FONTE: Adaptado de Forman et al., 2009, p 8.

O gene da proteína desacopladora 1 (*ucp1*) é amplamente conservado podendo ser encontrado em diversos organismos como mamíferos, protozoários, aves, peixes e plantas (Marzzoco e Bayardo, 2015). A UCP1 atua na membrana interna mitocondrial e suas principais funções são: transporte iônico, bombeado os H⁺ presentes na membrana externa mitocondrial através dos canais de prótons em direção a sua matriz durante a síntese de ATP na cadeia respiratória (Tine et al., 2012) e regulação da temperatura (termogênese) (Brondani et al., 2012). Em peixes, no entanto a *UCP1* não exerce função de regulação de temperatura corporal (Velasques et al., 2016). A UCP1 tem sido relacionada com a diminuição das EROs no tecido adiposo marrom (Dlasková et al., 2010; Oelkrug et al., 2010; Clarke e Porter, 2013) e no rim (Jia et al., 2019) de camundongos e em humanos (Chondronikola et al., 2016, 2014). Velasques et al.(2016) investigou a modulação da expressão do gene *ucp1* em *zebrafish* expostos a RD nas concentrações de 5 e 10 mg/L durante 96 horas: o trabalho relatou o aumento da expressão deste gene em brânquias contudo no fígado não houve diferença quando comparado ao grupo controle.

Diante do exposto, torna-se relevante a avaliação da modulação na expressão dos genes *cat*, *sod2*, *gclc*, *gsta* e *ucp1* após a exposição de *A. charrua* a RDT. Tais genes participam da manutenção de processos fisiológicos fundamentais do organismo e uma possível alteração por fatores antropogênicos pode ameaçar ainda mais a existência da espécie.

4 CAPÍTULO 1

4 1 Manuscrito

Os dados gerados nesta dissertação estão apresentados na de um artigo científico,manuscrito, o qual encontram-se submetido a revista *Frontiers in Genetics* com fator de impacto 4.599. A pesquisa contou com colabores externos como o Laboratório de Biologia Molecular (Universidade Federal de Rio Grande / FURG, Rio Grande, RS) e o Laboratório de Ictiologia (Instituto Pró-Pampa /IPPampa, Pelotas, RS).

Gene expression modulation from antioxidant system of killifish *Austrolebias charrua* after exposition to Roundup Transorb[®]

Natiéli M. Gonçalves¹, Tony L. R. Silveira^{1,2†}, Amanda W. S. Martins¹, Eduardo N. Dellagostin¹, Eduardo B. Blödorn¹, William B. Domingues¹, Mateus T. Kütter², Luis F. Marins², Matheus V. Volcan³, Mariana H. Remião^{1†*}, Vinicius F. Campos^{1*}

¹Laboratório de Genômica Estrutural, Centro de Desenvolvimento Tecnológico, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, RS, Brasil;

²Laboratório de Biologia Molecular, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande, RS, Brasil.

³Laboratório de Ictiologia, Instituto Pró-Pampa (IPPampa), Pelotas, RS, Brasil.

†These authors have contributed equally to this study.

* **Correspondence:** Vinicius Farias Campos, Laboratório de Genômica Estrutural, CDTEc, Campus Universitário Capão do Leão s/ nº - Prédio 20, Jardim América, Capão do Leão, RS, Brasil. CEP: 96.010-900, Phone/Fax:+55 53 3275–7030.

fariascampos@gmail.com

Mariana H. Remião, Laboratório de Genômica Estrutural, CDTEc, Campus Universitário Capão do Leão s/ nº - Prédio 20, Jardim América, Capão do Leão, RS, Brasil. CEP: 96.010-900, Phone/Fax:+55 53 3275–7030.

mariana.remiao@ufpel.edu.br

Number of words: 5606

Number of tables: 2

Number of figures: 2

Keywords: Gene expression; Oxidative stress; Killifish; Herbicide; Roundup; Glyphosate.

Abstract

Roundup Transorb® (RDT) is the most popular glyphosate-based herbicide (GHB) used in agriculture worldwide. Due to the increasing use, GHBs reach non-target organisms such as fishes, generating a concern about possible toxicological and environmental damage to the aquatic environment. The annual killifish *Austrolebias charrua* is an endangered species, endemic to the southern region of South America that inhabits temporary ponds that emerges on rainy season. The present study aims to evaluate the effects of different RDT concentrations 0.065 and 5 mg/L glyphosate acid equivalent exposure on *A. charrua* for 96 hours, followed by 96 hours of clean water. Gene expression of *cat*, *sod2*, *gsta*, *gclc*, and *ucp1* genes was performed on liver and gills. In liver, there was an up-regulation of *gclc*, and *gsta* genes in 5 mg/L RDT, while *ucp1* had a down-regulated in both RDT groups. In gills, *cat* presented a down-regulation in both RDT groups, while *ucp1* was up-regulated at 0.065 mg/L. This is the first study that evaluated the effect of RDT on gene modulation of *A. charrua* showing that this contaminant can negatively affect even in concentrations, allowed by legislation.

INTRODUCTION

The glyphosate (N-[phosphonomethyl] glycine) is a non-selective herbicide with $C_3H_8NO_5P$ molecular formulation (Benbrook, 2016). Glyphosate-based herbicides (GHBs) are one of the most widely used in agriculture (Spinaci et al., 2020) and it works acting on the shikimate pathway present on chloroplasts of plants, binding and inhibiting the enzyme 5-enolpyruvyl-3-shikimate phosphate synthase (EPSPS) (Panetto et al., 2019). The Roundup® (Monsanto, Saint Louis, MO, USA, 1974) was the first GHB produced, and it is nowadays the most popular herbicide used worldwide (Benbrook, 2016; Dayan, 2019; Nerozzi et al., 2020). Further, there are many different formulations, such as Roundup Original, Roundup Ultra, and Roundup Transorb (RDT).

The intense use of this and other agrochemicals (Du-Carrée et al., 2021) results in contamination of water bodies (Ayoola S.O, 2008; Carriquiriborde and Ronco, 2006; Retter et al., 2018). The GHBs have high water solubility (12 mg/L at 25 °C), contaminating the water bodies through leaching during rainfall seasons. This is intensified in cases of exacerbated applications and uses in agricultural fields near to aquatic environments. (Annett et al., 2014; Van Bruggen et al., 2018). In southern of Brazil, RDT is widely used in rice and soybean monocultures in the southern fields around Lagoa Mirim, the largest lagoon in Brazil, and around other smaller coastal. In Brazil, according to the National Environment Council (CONAMA, 2005), the maximum limit of glyphosate in water for the protection of aquatic communities is 0.065 mg/L. Meanwhile, residues of glyphosate have been detected in water

near plantations of 0.36 to 2.16 and 0.10 to 0.7 in Brazil and Argentina, respectively (Zebral et al., 2018). However, studies suggest that concentrations up to 10 mg/L may be environmentally relevant (Langiano and Martinez, 2008; Topal et al., 2015b)

Herbicides can affect non-target organisms such as aquatic animals (Retter et al., 2018), which can be damaged by the excess of reactive oxygen species (ROS) causing oxidative stress (Lushchak, 2016). Oxidative stress is characterized by the imbalance oxidative system, represented by excessive generation of pro-oxidants such hydrogen peroxide (H_2O_2), superoxide anion (O_2^-) and hydroxyl radical ($OH^\bullet$), and the defense system related to enzymatic antioxidants (Murussi et al., 2016) constituted by catalase (CAT), superoxide dismutase (SOD), and glutathione peroxidase (GPx) (Lushchak, 2016). Thus, genes related to antioxidant pathways can be markers related to ROS combat generated by herbicides exposure (Velasques et al., 2016). Some studies have related the toxicity of pesticides in aquatic environments on freshwater turtle (*Trachemys scripta elegans*) (Héritier et al., 2017), freshwater shrimp (*Macrobrachium nipponensis*) (Hong et al., 2018), copepod (*Tigriopus japonicus*) (Yoon et al., 2019), and teleosts *Danio rerio* (Velasques et al., 2016), *Rhamdia quelen* (Sobjak et al., 2017), *Cyprinus carpio* (Ma et al., 2018), and *Oreochromis niloticus* (Zheng et al., 2021).

Among the animals that are probably been affected by GHB are the annual killifish *Austrolebias charrua*. It is an endangered species from Rivulidae (de Oliveira Fernandes et al., 2021), endemic to the southern region of South America, including Uruguay, Paraguay, Argentina, and the south of Brazil (Lanés, 2011; Volcan et al., 2013). These fish *A. charrua* inhabits inhospitable to other teleosts environment, such as temporary ponds, which flood in rainy seasons and dry up completely during the dry seasons (Berois et al., 2015; Lanés, 2011; Naumann and Englert, 2018). *Austrolebias charrua* is restricted to ponds located in the surroundings of the Patos-Mirim lagoon system in Brazil (Lanés, 2011). In light of this, the present study aimed to evaluate the effects of RDT exposure on gene expression of antioxidant system from liver and gills of killifish *A. charrua*. Furthermore, due to the lacking of knowledge in molecular level about *A. charrua*, it was essential the sequencing and characterization of some genes to report the potential toxicity of RDT in gene expression.

MATERIALS AND METHODS

Animals and conditions

Adult *Austrolebias charrua* were caught in temporary ponds in the coastal fields of the Pampa Biome (Rio Grande city, RS, Brazil). The fish have mean length 3.34 ± 0.5 cm (standard deviation, SD) and mean mass of 0.42 ± 0.15 g (SD). After being captured, the animals were transported during less than 1 h to the laboratory and distributed in triplets (two female and one male) occupying plastic aquaria with nominal capacity of 7 L and working volume of 5 L. Perforated translucent acrylic partitions were used to separate males and females during the acclimation of 10 days. Since the beginning of acclimation until the end of experimental period (without significative difference between both), the water parameters were maintained as follows: temperature of 19 °C; dissolved oxygen levels of > 6 mg.L; pH 7 ± 0.1 (SD); ammonia levels lower than 0.25 mg.L; and water hardness ≤ 1 °dH. A photoperiod of 12 h light/12 h dark was applied in this study. Approximately 1/2 of the water of each tank was renewed once a week. Fish were fed twice a day with live *Artemia salina* nauplii *ad libitum*.

The animals were collected under permit IBAMA/SISBIO 71072. The animal use and all handling practices were approved by the ethics committees on Animal Experimentation of the Federal University of Pelotas and Federal University of Rio Grande (CEEa UFPEL 145/2019 and CEUA FURG P053/2019, respectively).

Experimental design

The animals were distributed in 18 aquaria, which contained two females and one male, totaling 54 animals. The experimental design consisted into three groups of six aquaria each: a control group without exposition, and two groups exposed to RDT at 0.065 and 5 mg/L (glyphosate acid equivalent, GAE).

The RDT groups acute exposed for 96 hours. After the 96 hours, the water from aquaria was removed and changed by clean water, and 96 hours later the animals were euthanized, and tissues were collected.

Sample collection

Animals were euthanized in iced water (2°C–4°C) for 10 min. Then, the animals were measured, weighted, and the tissues (gills and liver) were collected through dissection. The tissues were stored in liquid nitrogen until the use for the analysis.

RNA extraction and cDNA synthesis

The total RNA was extracted from gills and liver sample using Trizol[®] reagent (ThermoFisher Scientific, USA) along with the Pure Link RNA mini Kit (ThermoFisher Scientific, USA) according to the manufacturer's protocol adapted from (Parthipan et al., 2015). The RNA quality and integrity were measured using NanoVue[™] (GE Healthcare Life Sciences, United States) UV-light spectrophotometry with absorption ($A_{260}/A_{280} \geq 2.0$ nm). To remove genomic DNA contamination, the RNA was treated with DNase using DNA-free[™] Kit DNase Treatment and Removal Reagents (Ambion Life technologies, USA) following the manufacturer's recommendation. After, the RNA quality was analyzed with fluorometer Qubit[®] (Invitrogen[™], USA) and only the samples presenting high quality were used in reverse transcription reactions.

First-strand cDNA was performed using High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (applied Biosystems, USA), master mix with 10 μ l reaction adapted to the manufacturer's protocol. The cDNA was stored at -20 °C until further use.

Analyzed genes

The analyzed genes are related to oxidative stress and antioxidant defense: catalase (*cat*), Mn superoxide dismutase (*sod2*), glutathione S-transferase (*gsta*), glutamate-cysteine ligase catalytic subunit (*gclc*), and mitochondrial brown fat uncoupling protein 1 (*ucp1*) and the gene elongation factor 1 alpha (*ef1a*) was used as reference gene. The symbol, name, and function of each evaluated gene are presented at Table 1.

Sequencing and molecular characterization

The gene fragments were amplified by polymerase chain reaction (PCR) using primers designed on PriFi online tool (<https://services.birc.au.dk/prifi/>) based based in the conserved regions identified after multiple alignments of known sequences of other fish species deposited in GenBank (Table 2).

