

**Genotoxicidade da associação entre
glifosato e extrato celular de *Microcystis
aeruginosa* em tilápia do Nilo
(*Oreochromis niloticus*)**

**Genotoxicity of glifosate-*Microcystis
aeruginosa* cell extract association in Nile
tilapia (*Oreochromis niloticus*)**

Aniê Ieda Francabandiera¹, Cleiton Inácio Ramos¹,
Tatiana Martins de Oliveira³, Elisabete Hiromi Hashimoto⁴,
Tatiana Peres Vanzella⁵, Ilce Mara de Syllos Cólus⁶,
Maria do Carmo Bittencourt de Oliveira⁷, Elisa Yoko Hirooka⁸

Resumo

A co-ocorrência de *Microcystis aeruginosa* toxigênica e herbicidas à base de glifosato, como o Roundup® já é um fato evidente, devido a eutrofização de corpos d'água e a lixiviação do defensivo agrícola aplicado no campo. Neste estudo analisou-se o efeito genotóxico desta associação em tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) utilizando os testes de micronúcleo e cometa. Os resultados apontaram genotoxicidade em peixe devido à exposição ao Roundup® e ao extrato celular de *Microcystis aeruginosa* toxigênica, com a tendência desta toxidez mesmo em doses subcrônicas.

Palavras-chave: Glifosato, *Microcystis*, Tilápia.

¹ Mestre pelo Programa de Pós-Graduação em Ciência de Alimentos, DCTA/ CCA/ UEL.

²Discente do curso de Zootecnia, Bolsista PIBIC/CNPq-UEL.

³ Discente do curso de Zootecnia, Bolsista IC/UEL.

⁴ Doutora pelo Programa de Pós-Graduação em Ciência de Alimentos, DCTA/ CCA/ UEL.

⁵ Mestre pelo Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular CCB/ UEL.

⁶ Docente do Departamento de Biologia Geral/ CCB/ Universidade Estadual de Londrina-UEL.

⁷ Docente da Escola Superior de Agricultura Luis de Queiroz – ESALQ/Piracicaba

⁸ Docente do Depto. Ciência e Tecnologia de Alimentos DCTA/ CCA/ Universidade Estadual de Londrina-UEL. Endereço para correspondência: Caixa Postal 6001 - Cep: 86051-990- Londrina -PR. E-mail: elisahirooka@hotmail.com; telefone: 3371-4575.

Abstract

The co-occurrence of toxigenic *Microcystis aeruginosa* and the herbicide based on glyphosate as Roundup® is a real fact, due to the eutrophication of water bodies and leaching of the herbicide applied in field. The aim of this study was to evaluate the genotoxic effect of such association in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) by micronucleous and comet assay. The data indicated genotoxicity in fish due to exposure of Roundup® and toxigenic *Microcystis aeruginosa* cell extract association, showing a trend of toxicity even though in sub-chronic dose.

Key words: Glyphosate, *Microcystis*, Tilapia.

INTRODUÇÃO

A poluição aumenta a concentração de nutrientes devido a eutrofização, propiciando multiplicação exacerbada de cianobactérias toxigênicas, com destaque a *Microcystis aeruginosa*, produtora de ficotoxina pertencente ao grupo de microcistinas ⁽¹⁾. A hepatotoxicidade de microcistinas em mamíferos e peixes é um fato comprovado, sendo potentes inibidores de proteína fosfatase 1 e 2A, causando fosforilação de proteína com efeito citotóxico e promotor de tumor ⁽²⁾.

Mais de 80 variantes de microcistina detectados caracterizam-se como um heptapeptídeo cíclico constituído de cinco aminoácidos comuns e dois L-aminoácidos variantes ⁽³⁾. A presença de *Microcystis* spp. também indica risco adicional de contaminação por endotoxinas (lipopolissacarídeos – LPS), constituinte da membrana externa de parede celular, por serem procariotos Gram negativos. As endotoxinas aumentam o acúmulo de água no intestino, incrementando a absorção de microcistina e outros contaminantes ⁽⁴⁾.

