



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE – FURG  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS – ICB  
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS  
FISIOLÓGICAS – FISILOGIA ANIMAL COMPARADA



**Efeitos do Roundup® em parâmetros bioquímicos e moleculares envolvendo a  
resposta antioxidante em brânquias e fígado de zebrafish (*Danio rerio*)**

Robson Rabelo Velasques

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre no Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas - Fisiologia Animal Comparada, da Universidade Federal do Rio Grande - FURG, sob orientação do Prof. Dr. Carlos Eduardo da Rosa e Co-orientação da Prof. (a) Dra. Juliana Zomer Sandrini.

Rio Grande, Março de 2015.

## **Agradecimentos**

Agradeço primeiramente aos meus pais, por todo apoio e incentivo que me deram para que eu seguisse sempre estudando. Sei que posso sempre contar com vocês.

Ao meu orientador Prof. Dr. Carlos Eduardo da Rosa, por toda dedicação, esforço e paciência em me orientar. Nos momentos de apuros no laboratório, sempre se demonstrando preocupado e disposto a ajudar. Nos momentos em que tive algum tipo problema pessoal, também sempre pude contar com a tua ajuda e compreensão.

A minha co-orientadora Prof. Dra. Juliana Zomer Sandrini, por sempre apresentar soluções práticas e rápidas para problemas aos quais eu e Nino levávamos horas discutindo sem chegar a um acordo. A tua participação foi extremamente importante na realização desse trabalho.

Aos colegas Fábio e Amanda, por toda ajuda no laboratório, nas madrugadas e finais de semana em que tivemos que trabalhar, sempre com muita brincadeira e bom humor.

Aos colegas Simone e Maurício por toda a convivência no começo do meu mestrado, das conversas, dos planos, das Reuniões envolvendo a APTA e tudo mais, infelizmente não tivemos uma convivência até o final do mestrado mas foi um prazer ter passado esse tempo com vocês.

A todo pessoal da sala 2, onde tive a oportunidade de trocar experiências e aprender muito sobre como conviver em uma sala onde há predominância de pessoas do sexo feminino. Pude aprender muito com as experiências acadêmicas de cada um, sem dispensar os momentos de descontração, com muito chimarrão e música ao vivo.

E por fim a todos que de alguma forma contribuíram para a realização desse trabalho e que não estão com o nome aqui. Muito obrigado pela participação de todos.

## Sumário

<b>Resumo Geral</b> .....	4
<b>Introdução Geral</b> .....	5
<b>Objetivos</b> .....	14
<b>Objetivo Geral</b> .....	14
<b>Objetivos Específicos</b> .....	14
<b>Artigo</b> .....	16
Abstract.....	17
1. Introduction.....	18
2. Materials and Methods.....	20
3. Results.....	24
4. Discussion.....	28
5. Conclusion.....	33
Acknowledgements.....	34
References.....	34
<b>Considerações Finais</b> .....	39
<b>Bibliografia Geral</b> .....	43

## Resumo Geral

Organismos aquáticos estão constantemente sujeitos a sofrerem efeitos adversos causados por contaminantes ambientais. Dentre estes contaminantes podem se destacar os pesticidas, que são amplamente utilizados na atividade agrícola no combate de pragas, porém podendo causar danos ao meio ambiente e a organismos não-alvo. Entre os pesticidas mais utilizados no mundo está o herbicida Roundup, o qual possui como princípio ativo o glifosato. Entre seus efeitos em peixes está o estresse oxidativo, caracterizado como um desbalanço entre antioxidante e pró-oxidantes em favor dos pró-oxidantes, levando a danos oxidativos em biomoléculas. O objetivo do presente estudo foi verificar o efeito do Roundup no balanço oxidativo em brânquias e fígado de zebrafish bem como sua resposta em termos de expressão gênica de componentes do sistema de defesa antioxidante. Animais adultos foram expostos a concentrações de 5 mg/L e 10 mg/L de Roundup® e após 24, 48, 72 e 96 horas os animais foram eutanaziados para a dissecação dos tecidos para determinação da concentração de espécies reativas de oxigênio (ERO) e capacidade antioxidante contra radicais peroxil (ACAP). Após 24 e 96 horas os tecidos foram utilizados para análise da expressão dos seguintes genes: *nrf2*, *cat*, *sod1*, *sod2*, *gclc*, *gpx*, *gsta*, *gstp*, *gstπ*, *ucp1* e *ucp3*, sendo que a expressão dos genes *tbp* e *e1a* foi utilizada como normalizadores. Nas brânquias, os resultados mostraram um significativo aumento de ACAP em 96 horas de exposição na maior concentração. No fígado, foi observada uma diminuição significativa de ERO e ACAP em 24 horas de exposição, e um aumento significativo de ACAP após 48 horas de exposição na maior concentração de Roundup®. Os animais expostos a menor concentração apresentaram uma diminuição significativa nos níveis de ERO após 72 e 96 horas de exposição, sem alterações significativas para ACAP. Para a expressão gênica foi observada uma redução significativa de *sod2* nas brânquias dos animais expostos a maior concentração. A expressão de *gpx* foi reduzida nas brânquias dos animais expostos a menor concentração e aumentada no fígado dos animais expostos a maior concentração após 96 horas. A expressão de *gstp* foi diminuída nas brânquias dos animais expostos durante 24 horas na maior concentração. Em relação às proteínas desacopladoras (UCPs), *ucp1* teve um aumento significativo na expressão em 24 horas nas brânquias dos animais expostos a maior concentração. Esses resultados mostram que a exposição ao Roundup® causa um desbalanço oxidativo em ambos os tecidos analisados e essa situação pode levar a uma resposta em termos de alteração do perfil de expressão gênica do sistema de defesa antioxidante.

## **Introdução Geral**

Com o constante aumento populacional e conseqüente aumento da demanda de alimentos, técnicas de produção agrícola em larga escala são empregadas a fim de atender essa demanda (Peres e Moreira 2007). Nos últimos anos tem se observado um grande aumento da indústria agrícola no Brasil, principalmente na monocultura de grãos como a soja. Essas extensas áreas de cultivos estão sujeitas a ação de pragas, como insetos e ervas daninhas, sendo necessária a utilização de grandes quantidades de agrotóxicos que atuam no controle dessas pragas. No entanto, esses agrotóxicos, utilizados de forma indiscriminada, tem como conseqüência a contaminação de diferentes compartimentos ambientais (Grützmacher et al., 2008).

Segundo a Lei Federal nº7.802/89 os agrotóxicos são definidos como os produtos e os agentes de processos físicos, químicos ou biológicos, destinados ao uso nos setores de produção, armazenamento e beneficiamento de produtos agrícolas e são classificados de acordo com o agente que combatem. Dentre estes podem ser destacados os herbicidas, inseticidas, fungicidas, raticidas e acaricidas (Alonzo e Corrêa, 2008). No Brasil, o mercado de agrotóxicos cresceu 190% nos últimos 10 anos em comparação com o mercado mundial, que teve um crescimento de 93%, passando a ser o maior consumidor de agrotóxicos do mundo no ano de 2008, posição antes ocupada pelos EUA (ANVISA 2010).

Entre os agrotóxicos mais utilizados estão os herbicidas a base de glifosato, que representam 60% do mercado mundial de herbicidas (Amarante Junior e Santos 2002). Essa molécula é considerada um análogo da glicina e a sua estrutura química é ilustrada na Figura 1.

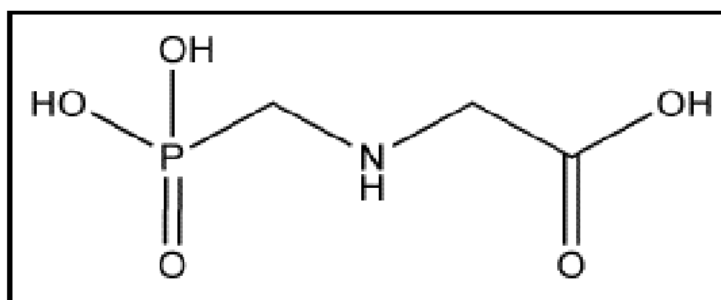


Figura1. Glifosato. Retirado de [www.pesticideinfo.org](http://www.pesticideinfo.org)

A utilização do glifosato como herbicida iniciou na década de 70, quando foram descobertas as suas propriedades no combate a ervas daninhas. O glifosato foi sintetizado por pesquisadores da empresa Monsanto onde observaram sua atuação como inibidor da enzima enolpiruvilchiquimato fosfato sintase (EPSPS). Esta enzima, presente apenas em plantas, é responsável pela biossíntese de corismato, um intermediário na biossíntese de fenilalanina, tirosina e triptofano (Williams et al., 2000).

Formulações comerciais do glifosato foram primeiramente introduzidas em 1974, tais como glifosato-isopropilamônio, glifosato-sesquisódio (patenteados pela Monsanto e vendidos como Roundup®) e glifosato-trimesium (patenteado pela ICI, atual Syngenta) (Amarante Junior e Santos 2002). Atualmente existe uma série de formulações de herbicidas a base de glifosato (Roundup WG, Roundup Ultra, Roundup Transorb, Roundup Transorb R, Roundup Original, Roundup Ready), todos contendo além do princípio ativo, surfactantes, água e ingredientes inertes. Um dos surfactantes predominantes nas diferentes formulações de Roundup® é o POEA (Amina polietoxilada). Esse surfactante é adicionado para facilitar a penetração do glifosato através das ceras cuticulares de plantas alvo e constitui aproximadamente 15% das formulações comerciais. Inicialmente essa concentração de surfactante adicionada nas formulações comerciais foi considerada sem risco para a saúde ambiental. Entretanto, a

partir de alguns estudos foi concluído que esse surfactante, nessas concentrações, pode causar riscos para organismos aquáticos (Giesy et al., 2000).

O glifosato apresenta uma meia vida no solo que pode variar de 30 a 90 dias dependendo do nível de matéria orgânica presente no meio, e em água sua meia vida é de cerca de duas semanas. Muitos estudos mostram a presença de glifosato em diferentes compartimentos ambientais (Andrighetti et al., 2014). A contaminação das águas por este herbicida, assim como outros químicos ambientais, pode ocorrer por via direta, através de métodos inadequados de aplicação ou por via indireta, através da lixiviação, erosão, precipitação e carreamento desses compostos para o ambiente, causando efeitos adversos à biota local (Maraschin, 2003).

Com o crescente aumento da utilização de herbicidas a base de glifosato, agências de proteção ambiental de diversos países começaram a regulamentar o uso destes, visando um menor impacto ambiental. No Brasil, a resolução CONAMA 357, de 17 de março de 2005 estabeleceu um limite máximo de glifosato permitido em águas doces de classe 1 de 65 µg/L. Esse crescente aumento da utilização de Roundup® também estimulou a produção de numerosos estudos mostrando que tanto o glifosato como suas formulações comerciais apresentam toxicidade para organismos não alvos. Na literatura são descritos efeitos do Roundup® e seus constituintes em uma ampla variedade de organismos, desde microrganismos aquáticos e terrestres até mamíferos (Giesy et al., 2000).

Segundo Klaasen (2008) o glifosato é classificado como um organofosforado sem capacidade de inibir a enzima acetilcolinesterase. Embora esta classificação, alguns trabalhos tem sugerido a inibição desta enzima como um possível mecanismo de toxicidade do Roundup® e seus constituintes para organismos não-alvo. Neste sentido alguns estudos mostram que tanto o glifosato como suas formulações comerciais podem

atuar reduzindo a atividade dessa enzima, importante no processo de transmissão do impulso nervoso. Exposições *in vivo* a formulações comerciais de Roundup mostraram, de maneira geral, inibição da atividade dessa enzima em peixes. Gluszczak et al. (2006) mostraram que em peixes da espécie *Leporinus obtusidens* ocorre uma redução gradual na atividade de acetilcolinesterase cerebral após exposição ao Roundup®. Modesto e Martinez (2010) demonstraram redução da atividade de acetilcolinesterase em peixes da espécie *Prochilodus lineatus* após 24 e 96 horas de exposição a 10 mg/L de Roundup. Além disso, Sandrini et al. (2013) mostraram, através de um estudo *in vitro*, que a molécula de glifosato é capaz de inibir a atividade de acetilcolinesterase em tecido muscular e nervoso dos peixes *Danio rerio* e *Jenynsia multidentata*.

Muitos trabalhos também demonstram que o Roundup® apresenta maior toxicidade que o seu princípio ativo, o glifosato. Folmar et al. (1979) foram os primeiros a realizar um estudo comparativo entre os diferentes constituintes do Roundup®. Estes autores testaram a toxicidade aguda para quatro espécies de invertebrados aquáticos e peixes e concluíram que o Roundup® e o POEA são mais tóxicos que o ingrediente ativo glifosato. Estudos subsequentes mostraram que a toxicidade do Roundup® é atribuída, em grande parte ao surfactante presente na formulação (Mitchell et al., 1987; Servizi et al., 1987; Wan et al., 1989).

Trabalhos mais recentes também tem confirmado essa hipótese. Tsui e Chu (2003) avaliaram a toxicidade dos diferentes constituintes do Roundup® para sete organismos, dentre eles bactérias, microalgas, protozoários e microcrustáceos. Com exceção de algas, que foram mais sensíveis ao glifosato por possuírem vias metabólicas semelhantes às de plantas superiores, todos os organismos foram mais sensíveis ao POEA, seguido pelo Roundup®, glifosato na forma ácida e sal de glifosato. Navarro e



Martinez (2014) mostraram que no peixe *Prochilodus lineatus* expostos apenas ao surfactante POEA foram observados efeitos genotóxicos, bioquímicos e fisiológicos.

Segundo Lushchak et al. (2009), organismos aquáticos, particularmente peixes, são mais susceptíveis a contaminação por glifosato do que mamíferos. Muitos trabalhos tem relatado uma série de efeitos sub-letais do Roundup® para várias espécies aquáticas. Em peixes já tem sido demonstrado efeitos do Roundup® e seus constituintes em diferentes níveis de organização biológica, tais como efeitos em parâmetros reprodutivos (Lopes et al., 2014; Webster et al., 2014), efeitos genotóxicos (Grisolia et al., 2002; Cavalcante et al., 2008; Ghisi e Cestari, 2013) bem como efeitos histopatológicos (Szarek et al., 2000; Jiraungkoorskul et al., 2003) e bioquímicos (Neškovic et al., 1996; Glusczak et al., 2006; Glusczak, et al. 2007).

