EXPOSIÇÃO EMBRIONÁRIA A CONCENTRAÇÕES SUBTERATOGÊNICAS DO FUNGICIDA MANCOZEBE PROMOVE ALTERAÇÕES MOTORAS EM ZEBRAFISH (DANIO RERIO)

Renata Siqueira de Mello [1]

Luana Paganotto Leandro [2]

Mauro Eugênio Medina Nunes [3]

Dennis Guilherme da Costa Silva [4]

Andressa Rubim Lopes [5]

Jeferson Luis Franco [6]

Resumo:

Pesticidas são produtos químicos especificamente desenvolvidos para o controle de pragas. O uso intensivo desses compostos leva a contaminação de matrizes ambientais. Em geral, esses resíduos se degradam lentamente, de forma que mesmo em baixas concentrações, podem causar danos a vida selvagem. O fungicida Mancozebe (MZ), é classificado como altamente tóxico, visto que seus metabólitos entram em contato com o ambiente aquático. Estudos anteriores demostram que MZ pode exercer efeitos pró-oxidantes através da formação de espécies reativas de oxigênio (EROs). Um organismo considerado excelente para estudo dos efeitos da exposição a diferentes contaminantes ambientais é o zebrafish (Danio rerio). Contudo, os efeitos da sua exposição ao MZ nas fases iniciais de desenvolvimento ainda é pouco estudada. Sendo assim, o objetivo desse estudo foi avaliar as alterações comportamentais e a geração de EROs causadas pela toxicidade induzida por concentrações subteratogênicas do fungicida Mancozebe sobre o desenvolvimento embrio-larval de zebrafish. Embriões de 4 horas pós-fertilização (hpf) foram expostos a Mancozebe 96% nas concentrações de 5, 10 e 20 µg/L, mantendo um grupo controle (CTL) no qual foi exposto apenas a água do sistema (zebtec™). Sendo N=200 animais (CEUA - Unipampa - protocolo 003/2016). A toxicidade do composto foi avaliada através da taxa de mortalidade, contagem de movimentos espontâneos dos embriões e geração de EROs com o corante DCFH2DA em 24 hpf e da taxa de eclosão e de estímulos sensoriais motores por resposta de escape em 72 hpf. Em relação a mortalidade, o grupo MZ não diferiu do CTL. Porém, a taxa de embriões não eclodidos se mostrou maior na concentração de 20 µg/L. A exposição ao MZ resultou em um aumento no número de movimentos espontâneos dos embriões na concentração de 10 g/L em comparação ao CTL, podendo sugerir uma hiperatividade nos embriões, provavelmente devido aos metabólitos de MZ, como o manganês. Já na resposta de escape, larvas expostas a concentração de 20 g/L apresentaram um défict motor quando comparadas ao CTL, sugerindo que podem ser mais suscetíveis à predação. Além disso, MZ promoveu uma tendência para o aumento na geração de EROs nas concentrações mais elevadas, sugerindo um possível desequilíbrio redox. Pode-se concluir que o Mancozebe, mesmo em concentrações baixas, é capaz de alterar parâmetros motores e comportamentais em zebrafish, tornando as análises comportamentais ferramentas sensíveis a detecção precoce de ambientes comprometidos com contaminação por meio de produtos agrícolas, uma vez que se manifestam anteriormente a parâmetros bioquímicos.

