

PUCRS

FACULDADE DE FARMÁCIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA FARMACÊUTICA
MESTRADO PROFISSIONAL EM BIOTECNOLOGIA FARMACÊUTICA

DAIANE BRIDI

**EFEITO DA EXPOSIÇÃO AO GLIFOSATO SOBRE PARÂMETROS COMPORTAMENTAIS EM
PEIXE-ZEBRA (*Danio rerio*)**

Porto Alegre
2017

PÓS-GRADUAÇÃO - *STRICTO SENSU*



Pontifícia Universidade Católica
do Rio Grande do Sul

DAIANE BRIDI

Efeitos da exposição ao glifosato sobre parâmetros comportamentais em peixe-zebra (*Danio rerio*)

Dissertação apresentada como requisito para a obtenção do grau de Mestre ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia Farmacêutica da Faculdade de Farmácia da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul.

Orientadora: Prof^{ta}. Dr^a. Carla Denise Bonan

Porto Alegre

2017

Aos meus pais e eternos incentivadores, Ivanir e Antonio.

Ao melhor amigo e marido, Igor.

AGRADECIMENTOS

Início meu agradecimento por DEUS, já que Ele colocou pessoas tão especiais ao meu lado, sem as quais certamente eu não teria dado conta!

Agradeço a minha orientadora Profa Dra Carla Denise Bonan, por sua paciência infinita, por ter aberto as portas do laboratório e me dado a oportunidade de desenvolver este trabalho. Obrigada pela dedicação e, principalmente, pela compreensão dos meus horários malucos.

Aos colegas do laboratório pelas risadas, discussões, palavras de carinho, por ouvirem minhas bobagens, pelos bons momentos com café e trocas de ideias. Vocês fizeram os meus dias mais felizes e divertidos. Foi muito bom dividir este tempo com vocês. Vocês são incríveis!

Agradeço, especialmente, aos meus colegas Stefani Altenhofen e Jonas Brum Gonzalez por todo o tempo dedicado na concretização deste trabalho, pelo companheirismo e paciência. Obrigada pela essencial ajuda nas longas horas de experimento, na análise de cada resultado, na construção de cada gráfico.

Um grande agradecimento é direcionado aos meus pais Antonio e Ivanir, que me incentivam a continuar meus estudos e buscar meus sonhos.

Agradeço ao meu marido Igor pelo companheirismo constante e por estar sempre tão presente, por compreender a minha ausência, a impaciência e o cansaço. Por me acalmar em vários momentos e por sempre oferecer sua ajuda, mesmo entendendo nada sobre o assunto.

A todas as pessoas que contribuíram para que eu chegasse até aqui.

“Devemos ser a mudança que queremos ver no mundo”

M. Gandhi

RESUMO

O glifosato tornou-se o herbicida mais utilizado no mundo, devido à adoção ampla de culturas resistentes, após sua introdução em 1996. O glifosato pode ser usado sozinho, mas é comumente utilizado como ingrediente ativo do herbicida Roundup[®]. Este herbicida contém vários adjuvantes, tal como a Polioxietilenamida (POEA), que podem promover uma toxicidade desconhecida. O peixe-zebra está ganhando popularidade na pesquisa comportamental, devido à similaridade fisiológica com os mamíferos, facilidade de manipulação, baixo custo, fertilização externa, transparência de embriões nos estágios larvais e desenvolvimento rápido. O objetivo deste estudo foi avaliar os efeitos do glifosato e do Roundup[®] sobre parâmetros comportamentais e morfológicos em peixe-zebra no estágio larval e adulto. As larvas com 3 dias pós-fertilização (dpf) e adultos foram expostos ao glifosato (0,01, 0,065 e 0,5 mg/L) e Roundup[®] (0,01, 0,065 e 0,5 mg/L) por 96 horas. Imediatamente após o tratamento, realizamos a análise de parâmetros comportamentais, como atividade locomotora, comportamento aversivo e morfologia para larvas e locomoção, comportamento agressivo e memória aversiva para adultos. Nas larvas houveram diferenças significativas na atividade locomotora e comportamento aversivo nos animais tratados com glifosato e Roundup[®] quando comparado ao controle. Foi observada uma diminuição na distância percorrida e na resposta aversiva nas larvas expostas ao glifosato e Roundup[®]. Observou-se uma diminuição significativa no comprimento corporal das larvas expostas ao Roundup[®] em todas as concentrações testadas. Nossos resultados demonstraram que a exposição ao glifosato ou Roundup[®] reduziu a distância percorrida, a velocidade média e o número de cruzamentos na maior concentração de glifosato (0,5mg/L) e 0,065 e 0,5mg/L de Roundup[®] em animais adultos. Verificamos que peixe-zebra adulto tratado com Roundup[®] apresentou um comprometimento significativo na memória. Nossos resultados demonstraram que o glifosato e o Roundup[®] tiveram efeito sobre o comportamento agressivo. Assim, nossos achados demonstraram que os efeitos das formas isoladas e comerciais de glifosato promoveram diferenças na locomoção, comportamento e morfologia do animal tratado, sugerindo mecanismos semelhantes de toxicidade e resposta celular.

Palavras chaves: *Danio rerio*, glifosato, peixe-zebra, Roundup[®], toxicidade

ABSTRACT

Glyphosate has become the most widely used herbicide in the world, due to the wide scale adoption of resistant crops, after its introduction in 1996. Glyphosate can be used alone, but is commonly used as an active ingredient of the Roundup[®] herbicide. This herbicide contains several adjuvants in addition to glyphosate, which may promote an unknown e.g. toxicity Polioxietilenamida (POEA). Zebrafish is gaining popularity in behavioral research, because of its physiological similarity to mammals, ease of manipulation, robust performance, low cost, external fertilization, transparency of embryos larval stages and rapid development. The aim of this study was to evaluate the effects of glyphosate and Roundup[®] on behavioral and morphological parameters in zebrafish larvae and adult. Zebrafish larvae at 3 days post-fertilization (dpf) and adults were exposed to glyphosate (0.01, 0.065, and 0.5 mg/L) and Roundup[®] (0.01, 0.065, and 0.5 mg/L) for 96 hours. Immediately after the treatment, behavioral parameters such as locomotor activity and aversive behavior and morphology for the larvae and locomotion, aggressive behavior and memory for the adults were analyzed. Zebrafish larvae, the results indicated that there were significant differences in the locomotor activity and aversive behavior by glyphosate and Roundup[®] when compared to the control. However, there was a decrease in distance traveled and the time spent in zone without stimulation for exposed larvae at doses of glyphosate and Roundup[®]. A significant decrease in body length was observed for larvae exposed to Roundup[®] in all concentrations tested. Our findings demonstrated that glyphosate and Roundup[®] exposure reduced the distance traveled, the mean speed and the line crossings in the highest concentration of glyphosate (0.5 mg / L) and 0.065 and 0.5mg/L Roundup[®] in animals adults. We verified that Roundup[®]-treated adult zebrafish showed a significant impairment in memory. Our results showed that glyphosate and Roundup[®] had an effect on aggressive behavior. Our findings demonstrated that the effects of isolated and commercial forms of glyphosate promoted differences on locomotion, behavior and morphology of the treated animal, suggesting similar mechanisms of toxicity and cellular response.

Keywords: *Danio rerio*, glyphosate, Roundup[®], toxicity, zebrafish.

LISTA DE ABREVIATURAS

ADP: adenosina 5'-difosfato

ANVISA: Agência Nacional de Vigilância Sanitária

CL: Concentração letal

DL: Dose letal

EPA: Agência de proteção ambiental dos Estados Unidos

EPSP: 5-enolpiruvilchiquimato-3-fosfato-sintase

nM: nano molar

OC: Organoclorados

OF: Organofosforados

OMS: Organização mundial da Saúde

POEA: Polioxietilenamida

PPM: Partes por milhão

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Fórmula estrutural do herbicida glifosato.....	14
Figura 2. Peixe-zebra.....	17

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	11
1.1. TOXICIDADE POR AGROTÓXICOS	11
1.2. GLIFOSATO.....	14
1.3 PEIXE-ZEBRA.....	17
1.3.1 PEIXE-ZEBRA EM ENSAIOS DE TOXICOLOGIA.....	18
1.3.2 PEIXE-ZEBRA EM ENSAIOS COMPORTAMENTAIS.....	19
2 OBJETIVOS	22
2.1. OBJETIVO GERAL	22
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	22
3 RESULTADOS.....	23
CAPÍTULO I	23
<i>Glyphosate and Roundup[®] alter morphology and behavior in zebrafish.....</i>	<i>25</i>
4 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	50
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	56
ANEXOS.....	69

1 INTRODUÇÃO

1.1 TOXICIDADE POR AGROTÓXICOS

Os agrotóxicos são largamente utilizados para o controle de pragas ou doenças causadas por elas. A Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos (EPA) estima que cerca de 75% dos lares americanos usam agrotóxicos frequentemente, e, no total, mais de 1 bilhão de toneladas de produtos pesticidas são utilizados anualmente no comércio e na agricultura (EPA, 2010). De acordo com a Organização Mundial da Saúde, os países em desenvolvimento consomem 20% de todo o agrotóxico produzido no mundo (Meyer et al., 2013).

No Brasil essa questão adquire dimensão de forte impacto no que diz respeito à Saúde Pública, uma vez que o país é atualmente o maior consumidor mundial de agrotóxicos, respondendo, na América Latina, por 86% dos produtos. Dados mostram que o mercado de agrotóxicos movimentou R\$ 7 bilhões no país, mais que o dobro da quantia registrada em 2003 (IBGE, 2010).

O mercado brasileiro de agrotóxicos expandiu rapidamente na última década (190%) num ritmo de crescimento maior que o dobro do apresentado pelo mercado global (93%), o que coloca o Brasil em primeiro lugar no *ranking* mundial de uso, desde 2008. Segundo a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA, 2013), na safra 2010/2011, o consumo foi de 936 mil toneladas, movimentando US\$ 8,5 bilhões entre dez empresas que controlam 75% deste mercado no país. A liberação do cultivo a partir de sementes transgênicas e sua difusão nas áreas agrícolas estão associadas ao aumento do consumo, tendo em vista o uso intenso de herbicidas, responsáveis por 45% do volume consumido, seguidos pelos fungicidas (14%) e inseticidas (12%).

Baseado no alvo de ação, os agrotóxicos podem ser classificados como: herbicidas, inseticidas, fungicidas, bactericidas e raticidas. Considerando as propriedades químicas desses compostos, eles podem ser classificados como: organoclorados (OC), organofosforados (OF), carbamatos, ditiocarbamatos, piretróides, triazinas, amidas e cumarínicos (Ye et al, 2013).

Existem critérios estabelecidos pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária-ANVISA para determinar a classificação toxicológica dos agrotóxicos que, através de dados validados, possuam atividade teratogênica, carcinogênica ou mutagênica. A classificação toxicológica destes produtos leva em consideração a CL 50 e a DL 50 oral, inalatória e dérmica, ou seja, a Concentração Letal (CL) e a Dose Letal (DL), dadas em miligramas por quilo de peso corporal, necessários para matar 50% dos roedores expostos ao agrotóxico. Essa classificação está estabelecida da seguinte forma: Classe I (extremamente tóxico); Classe II (altamente tóxico); Classe III (medianamente tóxico); Classe IV (pouco tóxico) (ANVISA).

Apesar da popularidade e ampla utilização, sérias preocupações têm sido levantadas sobre os riscos à saúde causados por estes produtos. Sugeng et al. (2013) e Burns et al. (2013), relatam que a exposição crônica a agrotóxicos é um grave problema de saúde ambiental em comunidades agrícolas. Câncer, problemas no sistema endócrino e que envolvem a reprodução e o desenvolvimento estão entre os eventos mais comuns (Burns et al. 2013).

Além da contaminação por exposição direta, Muthappa et al. (2014), relata que a contaminação ambiental por agrotóxicos está entre as ameaças mais importantes para a biodiversidade em paisagens agrícolas. A utilização generalizada combinada com o excesso do produto durante as aplicações, pode acarretar em derrames acidentais, mau descarte e escoamento topográfico de áreas cultivadas, resultando na presença dos seus

resíduos em várias matrizes ambientais, especialmente nas águas de superfície (Stamatis et al., 2013).

As pessoas podem, portanto, estar expostas a níveis excessivos de agrotóxicos no trabalho por meio do alimento, solo, água ou ar. Com a contaminação de águas subterrâneas, lagos, rios e outros corpos de água, os agrotóxicos podem ainda poluir os suprimentos de água potável, peixes e outras fontes muitas vezes vitais para o bem-estar humano (Murray et al., 2014). Estudos realizados em distintos estados do Brasil têm detectado a presença de agrotóxicos no leite materno (OMS, 2016; Sarcinelli et al., 2013), assim como apontado a possibilidade de ocorrência de anomalias congênitas relacionadas ao uso de agrotóxicos. A exposição crônica a agrotóxicos (exposição por longos períodos) pode desencadear o desenvolvimento de doenças tanto em trabalhadores quanto na população exposta a estes compostos, seja no ambiente, ou através da alimentação (Murray et al., 2014).

Embora existam práticas de gestão da poluição no ponto de origem, muito pouco progresso está sendo alcançado no combate à poluição difusa, especialmente das águas superficiais. O escoamento é a principal forma de contaminação dos pesticidas que se deslocam de campos agrícolas para as águas de superfície (Richards e Baker, 1993). Vários fatores, como a topografia do terreno, o clima da área, as características do solo, as práticas agrícolas, e as propriedades químicas e ambientais dos pesticidas favorecem o transporte para os ambientes aquáticos (Larson et al, 1995).

1.2 GLIFOSATO

O glifosato é um herbicida pós-emergente, classe IV, não-seletivo e de ação sistêmica. Possui a fórmula molecular $C_3H_8NO_5P$, cujas propriedades químicas possibilitam que se solubilize facilmente em ambientes aquáticos (Baird e Cann, 2005). Ele é um amino-fosfonato análogo ao aminoácido natural glicina, pertence ao grupo químico dos aminoácidos fosfonados e tal como seu precursor, a glicina, apresenta comportamento zwitteriônico, com separação de duas cargas em pH neutro, uma positiva no grupo amino e uma negativa no grupo fosfonato (Jayasumana et al., 2014). A fórmula estrutural do glifosato é mostrada na figura 1:

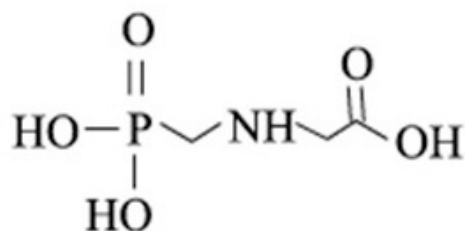


Figura 1. Fórmula estrutural do herbicida glifosato (Amarante et al, 2002)

Seu mecanismo de ação consiste em alterar diferentes processos bioquímicos que são vitais nas plantas. Inicialmente, ele inibe a enzima 5-enolpiruvilchiquimato-3-fosfato-sintase (EPSP), o que leva ao acúmulo de altos níveis de chiquimato nos vacúolos, intensificado pela perda de controle do fluxo de carbono na rota, ocorrendo o bloqueio da biossíntese dos aminoácidos aromáticos essenciais: fenilalanina, triptofano e tirosina (Hove-Jensen et al., 2014). As plantas tratadas com glifosato morrem lentamente, em poucos dias ou semanas, e devido ao transporte de todo o sistema, nenhuma parte da planta sobrevive.