Organismos aquáticos expostos a poluentes ambientais também estão sujeitos a sofrer estresse oxidativo, que é definido como um desbalanço entre antioxidantes e pró-oxidantes, a favor dos pró-oxidantes levando a um distúrbio da sinalização redox e/ou controle do dano molecular (Jones, 2006). Esta situação está fortemente relacionada com a geração de espécies reativas de oxigênio (ERO) formadas a partir do metabolismo aeróbico. Existem várias fontes endógenas de formação de ERO, no entanto o maior sítio de produção endógena é a mitocôndria (Echtay, 2007). Essas espécies reativas tais como ânion superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ), peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) e radical hidroxil ( $\cdot OH$ ) são formadas na etapa final da respiração celular, onde o oxigênio, que atua como acceptor final de elétrons, é reduzido formando  $H_2O$ . Estima-se que cerca de 0,1 - 6% de todo o oxigênio consumido em um organismo aeróbico seja parcialmente reduzido culminando com a produção de ERO (Sies, 1991). Abaixo são mostradas as etapas da redução de  $O_2$  à  $H_2O$ :

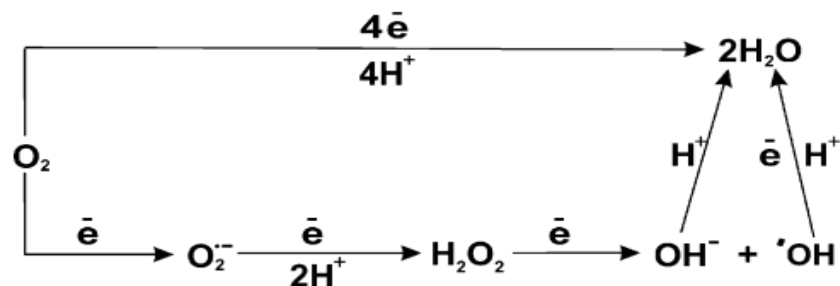


Figura 2. Redução do oxigênio a água com a formação de intermediários reativos (Retirado de Lushchak 2011).

Além de serem geradas no metabolismo aeróbico, as ERO, e a situação de estresse oxidativo, podem ser induzidas por uma série de fatores, incluindo xenobióticos, drogas, metais pesados e radiação ionizante. A exposição a estes fatores pode levar a um aumento da geração de espécies reativas de oxigênio, que por sua vez acabam reagindo com biomoléculas levando a danos oxidativos em proteínas, lipídeos e DNA (Sies, 1991). Esse dano oxidativo causado em biomoléculas leva a perda de função das mesmas, como por exemplo, desnaturação de proteínas, levando a perda de sua função e peroxidação lipídica, levando a perda de seletividade das membranas, entre outros (Scandalios et al., 2005).

Para combater essas ERO, organismos aeróbicos possuem um complexo sistema de controle constituído por uma série de enzimas e proteínas que atuam diminuindo os danos causados por estas espécies reativas em constituintes celulares. Esse sistema de defesa antioxidante é composto por moléculas enzimáticas e não enzimáticas, que tem como função interceptar, degradar ou reparar os danos oxidativos causados pelas diferentes ERO (Hermes-Lima, 2004).

Os mecanismos de defesa antioxidante enzimáticos compreendem enzimas que atuam na degradação de ânion superóxido ( $\text{O}_2^{\cdot-}$ ) e peróxido de hidrogênio ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ). A superóxido dismutase (SOD) catalisa a dismutação do  $\text{O}_2^{\cdot-}$  em oxigênio e  $\text{H}_2\text{O}_2$ ; a catalase (CAT) atua decompondo o  $\text{H}_2\text{O}_2$  em água e oxigênio; e a glutatona peroxidase

(GPx) também atua catalisando a decomposição de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> porém, utilizando o tripeptídeo glutationa na sua forma reduzida (GSH) como co-substrato, gerando água e glutationa em sua forma oxidada (GSSG) (Hermes-Lima, 2004).

Entre os antioxidantes não enzimáticos pode-se destacar a GSH, que constitui o tiól-não proteico mais abundante, cuja síntese ocorre constitutivamente nas células, podendo ser aumentada em resposta a diversos estressores. A síntese de GSH ocorre através de duas etapas, sendo a primeira catalisada pela enzima Glutamato Cisteína Ligase (GCL) que é considerada o passo limitante dessas reações, sendo a segunda catalisada pela enzima Glutathione sintase (GS) (Iles e Liu, 2005). Outra enzima que atua regulando os níveis de GSH é a glutathione redutase (GR), responsável por reestabelecer os níveis de GSH convertendo a forma oxidada GSSG de volta a forma reduzida GSH (Hermes-Lima, 2004).

Embora GSH possa reagir espontaneamente com algumas moléculas eletrofílicas, muitas dessas reações requerem a catálise através de uma extensa família de enzimas conhecidas como glutathione-S-transferases (GSTs) (Armstrong 1997). As GSTs são classificadas em três famílias distintas de acordo com a sua localização na célula sendo elas citosólicas, mitocondriais e associadas à membrana (Hayes, et al. 2005). As isoformas citosólicas são agrupadas em sete classes (alfa, mu, pi, teta, sigma, ômega e zeta) (Mannervik, et al. 1992). De uma maneira geral essas isoformas atuam na detoxificação de produtos oxidativos (como por exemplo hidroperóxidos de DNA e produtos da peroxidação lipídica), na metabolização de xenobióticos, além de participarem de vias biossintéticas (George, 1994; Hayes e Pulford, 1995).

Todo esse sistema de defesa antioxidante possui uma fina regulação ao nível de transcrição gênica (Kobayashi e Yamamoto 2005), visto que mudanças no perfil de expressão desses genes são cruciais para adaptação dos animais a condições de estresse

ambiental (Marchand et al., 2006). O controle da expressão desses genes relacionados com a resposta antioxidante ocorre, principalmente, através da via Nrf2-Keap1. Essa via compreende uma complexa cascata de sinalização com o potencial de manter a homeostase redox da célula (Bryan et al., 2013). Nrf2 é um fator de transcrição que controla a expressão e coordena a indução de uma série de genes de defesa que codificam para enzimas e proteínas antioxidantes (Kaspar et al., 2009). Em condições normais, os níveis proteicos de Nrf2 são baixos devido à atuação do inibidor Keap1, que sequestra Nrf2 presente no citosol e facilita sua degradação via proteossoma. Em condições de estresse essa degradação é inibida e Nrf2 é translocado para o núcleo, onde forma um heterodímero com Maf, uma proteína que facilita a ligação do Nrf2 com o elemento de resposta antioxidante (ARE – *Antioxidant Response Element*), uma região promotora presente nos genes envolvidos na resposta antioxidante (Itoh et al., 1997; Nguyen et al., 2003) (Figura 3).

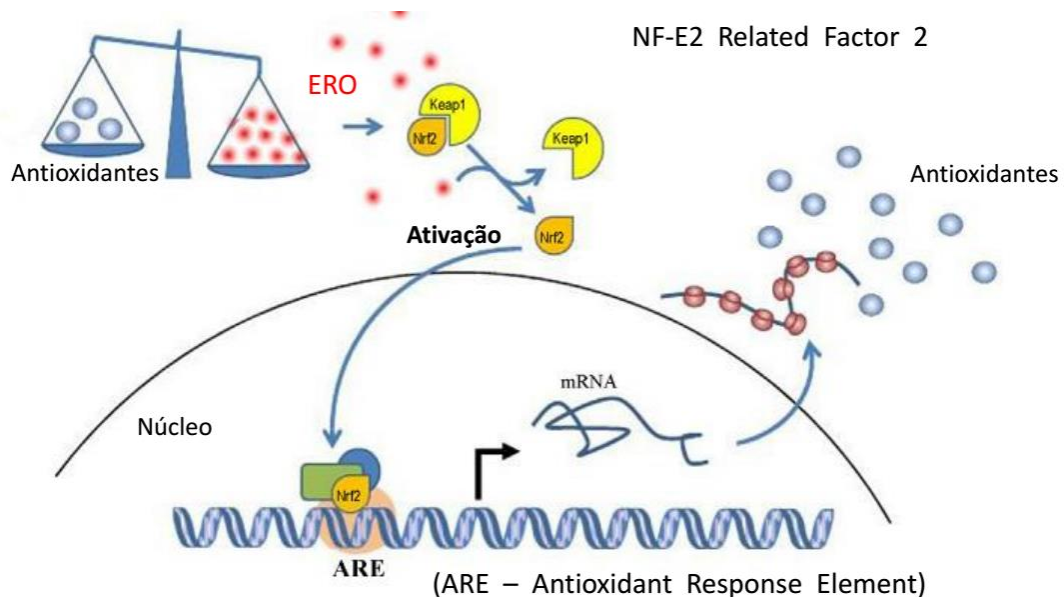


Figura 3. Esquema mostrando a via de sinalização do Nrf2 (Adaptado de Deramaudt, *et al.* 2013)

Outro mecanismo que pode estar envolvido no equilíbrio dos níveis de ERO é através do desacoplamento da fosforilação oxidativa mediado por proteínas desacopladoras (“uncoupling proteins” - UCPs). Estas são proteínas pertencentes a uma superfamília de transportadores de ânions e estão presentes na membrana interna da mitocôndria (Boss et al., 1998). Estas são responsáveis pelo “vazamento” de prótons do espaço intermembrana para a matriz mitocondrial. A primeira isoforma identificada em mamíferos foi a UCP1, e a sua função atribuída à termogênese em células do tecido adiposo marrom (Dicker et al., 1995). Entretanto, a descoberta da existência de isoformas, como a UCP2 e UCP3, e a presença dessas proteínas em peixes e outros grupos animais, acendeu uma discussão sobre a origem desse grupo de proteínas ao longo da escala filogenética e outras possíveis funções desempenhadas por estas (Hughes e Criscuolo, 2008). Em mamíferos, 5 isoformas de UCPs foram identificadas, com diferentes graus de identidade, funções e distribuição tecidual (Sevensson, 2010). Não há um consenso quanto ao número de isoformas presentes em peixes. No entanto sabe-se que pelo menos 3 isoformas estão presentes nestes organismos (Tseng et al., 2010; Tine et al., 2012).

O mecanismo pelo qual as UCPs atuam regulando a formação de ERO mitocondrial é através de um “leve” desacoplamento do processo de fosforilação oxidativa, onde ocorre uma redução da força próton-motriz e consequentemente estabilização do fluxo de elétrons pela cadeia transportadora (Mailloux e Harper, 2011). De acordo com Brand e Esteves (2005), de todas as enzimas e proteínas que compõem o sistema de defesa antioxidante, o “leve” desacoplamento realizado pelas UCPs pode ser a primeira linha de defesa contra as espécies ativas de oxigênio geradas na mitocôndria.

Alguns trabalhos tem mostrado que o Roundup® pode causar efeitos a nível mitocondrial. Peixoto (2005) mostrou que o Roundup® induz uma forte diminuição do

potencial de membrana mitocondrial, resultando em uma perda da seletividade da membrana interna da mitocôndria. Também foi visto uma diminuição da succinato desidrogenase e succinato citocromo c oxidase, sugerindo que esse herbicida afeta a transferência de elétrons pela cadeia transportadora através dos complexos II e III. Webster et al. (2015) também mostraram efeitos do Roundup® em genes envolvidos no processo de respiração celular. Observaram aumento da expressão de *slc52a3* e *rft2*, genes que codificam para proteínas transportadoras de riboflavina, componentes centrais de flavoproteínas FAD e FMN, que são importantes aceptores utilizados pela cadeia transportadora de elétrons. Esses efeitos do Roundup® ao nível mitocondrial podem acarretar em aumento de espécies reativas de oxigênio e conseqüentemente uma situação de estresse oxidativo, visto que essa organela é a principal fonte de ERO.

Alguns estudos tem mostrado que o Roundup® leva a alterações no sistema antioxidante de peixes, o que por conseqüência pode gerar danos oxidativos em biomoléculas, caracterizando uma situação de estresse oxidativo. Senhorin et al. (2014) mostraram uma série de efeitos relacionados ao estresse oxidativo no peixe *Pseudoplatystoma* sp após 96 horas de exposição ao Roundup®. Com relação ao sistema de defesa antioxidante foi visto que no fígado ocorre uma diminuição significativa da atividade das enzimas SOD e CAT e um aumento de ácido ascórbico e GSH entre as concentrações testadas. Nesse mesmo trabalho também foi visto aumento no conteúdo de proteínas carboniladas e malondialdeído indicando dano oxidativo em proteínas e lipídeos, respectivamente.

Modesto e Martinez (2010b) também observaram efeitos do Roundup na diminuição da atividade de SOD em 6 horas de exposição a uma concentração de 5 mg/L e CAT em 24 horas de exposição em concentrações de 1 mg/L e 5 mg/L de Roundup® para amostras de fígado do peixe *Prochilodus lineatus*. Em contrapartida a

atividade da GPx aumentou em 24 e 96 horas após exposição a 5 mg/L podendo estar balanceando o efeito da CAT. Também foi visto uma diminuição na atividade de GST após 6 e 24 horas de exposição em ambas as concentrações testadas. O conteúdo de GSH diminuiu em 24 horas nas duas concentrações porém, aumentou após 96 horas nos animais expostos a 5 mg/L de Roundup®. O mesmo grupo de pesquisa mostrou, em outro trabalho utilizando a mesma espécie de peixe, uma redução da atividade de SOD, GPx e GST após exposição a 10 mg/L de Roundup® e novamente um aumento de GSH foi observado. Lushchak et al. (2009) mostraram que no peixe *Carassius auratus* exposto a várias concentrações de Roundup® apresentou uma redução na atividade de uma série de enzimas do sistema de defesa antioxidante, tais como SOD, GST, GR, G6PDH bem como uma redução no conteúdo de GSH após 96 horas de exposição. Apenas a CAT apresentou aumento na atividade em 96 horas de exposição. Nwani et al. (2013) também mostrou redução na atividade de CAT, SOD e GR no peixe *Channa punctatus* após exposição ao Roundup.