Palavras-chave: toxicologia ambiental; agrotóxicos; comportamento

Modalidade de Participação: Iniciação Científica

EXPOSIÇÃO EMBRIONÁRIA A CONCENTRAÇÕES SUBTERATOGÊNICAS DO FUNGICIDA MANCOZEBE PROMOVE ALTERAÇÕES MOTORAS EM ZEBRAFISH (DANIO RERIO)

[1] Aluno de graduação. renatasmello96@gmail.com. Autor principal

[2] Aluna de pós-graduação. luanap.leandro@gmail.com. Co-autor

[3] Aluno de pós-graduação. mauroemnunes@gmail.com. Co-autor

[4] Aluno pós-graduação. dennis.costasilva@gmail.com. Co-autor

[5] Aluna de pós-graduação. andressarubimlopes@gmail.com. Co-autor

[6] Docente. jefersonfranco@gmail.com. Orientador

EXPOSIÇÃO EMBRIONÁRIA A CONCENTRAÇÕES SUBTERATOGÊNICAS DO FUNGICIDA MANCOZEBE PROMOVE ALTERAÇÕES MOTORAS EM ZEBRAFISH (*Danio rerio*)

1 INTRODUÇÃO

Pesticidas são produtos químicos especificamente desenvolvidos para o controle de pragas, ervas daninhas ou doenças de plantas (BOLOGNESI, 2003). O uso intensivo desses compostos em áreas de cultivo leva a contaminação de matrizes ambientais, onde essas substâncias podem ser persistentes, móveis e tóxicas, pois tendem a acumular-se no solo e na biota, e seus resíduos podem chegar à águas superficiais, por meio de processos naturais, como escoamento superficial. Em geral, esses resíduos se degradam lentamente, motivo pelo qual são amplamente distribuídos no meio ambiente e que, mesmo em baixas concentrações, podem causar danos a vida selvagem (PIGNATI et al., 2017; IBGE, 2015; FLORES-GARCÍA et al., 2011). O fungicida Mancozebe (MZ), formado por manganês e sais de zinco do composto de organossulfureto etileno-bis-ditiocarbarbamato, é classificado como altamente tóxico para peixes de água doce, invertebrados e anfíbios (SCARIOT et al., 2016; HOLMES; RUHMAN, 2007), visto que seus metabólitos entram em contato com o ambiente aquático. Estudos anteriores demostram que MZ pode exercer efeitos pró-oxidantes através da formação de espécies reativas de oxigênio (EROs), causando um desbalanço redox e levando a efeitos deletérios no desenvolvimento de organismos não-alvo, principalmente em concentrações teratogênicas (ATAMANIUK et al., 2013; COSTA-SILVA et al., 2018). Assim, estudos ecotoxicológicos com esse fungicida se tornam cada vez mais relevantes.

Um organismo considerado excelente para estudo dos efeitos da exposição a diferentes contaminantes ambientais é o zebrafish (*Danio rerio*) (FUZZEN; BERNIER; KRAAK, 2011; ALTHENOFEN et al., 2017), principalmente em razão dos seus embriões se desenvolverem rapidamente no meio externo e serem transparentes, permitindo a observação do animal durante todo o desenvolvimento embrio-larval (HAENDEL et al., 2004). Contudo, os efeitos da sua exposição ao MZ nas fases iniciais de desenvolvimento ainda é pouco estudada, principalmente em concentrações de relevância ecológica.

Sendo assim, o objetivo desse estudo foi avaliar potenciais alterações em parâmetros comportamentais e bioquímicos causadas pela exposição a concentrações subteratogênicas do fungicida Mancozebe durante o período de desenvolvimento embrio-larval de zebrafish.

2 METODOLOGIA

Os embriões de zebrafish utilizados neste ensaio toxicológico foram obtidos a partir de reprodução de exemplares adultos. Os experimentos com peixes adultos foram aprovados junto ao CEUA – Unipampa (protocolo 003/2016).

O método de exposição foi realizado baseado no protocolo OECD 236 (2013), de modo que embriões de 4 horas pós fertilização (hpf) foram expostos a Mancozebe 96% (Sigma-Aldrich) nas concentrações subteratogênicas e de relevência ecológica (BOMBARDI, 2017) de 5, 10 e 20 µg/L, mantendo um grupo controle (CTL) no qual foi exposto apenas a água do sistema (zebtec™). Sendo N=200 animais por grupo.