O glifosato é o ingrediente ativo do herbicida Roundup[®] mais utilizado no mundo, desenvolvido pela Monsanto Co. e introduzido na agricultura mundial, em 1974 (Kimmel et al., 2013; Pollegioni et al., 2012 e Duke et al., 2012). Ele foi rapidamente adotado nas comunidades agrícolas em todo o mundo. Jayasumana et al. (2014) citam em seu estudo que o glifosato foi aclamado como o pesticida da virada do milênio e o produto químico mais significativo na agricultura moderna.

Ele possui várias propriedades desejáveis que contribuem para o seu uso mundial. Possui pouca ou nenhuma atividade herbicida no solo e, dessa forma, é utilizado apenas com aplicação por pulverização foliar (Duke et al., 2012). Algumas culturas alimentares importantes, como trigo, milho e soja, foram geneticamente modificadas de modo que eles são resistentes a este herbicida, proporcionando o controle de ervas daninhas, sem danos à plantação (Negga et al., 2011). Os mecanismos de resistência ao glifosato conhecidos incluem mutação no local do alvo, duplicação do gene do sítio-alvo, captação celular limitada e resposta de necrose rápida (Sammons e Gaines, 2014).

Existem vários trabalhos que relatam que este ativo é relativamente não tóxico (DL50 por via oral = 5600 mg/kg) em ratos. No entanto, para as formulações de pesticidas, o glifosato é combinado com produtos químicos adicionais, que são normalmente referidos apenas como "ingredientes inertes" e cuja toxicidade pode ser desconhecida, em combinação com o ingrediente ativo (Negga et al., 2011), incluindo a polioxietilenamida (POEA) utilizada para dispersão e aumento da absorção do pesticida nas plantas (Brausch et al., 2007). Mesnage et al. (2014) relatam em seu experimento que o agrotóxico Roundup[®] mostrou-se 125 vezes mais tóxico do que o glifosato. Além disso, apesar de sua reputação, a forma comercial Roundup[®] foi o mais tóxico entre os herbicidas e inseticidas testados (Mesnage et al, 2014).

Um estudo examinou os efeitos do herbicida glifosato isolado e da formulação comercial Roundup[®] na fosforilação oxidativa mitocondrial (Peixoto, 2005). A formulação comercial diminuiu significativamente a relação de ADP/oxigênio em concentrações abaixo de 0,5 mM, o que não ocorreu com o glifosato na forma isolada (Peixoto, 2005). Assim, sugere-se que a exposição ao pesticida comercial pode levar a uma disfunção mitocondrial. Estes dados confirmam os estudos anteriores à década de 80, que relatavam que as formulações comerciais de glifosato inibiam as mitocôndrias (Negga et al., 2011; Peixoto, 2005).

Uren Webster e Santos (2015) sugerem em seu estudo que o glifosato e a exposição ao Roundup[®] promovem alterações de muitos processos metabólicos. Ambos interferem nas vias de sinalização que controlam a resposta ao estresse celular, em particular aqueles que estão envolvidos na regulação da apoptose, indicando uma resposta celular ao estresse oxidativo, e sugerindo que este é o mecanismo mais significativo de toxicidade de ambos, Roundup[®] e glifosato.

Em um estudo realizado por Séralini et al. (2014) foram avaliados os efeitos sobre ratos alimentados com cereais que receberam glifosato isolado e na forma comercial no seu cultivo. Após 4 meses de vida, houve um aumento de tumores mamários nas fêmeas, bem como um aumento de danos renais e hepáticos nos machos. Além disso, observou-se uma vida útil diminuída em ambos os sexos. Estes efeitos ocorreram em resposta às duas formas de glifosato utilizadas (Séralini et al., 2014).

Uma consideração importante é que as bactérias intestinais em humanos dependem da via do chiquimato - assim como em plantas - para o fornecimento dos aminoácidos aromáticos essenciais, triptofano, tirosina e fenilalanina (Samsel e Seneff, 2015). A metionina, um aminoácido essencial que contém enxofre, também é afetada negativamente pelo glifosato. Além disso, muitas outras moléculas biologicamente

ativas, incluindo serotonina, melatonina, melanina, epinefrina, dopamina, hormônios da tireóide, ácido fólico, coenzima Q10, vitamina K e vitamina E dependem dos metabólitos da via chiquimato como precursores. Algumas bactérias e plantas usam exclusivamente a via do chiquimato para produzir esses aminoácidos (Samsel e Seneff, 2015).

1.3 PEIXE-ZEBRA

O peixe-zebra, *Danio rerio* (Figura 2), é um pequeno peixe teleósteo, com cerca de 3 a 4 cm, de água doce originário do sul da Ásia, o qual exibe grande adaptabilidade para a criação em cativeiro (Liu e Leach, 2011). Ele vem sendo considerado um modelo ideal para estudos em vertebrados (Bai e Burton, 2011; Málaga-Trillo et al., 2011).



Figura 2:Peixe-zebra. Disponível em www.noldus.com

Dentre as características que vem ampliando o uso deste animal modelo estão: o seu tamanho pequeno, permitindo a fácil manipulação; o rápido metabolismo (Goldsmith, 2004); a alta sensibilidade a substâncias que são adicionadas diretamente na água, realizando a absorção pelas brânquias (Grosell e Wood, 2002); o baixo custo

para criação e manutenção; e o alto grau de similaridade com mamíferos quando comparado com outros modelos alternativos (Peterson et al., 2008). Além disso, o peixe-zebra apresenta grande sensibilidade a fármacos, e genes evolutivamente conservados que apresentam um alto grau de similaridade com os genes de humanos (70 a 80%) e de camundongos, apresentando sistemas de neurotransmissão muito similares (Barbazuk et al., 2000; Howe et al., 2013).

1.3.1 PEIXE-ZEBRA EM ENSAIOS DE TOXICOLOGIA

Na última década, o peixe-zebra demonstrou-se uma ferramenta útil para compreender não só os efeitos estruturais e químicos de compostos neurotóxicos, mas também para avaliar a disfunção comportamental associada com tal exposição e, como tal, sendo útil para o domínio da toxicologia neurocomportamental do desenvolvimento (Bailey et al, 2013; Hahn et al., 2016). Muitos sistemas de neurotransmissão excitatórios e inibitórios foram mapeados no sistema nervoso do peixe-zebra, tais como, sistemas dopaminérgico, serotoninérgico, colinérgico, purinérgico, histaminérgico, nitrérgico, glutamatérgico, glicinérgico e gabaérgico, enfatizando suas características como alvos farmacológicos e toxicológicos (Panula et al., 2010; Rico et al., 2011).

Tanto a integridade estrutural quanto a capacidade funcional do peixe-zebra podem ser avaliadas ao longo de todo o tempo de vida, desde a fase larval até a adulta, tornando este modelo ideal para compreender os efeitos tóxicos e teratogênicos de compostos. Além disso, as ações elementares de um agente neurotóxico podem ser acompanhadas, no que se refere às interrupções de diferenciação neural, proliferação e migração celular, formação de sinapses, e desenvolvimento de circuitos. O comportamento do peixe-zebra pode ser também medido para determinar o impacto

funcional de uma exposição química. Desta forma, a utilização do peixe-zebra em estudos de toxicidade e teratogenicidade expandiu-se enormemente nos últimos dez anos (Bailey et al., 2013; Kent et al., 2016 e Boix et al., 2013).

A espécie mostra-se adequada para trabalhos em condições laboratoriais, devido ao fato de ser amplamente reconhecida como um bom modelo para estudos de toxicidade, destacando a importância de pesquisas relacionadas aos aspectos reprodutivos de organismos aquáticos expostos ao herbicida glifosato. No estudo desenvolvido por Armiliato et al. (2014), fêmeas da espécie foram expostas a este herbicida. Os autores relatam que a concentração regulamentada para os rios do Brasil foi suficiente para causar alterações estruturais e bioquímicas nos ovários dos peixes, sugerindo comprometimento do processo reprodutivo da espécie.

1.3.2 PEIXE-ZEBRA EM ENSAIOS COMPORTAMENTAIS

Há um interesse crescente na utilização desta espécie em estudos comportamentais visando a compreensão da base genética do comportamento (Miklósi e Andrew, 2006; Hahn et al., 2016). Estudos demonstram que as respostas comportamentais do peixe-zebra são robustas, evolutivamente conservadas e se assemelham às de mamíferos (Kalueff et al., 2013). Tanto a fase larval, como a fase adulta já foram utilizadas para investigar a função cerebral e perturbações do comportamento (Norton, 2013; Kalueff et al., 2014, Liu et al., 2017).

Os aspectos comportamentais incluem alterações na locomoção, como movimentos erráticos, distância percorrida, tempo de permanência, velocidade média e número de cruzamentos (Giacomini et al., 2016). Além disso, estudos avaliando características comportamentais do peixe-zebra foram desenvolvidos, envolvendo a

análise da atividade locomotora, agressividade, interação social e aprendizado (Cognato et al., 2012; Karnik e Gerlai, 2012; Bailey et al., 2013; Porseryd et al., 2017).

O peixe-zebra é amplamente utilizado para pesquisar o comportamento animal, no que se refere à agressividade. Ele é uma espécie que vive em grupo e forma hierarquias de dominância em ambos os sexos (Oliveira, 2013). A agressividade é comumente utilizada pelo indivíduo dominante a fim de capacitá-lo a ocupar territórios sobre os locais de desova e proteger o seu *status*, frente aos seus subordinados. Esta estreita associação entre a agressividade e a posição social, juntamente com os padrões comportamentais menos complexos do peixe-zebra em comparação com os mamíferos, tornam esta espécie altamente apropriada para estudos sobre os mecanismos envolvidos na agressividade (Filby et al., 2010). Alguns comportamentos complexos como abordagem, movimento ondulante do corpo, abertura e fechamento da boca, movimento de mordida e perseguição quando dirigidos a membros da mesma espécie, ou a outros objetos em peixe-zebra adulto podem aparecer no contexto da defesa do território (comportamento territorial), proteção dos semelhantes e estabelecimento de domínio. Estes comportamentos podem ser afetados através da manipulação de diferentes substâncias farmacológicas e toxicológicas (Oliveira et al., 2011).

Além disso, esta espécie possui habilidades cognitivas evidentes e vários estudos têm demonstrado que apresentam excelente memória de curto prazo e de longo prazo, além de responder a vários modelos de aprendizagem (Kalueff et al., 2014; Mwaffo et al., 2017). Estudos já demonstraram a capacidade desta espécie em adquirir memórias associativas, aversivas e espaciais (Al-Mari e Gerlai, 2008; Blank et al., 2009; Cognato et al., 2012).

Com relação ao comportamento social, sabe-se que esta espécie pode ser influenciada pela presença ou ação de outros co-específicos (Oliveira et al., 2011; Al-

Imari e Gerlai, 2008; Miller e Gerlai, 2011). Isso pode resultar em alterações na agressividade, na memória, reconhecimento e preferência social. Esta espécie tem uma tendência natural de passar mais tempo perto de indivíduos da mesma espécie, podendo ser observado como parte do comportamento de cardume, reconhecimento social, ou preferência dos compartimentos (Miller e Gerlai, 2011).

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar os efeitos da exposição ao glifosato sobre parâmetros comportamentais e morfológicos em peixe-zebra nos estágios larval e adulto, comparando a forma ativa isolada e a forma comercial.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar o efeito do glifosato isolado ou da forma comercial (Roundup[®]), após 96 horas de exposição, sobre a morfologia de larvas de peixe-zebra.
- Avaliar o efeito do glifosato isolado ou da forma comercial (Roundup[®]), após 96 horas de exposição, sobre a locomoção e o comportamento aversivo de larvas de peixe-zebra.
- Investigar o efeito da exposição ao glifosato isolado ou da forma comercial (Roundup[®]), após 96 horas de exposição, sobre a atividade locomotora, memória e agressividade em animais adultos.

3 RESULTADOS

CAPÍTULO 1

ARTIGO CIENTÍFICO

Glyphosate and Roundup[®] alter morphofology and behavior in zebrafish

Daiane Bridi, Stefani Altenhofen, Jonas Brum Gonzalez, Gustavo Kellerman Reolon,
Carla Denise Bonan

Artigo em fase de revisão no periódico Toxicology

GLYPHOSATE AND ROUNDUP® ALTER MORPHOLOGY AND BEHAVIOR
IN ZEBRAFISH

Daiane Bridi^a, Stefani Altenhofen^b, Jonas Brum Gonzalez^b, Gustavo Kellerman Reolon^b, Carla Denise Bonan^{a,b,*}

^a Laboratório de Neuroquímica e Psicofarmacologia, Departamento de Biologia Celular e Molecular, Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia Farmacêutica, Faculdade de Biociências, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul. Porto Alegre, RS, Brazil.

^b Laboratório de Neuroquímica e Psicofarmacologia, Departamento de Biologia Celular e Molecular, Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, Faculdade de Biociências, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil.

* Corresponding author: Carla Denise Bonan

Avenida Ipiranga, 6681, 90619-900, Porto Alegre, RS, Brazil.