O glifosato [N-(fosfonometil)glicina], denominado Roundup®, é o principal componente deste herbicida mais comercializado no mundo ⁽⁵⁾. A Monsanto perdeu

recentemente a sua patente criada em 1974, permitindo produção de genéricos ⁽⁶⁾. *US Environmental Protection Agency*-EPA classificou este princípio ativo em grau IV, i.e. menor toxicidade, mas o Roundup® induz disfunção do ciclo celular devido ao sinergismo entre o glifosato e surfactantes da fórmula comercial, indicando participação de outros componentes ⁽⁷⁾.

A co-ocorrência de cianobactérias e herbicida pode decorrer por meio da lixiviação de plantações tratadas com esse defensivo agrícola em áreas próximas à produção de tilápia, contaminando lençóis freáticos, nascentes e corpos d'água abastecedores de piscicultura.

Neste estudo foi utilizada a Tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*), por ser o peixe mais cultivado e comercializado na América do Sul, com perspectiva de introdução na Europa. Além do valor comercial, facilidade de manejo reprodutivo e sabor neutro, a importância do gênero se estende por se encontrar em estuários em todo o mundo. A tilápia apresenta respostas rápidas a alterações ambientais, podendo destinar-se para observações de indicadores ambientais ⁽²⁾.

Neste trabalho foi avaliado o efeito genotóxico da ocorrência simultânea de herbicida à base de glifosato e *Microcystis aeruginosa* produtora de microcistina, simulando um ambiente com intenso desenvolvimento agropecuário.

MATERIAL E MÉTODOS

Animal experimental e manejo

Tilápias do Nilo (*Oreochromis niloticus*) foram obtidos da Estação de Piscicultura da Universidade Estadual de Londrina (EPUEL), sendo os alevinos (74,95 ±15 gramas) sexualmente revertidos a machos, administrando-se 60 mg/Kg de metil-

testosterona na ração. Foram utilizados 30 animais tratamento. O experimento foi iniciado no 12º dia após o alojamento no tanque, para aclimação e neutralização de estresse devido ao manejo.

O teor de oxigênio dissolvido e temperatura da água foram monitorados a cada três dias (oxímetro digital modelo YSI 55/12 FT, Fondriest Environmental Inc.), e os níveis de amônia e nitrito a cada 15 dias.

Herbicida

Roundup Original® (Monsanto do Brasil) contéve basicamente o isopropilamina de glifosato e polioxietileno amina (POEA) para impedir a formação de gotas, aumentando a área de contato com a superfície foliar. Para o ensaio de imersão utilizou-se doses com 2,4 mg de isopropilamina de glifosato (equivalente a 5 µL de Roundup®) por litro de água.

Extrato celular de M. aeruginosa

M. aeruginosa cepa BCCUSP 262 produtora de microcistina-LR foi cultivada em meio BG-11 pH 7,4, climatizada a 23-24°C no Laboratório de Microalgas da Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, ESALQ – USP, Piracicaba. Após a contagem celular em câmara de Fuchs-Rosenthal, o cultivo foi imediatamente centrifugado (11000 xg, 23º C) e precipitado, congelado e descongelado por 8 vezes consecutivas, proporcionando lise celular e liberação de microcistinas (MCs). O material liofilizado foi denominado de extrato celular de *M. aeruginosa*. A dose injetada intraperitonealmente (i.p.) em tilápia consistiu deste extrato celular diluído em solução fisiológica, correspondente a 1x10⁵ células/ Kg p.c. (peso corpóreo).