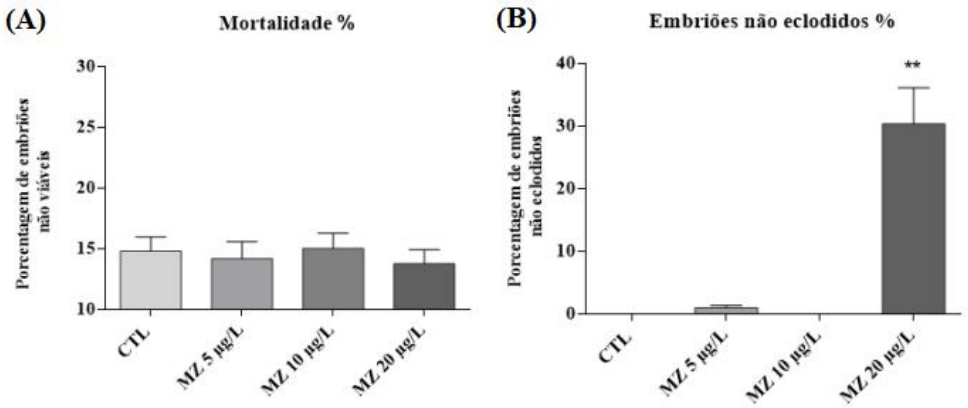
Primeiramente, a toxicidade do composto foi avaliada através da taxa de mortalidade, contagem de movimentos espontâneos dos embriões (SAINT-AMANT; DRAPEAU, 1998) e geração de EROs com o corante fluoróforo diacetato de 2,7-diclorofluoresceína ($DCFH_2DA$) (ANICHTCHIK et al., 2008) em 24 hpf e da taxa de eclosão e de estímulos sensoriais motores por resposta de escape (SAINT-AMANT; DRAPEAU, 1998) em 72 hpf.

Para análise estatística dos dados, foram aplicados testes de normalidade (Kolmogorov Smirnov) e homogeneidade (teste de Bartlett). Os resultados foram expressos como média ± erro padrão (S.E.M.). Para os dados não paramétricos, a análise foi feita através do teste de Kruskal-Wallis, seguido pelo teste de múltiplas comparações de Dunn. Para os dados paramétricos, a análise foi feita através de one-way ANOVA seguido pelo teste de múltiplas comparações de Holm-Sidak. Os resultados foram considerados estatisticamente significantes com $p \leq 0,05$.

3 RESULTADOS e DISCUSSÃO

Em relação à mortalidade dos embriões, o grupo MZ não diferiu em relação ao grupo controle (Figura 1A), sugerindo que as concentrações utilizadas não comprometem a sobrevivência desses embriões. Porém, a taxa de eclosão se mostrou estatisticamente diferente (Figura 1B), visto que na concentração de 20 µg/L o número de embriões não eclodidos foi maior em comparação com o grupo controle ao final de 72 hpf, sugerindo um possível atraso no desenvolvimento embrionário em razão da exposição ao composto.

Figura 1 - Sobrevivência e eclosão de embriões expostos a diferentes concentrações de MZ. (A) Porcentagem de embriões mortos após 24 hpf; (B) Porcentagem de embriões não eclodidos após 72 hpf. Os resultados foram expressos com média ± SEM referente aos grupos controle (CTL) e Mancozebe (MZ), sendo * p<0,05.