Os trabalhos investigando o efeito do Roundup no sistema de defesa antioxidante de peixes se baseiam em análises pontuais de enzimas e proteínas que compõem as defesas antioxidantes, e pouco se conhece sobre o possível efeito do Roundup® na geração de espécies reativas de oxigênio. Respostas moleculares envolvendo o sistema de defesa antioxidante frente à exposição ao Roundup® também são pouco conhecidas, visto que a maioria dos trabalhos se detém em analisar seus efeitos ao nível de atividade enzimática. Neste sentido há uma carência de trabalhos mostrando os efeitos moleculares do Roundup® frente a uma alteração do balanço oxidativo, principalmente em tecidos de importância toxicológica, como as brânquias e o fígado que são a primeira via de entrada e o principal local de biotransformação de xenobióticos respectivamente.

## **Objetivo Geral**

- Analisar os efeitos do Roundup® no balanço oxidativo e na expressão de genes relacionados com a resposta antioxidante no peixe *Danio rerio*.

## **Objetivos específicos**

- Determinar a geração de espécies reativas de oxigênio em fígado e brânquia de *D. rerio* expostos ao Roundup®;

- Determinar efeitos do Roundup® sobre a capacidade antioxidante total em fígados e brânquias de *D. rerio* expostos ao Roundup®;

- Determinar a expressão de genes que codificam para enzimas e proteínas que atuam na resposta antioxidante frente à exposição ao Roundup® em brânquias e fígado de zebrafish.



**Artigo**

**Roundup® in zebrafish: effects on oxidative balance and gene expression**

**(a ser submetido à revista Aquatic Toxicology)**

**Fator de Impacto = 3,513**

## **Roundup® in zebrafish: effects on oxidative balance and gene expression**

<sup>a</sup>Robson Rabelo Velasques, <sup>a</sup>Fabio de Mello Tarouco, <sup>a</sup>Amanda Silveira Guerreiro,  
<sup>a</sup>Juliana Zomer Sandrini, <sup>a</sup>Carlos Eduardo da Rosa.

<sup>a</sup>Instituto de Ciências Biológicas. Universidade Federal do Rio Grande, Av. Itália km 8,  
96203-900, Rio Grande, RS, Brazil. Programa de Pós-Graduação em Ciências  
Fisiológicas – Fisiologia Animal Comparada

e-mails:

robsonvelasques@furg.br (Robson Rabelo Velasques)

fabio.304@hotmail.com (Fabio de Mello Tarouco)

amandahg@gmail.com (Amanda Silveira Guerreiro)

julianasandrini@furg.br (Juliana Zomer Sandrini)

carlosrosa@furg.br (Carlos Eduardo da Rosa)

## Abstract

Environmental pollutants, such as pesticides, would cause oxidative stress. Roundup® and its active ingredient, glyphosate, are the most employed herbicides around the world and can contaminate rivers and basins. It is suggested that Roundup® can cause an imbalance between the reactive oxygen species production (ROS) and the action of the antioxidant defense system. The objective of the present study was to verify the Roundup® effects on the oxidative balance in zebrafish *Danio rerio* liver and gills as well as the response in terms of gene expression related to antioxidant defense system. Adult zebrafish were exposed to Roundup® (5 mg/L and 10 mg/L) and after 24h, 48, 72 and 96h the animals were euthanized for determination of ROS levels and antioxidant capacity against peroxy radicals (ACAP). Also, after 24 and 96h tissues were employed for gene expression determination of the following genes: *nrf2*, *cat*, *sod1*, *sod2*, *gclc*, *gpx*, *gsta*, *gstp*, *gstπ*, *ucp1* and *ucp3*. In gills, the results demonstrated a significant ACAP induction 96h after exposure to the highest concentration employed. In liver, it was observed a significant reduction in ROS and ACAP after 24h and a response of ACAP increment after 48h in animals exposed to the highest Roundup concentration. Animals exposed to the lowest concentration presented a significant reduction on ROS levels after 72 and 96h without changes in ACAP. Concerning gene expression, it was observed a reduction in *sod2* expression in gills of animals exposed to the highest concentration. The *gpx* gene expression was reduced in gills of animals exposed to the lowest concentration and induced in liver after 96h of exposure to the highest concentration. The *gstp* expression was diminished in gills of animals exposed for 24h to the highest concentration. Concerning uncoupling proteins (UCP), *ucp1* gene expression was induced in gills of animals exposed to 10 mg/l after 24h. Taken together, these results indicated that Roundup® exposure causes an imbalance in oxidative balance in both gills and liver of zebrafish and this situation leads to a response in terms of the antioxidant defense system altered gene expression.

**Keywords:** Roundup, *Danio rerio*, reactive oxygen species, antioxidant capacity, gene expression, *ucp1*.

## 1. Introduction

The wide employment of agrichemicals, like herbicides, leads to contamination of different environmental compartments, such as rivers and basins (Levine, 2007). Between the diverse formulations, the herbicide Roundup® is the most employed in Brazil and worldwide (Giesy et al., 2000). Its mechanism of action is based on the inhibition of the enzyme 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthetase (EPSPS) by its active ingredient, a glycine analog called glyphosate. This enzyme is present only in plants and its responsible for the aromatic amino acids synthesis (Williams et al., 2000). The presence of this molecule has been detected in aquatic environment. For example, in the Brazilian southern region, where Roundup is extensively employed in cultures of rice and soy, glyphosate has been detected in the range of 0.36 up to 2.16 mg/L in ponds and rivers (Almeida, 1992).

Several Roundup formulations are available, all of them containing as basic ingredients: isopropilamine glyphosate salt, surfactants, water as well as other substances described as inert ingredients. These formulations vary in terms of glyphosate concentration and the type and concentration of the surfactants (Giesy et al., 2000). Among the surfactants, the POEA (Polyethoxylated Tallow Amine) is the most common. Some studies have demonstrated that the commercial formulations are more toxic than the active ingredient *per se*. Tsui and Chu (2003) evaluated the toxicity of the different Roundup constituents to organisms from different taxa (bacteria, microalgae, protists and crustacean), and concluded that the organisms presented higher sensitivity to POEA alone, followed by Roundup, glyphosate alone in its acid form and finally to glyphosate salt.

Several studies have demonstrated that Roundup based herbicides can cause several effects in fish, including genotoxic effects (Guilherme, et al., 2012; Grisolia, 2002, Cavalcante et al., 2008), histological alterations (Jiraungkoorskul et al., 2003; Szarek et al., 2000) and biochemical and physiological effects (Navarro and Martinez, 2014; Lopes et al., 2014.). However, its mode of action is not well described. Some authors related that the toxicity of Roundup® is based in its capacity to reduce the activity of acetylcholinesterase enzyme (Modesto and Martinez 2010a; Modesto and Martinez 2010b; Gluszczak, *et al.*, 2006). In fact, Sandrini et al. (2013) demonstrates that glyphosate *per se* is able to inhibit *in vitro* the activity of this enzyme from *Danio rerio*

and *Jenynsia multidentata*. However, others studies attribute the ability to generate oxidative stress situation to Roundup® as a toxicity mechanism.

Oxidative stress is defined as an imbalance of prooxidants and antioxidants, in favor of the first, leading to a redox cell signaling disturbance which would lead to an oxidative damage (Sies, 1991). In this sense, the antioxidant defense system, both enzymatic and non enzymatic, are essential elements in order to maintain the redox state and to defend cells and organisms against oxidative damage (Monteiro et al., 2006; Ruas et al., 2008). This system acts in a fine regulation at the transcription level of antioxidant enzymes and proteins responsible for the synthesis of antioxidants. In this sense, the Nrf2 transcription factor (NF-E2 Related Factor 2) plays a pivotal role in regulation of antioxidant defense genes (Kaspar et al., 2009).

Among enzymatic antioxidants, the superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) and glutathione peroxidase (GPx) are enzymes that constitute the first cellular defense against reactive oxygen species (ROS) because they acts directly in degradation of ROS generated during cellular metabolism (Hermes-Lima, 2004). Another important enzyme is the glutathione *S*-transferase (GST). This enzyme family possesses multiple functions, among that the biotransformation of xenobiotics and the detoxification of oxidative damage products, catalyzing the conjugation of this electrophilic substances with the glutathione tripeptide (GSH) (Monteiro et al., 2006). This tripeptide, and other substances, such as the ascorbic acid and  $\alpha$ -tocopherol, constitutes the non enzymatic antioxidant defense system (Hermes-Lima 2004). These substances interact directly with ROS, reducing its toxic effects. Recently, other molecules have been suggested to participate in the attenuation of ROS generation. For example, it has been recently suggested the role of the uncoupling proteins (UCPs) in the oxidative balance regulation by acting in reduction of mitochondrial ROS production (Mailloux and Harper 2011).

It has been demonstrated that Roundup® would induce an increment in the ROS generation with a consequent increment in oxidative damage, such as lipid peroxidation, causing an oxidative stress situation (Fan et al., 2013). In relation to the antioxidant defense system, some studies have demonstrated an increment in the glutathione content and in the GPx and GST activities in fish exposed to the herbicide (Lushchak et al., 2009; Menezes et al., 2010; Modesto and Martinez, 2010a; Modesto and Martinez, 2010b). There are a few studies evaluating the Roundup® effects on oxidative balance linked to alterations in the antioxidant response in terms of gene expression (Fan et al.,

2013; Marchand et al., 2006; Webster et al., 2015). So, the objective of the present study was to investigate the Roundup® effects on the oxidative balance and its relation to the response at the level of gene expression evolved in the antioxidant defense system. To this, zebrafish *Danio rerio* exposed to Roundup® were employed and the gills and liver were chosen since they represent the entrance route of substances and the main detoxification organ, respectively.

## 2. Material and Methods

### 2.1. Fish Maintenance and Exposure Protocol

The animals were obtained commercially from local suppliers and acclimated at the Instituto de Ciências Biológicas from Universidade Federal do Rio Grande – FURG (Biological Sciences Institute from Rio Grande Federal University) for a minimum of 15 days. Animals were maintained in recipes of 100L (density of 1 animal/liter) with dechlorinated tap water under constant aeration with at 28°C, pH 7.0 and photoperiod 14L:10D. The nitrite levels were monitored with a commercial kit and maintained at 0 ppm. The animals were fed *ad libitum* every day with commercial food (Tetra – Colorbits).

After acclimation period the animals were randomly divide in three experimental groups: control group (without Roundup), a group exposed to 5mg/L and another exposed to 10 mg/L of Roundup. These concentrations were based in other studies describing oxidative balance disturbances in other fish species (Lushchak et al., 2009; Menezes et al., 2010; Modesto and Martinez, 2010a; Modesto and Martinez, 2010b). The experiments were conducted in glass aquaria (6L – density = 1 animal/L), with constant aeration, maintained under the same conditions of the acclimation period. The animals were exposed for 24, 48, 72 and 96 hours. At the end, the animals were euthanized in immersion to metanosulphonated tricaine (Sigma – 500 µg/L) and the gills and liver were dissected for posterior analysis.

The experimental procedures were approved by the Ethical Committee for the Animal Usage from Universidade Federal do Rio Grande (CEUA-FURG protocol number 23116.007832/2013-88) and followed the procedures described on the Brazilian Laws.

## *2.2.ROS quantification*

The fluorescent compound dichlorofluorescein diacetate (H<sub>2</sub>DCF-DA - Sigma) was employed for the ROS quantification, according to LeBel et al. (1990). Gills and liver freshly dissected (pool=2animals / n=6 pools per experimental group) were homogenized in 200 µl of cold homogenization buffer (100 mM Tris-HCl, 2 mM EDTA e 5 mM MgCl<sub>2</sub>.6H<sub>2</sub>O; pH = 7.75). The homogenate were centrifuged (2000 g for 20 min at 4 °C). The pellet was discarded and supernatant were employed for protein measurement with a commercial kit based on biuret assay (Doles Reagents LTDA, Brazil). In order to standardize protein content between samples, the supernatant was diluted with homogenization buffer to 2 mg/L of protein. After this, 10µL of the diluted supernatant was added to a microplate with 127.5 µL of reaction buffer (30 mM HEPES, 200 mM KCl e 1 mM MgCl<sub>2</sub>; pH=7.2) and 10 µL of the H<sub>2</sub>DCF-DA solution (16 µM). Fluorescence intensity was monitored during at each 5 minutes during 60 minutes (25°C) employing a fluorometer (Victor 2, Perkin Elmer) with the excitation and emission wavelengths of 485 and 520 nm, respectively. The area between the curve of fluorescence/time were integrated and the total area employed for comparison. The results were expressed as % fluorescence area x minute (%FA x min) compared to the control group (100%).

## *2.3.Antioxidant Capacity Against Peroxyradicals (ACAP)*

The diluted supernatants employed for ROS analysis were conserved at -80 °C for further application to ACAP determination. The ABAP (2,2-azobis(2-methylpropionamide dihydrochloride; 4 mM; Sigma Aldrich) were employed as a peroxy radicals generator. The ACAP of samples were measured employing H<sub>2</sub>DCF-DA in the presence and absence of the ABAP. The fluorescence intensity were monitored during 35 minutes at 37°C employing a fluorometer (Victor 2, Perkin Elmer) with the excitation and emission wavelengths of 485 and 520 nm, respectively. The difference of fluorescence area with and without ABAP was considered the antioxidant capacity. The data were expressed as 1/% relative area compared to the control group, where an increment in ACAP values indicates an increment in the antioxidant capacity (Amado et al., 2009).

#### 2.4. Gene expression Analysis

Total RNA from liver and gill samples (pool=3 animals/ n=5 pools per experimental group) were extracted with TRIzol Reagent (Invitrogen) according to the manufacturers protocol. In order to assess quantity and quality the total RNA were employed for spectrophotometrical analysis (260/280 nm) and electrophoresis gel analysis (agarose 1%). The RNA samples were standardized by their concentration. The cDNA was prepared with the High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems). The cDNAs were diluted and employed for sqPCR following the manufactures protocol from the GoTaq qPCR Master Mix (Promega) and the ABI Prism 7300 Sequence Detection System (Applied Biosystems). The specific primers (Table 1) for zebrafish *Danio rerio* genes were designed in the Primer 3 at the NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). The efficiency of primers were tested and considered only those primers with reaction efficiency higher than 95%. The analyzed genes were: *nrf2*, *cat*, *sod1*, *sod2*, *gclc*, *gpx*, *gsta*, *gstp*, *gstπ*, *ucp1* and *ucp3*. The *tbp* (TATA box binding protein) and *ef1α* (elongation factor 1 alpha) were employed as housekeeping genes. The relative quantification of gene expression was done by the  $2^{-\Delta CT}$  method. The results were expressed as fold induction related to control group (1 standard error).