Delineamento experimental

O experimento foi realizado na EPUEL, durante 185 dias, sendo os animais alocados em tanque plástico de 500 litros, com água de poço artesiano previamente armazenada em caixas d'água com aquecedores e aeradores. Os tratamentos consistiram de 60 animais divididos em: (i), controle negativo e (ii), i.p. *M. aeruginosa* e imersão em glifosato. As doses de extrato celular de *M. aeruginosa* e glifosato utilizadas foram consideradas subletais, baseadas em estudo prévio (8). As doses de extrato celular foram injetados i.p. nos dias t_{62} , t_{116} e t_{170} e imersos em tanque com glifosato nos tempos A (t_{38} , t_{40} e t_{42}), B (t_{92} , t_{94} e t_{96}) e C (t_{146} , t_{148} , t_{150}). Cada exposição ao glifosato foi realizada em 3 dias, procedendo 24 h de imersão (5 µL de Roundup®/L, fluxo de água fechado), intercalado com 24 horas de renovação de água (fluxo de água aberto), para evitar o acúmulo de amônia.

O sangue foi coletado da veia caudal do peixe (seringas heparinizadas de 1mL) e destinado ao Teste de Micronúcleo (t_{63} , t_{97} , t_{151} e t_{171}) e Ensaio Cometa (t_{97} , t_{117} , t_{151} e t_{171}).

Ensaio de Cometa (Single Cell Gel Electrophoresis)

O ensaio de cometa foi realizado segundo a metodologia de Singh (9) modificada por Speit e Hartmann (10). Duas lâminas por animal foram confeccionadas e cobertas com agarose 1,5 %, secas por 24 h e armazenadas a 4 °C. A seguir, adicionou-se 15 µL de suspensão de eritrócito (10 µL de sangue em 1000 µL de salina tamponada) homogeneizada com 120 µL de agarose a 0,5% e cobriu-se com lamínula, seguido de imersão em solução de lise por 24 h a 4 °C. As lâminas foram lavadas e procedeu-se eletroforese a 25 V e 300 mA (0,8-1,0 V/cm) por 20 minutos em tampão alcalino gelado (NaOH 300 mM, EDTA 200 mM, pH 13,0) e neutralizadas (Tris 0,4 M-HCl pH 7,5) por 3 repetições de 5 min. As lâminas foram fixadas em

etanol absoluto por 10 min, secas e armazenadas a 4 °C até a análise. As lâminas foram coradas com 90 µL de solução aquosa de brometo de etídio (0,20 mg/mL) e observadas em microscópio de fluorescência (1000x, filtro de excitação de 515 – 560 nm e filtro de barreira de 590 nm). Para cada animal analisou-se 100 nucleóides de eritrócitos e as classes de cometa registradas segundo KOBAYASHI et al. ⁽¹¹⁾: 0 (sem formação de cauda), 1 (cauda menor que 1 vez o diâmetro do nucleóide), 2 (cauda entre 1-2 vezes o diâmetro do nucleóide) e 3 (cauda maior que 2 vezes o diâmetro do nucleóide) e a somatória calculada empregando a equação: (Ax0) + (Bx1) + (Cx2) + (Dx3), onde as letras maiúsculas representaram o número de ocorrência de cada escore.

Teste de Micronúcleo

Os eritrócitos foram fixados em lâmina com metanol absoluto por 10 min e corados com Giemsa 5 % diluído em tampão fosfato pH 6,8 (4,0827g KH₂PO₄; 7,099g Na₂HPO₄ / L) por 10 min, lavada com água, seca e montada para uso permanente com Entellan (Merck, Darmstadt, Germany). Para análise citológica (1000x, microscopia) procedeu-se contagem de 2000 eritrócitos por animal, sendo a frequência de micronúcleo registrada.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A qualidade da água monitorada no decorrer de 185 dias de experimento, destinada à avaliação de efeito subcrônico da associação glifosato – extrato celular de *M. aeruginosa* BCCUSP 262, manteve em nível aceitável, não ocorrendo alteração que requeresse intervenção no manejo do cultivo de peixe.

A tabela 1 apresenta o escore médio de cometa dos tratamentos, sendo que a figura 1 representa análise detalhada da frequência de classes no decorrer de experimento. A tabela 2, mostra resultados do teste de micronúcleo e avalia a irreversibilidade do efeito da combinação de glifosato com extrato celular de uma cianobactéria toxigênica, na tentativa de simular a produção de peixe em ambiente com constante lixiviação de herbicida em corpo d'água eutrofizado. Para análise de genotoxicidade procederam-se os testes de cometa e micronúcleo, sendo a eficácia destes ensaios em peixe já comprovada na literatura ^(11,12,13).