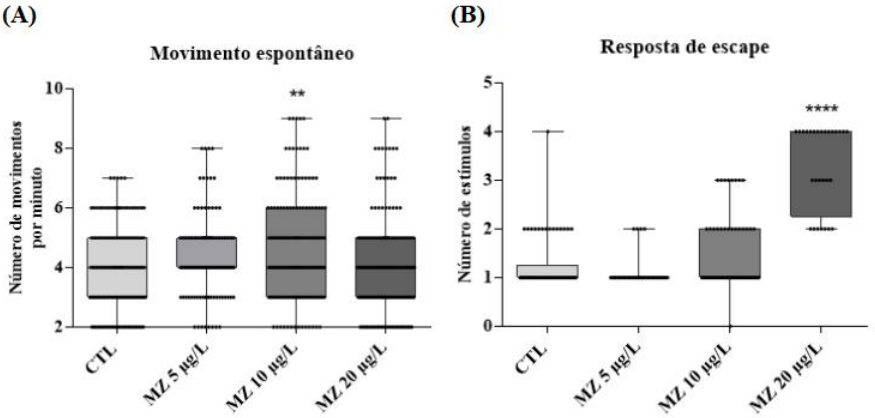
Fonte: do autor, 2018.

Em relação as análise comportamentais, a exposição ao MZ resultou em um aumento significativo no número de movimentos espontâneos dos embriões na concentração de 10 µg/L em comparação ao controle, podendo sugerir uma hiperatividade nos embriões expostos a essa concentração, e posterior diminuição na concentração de 20 µg/L (Figura 2A). Outros estudos também já apresentaram dados similares, Mu et al. (2013) relataram que embriões de zebrafish expostos ao fungicida Difenoconazole apresentaram uma indução no movimento espontâneo dos embriões na concentração de 1,5 mg/L e uma inibição nas concentrações de 2 e 2,5 mg/L. Já Costa-Silva et al. (2018) demonstraram que a exposição a MZ levou a um aumento no número de movimentos espontâneos dos embriões, provavelmente por um mecanismo de toxicidade induzido pelo principal composto metálico de MZ, o manganês.

Na resposta de escape, larvas expostas a concentração de 20 µg/L apresentaram um défict motor quando comparadas ao controle, necessitando de um maior número de estímulos para apresentar uma resposta de nado (Figura 2B). Esta inibição no comportamento de resposta ao escape pode indicar que larvas de zebrafish expostas no período embrionário a MZ podem ser mais suscetíveis à predação, uma vez que seu estado locomotor foi alterado

após a exposição ao fungicida. Andrade et al. (2016) demonstraram que larvas de zebrafish expostas ao pesticida Carbendazim em concentrações ecológicas apresentam uma resposta locomotora alterada em relação a natação, mesmo nas concentrações mais baixas, indicando o comportamento como um sinal de alerta para o estresse ambiental.

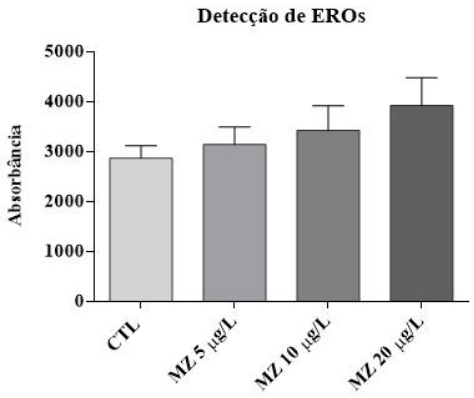
Figura 2 - Análises comportamentais de embriões expostos a diferentes concentrações de MZ. (A) Número de movimentos espontâneos por minuto em 24 hpf; (B) Número de estímulos motores de resposta de escape em 72 hpf. Os resultados foram expressos com média ± SEM referente aos grupos controle (CTL) e Mancozebe (MZ), sendo * p<0,05.



Fonte: do autor, 2018.

Além disso, a exposição ao MZ não resultou em alterações estatisticamente significativas em relação ao controle nos níveis de EROs (Figura 3). Costa-Silva et al. (2018) observou que a exposição de embriões de zebrafish ao MZ em concentrações superiores às testadas nesse trabalho causou um aumento na produção de EROs, indicando um possível desequilíbrio redox. Sabe-se que o desenvolvimento embrionário é caracterizado por uma alta taxa de diferenciação que depende principalmente da homeostase redox (DENNERY, 2007). Porém, uma tendência para a produção exacerbada de EROs pode perturbar esse equilíbrio, causando distúrbios no desenvolvimento, principalmente após a exposição a contaminantes ambientais (WANG et al., 2018), podendo levar a déficits locomotores e comportamentais em zebrafish, mesmo em baixas concentrações.