The PCR reactions were run in the SimpliAmp[™] thermal cycler (Applied Biosystems, USA), using GoTaqR G2 Flexi DNA Polymerase (Promega, USA) mix buffer following manufacturer's protocol. The PCR follows the steps: an initial denaturation step for 1 min at 94 °C; followed by 35 cycles at 94 °C for 30 s; 60 to 64.9 °C (according to primer sequence illustrated at Table 2) for 30 s; and 72 °C for 1 min, with a final extension of 5 min at 72 °C.

To confirm the amplification of the fragments, the PCR product were analyzed by electrophoresis using 1.5% agarose gel. PCR products were purified using E-gel (Invitrogen, USA) and inserted into pCR[®]4-TOPO[®] TA (Invitrogen, USA) cloning vector and transformed into the electrocompetent *Escherichia coli* strain DH5 α . For sequencing, it was used Applied Biosystems 3500 Genetic Analyzer[®] automatic sequencer (Life Technologies, USA), in characterized fragments.

***In silico* analysis**

The translation of sequenced nucleotides to amino acid sequences were identified with open-reading frame (ORF) using ORF finder (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/orffinder/>) and to predict the protein sequence with ExPASy bioinformatics resource portal (<https://web.expasy.org/translate/>). The UniProt database (<https://www.uniprot.org/>) were used to search conserved sites and domains. Many groups species were used from GenBank or UniProt to obtain amino acid sequences of CAT, SOD2, GCLC, GST α , EF1 α and UCP1 proteins. The default parameters of ClustalX v.2 (Larkin et al., 2007) were used to presume amino acid sequences of *A. charrua*.

Gene expression analysis

The predicted primers for genes *cat*, *sod2*, *gsta*, *gclc*, and, *ucp1* were designated using Primer3 online tool (<https://primer3.ut.ee/http://bioinfo.ut.ee/primer3-9010.4.0/>). In the absence of a validated reference gene for *A. charrua*, the primer to the gene *ef1a* previously described for *Odonthestes humensis* (Silveira et al., 2018; GenBank accession No KU639717) was efficient and used to normalize the analysis (Table 2).

The Quantitative Reverse Transcription PCR (qRT-PCR) was used to analyze gene expression, and it was runned on CFX96T Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad Laboratories, United States) using SYBRR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems, United States). The amplification conditions were 95 °C for 2 min; 40 cycles at 95 °C for 15 s; 60°C for 60 s. To normalize the fold change in gene expression were using method $2^{-\Delta\Delta CT}$, previously described (Livak and Schmittgen, 2001) using the reference gene.

Statistical analysis

The normality distribution of quantitative data was evaluated by the Shapiro–Wilk test. Levene’s test, O’Brien’s test, and Brown and Forsythe test are used to evaluate the

homogeneity variances. Gene expression data were submitted to the One-Way ANOVA by Tukey multiple comparison test, with a significance level of 5%.

RESULTS

Sequencing and molecular characterization

The nucleic acid of *cat*, *ef1 α* , *gclc*, *gsta*, *sod2*, and *ucp1* genes from *A. charrua* were sequenced and deposited on GenBank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>) with accession numbers MW960421, MW960433, MW960434, MW960435, MW960437, and MW360438, respectively. The length of fragments was 478, 645, 225, 426, 384, and 600 pb, respectively.

The fragment of *cat* cDNA from *A. charrua* belongs to ORF +1 and encodes to 159 amino acids that belong to the catalase family. The fragment between amino acids 1 and 159 contained a catalase domain, being possible to observe active site of the protein in amino acid 67.

The fragment of *sod2* cDNA was found in ORF +1 and codes to 128 amino acids. The fragment belongs to Superoxide dismutase [Mn] family and has a metal binding and two domains between amino acids 1 and 128. This fragment contains metal binding sites at amino acids 18 and 66 contained on first domain located at amino acids 1 to 73 and second domain at amino acids 81 to 128.

The fragment of *ucp1* cDNA codes to 200 amino acids on ORF +1 that belongs to uncoupling protein 1 family. This fragment contains three repetitions between amino acids 1 and 200 and these repetitions are located on 1 to 69, 73 to 165, and 175 to 200.

The fragment of *ef1 α* cDNA was found in ORF -2 and encodes to 215 amino acids that belong to the elongation factor 1 alpha. The fragment between 1 and 215 have two bonds for nucleotides on amino acids 48 to 52 and 110 to 113 with one domain on amino acids 1 to 199.

The fragment of *gclc* cDNA was found in ORF +1 and codes to 75 amino acids that belongs to the glutamate-cysteine ligase catalytic subunit family. The fragment has glutamate-cysteine ligase type 3 family domain.

The fragment of *gsta* cDNA was found in ORF +1 and encodes to 142 amino acids that belong to the glutathione S-transferase alpha family. The fragments between amino acids between 1 and 142 contains two glutathione domains, on amino acids 1 to 46 and 48 to 142, respectively.

Mortality

Mortality was observed only during experimental period, when fishes were exposed to 5 mg/L: 2(11,11%) at 24h, 2 (11,11%) at 48h, 1 (5,55%) at 72h, and 1 (5,55%) at 96 h in a total of 18 fish. In each aquarium, dead fish were replaced by others that have been equally exposed to RDT, to keep the minimum sample number, in order not to compromise the following statistical analysis.

Gene expression

Liver

For gene expression in liver, after (GAE) of RDT exposure, *cat* and *sod2* genes did not present a significant difference ($p < 0.05$) in comparasion to the control group (Fig. 1A and C). However, the mRNA expression of *gclc* and *gsta* were significantly up-regulated in fish exposed to 5 mg/L (GAE) of RDT, while were not different in 0.065 mg/L (Fig 1B and D). Meanwhile, the gene expression of *ucp1* was decreasead ($p < 0.05$) in fish exposed to both (GAE) of RDT concentrations (0.065 and 5 mg/L) in relation to control group (Fig.1E).

Gills

For gene expression in gills, *cat* gene presented a significant down-regulation ($p < 0.05$) on fish exposed to (GAE) of RDT (Fig 2.A). The *ucp1* gene also presented statistical difference ($p < 0.05$), fish exposed to 0.065 mg/L (GAE) of RDT had a significant higher expression than the fish that were exposed to 5 mg/L (GAE) of RDT (Fig. 2E). There was no significant difference observed in *gclc*, *sod2*, and *gsta* gene expressions between the groups (Fig. 2B, C and D).

DISCUSSION

This is the first study that evaluates the effects of RDT on the southern Brazilian endemic and endangered annual killifish *A. charrua*. In addition, we perform partial cloning and structural characterization of genes involved in oxidative stress.

Gene expression in gills

The gills are one of the primary target for aquatic pollutants (Bojarski and Witeska, 2020) due to anatomical position, being easily injured. Injuries on this organ may cause loss of its physiological functions resulting, for example, in low growth until death of fish (Ma et al., 2019). The present study has shown that *cat* gene was down-regulated in gills from the fish exposed to RDT. The *cat* gene translates to a protein that catalyzes the conversion of H_2O_2 to molecular oxygen (O_2) and water (H_2O) (Lushchak, 2016). Probably, the down-regulation of *cat* results into cell damage by accumulation of H_2O_2 (Sepasi Tehrani and Moosavi-Movahedi, 2018). Another study did not find difference in gene expression of *cat* gene in gills of zebrafish exposed to Roundup[®] at 5 mg/L for 96 hours (Velasques et al., 2016). Different results were also found by another study, that observed that *cat* was up-regulated in *O. humensis* exposed to RDT at 2.07 and 3.68 mg/L during 24 hours (Martins et al., 2021).

The result found in the present study was the up-regulation of *ucp1* gene expression in gills exposed to 0.065 mg/L of RDT. Fishes have three uncoupling proteins (UCP's), *ucp1*, *ucp2*, and *ucp3* (Tine et al., 2012), and they are located in the inner mitochondrial membrane. They may protect the organism from oxidative damage due to the decrease of membrane potential and oxygen availability (Dlasková et al., 2010). The *ucp1* gene translates to a protein that regulates the production of mitochondrial ROS (Dlasková et al., 2010). Corroborating with these, Velasques et al., (2016) has associated the up-regulation of *ucp1* gene with a ROS reduction in zebrafish exposed to Roundup[®]. The same study has found that zebrafish exposed to 10 mg/L of Roundup[®] presented an up-regulation of this gene expression in gills after 24 hours. At 5 mg/L after 96 hours of exposition, did not find difference of *ucp1* gene expression from the control group. To know the role of *ucp* gene and UCP protein in xenobiotic exposure may be interesting to understand the mechanisms for protection against oxidative stress damage in this cases (Cadenas, 2018). Probably, the highest peak of stress in gills is related to the 24 hours of contact with xenobiotics than to the concentration of these pollutants, going in agreement with results obtained by Velasques et al. (2016) and Martins et al. (2021).

Gene expression in liver

After the entry of xenobiotics through the gills, pollutant residues are carried through the blood where they can reach various organs such as the liver. The liver is the main organ responsible for excreting pollutants, detoxifying the body (Causey et al., 2018). The present study has found in this tissue an increase of *gclc* and *gstα* genes at 5 mg/L RDT, and a down-regulation of *ucp1* gene expression in both RDT exposition groups, comparing to control group. Differently, Velasques et al. (2016) observed that the *ucp1* gene expression was not different from control group when zebrafish are exposed to 5 and 10 mg/L of Roundup®.

The *gclc* gene translates to a protein that is important for the synthesis of the non-enzymatic antioxidant glutathione reduced (GSH) (White et al., 2003). GSH, during the process of oxidative stress is responsible for reducing reactive oxygen species as H_2O_2 and OH^- through a reaction catalyzed by the enzyme GPx, generating oxidized glutathione (GSSG) and H_2O (Barbosa et al., 2010b). The up-regulation of *gclc* gene may be associated to the primary response against pro-oxidant agents (de Aguiar et al., 2016). We believe, this is what happened to *A. charrua* exposed to 5 mg/L RDT, that presented an up-regulation of expression of this gene compared to other groups. Velasques et al. (2016) observed that zebrafish exposed to Roundup® for 96 hours did not find significant difference for this gene in liver. Similar to *gclc*, this study has found an up-regulation of *gstα* gene at 5 mg/L RDT. The *gstα* gene translates to a protein that detoxifies the body (Huber et al., 2008), acting at endogenous agents, such as metabolites from lipid peroxidation, and exogenous agents, such as pollutants present in the environment (Modesto and Martinez, 2010). Through the conjugation of the catalyzed reaction between GSH with electrophilic substances such as carbon, nitrogen or sulfur atoms, it facilitates the excretion of toxic substances by cells (Bašica et al., 2019). The up-regulation of *gstα* may be related to the detoxification of the body against pollutants, such as herbicides (Ma et al., 2018). In agreement with our results, another study has also found an up-regulation of *gstα* in liver of *Cyprinus carpio* L. after Paraquat exposure for 7 days (Ma et al., 2018). However, chronic exposure (80 days) to glyphosate (without surfactant) showed no difference in the expression of *gstα* in the liver of *O. niloticus* (Zheng et al., 2021). Likewise, Velasques et al. (2016) observed no modulation of *gstα* in the liver from zebrafish after 96h after the exposure to Roundup®. After the analysis of gene expression in gills and liver, we hypothesized that the period from 96 hours in clean water may have been a key factor responsible for reestablishing physiology of *A. charrua*.

However, further studies are needed to validate this hypothesis, since this is the first work that uses this methodology.

The first 48 hours of exposure to RDT were the most stressful for *A. charrua* culminating in highest mortality rate in this study. However, further studies are needed to verify the cause of death these fish was due to genotoxicity from exposure to RDT, since, unlike our results, Velasques et al. (2016) observed no mortality in zebrafish exposed to 10 mg/L of Roundup® for 96 hours. As well as no mortality in *Prochilodus lineatus* (Modesto and Martinez, 2010a) and *O. humensis* (Martins et al., 2021), exposed for 96 hours to 5 mg/L hours and exposed to 3.68 mg/L for 24 hours to RDT, respectively.

Conclusion

This research can contribute to the development of public policies that aim to mitigate the damage caused by herbicides to non-target organisms, mainly the endangered ones such as *A. charrua*. More studies are needed to elucidate the effect of RDT and other herbicides in different systems, organs, and genes.

Conflict of Interest

The authors declare not having conflict of interest. No brand or trademark cited in the text have sponsored any of the authors. All authors have had access to the pre-submitted version of the manuscript and agree with the publication in Frontiers in Genetics.

Author Contributions

NMG, MHR, and TLRS conducted all experiments and were a major's contributors in writing the manuscript. TLRS, MTK, MVV, and LFM were responsible for collection and animal maintenance. AWSM, END, EBB, and WBD conducted the gene cloning and qRT-PCR experiments. MHR and VFC were responsible for project administration, funding acquisition, and writing the manuscript. All authors read and approved the final version of manuscript.