Phone: +55 51 3353 4158

E-mail address: cbonan@pucrs.br

Abstract

Glyphosate has become the most widely used herbicide in the world, due to the wide scale adoption of transgenic glyphosate resistant crops after its introduction in 1996. Glyphosate may be used alone, but it is commonly applied as an active ingredient of the herbicide Roundup[®]. This pesticide contains several adjuvants, which may promote an unknown toxicity. The indiscriminate application poses numerous problems, both for the health of the applicators and consumers, and for the environment, contaminating the soil, water and leading to the death of plants and animals. Zebrafish (*Danio rerio*) is quickly gaining popularity in behavioral research, because of physiological similarity to mammals, sensitivity to pharmacological factors, robust performance, low cost, short spawning intervals, external fertilization, transparency of embryos through larval stages, and rapid development. The aim of this study was evaluate the effects of glyphosate and Roundup[®] on behavioral and morphological parameters in zebrafish larvae and adults. Zebrafish larvae at 3 days post-fertilization and adults were exposed to glyphosate (0.01, 0.065, and 0.5 mg/L) or Roundup[®] (0.01, 0.065, and 0.5 mg/L) for 96 hours. Immediately after the exposure, we performed the analysis of locomotor activity, aversive behavior, and morphology for the larvae and exploratory behavior, aggression and inhibitory avoidance memory for adult zebrafish. In zebrafish larvae, there were significant differences in the locomotor activity and aversive behavior after glyphosate or Roundup[®] exposure when compared to the control group. Our findings demonstrated that exposure to glyphosate at the concentration of 0.5 mg/L, Roundup[®] at 0.065 or 0.5 mg/L reduced the distance traveled, the mean speed and the line crossings in adult zebrafish. A decreased ocular distance was observed for larvae exposed at 0.5 mg/L of glyphosate. We verified that at 0.5 mg/L of Roundup[®]-treated adult zebrafish demonstrated a significant impairment in memory. Both glyphosate and Roundup[®] reduced aggressive behavior. Our data suggest that there are small differences between the effects induced by glyphosate and Roundup[®], both altering morphological and behavior parameters in zebrafish, suggesting common mechanisms of toxicity and cellular response.

Keywords: glyphosate, Roundup[®], toxicity, zebrafish, behavior, memory.

1. Introduction

Roundup[®] is the most popular and widely used herbicide in the majority of the world (Robert *et al.*, 2010; Wang *et al.*, 2016; Gallardo *et al.*, 2016). It is largely used in agriculture, forestry and horticulture (including domestic use) (Uren Webster *et al.*, 2014). The indiscriminate use of Roundup[®] associated with careless handling, accidental spillage or discharge of untreated effluents into natural waterways has caused harmful effects on aquatic life and may promote long-term biological effects yet to be discovered (Moustafa *et al.*, 2016; Gallardo *et al.*, 2016).

Glyphosate is the primary active ingredient present in Roundup[®] (Monsanto Co., St. Louis, MO, USA). However, the actual application mixture also contains what is referred to as “inert” or “inactive” ingredients (Negga *et al.*, 2011; Cox, 1998; Williams *et al.*, 2000). Despite the classification of innocuous, the commercial formulation has greater side effects than glyphosate alone (Cavalli *et al.*, 2013). The introduction of glyphosate-resistant crops in the late 1980s increased exponentially the use of glyphosate-containing herbicides (Araujo *et al.*, 2014). In 1987, glyphosate was the 17th most used pesticide in the United States, and by 2001, it became the most applied herbicide (Negga *et al.*, 2011).

The wide applications of glyphosate and its relatively long half-life in water (most commonly 45–60 days) will lead to its constant presence in coastal waters (Annett *et al.*, 2014). Studies have characterized the effects of individual glyphosate-based herbicide formulations on a wide variety of aquatic organisms, including microorganisms (Arunakumara *et al.*, 2013; Vendrell *et al.*, 2009), invertebrates (Kreutzweiser *et al.*, 1989; Folmar *et al.*, 1979), amphibians (Edge *et al.*, 2013; Relyea, 2005), and fish (Uren Webster and Santos, 2014; Mitchell *et al.*, 1987), which indicated diverse physiological and behavioral effects depending on the dose and formulation.

Danio rerio, commonly known as zebrafish, is a tropical freshwater fish. It was previously a well-known domestic fish, which has rapidly become an indispensable animal model for scientists of today's world. The usage of zebrafish in scientific research could be seen playing significant roles in fundamental areas of research, such as toxicology (Zoupa and Machera, 2017; Alestrom *et al.*, 2006; Beis and Stainier, 2006; Ingham, 2009). The numerous advantages and characteristics of this small animal have contributed for the growing interest in this animal model for the biomedical

research. Thus, the aim of this study is to evaluate the effects of exposure to glyphosate and Roundup[®] on morphological and behavioral parameters on zebrafish during the larval and adult stages, comparing the isolated active form and the commercial form.

2. MATERIALS AND METHODS

2.1. Animals and maintenance

Zebrafish (*Danio rerio*) adults stage (6-8 months, 0.2-0.4 g) wild-type were obtained from a local commercial supplier (Red Fish, Porto Alegre, Brazil) and acclimated for at least 2 weeks in the experimental room before the experiments. Animals were housed in a 30 L- thermostated aquarium filled with unchlorinated water constantly aerated at a targeted temperature of 26 ± 2 °C. Fish were kept under a 14-h light/10-h dark cycle photoperiod (lights on at 7:00 am) and were fed three times a day with commercial flake fish food (Alcon BASIC[®], Alcon, Brazil), supplemented with brine shrimp (*Artemia* sp.).

At least one week prior to training, animals were transferred to 25 L temporary housing tanks in the task room to minimize further changes in context during the experiment. The housing tank mimicked the conditions mentioned above and had a glass partition that allowed manipulated and non-manipulated fish to be maintained separated during each experimental session and *yet allowed* animals to be maintained among their original group during the investigation. This strategy was adopted to minimize animal stress due to isolation and its eventual impacts on behavioral responses. Feeding was not interrupted during the experimentation and all sessions were performed at morning. On each session animals were gently captured from the temporary housing tank using a 6 cm wide fine nylon mesh fish net.

Water used in the experiments was obtained from a reverse osmosis apparatus (18 MOhm/cm) and was reconstituted with marine salt (Crystal Sea, Maninmix, Baltimore, USA) at 0.4 ppt. The total organic carbon concentration was 0.33 mg/L. The total alkalinity (CO_3^{2-}) was 0.030 mEq/L. During fish maintenance, water parameters were monitored daily and maintained in the following ranges: pH: 6.5 to 7.5, conductivity: 400 to 600 S, ammonium concentration: < 0.004 ppm, and temperature: 25 to 28 °C. All protocols were approved by the Institutional Animal Care Committee (06/2016, CEUA-PUCRS).

2.2. Exposures

2.2.1. Larval exposure

Embryos were obtained from our breeding colony. For breeding, 1 female and 2 males per aquaria were placed in breeding tanks overnight in which the sexes were separated by a transparent barrier. After the lights went on in the following morning, the barrier was removed. Fertilized eggs were used for the experiments with larvae. Embryos were collected, sanitized and 3 days after, they were subjected to the exposure.

After sanitized, embryos were kept for 3 days in six-well plates (10 embryos per well at a density of 1 embryo per 2 mL). Larvae (3 dpf) were placed in Petri dishes (10 larvae per dish at a density of 1 larvae per 2 mL), and subjected to Roundup[®] (Monsanto) or glyphosate (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) exposure at nominal concentrations of 0 (control group), 0.01, 0.065 and 0.5 mg/L for 96 hours (solutions were not changed during this period). The third day post fertilization was chosen as it is the well described period during Zebrafish development in which the majority of eggs hatch, therefore allowing directly exposure to herbicides. Only larvae that hatched in the third dpf were used in the experiments. The three concentrations were chosen to represent concentrations that may occur in the environment (0.01 mg/L) or during occasional peak contamination events (0.5 mg/L) (Uren Webster and Santos, 2015). Animals were monitored daily for survival as determined by the lack of heartbeat visualized under a stereoscope.

2.2.2. Adult exposure

Adult animals, aged between 6 and 7 months, were exposed to Roundup[®] (Monsanto Company, Marysville, OH, USA) or glyphosate (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) nominal concentrations of 0 (control groups), 0.01, 0.065 and 0.5 mg/L (Uren Webster and Santos, 2015) in 2 L aquarium (10 animals per tank) for 96 h (solutions were not changed during this period).

2.3. Morphological defects

Morphology evaluation was performed by monitoring morphological defects in larvae under a stereomicroscopy at 7 days post-fertilization (dpf). Body length (μm), ocular distance (μm), and surface area of the eyes (μm^2) were evaluated using NIS-Elements D software for Windows 3.2 (Nikon Instruments Inc., Melville, USA). Body length was estimated using the method described by Capiotti *et al.* (2011), with modifications; the distance from the larval mouth to the pigmented tip of the tail was measured. The ocular distance was evaluated by the distance between the inner edge of the two eyes (similar to the inner intercantal distance in humans), and the size of the eyes was determined by measuring the surface area of the eyes (Lutte *et al.*, 2015).

2.4 Behavioral analyses

2.4.1 Exploratory behavior of larvae

The exploratory behavior of the larvae was based on Altenhofen *et al.* (2017) and evaluated at 7 dpf. The experiments were performed in a temperature-controlled room (27 ± 2 °C) between 1 p.m - 5 p.m. Each larva was individually placed in a 24-well cell culture plate containing 2 mL of water per well, and the total distance traveled of each animal were evaluated (N=30). After a 60 s habituation, the sessions were recorded for five minutes for later analysis using ANY-Maze tracking software (Stoelting Co., Wood Dale, IL, USA).

2.4.2 Bouncing-ball avoidance behavior of larvae

Immediately after the exploratory behavior, larvae were placed in 6-well plate (5 larvae per well, N=30) over a LCD monitor for cognitive ability and avoidance responses to a visual stimulus (a 1.35 cm diameter red bouncing ball) during a 5-min session after a 2-min acclimation (Pelkowski *et al.*, 2011; Nery *et al.*, 2014). The red bouncing ball travelled from left to right over a straight 2 cm trajectory on half of the well area (stimuli area), which animals avoided by swimming to the other non-stimuli half of the well. The number of larvae on the non-stimuli area during the 5-min session was considered indicative of their cognitive ability.

2.4.3 Adult exploratory behavior

The exploratory behavior of the adults was based on Gerlai *et al.* (2000) and Reolon *et al.* (2017). Adult exploration was evaluated at 96 h after the start of exposure. The experiments were performed in a temperature-controlled room (27 ± 1 °C) between 9 a.m – 1 p.m. Animals were placed individually in experimental tanks (30 cm length \times 15 cm height \times 10 cm width), and after 60 s of habituation, their locomotor behavior was recorded for five minutes. The videos were analyzed using the ANY-Maze software. The behavioral parameters analyzed were: distance traveled, mean speed, time mobile, line crossings and time spent in upper zone. The time spent in upper zone can indicate an anxiolytic-like behavior (Levin *et al.*, 2007).

2.4.4 Adult aggressive behavior

The aggressive behavior was estimated using the method described by Gerlai *et al.* (2000) and Gerlai (2003), with modifications. Each fish was placed in an experimental tank (30 cm \times 15 cm \times 10 cm, length \times height \times width). A mirror (45 cm \times 38 cm) was placed at the side of the tank at an angle of 22.5° to the backwall of the tank so that the left vertical edge of the mirror touched the side of the tank and the right edge was further away. Thus, when the experimental fish swam to the left side of the tank, their mirror image appeared closer to them. A test fish was added to the tank and was allowed acclimate for 60 s; the aggressive behaviors that a fish conducted toward its mirror image were subsequently recorded over a period of 5 min. The vertical lines divided the tank into four equal sections and allowed the number of entries to each section made by the fish to be counted. Entry to the left-most segment indicated preference for proximity to the “opponent”, whereas entry to the right most segments implied avoidance. The amount of time the experimental fish spent in each segment was measured using ANY-Maze recording software.

2.4.5 Aversive memory in adults

The inhibitory avoidance test was evaluated using a glass tank (18 cm Length \times 9 cm Width \times 7 cm Height), divided in two equally sized compartments, designated hereon as dark and white and divided by a sliding guillotine-type partition (9 cm \times 7

cm) (Blank *et al.*, 2009). Compartments were defined by opaque plastic self-adhesive films in black or white colors externally covering walls, floor and the corresponding sides of the partition. Two electrodes extending through the wall height and placed on each far side of the opposing side walls of the dark compartment were attached to an 8 V stimulator and administered a final 3 ± 0.2 V AC shock (intensity measured between electrodes and the center of the dark compartment) when manually activated. Zebrafish were trained and tested individually in the inhibitory avoidance apparatus. Animals were gently placed in the white side of the task tank while the partition between compartments was closed. After 1 min of familiarization with the new environment, the partition was raised, allowing fish to cross to the dark side of the tank through the 1 cm high opening. On training session, when animals entered the dark side with their entire body the sliding partition was closed and a pulsed electric shock administered for 5 s. Fish were then removed from the apparatus and placed in the dedicated compartment of the temporary housing tank. Animals were tested 24 h after training. The test session repeated the training protocol except that no shock was administered and animals immediately removed from the dark compartment. The latency to completely enter the dark compartment was measured on both sessions and the test latencies used as an index of retention.

2.4.6 Statistical analysis

All data were presented as mean \pm S.E.M, except for larval survival that is presented as percentages. Larval survival during the four experimental days was analyzed by Kaplan-Meier analysis. Differences in locomotor parameters (larvae at 7 dpf and adults after 96 h of exposure) were evaluated by one-way analysis of variance (ANOVA) followed by post-hoc comparisons using Tukey corrections. Inhibitory avoidance training and test latencies for each group were compared by the Wilcoxon matched pairs test. For all comparisons, the significance level was set at $p < 0.05$.

3. RESULTS

3.1. Glyphosate and Roundup[®] exposure in zebrafish larvae

3.1.1. Survival

We investigated the effect of glyphosate or Roundup[®] exposure on survival and morphology at 24, 48, and 72 hours after the beginning of the exposure. Data for survival evaluation were analysed by Kaplan Meier survival test ($p=0.6275$, $N=36$). The results evaluated at 72 h demonstrated that animals exposed to concentrations of 0.01, 0.065, and 0.1 mg/L showed survival percentages of 92%, 96% and 91%, respectively. Animals exposed the same concentrations of Roundup[®] showed survival percentages of 91%, 90% and 91%, respectively (). There were no differences between any group and control (survival of 93%). At 24 and 48 hours there were no differences between groups (data not shown).

3.1.2 Exploratory behavior

The exploratory behavior of the larvae was examined at 7 dpf to determine whether glyphosate and Roundup[®] exposure could alter larvae locomotion and orientation. The distance traveled of animals exposed to glyphosate or Roundup[®] at concentration 0.01 and 0.5 mg/mL was decreased when compared to the control group ($F_{(6,197)} = 4.143$; $p = 0.0006$; Fig. 1a). The parameter of absolute turn angle ($F_{(6,197)} = 8.7662$; $p < 0.0001$; Fig.1b) was decreased in the 0.01 mg/L glyphosate and Roundup[®] groups. The animals exposed to Roundup[®] concentration of 0.065 and 0.5 mg/L had increased time mobile ($F_{(6,197)} = 8.343$; $p < 0.0001$; Fig.1c) compared with the control group.