Tabela 1. Ensaio de cometa em sangue de tilápia exposta simultaneamente a Roundup® e extrato celular de *M. aeruginosa* BCCUSP 262.

Exposição		Escore médio de cometa*	
Dias	N	Controle Negativo	Tratamento
97	6	190 ± 39 ^a	151 ± 35 ^a
117	6	108 ± 16 ^b	178 ± 33 ^a
151	6	120 ± 21 ^b	177 ± 23 ^a
171	6	101 ± 15 ^b	145 ± 19 ^a

(*) Médias obtidas pela classificação de 100 nucleóides por animal. Análise de Variância (ANOVA) do escore médio de cometa. Letras iguais na mesma linha não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$). Antes do dia 97 não houve dados suficientes para comparação devido a problemas durante a coleta de amostra e /ou processamento de análise.

Conforme tabela 1, a partir de t_{117} , os animais submetidos à exposição simultânea de glifosato e extrato celular de *M. aeruginosa* apresentaram o escore significativamente maior (178 ± 33) em relação ao controle negativo (108 ± 16), indicando

dano genético causado pela combinação do Roundup® e extrato celular de *M. aeruginosa* ($p < 0,05$). Os escores em t_{151} e t_{171} também apresentaram o mesmo perfil de resposta perante teste de cometa, se comparado ao controle negativo ($p < 0,05$).

Entretanto, a associação de glifosato com extrato celular de cianobactéria toxigênica, no nível de tratamento desta experiência, ao longo de t_{97} a t_{171} (151 ± 35 a 145 ± 19), não causou variação significativa do escore médio ($p < 0,05$). Apesar da densidade de tilápia (5,6 g/L) se apresentar em nível aceitável para a criação intensiva (25 a 40 g/L)⁽¹⁴⁾, observou-se escore de cometa relativamente alto em t_{97} (tabela 1) indicando provável estresse devido ao aumento nos valores de amônia. Este nível de amônia ($< 3,7$ mg/L, dados não apresentados) ainda permitiu manter a criação sem necessidade de manejo especial⁽¹⁴⁾.

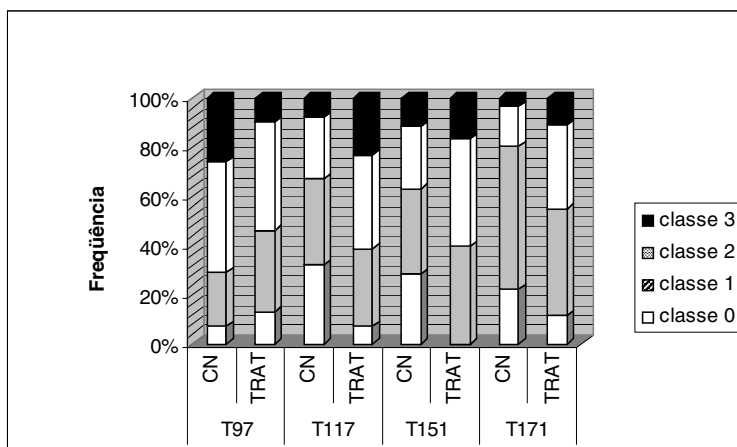


Figura 1. Frequência relativa das classes de cometa em sangue de tilápia exposta simultaneamente à Roundup® e *M. aeruginosa* BCCUSP 262 (análise de 600 nucleóides por tratamento).