Funding

This study was supported by Fundação de Amparo à pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS 1#19/2551-0001323-0; FAPERGS-FAPESP #19/2551-0000953-3) and was financed in part by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) Finance Code 001 and AUXPE #2537/2018. LFM and VFC are also individually supported by Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico.

Acknowledgments

To the graduate colleagues of the Structural Genomics Laboratory for their research assistance.

RDT

GHBs

EPSPS

GAE

SD

Roundup Transorb

Glyphosate-based herbicides

Enolpyruvyl-3-shikimate phosphate synthase

Glyphosate acid equivalent

Standard deviation

References

- Annett, R., Habibi, H.R., and Hontela, A. (2014). Impact of glyphosate and glyphosate-based herbicides on the freshwater environment. *J. Appl. Toxicol.* 34, 458–479. doi:10.1002/jat.2997.
- Ayoola S.O. (2008). Toxicity of glyphosate herbicide on Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) juvenile. *Afr.J. Agric. Res.* 3 (12), 825–834.
- Barbosa, K.B.F., Costa, N.M.B., Alfenas, R. de C.G., De Paula, S.O., Minim, V.P.R., and Bressan, J. (2010). Estresse oxidativo: conceito, implicações e fatores modulatórios. *Rev. Nutr.* 23, 629–643. doi:10.1590/S1415-52732010000400013.
- Bašica, B., Mihaljević, I., Maraković, N., Kovačević, R., and Smital, T. (2019). Molecular characterization of zebrafish Gstr1, the only member of teleost-specific glutathione S-transferase class. *Aquat. Toxicol.* 208, 196–207. doi:10.1016/j.aquatox.2019.01.005.
- Benbrook, C.M. (2016). Trends in glyphosate herbicide use in the United States and globally. *Environ. Sci. Eur.* 28, 3. doi:10.1186/s12302-016-0070-0.
- Berois, N., Garcia, G., and Sa, R.O. (2015). *Annual Fishes: Life History Strategy, Diversity, and Evolution*. CRC Press.
- Bojarski, B., and Witeska, M. (2020). Blood biomarkers of herbicide, insecticide, and fungicide toxicity to fish-a review. *Environ. Sci. Pollut. Res. Int.* 27, 19236–19250. doi:10.1007/s11356-020-08248-8.
- Cadenas, S. (2018). Mitochondrial uncoupling, ROS generation and cardioprotection. *Biochim. Biophys. Acta. Bioenerg.* 1859, 940–950. doi:10.1016/j.bbabi.2018.05.019.
- Carriquiriborde, P., and Ronco, A. (2006). Ecotoxicological studies on the pejerrey (*Odontesthes bonariensis*, Pisces atherinopsidae). *Biocell.* 30, 97–109.
- Causey, D.R., Pohl, M.A.N., Stead, D.A., Martin, S.A.M., Secombes, C.J., and Macqueen, D.J. (2018). High-throughput proteomic profiling of the fish liver following bacterial infection. *B.M.C. Genomics* 19, 719. doi:10.1186/s12864-018-5092-0.
- CONAMA, Conselho Nacional do Meio Ambiente. Resolução nº 357, de 17 de março de 2005. **Diário Oficial da União**, n. 53, p. 58-63, 2005.
- Dayan, F.E. (2019). Current status and future prospects in herbicide discovery. *Plants (Basel)* 8. doi:10.3390/plants8090341.
- de Aguiar, L.M., Figueira, F.H., Gottschalk, M.S., and da Rosa, C.E. (2016). Glyphosate-based herbicide exposure causes antioxidant defence responses in the fruit fly *Drosophila melanogaster*. *Comp. Biochem. Physiol. C Toxicol. Pharmacol.* 185–186, 94–101. doi:10.1016/j.cbpc.2016.03.006.
- de Oliveira Fernandes, M., Barbosa, C., Garcez, D.K., Varela Junior, A.S., Volcan, M.V., and Robe, L.J. (2021). Phylogeographic analyses and taxonomic inconsistencies of the Neotropical annual fish *Austrolebias minuano*, *Austrolebias charrua* and *Austrolebias pongondo* (Cyprinodontiformes: Rivulidae). *Environ. Biol. Fish.* 104, 1–14. doi:10.1007/s10641-020-01045-9.
- Dlasková, A., Clarke, K.J., and Porter, R.K. (2010). The role of UCP 1 in production of reactive oxygen species by mitochondria isolated from brown adipose tissue. *Biochim. Biophys. Acta. Bioenerg.* 1797, 1470–1476. doi:10.1016/j.bbabi.2010.04.008.
- Du-Carrée, J.L., Morin, T., and Danion, M. (2021). Impact of chronic exposure of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*, to low doses of glyphosate or glyphosate-based herbicides. *Aquat. Toxicol.* 230, 105687. doi:10.1016/j.aquatox.2020.105687.
- Héritier, L., Duval, D., Galinier, R., Meistertzheim, A.L., and Verneau, O. (2017). Oxidative stress induced by glyphosate-based herbicide on freshwater turtles: Glyphosate-based

- herbicide affect on freshwater turtles. *Environ. Toxicol. Chem.* 36, 3343–3350. doi:10.1002/etc.3916.
- Hong, Y., Yang, X., Huang, Y., Yan, G., and Cheng, Y. (2018). Assessment of the oxidative and genotoxic effects of the glyphosate-based herbicide roundup on the freshwater shrimp, *Macrobrachium nipponensis*. *Chemosphere* 210, 896–906. doi:10.1016/j.chemosphere.2018.07.069.
- Huber, P.C., Almeida, W.P., and Fátima, Â. (2008). Glutathione e enzimas relacionadas: papel biológico e importância em processos patológicos. *Química Nova* 31, 1170–1179. doi:10.1590/S0100-40422008000500046.
- Lanés, L. (2011). **Dinâmica e conservação de peixes anuais (Cyprinodontiformes: Rivulidae) no parque nacional da lagoa do peixe.** Dissertação (Mestrado em Biologia: Diversidade e Manejo de Vida Silvestre). Universidade do Vale do Rio dos Sinos. São Leopoldo, p. 60.
- Larkin, M.A., Blackshields, G., Brown, N.P., Chenna, R., McGettigan, P.A., McWilliam, H., et al. (2007). Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics* 23, 2947–2948. doi:10.1093/bioinformatics/btm404.
- Livak, K.J., and Schmittgen, T.D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ Method. *Methods* 25, 402–408. doi:10.1006/meth.2001.1262.
- Lushchak, O.V., Kubrak, O.I., Storey, J.M., Storey, K.B., and Lushchak, V.I. (2009). Low toxic herbicide Roundup induces mild oxidative stress in goldfish tissues. *Chemosphere* 76, 932–937. doi:10.1016/j.chemosphere.2009.04.045.
- Lushchak, V.I. (2016). Contaminant-induced oxidative stress in fish: a mechanistic approach. *Fish physiol. Biochem.* 42, 711–747. doi:10.1007/s10695-015-0171-5.
- Ma, J., Li, Y., Li, W., and Li, X. (2018). Hepatotoxicity of paraquat on common carp (*Cyprinus carpio* L.). *Sci. Total Environ.* 616–617, 889–898. doi:10.1016/j.scitotenv.2017.10.231.
- Ma, J., Zhu, J., Wang, W., Ruan, P., Rajeshkumar, S., and Li, X. (2019). Biochemical and molecular impacts of glyphosate-based herbicide on the gills of common carp. *Environ Pollut* 252, 1288–1300. doi:10.1016/j.envpol.2019.06.040.
- Martins, A.W.S., Silveira, T.L.R., Remião, M.H., Domingues, W.B., Dellagostin, E.N., Junior, A.S.V., et al. (2021). Acute exposition to Roundup Transorb® induces systemic oxidative stress and alterations in the expression of newly sequenced genes in silverside fish (*Odontesthes humensis*). *Environ. Sci. Pollut. Res. Int.* doi:10.1007/s11356-021-15239-w.
- Modesto, K.A., and Martinez, C.B.R. (2010a). Effects of Roundup Transorb on fish: Hematology, antioxidant defenses and acetylcholinesterase activity. *Chemosphere* 81, 781–787. doi:10.1016/j.chemosphere.2010.07.005.
- Modesto, K.A., and Martinez, C.B.R. (2010b). Roundup causes oxidative stress in liver and inhibits acetylcholinesterase in muscle and brain of the fish *Prochilodus lineatus*. *Chemosphere* 78, 294–299. doi:10.1016/j.chemosphere.2009.10.047.
- Murussi, C.R., Costa, M.D., Leitemperger, J.W., Guerra, L., Rodrigues, C.C.R., Menezes, C.C., et al. (2016). Exposure to different glyphosate formulations on the oxidative and histological status of *Rhamdia quelen*. *Fish Physiol. Biochem.* 42, 445–455. doi:10.1007/s10695-015-0150-x.
- Naumann, B., and Englert, C. (2018). Dispersion/reaggregation in early development of annual killifishes: Phylogenetic distribution and evolutionary significance of a unique feature. *Dev. Biol.* 442, 69–79. doi:10.1016/j.ydbio.2018.07.015.

- Nerozzi, C., Recuero, S., Galeati, G., Bucci, D., Spinaci, M., and Yeste, M. (2020). Effects of Roundup and its main component, glyphosate, upon mammalian sperm function and survival. *Sci. Rep.* 10, 11026. doi:10.1038/s41598-020-67538-w.
- Panetto, O.S., Gomes, H.F., Fraga Gomes, D.S., Campos, E., Romeiro, N.C., Costa, E.P., et al. (2019). The effects of Roundup® in embryo development and energy metabolism of the zebrafish (*Danio rerio*). *Comp. Biochem. Physiol. C. Toxicol. Pharmacol.* 222, 74–81. doi:10.1016/j.cbpc.2019.04.007.
- Parthipan, S., Selvaraju, S., Somashekar, L., Kolte, A. P., Arangasamy, A., and Ravindra, J.P. (2015). Spermatozoa input concentrations and RNA isolation methods on RNA yield and quality in bull (*Bos taurus*). *Anal. Biochem.* 482, 32–39. doi:10.1016/j.ab.2015.03.022.
- Retter, K., Esser, K.H., Lüpke, M., Hellmann, J., Steinhagen, D., and Jung-Schroers, V. (2018). Stunning of common carp: Results from a field and a laboratory study. *BMC Vet. Res.* 14, 205. doi:10.1186/s12917-018-1530-0.
- Salbego, J., Pretto, A., Gioda, C.R., de Menezes, C.C., Lazzari, R., Radünz Neto, J., et al. (2010). Herbicide formulation with glyphosate affects growth, acetylcholinesterase activity, and metabolic and hematological parameters in piava (*Leporinus obtusidens*). *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 58, 740–745. doi:10.1007/s00244-009-9464-y.
- Sepasi Tehrani, H., and Moosavi-Movahedi, A.A. (2018). Catalase and its mysteries. *Prog. Biophys Mol. Biol.* 140, 5–12. doi:10.1016/j.pbiomolbio.2018.03.001.
- Silveira, T.L.R., Martins, G.B., Domingues, W.B., Remião, M.H., Barreto, B.F., Lessa, I.M., et al. (2018). Gene and blood analysis reveal that transfer from brackish water to freshwater is more stressful to the silverside *Odontesthes humensis*. *Front. Genet.* 9. doi:10.3389/fgene.2018.00028.
- Sobjak, T.M., Romão, S., do Nascimento, C.Z., Dos Santos, A.F.P., Vogel, L., and Guimarães, A.T.B. (2017). Assessment of the oxidative and neurotoxic effects of glyphosate pesticide on the larvae of *Rhamdia quelen* fish. *Chemosphere* 182, 267–275. doi:10.1016/j.chemosphere.2017.05.031.
- Spinaci, M., Nerozzi, C., Tamanini, Bucci, D., and Galeati, G. (2020). Glyphosate and its formulation Roundup impair pig oocyte maturation. *Sci. Rep.* 10, 12007. doi:10.1038/s41598-020-68813-6.
- Tine, M., Kuhl, H., Jastroch, M., and Reinhardt, R. (2012). Genomic characterization of the European sea bass *Dicentrarchus labrax* reveals the presence of a novel uncoupling protein (UCP) gene family member in the teleost fish lineage. *BMC Evol. Biol.* 12, 62. doi:10.1186/1471-2148-12-62.
- Van Bruggen, A.H.C., He, M.M., Shin, K., Mai, V., Jeong, K.C., Finckh, M.R., et al. (2018). Environmental and health effects of the herbicide glyphosate. *Sci. Total Environ.* 616–617, 255–268. doi:10.1016/j.scitotenv.2017.10.309.
- Velasques, R.R., Sandrini, J.Z., and da Rosa, C.E. (2016). Roundup® in zebrafish: Effects on oxidative status and gene expression. *Zebrafish* 13, 432–441. doi:10.1089/zeb.2016.1259.
- Volcan, M.V., Sampaio, L.A., Bongalhardo, D.C., and Robaldo, R.B. (2013). Reproduction of the annual fish *Austrolebias nigrofasciatus* (Rivulidae) maintained at different temperatures. *J. Appl. Ichthyol.* 29, 648–652. doi:10.1111/jai.12013.
- White, C.C., Viernes, H., Krejsa, C.M., Botta, D., and Kavanagh, T.J. (2003). Fluorescence-based microtiter plate assay for glutamate–cysteine ligase activity. *Anal. Biochem.* 318, 175–180. doi:10.1016/S0003-2697(03)00143-X.
- Yoon, D.-S., Park, J.C., Park, H.G., Lee, J.-S., and Han, J. (2019). Effects of atrazine on life parameters, oxidative stress, and ecdysteroid biosynthetic pathway in the marine