#### 2.5. Statistical Analysis

Data were checked in order test Anova assumptions. Data considered normal and homocedastic were verified by ANOVA with a significance level of 5% comparing groups in the same experimental time. The differences were verified by the post-hoc test of Newmann-Keuls, with a significance level of 5%.



Table 1.

Primer sequences for quantitative PCR used in this study

GenBank accession number	Gene	Primer sequence
<u>NM_182889.1</u>	<i>nrf2</i>	F: 5'- TGTGTTTCGGAGGCTCTTAA – 3' R: 5' AGCCATGTCCACACGTACA – 3'
NM_130912.1	<i>cat</i>	F: 5' – TGATCTTAGCAAATGCAACACTGA – 3' R: 5' – TGCAAAGGCCCCCATTTT – 3'
<u>NM_199976.1</u>	<i>sod1</i>	F: 5' - GGAAGAGCCGTTGAAATATTG – 3' R: 5' – AGCGGGCTAAGTGCTTTCAG – 3'
<u>NM_131294.1</u>	<i>sod2</i>	F: 5' – GAATGTCAGCGAGCGTTTCC – 3' R: 5' – TCCCAAGTGTGGTGCAATTTATT – 5'
<u>NM_213394.1</u>	<i>gsta</i>	F: 5'-CCCCAAAATACAAGGCGTTTC-3' R: 5'-CCCCTTCTGCAACACATCAAT-3'
<u>BC13957.2</u>	<i>gstp</i>	F: 5'-CCTGTGATGCCTATTTTGATCCT-3' R: 5'-TGTGATTGTATCATTGTAAGGACTTGAT-3'
<u>BC162358.1</u>	<i>Gstπ</i>	F: 5'-GCCCCGTCCCAAAGTGAAA-3' R: 5'-TTGATGGGCAGTTTCTTGAAGTT-3'
<u>BC164554.1</u>	<i>Gclc</i>	F: 5'-AGGGGATTCCCCAGGTTAG-3' R: 5'-TTTTCAACAGGTGTGGTTTGT-3'
<u>NM_001007281.2</u>	<i>Gpx</i>	F: 5'-CCAAGTAAACCAGCGCTTCT-3' R: 5'-TGATGTGCAGTGGACGGTTTAT-3'
<u>NM_199523.2</u>	<i>ucp1</i>	F: 5'-AGCCACAGACGTGGTAAAG-3' R: 5'-CGGCAGAGTTCCTTTCCAGA-3'
<u>NM_200353.1</u>	<i>ucp3</i>	F: 5'-TGAAACGCCCTGTTGTGA-3' R: 5'-TGACGTTGACCTTTGGCC-3'
<u>BC064291.1</u>	<i>ef1a</i>	F: 5'-ACATCAAGAAGATCGGCTACAAC-3' R: 5'-GACCCACAGGTACAGTTCCAATA-3'
<u>AF5034491.1</u>	<i>Tbp</i>	F: 5'-ACACCGCAGCCTGTGCAGAA-3' R: 5'-TGGCCTGAACCTCCCACCAT-3'

### 3. Results

#### 3.1. ROS and ACAP

Concerning ROS concentration, no significant differences were observed in gills at any experimental time (Fig.1A), although a tendency to reduction were observed in

the first 24 hours ( $p=0.058$ ). The ACAP significantly increased (80%) in animals exposed for 96h to the highest concentration (10 mg/L) compared to the control group ones ( $p<0.05$ ) (Fig. 1B). A trend to induction was also observed for animals exposed to the same concentration at 72h ( $p=0.0509$ ).

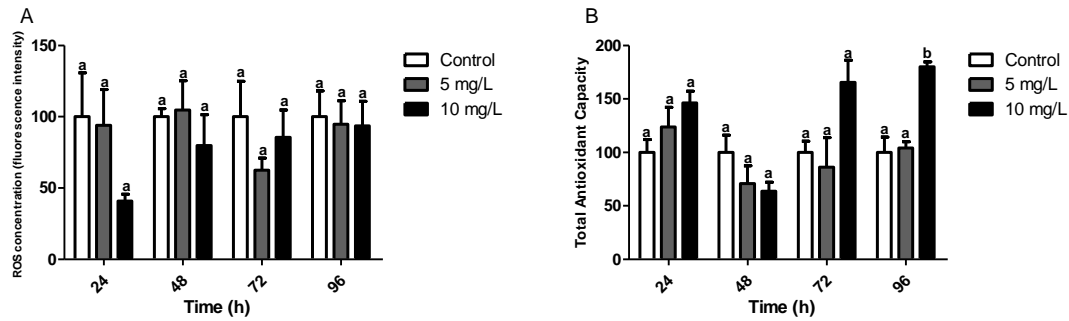


Fig. 1 Oxidative balance in gills from zebrafish exposed for 24, 48, 72 and 96h to Roundup® (0, 5 and 10 mg/L). A – Reactive Oxygen Species concentration (pools of 2 animals;  $n=6$  pools). B- Antioxidant Capacity Against Peroxyradicals (pools of 2 animals;  $n=4$  pools). Values are expressed as means  $\pm$  standard error. Different letters indicates significant difference in each experimental time ( $p<0.05$ ).

Regarding liver, after 24 hours exposure it was observed a significant reduction to 0.5 in ROS concentration in animals exposed to the highest concentration. In 48 hours exposure period, no significant differences were observed, although a trend of reduction was observed in both concentrations ( $p=0,065$ ). After 72 and 96 hours the ROS concentration of animals exposed to highest concentration returns to the control level values. However, animals exposed to the lowest concentration presented levels reduced in both experimental times compared to control group and animals exposed to the highest concentration ( $p<0.05$ ) (Fig. 2A). Concerning the ACAP in the highest Roundup concentration tested, it was observed a significant reduction to 0.34 in ACAP levels after exposure for 24 hour ( $p<0.05$ ). In the other hand, in the following experimental period, the ACAP levels were 1.38 times higher in animals exposed to the same Roundup concentration ( $p<0.05$ ) (Fig. 2B).

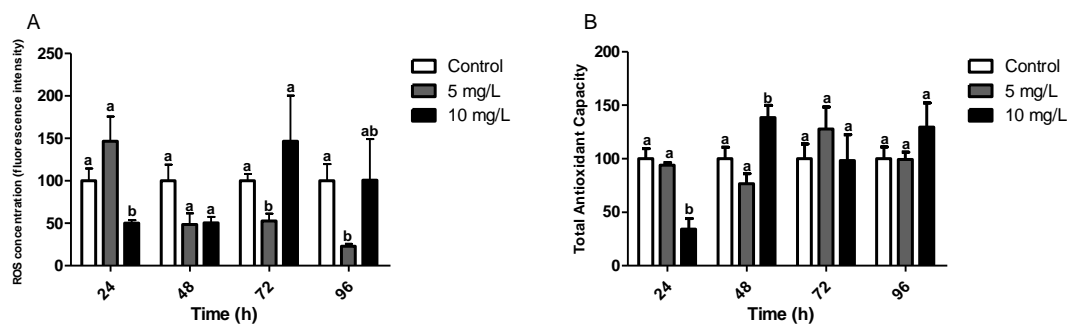


Fig. 2 Oxidative balance in livers from zebrafish exposed for 24, 48, 72 and 96h to Roundup® (0, 5 and 10 mg/L). A – Reactive Oxygen Species concentration (pools of 2 animals; n= 6 pools). B- Antioxidant Capacity Against Peroxyradicals (pools of 2 animals; n=4 pools). Values are expressed as means  $\pm$  standard error. Different letters indicates significant difference in each experimental time ( $p < 0.05$ ).

### 3.2. Gene Expression

The gene expression of *nrf2*, *cat*, *sod1*, *sod2*, *gclc* and *gpx* were evaluated in both gills (Figs. 3A and 3B) and liver (Figs. 3C and 3D) after 24 and 96 hours of Roundup exposure. In gills, after 24 hours, the *sod2* gene presented a reduction to 0.59 times in its expression compared to control group ( $p < 0.05$ ) (Fig 3A). After 96h of exposure, *gpx1a* presented significant difference in its expression ( $p < 0.05$ ), with a reduction of 81% in animals exposed to the lowest concentration (Fig. 3B). Concerning liver, it was not observed any significant difference after 24h of Roundup® exposure (Fig. 3C). However, after 96 hours, *gpx1a* presented a significant increment of 3.23 times in its expression in animals exposed to the highest concentration (Fig. 3D).

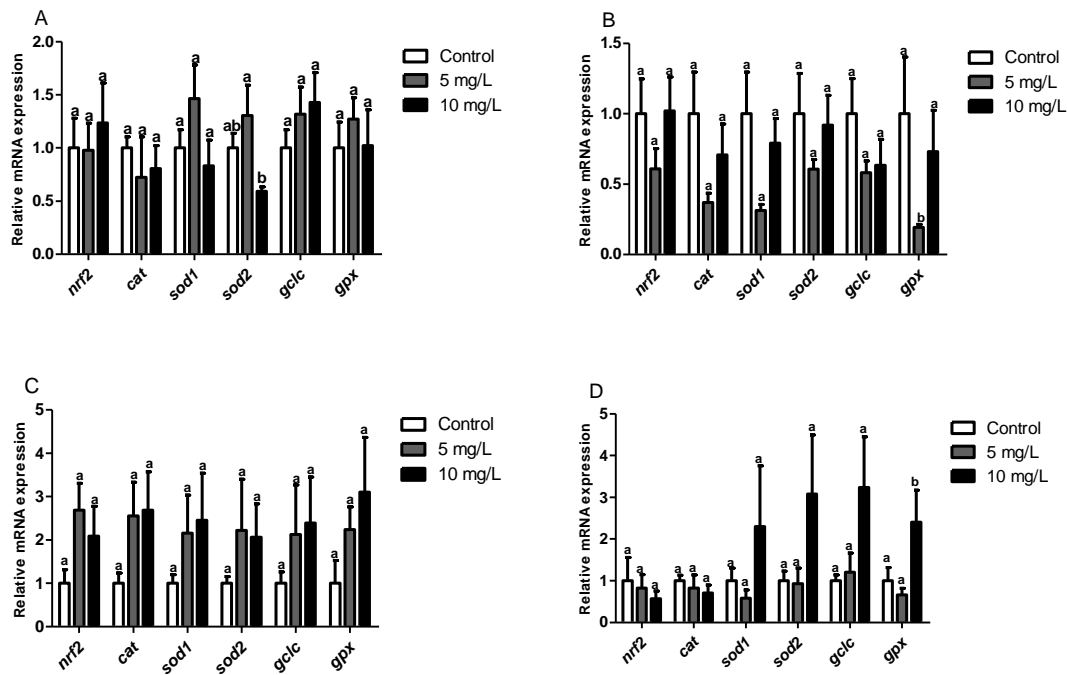


Fig. 3. The gene expression of *nrf2*, *cat*, *sod1*, *sod2*, *gclc* e *gpx* in zebrafish gills and liver after 24 and 96h of Roundup® exposure (0, 5 mg/L and 10 mg/L). A. Gill - 24h; B - Gill - 96h; C- Liver 24h; D - Liver 96h. The mean gene expression from control group was considered 1 (pools of 3 animals; n=5 pools). Values were expressed as means  $\pm$  standard error. Different letters indicates significant differences ( $p < 0.05$ ) in gene expression between groups.

Considering the three *gst* isoforms analyzed, only *gstp* presented significant differences. In gills from animals exposed to the highest concentration for 24 hours, a significant reduction of 0.39 times were observed compared with control group and animals exposed to the lowest concentration (Fig. 4A). In gill tissues of animals exposed to Roundup for 96h hours (Fig. 4B) and in liver from animals exposed to both experimental periods it was not observed any significant difference (Figs. 4C and 4D).

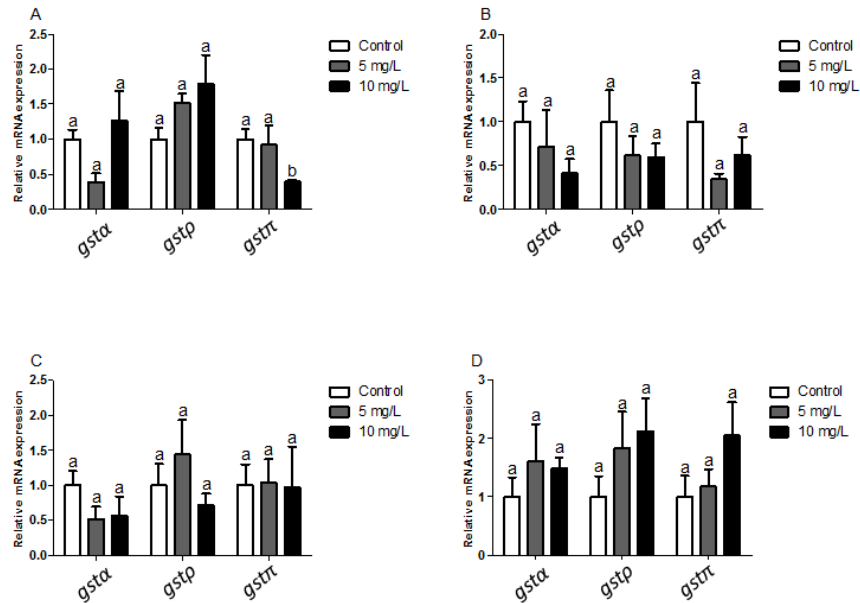


Fig. 4. The gene expression of *gsta*, *gstp*, *gstt* in zebrafish gills and liver after 24h and 96h of Roundup exposure (0 mg/L, 5mg/L e 10 mg/L). A. Gill - 24h; B - Gill - 96h; C- Liver 24h; D - Liver 96h. The mean gene expression from control group was considered 1. Values were expressed as means  $\pm$  standard error. Different letters indicates significant differences ( $p < 0.05$ ) in gene expression between groups.