Figura 3 - Quantificação da absorbância através da fluorescência do corante $DCFH_2DA$ com média ± SEM referente aos grupos controle (CTL) e Mancozebe (MZ).



Fonte: do autor, 2018.

4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Desse modo, pode-se concluir que o Mancozebe, mesmo em concentrações baixas, é capaz de alterar parâmetros motores e comportamentais em zebrafish, tornando as análises comportamentais e motoras ferramentas sensíveis a detecção precoce de ambientes comprometidos com contaminação por meio de produtos agrícolas, uma vez que tais alterações se manifestam anteriormente a distúrbios relacionados a parâmetros bioquímicos. Porém, mais estudos são necessários para elucidar as vias biológicas dessas alterações nesse organismo modelo, principalmente em concentrações subteratogênicas, visto que possuem grande relevância ecotoxicológica com o constante crescimento da agricultura no Brasil.

REFERÊNCIAS

ALTHENOFEN, S.; NABINGER, D. D.; WIPRICH, M. L.; PEREIRA, T. C. B.; BOGO, M. R.; BONAN, C.D. Tebuconazole alters morphological, behavioral and neurochemical parameters in larvae and adult zebrafish (*Danio rerio*). **Chemosphere**, v.180, p.484-490, abr. 2017.

ANDRADE, T. S.; HENRIQUES, J. F.; ALMEIDA, A. R.; MACHADO, A. L.; KOBA, O.; GIANG, P. T.; SOARES, A. M. V. M.; DOMINGUES, I. Carbendazim exposure induces developmental, biochemical and behavioural disturbance in zebrafish embryos. **Aquatic Toxicology**, v.170, p.390-399, nov. 2016.

ANICHTCHIK, O.; DIEKMANN, H.; FLEMING, A.; ROACH, A.; GOLDSMITH, P.; RUBINSZTEIN, D. C.. Loss of PINK1 function affects development and results in neurodegeneration in zebrafish. **The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience**, v. 28, n. 33, p. 8199–207, 13 ago. 2008.

ATAMANIUK, T.; KUBRAK, O.; HUSAK, V.; STOREY, K.; LUSHCHAK, V. The mancozeb-containing carbamate fungicide tattoo induces mild Oxidative Stress in goldfish brain, liver, and kidney. **Environmental Toxicology**, v. 29, n. 11, p.1227-1235, jan. 2013.

BOLOGNESI, C. Genotoxicity of pesticides: a review of human biomonitoring studies. **Mutation Research**, v. 543, p. 251-272, jan. 2003.

BOMBARDI, L. M. Laboratório de Geografia Agrária FFLCH - USP. **Geografia do uso de agrotóxicos no Brasil e conexões com a União Européia**. 1. ed. São Paulo, 2017. 296p.

CHEN, T.; WANG, Y.; WU, Y. Developmental exposures to ethanol or dimethylsulfoxide at low concentrations alter locomotor activity in larval zebrafish: Implications for behavioral toxicity bioassays. **Aquatic Toxicology**, v.102, p.162-166, fev. 2011.

COSTA-SILVA, D. G.; LEANDRO, L. P.; VIEIRA, P. B.; CARVALHO, N. R.; LOPES, A. R.; SCHIMITH, L. E.; NUNES, M. E. M.; DE MELLO, R. S.; MARTINS, I. K.; PAULA, A. A.; CAÑEDO, A. D.; MOREIRA, J. C. F.; POSSER, T.; FRANCO, J. F. N-acetylcysteine inhibits Mancozeb-induced impairments to the normal development of zebrafish embryos. **Neurotoxicology and Teratology**, v. 68, p. 1-12, abr. 2018.

