

**IGOR CAUÊ ALVES ARARUNA**

**AVALIAÇÃO DOS MECANISMOS DE TOXICIDADE DA PROTEÍNA  
ANTIFÚNGICA *Mo*-CBP<sub>3</sub> EM EMBRIÕES DE PEIXE-ZEBRA (*Danio rerio*)**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA  
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E DA NATUREZA  
BACHARELADO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS**

**JOÃO PESSOA -PB**

**2021**

**Catálogo na publicação**  
**Seção de Catalogação e Classificação**

A662a Araruna, Igor Cauê Alves.

Avaliação dos mecanismos de toxicidade da proteína antifúngica Mo-CBP3 em embriões de peixe-zebra (*Danio rerio*) / Igor Cauê Alves Araruna. - João Pessoa, 2021. 44f. : il.

Orientação: Davi Felipe Farias.

TCC (Graduação/Bacharelado em Ciências Biológicas) - UFPB/CCEN.

1. Bioacumulação. 2. Ecotoxicologia. 3. Proteínas antifúngicas - Mo-CBP. 4. Proteínas transgênicas. I. Farias, Davi Felipe. II. Título.

UFPB/CCEN

CDU 577.1(043.2)

**IGOR CAUÊ ALVES ARARUNA**

**AVALIAÇÃO DOS MECANISMOS DE TOXICIDADE DA PROTEÍNA  
ANTIFÚNGICA *Mo*-CBP<sub>3</sub> EM EMBRIÕES DE PEIXE-ZEBRA (*Danio rerio*)**

Trabalho de conclusão de curso  
apresentado ao Centro de Ciências  
Exatas e da Natureza Federal da  
Paraíba como requisito obrigatório  
para a obtenção do Título de  
Bacharel em Ciências Biológicas

Orientador: Prof. Dr. Davi Felipe  
Farias

**JOÃO PESSOA**

**2021**

**IGOR CAUÊ ALVES ARARUNA**

**AVALIAÇÃO DOS MECANISMOS DE TOXICIDADE DA PROTEÍNA  
ANTIFÚNGICA *Mo*-CBP<sub>3</sub> EM EMBRIÕES DE PEIXE-ZEBRA (*Danio rerio*)**

Monografia apresentada ao Curso de Ciências Biológicas (Trabalho Acadêmico de conclusão de Curso), como requisito parcial à obtenção do grau de Bacharel em Ciências Biológicas da Universidade Federal da Paraíba.

Data: 09 de julho de 2021

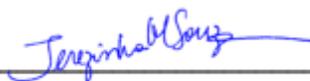
Resultado: 8,3

**BANCA EXAMINADORA:**



---

Davi Felipe Farias (orientador), Professor Doutor, UFPB



---

Terezinha Maria de Souza, Doutora, Princess Maxima Center for Oncology



---

Juliana Alves da Costa Ribeiro Souza, Mestre, UFPB

## **AGRADECIMENTOS**

Ao apoio dos meus pais Jorge Arruda e Luciana Alves, minhas irmãs Adaili Cauê e Lorraine Arruda.

A minha namorada Sofia Paoli, meus amigos próximos André Barbosa, Katarina Rocha, Pedro Henrique, Catarina Serrão, Eduardo Afonso, Rafael Xavier, Filipi Calbaizer e a Marta Muniz, que prestaram apoio à execução deste trabalho.

Ao meu ex-orientador e amigo Luís Fernando Marques dos Santos e ao meu orientador e amigo Davi Felipe Farias.

Aos integrantes da banca examinadora Dra. Terezinha Maria de Souza e Me. Juliana Alves da Costa Ribeiro Souza.

Às professoras Ilka Maria Vasconcelos e Daniele de Oliveira Bezerra de Sousa da Universidade Federal do Ceará (Fortaleza, Ceará) pela doação da proteína que foi o alvo deste estudo.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento e Tecnológico (CNPq) pelas bolsas a mim agraciadas através do Programa Institucional de Bolsas de Iniciação Científica (PIBIC) da Universidade Federal da Paraíba.

E a todos os outros amigos e colegas que foram essenciais diretamente e indiretamente na minha jornada e conseqüentemente na produção deste trabalho.

## RESUMO

*Mo*-CBP<sub>3</sub> é uma proteína antifúngica isolada das sementes de *Moringa oleifera*, que é considerada uma candidata para o desenvolvimento de culturas transgênicas para conferir resistência contra fungos fitopatogênicos. No entanto, estudos prévios mostraram que esta proteína é tóxica para embriões de peixe-zebra (*Danio rerio*), atuando, em parte, através do desbalanço do equilíbrio de espécies reativas de oxigênio e neurotoxicidade. Portanto, faz-se necessário avançar na compreensão dos mecanismos de toxicidade da *Mo*-CBP<sub>3</sub> e, dessa forma, fornecer subsídios ao seu uso como ferramenta biotecnológica. Neste sentido, este trabalho objetivou ampliar o conhecimento sobre os mecanismos de toxicidade da *Mo*-CBP<sub>3</sub> em embriões de peixe-zebra. Para tanto, embriões com até 3 hpf foram expostos à *Mo*-CBP<sub>3</sub> (50 mg/L), durante 24 h, para os seguintes testes: (i) verificação temporal de alterações morfológicas (surgimento de vesículas); (ii) incubação prévia da proteína com *N*-acetilglucosamina (NAG) para avaliação da dependência do seu sítio de ligação à açúcar para a toxicidade embrionária; e (iii) marcação fluorescente da proteína para verificação do cruzamento do córion e da bioacumulação no embrião. Além disso, os embriões foram expostos a concentrações subletais da proteína (10, 15, 20 e 25 mg/L) para determinação da atividade da lactato desidrogenase (LDH), um marcador de hipóxia e danos celulares, e da glutatona peroxidase (GPx) como um marcador de estresse oxidativo. Os resultados mostraram que a *Mo*-CBP<sub>3</sub> é capaz de atravessar a membrana coriônica de embriões de peixe-zebra (*Danio rerio*) através de mecanismos que envolvem, pelos menos em parte, sua interação com carboidratos presentes nesta estrutura. Após chegar ao espaço perivitelínico, *Mo*-CBP<sub>3</sub> se acumula na superfície corporal do embrião, concentrando-se na região do saco vitelínico. Além disso, foi visto que concentrações subletais de *Mo*-CBP<sub>3</sub> alteraram a atividade de GPx, confirmando que a proteína afeta o sistema de defesa contra espécies reativas de oxigênio e gera estresse oxidativo. O conjunto de dados apresentados neste trabalho reportam pela primeira vez os mecanismos básicos pelos quais uma proteína de alta massa molecular, neste caso uma glicoproteína semelhante a uma merolectina, é capaz de atravessar a membrana coriônica de peixe-zebra e promover efeitos tóxicos. Por fim, é importante que mais estudos ecotoxicológicos sejam realizados com *Mo*-CBP<sub>3</sub> a fim de dar suporte ao uso desta proteína no desenvolvimento de produtos biotecnológicos com menos impactos aos ecossistemas aquáticos.