Two uncoupling proteins gene expression were analyzed (*ucp1* and *ucp3*) and the results are presented in Figure 5. In fish gills, *ucp1* gene presented a significant alteration ( $p < 0.05$ ) in its expression after 24 hours of exposure to the highest concentration. In this group, the gene was 14 times more expressed than in control group and in animals exposed to the lowest concentration of Roundup® (Fig 5A). The other experimental time (Fig. 5B) and in the liver in both experimental periods (Fig. 5C and 5D) no other alteration was observed.

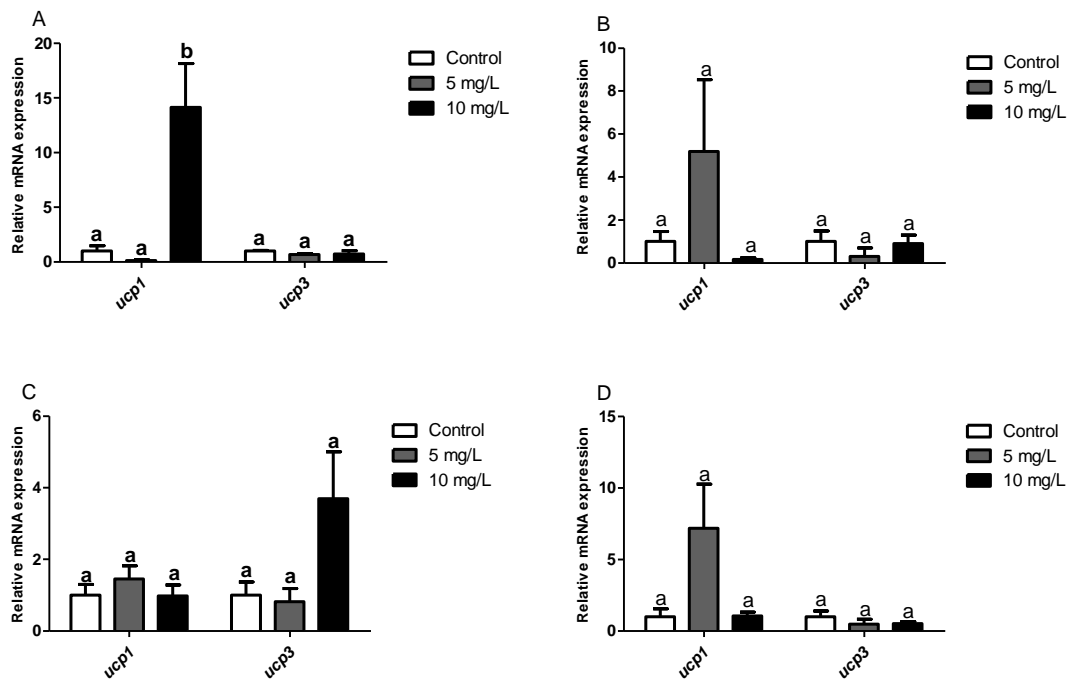


Fig. 5. The gene expression of *ucp1* and *ucp3* in zebrafish gills and liver after 24h and 96h of Roundup® exposure (0 mg/L, 5mg/L e 10 mg/L). A. Gill - 24h; B - Gill - 96h; C- Liver 24h; D - Liver 96h. The mean gene expression from control group was considered 1. Values were expressed as means  $\pm$  standard error. Different letters indicates significant differences ( $p < 0.05$ ) in gene expression between groups.

#### 4. Discussion

It has been previously described that Roundup® is an herbicide that can induces harmful effects on aquatic animals (Lushchak et al., 2009). Some studies have demonstrated that its toxicity mechanism is based on its capability to reduce the acetylcholinesterase enzyme activity (Modesto and Martinez, 2010a; Modesto and Martinez, 2010b; Gluszczak et al., 2006; Sandrini et al., 2013). Other studies demonstrated that the toxicity mechanism of Roundup® and other glyphosate-based herbicides is the generation of oxidative stress. These studies have demonstrated that this herbicide causes alteration in components of the antioxidant defense system, such as enzymes and low molecular weight substances as well as oxidative damage on biomolecules (Sinhorin et al., 2014; Lushchak et al., 2009; Menezes et al., 2011). However, a global analysis of ROS generation and the total antioxidant capacity after *in vivo* Roundup exposure are not available.

In the present study it was demonstrated that the Roundup® exposure causes an alteration of the antioxidant balance in zebrafish gills and liver. Liver, the main xenobiotics detoxification tissue, appears to be more sensitive and responsive than gills, since in each experimental time ROS and/or ACAP were observed significant differences. Other studies that investigate Roundup® effects in different fish tissues demonstrated that liver is responsive to Roundup® effects when compared with other tissues (Lushchak et al., 2009; Modesto and Martinez 2010a; Modesto and Martinez 2010b). This response is due to the fact that in liver the main enzymes in the xenobiotic detoxification are present and those molecules in some cases would be bioactivated to high toxic forms (Sancho et al., 1998). However, the detoxification of Roundup® ingredients is not well understood. By the other hand, gills are target of pollutants in water due to its function, anatomical localization and direct contact with external environment leading to the rapid absorption of contaminants in water, being a sensitive tissue too (Pandey et al., 2008).

The gills, as the main entrance for pollutants present in the water, would suffer with unbalance of oxidative status. ROS generation was not significantly altered, although a tendency to reduction was observed after 24 hours of exposure. By the other hand, ACAP presented a later response with a tendency to increase after 72 hours. This tendency was confirmed with a significant increment after 96 in animals exposed to the highest concentration. Harayashiki et al. (2013) also measured antioxidant capacity in gills of *Poecilia vivipara* exposed to lower concentrations (130 µg/L and 700 µg/L) than that employed in the present study. It was not observed any significant differences. However, it has to be considered the species-specific differences and the concentrations employed.

In liver, a reduction in ROS levels were observed after 24 hours of exposure in the highest concentration and only after 72 and 96 hours of exposure this reduction were observed in the lowest concentration. This shows a temporal response patterns between the two concentrations studied. At the highest Roundup® concentration, the ROS levels returns to control group values after 72 and 96 hours. In the lowest Roundup® concentration this return was not observed. This effect of reducing ROS levels would be associated to a mitochondrial dysfunction caused by Roundup, since mitochondrion is the main site for ROS production (Echtay, 2007). Peixoto et al. (2005) observed an uncoupling of oxidative phosphorylation in mitochondria exposed *in vitro* to

Roundup®. This effect was related to a non-specific mitochondrial membrane permeabilization, which in turns lead to effects on ROS generation.

Considering antioxidant capacity, it was observed a reduction in ACAP levels after exposure for 24 hours in the highest concentration with a consequent response of increment after 48hours. After this, the ACAP returns to levels similar to those observed in the control group. Modesto and Martinez (2010b) demonstrate that the fish *Prochilodus lineatus* exposed to Roundup transorb (1 and 5 mg/L), a commercial formulation with high glyphosate levels (48%), presented a reduction in the main components of the antioxidant defense system in livers in both concentrations. In this study, after 6 hours of exposure a significant reduction in SOD and GST activity was observed and after 24 hours of exposure a more prominent reduction was observed in GST and CAT activity as well as GSH levels. This data corroborates with our results of ACAP reduction after the initial exposure period. In fact, another aspect of the study of Modesto and Martinez (2010b) is that after an extended exposure period Roundup® causes an induction of GSH as a response to oxidative stress situation, corroborating with the induction of ACAP observed here. Sinhorin et al. (2014) also observed this pattern of response in other fish species *Pseudoplatystoma sp.* where an exposure to Roundup® caused a reduction in CAT and SOD activity and a posterior induction of GSH synthesis/recycling. This recuperation in terms of the antioxidant capacity in zebrafish liver would be related to non enzymatic antioxidant defense system, since previous works demonstrate that the fish liver enzymatic activities were in fact reduced after Roundup® exposure (Lushchak et al., 2009; Sinhorin et al., 2014; Menezes et al., 2011). This study comparison reinforces that a global evaluation, such as ACAP, presented an advantage to understand the status of the antioxidant defense system comparing to punctual evaluation of enzymatic activity.

Considering the liver oxidative balance, it was observed that after a Roundup® exposure a concomitant reduction in ROS levels and ACAP were observed. This significant reduction on ROS levels would alters cell redox state leading to disturbances of the antioxidant defense system of animals since ROS are important players on cell signaling (Thannickal and Fanburg 2000). However, after 48 hours of exposure, the ACAP levels increase significantly, although ROS levels remain reduced. Webster and colleagues (2015) showed, by transcriptome analysis, that Roundup® alters the expression of genes involved in cell cycle, apoptosis, hepatic metabolism, immune



response and antioxidant responses, demonstrating that Roundup would alter cell-signaling pathways.

Peixoto (2005) demonstrated that Roundup would interfere with mitochondrial bioenergetics, leading to a strong reduction of mitochondrial membrane potential, leading a loss of membrane selectivity. The same author stated that Roundup would interfere with succinate dehydrogenase and the protein complex succinate cytochrome c oxidase, suggesting that the herbicide would interfere with the electron transport chain inhibiting complexes II and III. Webster et al. (2015) also demonstrated an interference of Roundup® on the expression of genes related to components of the electron transport chain, such as *slc52a3* and *rfi2*, which codes to riboflavin transport proteins, an essential component of flavoproteins employed as electron acceptors. Taken together, this data clearly demonstrates that Roundup® interfere directly with mitochondrial processes. The described situation would cause disturbance on mitochondrial bioenergetics, ROS production, which in turns would affect antioxidant defense system.

In the present study, it was tested the hypothesis that alteration in oxidative balance in organisms can cause alteration in the gene expression profile of genes involved in the antioxidant response. To check this, the exposure periods of 24 and 96 hours were selected since they represent the exposure periods with the most prominent alterations in ACAP and ROS generation in both gills and liver. In both tissues it was not observed any difference in *nrf2* gene expression. This gene codes to Nrf2 transcription factor, and this protein controls and coordinates the expression of genes involved in cell defense such as detoxification enzymes and enzymes/proteins of the antioxidant defense system (Kaspar et al., 2009). This transcription factor would be activated as a consequence to the exposure to xenobiotics, UV radiation, among others, which in turns leads to its translocation to the nucleus and the ligation to the Antioxidant Responsive Element (ARE) and consequently the induction of transcription of antioxidant and detoxification enzymes (Nguyen et al., 2000). In the present study it was not observed any significant difference in *nrf2* in both tissues and experimental times of Roundup® exposure. However, the function of this protein is associated with its presence in cell rather than its gene expression, so the failure in cause *nrf2* expression does not mean that enzymes and proteins regulated by this transcription factor would not be regulated.

Considering antioxidant defense system, a reduction in *sod2* gene expression was observed in gills after 24 hours of exposure at the highest concentration. The protein isoform coded by this gene, Mn SOD, is located at the mitochondria, the main site for ROS production. This corroborates with the reduction of ROS levels, which in turn would be associated to a mitochondrial dysfunction caused by Roundup® (Peixoto, 2005).

Another antioxidant enzyme that presented alteration in its gene expression was GPx. This enzyme catalyzes the transformation of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> to H<sub>2</sub>O employing as a co-substrate a glutathione molecule (Hermes-Lima, 2004). In gills, a reduction in *gpx* expression was observed in the lowest Roundup® concentration employed and in liver an induction in the highest Roundup® concentration was observed. There is no data concerning alteration of *gpx* expression in other fish species exposed to Roundup or other glyphosate based herbicides. Considering its activity, Modesto and Martinez (2010b) observed that in *P. lineatus* the GPx activity was enhanced in liver of fish exposed to 5 mg/L Roundup®, corroborating with the present study. In this sense, Webster et al. (2015) demonstrated an induction of *gr* (glutathione peroxidase) gene expression in *Salmo trutta* exposed to Roundup® 0.5 mg/L. It is important to note that GR is an enzyme that recycles the tripeptide glutathione, which in turns acts as a GPx substrate. Based on these results, GPx would be considered a good marker when considering Roundup® exposure.

Concerning the profile of glutathione *S*-transferases isoforms, it was observed the expression of *gst1α*, *gstπ* and *gstρ* in both gills and liver from zebrafish. GSTs conjugates electrophilic substances, such as some xenobiotics and oxidative damage products, with the tripeptide glutathione became less toxic than the original compounds which in turns facilitates its excretion (Armstrong, 1997). Some studies evaluated the total GST activity after Roundup® exposure. In *P. lineatus*, GST activity was induced in liver of fish exposed to Roundup® (10 mg/L) for 24 and 96 hours (Modesto and Martinez, 2010b). In other study with the same species, the authors described an initial reduction of GST activity after 6 hours of exposure to Roundup® (Modesto and Martinez, 2010a). The same trend was observed to *Carassius auratus* exposed to Roundup® (2.5, 5, 10 and 20 mg/L) (Lushchak et al., 2009). These results corroborates with the reduction of *gstρ* observed for gills after Roundup® exposure to 24 hours.

Glisic et al. (2015) analyzed the family of GST enzymes in *Danio rerio* and its respective functions. The authors suggested that other isoforms not tested in the present study were more related to xenobiotics biotransformation, and other isoforms, such as *gstp*, are more involved in other physiological process, such as conjugation of lipid peroxidation products. This role is also attributed to other GST isoforms, such as those tested in the present study. Therefore, although it was not observed other differences in the GST gene expression in the present studies, other isoforms, more responsive for xenobiotic biotransformation process, could be altered after Roundup® exposure in zebrafish tissues.

Another aspect of oxidative balance is the control of ROS production at mitochondrial level. In this sense, uncoupling proteins (UCPs) are present in the inner mitochondrial membrane and uncouple the electron transport chain from the oxidative phosphorylation process (Boss et al., 1998). Five isoforms were described in mammals, with different degrees of identity, with different tissue distribution and functions (Sevensson et al., 2010). These proteins are involved in a series of physiological process, including non shivering thermogenesis, cell signaling and a more recent approach has suggested its function on the attenuation of ROS production at mitochondrial level with a consequent reduction of the oxidative stress situation (Brand and Esteves, 2005). Surprisingly, it was observed an expressive enhancement (14 times) of *ucp1* gene expression in zebrafish gills exposed to Roundup® for 24 hours at the highest concentration. This UCP isoform is classically associated to adaptative thermogenesis in mammal tissues (Nedergaard et al., 2001). However, the presence of this protein in fish and other animals that do not regulate its body temperature suggests another function (Hughes and Criscuolo, 2008). There is no data describing *ucp1* gene expression after xenobiotic exposure. However, the result observed in the present study would be related to the reduction in ROS levels after 24 hours of Roundup® exposure to the highest concentration.