- copepod *Tigriopus japonicus*. *Aqua. Toxicol.* 213, 105213.
doi:10.1016/j.aquatox.2019.05.015.
- Zebral, Y.D., Lansini, L.R., Costa, P.G., Roza, M., Bianchini, A., and Robaldo, R.B. (2018). A glyphosate-based herbicide reduces fertility, embryonic upper thermal tolerance and alters embryonic diapause of the threatened annual fish *Austrolebias nigrofasciatus*. *Chemosphere* 196, 260–269. doi:10.1016/j.chemosphere.2017.12.196.
- Zheng, T., Jia, R., Cao, L., Du, J., Gu, Z., He, Q., et al. (2021). Effects of chronic glyphosate exposure on antioxidant status, metabolism and immune response in tilapia (GIFT, *Oreochromis niloticus*). *Comp. Biochem. Physiol. C. Toxicol. Pharmacol.* 239, 108878. doi:10.1016/j.cbpc.2020.108878.

Table 1. Summarized data of analyzed genes in the present study.

Gene symbol	Gene name	Function	Access on GenBank
<i>cat</i>	Catalase	Enzyme of the antioxidant pathway	MW960421
<i>sod2</i>	Superoxide dismutase [Mn]	Enzyme of the antioxidant pathway	MW960437
<i>gsta</i>	Glutathione S-transferase alpha	Enzyme of the antioxidant pathway	MW960435
<i>gclc</i>	Glutamate-cysteine ligase catalytic subunit	Enzyme for glutathione biosynthesis	MW960434
<i>ucp1</i>	Uncoupling protein 1	Enzyme for ion transport in respiration chain	MW360438
<i>ef1a</i>	Elongation factor 1 alpha	Factor for protein translation	MW960433

Table 2. Sequences of primers for *Austrolebias charrua* used in this study.

Gene symbol	Primer sequence 5'→3'	Annealing temperature (°C)	Efficiency (%)	Objective
<i>cat</i>	F: TGGTCTTCACMGATGAGATGGCCC	64.5	-	Characterization
	R: CTGAACCCGGTTTCRTAGTCTGG			
	F: GTCTTCATCAGGTGTCGTTCC	60.0	99.6%	qRT-PCR
	R: TTGAAGGTGTGAGAGCCGTAG			
<i>sod2</i>	F: AGGCAGAAGCAYACACTTCCTGAC	64.9	-	Characterization
	R: GGATCCTGGTTAGCACAAGCAGC			
	F: GCAAGCATCATGCCACATAC	60.0	97.0%	qRT-PCR
	R: TGTGCAGTTACATCTCCCTTTG			
<i>gsta</i>	F: ACAGTTGCAGAAGYGGAGTTTG	64.7	-	Characterization
	R: CTGCAGAAACCTGCTGATGGC			
	F: GAGGGACTGATGGATCTTATGG	60.0	102.9%	qRT-PCR
	R: TCAGCGCCTTCTCAAACAC			
<i>gclc</i>	F: AAGTATGCCGACCACATCCGAAAGC	64.5	-	Characterization
	R: TTCCCTCATCCACTTGGCCATGGTC			
	F: GTGCTGAAATGGGGAGATG	60.0	101.4%	qRT-PCR
	R: GTCGAACCTTTTCGTCCTTG			
<i>ucp1</i>	F: CCCTCAGAYGTGCCTCCTCCTC	64.9	-	Characterization
	R: GTCATCATGGTCCAGGCGCAG			
	F: ATCACAAGGAACGCACTGG	60.0	99.2%	qRT-PCR
	R: GAACGCAGACACGAAGTGG			

<i>ef1a</i>	F: TCATTGGCCATGTCGACTCCGG			
	R: AACCTTCCATCCCTTGAACC	64.7	-	Characterization
	F: CCTACATCAAGAAGATCGGCTAC			
	R: AACCTTCCATCCCTTGAACC	60.0	99.1%	Reference gene for qRT-PCR analysis

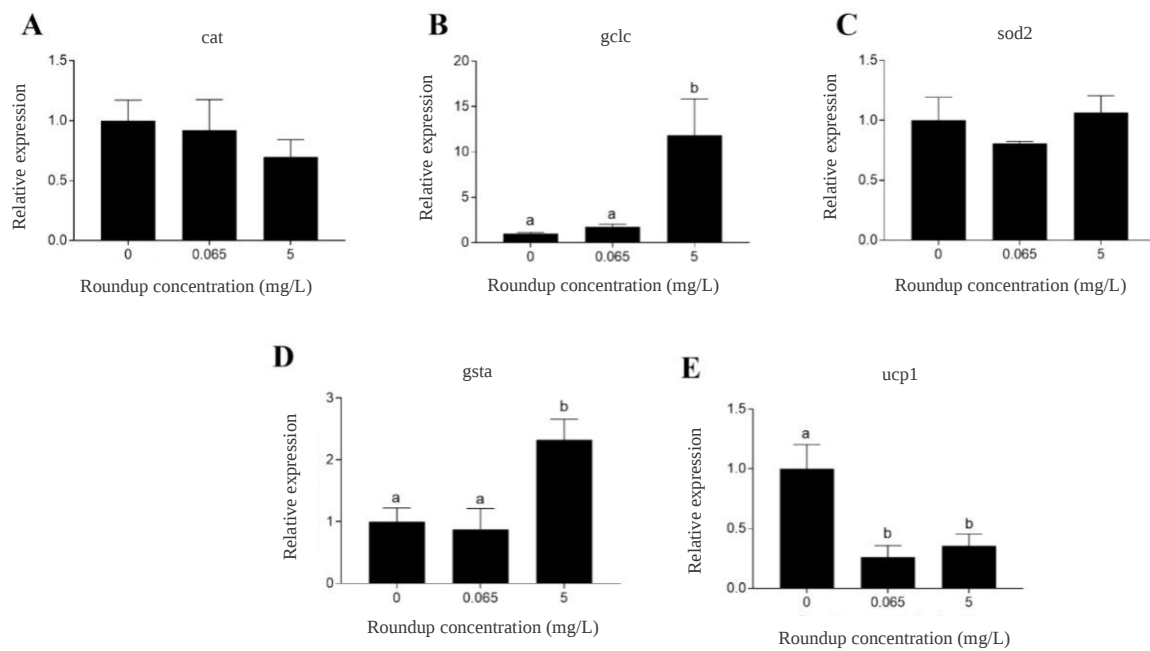


Figure 1. Analysis of gene expression of *Austrolebias charrua* liver after 96 hours to Roundup Transorb® (glyphosate acid equivalent) exposure (0.065 and 5 mg/L) followed by 96 hours in clean water. mRNA relative expression of (A) *cat*, (B) *gclc*, (C) *sod2*, (D) *gsta*, and (E) *ucp1* genes evaluated by qRT-PCR. Values were expressed as mean $\pm$ standard error of the mean, $n=5$. Different letters indicate significant statistical difference ($p<0.05$) between treatments groups analyzed by one-way ANOVA followed by Turkey's test.

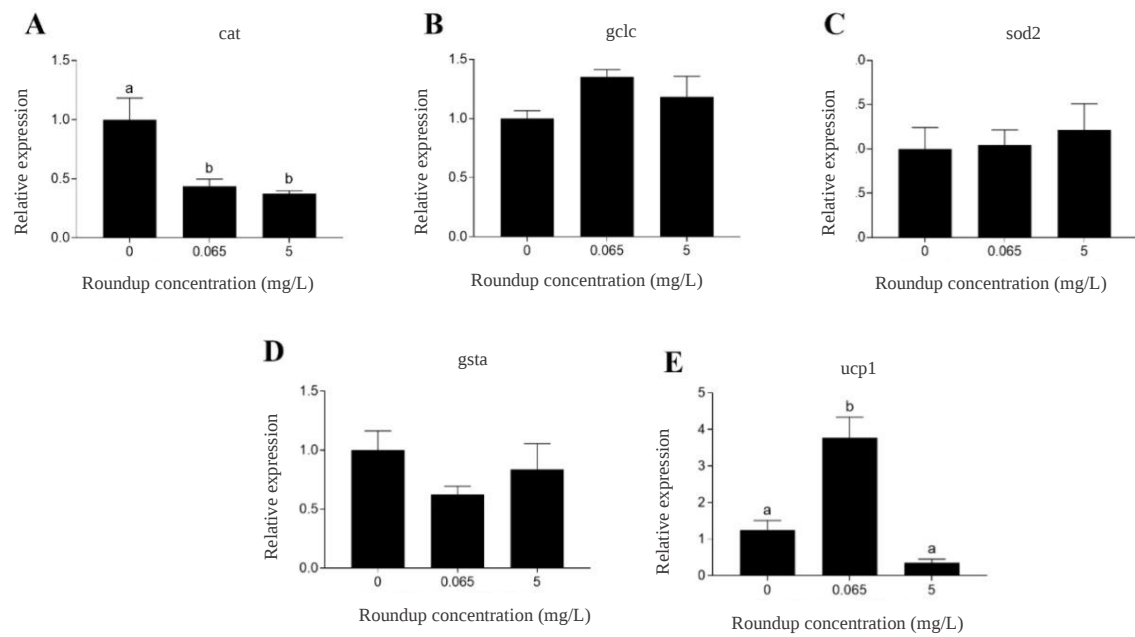


Figure 2. Gene expression of *Austrolebias charrua* gills for 96 hours to Roundup Transorb® (glyphosate acid equivalent) exposure (0.065 and 5 mg/L) followed by 96 hours in clean water. mRNA relative expression of (A) *cat*, (B) *gclc*, (C) *sod2*, (D) *gsta*, and (E) *ucp1* genes evaluated by qRT-PCR. Values were expressed as mean $\pm$ standard error of the mean, n=5. Different letters indicate significant statistical difference (p<0.05) between treatments groups analyzed by one-way ANOVA followed by Turkey's test.

5 DISCUSSÃO

Este é o primeiro estudo que avaliou os efeitos do RDT no peixe-anual *A. charrua*, endêmico do Sul do Brasil e ameaçado de extinção, nós realizamos a clonagem parcial e a caracterização dos genes do sistema antioxidante.

A brânquia devido a sua posição anatômica pode ser facilmente lesionada, uma vez que possivelmente é o primeiro órgão a ser atingido por poluentes aquáticos (Bojarski and Witeska, 2020). Lesões nesse órgão podem causar perdas de suas funções fisiológicas resultando, por exemplo, em casos leves diminuir a taxa de crescimento e até os mais severos ocasionando a mortes dos peixes (Ma et al., 2019). No presente estudo, foi demonstrado que o gene *cat* foi suprimido nas brânquias dos peixes expostos ao RDT. O gene *cat* traduz para a proteína catalase (CAT) que converte o H_2O_2 em O_2 e H_2O (Lushchak, 2016). Provavelmente, a supressão na expressão da *cat* resulte em danos celulares através do acúmulo de H_2O_2 (Sepasi Tehrani and Moosavi-Movahedi, 2018). Outro estudo não encontrou diferença na expressão de *cat* em brânquias de zebrafish expostos a Roundup® na concentração de 5 m/L durante 96 horas (Velasques et al., 2016). Resultados diferentes foram encontrados por outro estudo, o qual observou que a *cat* foi super expressa in *O. humensis* expostos ao RDT nas concentrações de 2.07 e 3.68 mg/L durante 24 horas (Martins et al., 2021).