Palavras-chaves: Bioacumulação. Ecotoxicologia. Proteínas transgênicas.

## ABSTRACT

*Mo*-CBP<sub>3</sub> is an antifungal protein isolated from *Moringa oleifera* seeds, which is considered a candidate for the development of transgenic crops to confer resistance against phytopathogenic fungi. However, previous studies have shown that this protein is toxic to zebrafish (*Danio rerio*) embryos, acting, in part, through the imbalance of reactive oxygen species and neurotoxicity. Therefore, it is necessary to advance in the understanding of the toxicity mechanisms of *Mo*-CBP<sub>3</sub> and, thus, provide subsidies for its use as a biotechnological tool. In this sense, this work aimed to increase the knowledge about the mechanisms of toxicity of *Mo*-CBP<sub>3</sub> in zebrafish embryos. Therefore, embryos with up to 3 hpf were exposed to *Mo*-CBP<sub>3</sub> (50 mg/L) for 24 h for the following tests: (i) temporal verification of morphological alterations (emergence of vesicles); (ii) previous incubation of the protein with *N*-acetylglucosamine (NAG) to assess the dependence of its sugar-binding site on embryonic toxicity; and (iii) fluorescent labeling of the protein to verify chorion crossing and bioaccumulation in the embryo. In addition, the embryos were exposed to sublethal concentrations of the protein (10, 15, 20 and 25 mg/L) to determine the activity of lactate dehydrogenase (LDH), a marker of hypoxia and cell damage, and glutathione peroxidase (GPx) as a marker of oxidative stress. The results showed that *Mo*-CBP<sub>3</sub> is able to cross the chorionic membrane of zebrafish embryos through mechanisms that involve, at least in part, its interaction with carbohydrates present in this structure. After reaching the perivitelline space, *Mo*-CBP<sub>3</sub> accumulates on the body surface of the embryo, concentrating in the yolk sac region. Furthermore, it was seen that sublethal concentrations of *Mo*-CBP<sub>3</sub> altered GPx activity, confirming that the protein affects the defense system against reactive oxygen species and generates oxidative stress. The data set presented in this work report for the first time the basic mechanisms by which a high molecular mass protein, in this case a lectin, is able to cross the zebrafish chorionic membrane and promote toxic effects. Finally, it is important that more ecotoxicological studies are carried out with *Mo*-CBP<sub>3</sub> in order to support the use of this protein in the development of biotechnological products with less impact on aquatic ecosystems.

Keywords: Bioaccumulation. Ecotoxicology. Transgenic proteins.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - <i>Moringa oleifera</i> Lam.: sementes (à esquerda) e estrutura arbórea (à direita). .....	pag 15
Figura 2 - Dois espécimes adultos de <i>Danio rerio</i> .....	pag 19
Figura 3 - Monitoramento de alterações morfológicas em embriões de peixe-zebra.....	pag 28
Figura 4 - Efeitos letais (A) e não letais (B) em embriões de peixe-zebra.....	pag 29
Figura 5 - Embrião de peixe-zebra após exposição à <i>Mo-CBP3</i> .....	pag 30
Figura 6 - Quantificação de atividade enzimática de LDH.....	pag 31
Figura 7 - Quantificação de atividade enzimática de GPx.....	pag 32

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

NAG : *N*-Acetilglicosamina

*Mo*-CBP<sub>3</sub> : Proteína ligante à quitina de *Moringa oleifera* (do inglês “*Moringa oleifera* Chitin Binding protein”)

GPx : Glutathione Peroxidase

LDH : Lactato Desidrogenase

KBP : Solução de fosfato monopotássico em água destilada

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b>	<b>11</b>
2.1. Culturas transgênicas	13
<b>2.2. Moringa oleifera Lam.</b>	<b>15</b>
2.3. Mo-CBP3	16
2.5. História natural, classificação e biologia do peixe-zebra	18
2.6. Peixe-zebra como sistema modelo na ciência	20
3.1 Objetivo geral	22
3.2 Objetivos específicos	22
<b>4 METODOLOGIA</b>	<b>23</b>
4.1 Obtenção da proteína	<b>23</b>
4.3 Monitoramento de alterações morfológicas	24
4.4 Incubação da Mo-CBP3 com N-acetilglicosamina e avaliação da embriotoxicidade	24
4.6 Avaliação de estresse metabólico e oxidativo	25
4.6.1 GPx	26
4.6.2 LDH	26
<b>5. RESULTADOS E DISCUSSÃO</b>	<b>27</b>
5.1 Alterações morfológicas	27
5.3 Bioacumulação de Mo-CBP3	29
5.4 Quantificação enzimática de LDH	30
5.5 Quantificação enzimática de GPx	32
<b>6. CONCLUSÃO</b>	<b>37</b>
<b>7. REFERÊNCIAS</b>	<b>38</b>

## 1. INTRODUÇÃO

Dentre os diversos problemas que a população mundial enfrenta, um dos mais preocupantes é a fome. Pelo menos, 795 milhões de pessoas no mundo não têm acesso a uma dieta equilibrada, em termos de quantidade e qualidade, e estão em situação de subnutrição (FOOD FOUNDATION, 2020). Este cenário tem sua gênese e manutenção, em parte, nos problemas de produção agrícola, que compreendem adversidades climáticas, ausência de políticas de proteção aos produtores e pragas (Food and agriculture organization of United States (FAO), 2019). É consenso na literatura científica que pragas (por exemplo, insetos, fungos e bactérias) podem causar perdas significativas nas plantações, afetando em média 40% de toda a produção, o que inclui cultivos importantes para a dieta humana, como trigo, arroz, soja e milho (ZADOKS, 1996; SHARMA et al., 2000; GOTTULA & FUCHS, 2009, OERKE 2012).