## 5. Conclusion

The results of the present study demonstrated that the exposure to Roundup® leads to a disturbance in the oxidative balance of zebrafish gills and liver. This effect would characterize an alteration in the cell redox state, which in turns would cause disturbances in cellular signaling pathways related to antioxidant response. In addition to some studies that had related alteration in enzyme activities of several components of

the antioxidant defense system, the present study demonstrates that this disturbance caused by Roundup® exposure would lead to alteration of gene expression in components of this system. Also, Roundup® exposure would interfere with genes that were not classically involved in the antioxidant defense system, such as *ucp1*, which in turns would contribute to an indirect restoration of the oxidative balance.

### **Acknowledgements**

Robson R. Velasques, Fabio de Mello Tarouco and Amanda Silveira Guerreiro are graduate students fellow from the Brazilian agency CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior). The authors would like to thank the financial support the CNPq (Conselho Nacional de Pesquisa process 480919/2013-5) and National Institute of Science and Technology – Aquatic Toxicology (INCT-TA).

### **Cited Bibliography**

Almeida, F. S. 1992. Herbicidas Residuais em diferentes sistemas de preparo do solo. *Pesquisa Agropecuaria Brasileira*, 27: 595-601.

Amado, L. L., Garcia, M. L., Ramos, P. B., Freitas, R. F., Zafalon, B., Ferreira, J. L. R., Yunes, J. S. and Monserrat, J. M. 2009. A method to measure total antioxidant capacity against peroxy radicals in aquatic organisms: Application to evaluate microcystins toxicity. *Science of the Total Environment*, 407. 2115-2123.

Armstrong, R. N. 1997. Structure, Catalytic Mechanism, and Evolution of the Glutathione Transferases. *Chemical Research in Toxicology*, 10: 2-18.

Anedda, A., López-Bernardo, E., Acosta-Iborra, B., Suleiman, M. S., Landázuri, M. O. and Cadenas, S. 2013. The transcription factor Nrf2 promotes survival by enhancing the expression of uncoupling protein 3 under conditions of oxidative stress. *Free Radical Biology and Medicine*, 61: 395-407.

Bryan, H. K., Olayanju, A., Goldring, C. E. and Park, B. K. 2013. The Nrf2 cell defence pathway: Keap1-dependent and -independent mechanisms of regulation. *Biochemical Pharmacology*, 85: 705-717.

Boss, O., Muzzin, P. and Giacobino, J. 1998. The uncoupling proteins, a review. *European Journal of Endocrinology*, 139: 1-9.

Brand, M. D., Esteves, T. C. 2005. Physiological functions of the mitochondrial uncoupling proteins UCP2 and UCP3. *Cell Metabolism*, 2: 85-93

- Cavalcante, D. G. S. M., Martinez, C. B. R. and Sofia, S. H. 2008. Genotoxic effects of Roundup® on the fish *Prochilodus lineatus*. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 655: 41-46.
- de Menezes, C. C., da Fonseca, M. B., Loro, V. L., Santi, A., Cattaneo, R., Clasen, B., Pretto, A. and Morsch, V. M. 2011. Roundup Effects on Oxidative Stress Parameters and Recovery Pattern of *Rhamdia quelen*. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 60: 665-671.
- Echtay, K. S. 2007. Mitochondrial uncoupling proteins - What is their physiological role? *Free Radical Biology & Medicine*, 43: 1351-1371.
- Fan, J. Y., Geng, J. J., Ren, H. Q., Wang, X. R. and Han, C. 2013. Herbicide Roundup® and its main constituents cause oxidative stress and inhibit acetylcholinesterase in liver of *Carassius auratus*. *Journal of Environmental Science and Health, Part B*. 48: 844-850.
- Giesy, J. P., Dobson, S., Solomon, K. R. 2000. Ecotoxicological Risk Assessment for Roundup® Herbicide. *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology*, 167:35-120.
- Ghisi, N. e Cestari, M., M. 2013. Ecotoxicological Risk Assessment for Roundup® Herbicide. *Environmental Monitoring and Assessment*, 185: 3201-3207.
- Glisic, B., Mihaljevic, I., Popovic, M., Zaja, R., Loncar, J., Fent, K., Kovacevic, R. and Smital, T. 2015. Characterization of glutathione-S-transferases in zebrafish (*Danio rerio*). *Aquatic Toxicology*, 158: 50-62.
- Gluszczak, L., Miron, D. S. da Fonseca, M. B., Pedron, F. A., Duarte, M. F. and Vieira, V. L. P. 2006. Effect of glyphosate herbicide on acetylcholinesterase activity and metabolic and hematological parameters in piava (*Leporinus obtusidens*). *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 65: 237-241.
- Gluszczak, L., Miron, D. S., Moraes, B. S., Simões, R. R., Schetinger, M. R. C., Morsch, V. M. and Loro, V. L. 2007. Acute effects of glyphosate herbicide on metabolic and enzymatic parameters of silver catfish (*Rhamdia quelen*). *Comparative Biochemistry and Physiology, Part C*, 146: 519-524.
- Grisolia, C. K. 2002. A comparison between mouse and fish micronucleus test using cyclophosphamide, mitomycin C and various pesticides. *Mutation Research*, 518: 145-150.
- Guilherme, S., Santos, M.A., Gaivão, I., Barroso, C., Pacheco, M. 2012. Differential genotoxicity of Roundup formulation and its constituents in blood cells of fish (*Anguilla anguilla*): considerations on chemical interactions and DNA damaging mechanisms. *Ecotoxicology*, 21, 1381–1390
- Harayashik, C. A. Y., Junior, A. S. V., Machado, A. A. S., Cabrera, L. C., Primel, E. G., Bianchini, A. and Corcini, C. D. 2013. Toxic effects of the herbicide Roundup in the guppy *Poecilia vivipara* acclimated to fresh water. *Aquatic Toxicology*, 142-143: 176-184.

- Hermes-Lima, M., 2004. Oxygen in biology and biochemistry: role of free radicals. In: Storey, K.B. (Ed.), *Functional Metabolism: Regulation and Adaptation*. Hoboken, Wiley-Liss, pp. 319–368.
- Hughes, J., Criscuolo, F. 2008. Evolutionary history of the UCP gene family: gene duplication and selection. *BMC Evolutionary Biology*, 8: 308.
- Jiraungkoorskul, W., Upatham, E. S., Kruatrachue, M., Sahaphong, S., Vichasri-Grams, S. and Pokethitiyook, P. 2003. Biochemical and Histopathological Effects of Glyphosate Herbicide on Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Environmental toxicology*, 2003. 18: 260-267.
- Kaspar, J. W., Niture, S. K. and Jaiswal, A. K. 2009. Nrf2:INrf2 (Keap1) signaling in oxidative stress. *Free Radical Biology & Medicine*, 47: 1304-1309.
- LeBel, C. P., Ischiropoulos, H., Bondy, S. C. 1992. Evaluation of the Probe 2',7'-Dichlorofluorescein as an Indicator of Reactive Oxygen Species Formation and Oxidative Stress. *Chemical Research in Toxicology*, 5: 227-231.
- Levine, M., J. Pesticides: A Toxic Time Bomb in Our Midst. Ed. Westport Continuing, pp 199-201.
- Lopes, F. M., Junior, A. S. V., Corcini, C. D., da Silva, A. C., Guazzelli, V. G., Tavares, G. and da Rosa, C. E. 2014. Effect of glyphosate on the sperm quality of zebrafish *Danio rerio*. *Aquatic Toxicology*, 155: 322-326.
- 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.
- Mailloux, R. J., Harper, M. E. 2011. Uncoupling proteins and the control of mitochondrial reactive oxygen species production. *Free Radical Biology & Medicine*, 51: 1106-1115.
- Marchand, J., Tanguy, A., Charrier, G., Quiniou, L., Plee-Gauthier, E. and Laroche, J. 2006. Molecular Identification and Expression of Differentially Regulated Genes of the European Flounder, *Platichthys flesus*, Submitted to Pesticide Exposure. *Marine Biotechnology*, 8: 275-294.
- Modesto, K. A. and Martinez, C. B. R. 2010a. Roundup® causes oxidative stress in liver and inhibits acetylcholinesterase in muscle and brain of the fish *Prochilodus lineatus*. *Chemosphere*, 78: 294-299.
- Modesto, K. A. and Martinez, C. B. R. 2010b. Effects of Roundup Transorb on fish: Hematology, antioxidant defenses and acetylcholinesterase activity. *Chemosphere*, 81: 781-787.
- Monteiro, D. A., de Almeida, J. A., Rantin, F. T. and Kalinin, A. L. 2006. Oxidative stress biomarkers in the freshwater characid fish, *Brycon cephalus*, exposed to organophosphorus insecticide Folisuper 600 (methyl parathion). *Comparative Biochemistry and Physiology, Part C*, 143: 141-149.

- Navarro, C. D. C. and Martinez, C. B. R. 2014. Effects of the surfactant polyoxyethylene amine (POEA) on genotoxic, biochemical and physiological parameters of the freshwater teleost *Prochilodus lineatus*. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part C*, 165: 83-90.
- Nedergaard J., Golozoubova, V., Matthias, A., Asadi, A., Jacobsson, A. and Cannon, B. 2001. UCP1 : the only protein able to mediate adaptive non-shivering thermogenesis and metabolic inefficiency. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1504: 82-106.
- Neškovic, N. K., Poleksic, V., Elezovic, I., Karan, V. and Budimir, M. 1996. Biochemical and Histopathological Effects of Glyphosate on Carp, *Cyprinus carpio* L. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 56: 295-302.
- Nguyen, T., Nioi, P. and Pickett, C. B. 2009. The Nrf2-Antioxidant Response Element Signaling Pathway and Its Activation by Oxidative Stress. *The Journal of Biological Chemistry*, 284: 13291-13295.
- Nwani, C. D., Nagpure, N. S., Kumar, R., Kushwaha, B. and Lakra, W. S. DNA damage and oxidative stress modulatory effects of glyphosate-based herbicide in freshwater fish, *Channa punctatus*. 2013. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 36: 539-547.
- Pandey, S., Parvez, S., Sayeed, I., Haque, R., Bin-Hafeez, B. and Raisuddin, S. 2003. Biomarkers of oxidative stress: a comparative study of river Yamuna fish *Wallago attu* (Bl. & Schn.). *The Science of the Total Environment*, 309: 105-115.
- Peixoto, F. 2005. Comparative effects of the Roundup and glyphosate on mitochondrial oxidative phosphorylation. *Chemosphere*, 61: 1115–1122.
- Ruas, C. B. G., Carvalho, C. S., de Araújo, H. S. S., Espíndola, L. G. and Fernandes, M. N. 2008. Oxidative stress biomarkers of exposure in the blood of cichlid species from a metal-contaminated river. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 71: 86-93.
- Sancho, E., Ferrando, M. D. and Andreu, E. Liver Energy Metabolism of *Anguilla anguilla* after Exposure to Fenitrothion. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 41: 168-175.
- Sandrini, J. Z., Rola, R. C., Lopes, F. M., Buffon, H. F., Freitas, M. M., Martins, C. M. G. and da Rosa, C. E. 2013. Effects of glyphosate on cholinesterase activity of the mussel *Perna perna* and the fish *Danio rerio* and *Jenynsia multidentata*: In vitro studies. *Aquatic Toxicology*, 130-131: 171-173.
- Sevensson, O. L. 2010. Mitochondria: Structure, Functions and Dysfunctions. *ED. Nova Biomedical Book*. pp. 292-293.
- Sies, H. 1991. Oxidative Stress: From Basic Research to Clinical Application. *The American Journal of Medicine*, 91: S31-S38.
- Sinhorin, V. D. G., Sinhorin A. P., Teixeira, J. M. S., Miléski, M. L., Hansen, P. C., Moreira, P. S. A., Kawashita, N. H., Baviera, A. M. and Loro, V. L. 2014. Effects of the acute exposition to glyphosate-based herbicide on oxidative stress parameters and antioxidant responses in a hybrid Amazon fish surubim (*Pseudoplatystoma* sp.). *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 106: 181-187.

- Szarek, J., Siwicki, A., Andrzejewska, A., Terech-Majewska, E. and Banaszekiewicz, T. 2000. Effects of the herbicide Roundup™ on the ultrastructural pattern of hepatocytes in carp (*Cyprinus carpio*). *Marine Environmental Research*, 50: 263-266.
- Thannickal, V. J. and Fanburg, B. L. 2000. Reactive oxygen species in cell signaling. *American Journal of Physiology - Lung Cellular and Molecular Physiology*, 279: L1005-L1028.
- Tine, M., Kuhl, H., Jastroch, M., 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. *Evolutionary Biology*, 12: 62.
- Tseng, Y., Chen, R., Lucassen, M., Schmidt, M., Dringen, R., Abele, D., Hwang, P. 2010. Exploring Uncoupling Proteins and Antioxidant Mechanisms under Acute Cold Exposure in Brains of Fish. *PLoS ONE*, 6: 3.
- Tsui, M. T. K. and Chu, L. M. 2003. Aquatic toxicity of glyphosate-based formulations: comparison between different organisms and the effects of environmental factors. *Chemosphere*, 52: 1189-1197.
- Webster, T. M. U. and Santos, E. M. 2015. Global transcriptomic profiling demonstrates induction of oxidative stress and of compensatory cellular stress responses in brown trout exposed to glyphosate and Roundup. *BMC Genomics*, 16:32.
- Williams, G. M., Kroes, R. and Munro, I. 2000. Safety Evaluation and Risk Assessment of the Herbicide Roundup<sup>1</sup> and Its Active Ingredient, Glyphosate, for Humans. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 31: 117-165.