3.1.3 Aversive Behavior

The cognitive escaping responses from an aversive stimulus was evaluated and it was observed a significant effect of groups exposure ($F_{(6,308)} = 8.925$; $p < 0.0001$; Fig. 2) with glyphosate and Roundup[®]. The findings demonstrated an increase in the number of animals in non-stimuli area in the concentrations of 0.1 (89%), 0.065 (86%) and 0.5

mg/L (88%) glyphosate and 0.065 (95%) and 0.5 mg/L (90%) Roundup[®], when compared with the control (76%).

3.1.4 Morphological Evaluation

The teratogenic effects of glyphosate and Roundup[®] on larvae morphology were evaluated at 7 dpf. There were significant decreases in body length with all concentrations of Roundup[®] ($F_{(6,197)} = 9.301$; $p < 0.0001$; Fig. 3a) and only a significant reduction in ocular distance when compared with the control group at concentration 0.5 mg/L of glyphosate ($F_{(6,197)} = 2.582$; $p = 0.0198$; Fig 3b). There were no differences in surface area of the eyes between the control and either glyphosate or Roundup[®] exposed groups at all concentrations ($F_{(6,197)} = 3.367$; $p = 0.0035$; Fig. 3c).

3.2 Glyphosate and Roundup[®] exposure in zebrafish adults

3.2.1 Exploratory behavior

The behavior pattern of adult animals was analyzed after 96 h of exposure to glyphosate and Roundup[®]. Exposure to 0.5 mg/L glyphosate and 0.065 and 0.5 mg/L Roundup[®] decreased the distance traveled ($F_{(6,105)} = 5.728$; $p < 0.0001$; Fig 4a), mean speed ($F_{(6,105)} = 6.042$; $p < 0.0001$; Fig. 4b) and the number of line crossings ($F_{(6,105)} = 4.769$; $p = 0.0002$; Fig. 4d) when compared to the control group. There were no differences in time mobile between the control and the glyphosate or Roundup[®] exposed groups at all concentrations. ($F_{(6,105)} = 0.9546$; $p = 0.4597$; Fig. 4c).

3.2.2 Memory

There was no impairment in memory at all concentrations of animals exposed to glyphosate (0.01, 0.065, and 0.5 mg/L) ($U = 0.50$, $p < 0.0001$; $U = 9.00$, $p < 0.0001$; $U = 29.00$, $p < 0.0002$, respectively) and animals exposed to Roundup[®] at the lower concentration tested (0.01mg/L) and intermediate concentration showed no memory impairment ($U = 50.00$, $p < 0.001$; $U = 65.00$, $p < 0.05$, respectively), while animals exposed to the higher concentration showed memory impairment ($U = 67.50$, $p > 0.05$) compared to the control group ($U = 15.00$, $p < 0.0001$) (Fig. 5).

3.2.3 Agression

Glyphosate exposed groups to 0.01 (91%), 0.065 (93%) and 0.5 mg/L (93%) and Roundup[®] exposed groups at all concentrations 0.01 (85%), 0.065 (86%) and 0.5 mg/L (86%) remained less time in the segment nearest to the mirror ($F_{(6,169)} = 4.7108$; $p = 0.0007$; Fig. 6a) when compared with the control group (%). There was a significant decrease on the number of entries into the mirror contact zone, when compared with the control group. ($F_{(6,203)} = 7.438$; $p < 0.0001$; Fig. 6b).

4 DISCUSSION

Aquatic contamination by herbicides can occur as result of direct spraying, or during heavy rainfall or leaching of agricultural fields (Roy *et al.*, 2016; Benachour and Seralini, 2009). Glyphosate has been regularly detected in a diversity of water bodies (Mercurio *et al.*, 2014), and its presence in surface waters has been found 60 days after the formulation was applied, which indicates that this compound can persist in the environment (Roy *et al.*, 2016). Moreover, up to approximately 0.04 mg/L glyphosate has been reported to occur in rivers near urban run off and waste water treatment effluent. Therefore, exposure to non-target organisms is inevitable and is related to glyphosate's high water solubility, contaminating the aquatic microbiota, animals and fish. (Roy *et al.*, 2016).

This study demonstrated that glyphosate or Roundup[®] exposure induces behavioral and morphological changes in different developmental stages of zebrafish. The exposure to different glyphosate and Roundup[®] concentrations, starting at 3 dpf during 96 h can cause small morphological alterations in zebrafish larvae. The findings showed that concentrations of glyphosate did not alter body length and surface area of the eyes. However, the exposure to highest concentration (0.5 mg/L) induced decrease in the ocular distance and this effect is probably maintained during the animal lifespan. The exposure to all concentrations of Roundup[®] (0.01, 0.065 and 0.5 mg/L) in early stages of development decreased body length. This study has shown that 96-h exposure to these herbicides causes morphological alterations in zebrafish larvae. A study by Zhang *et al.* (2017) also shows that from 100 to 400 mg/L of glyphosate exposure to zebrafish larvae (4 dpf) resulted in shorter body lengths, smaller eyes and heads, especially in 400 mg/L.

Studies also have shown that other neurotoxic agents can cause numerous morphological changes in zebrafish larvae. It has been observed that exposure during 120 h to the fungicide tebuconazole was able to increase the ocular distance in larvae that were exposed to 4 mg/L (Altenhofen *et al.*, 2017). A similar effect was also verified where zebrafish larvae were exposed to concentrations up to 10 ppm (near the solubility limit in water) of atrazine during its development (from 1 to 120 hpf). The results showed that larvae in all atrazine exposures had a significant increase in head length compared with the control (Weber *et al.*, 2013).

Our study demonstrated that exposure to glyphosate and Roundup® in the highest and lowest concentration (0.01 and 0.5 mg/mL) were able to alter the swimming behavior of zebrafish larvae, reducing the distance traveled, it is possible that morphological changes affected the found locomotion alterations. This effect was also observed in the absolute turn angle of the animals in the lowest concentration (0.01 mg/L) tested, which indicates that both glyphosate and Roundup® are able to change the swimming pattern of larvae. Bortolotto *et al.* (2014) have associated absolute turn angle alterations with parkinson-associated symptoms in adult zebrafish exposed to paraquat. This parameter has been suggested as a sensitive measure of motor coordination (Blazina *et al.*, 2013). In addition, the glyphosate causes behavioral changes in animals that were submitted to exposure in the larval stage (Uren Webster and Santos, 2014). Pesticides can alter exploratory parameters in zebrafish larvae. Andrade *et al.* (2016) showed that the fungicide carbendazim induced changes in the locomotor activity of zebrafish larvae at 120 hpf, with significant decrease in the distance moved was observed at concentrations above 0.8 g/L during the light period (Andrade *et al.*, 2016). Imazalil fungicide exposure after 96 h, especially at high concentrations, resulted in decreased locomotor activity in zebrafish larvae. Both distance and swimming speed were significantly lower in the 100 and 300 mg/L imazalil-treated groups than in the control group (Jin *et al.*, 2016). Studies also showed that the distances of groups treated with 100 and 300 mg/L after 120 h exposure herbicide atrazine was significant lower than those in the control group (Liu *et al.*, 2016; Pérez *et al.*, 2013). Therefore, as observed for other pesticides, glyphosate and Roundup® are able to alter the locomotor pattern of zebrafish at early stages of development.

The aversive behavior showed a significant effect of glyphosate and Roundup® exposure. All groups, except for the lowest Roundup® concentration (0.01mg/L) showed an increase in the time swimming in the unstimulated area when compared to

control. This result is probably related to the decrease of the exploratory capability observed in the larvae, however, it can not be excluded that the herbicide increased the ability to perceive danger and, therefore, the time spent away from the aversive stimulus. Considering this altered behavior, the larvae may have escaped the stimulus and remained longer in the unstimulated area of the plate. These results suggest that the decrease in the exploratory behavior of zebrafish larvae exposed to glyphosate or Roundup® may cause animals to be more susceptible to predation. In addition, exposure to glyphosate may alter the normal morphology and behavior of the larvae even at the concentration that is close to the environmental concentration of glyphosate (0.01 mg/L), indicating that environmental glyphosate may alter the morphology and decrease spontaneous movement of the larvae.

In adults, our findings demonstrated that glyphosate or Roundup® exposure reduced the distance traveled, the mean speed and the line crossings in fish exposed to the concentrations of 0.5 mg/L glyphosate and 0.065 and 0.5 mg/L of Roundup®. Other studies observed the change of this parameter with other toxic agents. Bortolotto *et al.* (2014) showed that the pesticide paraquat can alter locomotion parameters in zebrafish adults, resulting in decreased of locomotion and distance traveled 24 h after injection of this herbicide. Pereira *et al.* (2012) described that exposure to endosulfan, a broad spectrum organochlorine pesticide, decreased line crossings, distance traveled, mean speed, and body turn angle in adults zebrafish when compared with the control groups. Tilton *et al.* (2011) observed that chlorpyrifos, an organophosphate pesticide, significantly reduced the treated adult animal's swimming rate for 24 h. Our findings indicate that isolated or commercial forms of glyphosate are also able to modulate locomotion in adult zebrafish.

In addition, we found a significant impairment in long-term memory in the inhibitory prevention task for the highest concentration of Roundup®, suggesting that this pesticide induces memory impairment. In contrast to our findings, Pereira *et al.* (2012) observed that the exposure to 2.4 µg endosulfan/L for 96 h neither altered training session nor test session. The study of Balbuena *et al.* (2015) showed that after ingesting food contaminated with glyphosate impaired navigational memory in foraging honeybees. In this study, our results have shown that exposure to glyphosate or Roundup® decreases the time fish spent in the segment nearest to the mirror, indicating impairment in aggressive behavior. Aggressive behavior and memory are very important

regarding resources dispute, nesting sites dispute and mate dispute and this impairment could be very harmful to fish living in the wild.

The significant alterations observed concerns for the potential toxicity of this herbicide to fish populations inhabiting contaminated rivers. Our data raises concerns about the potential for environmental relevant concentrations of glyphosate and Roundup[®] to affect wild fish populations, even at concentrations that are found in the environment. Our data suggest that there is small differences between glyphosate and Roundup[®], both altering morphological and behavior parameters in zebrafish larvae and in adults, behavior was impaired.

Our results showed that both glyphosate and Roundup[®] are toxic to larvae and adult zebrafish. Several authors have suggested that the toxicity of Roundup[®] may be derived from synergistic effects between glyphosate and other formulation products, such as a surfactant that enhances the penetration of glyphosate through the plant cuticle (Cuhra *et al*, 2013). Folmar *et al.* (1979) compared the acute toxicity of technical-grade glyphosate acid, Roundup[®], isopropylamine salt of glyphosate, and surfactant to several freshwater invertebrates and fishes. The authors observed that acute toxicity of the surfactant and Roundup[®] formulation were similar, which corroborates the findings of this study. An interesting perspective from this work is to investigate the neurobiological basis of the observed effects.

Our results indicate that the current toxicity levels allowed in water bodies causes zebrafish larvae to decrease its exploratory behavior. This could unbalancing fish population (e.g. increase predation or alter resources dispute). Therefore, it is necessary that more studies evaluate if the tolerable glyphosate levels in the water should be changed.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) (Proc. 446025/2014-3). S.A. was the recipient of a fellowship from Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES). J.B.G was recipient of a fellowship from Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS) and G.K. R. and C.D.B were CNPq fellowship recipients.

References

- Alestrom P., Holter J.L., Nourizadeh-Lillabadi R., 2006. Zebrafish in functional genomics and aquatic biomedicine. *Trends Biotechnol.* 24,15–21, doi: 10.1016/j.tibtech.2005.11.004.
- Altenhofen S., Wiprich M.T., Nery L.R., Leite C.E., Vianna M.R.M. and Bonan C.D., 2017. Manganese(II) chloride alters behavioral and neurochemical parameters in larvae and adult zebrafish. *Aquatic Toxicology.* 182, 172–183, doi: 10.1016/j.aquatox.2016.11.013.
- Altenhofen S., Nabinger D. D., Wiprich M. T., Pereira T. C. B., Bogo M. R., Bonan C. D., 2017. Tebuconazole alters morphological, behavioral and neurochemical parameters in larvae and adult zebrafish (*Danio rerio*). *Chemosphere.* 180, 483-490. doi: 10.1016/j.chemosphere. 2017.04.029.
- Andrade, T.S., Henriques, J.F., Almeida, A.R., Machado, A.L., Koba, O., Giang, P.T., Soares, A.M., Domingues, I., 2016. Carbendazim exposure induces developmental, biochemical and behavioural disturbance in zebrafish embryos. *Aquat. Toxicol.* 170, 390e399. <http://dx.doi.org/10.1016/j.aquatox.2015.11.017>. Erratum in: *Aquat Toxicol.* 173, 228.
- Annett R., Habibi H.R., Hontela A., 2014. Impact of glyphosate and glyphosate-based herbicides on the freshwater environment. *J Appl Toxicol.* 34, 458–479, doi: 10.1002/jat.2997.
- Araujo J.S.A., Delgado I.F., Paumgartten F.J.R., 2014. Glyphosate and adverse pregnancy outcomes, a systematic review of observational studies. *BMC Public Health.* 16, 472, doi: 10.1186/s12889-016-3153-3.
- Arunakumara K., Walpola B.C., Yoon M.H., 2013. Metabolism and degradation of glyphosate in aquatic cyanobacteria: A review. *African J Microbiol Res.* 7, 4084–4090, doi: 10.5897/AJMR12.2302.
- Balbuena M.S., Tison L., Hahn M.L., Greggers U., Menzel R., Farina W.M., 2015.

Effects of sublethal doses of glyphosate on honeybee navigation. *J Exp Biol.* 218, 2799-805, doi: 10.1242/jeb.117291.

Beis D., Stainier D.Y., 2006. In vivo cell biology: following the zebrafish trend. *Trends Cell Biol.* 16, 105–112, doi: 10.1016/j.tcb.2005.12.001.

Benachour N., Seralini G.E., 2009. Glyphosate formulations induce apoptosis and necrosis in human umbilical, embryonic, and placental cells. *Chem Res Toxicol.* 22, 97–105, doi: 10.1021/tx800218n.

Bortolotto J.W., Cognato G.P., Christoff R.R., Roesler L.N., Leite C.E., Kist L.W., Bogo M.R., Vianna M.R.M., Bonan C.D., 2014. Long-term exposure to paraquat alters behavioral parameters and dopamine levels in adult zebrafish (*Danio rerio*). *Zebrafish.* 11, 142-53. doi: 10.1089/zeb.2013.0923. Epub 2014 Feb 25.