A tecnologia mais utilizada atualmente para prevenir a perda por pragas é a aplicação de agrotóxicos, que visam exterminar os patógenos com o uso destes químicos sintéticos (GONÇALVES et al., 2020). Mas esta opção tem-se mostrado perigosa para a saúde humana e ambiental, uma vez que muitos desses químicos podem ser encontrados no ambiente após a utilização e, assim, afetar organismos não-alvo (ROY, 1998; GONÇALVES et al., 2020).

A produção de transgênicos a partir do uso de técnicas de Biologia Molecular e Engenharia Genética surgiram há algumas décadas e revolucionaram a produção agrícola a partir do desenvolvimento de culturas resistentes ao ataque de patógenos de interesse agrícola (MRÍZOVÁ et al., 2014; KUMAR et al., 2020). Uma das primeiras etapas na aplicação deste tipo de tecnologia é a bioprospecção, que consiste na busca por genes, moléculas, organismos, genes, e/ou partes provenientes de seres vivos que possam ter um potencial econômico e, eventualmente, levar ao desenvolvimento de um bioproduto (SACCARO JR., 2011). Neste contexto, abre-se a perspectiva de produção de cultivares mais resistentes e que proporcionem maior lucro aos produtores aliado a menos danos ao meio ambiente (KUMAR et al., 2020). Isto também pode contribuir com economias locais, melhorando não apenas a estatística de pessoas subnutridas, mas trazendo benefícios a diversos setores da sociedade (TRIPP, 2009; KUMAR et al., 2020).

Nesta perspectiva, a espécie *Moringa oleifera* Lam., conhecida popularmente como moringa, apresenta-se como uma planta candidata a estudos de bioprospecção e desenvolvimento de produtos transgênicos (GIFONI et al., 2012; PINTO et al., 2015). Nativa da Índia, a *M. oleifera* é disseminada por todo o mundo devido ao seu uso ornamental, além de várias de suas partes serem utilizadas para fins nutricionais e na medicina popular (FUGLIE et al., 1999).

Dentre os diversos compostos bioativos presentes em diferentes partes da *M. oleifera*, a semente desta planta possui proteínas que potencialmente possuem a capacidade de protegê-la contra fungos patogênicos, muitos destes são também considerados importantes pragas agrícolas. Uma das proteínas antifúngicas identificadas foi a *Mo*-CBP<sub>3</sub> (do inglês, “*Moringa oleifera* chitin binding protein”), que apresenta mecanismo de ação tóxico mediado, em parte, por sua ligação à quitina, um componente da parede celular que suporta as hifas fúngicas (GIFONI et al., 2012). Neste sentido, *Mo*-CBP<sub>3</sub> é considerada uma proteína candidata para o desenvolvimento de culturas transgênicas para conferir proteção contra fungos fitopatogênicos, o que poderia contribuir, portanto, para melhoria de produtividade das novas cultivares e redução do uso de agrotóxicos (GIFONI et al., 2012; PINTO et al., 2015).

No entanto, ao explorar uma nova tecnologia que pode ter impactos sobre a saúde humana e ambiental, faz-se necessária a realização de uma avaliação de risco precoce das proteínas candidatas com a finalidade de minimizar o surgimento de efeitos não intencionais em organismos não-alvo (NICOLIA et al., 2014; FARIAS et al., 2015; PINTO et al., 2015).

Na última década, o peixe-zebra (*Danio rerio*), também conhecido como “zebrafish” (em inglês) ou paulistinha, têm sido bastante utilizado como sistema modelo para avaliação dos impactos à saúde humana e ambiental de produtos biotecnológicos (VIEIRA et al., 2021) uma vez que 70% do seu DNA é homólogo ao DNA humano, há ênfase ao uso das fases iniciais da vida (embriões e larvas) deste organismo, por sua facilidade em absorção e resposta a compostos exógenos (GONÇALVES et al., 2020). Portanto, o uso de embriões de peixe-zebra pode fornecer informações importantes sobre a segurança de uso da *Mo*-CBP<sub>3</sub> para o desenvolvimento de plantas transgênicas. Previamente, Marchi (2018) relatou que esta proteína é tóxica para embriões de peixe-zebra, apresentando CL<sub>50</sub> de 36,71 ± 1,70 mg/L. Além disso, este mesmo estudo também mostrou que esta proteína possui efeito neurotóxico e altera o balanço de espécies reativas de oxigênio em embriões de peixe-zebra (MARCHI, 2018). Portanto, faz-se necessário avançar na compreensão dos mecanismos de toxicidade da *Mo*-CBP<sub>3</sub> e, dessa forma, fornecer subsídios ao seu uso como ferramenta biotecnológica.

## 2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

### 2.1. Culturas transgênicas

Das 7,6 bilhões de pessoas que habitam o mundo, 795 milhões sofrem de desnutrição (Food Foundation, 2020). Apesar dos objetivos da ONU para erradicar a fome até 2030, o número de pessoas sem acesso a alimentos subiu pelo terceiro ano consecutivo e os principais motivos para esta situação resultam de um conglomerado de fracas políticas e problemas ambientais nas agriculturas locais (FAO et al., 2019).

As mudanças climáticas é um dos fatores que certamente têm afetado a produção agrícola. Nos próximos anos, o aquecimento global pode ser um fator impactante para todo o mundo, principalmente em regiões já afetadas pela desnutrição (KANE et al., 2019; PARRY, 2019).

No entanto, o maior problema para o desenvolvimento atual das culturas de importância econômica são as perdas relacionadas a pragas, afetando uma média de 40% do recurso total em áreas afligidas. Estas perdas podem ser até bem maiores, podendo alcançar taxas de até 50% em trigo, 65% em arroz, 40% em batatas, 60% em soja e 82% em algodão, estes são alguns dos cultivos mais importantes para o sustento de grandes populações (OERKE 2012; DEUTSCH, 2018).

Em função deste problema, a utilização de agrotóxicos é extremamente difundida entre os cultivos atuais, principalmente em países de terceiro mundo (SHARMA, 2019). Contudo, o consumo destes químicos sintéticos pode acarretar diversos problemas para a saúde humana como: desordens endócrinas (MNIF et al., 2011), efeitos no desenvolvimento embrionário (TIEMANN, 2008), desestabilização no metabolismo de lipídios (KARAMI-MOHAJERI & ABDOLLAHI, 2011), hepatotoxicidade (C. FREIRE et al., 2015), hipertensão, diabetes, mal de Parkinson, doença de Alzheimer, câncer (KWIATKOWSKA et al., 2014), demência (LIN et al., 2015). O que pode ser maximizado dentre os trabalhadores agrícolas, uma vez que estão diretamente expostos ao agentes tóxicos (BURALLI et al., 2019).