No presente estudo foi demonstrado a super expressão do gene da *ucp1* em brânquias de peixes expostos a 0,065 mg/L de RDT. Peixes possuem três tipos de proteínas desacopladoras (UCP's) *ucp1*, *ucp2* e *ucp3* (Tine et al., 2012) as quais encontram-se localizadas na membrana mitocondrial interna. As UCP's podem atuar na proteção do organismo frente ao estresse oxidativo devido a diminuição do potencial de membrana e da disponibilidade de oxigênio durante o processo de geração de energética pelas mitocôndrias (Dlasková et al., 2010). Corroborando com este fato, Velasques, et al., (2016) associou a super expressão de *ucp1* com a redução de EROs em peixes zebra expostos a Roundup®. O mesmo trabalho observou a super expressão deste gene em brânquias de peixes expostos a 10 mg/L de Roundup® durante 24 horas, no entanto, após 96 horas de exposição a 5 mg/L, a expressão de *ucp1* não diferenciou do grupo controle. Assim, conhecer a função dos genes *ucp* e

das proteínas UCP frente a exposição a xenobióticos pode ser importante para entender os mecanismos de proteção contra o estresse oxidativo gerado por estes contaminantes (Cadenas, 2018). Provavelmente, o maior pico de estresse nas brânquias esteja relacionado as primeiras horas de contato (até 24 horas) com xenobióticos do que com a concentração desses poluentes, indo de acordo com resultados obtidos por Velasques et al. (2016) e Martins et al. (2021).

Após a entrada dos xenobióticos através das brânquias, esses resíduos poluentes são carregados pela corrente sanguínea e assim atingindo diversos órgãos como o fígado. O fígado é responsável por excretar poluentes ao organismo, detoxificando o corpo (Causey et al., 2018). Foi demonstrado no trabalho, a super expressão dos genes *gcl*c e *gsta* na maior concentração testada (5 mg/L) de RDT, e a supressão na expressão de *ucp1* em ambos os grupos expostos a RDT quando comparados ao grupo controle. Diferentemente, Velasques et al. (2016) não observou mudança na expressão de *ucp1* em comparação com o grupo controle em peixes-zebra expostos a 5 e 10 mg/L de Roundup®.

O gene *gcl*c traduz para uma proteína importante para a síntese do antioxidante não enzimático GSH (White et al., 2003). A GSH, durante o processo de estresse oxidativo, é responsável por reduzir as EROs como o H_2O_2 e OH^- por meio de uma reação catalisada pela enzima GPx, gerando GSSG e H_2O (Barbosa et al., 2010b). A super expressão de *gcl*c pode estar associada a uma resposta inicial contra os agentes oxidantes (de Aguiar et al., 2016). Acreditamos, que isso foi o que ocorreu com o *A. charrua* exposto a 5 mg/L de RDT, uma vez que este gene foi super expresso quando comparado ao grupo controle. Velasques et al. (2016) observou que os peixes-zebra expostos ao Roundup® por 96 horas não tiveram modulação na expressão de *gcl*c no fígado.

Semelhante ao resultado de *gcl*c, nosso estudo observou a super expressão de *gsta* em peixes expostos a 5 mg/L de RDT. O gene *gsta* traduz para uma proteína que possui a função de detoxificar o organismo (Huber et al., 2008), frente a compostos endógenos, como os metabólitos oriundos da LPO, e exógenos, como os poluentes presentes em ambientes aquáticos (Modesto and Martinez, 2010). A detoxificação do corpo ocorre por meio da reação catalisada entre a GSH e de substâncias eletrofílicas, como os átomos de carbono, nitrogênio ou enxofre, e assim facilitando a excreção de substâncias tóxicas para as células (Bašica et al., 2019). A super expressão de *gsta*

pode estar relacionada com a detoxificação do organismo frente a compostos poluentes, como os herbicidas (Ma et al., 2018). Em encontro com nossos resultados, outro estudo observou a super expressão de *gsta* no fígado de *Cyprinus carpio* após a exposição ao herbicida Paraquat por 7 dias (Ma et al., 2018). Entretanto, uma exposição crônica de 80 dias ao herbicida Glifosato (sem surfactantes em sua formulação) não demonstrou diferença na expressão de *gsta* no fígado de *O. niloticus* (Zheng et al., 2021). Assim como, Velasques et al. (2016) não observou modulação neste gene no fígado de peixes-zebra expostos a Roundup® durante 96 horas. A partir dos resultados obtidos da expressão gênica nas brânquias e fígado, nós hipotetizamos que a troca de água dos aquários pelo período de 96 horas, pode ter sido um fator chave responsável por reestabelecer a fisiologia de *A. charrua*. Porém, são necessários mais estudos para validar essa hipótese, uma vez que este é o primeiro trabalho que utiliza esta metodologia.

As primeiras 48 horas de exposição ao RDT foram as mais estressantes para *A. charrua* culminando no maior índice de mortalidade do presente trabalho. Contudo, são necessários mais estudos para verificar a causa de morte desses peixes foi devido a genotoxicidade oriunda da exposição ao RDT. Uma vez que, diferente de nossos resultados Velasques et al. (2016) não observaram mortalidade em zebrafish expostos a 10 mg/L de Roundup® durante 96 horas. Assim como nenhuma mortalidade em *Prochilodus lineatus* (Modesto and Martinez, 2010a) e *O. humensis* (Martins et al., 2021), expostos por 96 horas a 5 mg/L horas e expostos a 3,68 mg/L durante 24 horas a RDT, respectivamente.

Esta pesquisa pode contribuir para o desenvolvimento de políticas públicas que visam mitigar os impactos causados por herbicidas, a espécies não-alvo, principalmente das espécies ameaçadas de extinção como o *A. charrua*. Contudo, são necessários mais estudos para elucidar os efeitos de RDT e de outros herbicidas em diferentes sistemas, órgãos e genes de *A. charrua*.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A execução deste trabalho contribui com o conhecimento a respeito de uma espécie endêmica e ameaçada de extinção, *Austrolebias charrua*. Este é o primeiro estudo que avalia a modulação de genes em *A. charrua* expostos ao herbicida RDT. Para execução destas análises, devido ao ineditismo de algumas informações sobre a biologia molecular da espécie, foi necessário a clonagem e o sequenciamento dos genes avaliados, os quais também como resultado deste trabalho, foram depositados publicamente no GenBank.

A partir dos resultados obtidos pode-se concluir que, na concentração de 5 mg/L de RDT existe incidência de mortalidade dos animais principalmente durante as primeiras 48 horas. Além disso, a exposição dos peixes ao RDT provocou a modulação dos genes *gclc*, *gsta* e *ucp1* no fígado e da *cat* e *ucp1* nas brânquias, respectivamente. Nesse sentido, este estudo é importante para a compreensão dos mecanismos envolvidos na toxicologia de herbicidas à base de glifosato sobre espécies não alvo, como *A. charrua*. Além disso, este trabalho é importante por contribuir na geração de subsídios para o possível desenvolvimento ou adequação da legislação com o intuito de mitigar os efeitos de herbicidas e assim proteger o meio ambiente e a biodiversidade. Contudo, são necessários mais estudos para elucidar os efeitos de HBGs sobre outros sistemas, órgãos, genes e vias bioquímicas de *A. charrua* a fim de compreender melhor como ocorre a toxicidade deste xenobiótico na referida espécie.

7 REFERÊNCIAS

- ABD EL-RAHMAN, G. I., AHMED, S.A.A., KHALIL, A.A., ABD-ELHAKIM, Y.M. Assessment of hematological, hepato-renal, antioxidant, and hormonal responses of *Clarias gariepinus* exposed to sub-lethal concentrations of oxyfluorfen. **Aquatic Toxicology** 217, 105329, 2019.
- AGOSTINHO, A., THOMAZ, S., GOMES, L. Conservation of the biodiversity of Brazil's inland waters. **Conservation Biology** 19, p. 646–652, 2005.
- AMARANTE JUNIOR, O. P., SANTOS, T. C. R. , BRITO, N. M., e RIBEIRO, M. L. Glifosato: propriedades, toxicidade, usos e legislação. **Química Nova**, v. 25(4), p. 589–593, 2002.
- ANNETT, R., HABIBI, H. R., HONTELA, A. Impact of glyphosate and glyphosate-based herbicides on the freshwater environment. **Journal of Applied Toxicology**, v. 34, p. 458–479, 2014.
- ANVISA, 2019. Ato nº 58, de 27 de agosto de 2019. **Imprensa Nacional**. Disponível em: <<https://www.in.gov.br/web/dou>>. Acesso em: 21/04/21
- AYOOLA S. O. Toxicity of glyphosate herbicide on Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) juvenile. **Journal of Agricultural Research**, v. 3 (12), p. 825–834, 2008.
- BARBOSA, K. B. F., COSTA, N. M. B., ALFENAS, R. C. G., DE PAULA, S. O., MINIM, V. P. R., BRESSAN, J. Estresse oxidativo: conceito, implicações e fatores modulatórios. **Revista de Nutrição**, v. 23, p. 629–643, 2010.
- BAŠICA, B., MIHALJEVIĆ, I., MARAKOVIĆ, N., KOVAČEVIĆ, R., SMITAL, T. Molecular characterization of zebrafish Gstr1, the only member of teleost-specific glutathione S- transferase class. **Aquatic Toxicology**, v. 208, p. 196–207, 2019.
- BAUTISTA, F. E. A., VARELA JUNIOR, A. S., CORCINI, C. D., ACOSTA, I. B., CALDAS, S. S., PRIMEL, E. G., ZANETTE, J. The herbicide atrazine affects sperm quality and the expression of antioxidant and spermatogenesis genes in zebrafish testes. **Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology**, p. 206–207, p. 17–22, 2018.
- BENBROOK, C. Trends in glyphosate herbicide use in the United States and globally. **Environmental Sciences Europe**, v. 28 (3), 2016.
- BEROIS, N., GARCIA, G., SA, R. O. **Annual Fishes: Life History Strategy, Diversity, and Evolution**. CRC Press, 2015.
- BHARDWAJ, N., SINGH, A. Paraquat treatment modulates integrin associated protein (CD47) and basigin (CD147) expression and mitochondrial potential on erythroid cells in mice. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 58, p. 37–44, 2018.
- BOJARSKI, B., WITESKA, M. Blood biomarkers of herbicide, insecticide, and fungicide toxicity to fish-a review. **Environmental Science and Pollution Research**, v 27, p. 19236–19250, 2020.
- BRIDI, D., ALTENHOFEN, S., GONZALEZ, J. B., REOLON, G. K., BONAN, C.D. Glyphosate and Roundup® alter morphology and behavior in zebrafish. **Toxicology**, v. 392, p. 32–39, 2017.
- BRONDANI, L. A., ASSMANN, T. S., DUARTE, G. C .K., GROSS, J. L., CANANI, L. H., CRISPIM, D. Papel da proteína desacopladora 1 (UCP1) no desenvolvimento da obesidade e do diabetes melito tipo 2. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia: Metabologia**, v. 56, p. 215–225, 2012.

- CADENAS, S. Mitochondrial uncoupling, ROS generation and cardioprotection. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics**, v. 1859, p. 940–950, 2018.
- CARRIQUIRIBORDE, P., RONCO, A., 2006. Ecotoxicological studies on the pejerrey (*Odontesthes bonariensis*, Pisces Atherinopsidae). **Biocell**, v.30, p. 97–109, 2006.
- CAUSEY, D. R., POHL, M. A. N., STEAD, D. A., MARTIN, S. A. M., SECOMBES, C. J., MACQUEEN, D. J. High-throughput proteomic profiling of the fish liver following bacterial infection. **BMC Genomics**, v. 19, p. 719, 2018.
- CAVALCANTE, D. G. S. M., MARTINEZ, C. B. R., SOFIA, S. H. Genotoxic effects of Roundup on the fish *Prochilodus lineatus*. **Mutation Research**, v. 655, p. 41–46, 2008.
- CHONDRONIKOLA, M., VOLPI, E., BORSHEIM, E., PORTER, C., ANNAMALAI, P., ENERBACK, S., LIDELL, M. E., SARAF, M. K., LABBE, S. M., HURREN, N. M., YFANTI, C., CHAO, T., ANDERSEN, C. R., CESANI, F., HAWKINS, H., SIDOSSIS, L. S. Brown adipose tissue improves whole-body glucose homeostasis and insulin sensitivity in humans. **Diabetes**, v. 63, p. 4089–4099, 2014.
- CHONDRONIKOLA, M., VOLPI, E., BORSHEIM, E., PORTER, C., SARAF, M. K., ANNAMALAI, P., YFANTI, C., CHAO, T., WONG, D., SHINODA, K., LABBÉ, S. M., HURREN, N. M., CESANI, F., KAJIMURA, S., SIDOSSIS, L. S. Brown adipose tissue activation is linked to distinct systemic effects on lipid metabolism in humans. **Cell Metabolism**, v 23, p. 1200–1206, 2016.
- CLARKE, K. J., PORTER, R. K. Uncoupling protein 1 dependent reactive oxygen species production by thymus mitochondria. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v. 45, p. 81–89, 2013.
- SMITH, C.; MARKS, A. D; LIEBERMAN, M. **Bioquímica médica básica de Marks: uma abordagem Clínica**, 2 ed. Artmed, Porto Alegre, 2007.
- CONAMA, Conselho Nacional do Meio Ambiente. Resolução nº 357, de 17 de março de 2005. **Diário Oficial da União**, n. 53, p. 58-63, 2005.
- DAYAN, F. E. Current status and future prospects in herbicide discovery. **Plants (Basel)**, v. 8, 2019.
- DE AGUIAR, L. M., FIGUEIRA, F. H., GOTTSCHALK, M. S., DA ROSA, C. E. Glyphosate-based herbicide exposure causes antioxidant defence responses in the fruit fly *Drosophila melanogaster*. **Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology**, p. 185–186, p. 94–101, 2016.
- DE MELO, M. S., NAZARI, E. M., MÜLLER, Y. M. R., GISMONDI, E. Modulation of antioxidant gene expressions by Roundup® exposure in the decapod *Macrobrachium potiuna*. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 190, 110086, 2020.
- DE OLIVEIRA FERNANDES, M., BARBOSA, C., GARCEZ, D. K., VARELA JUNIOR, A. S., VOLCAN, M. V., ROBE, L. J. Phylogeographic analyses and taxonomic inconsistencies of the Neotropical annual fish *Austrolebias minuano*, *Austrolebias charrua* and *Austrolebias pongondo* (Cyprinodontiformes: Rivulidae). **Environmental Biology of Fishes**, v. 104, p. 1–14, 2021.
- DICIO, Dicionário Online de Português. Porto Alegre, 2021. Disponível em: <<https://www.dicio.com.br/xenobiotico/>>. Acesso em: 10/08/21.