DENNERY, P. A. Effects of oxidative stress on embryonic development. **Birth Defects Research Part C: Embryo Today: Reviews**, v. 81, n. 3, p. 155–162, set. 2007.

FLORES-GARCÍA, M. E.; MOLINA-MORALES, Y.; BALZA-QUINTERO, A.; BENÍTEZ-DÍAZ, P. R.; MIRANDA-CONTRERAS, L. Residuos de plaguicidas en aguas para consumo humano en una comunidad agrícola del estado Mérida, Venezuela. **Investigacion Clinica**, v.52, n.4, p.295-311, dez. 2011.

FUZZEN, M. L. M.; BERNIER, N. J.; KRAAK, G. Differential effects of 17b-estradiol and 11-ketotestosterone on the endocrine stress response in zebrafish (*Danio rerio*). **General and Comparative Endocrinology**, v.170, p.365-373, jan. 2011.

HAENDEL, M. A.; TILTON, F.; BAILEY, G. S.; TANGUAY, R. L. Developmental Toxicity of the Dithiocarbamate Pesticide Sodium Metam in Zebrafish. **Toxicological Sciences**, v.81, n. 2, p. 390-400, nov. 2004.

HOLMES, J.; RUHMAN, M. Divisão de Destino e Efeitos Ambientais, Escritório de Programas de Pesticidas. **Risks of Mancozeb and Maneb Uses to the Federally Listed California Red Legged Frog (*Rana aurora draytonii*)**. 5. ed. Washington, D.C., 2007. 143p.

Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE). Ministério do Planejamento, Orçamento e Gestão. **6º Indicadores de desenvolvimento sustentável**. 10. ed. Rio de Janeiro, 2015. 348 p.

IRONS, T. D.; MACPHAIL, R. C.; HUNTER, D. L.; PADILLA, S. Acute neuroactive drug exposures alter locomotor activity in larval zebrafish. **Neurotoxicology and Teratology**, v.32, p.84-90, jun. 2009.

MU, X.; PANG, S.; SUN, X.; GAO, J.; CHEN, J.; CHEN, X.; LI, X.; WANG, C. Evaluation of acute and developmental effects of difenoconazole via multiple stage zebrafish assays. **Environmental Pollution**, v. 175, p. 147-157, abr. 2013.

OECD GUIDELINES FOR THE TESTING OF CHEMICALS. Organização para a Cooperação e Desenvolvimento Econômico. **Fish Embryo Acute Toxicity (FET) Test 236**. Paris, 2013. 22p.

PIGNATI, W. A.; LIMA, F.; LARA, S. S.; CORREA, M.; BARBOSA, J. R.; LEÃO, L.; PIGNATTI, M. G. Distribuição espacial do uso de agrotóxicos no Brasil: uma ferramenta para a vigilância em saúde. **Ciência & Saúde Coletiva**, Rio de Janeiro, v. 22, n. 10, p. 3281-3293, out. 2017.

SAINT-AMANT, L.; DRAPEAU, P. Time course of the development of motor behaviors in the zebrafish embryo. **Journal of neurobiology**, v. 37, n. 4, p. 622–32, dez. 1998.

SCARIOT, F. J.; JAHN, L. M.; MAIANTI, J. P.; DELAMARE, A. P. L.; ECHEVERRIGARAY, S. The fungicide Mancozeb induces metacaspase-dependent apoptotic cell death in *Saccharomyces cerevisiae* BY4741. **Apoptosis**, New York, v.21, n.7, p.866-872, mai. 2016.

WANG, X. H.; SOUDERS, C. L.; ZHAO, Y. H.; MARTYNIUK, C. J. Mitochondrial bioenergetics and locomotor activity are altered in zebrafish (*Danio rerio*) after exposure to the bipyridylium herbicide diquat. **Toxicology letters**, v. 283, p. 13-20, fev. 2018.