Esse problema também pode se estender aos ecossistemas, dado que estes compostos são liberados em ambientes que compreendem biomas que não estão adaptados aos químicos, prejudicando organismos não alvo e influenciando na estabilidade de cadeias tróficas inteiras (ROY, 1998; GONÇALVES et al., 2020; VIEIRA et al., 2020).

Apesar do conhecimento destas problemáticas, o uso de agrotóxicos no Brasil tem aumentado no decorrer das últimas décadas associado a um crescimento proporcional de mortes ou sequelas decorrentes de intoxicações agudas devido à exposição direta a esses químicos sintéticos (BOMBARDI, 2017). Esse aumento no uso de agrotóxicos tem acompanhado uma série de decisões governamentais que aumentaram o número de agrotóxicos e afins que podem ser comercializados no Brasil, tendo essas medidas se intensificado desde 2018. Por exemplo, apenas em 2019 foram liberados para comercialização mais 474 produtos (agrotóxicos e afins) – a maior liberação anual desde 2005 (SOUZA et al., 2020).

Partindo deste princípio, a busca por novos recursos naturais, tais como compostos biológicos e químicos, associada aos avanços da Biologia Molecular e Engenharia Genética durante o fim do século passado foram cruciais para fornecer novas soluções para problemas contemporâneos (WANI et al., 2020). Uma destas tecnologias é a utilização de plantas transgênicas, que são fitoculturas que transportam genes inseridos artificialmente. Portanto, o cultivo de transgênicos parece ser uma ótima alternativa ao uso de agrotóxicos com o potencial de melhorar a produtividade e a economia (MRÍZOVÁ et al., 2014). Em países em desenvolvimento, esta alta produção de alimentos básicos confere uma melhora na produtividade agrícola, aumentando o rendimento e diminuindo os preços destes recursos (TRIPP, 2009).

Nesta perspectiva, a busca de elementos naturais como proteínas e peptídeos que possam conferir resistência a pragas têm sido intensa, uma vez que os benefícios de sua incorporação em plantas transgênicas podem ser compensadores à sociedade e ao meio ambiente. No entanto, nenhuma tecnologia nova está isenta de riscos e, portanto, deve ser avaliada quanto à presença de potenciais efeitos não-intencionais contra organismos não-alvo (FARIAS et al., 2014).

## 2.2. *Moringa oleifera* Lam.

A *M. oleifera* Lam., conhecida popularmente como “moringa, “acácia branca” ou “horseradish tree”, é uma árvore (ou arbusto) descrita por Lamarck, em 1785, e faz parte da família *Moringaceae*. Nativa da Índia, mas introduzida em regiões tropicais e subtropicais de todo o mundo é comumente cultivada para ornamentação, mas seu uso mais comum é nutricional (PEREIRA et al., 2018).

A moringa pode alcançar até 10 metros de altura e possui uma rápida taxa de crescimento (Figura 1). Apresenta folhas imparipinadas, obovadas, com 1-2 cm de comprimento, agrupadas com 3 a 5 pares de folhetos em raques pecioladas de 12 a 25 cm de comprimento. Os frutos possuem geralmente 1-2 cm de largura, de 30 a 50 cm de comprimento, mas podem alcançar até 120 cm de comprimento em algumas variedades, seção transversal longa, pontiaguda e triangular. Possui sementes pretas oleosas de até 1 cm de diâmetro, agrupadas em vagens (Figura 1). Na Índia costuma perder as folhas entre dezembro e janeiro e floresce entre fevereiro e março e só produz frutos maduros em meados de abril e março, no entanto, em condições constantemente favoráveis torna-se perene (FUGLIE et al., 1999).

Figura 1 - *Moringa oleifera* Lam.: sementes (à esquerda) e estrutura arbórea (à direita).



Fonte: MfRural 2021; Sitio da Mata 2021

Todas as partes da árvore da moringa são comestíveis e há muito tempo são consumidas por seres humanos. Foi usada como alimento no Egito, Grécia e Roma antigos e, hoje em dia, é amplamente cultivada. Há muitos usos para moringa, como: produção de biomassa, produção de biogás a partir das folhas, agente de limpeza doméstica com folhas trituradas, corante azul da

madeira, cercas vivas, fertilizantes feitos de misturas com sementes, nutriente foliar do suco concentrado das folhas, adubo verde, remédios (todas as partes das plantas), plantas ornamentais, biopesticida (incorporação de folhas no solo para evitar o amortecimento das mudas), polpa (madeira), corda (casca), purificação de água (sementes em pó), dentre outros (KHALAFALLA et al., 2010)

O óleo de semente de moringa (que corresponde a 30-40% do peso) é utilizado em saladas, para lubrificação de máquinas, na fabricação de perfumes e produtos para os cabelos (TSAKNIS et al., 1999). As folhas da moringa podem ser consumidas frescas, cozidas ou trituradas como farinha e armazenadas por muitos meses sem perder valor nutricional, ou seja, é uma fonte de nutrição extremamente interessante para os trópicos (FAHEY, 2005). A madeira tem baixa qualidade, as sementes são consumidas cruas, torradas, em pó ou mergulhadas em chá (GASSENSCHMIDT et al., 1995).

### 2.3. *Mo*-CBP<sub>3</sub>

Em 2012, Gifoni e colaboradores identificaram uma nova proteína nas sementes da *M. oleifera*, para qual foi imputada um papel na defesa da planta a partir da prevenção contra infecções por fitopatógenos fúngicos, pragas que assolam os mais variados tipos de culturas. Apesar de não possuir atividade do tipo quitinase,  $\beta$ -1,3-glucanase ou, ainda atividade hemaglutinante, esta proteína foi capaz de impedir a reprodução e o crescimento fúngico até mesmo depois de aquecida à 100 °C por uma hora ou tratada com o monossacarídeo NAG (*N*-acetilglicosamina) (GIFONI et al., 2012).

A proteína em questão faz parte do grupo de proteínas ligantes à quitina (em inglês, “Chitin Binding Proteins”), que costumam possuir uma grande resistência a mudanças de pH e proteólise, além de massa molecular baixa e mecanismo antifúngico a partir da ligação à parede celular dos fungos impedindo as hifas de exercerem seu crescimento. Esta proteína foi nomeada de *Mo*-CBP<sub>3</sub> (“*Moringa oleifera* Chitin Binding Protein”) e apresenta massa molecular de 14,3 kDa, obtida através de eletroforese bidimensional (GIFONI et al., 2012). Como parte do mecanismo de ação antifúngico, foi descrito que a *Mo*-CBP<sub>3</sub> consegue interferir com a bomba de prótons do citoplasma, assim como aumento de espécies reativas de oxigênio (BATISTA et al., 2014).