- DLASKOVÁ, A., CLARKE, K. J., PORTER, R. K. The role of UCP 1 in production of reactive oxygen species by mitochondria isolated from brown adipose tissue. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics**, v.1797, p. 1470–1476, 2010.
- DUKE, S. O. The history and current status of glyphosate. **Pest Management Science**, v. 74, p. 1027–1034, 2018.
- DUKE, S. O. Perspectives on transgenic, herbicide-resistant crops in the United States almost 20 years after introduction. **Pest Management Science**, v. 71, p. 652–657, 2015.
- FABRELLO, J., GRAPPUTO, A., MUNARI, M., MARIN, M. G., MASIERO, L., PACCHIONI, B., MILLINO, C., MATOZZO, V. Molecular and biochemical responses of vitellogenin in the mussel *Mytilus galloprovincialis* exposed to the glyphosate-based herbicide Roundup® Power 2.0. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 27, p. 26543–26553, 2020.
- FARIA, M., BEDROSSIANTZ, J., RAMÍREZ, J. R. R., MAYOL, M., GARCÍA, G. H., BELLOT, M., PRATS, E., GARCIA-REYERO, N., GÓMEZ-CANELA, C., GÓMEZ-OLIVÁN, L. M., RALDÚA, D. Glyphosate targets fish monoaminergic systems leading to oxidative stress and anxiety. **Environment International**, v. 146, 106253, 2021.
- FORMAN, H. J., ZHANG, H., RINNA, A. Glutathione: Overview of its protective roles, measurement, and biosynthesis. **Molecular Aspects of Medicine**, v. 30, p. 1–12, 2009.
- GAAIED, S., OLIVEIRA, M., LE BIHANIC, F., CACHOT, J., BANNI, M. Gene expression patterns and related enzymatic activities of detoxification and oxidative stress systems in zebrafish larvae exposed to the 2,4-dichlorophenoxyacetic acid herbicide. **Chemosphere**, v. 224, p. 289–297, 2019.
- GARCÍA, D., LOUREIRO, M., TASSINO, B., 2008. Reproductive behavior in the annual fish *Austrolebias reicherti* Loureiro & García (Cyprinodontiformes: Rivulidae). **Neotropical Ichthyology**, v. 6, p. 243–248, 2004.
- GHNEIM, H. K., AL-SHEIKH, Y. A., ALSHEBLY, M. M., ABOUL-SOUD, M. A. M., . Superoxide dismutase activity and gene expression levels in Saudi women with recurrent miscarriage. **Molecular Medicine Reports**, v. 13, p. 2606–2612, 2016.
- GLISIC, B., HRUBIK, J., FA, S., DOPUDJ, N., KOVACEVIC, R., ANDRIC, N. Transcriptional profiles of glutathione-S-Transferase isoforms, Cyp, and AOE genes in atrazine-exposed zebrafish embryos. **Environmental Toxicology** 31, 233–244, 2016.
- GLORIEUX, C., ZAMOCKY, M., SANDOVAL, J. M., VERRAX, J., CALDERON, P. B. Regulation of catalase expression in healthy and cancerous cells. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 87, p. 84–97, 2015.
- GUILHERME, S., GAIVÃO, I., SANTOS, M. A., PACHECO, M. European eel (*Anguilla anguilla*) genotoxic and pro-oxidant responses following short-term exposure to Roundup-a glyphosate-based herbicide. **Mutagenesis**, v. 25, p. 523–530, 2010.
- HAGEDORN, M., MCCARTHY, M., CARTER, V. L., MEYERS, S. A. Oxidative stress in zebrafish (*Danio rerio*) sperm. **PLoS One** 7, e39397, 2012.

- HAND, S. C., MOORE, D.S., PATIL, Y. Challenges during diapause and anhydrobiosis: Mitochondrial bioenergetics and desiccation tolerance. **IUBMB Life**, v. 70, p. 1251–1259, 2018.
- HU, C.-K., WANG, W., BRIND'AMOUR, J., SINGH, P. P., REEVES, G. A., LORINCZ, M. C., ALVARADO, A. S., BRUNET, A. Vertebrate diapause preserves organisms long term through Polycomb complex members. **Science**, v. 367, p. 870–874, 2020.
- HUBER, P. C., ALMEIDA, W. P., FÁTIMA, Â. Glutathione e enzimas relacionadas: papel biológico e importância em processos patológicos. **Química. Nova**, v. 31, p. 1170–1179, 2008.
- IBAMA, **Instituto Brasileiro do Meio ambiente e dos recursos Naturais**, 2019. Relatórios de comercialização de agrotóxicos, . IBAMA. Disponível em: <<http://www.ibama.gov.br/agrotoxicos/relatorios-de-comercializacao-de-agrotoxicos>> Acesso: 19/04/21
- IBRAHIM, Y. A. A regulatory perspective on the potential carcinogenicity of glyphosate, **Journal of Toxicology and Health**, 2015.
- JIA, P., WU, X., PAN, T., XU, S., HU, J., DING, X. Uncoupling protein 1 inhibits mitochondrial reactive oxygen species generation and alleviates acute kidney injury. **EBioMedicine**, v. 49, p. 331–340, 2019.
- JIN, J., KUROBE, T., HAMMOCK, B. G., LAM, C. H., LIN, L., TEH, S. J. Toxic effects of fluridone on early developmental stages of Japanese Medaka (*Oryzias latipes*). **Science of The Total Environment**, v.700, 134495, 2020.
- JIN, Y., ZHANG, X., SHU, L., CHEN, L., SUN, L., QIAN, H., LIU, W., FU, Z. Oxidative stress response and gene expression with atrazine exposure in adult female zebrafish (*Danio rerio*). **Chemosphere**, v. 78, p. 846–852, 2010.
- KHALID, N., MAHJABEEN, I., KAYANI, M. A., AKRAM, Z. Association of arsenic-related *AS3MT* gene and antioxidant *SOD2* gene expression in industrial workers occupationally exposed to arsenic. **Toxicology and Industrial Health**, v. 36, p. 161–169, 2020.
- KOIKE, M., NOJIRI, H., OZAWA, Y., WATANABE, K., MURAMATSU, Y., KANEKO, H., MORIKAWA, D., KOBAYASHI, K., SAITA, Y., SASHO, T., SHIRASAWA, T., YOKOTE, K., KANEKO, K., SHIMIZU, T. Mechanical overloading causes mitochondrial superoxide and SOD2 imbalance in chondrocytes resulting in cartilage degeneration. **Scientific Reports**, v. 5, 11722, 2015.
- KUMAR, V.; ABBAS, A. K.; ASTER, J. C. **Robbins & Cotran Patologia - Bases Patológicas das Doenças**, 9 ed.Elsevier, Rio de Janeiro, 2016.
- LANÉS, L. **Dinâmica e conservação de peixes anuais (Cyprinodontiformes: Rivulidae) no parque nacional da lagoa do peixe**. Dissertação. São Leopoldo, 2011.
- LANGIANO, V. 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**, v. 147, p. 222–231, 2008.
- LIU, J., DONG, C., ZHAI, Z., TANG, L., WANG, L. Glyphosate-induced lipid metabolism disorder contributes to hepatotoxicity in juvenile common carp. **Environmental Pollution**, v. 269, 116186, 2021.
- LUSHCHAK, O. V., KUBRAK, O. I., STOREY, J. M., STOREY, K. B., LUSHCHAK, V. I. Low toxic herbicide Roundup induces mild oxidative stress in goldfish tissues. **Chemosphere**, v. 76, p. 932–937, 2009.

- LUSHCHAK, V. I. Contaminant-induced oxidative stress in fish: a mechanistic approach. **Fish physiology Biochemistry**, v.42, p. 711–747, 2016.
- MA, J., LI, Y., LI, W., LI, X. Hepatotoxicity of paraquat on common carp (*Cyprinus carpio* L.). **Science of The Total Environment**, p. 616–617, p. 889–898, 2018.
- MA, J., ZHU, J., WANG, W., RUAN, P., RAJESHKUMAR, S., LI, X. Biochemical and molecular impacts of glyphosate-based herbicide on the gills of common carp. **Environmental Pollution**, v. 252, p. 1288–1300, 2019.
- MACMILLAN-CROW, L. A., THOMPSON, J. A. Tyrosine modifications and inactivation of active site manganese superoxide dismutase mutant (Y34F) by peroxynitrite. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 366, p. 82–88, 1999.
- MARTIN, K. L. M, PODRABSKY, J. E. Hit pause: Developmental arrest in annual killifishes and their close relatives, **Developmental Dynamics**, v. 246 (11), p. 858-866, 2017.. <https://doi.org/10.1002/dvdy.24507>
- MARTINS, A. W. S., SILVEIRA, T. L. R., REMIÃO, M. H., DOMINGUES, W. B., Dellagostin, E. N., Junior, A. S. V., Corcini, C. D., Costa, P. G., Bianchini, A., Somoza, G. M., ROBALDO, R. B., CAMPOS, V. F. Acute exposition to Roundup Transorb® induces systemic oxidative stress and alterations in the expression of newly sequenced genes in silverside fish (*Odontesthes humensis*). **Environmental Science and Pollution Research**, 2021.
- MARZZOCO, A; TORRES, B. B. **Bioquímica Básica**, 4 ed. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, 2015.
- MILAN, M., DALLA ROVERE, G., SMITS, M., FERRARESSO, S., PASTORE, P., MARIN, M. G., BOGIALLI, S., PATARNELLO, T., BARGELLONI, L., MATOZZO, V. Ecotoxicological effects of the herbicide glyphosate in non-target aquatic species: Transcriptional responses in the mussel *Mytilus galloprovincialis*. **Environmental Pollution**, v. 237, p. 442–451, 2018.
- MMA, **Ministério do Meio Ambiente** 2013. Portaria MMA nº 198 de 19 de junho de 2013 - Português. Disponível em: <https://www.icmbio.gov.br/portal/images/stories/imgs-unidades-coservacao/portarias/2013/Port_198.pdf>. Acesso em: 01/04/21
- MMA, **Ministério do Meio Ambiente** 2014. portaria MMA nº 445 de 17 de dezembro de 2014 — Português. Disponível em <<https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/aquicultura-e-pesca/legislacao/legislacao-geral-da-pesca/portaria-mma-no-445-de-17-12-2014.pdf/view>>. Acesso em: 01/04/21
- 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, p. 294–299, 2010.
- MUELLER, S., RIEDEL, H.-D., STREMMEL, W. Direct evidence for catalase as the predominant H₂O₂ -removing enzyme in human erythrocytes. **Blood**, v. 90, p. 4973–4978, 1997.
- MURUSSI, C. R., COSTA, M. D., LEITEMPERGER, J. W., GUERRA, L., RODRIGUES, C. C. R., MENEZES, C. C., SEVERO, E. S., FLORES-LOPES, F., SALBEGO, J., LORO, V. L. Exposure to different glyphosate formulations on the oxidative and histological status of *Rhamdia quelen*. **Fish Physiology Biochemistry**, v. 42, p. 445–455, 2016.
- NAUMANN, B., ENGLERT, C. Dispersion/reaggregation in early development of annual killifishes: Phylogenetic distribution and evolutionary significance of a unique feature. **Developmental Biology**, v. 442, p. 69–79, 2018.