## Considerações Finais

Estudos prévios que mostram o efeito do Roundup® no sistema de defesa antioxidante de peixes abordam, na sua maioria, alterações na atividade de enzimas como SOD, CAT, GPx, GST, bem como o dano oxidativo causado em biomoléculas devido a um distúrbio desse sistema (Lushchak et al., 2009; Menezes et al., 2010; Modesto e Martinez, 2010a; Modesto e Martinez, 2010b). No entanto, alterações na geração de espécies reativas de oxigênio e capacidade antioxidante total, bem como o efeito na transcrição de componentes do sistema de defesa antioxidante não são ainda bem conhecidos.

No presente estudo, o Roundup demonstrou afetar o balanço oxidativo em brânquias e fígado de zebrafish (*Danio rerio*), visto que houve uma alteração tanto na produção de espécies reativas de oxigênio como na capacidade antioxidante total contra radicais peroxil nos tempos experimentais analisados. Essa alteração no balanço oxidativo em decorrência da exposição ao Roundup® mostrou relação com os trabalhos que relatam efeitos no sistema de defesa antioxidante enzimático e não-enzimático para outras espécies de peixe (Modesto e Martinez 2010b; Lushchak et al., 2009; Senhorin et al., 2014; Menezes et al., 2011). Isso mostra que distúrbios no balanço oxidativo podem estar relacionados com efeitos adversos causados em decorrência da exposição ao Roundup®.

Essa alteração do balanço oxidativo pode estar também influenciando o estado redox da célula, visto que a regulação da atuação do sistema de defesa antioxidante está diretamente associada com a sinalização redox celular (Thannickal e Fanburg 2000). No presente estudo não foi visto alteração na expressão de Nrf2, um importante fator de transcrição que regula a expressão de genes envolvidos na resposta antioxidante. Numa

situação onde não há alteração no estado redox na célula, Nrf2 está associado à outra proteína, keap1, a qual forma um dímero Nrf2-keap1, inibindo a sua atuação como fator de transcrição. Numa situação de alteração no estado redox, keap1 se desliga do Nrf2 fazendo com que este se direcione para o núcleo e se ligue ao elemento de resposta antioxidante, aumentando a transcrição gênica. Muitos trabalhos também mostram que Nrf2 é regulado através de mecanismos pós transcricionais como, por exemplo, atuação de quinases e fosfatases. Isso mostra que mesmo sem haver alteração na expressão de Nrf2 este pode estar atuando na regulação da expressão gênica (Bryan et al., 2013).

Segundo Marchand et al. (2006) mudanças na expressão gênica são importantes para a adaptação a alterações ambientais. No presente estudo foi visto que alteração do balanço oxidativo se refletiu também em mudanças no perfil de expressão de genes envolvidos na resposta antioxidante, tais como *sod2*, *gpx* e *gstp*. Também foi visto alteração na expressão de *ucp1*, um gene que não está diretamente relacionado com a resposta oxidante, porém, atua no desacoplamento da fosforilação oxidativa, o que pode estar relacionado com a diminuição da produção de espécies reativas de oxigênio. (Mailloux e Harper 2011).

A *gpx* apresentou diferenças significativas em ambos os tecidos após 96 horas de exposição em pelo menos uma das concentrações. No fígado, um aumento significativo da atividade de *gpx* foi observado na maior concentração. Não há dados na literatura mostrando alteração na expressão de *gpx* frente à exposição ao Roundup®. No entanto, Modesto e Martinez (2010a) observaram aumento da atividade de GPx após 24 e 96 horas de exposição à 5 mg/L de Roundup® no fígado de *Prochilodus lineatus*. Isso mostra que o Roundup® pode alterar não somente a atividade de GPx, mas também seu perfil de expressão gênica frente a exposição ao Roundup®.

Em relação a *sod2*, foi observada uma diminuição significativa da expressão na brânquia em 24 horas de exposição ao Roundup® na maior concentração. Alguns trabalhos mostram que o Roundup® reduz significativamente a atividade de SOD em outras espécies de peixes (Sinhorin et al., 2014; Modesto e Martinez 2010a; Modesto e Martinez 2010b, Lushchak et al., 2009). Para essa enzima também não há dados na literatura mostrando alteração da expressão gênica frente exposição ao Roundup®. No presente estudo, foi visto que o Roundup® também causa uma diminuição a nível transcricional para essa enzima. Também foi visto que dentre as isoformas analisadas, apenas a *sod2*, que está presente na matriz mitocondrial, teve sua expressão alterada, mostrando que o efeito do Roundup® pode estar mais relacionado com distúrbios a nível mitocondrial, visto que a isoforma citosólica não apresentou diferença na expressão.

As três isoformas de GST analisadas expressaram-se no fígado e brânquias de zebrafish. A *gstp* também apresentou um perfil de diminuição da expressão na brânquia após 24 horas de exposição ao Roundup® na maior concentração. Alguns trabalhos mostram alteração na atividade de GST após exposição ao Roundup® em peixes (Modesto e Martinez, 2010a; Modesto e Martinez, 2010b; Lushchak et al., 2009). No entanto, também não há trabalhos mostrando alteração na expressão gênica dessas enzimas após exposição ao Roundup®. Alguns trabalhos mostram diminuição da atividade das GSTs após exposição ao Roundup® em peixes, o que corrobora com a diminuição da expressão de *gstp* encontrada no presente estudo (Menezes et al., 2011; Modesto e Martinez, 2010; Lushchak, et al., 2009).

Na brânquia houve um aumento significativo de *ucp1* em 24 horas de exposição. Essa isoforma é classicamente relacionada à termogênese em mitocôndrias do tecido adiposo marrom de mamíferos, através da dissipação do calor pela força próton-motriz

(Argyropoulos e Harper, 2002). Em relação à diminuição de ERO na mitocôndria muitos trabalhos mostram que UCP2 e UCP3 são eficientes na redução dessas espécies, (Talbot et al., 2005; McLeod et al., 2005) principalmente a UCP2, onde tem sido demonstrado que sua ausência ou diminuição da expressão aumenta a produção de ERO (Onuma et al., 2005; Arsenijevic et al., 2000). No entanto, Dlasková et al. (2010) mostraram que UCP1 presente em mitocôndrias do tecido adiposo marrom também desempenha um papel importante na regulação da geração de ERO. Oelkrug et al. (2014), observaram em ratos submetidos a diferentes temperaturas uma correlação positiva entre a produção de espécies reativas de oxigênio e conteúdo de UCP1. Nesse mesmo trabalho também foi visto que o aumento do potencial de membrana mitocondrial está fortemente relacionado com o conteúdo de UCP1.

Em peixes, alguns estudos tem identificado a presença dessas proteínas em vários tecidos. Em *Cyprinus carpio*, Jastroch et al. (2007) identificaram a presença de UCP1 no fígado e cérebro, e em *Danio rerio*, Tseng et al. (2010) encontraram ampla distribuição tecidual das diferentes isoformas de UCPs. No entanto não se conhece nenhuma função atribuída a UCP1 em peixes, visto que esta isoforma está relacionada à termogênese, e de maneira geral, os peixes não regulam sua temperatura corporal. Alguns trabalhos tem mostrado indução de *ucp2* em *D. rerio* frente à exposição à atrazina (Jin, et al. 2010a, Jin et al, 2010b). No entanto, no presente estudo foi observado indução de *ucp1* após exposição ao Roundup®. Tendo em vista que alguns trabalhos sugerem que a UCP1 também participa do controle da geração de EAO em células do tecido adiposo marrom, em peixes essa isoforma pode também estar atuando na regulação dessas espécies frente à exposição a contaminantes.

Sendo assim o trabalho demonstrou que o Roundup® tem a capacidade de alterar o balanço oxidativo no peixe *Danio rerio*, influenciando respostas moleculares

envolvendo o sistema de defesa antioxidante desses animais, mostrando que esse herbicida pode alterar tanto parâmetros bioquímicos como moleculares envolvendo a resposta antioxidante.

A partir dos resultados observados no presente estudo, sugere-se que outras isoformas de GSTs, que não as citosólicas podem também estar sendo alteradas a nível transcricional frente à exposição ao Roundup®, principalmente as isoformas mitocondriais, tendo em vista o potencial do Roundup® em causar disfunções a nível mitocondrial. Portanto, sugere-se que a análise destas isoformas seja importante para elucidar os mecanismos de toxicidade do Roundup®.

Além disso, o aumento significativo na expressão de *ucp1* sugere o envolvimento dessa proteína na resposta dos animais frente à exposição ao Roundup®. Investigações ao nível de atividade, bem como análise da alteração na quantidade dessas proteínas após exposição ao Roundup® elucidaria o papel destas proteínas na resposta ao estresse causado pelo Roundup®.

Por fim uma análise de outros genes envolvidos na via de sinalização da resposta antioxidante como, por exemplo, *keap1*, poderia responder como o Roundup® pode levar a alterações transcricionais em genes relacionados à resposta antioxidante.

## **Bibliografia Geral**

- Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), 2010. Gestão 2005-2010. Principais realizações, first ed. Agência Nacional de Vigilância Sanitária, Brasília.
- Almeida, F. S. 1992. Herbicidas Residuais em diferentes sistemas de preparo do solo. *Pesquisa Agropecuaria Brasileira*. 27: 595-601.
- Amado, L. L., Garcia, M. L., Ramos, P. B., Freitas, R. F., Zafalon, B., Ferreira, J. L. R., Yunes, J. S. and Monserrat, J. M. 2009. A method to measure total antioxidant capacity against peroxy radicals in aquatic organisms: Application to evaluate microcystins toxicity. *Science of the Total Environment*. 407. 2115-2123.
- Amarante Junior, O. P., Santos, T. C. R. 2002. Glifosato: Propriedades, toxicidade, usos e legislação. 2002. *Química Nova*. 25: 589-593.
- Andrighetti, M. S., Nachtigall, G. R., Queiroz, S. C. N., Ferracini, V. L. and Ayub, M. A. Z. 2014. Biodegradação de Glifosato pela microbiota de solos cultivados com Macieira. *Revista Brasileira de Ciência do Solo*. 38: 1643-1653.
- Alonzo, H. G. A., Corrêa, C. L., 2008. Praguicidas. In: Oga, S., Camargo, M. M. A., Batistuzzo, J. A. O., 3ª ed. Atheneu Editora, São Paulo, p. 621-642.
- Arsenijevic, D., Onuma, H., Pecqueur, C., Raimbault, S., Manning, B. S., Miroux. B., Couplan, E., Alves-Guerra, M., Gubern, M., Surwit, R., Bouillaud, F., Richard, D., Collins, S. and Ricquier, D. 2000. *Nature*. 26: 435-439.
- Argyropoulos, G. and Harper, M. 2002 Molecular Biology of Thermoregulation Invited Review: Uncoupling proteins and thermoregulation. *American Physiological Society*. 92: 2187-2198.
- Armstrong, R. N. 1997. Structure, Catalytic Mechanism, and Evolution of the Glutathione Transferases. *Chemical Research in Toxicology*. 10: 2-18.
- Boss, O., Muzzin, P. and Giacobino, J. 1998. The uncoupling proteins, a review. *European Journal of Endocrinology*. 139: 1-9.

- Brand, M. D., Esteves, T. C. 2005. Physiological functions of the mitochondrial uncoupling proteins UCP2 and UCP3. *Cell Metabolism*, 2: 85-93.
- BRASIL, 1989. Presidência da República – Casa Civil, subchefia para Assuntos Jurídicos. Lei nº 7.802, de 11 de Julho de 1989.
- Bryan, H. K., Olayanju, A., Goldring, C. E. and Park, B. K. 2013. The Nrf2 cell defence pathway: Keap1-dependent and -independent mechanisms of regulation. *Biochemical Pharmacology*. 85: 705-717.
- Cavalcante, D. G. S. M., Martinez, C. B. R. and Sofia, S. H. 2008. Genotoxic effects of Roundup® on the fish *Prochilodus lineatus*. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*. 655: 41-46.
- CONAMA, 2005 Ministério do Meio Ambiente – Conselho Nacional do Meio Ambiente CONAMA Resolução N°357 de 17 de março de 2005.
- Costa, L. G., 2008. Toxic effects of pesticides. In: Casarett & Doulls, Toxicology: The Basic Science of Poisons, 7<sup>th</sup> ed. McGraw-Hill, New York, p. 911-917.
- 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. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1797: 1470-1476.
- Dicker, A. B., Ohlson, K. B., Johnson, L., Cannon, B., Lindahl, S. G., Nedergaard, J. 1995. Halothane Selectively Inhibits Nonshivering Thermogenesis. *Anesthesiology*, 82: 491-501.
- Echtay, K. S. 2007. Mitochondrial uncoupling proteins—What is their physiological role? *Free Radical Biology & Medicine*, 43: 1351-1371.
- Folmar, L.C., Sanders, H. O. and Julin, A. M. 1979. Toxicity of the herbicide glyphosate and several of its formulations to fish and aquatic invertebrates. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*. 8: 269-278.

- George, S. G. (1994) Enzymology and molecular biology of phase II xenobiotic-conjugating enzymes in fish. Em *Aquatic toxicology: molecular, biochemical, and cellular perspectives*. (Editado por D. C. Malins e G. K. Ostrander). *Lewis Publishers, CRC Press*. pp. 37-85.
- Giesy, J. P., Dobson, S., Solomon, K. R. 2000. Ecotoxicological Risk Assessment for Roundup® Herbicide. *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology*. 167:35-120.
- Ghisi, N. e Cestari, M., M. 2013. Ecotoxicological Risk Assessment for Roundup® Herbicide. *Environmental Monitoring and Assessment*. 185: 3201-3207.
- Glisic, B., Mihaljevic, I., Popovic, M., Zaja, R., Loncar, J., Fent, K., Kovacevic, R. and Smital, T. 2015. Characterization of glutathione-S-transferases in zebrafish (*Danio rerio*). *Aquatic Toxicology*. 158: 50-62.
- Gluszczak, L., Miron, D. S. da Fonseca, M. B., Pedron, F. A., Duarte, M. F. and Vieira, V. L. P. 2006. Effect of glyphosate herbicide on acetylcholinesterase activity and metabolic and hematological parameters in piava (*Leporinus obtusidens*). *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 65: 237-241.
- Gluszczak, L., Miron, D. S., Moraes, B. S., Simões, R. R., Schetinger, M. R. C., Morsch, V. M. and Loro, V. L. 2007. Acute effects of glyphosate herbicide on metabolic and enzymatic parameters of silver catfish (*Rhamdia quelen*). *Comparative Biochemistry and Physiology, Part C*. 146: 519-524.
- Grisolia, C. K. 2002. A comparison between mouse and fish micronucleus test using cyclophosphamide, mitomycin C and various pesticides. *Mutation Research*. 518: 145-150.
- Guilherme, S., Santos, M.A., Gaivão, I., Barroso, C., Pacheco, M. 2012. Differential genotoxicity of Roundup formulation and its constituents in blood cells of fish (*Anguilla*



*anguilla*): considerations on chemical interactions and DNA damaging mechanisms. *Ecotoxicology*. 21, 1381–1390

Grützmacher, D. D., Grützmacher, A. D., Agostinetto, D., Loeck, A. E., Roman, R., Roman, S. C. and Zanella, R. 2008. *Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental*. 12: 632-637.