A *Mo*-CBP<sub>3</sub> foi classificada como um membro da família das albuminas 2S, uma das 3 grandes famílias de proteínas de armazenamento em sementes. Albuminas 2S geralmente são compostas por uma cadeia de aminoácidos pequena e uma maior ligadas por pontes de dissulfeto. O genoma das plantas costuma possuir diversos genes de albuminas 2S que não possuem íntrons e são

organizados como repetições em tandem, o que facilita a formação de isoformas dessas proteínas. A *Mo*-CBP<sub>3</sub> possui pelo menos 4 DNA complementares que traduzem isoformas. Já é suposto que algumas das proteínas nesta família estão envolvidas com a defesa da semente e a descoberta da *Mo*-CBP<sub>3</sub> corrobora esta afirmação (J. E. C. FREIRE et al., 2015).

Sua baixa massa molecular e capacidade de proteção contra fungos em baixas concentrações tornam a *Mo*-CBP<sub>3</sub> uma ótima candidata para o desenvolvimento de transgênicos. Testes preliminares *in vitro*, mostraram que esta proteína não possui atividade hemolítica, o que denota que sua atividade é possivelmente restrita a fungos e a priori não há risco entre seu contato com células eucarióticas (BATISTA et al., 2014).

#### **2.4. Avaliação de risco ambiental**

Em vigor no Brasil desde 2004, o Protocolo de Cartagena sobre a Biossegurança é assinado por mais de 130 países e trata-se de um marco nas questões sobre a avaliação de risco de produtos derivados da Biotecnologia moderna (SENADO, 2006). Neste sentido, este protocolo determina que devem ser avaliados os possíveis efeitos adversos de organismos geneticamente modificados (OGM's) e seus derivados sobre o meio ambiente e, também, à saúde humana (ONU, 2003).

Neste contexto, é razoável que proteínas candidatas ao desenvolvimento de OGM's sejam precocemente avaliadas quanto aos seus potenciais risco ao homem e aos ecossistemas. Isto pode poupar tempo e recursos financeiros no processo de desenvolvimento de uma nova cultivar transgênica, uma vez que proteínas potencialmente perigosas (por exemplo, alergênicas e tóxicas) podem ser rapidamente descartadas ou feitas modificações em suas estruturas a fim de debelar os efeitos indesejáveis (PINTO et al., 2015; FARIAS et al., 2015).

Quanto à avaliação de riscos ambientais de proteínas transgênicas, o que são normalmente feitos são testes de toxicidade aguda contra algumas espécies de organismos não-alvo, em sua maioria invertebrados terrestres (YU et al., 2011). Contudo, muito pouco se sabe sobre os efeitos dessas moléculas contra organismos aquáticos, o que é preocupante visto que já foi relatada a entrada de produtos derivados de lavouras transgênicas em corpos d'água (STRAIN E LYDY, 2015). Dessa forma, uma avaliação de risco ambiental da proteína antifúngica *Mo*-CBP<sub>3</sub>, que é candidata ao desenvolvimento de OGM's, poderia fornecer informações sobre a segurança dessa molécula para os ecossistemas naturais, com ênfase aos ambientes aquáticos (MARCHI, 2018).

Previamente, Marchi (2018) mostrou que a *Mo*-CBP<sub>3</sub> apresentou toxicidade aguda para embriões de peixe-zebra, determinando uma CL<sub>50</sub> de  $36,71 \pm 1,70$  mg/L em 96 horas de exposição. Além disso, a exposição de embriões de peixe-zebra a concentrações abaixo da CL<sub>50</sub> para esta

proteína foi capaz de alterar a atividade da acetilcolinesterase (AChE), um biomarcador de formação neuronal (ALTENHOFEN et al, 2017), e também de catalase (CAT) e glutathione S-transferase (GST), biomarcadores de estresse oxidativo (LING et al, 2011; SOPEZKI et al, 2013). Portanto, é hipotetizado que os efeitos tóxicos da *Mo-CBP<sub>3</sub>* podem ser desencadeados, em parte, pelo desbalanço do equilíbrio de espécies reativas de oxigênio e danos ao desenvolvimento inicial do sistema nervoso de peixe-zebra. Esses resultados revelam que esta proteína sob condições específicas pode apresentar riscos tanto à saúde humana quanto ao ambiente e, conseqüentemente, mais estudos fazem-se necessários para ampliar o conhecimento sobre os mecanismos de toxicidade da proteína.

## 2.5. História natural, classificação e biologia do peixe-zebra

Em 1822, o naturalista Francis Hamilton relatou pela primeira vez a ocorrência da espécie atualmente denominada de *D. rerio* no rio Kosi, sul da Ásia, entre a Índia e o Nepal. *D. rerio* é atualmente classificado como pertencente a família de peixes dulcícolas Cyprinidae. Foi descrito como um peixe com várias listras azuis e pretas alternadas pelo corpo achatado, capaz de crescer até 5 cm de comprimento num formato oblongo, possui uma cabeça pequena e meio oval, com olhos nas laterais que possuem pupilas redondas (HAMILTON, 1822).

Características sexuais secundárias indistintas dificultam a diferenciação entre machos e fêmeas antes da idade reprodutiva (Figura 2). O adulto, no entanto, possui um contorno corporal na fêmea gravídica que é perceptivelmente diferente do masculino, facilitando assim a distinção entre os sexos. Os machos costumam possuir barbatanas anais maiores e as papilas genitais distintas das fêmeas. A coloração de machos e fêmeas não proporciona dimorfismo sexual (LAALE, 1977; PARICHY, 2015).

O *D. rerio* é popularmente chamado de peixe-zebra por conta de seu tegumento listrado. É uma espécie ovípara. A primeira desova costuma ocorrer quando as fêmeas atingem um comprimento padrão de 2,49 cm e os machos um comprimento padrão de 2,31 cm. Essa condição é alcançada em 74 a 75 dias de desenvolvimento à 25,5 °C . Os ovos são depositados em grande número dentro de um período de 5 a 45 dias após a oviposição anterior, sendo ideal de 5 a 10 dias. Dificilmente os ovos são postos nos primeiros 4 dias após a oviposição anterior. O número máximo de ovos obtidos de uma única fêmea gravídica pode ser de 1500 a 1800. O número comumente varia entre 150 e 400 ovos por desova (HISAOKA & FIRLIT, 1962; PARICHY, 2015).