Blank M., Guerim L.D., Cordeiro R.F., Vianna M.R.M., 2009. A one-trial inhibitory avoidance task to *zebrafish*: rapid acquisition of an NMDA-dependent long-term memory. *Neurobiol Learn Mem.* 92, 529–534, doi: 10.1016/j.nlm.2009.07.001.

Blazina A.R., Vianna M.R., Lara D.R., 2013 The spinning task: a new protocol to easily assess motor coordination and resistance in zebrafish. *Zebrafish.* 10, 480-485, doi: 10.1089/zeb.2012.0860

Capiotti, K.M., Menezes, F.P., Nazario, L.R., Pohlmann, J.B., de Oliveira, G.M., Fazenda, L., Bogo, M.R., Bonan, C.D., Da Silva, R.S., 2011. Early exposure to caffeine affects gene expression of adenosine receptors, DARPP-32 and BDNF without affecting sensibility and morphology of developing zebrafish (*Danio rerio*). *Neurotoxicol. Teratol.* 33, 680–685, doi: 10.1016/j.ntt.2011.08.010

Cavalli V.L.D.O., Cattani D., Rieg C.E.H., Pierozan P., Zanatta L., Parisotto E.B., Wilhelm D.F., Silva F.R.M.B., Pessoa-Pureur R., Zamoner A., 2013. Roundup disrupts male reproductive functions by triggering calcium-mediated cell death in rat testis and Sertoli cells, *Free Radical Biology and Medicine.* 65, 335-346, doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2013.06.043

Cox, C., 1998. Glyphosate (Roundup), *J. Pest.* 18, 3–17. <http://naturalrevolution.org/wp-content/uploads/2014/11/ia18.pdf>, accessed in 12/03/2017.

Cuhra M., Traavik T., Bohn T., 2013. Clone-and age-dependent toxicity of a glyphosate commercial formulation and its active ingredient in *Daphnia magna*. *Ecotoxicology*. 22. 251–262, doi: 10.1007/s10646-012-1021-1.

Edge C.B., Gahl M.K., Thompson D.G., Houlahan J.E., 2013. Laboratory and field exposure of two species of juvenile amphibians to a glyphosate-based herbicide and *Batrachochytrium dendrobatidis*. *Sci Total Environ.* 444, 145–152, doi: 10.1016/j.scitotenv.2012.11.045.

Folmar L.C., Sanders H., Julin A., 1979. Toxicity of the herbicide glyphosate and several of its formulations to fish and aquatic invertebrates. *Arch Environ Contamin Toxicol.* 8, 269–278, doi: 10.1016/j.bbadis.2011.01.004.

Gallardo K.C., Verbel J.O., Freeman J.L., 2016. Toxicogenomics to Evaluate Endocrine Disrupting Effects of Environmental Chemicals Using the Zebrafish Model. *Curr Genomics.* 17(6), 515–527, doi: 10.2174/1389202917666160513105959.

Gerlai R., Lahav M., Guo S., Rosenthal A., 2000. Drinks like a fish: zebra fish (*Danio rerio*) as a behavior genetic model to study alcohol effects. *Pharmacol Biochem Behav.* 67, 773-782, [https://doi.org/10.1016/S0091-3057\(00\)00422-6](https://doi.org/10.1016/S0091-3057(00)00422-6).

Gerlai R., 2003. Zebra fish: an uncharted behavior genetic model. *Behav Genet.* 33, 461-468, doi: 10.1023/A:1025762314250.

Ingham P.W., 2009. The power of the zebrafish for disease analysis. *Hum Mol Genet.* 18, 107–112, doi: 10.1093/hmg/ddp091.

Jin, Y., Zhu, Z., Wang, Y., Yang, E., Feng, X., Fu, Z., 2016. The fungicide imazalil induces developmental abnormalities and alters locomotor activity during early

developmental stages in zebrafish. *Chemosphere* 153, 455e461, doi: 10.1016/j.chemosphere.2016.03.085.

Kreutzweiser D., Kingsbury P., Feng J., 1989. Drift response of stream invertebrates to aerial applications of glyphosate. *Bull Environ Contamin Toxicol.* 42, 331–338, doi: 10.1007/BF01699957.

Levin E.D., Bencan Z., Cerutti D.T., 2007. Anxiolytic effects of nicotine in *zebrafish*. *Physiol Behav.* 90, 54-58, doi: 10.1016/j.physbeh.2006.08.026

Liu, Z., Wang, Y., Zhu, Z., Yang, E., Feng, X., Fu, Z., Jin, Y., 2016. Atrazine and its main metabolites alter the locomotor activity of larval zebrafish (*Danio rerio*). *Chemosphere* 148, 163e170, doi: 10.1016/j.chemosphere.2016.01.007.

Lutte, A.H., Capiotti, K.M., da Silva, N.L., da Silva, C.S., Kist, L.W., Bogo, M.R., Da Silva, R.S., 2015. Contributions from extracellular sources of adenosine to the ethanol toxicity in zebrafish larvae. *Reprod. Toxicol.* 53, 82–91, doi: 10.1016/j.reprotox.2015.04.001.

Mercurio P., Flores F., Mueller J.F., Carter S., Negri A.P., 2014. Glyphosate persistence in seawater. *Mar Pollut Bull.* 85, 385–390, doi: 10.1016/j.marpolbul.2014.01.021.

Mitchell D.G., Chapman P.M., Long T.J., 1987. Acute toxicity of Roundup® and Rodeo® herbicides to rainbow trout, chinook, and coho salmon. *Bull Environ Contamin Toxicol.* 39, 1028–1035, doi: 10.1007/BF01689594.

Moustafa G.G., Shaaban F.E., Hadeed A.H.A., Elhady W.M., 2016. Immunotoxicological, biochemical, and histopathological studies on Roundup and Stomp herbicides in Nile catfish (*Clarias gariepinus*), *Vet World.* 9, 638–647, doi: 10.14202/vetworld.2016.638-647

Negga R., Rudd D. A., Davis N. S., Justice A. N., Hatfiels H. E., Valente A. L., Fields A. S., Fitsanakis V. A., 2011. Exposure to Mn/Zn Ethylene-bis-Dithiocarbamate and Glyphosate Pesticides Leads to Neurodegeneration in *Caenorhabditis elegans*; *Neurotoxicology.* 32, 331–341, doi: 10.1016/j.neuro.2011.02.002.

Nery L.R., Eltz N.S., Hackman C., Fonseca R., Altenhofen S., Guerra H.N., Freitas V.M., Bonan C.D., Vianna M.R.M., 2014. Brain intraventricular injection of amyloid- β in zebrafish embryo impairs cognition and increases Tau phosphorylation, effects reversed by lithium. PLoS One. 9, e105862, <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0105862>, doi: 10.1371/journal.pone.0105862.

Pelkowski S.D., Kapoor M., Richendrfer H.A., Wang X., Colwill R.M., Creton R., 2011. A novel high-throughput imaging system for automated analyses of avoidance behavior in *zebrafish* larvae. Behav Brain Res. 223, 135–144, doi: 10.1016/j.bbr.2011.04.033.

Pereira V.M., Bortolotto J.W., Kist L.W., Azevedo M.B., Fritsch R.S., Oliveira Rda. L., Pereira T.C., Bonan C.D., Vianna M.R.M., Bogo M.R., 2012. Endosulfan exposure inhibits brain AChE activity and impairs swimming performance in adult zebrafish (*Danio rerio*). Neurotoxicology. 33 (3), 469-75, doi: 10.1016/j.neuro.2012.03.005.

Pérez, J., Domingues, I., Monteiro, M., Soares, A.M., Loureiro, S., 2013. Synergistic effects caused by atrazine and terbuthylazine on chlorpyrifos toxicity to early life stages of the zebrafish *Danio rerio*. Environ. Sci. Pollut. Res. Int. 20, 4671e4680, doi: 10.1007/s11356-012-1443-6.

Relyea R.A., 2005. The lethal impact of Roundup on aquatic and terrestrial amphibians. Ecol Appl. 15, 1118–1124, doi: 10.1890/04-1291.

Reolon G.K., de Melo G.M., da Rosa J.G.D.S., Barcellos L.J.G., Bonan C.D., 2017. Sex and the Housing: Effects on Behavior, Cortisol Levels and Weight in Zebrafish. Behav Brain Res. 17, <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbr.2017.08.006>.

Roberts D.M., Buckley N.A., Mohamed F., Eddleston M., Goldstein D.A., Mehrsheikh A., Bleeke M.S., Dawson A.H., 2010. A prospective observational study of the clinical toxicology of glyphosate-containing herbicides in adults with acute self-poisoning. Clin Toxicol (Phila). 48, 129-136, doi: 10.3109/15563650903476491.

Roy N.M., Carneiro B., Ochs J., 2016. Glyphosate induces neurotoxicity in zebra fish.

Environ Toxicol Pharmacol. 42, 45–54, doi: 10.1016/j.etap.2016.01.003.

Tilton, F.A., Bammler, T.K., Gallagher, E.P., 2011. Swimming impairment and acetylcholinesterase inhibition in zebrafish exposed to copper or chlorpyrifos separately, or as mixtures. *Comp. Biochem. Physiol. C Toxicol. Pharmacol.* 153, 9e16. doi: 10.1016/j.cbpc.2010.07.008

Uren Webster T.M., Laing L.V., Florance H., Santos E.M., 2014. Effects of glyphosate and its formulation, Roundup, on reproduction in Zebrafish (*Danio rerio*). *Environ. Sci. Technol.* 48, 1271–1279, doi: 10.1021/es404258h.

Uren Webster T.M., 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, doi: 10.1186/s12864-015-1254-5.

Vendrell E., Ferraz D.G., Sabater C., Carrasco J.M., 2009. Effect of glyphosate on growth of four freshwater species of phytoplankton: a microplate bioassay. *Bull Environ Contam Toxicol.* 82. 538–542.

Wang C., Lin X., Li L.; Lin S., 2016. Differential Growth Responses of Marine Phytoplankton to Herbicide Glyphosate, *PLoS One.* 2016; 11(3): e0151633, doi: 10.1371/journal.pone.0151633.

Weber G.J., Sepúlveda M.S., Peterson S.M., Lewis S. S., Freeman J.L., 2013. Transcriptome Alterations Following Developmental Atrazine Exposure in Zebrafish Are Associated with Disruption of Neuroendocrine and Reproductive System Function, Cell Cycle, and Carcinogenesis. *Toxicol Sci.* 132(2), 458–466, doi: 10.1093/toxsci/kft017.

Williams, G. M., Kroes, R., Munro, I. C., 2000. Safety evaluation and risk assessment of the herbicide Roundup and its active ingredient, glyphosate, for human. *Regul. Toxicol. Pharmacol.* 31, 117–165, doi:10.1006/rtph.1999.1371.

Zhang S., Xu J., Kuang X., Li S., Li X., Chen D., Zhao X., Feng X., 2017. Biological impacts of glyphosate on morphology, embryo biomechanics and larval behavior in zebrafish (*Danio rerio*). *Chemosphere*. 181, 270-280, doi: 10.1016/j.chemosphere.2017.04.094.

Zoupa M., Machera K., 2017. Zebrafish as an Alternative Vertebrate Model for Investigating Developmental Toxicity - The Triadimefon Example. *Int J Mol Sci*. 18, 817, doi: 10.3390/ijms18040817.

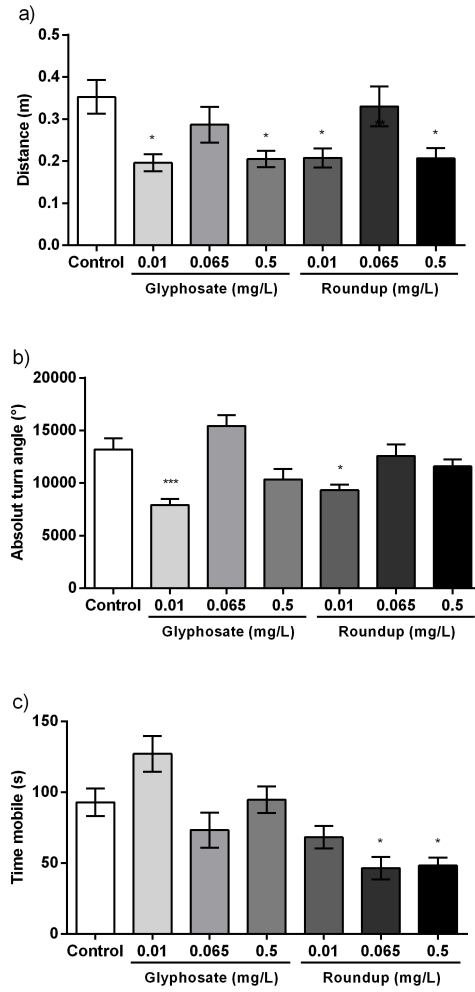


Figure 1. Exploratory behavior of glyphosate and Roundup[®]-treated zebrafish larvae. Distance traveled (a), absolute turn angle (b), time mobile (c). Data are expressed as the mean ± S.E.M. from 36 animals analyzed individually for each group and were analyzed by one-way analysis of variance (ANOVA) followed by post-hoc comparisons using Tukey corrections. (* indicates < 0.05, *** indicates p < 0.001).

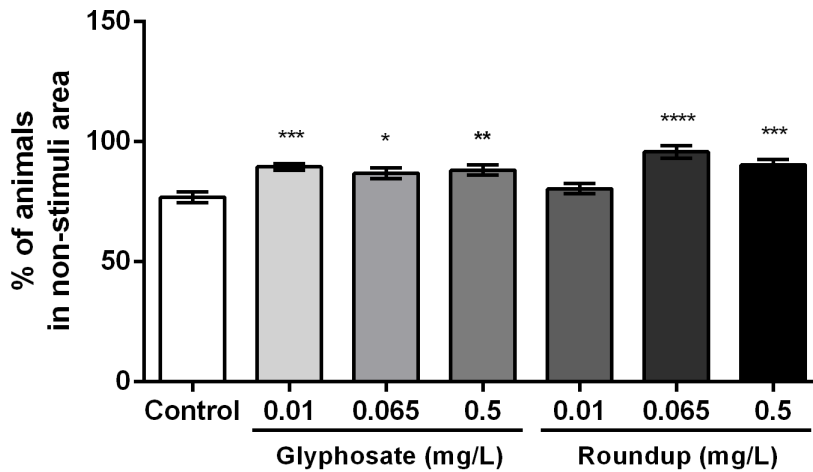


Figure 2. 7 dpf larvae escape behavior from an aversive stimulus (charts were plotted with means and S.E.M. (n = 45 per group), escape responses to a non-stimuli area). Data analyzed by one-way analysis of variance (ANOVA) followed by post-hoc comparisons using Tukey corrections. The animals exposed to glyphosate and Roundup[®] showed diminished escape responses when compared to control group (* indicates $p < 0.05$, ** indicates $p < 0.01$, *** indicates $p < 0.001$, **** indicates $p < 0.0001$).