Na figura 1 procedeu-se uma análise detalhada de distribuição das classes de cometa, para melhor visualização dos dados da tabela 1. Salienta-se que as classes 0 e 1

apresentam maior probabilidade de reparo, enquanto a classe 3 consiste de dano praticamente irreversível. A representação gráfica (figura 1) confirmou os dados da tabela 1, i.e., ocorrência de maior frequência de classe 2 e 3 entre os animais submetidos ao tratamento, mas não se observou aumento nos danos com o tempo. Este resultado pode ser decorrente da redução de estresse devido à retirada de animais para análise. Aliado a isso, a renovação natural de eritrócitos provavelmente impediu o acúmulo de células geneticamente danificados no organismo da tilápia.

Para analisar mutações gênicas não reversíveis utilizou-se o teste de micronúcleo (tabela 2). A tendência da frequência média de micronúcleo em peixe tratado com associação entre extrato celular de *M. aeruginosa* e glifosato apresentou-se superior em relação ao tratamento controle, mas estatisticamente significativa somente em t_{97} ($p < 0,05$). Grisolia⁽¹²⁾ também detectou micronúcleo em *Tilapia rendalli* tratada com Roundup®, sendo o efeito dose-dependente. Araújo⁽¹⁵⁾ mencionou non-genotoxicidade de glifosato puro, sendo que a toxicidade de Roundup® se deve à presença de surfactantes na formulação, resultando em comportamento sinérgico. O fato provavelmente contribuiu para o aumento da frequência média de micronúcleo em peixes tratados com Roundup® e *M. aeruginosa*, mesmo em doses consideradas subcrônicas (tabela 2).

Tabela 2. Teste de micronúcleo em eritrócito de tilápia exposta simultaneamente à Roundup® e *Microcystis aeruginosa* BCCUSP 262.

Exposição		Frequência média de micronúcleo* (média ± desvio padrão)	
Dias	N	Controle negativo	Tratamento
63	6	0,5 ± 0,8 ^a	0,83 ± 1 ^a
97	6	0,67 ± 1,2 ^b	3,83 ± 0,8 ^a
151	6	0,67 ± 0,5 ^a	0,83 ± 0,4 ^a
171	6	0,33 ± 0,5 ^a	2,33 ± 1,5 ^a

(*) Médias obtidas pela contagem de 2000 eritrócitos por animal. Análise de Variância (ANOVA) do escore médio de cometa. Letras iguais na mesma linha não diferem entre si pelo Teste de Tukey ($p < 0,05$). Antes do dia 63 não houve dados suficientes para comparação devido a problemas durante a coleta de amostra e /ou processamento de análise.

Em suma, a co-ocorrência de Roundup® e *Microcystis aeruginosa* em quantidades subcrônicas causaram genotoxicidade em eritrócitos de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*), sendo o efeito evidenciado por testes de micronúcleo e cometa. Salienta-se o risco de genotoxicidade oriunda de doses subcrônicas da interação destes componentes, desconhecendo-se a repercussão do acúmulo de microcistina no músculo de peixe ^(16,17) quanto ao perigo à saúde ser superior na cadeia trófica, como em humanos.

AGRADECIMENTOS

Agradecemos à CAPES, CNPq, UGF-SETI-Fundo Paraná e Fundação Araucária pelo auxílio financeiro concedido assim como Bolsas de iniciação científica, mestrado, doutorado e