Há influência do intervalo de tempo de reprodução no número de ovos. Um intervalo de reprodução de 10 dias garante baixa mortalidade e eclosão uniforme. As larvas eclodem dias após a

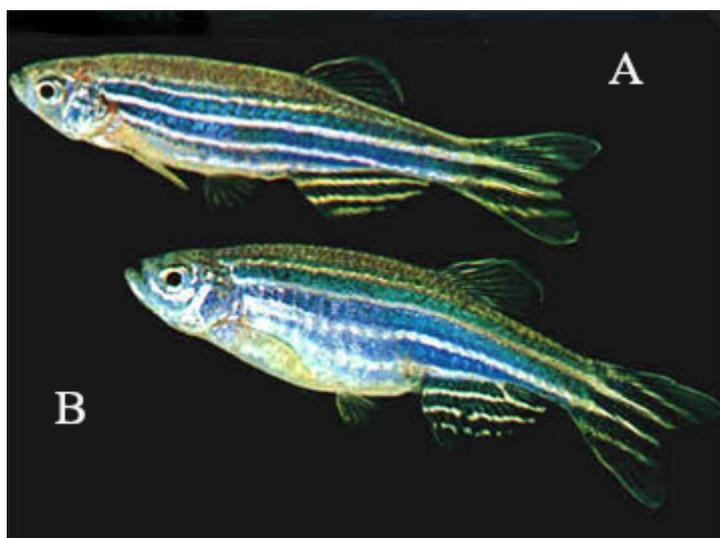
fertilização (NIIMI & LAHAM, 1974; HARPER et al, 2016).

O crescimento e a reprodução provavelmente estão ligados à estação do ano, com o principal período de crescimento rápido durante o início das estações chuvosas. No entanto, as fêmeas maiores (comprimento de 2,3 cm) coletadas em janeiro contêm óvulos maduros, indicando que a reprodução pode não ser limitada à sazonalidade, mas também pode depender da disponibilidade de alimentos, o que provavelmente será maior durante o período chuvoso. Esta conclusão é consistente com o fato de que o peixe-zebra domesticado se reproduz o ano todo com a devida alimentação (SPENCE et al., 2007; CHAKRABORTY et al, 2009).

A nutrição e a temperatura provavelmente são os fatores de maior importância na preparação do peixe para a fertilização. *D. rerio* é onívoro e costuma prosperar bem com uma variação de alimentos, tais como plâncton, paramécio, minhocas, larvas de mosquitos, dáfnias e drosófilas. Alimentar duas vezes ao dia é adequado, embora seja relatado maiores frequências de alimentação. A temperatura dos tanques de estoque deve ser mantida em 24 °C e os tanques de criação em 26 °C, a água perdida por evaporação deve ser substituída pela adição de água destilada ao tanque (HARPER et al, 2016).

É relatado que uma fêmea colocada com quatro ou cinco machos a 26 °C produz cerca de 200 a 250 ovos. No entanto, uma proporção de duas fêmeas para três machos a 26° C se mostrou mais produtivo em diversos casos (LAALE, 1977; CHAKRABORTY et al, 2009).

Figura 2 – Dois espécimes adultos de *Danio rerio*, conhecido popularmente como peixe-zebra ou paulistinha. Representando o dimorfismo sexual da espécie: A) macho com o corpo esguio e formato de torpedo e B) fêmea com protuberância na área ventral.



Fonte: achetudoeregiao 2021

## 2.6. Peixe-zebra como sistema modelo na ciência

O uso do *D. rerio* na experimentação científica data de pelo menos 1930, em trabalhos relatando hibridização de Cyprinidae. A partir de então percebeu-se que a facilidade na obtenção dos embriões, o baixo custo desde a aquisição dos peixes até sua manutenção, além de possibilitar um objeto de estudo magnífico que são os embriões transparentes e em grandes quantidades (TAVARES, 2013).

Na década de 1960, o peixe-zebra foi usado pela primeira vez na pesquisa sobre câncer, quando Stanton e colaboradores usaram este organismo para testar os efeitos de agentes cancerígenos. O peixe-zebra mostrou-se então ser um modelo excelente para estudar se o tumor é benigno ou maligno por meio de ensaios de transplante de tumores. Vários tipos de câncer foram estudados com esse modelo, como leucemia, melanoma, câncer endócrino e hepático a partir de xenotransplante (xenoenxertos) de células tumorais humanas em embriões de peixe-zebra. é possível abordar a migração de células tumorais, metástase e angiogênese e até determinar potenciais agentes e alvos terapêuticos (SEOK et al., 2008).

O peixe-zebra só veio a ser popular no meio científico no início da década de 1980 com um grande estudo sobre genética e clonagem de peixes, a partir daí sua notoriedade cresceu, refletida em seu crescente número de publicações anuais na área de toxicologia (MIYAWAKI et al, 2020.)

Se destaca pela sua compatibilidade tecidual e de órgãos com os homólogos humanos (GOLDSMITH et al, 2012), 70% de seu DNA é correspondente ao DNA humano, e até 84% dos genes causadores de patologias em humanos são encontrados no *D. rerio* (HOWE, 2013), o que permite uma fácil extrapolação de dados importante em pesquisas na saúde humana (MIYAWAKI et al, 2020).

Existem vantagens no uso do peixe-zebra como sistema modelo em Toxicologia e Ecotoxicologia. Os principais benefícios do uso do peixe-zebra como modelo experimental em relação a outras espécies de vertebrados são em relação ao tamanho, criação e morfologia precoce. Ao contrário de outras espécies de peixes, como a truta, os adultos de peixe-zebra são bem menores, o que reduz muito o espaço de moradia e os custos de criação. Da mesma forma, o pequeno tamanho da larva e adulto minimiza os custos através do uso de pequenas quantidades das soluções teste, que incluem químicos, drogas e poluentes. Consequentemente, isto acaba por gerar volumes menores de resíduos para descarte, seja para manejo e criação de peixes vivos ou para realização de vários ensaios e avaliações histológicas (A. J. HILL et al., 2002).