- NOLORBE-PAYAHUA, C. D., DE FREITAS, A. S., ROESCH, L. F. W., ZANETTE, J. Environmental contamination alters the intestinal microbial community of the livebearer killifish *Phalloceros caudimaculatus*. **Heliyon**, v. 6, e04190, 2020.
- OELKRUG, R., KUTSCHKE, M., MEYER, C. W., HELDMAIER, G., JASTROCH, M. Uncoupling protein 1 decreases superoxide production in brown adipose tissue mitochondria. **Journal of Biological Chemistry**, v. 285, p. 21961–21968, 2010.
- OKADA, E., COSTA, J. L., BEDMAR, F. Adsorption and mobility of glyphosate in different soils under no-till and conventional tillage. **Geoderma**, v. 263, p. 78–85, 2016.
- PANDEY, S., PARVEZ, S., ANSARI, R. A., ALI, M., KAUR, M., HAYAT, F., AHMAD, F., RAISUDDIN, S. Effects of exposure to multiple trace metals on biochemical, histological and ultrastructural features of gills of a freshwater fish, *Channa punctata* **Chemico-Biological Interactions**, v. 174, p. 183–192, 2008.
- PANETTO, O. S., GOMES, H. F., FRAGA GOMES, D. S., CAMPOS, E., ROMEIRO, N. C., COSTA, E. P., DO CARMO, P. R. L., FEITOSA, N. M., MORAES, J. The effects of Roundup® in embryo development and energy metabolism of the zebrafish (*Danio rerio*). **Comparative Biochemistry and Physiology - Part C**, v. 222, p. 74–81, 2019.7
- PERES, F. Saúde, trabalho e ambiente no meio rural brasileiro. Ciência; **Saúde Coletiva**, v. 14, p. 1995–2004, 2009.
- RAINIO, M. J., MARGUS, A., LEHMANN, P., HELANDER, M., LINDSTRÖM, L. Effects of a glyphosate-based herbicide on survival and oxidative status of a non-target herbivore, the Colorado potato beetle (*Leptinotarsa decemlineata*). **Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology**, v. 215, p. 47–55, 2019.
- RETTET, K., ESSER, K.-H., LÜPKE, M., HELLMANN, J., STEINHAGEN, D., JUNG-SCHROERS, V. Stunning of common carp: Results from a field and a laboratory study. **BMC Veterinary Research**, v. 14, p. 205, 2018.
- SALBEGO, J., PRETTO, A., GIODA, C. R., DE MENEZES, C. C., LAZZARI, R., RADÜNZ NETO, J., BALDISSEROTTO, B., LORO, V. L. 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, p. 740–745, 2010.
- SÁNCHEZ, J. A. A., VARELA, A. S., CORCINI, C. D., DA SILVA, J. C., PRIMEL, E. G., CALDAS, S., KLEIN, R. D., MARTINS, C. D. M. G. Effects of Roundup formulations on biochemical biomarkers and male sperm quality of the livebearing *Jenynsia multidentata*. **Chemosphere**, v. 177, p. 200–210, 2017.
- SELLATHURAI, S., PRIYATHILAKA, T. T., LEE, J. Molecular cloning, characterization, and expression level analysis of a marine teleost homolog of catalase from big belly seahorse (*Hippocampus abdominalis*). **Fish & Shellfish Immunology**, v. 89, p. 647–659, 2019.
- SEPASI T. H., MOOSAVI-MOVAHED, A. A. Catalase and its mysteries. **Progress in Biophysics and Molecular Biology** 140, 5–12, 2018.
- SILVEIRA, T., VARELA JUNIOR, A. S., CORCINI, C. D., DOMINGUES, W. B., REMIÃO, M., SANTOS, L., BARRETO, B., LESSA, I., MARTINS, D., BOYLE, R. T., COSTA, P. G., BIANCHINI, A., ROBALDO, R. B., CAMPOS, V. F. Roundup® herbicide decreases quality parameters of spermatozoa of

- silversides *Odontesthes humensis*. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 102, p. 1–6, 2019.
- SMITH, C. M., VERA, M. K. M., BHANDARI, R. K. Developmental and epigenetic effects of Roundup and glyphosate exposure on Japanese medaka (*Oryzias latipes*). **Aquatic Toxicology**, v. 210, p. 215–226, 2019.
- SUPPA, A., KVIST, J., LI, X., DHANDAPANI, V., ALMULLA, H., TIAN, A. Y., KISSANE, S., ZHOU, J., PEROTTI, A., MANGELSON, H., LANGFORD, K., ROSSI, V., BROWN, J. B., ORSINI, L. Roundup causes embryonic development failure and alters metabolic pathways and gut microbiota functionality in non-target species. **Microbiome**, v. 8, p. 170, 2020.
- TINE, M., KUHLE, H., JASTROCH, M., REINHARDT, R. Genomic characterization of the European sea bass *Dicentrarchus labrax* reveals the presence of a novel uncoupling protein (UCP) gene family member in the teleost fish lineage. **BMC Evolutionary Biology**, v. 12, p. 62, 2012.
- TOPAL, A., ATAMANALP, M., UÇAR, A., ORUÇ, E., KOCAMAN, E. M., SULUKAN, E., AKDEMİR, F., BEYDEMİR, Ş., KILINÇ, N., ERDOĞAN, O., CEYHAN, S. B. Effects of glyphosate on juvenile rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*): transcriptional and enzymatic analyses of antioxidant defence system, histopathological liver damage and swimming performance. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 111, p. 206–214, 2015.
- UREN WEBSTER, T. M., LAING, L. V., FLORANCE, H., SANTOS, E. M. Effects of glyphosate and its formulation, Roundup, on reproduction in zebrafish (*Danio rerio*). **Environmental Science & Technology**, v. 48, p. 1271–1279, 2014.
- VAN BRUGGEN, A. H. C., HE, M. M., SHIN, K., MAI, V., JEONG, K. C., FINCKH, M. R., MORRIS, J. G. Environmental and health effects of the herbicide glyphosate. **Science of The Total Environment**, p. 616–617, p. 255–268, 2018.
- VELASQUES, R. R., SANDRINI, J. Z., DA ROSA, C. E. Roundup® in zebrafish: effects on oxidative status and gene expression. **Zebrafish**, v. 13, p. 432–441, 2016.
- VELKI, M. Enzymatic activity and gene expression changes in zebrafish embryos and larvae exposed to pesticides diazinon and diuron. **Aquatic Toxicology**, v. 14, 2017.
- VOLCAN, M. V. **Sumário executivo do plano de ação nacional para a conservação dos peixes rivulídeos ameaçados de extinção**, 2012. Disponível em: <<https://www.icmbio.gov.br/portal/faunabrasileira/plano-de-acao-nacional-lista/2833> plano-de-acao-nacional-para-a-conservacao-dos-rivulideos#:~:text=2018%20(1%C2%BA%20ciclo),RESUMO%3A,esp%C3%A9cies%20focais%20em%20cinco%20anos>. Acesso em: 07/04/21
- VOLCAN, M. V., LANÉS, L. E. K. Brazilian killifishes risk extinction. **Science**, v. 361, p. 340–341, 2018.
- VOLCAN, M. V., SAMPAIO, L. A., BONGALHARDO, D. C., ROBALDO, R. B. Reproduction of the annual fish *Austrolebias nigrofasciatus* (Rivulidae) maintained at different temperatures. **Journal of Applied Ichthyology**, v. 29, p. 648–652, 2013.
- WANG, X. H., SOUDERS, C. L., ZHAO, Y. H., MARTYNIUK, C. J. Mitochondrial bioenergetics and locomotor activity are altered in zebrafish (*Danio rerio*) after exposure to the bipyridylum herbicide diquat. **Toxicology Letters**, v. 283, p. 13–20, 2018.

- WEEKS SANTOS, S., GONZALEZ, P., CORMIER, B., MAZZELLA, N., BONNAUD, B., MORIN, S., CLÉRANDÉAU, C., MORIN, B., CACHOT, J. A glyphosate-based herbicide induces sub-lethal effects in early life stages and liver cell line of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. **Aquatic Toxicology**, v. 216, p. 105291, 2019.
- WHITE, C. C., VIERNES, H., KREJSA, C. M., BOTTA, D., KAVANAGH, T. J. Fluorescence-based microtiter plate assay for glutamate–cysteine ligase activity. **Analytical Biochemistry**, v. 318, p. 175–180, 2003.
- WU, K. C., ZHANG, Y., KLAASSEN, C. D. Nrf2 protects against diquat-induced liver and lung injury. **Free Radical Research**, v. 46, p. 1220–1229, 2012.
- XING, H., WANG, Xu, SUN, G., GAO, X., XU, S., WANG, XIAOLONG, W. Effects of atrazine and chlorpyrifos on activity and transcription of glutathione S-transferase in common carp (*Cyprinus carpio* L.). **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 33, p. 233–244, 2012.
- YANG, X., SONG, Y., ZHANG, C., PANG, Y., SONG, X., WU, M., CHENG, Y. Effects of the glyphosate-based herbicide Roundup on the survival, immune response, digestive activities and gut microbiota of the Chinese mitten crab, *Eriocheir sinensis*. **Aquatic Toxicology**, v. 214, 105243, 2019.
- ZAHA, A.; FERREIRA, H. B.; PASSAGLIA, L. M.P. **Biologia molecular básica**, 5 ed. Artmed, Porto Alegre, 2014.
- ZEBRAL, Y. D., COSTA, P. G., DE CASTRO KNOPP, B., LANSINI, L. R., ZAFALON-SILVA, B., BIANCHINI, A., ROBALDO, R. B. Effects of a glyphosate-based herbicide in pejerrey *Odontesthes humensis* embryonic development. **Chemosphere**, v. 185, p. 860–867, 2017.
- ZEBRAI, Y. D., LANSINI, L. R., COSTA, P. G., ROZA, M., BIANCHINI, A., ROBALDO, R. B. A glyphosate-based herbicide reduces fertility, embryonic upper thermal tolerance and alters embryonic diapause of the threatened annual fish *Austrolebias nigrofasciatus*. **Chemosphere**, v. 196, p. 260–269, 2018.
- ZELKO, I. N., MARIANI, T. J., FOLZ, R. J. Superoxide dismutase multigene family: a comparison of the CuZn-SOD (SOD1), Mn-SOD (SOD2), and EC-SOD (SOD3) gene structures, evolution, and expression. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 33, p. 337–349, 2002.
- ZHENG, T., JIA, R., CAO, L., DU, J., GU, Z., HE, Q., XU, P., YIN, G. Effects of chronic glyphosate exposure on antioxidant status, metabolism and immune response in tilapia (GIFT, *Oreochromis niloticus*). **Comparative Biochemistry and Physiology - Part C**, v. 239, 108878, 2021.

8 ANEXOS

Anexo 1

Comprovante de submissão para Frontiers in Genetics.

20/07/2021

Frontiers

 ABOUT JOURNALS RESEARCH TOPICS ARTICLES SUBMIT

Q MY FRONTIERS 

SUBMIT

REVIEW FORUM Corresponding Author Need Help ? Contact us

1. Initial Validation

2. Editorial Assignment

3. Independent Review

4. Interactive Review

5. Review Finalized

6. Final Validation

7. Final Decision

Uncoupling protein 1 and other genes from antioxidant system are altered when the killifish *Austrolebias charrua* is exposed to Roundup Transorb

Natiéli M Gonçalves, [Tony Silveira](#), Amanda W S Martins, [Eduardo Nunes Dellagostin](#), [Eduardo B Blódorn](#), [William Borges Domingues](#), [Mateus T Kütter](#), [Luis Fernando Marins](#), [Matheus V Volcan](#), [Mariana H Remião*](#) and [Vinicius Farias Campos*](#)

Brief Research Report, *Front. Genet.* – *Evolutionary and Population Genetics*

Received on: 21 Jul 2021, Edited by: No Associate Editor assigned.

Manuscript ID: 744853

Research Topic: [Application of Fishes as Biological Models in Genetic Studies](#)

Keywords: Gene Expression, Reactive Oxygen Species, killifish, herbicide, Roundup, glyphosate

Download latest manuscript

View submitted files history

View invoice

NO ACTION IS REQUIRED FROM YOU

Your manuscript has been submitted successfully and is being verified by the editorial office as part of the initial manuscript validation.

History

Date	Updates
21 Jul 2021	Corresponding Author Vinicius Farias Campos submitted manuscript.

Back to top ▲

Anexo 2

Certificado CEUA - FURG

COMISSÃO DE ÉTICA EM USO ANIMAL

Universidade Federal do Rio Grande
Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação - PROPESP
ceua@furg.br http://www.propesp.furg.br



CERTIFICADO Nº P053/2019

Certificamos que o projeto intitulado "Novas ferramentas moleculares de monitoramento ambiental a partir dos efeitos da exposição à herbicidas à base de glifosato sobre a reprodução do peixe-anual *Austrolebias charrua* (Cyprinodontiformes: Rivulidae)", protocolo nº 23116.003876/2019-24, sob a responsabilidade de Tony Leandro Rezende da Silveira - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao Filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi APROVADO pela COMISSÃO DE ÉTICA EM USO ANIMAL DA UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE (CEUA-FURG), em reunião de 04 de dezembro de 2019 (Ata 011/2019).