produção em pesquisa dos autores, manifestamos agradecimento especial aos responsáveis EPUEL-PR: Mauro Caetano Filho, Heitor Frossard Santos, Jurandir Batista, Waldemar Ferreira da Silva, Valdemir da Silva pelo apoio e serviços prestados durante o desenvolvimento experimental desta pesquisa.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Carmichael WW, Azevedo SMFO, An JS, Molica RJR, Jochimsen EM, Lau S, Rinehart KL, Shaw GR, Eaglesham GK. Human Fatalities from Cyanobacteria: Chemical and Biological Evidence for Cyanotoxins. *Environmental Health Perspectives*, 109:663-668, 2001.
2. Jos A, Pichardo S, Prieto AI, Repetto G, Vázquez CM, Moreno I, Cameán AM. Toxic cyanobacterial cells containig microcystins induce oxidative stress in exposed tilapia fish (*Oreochromis* sp.) under laboratory conditions. *Aquatic Toxicology*, 72:261-271, 2005.
3. Mesquita E, Menaia J, Napier V, Rosa MJ. Biodegradação de microcistina-LR em filtros de carvão activado com actividade biológica. *12º Encontro Nacional de Saneamento Básico*, Cascais, Portugal, out. 2006. Disponível em http://www-ext.lnec.pt/LNEC/60anos/dia_bolseiro/texto/apresentacoes.html, acesso em 29/08/2007.
4. Best JH, Pflugmacher S, Wiegand C. Effects of enteric bacterial and cyanobacterial lipopolysaccharides, and af microcystin-LR, on glutathione S-transferase activities in zebra fish (*Danio rerio*). *Aquatic Toxicology*, Berlin, 60:223-231, 2002.
5. Marc J, Mulner-Lorillon O, Bellé R. Glyphosate-based pesticides affect cell cycle regulation. *Biology of the Cell*, 96:245-249, 2004.
6. Williams GM, Kroes R, Munro IC. Safety evaluation and risk assessment of the herbicide Roundup and its active ingredient, glyphosate, for humans. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 31:117-165, 2000.

7. Marc J, Mulner-Lorillon O, Bellé R. Glyphosate-based pesticides affect cell cycle regulation. *Biology of the Cell*, 96:245-249, 2004.
8. Francabandiera AI. *Genotoxicidade Subcrônica de Microcystis aeruginosa, Aflatoxina B1 e Herbicida à Base de Glifosato em Tilápia do Nilo (Oreochromis niloticus)*. 80 f. Dissertação (Mestrado) – Curso de Mestrado em Ciência de Alimentos, Departamento de Ciência de Alimentos, Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2007.
9. Singh NP, McCoy MT, Tice RR, Schneider EL. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Experimental Cell Research*, 175:184-191, 1988.
10. Speit G, Hartmann A. The Comet Assay (Single Cell Gel Test) – A sensitive genotoxicity test for detection of DNA damage and repair. *Methods in Molecular Biology*, DNA-repair Protocols: Eucaryotic Systems. 113:203-212, 1999.
11. Kobayashi H, Suguyama C, Morikawa Y, Hayashi M, Sofuni T. A comparison between manual microscopic analysis and computerized image analysis in the single cell gel electrophoresis. *MMS Comm.*, 3:103-115, 1995.
12. Grisolia CK, Starling FLRM. Micronuclei monitoring of fishes from Lake Paranoá, under influence of sewage treatment plant discharges. *Mutation Research*, 491:39-44, 2001.
13. Arkhipchuk VV, Garanko NN. Using the nuclear biomarker and micronucleous test on in vivo fish fin cells. *Ecotoxicology And Environmental Safety*, 62:42-52, 2005.
14. Beveridge MCM, McAndrew BJ. In: *Tilapias: Biology and Exploitation*. Eds. Beveridge MCM, McAndrew BJ. Fish and Fisheries Series n.25. Kluwer Academic Publishers. 2000. 532p.
15. Araújo ASF de. *Biodegradação e análise de glifosato em dois tipos de solos*. 2002. 83 f. Dissertação (Mestrado) – Curso de Agronomia, Departamento de Microbiologia Agrícola, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2002.

16. Soares RM, Magalhães VF, Azevedo SMFO. Accumulation and depuration of microcystins (cyanobacteria hepatotoxins) in *Tilapia rendalli* (Cichlidae) under laboratory conditions. *Aquatic Toxicology*, 70:1-10, 2004.
17. Kamogae M, Hashimoto EH, Millet AP, Francabandiera AI, Pádua CG de, Bracarense APFRL, Bittencourt-Oliveira MC, Colus IMS, Itano EN, Kawamura O, Tsutsumi T, Nagata S, Harada K-I, Ueno Y, Hirooka EY. Imunoistoquímica: detecção de microcistina em tilápia exposta ao extrato de *Microcystis aeruginosa* (Cyanobacteria). *Semina: Ciências Agrárias*, Londrina, 28:427-436, 2007.