Nos últimos anos o peixe-zebra tem ascendido cada vez mais como plataforma biológica para testes de toxicidade e prospecção de drogas, isso porque há uma grande quantidade de

substâncias que afetam estes organismos e a espécie humana de maneiras muito semelhantes (SHIN et al, 2002; DELVECCHIO et al, 2011). O peixe-zebra é vulnerável à absorção de compostos através da boca, tegumento e brânquias e principalmente através do tegumento dos embriões, o que facilita a administração e avaliação de compostos (CHAKRAVARTHY et al, 2014). A OECD (Organização para a Cooperação e Desenvolvimento Econômico) recomenda e padroniza ensaios de toxicidade aguda em embriões de peixe zebra, chamado teste FET (Fish Embryo acute Toxicity) (OECD, 2013). Nesta perspectiva, o peixe se mostra como uma ótima ferramenta para teste de toxicidade de xenobióticos, como proteínas (GRISOLIA et al, 2009; BLAGOJEVIC et al, 2021), o que torna este organismo adequado ao objetivo do presente trabalho.

## 3 OBJETIVOS

### 3.1 Objetivo geral

Ampliar o conhecimento sobre o mecanismo de toxicidade da proteína antifúngica *Mo-CBP<sub>3</sub>* em embriões de peixe-zebra (*D. rerio*), numa perspectiva de contribuir com informações de segurança desta proteína para o desenvolvimento de plantas transgênicas.

### 3.2 Objetivos específicos

- Monitorar temporalmente alterações morfológicas (surgimento de vesículas) em embriões de peixe-zebra expostos à *Mo-CBP<sub>3</sub>*;
- Avaliar a dependência do sítio de ligação à açúcar da *Mo-CBP<sub>3</sub>* para a sua toxicidade embrionária;
- Verificar a bioacumulação da *Mo-CBP<sub>3</sub>* em embriões de peixe-zebra;
- Avaliar os efeitos da *Mo-CBP<sub>3</sub>* sobre o sistema enzimático antioxidante e do metabolismo energético anaeróbico;

## 4 METODOLOGIA

### 4.1 Obtenção da proteína

Foram fornecidos 50 mg da proteína *Mo-CBP*<sub>3</sub> liofilizada pelas professoras Ilka Maria Vasconcelos e Daniele Oliveira Bezerra de Sousa, coordenadoras do Laboratório de Proteínas Tóxicas (LabTox) da Universidade Federal do Ceará (Fortaleza-CE). A amostra da proteína foi mantida sob refrigeração entre 2 e 8 °C até o momento dos testes. A identidade e pureza desta amostra foi previamente confirmada por Marchi (2018) através de uma eletroforese em gel de poliacrilamida em condições desnaturantes. A proteína apresentou seu padrão característico de bandas (uma banda maior com massa molecular aparente próxima a 20,1 kDa e duas bandas menores de massa molecular aparente abaixo de 14,4 kDa) e pureza superior a 90%.

### 4.2 Obtenção de embriões

Embriões de peixe zebra de linhagem tipo selvagem (geração F2), com até 1 hpf (hora pós-fertilização), utilizados nos testes cedidos pela Unidade de Produção de Organismos Modelo Não Convencionais (UniPOM), que fica localizada no Departamento de Biologia Molecular da Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, Brasil. Os parentais foram mantidos em um sistema de recirculação de água com pH e níveis de amônia e nitrito regularmente monitorados, mantido em uma sala com temperatura de  $26 \pm 1$  °C e fotoperíodo de 14 h claro: 10 h escuro controlados. Para a obtenção dos embriões, animais adultos (razão macho:fêmea = 2:1) foram transferidos para um dispositivo de acasalamento com capacidade de 7 L no dia anterior ao experimento. No dia seguinte, os embriões foram coletados, lavados com água do sistema de recirculação e, posteriormente, alocados em meio embrionário E3 (NaCl 5,0 mM, KCl 0,17 mM, CaCl 0,33mM e MgSO<sub>4</sub> 0,33mM). Posteriormente, embriões viáveis (padrão normal de clivagem e ausência de alterações morfológicas) foram selecionados em um microscópio de luz invertida (Televal 31, Zeiss, Alemanha) em um aumento de 50 x. Embriões inviáveis foram congelados e, posteriormente, incinerados, enquanto embriões excedentes ou utilizados nos experimentos foram previamente eutanasiados com eugenol antes do congelamento.

Os procedimentos e testes com embriões de peixe-zebra neste estudo foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal da Paraíba (CEUA-UFPB), sob protocolo n° 6743030518.

### 4.3 Monitoramento de alterações morfológicas

Resultados preliminares mostraram que a exposição a concentrações superiores à 25 mg/L de *Mo*-CBP<sub>3</sub> nas primeiras 24 h (de um total de 96 h) induziu à formação de vesículas no embrião de peixe-zebra. Dado o exposto, foi proposta neste estudo a exposição de embriões de peixe-zebra à *Mo*-CBP<sub>3</sub> para monitorar temporalmente o surgimento dessas vesículas, marcando morfológicamente a passagem da proteína pela membrana coriônica e seu contato com a superfície do embrião. Para este experimento, 20 embriões com até 3 hpf foram tratados com 50 mg/L da proteína durante 24 h, a uma temperatura de  $26 \pm 1$  °C e fotoperíodo de 14:10h (ciclo claro/escuro). A exposição ocorreu em uma placa de 96 poços, onde os embriões foram alocados individualmente em poços contendo 300 µL da solução teste. Um grupo controle negativo, onde os embriões foram expostos apenas a meio E3, foi estabelecido. A análise da formação de vesículas foi feita em intervalos de 30 min., utilizando um microscópio de luz invertida (Televal 31, Zeiss, Alemanha), com um aumento de 50 x.

### 4.4 Incubação da *Mo*-CBP<sub>3</sub> com *N*-acetilglicosamina e avaliação da embriotoxicidade

O teste consistiu em expor embriões de peixe-zebra à proteína *Mo*-CBP<sub>3</sub> previamente incubada com *N*-Acetilglicosamina (NAG). Este monossacarídeo é o componente da quitina (homopolímero), com o qual a *Mo*-CBP<sub>3</sub> interage com seu sítio de ligação a carboidratos e que é usado como estratégia para purificação dessa proteína (GIFONI et al., 2012).