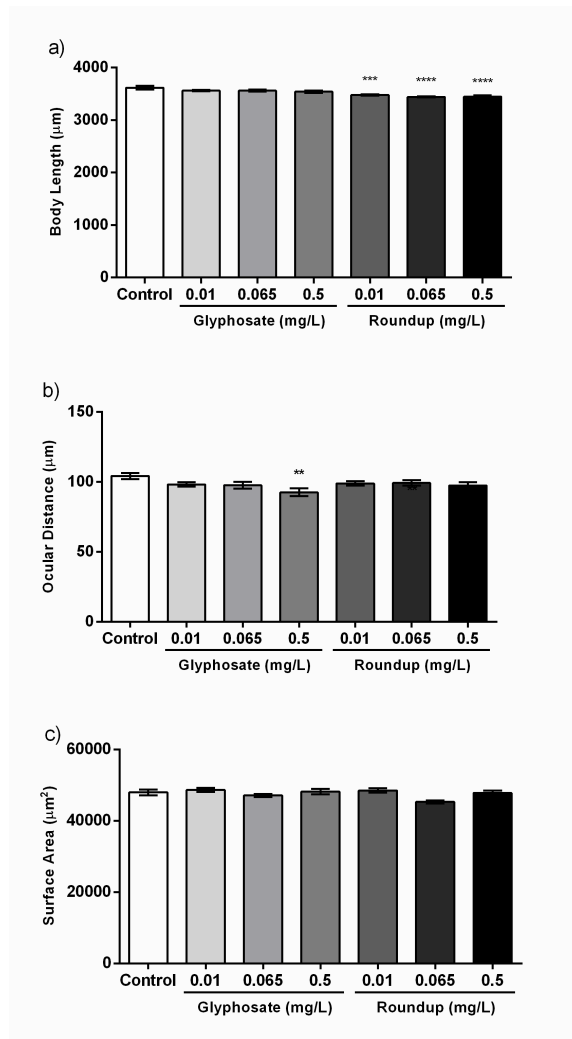


Figure 3. Morphological parameters of control, glyphosate and Roundup[®]-treated zebrafish larvae. Surface area (a), body length (b) and ocular distance (c). Data are expressed as mean \pm S.E.M. from 30 animals analyzed individually for each group and were analyzed by one-way analysis of variance (ANOVA) followed by post-hoc comparisons using Tukey corrections. (** indicates $p < 0.01$, *** indicates $p < 0.001$, **** indicates $p < 0.0001$).

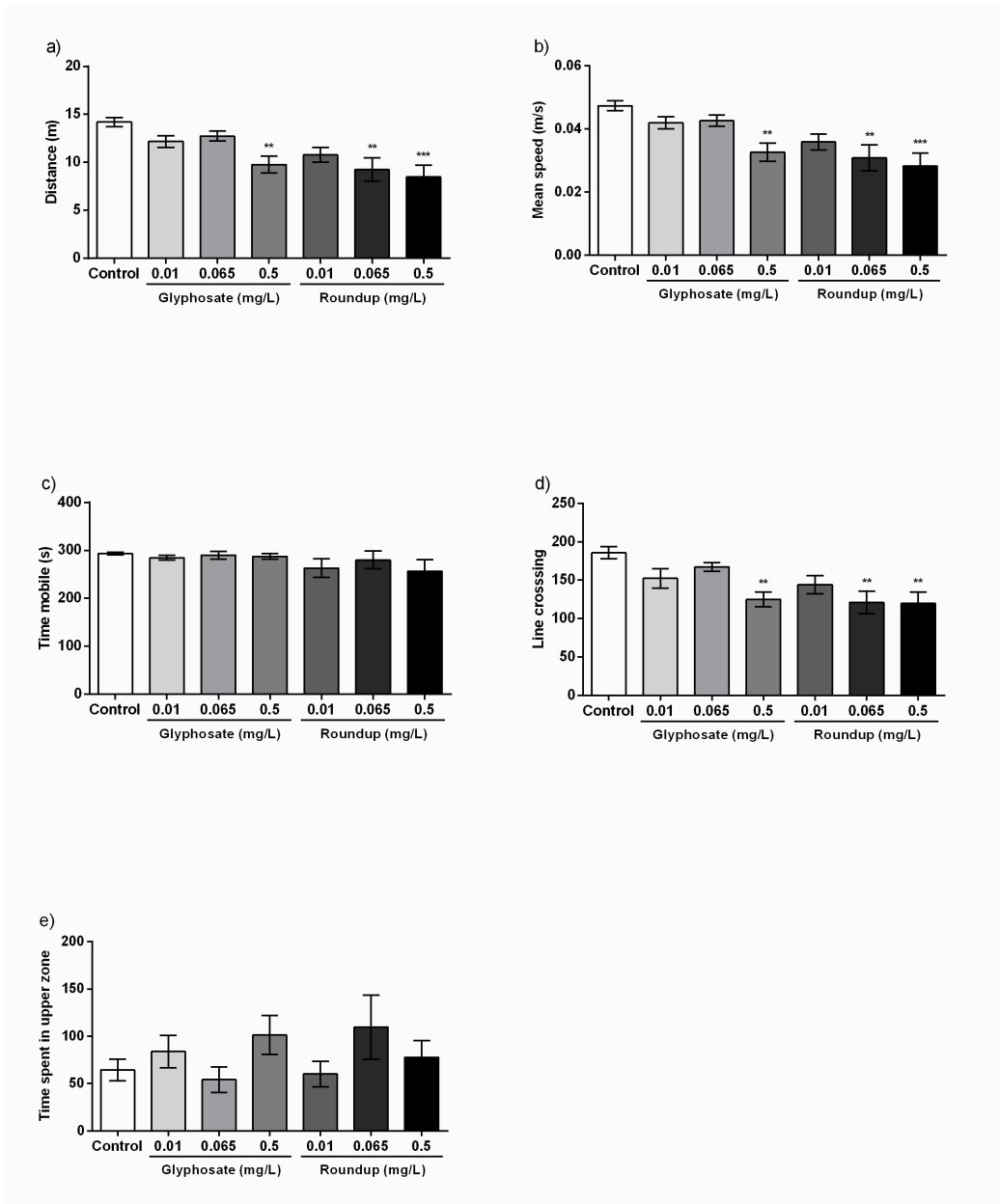


Figure 4. Exploratory behavior of control and glyphosate and Roundup[®]-treated adult zebrafish. Distance traveled (a), mean speed (b), time mobile (c), line crossing (d) and time spent in upper zone (e). Data are expressed as the mean \pm S.E.M. from 16 animals analyzed individually for each group and were analyzed by one-way analysis of variance (ANOVA) followed by post-hoc comparisons using Tukey corrections. (** indicates $p < 0.01$, *** indicates $p < 0.001$).

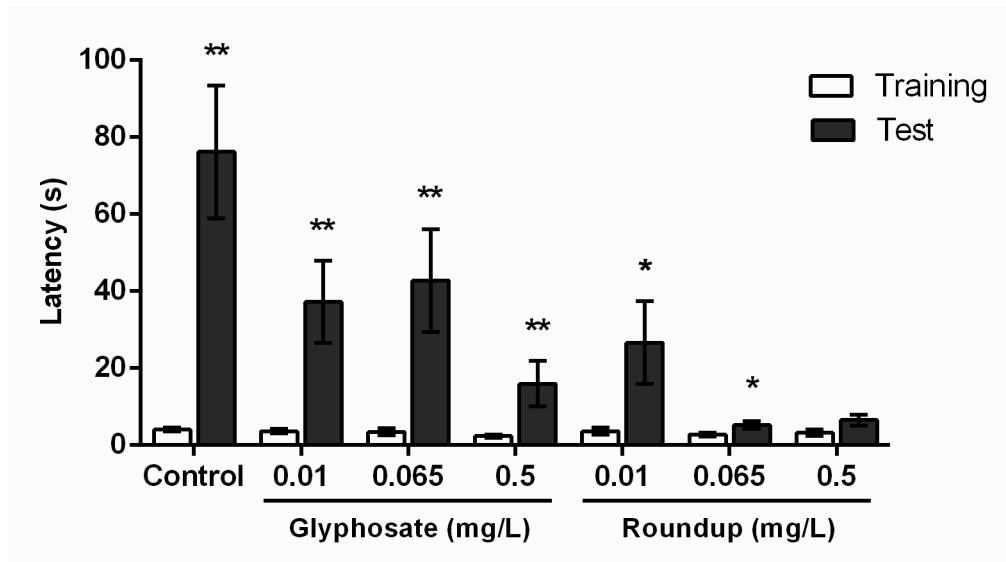


Figure 5. Inhibitory avoidance task performance on training and long-term memory test sessions of control and glyphosate and Roundup[®]-treated adult zebrafish after 96h of exposure. Data are presented as mean \pm S.E.M from 17 animals analyzed individually for each group. (* indicates $p < 0.05$, ** indicates $p < 0.01$). No differences were found between training performance among in 0.065 and 0.5 Roundup[®] treated groups as evaluated by Kruskal–Wallis test.

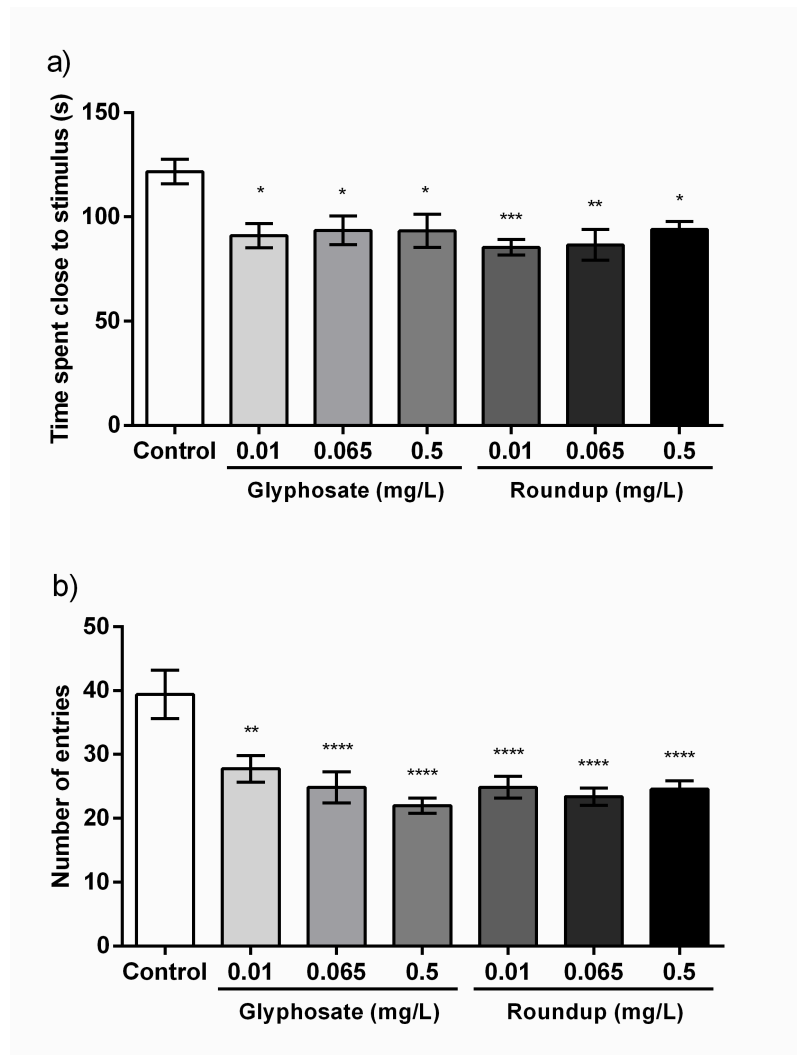


Figure 6. Effects of glyphosate and Roundup[®]-induced aggression deficits in zebrafish. The data are expressed as the mean \pm S.E.M. (n = 26 per group), and were analyzed by one-way analysis of variance (ANOVA) followed by post-hoc comparisons using Tukey corrections. (* indicates $p < 0.05$, ** indicates $p < 0.01$, *** indicates $p < 0.001$, **** indicates $p < 0.0001$).

4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O crescimento mundial da população tem forçado o aumento na produção de alimentos nos últimos anos. A abertura de novas fronteiras agrícolas, a intensificação do uso do solo, a utilização de fertilizantes de variedades melhoradas, o uso de agroquímicos, e, recentemente, a introdução de plantas transgênicas, além de outras, são tecnologias utilizadas visando a maior produção de alimentos (Oliveira e Brighenti, 2011).

Um pacote tecnológico para a obtenção de elevada produtividade das culturas necessita conter um componente de manejo adequado de plantas daninhas, o qual pode ser realizado basicamente com a utilização de herbicidas. Por isso, a agricultura brasileira cada vez mais tem feito uso desses insumos químicos, e isso acarreta em uma série de problemas ecológicos. Sua aplicação indiscriminada acarreta inúmeros problemas, tanto para saúde dos aplicadores e dos consumidores, como para o meio ambiente, contaminando o solo, a água e levando à morte plantas e animais.

O herbicida mundialmente mais utilizado é o glifosato, seu amplo uso em várias culturas tem-se mostrado vantajoso em relação a vários métodos de controle de plantas daninhas. Aspectos relacionados à toxicologia, ecotoxicologia, facilidade de manuseio, eficácia de controle, ganhos de produtividade, entre outros, tornaram esse herbicida um líder mundial de vendas. Porém, a contaminação do meio aquático por esse composto compromete a sanidade do ecossistema local e pode trazer prejuízos a população humana que faz uso desses recursos. Vários estudos têm demonstrado a existência e persistência do glifosato em corpos hídricos próximos a áreas de cultivo (Giesy et al., 2000).

Estudos sobre a toxicidade do glifosato e outros elementos químicos permitem determinar as respostas de um dado organismo à contaminação por estes elementos,

bem como avaliar o impacto e o efeito destes sobre células, tecidos e órgãos, e ainda inferir sobre possíveis perturbações metabólicas morfológicas e comportamentais (Pandurangi et al., 1995).

No estudo apresentado no Capítulo 1 desta dissertação, realizamos uma avaliação dos efeitos do herbicida glifosato na sua forma isolada e na sua forma comercial (Roundup[®]) sobre a morfologia e comportamento de larvas de peixe-zebra e sobre o comportamento do peixe-zebra na fase adulta. Este estudo demonstrou que a exposição do peixe-zebra ao glifosato ou ao Roundup[®] induz mudanças comportamentais e morfológicas em diferentes estágios de desenvolvimento deste animal.