Hayes, J. D. and Pulford, D. J. 1995. The Glutathione S-Transferase Supergene Family: Regulation of GST\* and the Contribution of the Isoenzymes to Cancer Chemoprotection and Drug Resistance. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*. 30: 445-600.

Hayes, J. D., Flanagan, J. U. and Jowsey, I. R. 2005. Glutathione Transferases *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*. 45: 51-88.

Hermes-Lima, M., 2004. Oxygen in Biology and Biochemistry: Role of Free Radicals. In: Storey, K.B., *Functional Metabolism: Regulation and Adaptation*, 1st ed., John Wiley & Sons, New York, p. 319-368.

Hughes, J., Criscuolo, F. 2008. Evolutionary history of the UCP gene family: gene duplication and selection. *BMC Evolutionary Biology*, 8: 308.

Itoh, K., Chiba, T., Takahashi, S., Ishii, T., Igarashi, K., Katoh, Y., Oyake, T., Hayashi, N., Satoh, K., Hatayama, I., Yamamoto, M. and Nabeshima, Y. 1997. An Nrf2/Small Maf Heterodimer Mediates the Induction of Phase II Detoxifying Enzyme Genes through Antioxidant Response Elements. *Biochemical and Biophysics Research Communications*. 236: 313-322.

Jastroch, M., Buckingham, J. A., Helwig, M., Klingenspor, M., Brand, M. D. 2007. Functional characterisation of UCP1 in the common carp: uncoupling activity in liver mitochondria and cold-induced expression in the brain. *Journal of Comparative Physiology B*, 177: 743-752.

- Jones, 2006. Redefining Oxidative Stress. *Antioxidants & Redox Signaling*. 8: 9-10.
- Jin, Y., Chen, R., Liu, W., Fu, Z. 2010a. Effect of endocrine disrupting chemicals on the transcription of genes related to the innate immune system in the early developmental stage of zebrafish (*Danio rerio*). *Fish & Shellfish Immunology*, 28: 854-861.
- Jin, Y., Zhang, X., Shu, L., Chen, L., Sun, L., Qian, W. L., Liu, W. and Fu, F. 2010. Oxidative stress response and gene expression with atrazine exposure in adult female zebrafish (*Danio rerio*). *Chemosphere*. 78: 846-852.
- Jiraungkoorskul, W., Upatham, E. S., Kruatrachue, M., Sahaphong, S., Vichasri-Grams, S. and Pokethitiyook, P. 2003. Biochemical and Histopathological Effects of Glyphosate Herbicide on Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Environmental toxicology*. 2003. 18: 260-267.
- Kaspar, J. W., Niture, S. K. and Jaiswal, A. K. 2009. Nrf2:INrf2 (Keap1) signaling in oxidative stress. *Free Radical Biology & Medicine*. 47: 1304-1309.
- Klaassen, C., 2008. Casarety Doull Casarett & Doulls, Toxicology: The Basic Science of Poisons, 7th ed. McGraw-Hill, New York, p. 911-917.
- Kobayashi and Yamamoto. 2005. Molecular Mechanisms Activating the Nrf2-Keap1 Pathway of Antioxidant Gene Regulation. *Antioxidants & Redox Signaling*. 7: 3-4.
- LeBel, C. P., Ischiropoulos, H., Bondy, S. C. 1992. Evaluation of the Probe 2',7'-Dichlorofluorescein as an Indicator of Reactive Oxygen Species Formation and Oxidative Stress. *Chemical Research in Toxicology*, 5: 227-231.
- Lopes, F. M., Junior, A. S. V., Corcini, C. D., da Silva, A. C., Guazzelli, V. G., Tavares, G. and da Rosa, C. E. 2014. Effect of glyphosate on the sperm quality of zebrafish *Danio rerio*. *Aquatic Toxicology*. 155: 322-326.

- 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.
- Lushchak, V. I. 2011. Environmentally induced oxidative stress in aquatic animals. *Aquatic Toxicology*. 101: 13-30
- Mailloux, R. J., Harper, M. E. 2011. Uncoupling proteins and the control of mitochondrial reactive oxygen species production. *Free Radical Biology & Medicine*. 51: 1106-1115.
- Maraschin L., 2003. Avaliação do grau de contaminação por pesticidas na água dos principais rios formadores do pantanal mato-grossense. Dissertação apresentada ao Programa de Pós Graduação em Saúde e Ambiente do Instituto de Saúde Coletiva da Universidade Federal de Mato Grosso.
- Marchand, J., Tanguy, A., Charrier, G., Quiniou, L., Plee-Gauthier, E. and Laroche, J. 2006. Molecular Identification and Expression of Differentially Regulated Genes of the European Flounder, *Platichthys flesus*, Submitted to Pesticide Exposure. *Marine Biotechnology*. 8: 275-294.
- McLeod, C. J., Aziz, A., Hoyt, R. F., McCoy, J. P. and Sack, M. N. 2005. Uncoupling Proteins 2 and 3 Function in Concert to Augment Tolerance to Cardiac Ischemia\*. *The Journal of Biological Chemistry*. 280: 33470-33476.
- Menezes, C. C., da Fonseca, M. B., Loro, V. L., Santi, A., Cattaneo, R., Clasen, B., Pretto, A. and Morsch, V. M. 2011. Roundup Effects on Oxidative Stress Parameters and Recovery Pattern of *Rhamdia quelen*. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*. 60: 665-671.

- Modesto, K. A. and Martinez, C. B. R. 2010a. Roundup® causes oxidative stress in liver and inhibits acetylcholinesterase in muscle and brain of the fish *Prochilodus lineatus*. *Chemosphere*. 78: 294-299.
- Modesto, K. A. and Martinez, C. B. R. 2010b. Effects of Roundup Transorb on fish: Hematology, antioxidant defenses and acetylcholinesterase activity. *Chemosphere*. 81: 781-787.
- Monteiro, D. A., de Almeida, J. A., Rantin, F. T. and Kalinin, A. L. 2006. Oxidative stress biomarkers in the freshwater characid fish, *Brycon cephalus*, exposed to organophosphorus insecticide Folisuper 600 (methyl parathion). *Comparative Biochemistry and Physiology, Part C*. 143: 141-149.
- Mitchell, D. G., Chapman, P. M. and Long, T. L. 1987. Acute Toxicity of Roundup® and Rodeo| Herbicides to Rainbow Trout, Chinook, and Coho Salmon. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*. 39: 1028-1035.
- Nguyen, T., Sherratt, P. J. and Pickett, C. B. 2003. Regulatory mechanisms controlling gene expression mediated by the antioxidant response element. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*. 43: 233-60.
- Navarro, C. D. C. and Martinez, C. B. R. 2014. Effects of the surfactant polyoxyethylene amine (POEA) on genotoxic, biochemical and physiological parameters of the freshwater teleost *Prochilodus lineatus*. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part C*. 165: 83-90.
- Nedergaard J., Golozoubova, V., Matthias, A., Asadi, A., Jacobsson, A. and Cannon, B. 2001. UCP1 : the only protein able to mediate adaptive non-shivering thermogenesis and metabolic inefficiency. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1504: 82-106.

- Neškovic, N. K., Poleksic, V., Elezovic, I., Karan, V. and Budimir, M. 1996. Biochemical and Histopathological Effects of Glyphosate on Carp, *Cyprinus carpio* L. Bulletin of *Environmental Contamination and Toxicology*. 56: 295-302.
- Nwani, C. D., Nagpure, N. S., Kumar, R., Kushwaha, B. and Lakra, W. S. DNA damage and oxidative stress modulatory effects of glyphosate-based herbicide in freshwater fish, *Channa punctatus*. 2013. *Environmental Toxicology and Pharmacology*. 36: 539-547.
- Oelkrug R., Goetze, N., Meyer, C. W. and Jastroch, M. 2014. *Free Radical Biology and Medicine*. 77: 2010-2016.
- Onuma, Y. B. H., Bai, X., Medvedev, A. V., Misukonis, M., Weinberg, J. B., Cao, W., Robidoux, J., Floering, L. M., Daniel, K. W. and Collins, S. 2005. Persistent Nuclear Factor- $\kappa$ B Activation in Ucp2  $-/-$  Mice Leads to Enhanced Nitric Oxide and Inflammatory Cytokine Production\*. *The Journal of Biological Chemistry*. 280: 19062-19069.
- Peres, F. e Moreira, J. C. 2007. Saúde e ambiente em sua relação com o consumo de agrotóxicos em um pólo agrícola do Estado do Rio de Janeiro, Brasil. *Cadernos de Saúde Pública*. 4: S612-S621.
- Peixoto, F. 2005. Comparative effects of the Roundup and glyphosate on mitochondrial oxidative phosphorylation. *Chemosphere*. 61: 1115–1122.
- Ruas, C. B. G., Carvalho, C. S., de Araújo, H. S. S., Espíndola, L. G. and Fernandes, M. N. 2008. Oxidative stress biomarkers of exposure in the blood of cichlid species from a metal-contaminated river. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 71: 86-93.
- Sandrini, J. Z., Rola, R. C., Lopes, F. M., Buffon, H. F., Freitas, M. M., Martins, C. M. G. and da Rosa, C. E. 2013. Effects of glyphosate on cholinesterase activity of the mussel *Perna perna* and the fish *Danio rerio* and *Jenynsia multidentata*: In vitro studies. *Aquatic Toxicology*. 130-131: 171-173.

Scandalios, 2005. Oxidative stress: molecular perception and transduction of signals triggering antioxidant gene defenses. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*. 38: 995-1014.

Soso, A. B., Barcellos, L. J. G., Ranzani-Paiva, M. J., Kreutz, L. C., Quevedo, R. M., Anziliero, D., Lima, M., da Silva, L. B., Ritter, F., Bedin, A. C. and Finco, J. A. 2007. Chronic exposure to sub-lethal concentration of a glyphosate-based herbicide alters hormone profiles and affects reproduction of female Jundiá (*Rhamdia quelen*). *Environmental Toxicology and Pharmacology*. 23: 308-313.

Servizi, J. A., Gordon, R. W. and Martens, D. W. 1987. Acute Toxicity of Garlon 4 and Roundup Herbicides to Salmon, *Daphnia*, and Trout. *Bulletin of Environmental Contamination Toxicology*. 39: 15-22.

Sevensson, O. L. 2010. Mitochondria: Structure, Functions and Dysfunctions. *ED. Nova Biomedical Book*. pp. 292-293.

Sies, H. 1991. Oxidative Stress: From Basic Research to Clinical Application. *The American Journal of Medicine*. 91: S31-S38.

Sinhorin, V. D. G., Sinhorin A. P., Teixeira, J. M. S., Miléski, M. L., Hansen, P. C., Moreira, P. S. A., Kawashita, N. H., Baviera, A. M. and Loro, V. L. 2014. Effects of the acute exposition to glyphosate-based herbicide on oxidative stress parameters and antioxidant responses in a hybrid Amazon fish surubim (*Pseudoplatystoma sp*). *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 106: 181-187.

Szarek, J., Siwicki, A., Andrzejewska, A., Terech-Majewska, E. and Banaszkiwicz, T. 2000. Effects of the herbicide Roundup™ on the ultrastructural pattern of hepatocytes in carp (*Cyprinus carpio*). *Marine Environmental Research*. 50: 263-266.

- Talbot, D. A. and Brand, M. D. Uncoupling protein 3 protects aconitase against inactivation in isolated skeletal muscle mitochondria. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1709: 150-156.
- Thannickal, V. J. and Fanburg, B. L. 2000. Reactive oxygen species in cell signaling. *American Journal of Physiology - Lung Cellular and Molecular Physiology*. 279: L1005-L1028.
- Tseng, Y., Chen, R., Lucassen, M., Schmidt, M., Dringen, R., Abele, D., Hwang, P. 2010. Exploring Uncoupling Proteins and Antioxidant Mechanisms under Acute Cold Exposure in Brains of Fish. *PLoS ONE*, 6: 3.
- Tine, M., Kuhl, H., Jastroch, M., 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. *Evolutionary Biology*. 12: 62.
- Tsui, M. T. K. and Chu, L. M. 2003. Aquatic toxicity of glyphosate-based formulations: comparison between different organisms and the effects of environmental factors. *Chemosphere*. 52: 1189-1197.
- Wan, M. T., Watts, R. G. and Moul, D. J. 1989. Effects of Different Dilution Water Types on the Acute Toxicity to Juvenile Pacific Salmonids and Rainbow Trout of Glyphosate and Its Formulated Products. *Bulletin of Environmental Contamination Toxicology*. 43: 378-385.
- Webster, T. M. U., Florance, L. V. L. H. and Santos, E. M. 2014. Effects of Glyphosate and its Formulation, Roundup, on Reproduction in Zebrafish (*Danio rerio*). *Environmental Science & Technology*. 48: 1271-1279.

Webster, T. M. U. and Santos, E. M. 2015. Global transcriptomic profiling demonstrates induction of oxidative stress and of compensatory cellular stress responses in brown trout exposed to glyphosate and Roundup. *BMC Genomics*. 16:32.

Williams, G. M., Kroes, R. and Munro, I. 2000. Safety Evaluation and Risk Assessment of the Herbicide Roundup<sup>1</sup> and Its Active Ingredient, Glyphosate, for Humans. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*. 31: 117-165.