A CEUA lembra aos pesquisadores que qualquer alteração no protocolo experimental ou na equipe deve ser encaminhada à comissão para avaliação e aprovação. Um relatório final deve ser enviado à CEUA no término da vigência do seu projeto.

CEUA Nº	Pq004/2019
COLABORADORES AUTORIZADOS A MANIPULAR OS ANIMAIS	Mateus Tavares Kütter
VIGÊNCIA DO PROJETO	01/10/2021
ESPÉCIE / GRUPOS TAXONÔMICOS	<i>Austrolebias charrua</i> / Cyprinodontiformes: Rivulidae
NÚMERO DE ANIMAIS	24 Fêmeas e 24 Machos; Ovos embrionados
Nº SOLICITAÇÃO / AUTORIZAÇÃO SISBIO	71072
ATIVIDADE(S)	(X) CAPTURA (X) COLETA DE ESPÉCIMES () MARCAÇÃO () OUTRAS:
LOCAL(is) REALIZAÇÃO ATIVIDADES	Arredores da estrada do Senandes e da BR-471, Rio Grande, RS
ENVIO DE RELATÓRIO PARCIAL	Janeiro de 2021
ENVIO DO RELATÓRIO FINAL	Outubro de 2021

Rio Grande, 10 de dezembro de 2019.

Med. Vet. Márcio de Azevedo Figueiredo
Coordenador da CEUA-FURG

Anexo 3

Certificado SisBio



Ministério do Meio Ambiente - MMA
Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade - ICMBio
Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade - SISBIO

Autorização para atividades com finalidade científica

Número: 71072-1	Data da Emissão: 27/08/2019 10:49:23	Data da Revalidação*: 27/08/2020
De acordo com o art. 28 da IN 03/2014, esta autorização tem prazo de validade equivalente ao previsto no cronograma de atividades do projeto, mas deverá ser revalidada anualmente mediante a apresentação do relatório de atividades a ser enviado por meio do Sisbio no prazo de até 30 dias a contar da data do aniversário de sua emissão.		

Dados do titular

Nome: Mariana Härter Remião	CPF: 026.254.340-07
Título do Projeto: Novas ferramentas moleculares de monitoramento ambiental a partir dos efeitos da exposição à herbicidas à base de glifosato sobre a reprodução do peixe-anual <i>Austrolebias charrua</i> (Cyprinodontiformes: Rivulidae)	
Nome da Instituição: Universidade Federal de Pelotas	CNPJ: 92.242.080/0001-00

Cronograma de atividades

#	Descrição da atividade	Início (mês/ano)	Fim (mês/ano)
1	Redação dos artigos científicos e da proposta de patente	03/2022	06/2022
2	Validação dos miRNA e análise estatística	12/2021	03/2022
3	Extração de RNA, confecção de cDNA, amplificação e clonagem dos fragmentos, e sequenciamento.	03/2020	12/2021
4	Coleta dos tecidos	01/2020	08/2021
5	Coleta dos peixes e exposição ao herbicida em biotério	09/2019	08/2021
6	Aclimação	09/2019	12/2019
7	Expressão gênica, isolamento de miRNA e análise	03/2020	12/2021

Equipe

#	Nome	Função	CPF	Nacionalidade
1	Luis Fernando Fernandes Marins	Colaborador	489.907.790-49	Brasileira
2	Antonio Sergio Varela Junior	Colaborador	262.548.588-43	Brasileira
3	Mateus Tavares Kutter	Colaborador	994.154.020-91	Brasileira
4	Tony Leandro Rezende da Silveira	Colaborador	016.070.290-90	Brasileira

Observações e ressalvas

1	Esta autorização NÃO exige o pesquisador titular e os membros de sua equipe da necessidade de obter as anuências previstas em outros instrumentos legais, bem como do consentimento do responsável pela área, pública ou privada, onde será realizada a atividade, inclusive do órgão gestor de terra indígena (FUNAI), da unidade de conservação estadual, distrital ou municipal, ou do proprietário, arrendatário, posseiro ou morador de área dentro dos limites de unidade de conservação federal cujo processo de regularização fundiária encontra-se em curso.
2	Em caso de pesquisa em UNIDADE DE CONSERVAÇÃO, o pesquisador titular desta autorização deverá contactar a administração da unidade a fim de CONFIRMAR AS DATAS das expedições, as condições para realização das coletas e de uso da infraestrutura da unidade.
3	O titular de autorização ou de licença permanente, assim como os membros de sua equipe, quando da violação da legislação vigente, ou quando da inadequação, omissão ou falsa descrição de informações relevantes que subsidiaram a expedição do ato, poderá, mediante decisão motivada, ter a autorização ou licença suspensa ou revogada pelo ICMBio, nos termos da legislação brasileira em vigor.
4	Este documento somente poderá ser utilizado para os fins previstos na Instrução Normativa ICMBio nº 03/2014 ou na Instrução Normativa ICMBio nº 10/2010, no que especifica esta Autorização, não podendo ser utilizado para fins comerciais, industriais ou esportivos. O material biológico coletado deverá ser utilizado para atividades científicas ou didáticas no âmbito do ensino superior.
5	As atividades de campo exercidas por pessoa natural ou jurídica estrangeira, em todo o território nacional, que impliquem o deslocamento de recursos humanos e materiais, tendo por objeto coletar dados, materiais, espécimes biológicos e minerais, peças integrantes da cultura nativa e cultura popular, presente e passada, obtidos por meio de recursos e técnicas que se destinem ao estudo, à difusão ou à pesquisa, estão sujeitas a autorização do Ministério de Ciência e Tecnologia.

Este documento foi expedido com base na Instrução Normativa nº 03/2014. Através do código de autenticação abaixo, qualquer cidadão poderá verificar a autenticidade ou regularidade deste documento, por meio da página do Sisbio/ICMBio na Internet (www.icmbio.gov.br/sisbio).

Código de autenticação: 0710720120190827

Página 1/3



Ministério do Meio Ambiente - MMA
Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade - ICMBio
Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade - SISBIO

Autorização para atividades com finalidade científica

Número: 71072-1	Data da Emissão: 27/08/2019 10:49:23	Data da Revalidação*: 27/08/2020
De acordo com o art. 28 da IN 03/2014, esta autorização tem prazo de validade equivalente ao previsto no cronograma de atividades do projeto, mas deverá ser revalidada anualmente mediante a apresentação do relatório de atividades a ser enviado por meio do Sisbio no prazo de até 30 dias a contar da data do aniversário de sua emissão.		

Dados do titular

Nome: Mariana Härter Remião	CPF: 026.254.340-07
Título do Projeto: Novas ferramentas moleculares de monitoramento ambiental a partir dos efeitos da exposição à herbicidas à base de glifosato sobre a reprodução do peixe-anual Austrolebias charrua (Cyprinodontiformes: Rivulidae)	
Nome da Instituição: Universidade Federal de Pelotas	CNPJ: 92.242.080/0001-00

Observações e ressalvas

6	O titular de licença ou autorização e os membros da sua equipe deverão optar por métodos de coleta e instrumentos de captura direcionados, sempre que possível, ao grupo taxonômico de interesse, evitando a morte ou dano significativo a outros grupos; e empregar esforço de coleta ou captura que não comprometa a viabilidade de populações do grupo taxonômico de interesse em condição in situ.
7	Este documento não dispensa o cumprimento da legislação que dispõe sobre acesso a componente do patrimônio genético existente no território nacional, na plataforma continental e na zona econômica exclusiva, ou ao conhecimento tradicional associado ao patrimônio genético, para fins de pesquisa científica, bioprospecção e desenvolvimento tecnológico. Veja maiores informações em www.mma.gov.br/cgen .

Locais onde as atividades de campo serão executadas

#	Descrição do local	Município-UF	Bioma	Caverna?	Tipo
1	Poças temporárias dos campos costeiros de Rio Grande e Santa Vitória do Palmar	Santa Vitória do Palmar-RS	Pampa	Não	Fora de UC Federal
2	Poças temporárias dos campos costeiros de Rio Grande e Santa Vitória do Palmar	Rio Grande-RS	Pampa	Não	Fora de UC Federal

Atividades X Táxons

#	Atividade	Táxon	Qtde.
1	Manutenção temporária (até 24 meses) de vertebrados silvestres em cativeiro	Austrolebias charrua	-
2	Coleta/transporte de espécimes da fauna silvestre in situ	Austrolebias charrua	48

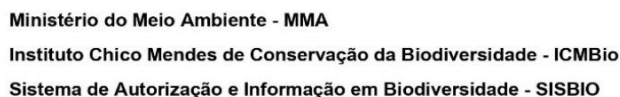
Materiais e Métodos

#	Tipo de Método (Grupo taxonômico)	Materiais
1	Método de captura/coleta (Peixes)	Puçá

Este documento foi expedido com base na Instrução Normativa nº 03/2014. Através do código de autenticação abaixo, qualquer cidadão poderá verificar a autenticidade ou regularidade deste documento, por meio da página do Sisbio/ICMBio na Internet (www.icmbio.gov.br/sisbio).

Código de autenticação: 0710720120190827

Página 2/3



Número: 71072-1	Data da Emissão: 27/08/2019 10:49:23	Data da Revalidação*: 27/08/2020
De acordo com o art. 28 da IN 03/2014, esta autorização tem prazo de validade equivalente ao previsto no cronograma de atividades do projeto, mas deverá ser revalidada anualmente mediante a apresentação do relatório de atividades a ser enviado por meio do Sisbio no prazo de até 30 dias a contar da data do aniversário de sua emissão.		

Nome: Mariana Härter Remião	CPF: 026.254.340-07
Título do Projeto: Novas ferramentas moleculares de monitoramento ambiental a partir dos efeitos da exposição à herbicidas à base de glifosato sobre a reprodução do peixe-anual <i>Austrolebias charrua</i> (Cyprinodontiformes: Rivulidae)	
Nome da Instituição: Universidade Federal de Pelotas	CNPJ: 92.242.080/0001-00

De acordo com a Instrução Normativa nº03/2014, a coleta imprevista de material biológico ou de substrato não contemplado na autorização ou na licença permanente deverá ser anotada na mesma, em campo específico, por ocasião da coleta, devendo esta coleta imprevista ser comunicada por meio do relatório de atividades. O transporte do material biológico ou do substrato deverá ser acompanhado da autorização ou da licença permanente com a devida anotação. O material biológico coletado de forma imprevista, deverá ser destinado à instituição científica e, depositado, preferencialmente, em coleção biológica científica registrada no Cadastro Nacional de Coleções Biológicas (CDBIO).

[illegible]

* Identificar o espécime do nível taxonômico possível.

Este documento foi expedido com base na Instrução Normativa nº 03/2014. Através do código de autenticação abaixo, qualquer cidadão poderá verificar a autenticidade ou regularidade deste documento, por meio da página do Sisbio/ICMBio na Internet (www.icmbio.gov.br/sisbio).

Código de autenticação: 0710720120190827

Página 3/3

Anexo 4

Certificado CEEA - UFPel



PARECER Nº
PROCESSO Nº

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS
145/2019/CEEA/REITORIA
23110.033011/2019-42

Prezado (a):

A CEEA avaliou a proposta intitulada “**Novas ferramentas moleculares de monitoramento ambiental a partir dos efeitos da exposição à herbicidas à base de glifosato sobre a reprodução do peixe-anual *Austrolebias charrua* (Cyprinodontiformes: Rivulidae)**”, processo nº 23110.033011/2019-42. Porém, de acordo com a informação fornecida pela Pesquisadora Responsável, os protocolos experimentais serão realizadas em outra Instituição de Ensino/Pesquisa, a qual possui sua própria Comissão de Ética no Uso de Animais (FURG). Portanto, segundo o CONCEA, o projeto proposto deve ser avaliado pela CEUA da instituição onde ocorrerá a experimentação animal.

A Comissão de Ética em Experimentação da UFPel emite parecer de **CIÊNCIA** do projeto e orienta que a Pesquisadora encaminhe o mesmo para análise da CEUA - FURG.

Anelize Campello Felix

Presidente da CEEA

Solicitamos que, após realizar os devidos esclarecimentos, o processo seja reenviado para avaliação das modificações.

M.V. Dra. Anelize de Oliveira Campello Felix

Presidente da CEEA



Documento assinado eletronicamente por **ANELIZE DE OLIVEIRA CAMPELLO FELIX, Médico Veterinário**, em 20/11/2019, às 10:53, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site http://sei.ufpel.edu.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **0790136** e o código CRC **6275B747**.