Nossos resultados demonstraram que a exposição de larvas de peixe-zebra a concentração mais baixa e intermediária de glifosato na sua forma isolada não altera as medidas morfológicas, como o comprimento do corpo e a área superficial dos olhos. No entanto, a exposição à maior concentração (0,5 mg/L) pode induzir efeitos a longo prazo capazes de diminuir a distância ocular. A exposição a todas as concentrações de Roundup[®] (0.01, 0.065 e 0.5mg/L) em estágios iniciais de desenvolvimento foi capaz de diminuir o comprimento do corpo da larva. Este estudo mostrou que a exposição de 96h a esses herbicidas causa alterações morfológicas nas larvas de peixe-zebra.

Similarmente aos nossos resultados, um estudo conduzido por Zhang et al. (2017) também mostra que a exposição de larvas de peixe-zebra por 96h a concentrações de 100 a 400 mg/L de glifosato resultou em comprimentos de corpo mais curtos, olhos e cabeças menores. Curiosamente, na exposição à concentração mais baixa de glifosato (0,01mg/L) não houve diferenças morfológicas em comparação com o grupo controle, resultado também obtido em nosso estudo. Ressaltamos que as diferenças nas concentrações de glifosato e Roundup[®], além do tempo de tratamento,

podem influenciar nos padrões comportamentais observados nas larvas de peixe-zebra.

Estudos também mostraram que outros agentes tóxicos podem causar numerosas alterações morfológicas nas larvas de peixe-zebra. A exposição ao fungicida tebuconazol, durante 120h, foi capaz de aumentar a distância ocular em larvas expostas a 4 mg/L (Altenhofen et al., 2017). Um efeito semelhante também foi observado no estudo de Weber et al., (2013) onde larvas de peixe-zebra foram expostas a concentrações de até 10 ppm (perto do limite de solubilidade na água) da atrazina durante o seu desenvolvimento (de 1 a 120 hpf) e os dados mostraram que larvas em todos os tratamentos de atrazina tiveram um aumento significativo no comprimento da cabeça em comparação com o controle.

Além disso, o glifosato causou alterações comportamentais em animais que são submetidos ao tratamento no estágio larval. Nosso estudo demonstrou que a exposição ao glifosato e ao Roundup[®] na menor e na maior concentração (0,01 e 0,5 mg/mL) foram capazes de alterar o comportamento de natação das larvas de peixe-zebra, reduzindo a distância percorrida. Este efeito também foi observado no ângulo de giro absoluto dos animais na menor concentração (0,01 mg/L), o que indica que tanto o glifosato como o Roundup[®] são capazes de alterar o padrão de natação das larvas, independentemente da sua concentração.

Alguns estudos corroboram nossos resultados, também demonstrando que outros agentes tóxicos podem alterar parâmetros exploratórios em larvas de peixe-zebra. Andrade et al. (2016) mostraram que o fungicida carbendazim induziu mudanças na atividade locomotora de larvas de peixe-zebra com 120hpf e durante o período claro observaram-se uma diminuição significativa na distância percorrida em concentrações acima de 0,8 g/L. Jin et al. (2016) mostraram que a exposição ao fungicida de imazalil após 96 h, especialmente em altas concentrações, resultou em diminuição da atividade

locomotora em larvas de peixe-zebra. Tanto a distância, como a velocidade da natação foram significativamente menores nos grupos tratados com 100 e 300 mg/L de imazalil do que no grupo controle. Liu et al. (2016) e Pérez et al. (2013) mostraram que as distâncias dos grupos tratados com 100 e 300 mg/L após 120h de exposição ao herbicida atrazina, foram significativamente menores do que as do grupo controle.

Nossos achados demonstraram diferenças significativas no nado das larvas de peixe-zebra, no que se refere ao comportamento aversivo, após a exposição ao glifosato e ao Roundup[®], ou seja, houve um aumento do nado na região não estimulada da placa, quando comparado ao grupo controle. Esse efeito foi observado em todos os grupos, com exceção da concentração mais baixa de Roundup[®] (0,01mg/L). Através destes resultados, sugere-se que larvas de peixe-zebra expostas ao glifosato ou Roundup[®] podem ser mais suscetíveis à predação, pois seu estado locomotor diminuiu significativamente, após essa exposição ao herbicida.

Além disso, a exposição ao glifosato pode alterar a morfologia e o comportamento normais das larvas mesmo na concentração que é próxima à concentração ambiental permitida de glifosato (0,01 mg/L), indicando que o glifosato ambiental pode alterar os comportamentos do organismo e diminuir o movimento espontâneo das larvas.

Além das mudanças comportamentais nos estágios iniciais de desenvolvimento, a exposição prolongada ao glifosato e o Roundup[®] também podem causar alterações no comportamento do adulto. Nossas descobertas demonstraram que o glifosato e a exposição ao Roundup[®] reduziram a distância percorrida, a velocidade média e o cruzamento da linha em concentrações de 0,5 mg/L de glifosato e 0,065 e 0,5 mg/L de Roundup[®]. Outros estudos demonstram a mudança deste parâmetro com outros agentes tóxicos. Bortolotto et al. (2014) mostraram que o pesticida paraquat pode alterar os

parâmetros de locomoção em peixe-zebra adultos, resultando em diminuição da locomoção e distância percorrida 24 h após a injeção deste herbicida. Pereira et al. (2012) relataram neste estudo que, após a exposição durante 96h ao endosulfan, um pesticida organoclorado de amplo espectro que ainda é amplamente utilizado em muitos países em desenvolvimento, houve diminuição dos cruzamentos de linha, distância percorrida, velocidade média e ângulo de inclinação em peixes-zebra de adultos, quando comparado com os grupos de controle. Tilton et al. (2011) observaram que o clorpirifos, um pesticida organofosforado, reduziu significativamente a taxa de natação do animal adulto tratado durante 24 h, sendo que três animais no grupo de tratamento de clorpirifos, de maior concentração, apresentaram respostas tóxicas claras com contrações musculares à medida que nadavam.

Além disso, verificamos um comprometimento significativo na memória de longo prazo na tarefa de prevenção inibitória para o peixe-zebra adulto que ficou exposto a concentração mais alta de Roundup[®], sugerindo que esse pesticida induz efeitos neurotóxicos significativos. Entretanto, Pereira et al. (2012) demonstraram que a exposição ao endosulfan não promoveu comprometimento na formação de memória a longo prazo em peixes-zebra adultos. Já o estudo de Balbuena et al. (2015) foi capaz de mostrar que, depois de ingerir alimentos contaminados com glifosato, houve atrasos na memória de navegação de abelhas, levando mais tempo para realizar vôos diretos para o lar.

Sobre o comportamento agressivo dos peixes adultos, nossos resultados mostraram que o glifosato e o Roundup[®] mantêm os animais no segmento do aquário mais longe do estímulo, além de diminuir o número de entradas na zona onde há o estímulo, sugerindo uma diminuição do comportamento agressivo destes animais, em relação ao grupo controle.

As alterações observadas sugerem uma potencial toxicidade deste herbicida para as populações de peixes que habitam rios contaminados. Nossos dados geram preocupação sobre as concentrações ambientais permitidas de glifosato, já que, mesmo em concentrações próximas às concentrações ambientais, pode haver efeitos adversos para a saúde e mudanças comportamentais e morfológicas em populações de peixes selvagens. Os efeitos observados nos nossos experimentos mostram que houve pequenas diferenças entre os resultados gerados pelo glifosato na sua forma isolada e pelo glifosato na sua forma comercial (Roundup[®]), tanto nas larvas de peixe-zebra como nos peixes-zebra adultos, sugerindo mecanismos semelhantes de toxicidade em ambas as substâncias.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Programa de Análise de Resíduos de Agrotóxicos em Alimentos (PARA). Relatório de Atividades de 2011 e 2012. Brasília: Agência Nacional de Vigilância Sanitária; 2013.

Al-Imari L, Gerlai R. Sight of conspecifics as reward in associative learning in zebrafish (*Danio rerio*). *Behav Brain Res*. 2008; 189: 216–219

Altenhofen S, Nabinger DD, Wiprich MT, Pereira TCB, Bogo MR, Bonan CD. Tebuconazole alters morphological, behavioral and neurochemical parameters in larvae and adult zebrafish (*Danio rerio*). *Chemosphere*. 2017. 180: 483-490.

Andrade TS, Henriques JF, Almeida AR, Machado AL, Koba O, Giang PT, Soares AM, Domingues I. Carbendazim exposure induces developmental, biochemical and behavioural disturbance in zebrafish embryos. *Aquat. Toxicol*. 2016; 170: 390-399.

ANVISA, Manual de Procedimentos para Avaliação Toxicológica de Agrotóxicos, seus Componentes e Afins; Critérios para a Classificação Toxicológica; Anexo 3. Disponível em: <<http://s.anvisa.gov.br/wps/s/t/5T>> Acesso em: 10 de setembro de 2015.

Amarante J, Ozelito P, Santos TCR, Brito NM, Ribeiro ML. Métodos de extração e determinação do herbicida glifosato: breve revisão. *Quím. Nova*. 2002, vol.25, n.3, pp. 420-428.

Armiliato N, Ammar D, Nezzi L, Stralio M, Muller YM, Nazari EM. Changes in ultrastructure and expression of steroidogenic factor-1 in ovaries of zebrafish (*Danio rerio*) exposed to glyphosate. *Journal of Toxicology and Environmental Health*. 2014, Part A, v. 77, n. 7, p. 405-414.

Bai Q, Burton EA. Zebrafish models of Tauopathy. *Biochim Biophys Acta*. 2011; 1812: 353-363.

Bailey J, Oliveri A, Levin E; Zebrafish model systems for developmental neurobehavioral toxicology. *Birth Defects Res C Embryo Today*. 2013; 99: 14-23.

Baird C, Cann, M. *Environmental Chemistry*. 2. Nova York: Freeman, 2005.

Balbuena MS, Tison L, Hahn ML, Greggers U, Menzel R, Farina WM. Effects of sublethal doses of glyphosate on honeybee navigation. *J Exp Biol*. 2015; 218: 2799-2805.

Barbazuk WB, Korf I, Kadavi C, Heyen J, Tate S, Wun E, Bedell JA, McPherson JD, Johnson SL. The syntenic relationship of the zebrafish and human genomes. *Genome Res*. 2000; 1351-1358.

Blank M, Guerim LD, Cordeiro RF, Vianna MRM. A one-trial inhibitory avoidance task to *zebrafish*: rapid acquisition of an NMDA-dependent long-term memory. *Neurobiol Learn Mem*. 2009; 92: 529-534.

Boix N, Piqué E, Gómez-Catalán J, Teixidó E, Llobet JM. The zebrafish embryo as a model for studying oxidative stress effects during embryonic development. *Reproductive Toxicology*. 2013; 41: 25–26.

Bortolotto JW, Cognato GP, Christoff RR, Roesler LN, Leite CE, Kist LW, Bogo MR, Vianna MRM, Bonan CD. Long-term exposure to paraquat alters behavioral parameters and dopamine levels in adult zebrafish (*Danio rerio*). *Zebrafish*. 2014; 11: 142-153.

Brausch JM, Beall B, Smith PN. Acute and sub-lethal toxicity of three POEA surfactant formulations to *Daphnia magna*. *B Environ Contam Tox*. 2007; 78(6): 510–514.

Burns CJ, McIntosh LJ; Mink PJ, Jurek AM, Li AA. Pesticide Exposure and Neurodevelopmental Outcomes: Review of the Epidemiologic and Animal Studies. *J Toxicol Environ Health B Crit Rev*. 2013; 16: 3-4).

Cognato GP, Bortolotto JW, Blazina AR, Christoff RR, Lara DR, Vianna MR, Bonan CD. Y-Maze memory task in zebrafish (*Danio rerio*): The role of glutamatergic and cholinergic systems on the acquisition and consolidation periods. *Neurobiol Learn Mem*. 2012; 98: 321-328.

Duke SO, Lydon J, Koskinen W C, Moorman T B, Chaney R F e Hammerschmidt R. Glyphosate Effects on Plant Mineral Nutrition, Crop Rhizosphere

Microbiota, and Plant Disease in Glyphosate-Resistant Crops; *J Agric Food Chem.* 2012; 60: 10375–10397.

EPA U.S. Environmental Protection Agency. Pesticides. 2010. Disponível em: <www.epa.gov/pesticides> Acesso em 12 de setembro de 2016.

Filby AL, Paull GC, Hickmore TFA e Tyler CR. Unravelling the neurophysiological basis of aggression in a fish model; *BMC Genomics.* 2010; 11: 498.

Giacomini AC, Abreu MS, Giacomini LV, Siebel AM, Zimmerman FF, Rambo CL, Mocelin R, Bonan CD, Piato AL, Barcellos LJ. Fluoxetine and diazepam acutely modulate stress induced-behavior. *Behav Brain Res.* 2016; 296: 301-310.

Giesy JP, Dobson S, Solomon KR. Ecotoxicological Risk Assessment for Roundup Herbicide. *Rev. Environ. Contam. Toxicol.* 2000; 167: 35-120.

Goldsmith P. Zebrafish as a pharmacological tool: The how, why and when. *Curr. Opin. Pharmacol.* 2004. p. 504–512.

Grosell M, Wood CM. Copper uptake across rainbow trout gills mechanisms of apical entry. *Journal of Experimental Biology.* 2002; 205: 1179-1188.

Hahn ME, Timme-Laragy AR, Karchner SI, Stegeman JJ. Nrf2 and Nrf2-Related Proteins in Development and Developmental Toxicity: Insights from studies in Zebrafish (*Danio rerio*). *Free Radic Biol Med.* 2016; 88: 275–289.

Hove-Jensen B, Zechel DL, Jochimsen B. Utilization of Glyphosate as PhosphateSource: Biochemistry and Genetics of Bacterial Carbon-Phosphorus Lyase; Microbiol Mol Biol Rev. 2014; 78: 176–197.

Howe K, Clark MD, Torroja CF, Torrance J, Berthelot C, Muffato M, Collins JE, Humphray S, McLaren K, Matthews L, McLaren S, Sealy I, Caccamo M, Churcher C, Scott C, Barrett JC, Koch R, Rauch GJ, White S, Chow W, Kilian B, Quintais LT, Guerra-Assunção JA, Zhou Y, Gu Y, Yen J, Vogel JH, Eyre T, Redmond S, Banerjee R, Chi J, Fu B, Langley E, Maguire SF, Laird GK, Lloyd D, Kenyon E, Donaldson S, Sehra H, Almeida-King J, Loveland J, Trevanion S, Jones M, Quail M, Willey D, Hunt A, Burton J, Sims S, McLay K, Plumb B, Davis J, Clee C, Oliver K, Clark R, Riddle C, Elliot D, Threadgold G, Harden G, Ware D, Begum S, Mortimore B, Kerry G, Heath P, Phillimore B, Tracey A, Corby N, Dunn M, Johnson C, Wood J, Clark S, Pelan S, Griffiths G, Smith M, Glithero R, Howden P, Barker N, Lloyd C, Stevens C, Harley J, Holt K, Panagiotidis G, Lovell J, Beasley H, Henderson C, Gordon D, Auger K, Wright D, Collins J, Raisen C, Dyer L, Leung K, Robertson L, Ambridge K, Leongamornlert D, McGuire S, Gilderthorp R, Griffiths C, Manthravadi D, Nichol S, Barker G, Whitehead S, Kay M, Brown J, Murnane C, Gray E, Humphries M, Sycamore N, Barker D, Saunders D, Wallis J, Babbage A, Hammond S, Mashreghi-Mohammadi M, Barr L, Martin S, Wray P, Ellington A, Matthews N, Ellwood M, Woodmansey R, Clark G, Cooper J, Tromans A, Grafham D, Skuce C, Pandian R, Andrews R, Harrison E, Kimberley A, Garnett J, Fosker N, Hall R, Garner P, Kelly D, Bird C, Carter NP, Harrow J, Ning Z, Herrero J, Searle SM, Enright A, Geisler R, Plasterk RH, Lee C, Westerfield M, de Jong PJ, Zon LI, Postlethwait JH, Nüsslein-Volhard C, Hubbard TJ,

Roest Crollius H, Rogers J, Stemple DL. The zebrafish reference genome sequence and its relationship to the human genome. *Nature*. 2013; 496: 498-503.

Jayasumana C, Gunatilake S, Senanayake P. Glyphosate, Hard Water and Nephrotoxic Metals: Are They the Culprits Behind the Epidemic of Chronic Kidney Disease of Unknown Etiology in Sri Lanka?; *Int J Environ Res Public Health*. 2014; 11: 2125–2147.

Jin Y, Zhu Z, Wang Y, Yang E, Feng X, Fu Z. The fungicide imazalil induces developmental abnormalities and alters locomotor activity during early developmental stages in zebrafish. *Chemosphere*. 2016; 153: 455-461.

Kalueff AV, Stewart AM, Gerlai R. Zebrafish as an emerging model for studying complex brain disorders. *Trends Pharmacol*. 2014; 35, 63–75.

Kalueff AV, Gebhardt M, Stewart AM, Cachat JM, Brimmer M, Chawla JS, Craddock C, Kyzae EJ, Roth A, Landsman S, Gaikwad S, Robinson K, Baatrup E, Tierney K, Shamchuk A, Norton W Miller N, Nicolson E, Braubach O, Gilman CP, Pittman J, Rosenberg DB, Gerlai R, Echevarria D, Lamb E, Neuhauss SB, Weng W, Bally-Cuif L and Schneider H. Towards a Comprehensive Catalog of Zebrafish Behavior 1.0 and Beyond; *Zebrafish*. 2013; 10: 70–86.

Karnik I, Gerlai R. Can zebrafish learn spatial tasks? An empirical analysis of place and single CS-US associative learning. *Behav Brain Res*. 2012; 233(2): 415-421.

Kent B, Magnani E, Walsh MJ, Sadler KC. UHRF1 regulation of Dnmt1 is required for pre-gastrula zebrafish development. *Developmental Biology*. 2016; 292(4): 892–899.

Kimmel GL, Kimmel CA, Williams AL, DeSesso JM. Evaluation of developmental toxicity studies of glyphosate with attention to cardiovascular development; *Crit Rev Toxicol*. 2013; 43: 79–95.

Larson SJ, Capel PD, Goolsby DA, Zaugg SD and Sandstrom MW. Relations between pesticide use and riverine flux in the Mississippi river basin. *Chemosphere*. 1995; 31: 3305–3321.

Liu S and Leach SD. Zebra fish models for cancer. *Annu Rev Pathol*. 2011; 28: 71-93.

Liu Z, Wang Y, Zhu Z, Yang E, Feng X, Fu Z, Jin Y. Atrazine and its main metabolites alter the locomotor activity of larval zebrafish (*Danio rerio*). *Chemosphere*. 2016; 148: 163-170.

Liu J, Zhou Y, Qi X, Chen J, Chen W, Qiu G, Wu Z, Wu N. CRISPR/Cas9 in zebrafish: an efficient combination for human genetic diseases modeling. *Hum Genet*. 2017; 136(1): 1-12.

Málaga Trillo E, Salta E, Figueras A, Panagiotidis C and Sklaviadis T. Fish models in prion biology: underwater issues. *Biochim Biophys Acta*. 2011; 1812: 402-

414.

Meyer A, Chrisman J and Moreira JC and Koifman S. Cancer mortality among agricultural workers from Serrana Region, state of Rio de Janeiro, Brazil. *Environ Res.* 2013; 93:264-271.

Mesnager R, Defarge N, Vendomois JS and Seralini GE. Major Pesticides Are More Toxic to Human Cells Than Their Declared Active Principles. *Biomed Res Int.* 2014; 2014: 179-191.

Miklósi A and Andrew RJ. The Zebrafish as a model for behavioral studies. *Zebrafish.* 2006; 3: 227-234.

Miller NY and Gerlai R. Shoaling in zebrafish: What we don't know. *Rev Neurosci.* 2011; 22: 17–25.

Murray B, Wahlström B and Pronczuk J. Childhood Pesticide Poisoning – information for advocacy and action. Food and Agriculture Organization (FAO). 2014, United Nations Environment Programme (UNEP), World Health Organization (WHO).

Muthappa NA, Gupta S, Yengkokpam S, Debnath D, Kumar N, Pal AK and Jadhao SB; Lipotropes promote immunobiochemical plasticity and protect fish against low-dose pesticide-induced oxidative stress. *Cell Stress Chaperones.* 2014; 19: 61–81.

Mwaffo V, Butail S, Porfíria M; *In-silico* experiments of zebrafish behaviour:

modeling swimming in three dimensions. *Sci Rep.* 2017; 7: 39877.

Negga R, Rudd DA, Davis NS, Justice AN, Hatfiels HE, Valente AL, Fields AS and Fitsanakis VA. Exposure to Mn/Zn Ethylene-*bis*-Dithiocarbamate and Glyphosate Pesticides Leads to Neurodegeneration in *Caenorhabditis elegans*; *Neurotoxicology.* 2011; 32: 331–341.

Norton WH. Toward developmental models of psychiatric disorders in zebrafish. *Front. Neural Circuits.* 2013; 7: 79.

Oliveira RF. Mind the fish: zebrafish as a model in cognitive social neuroscience. *Front Neural Circuits.* 2013; 7: 131.

Oliveira RF, Silva JF and Simoes JM. Fighting zebrafish: Characterization of aggressive behavior and winner-loser effects. *Zebrafish.* 2011;8: 73–81.

Oliveira MF, Brighenti AM. Comportamento dos Herbicidas no Ambiente. *Embrapa.* 2011; 11: 263.

Organização Pan-americana de Saúde/Organização Mundial de Saúde. Manual de Vigilância da saúde de populações expostas a agrotóxicos. Brasília; 2016.

Pandurangi R, Petras M, Ralph M, Vrzoc M. Alkaline single cell (comet): assay and genotoxicity monitoring using bullhead and carp. *Environmental and Molecular Mutagenesis.* 1995; 26: 345-356.

Panula P, Chen YC, Priyadarshini M, Kudo H, Semenova S, Sundvik M and Sallinen V. The comparative neuroanatomy and neurochemistry of zebrafish CNS systems of relevance to human neuropsychiatric diseases. *Neurobiol Dis.* 2010; 40: 46-57.

Peixoto F. Comparative effects of the Roundup and glyphosate on mitochondrial oxidative phosphorylation, *Chemosphere*; 2005; 61: 1115–1122.

Pereira VM, Bortolotto JW, Kist LW, Azevedo MB, Fritsch RS, Oliveira R da L, Pereira TC, Bonan CD, Vianna MRM, Bogo MR. Endosulfan exposure inhibits brain AChE activity and impairs swimming performance in adult zebrafish (*Danio rerio*). *Neurotoxicology.* 2012; 33 (3): 469-475.

Pérez J, Domingues I, Monteiro M, Soares AM, Loureiro S. Synergistic effects caused by atrazine and terbuthylazine on chlorpyrifos toxicity to early life stages of the zebrafish *Danio rerio*. *Environ. Sci. Pollut. Res. Int.* 2013; 20: 4671-4680.

Peterson RT, Nass R, Boyd WA, Freedan JH, Dong K and Narahashi T. Use of non-mammalian alternative models for neurotoxicological study. *Neurotoxicology.* 2008; 29: 546-555.

Pollegioni L, Schonbrunn E and Siehl D; Molecular basis of glyphosate resistance: Different approaches through protein engineering; *FEBS J.* 2012; 278: 2753-2766.

Porseryd T, Volkova K, Caspillo HR, Källman T, Dinnetz P, Hällström IP; Persistent Effects of Developmental Exposure to 17 α -Ethinylestradiol on the Zebrafish (*Danio rerio*) Brain Transcriptome and Behavior; *Front Behav Neurosci*. 2017; 11: 69.

Rico EP, Rosemberg DB, Seibt KJ, Capiotti KM, Da Silva RS and Bonan CD. Zebrafish neurotransmitter systems as potential pharmacological and toxicological targets. *Neurotoxicol Teratol*. 2011; 33: 608-617.

Richards RP and Baker DB. Pesticide concentration patterns in agricultural drainage networks in the Lake Erie basin. *Environmental Toxicology and Chemistry*. 1993; 12:13–26.

Sammons RD and Gaines TA. Glyphosate resistance: state of knowledge. *Pest Manag Sci*. 2014; 70(9): 1367–1377.

Samsel A and Seneff S. Glyphosate, pathways to modern diseases III: Manganese, neu-rogical diseases, and associated pathologies; *Surg Neurol Int*. 2015; 6: 45.

Sarcinelli PN, Pereira AC, Mesquita SA, Oliveira-Silva JJ, Meyer A, Menezes MA, Alves SR, Mattos RC, Moreira JC and Wolff M. Dietary and reproductive determinants of plasma organochlorine levels in pregnant women in Rio de Janeiro. *Environ Res*. 2013; 91:143–150.

Séralini GE, Clair E, Mesnage R, Gress S, Defarge N and Malatesta M. Republished study: Long-term toxicity of a Roundup herbicide and a Roundup-tolerant genetically modified maize. *Environ Sci Eur.* 2014; 26:14.

Stamatis N, Hela D, Triantafyllidis V, Konstantinou I; Spatiotemporal Variation and Risk Assessment of Pesticides in Water of the Lower Catchment Basin of Acheloos River, Western Greece; *Scientific World Journal.* 2013.

Sugeng AJ, Beamer PI, Lutz EA and Rosales CB. Hazard-Ranking of Agricultural Pesticides for Chronic Health Effects in Yuma County. *Sci Total Environ.* 2013; 35-41.

Tilton FA, Bammler TK, Gallagher EP. Swimming impairment and acetylcholinesterase inhibition in zebrafish exposed to copper or chlorpyrifos separately, or as mixtures. *Comp. Biochem. Physiol. C Toxicol. Pharmacol.* 2011; 153: 9-16.

Uren Webster TMU and Santos EM. Global transcriptomic profiling demonstrates induction of oxidative stress and of compensatory cellular stress responses in brown trout exposed to glyphosate and Roundup. *BMC Genomics.* 2015; 16: 32.

Weber GJ, Sepúlveda MS, Peterson SM, Lewis SS, Freeman JL. Transcriptome Alterations Following Developmental Atrazine Exposure in Zebrafish Are Associated with Disruption of Neuroendocrine and Reproductive System Function, Cell Cycle, and Carcinogenesis. *Toxicol Sci.* 2013; 132(2): 458–466.

Ye M, Beach J, Martin JW and Senthilselvan A. Occupational Pesticides Exposures and Respiratory Health. *Int. J. Environ. Res. Public Health*. 2013; 10: 6442-6471.

Zhang S, Xu J, Kuang X, Li S, Li X, Chen D, Zhao X, Feng X. Biological impacts of glyphosate on morphology, embryo biomechanics and larval behavior in zebrafish (*Danio rerio*). *Chemosphere*.2017; 181: 270-280.

ANEXO



Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA, INOVAÇÃO E DESENVOLVIMENTO
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

Ofício 06/2016 - CEUA

Porto Alegre, 21 de janeiro de 2016.

Prezado Sr(a). Pesquisador(a),

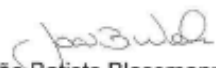
A Comissão de Ética no Uso de Animais da PUCRS apreciou e aprovou seu Protocolo de Pesquisa, registro CEUA 15/00493 intitulado **"Efeitos da exposição ao glifosato sobre parâmetros comportamentais e neuroquímicos em Peixe-Zebra"**.

Sua investigação, respeitando com detalhe as descrições contidas no projeto e formulários avaliados pela CEUA, está **autorizada** a partir da presente data.

Informamos que é necessário o encaminhamento de relatório final quando finalizar esta investigação. Adicionalmente, ressaltamos que conforme previsto na Lei no. 11.794, de 08 de outubro de 2008 (Lei Arouca), que regulamenta os procedimentos para o uso científico de animais, é função da CEUA zelar pelo cumprimento dos procedimentos informados, realizando inspeções periódicas nos locais de pesquisa.

Nº de Animais	Espécie	Duração do Projeto
1.092	Danio rerio	08/2015 – 07/2017

Atenciosamente,


Prof. Dr. João Batista Blessmann Weber
Coordenador da CEUA/PUCRS

Ilma. Sra.
Profa. Dra. Carla Denise Bonan
FABIO
Nesta Universidade

PUCRS

Campus Central
Av. Ipiranga, 6681 - P. 99 - Portal Tecnopuc - sala 1512
CEP: 90619-900 - Porto Alegre/RS
Fone: (51) 3353-6365
E-mail: ceua@pucrs.br



Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul
Pró-Reitoria Acadêmica
Av. Ipiranga, 6681 - Prédio 1 - 3º. andar
Porto Alegre - RS - Brasil
Fone: (51) 3320-3500 - Fax: (51) 3339-1564
E-mail: proacad@pucrs.br
Site: www.pucrs.br/proacad