Para avaliar se a incubação prévia com NAG seria capaz de minimizar os efeitos embriotóxicos da *Mo*-CBP<sub>3</sub>, embriões com até 3 hpf foram divididos em 4 grupos, numerados de 1 a 4, com 20 embriões por grupo e alocados individualmente em uma placa de 96 poços, cada poço contendo um volume de 300 µL da solução referente a cada grupo. O 1º grupo foi definido como controle e exposto apenas a meio E3; o 2º grupo foi exposto à 50 mg/L de *Mo*-CBP<sub>3</sub>; o 3º grupo foi exposto 50 mg/L de NAG preparado em meio E3; e o 4º grupo foi exposto à 50 mg/L de *Mo*-CBP<sub>3</sub> previamente encubada com uma solução de 50 mg/L NAG em meio E3 por 30 min, à 26 °C. A exposição teve duração de 96 h. Os embriões foram avaliados quanto à 4 critérios: (i) coagulação do embrião a partir de 24 hpf; (ii) formação das vesículas a partir de 24 hpf, que não é um sinal de letalidade, mas foi utilizado como um marcador do efeito inicial da proteína; (iii) curvatura anormal da coluna após a saída do córion verificada a partir de 72 hpf; (iv) e parada cardíaca, que foi usado como marcador de morte às 96 hpf. As observações foram feitas a cada 24 h, utilizando um microscópio de luz invertida (Televal 31, Zeiss, Alemanha), num aumento de 50 x.

#### 4.5 Verificação da bioacumulação da *Mo*-CBP<sub>3</sub>

A proteína *Mo*-CBP<sub>3</sub> foi marcada com a sonda fluorescente FITC (Isotiocianato de fluoresceína) para monitorar sua passagem através do córion e localização espacial no embrião de peixe-zebra. O protocolo de marcação da proteína com FITC foi feito de acordo com Green (1990). Posteriormente, embriões com até 3 hpf foram divididos em 3 grupos, numerados de 1 a 3, com 9 embriões por grupo e alocados individualmente em uma placa de 96 poços, cada poço contendo um volume de 300 µL da solução referente a cada grupo. Os grupos de 1 e 2 foram expostos a 12,5 e 25 mg/L, respectivamente, enquanto o 3º grupo foi definido como controle e exposto apenas ao meio E3. Os embriões foram mantidos protegidos da luz à 26 °C durante 24 h. A cada 6 h, três embriões de cada grupo foram coletados e dispostos em uma lâmina de vidro para observação através de microscopia de fluorescência (excitação de 496 nm) (BX41 Microscope, Olympus America Inc., Canadá), num aumento de 50x.

#### 4.6 Avaliação de estresse metabólico e oxidativo

Para contribuir na compreensão dos mecanismos de toxicidade, embriões de peixe-zebra foram expostos a concentrações inferiores à CL<sub>50</sub> da *Mo*-CBP<sub>3</sub> (36,71 ± 1,7 mg/L) previamente estabelecida por Marchi (2018) para determinação de marcadores enzimáticos de estresse metabólico (lactato desidrogenase-LDH) e oxidativo (glutathiona peroxidase-GPx). Para tanto, os embriões com até 3 hpf foram divididos em 5 grupos numerados de 1 a 5, onde os grupos de 1 a 4 foram expostos à *Mo*-CBP<sub>3</sub> nas concentrações de 10, 15, 20 e 25 mg/L, respectivamente, e o quinto grupo foi exposto apenas ao meio E3 utilizado como controle negativo. Cada grupo continha 20 embriões que foram alocados individualmente em uma placa de 96 poços, cada poço contendo um volume de 300 µL da solução referente a cada grupo. A exposição ocorreu durante 96 h, com temperatura de 26 °C e fotoperíodo de 14:10 h (ciclo claro/escuro). Ao final das 96 h, as larvas foram separadas em grupos (proporção de 1 larva para 25 µL de água destilada) e congeladas (-18 à -20 °C) para a posterior quantificação enzimática.

No dia das análises das atividades enzimáticas, as larvas foram descongeladas em banho de gelo, maceradas com um pistilo e centrifugadas (10.000 x g, 4 °C, por 20 min) para coleta do sobrenadante. Este material foi dividido em diferentes alíquotas para cada ensaio.

Foi utilizado o método fotolorimétrico de Bradford (1976) para a quantificação das proteínas solúveis, adaptado para uma placa com 96 poços. Uma curva padrão foi confeccionada a partir de albumina sérica bovina numa leitura de absorbância de 595 nm, utilizando um

espectrofotômetro (Multiskan GO, Thermo Fisher Scientific Oy, Finlândia). Cada amostra foi ensaiada em quadruplicata.

#### 4.6.1 GPx

A quantificação da atividade da GPx foi realizada de acordo com a metodologia descrita por Massarsky et al. (2017). Resumidamente, os sobrenadantes larvais (10 uL) foram distribuídos numa placa de 96 poços, seguidos da adição de 200 uL solução de ensaio da GPx (7,8 mg de  $\text{NaN}_3$ , 138,3 mg de GSH, 117  $\mu\text{L}$  de glutathiona redutase 2 U/mL, 5 mL de água deionizada e 20 mL KPB-50). Foi preparado um branco do teste pela substituição da amostra por 10  $\mu\text{L}$  de KPB-50. A absorbância foi lida em 340 nm até que as linhas estivessem planas (aproximadamente 5 min). Em seguida, foi adicionado em cada poço  $\text{H}_2\text{O}_2$  e, novamente, foi feita a leitura por mais 10 min em intervalos de 30 s. A atividade específica de GPx foi expressa em unidades de ‘ $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$  de proteína’. As leituras foram feitas em quadruplicata para cada amostra.

#### 4.6.2 LDH

A determinação da atividade da LDH foi realizada através da metodologia descrita por Domingues et al. (2010). Quarenta microlitros do sobrenadante larval foi incubado com 80  $\mu\text{L}$  de solução tampão TRIS/NaCl/piruvato em um poço de placa de 96 poços. Após 30 s, a diminuição dos níveis de absorbância decorrente da oxidação do NADH foi avaliada por leitura em espectrofotômetro, à cada 20 s, durante 5 min, à 340 nm. A atividade específica de LDH foi expressa em unidades de ‘ $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$  de proteína’. As leituras foram feitas em quadruplicata para cada amostra.

#### 4.7. Análise estatística

Os resultados foram apresentados como média e desvio-padrão. Dados de atividade enzimática foram analisados estatisticamente utilizando o software Graphpad prism 8. Os resultados foram avaliados quanto a sua normalidade utilizando o teste de Shapiro-Wilk e, em seguida, a significância da diferença entre as médias foi medida pelo teste ANOVA one way e o pós teste de Tukey ( $p < 0,05$ ).

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 Alterações morfológicas

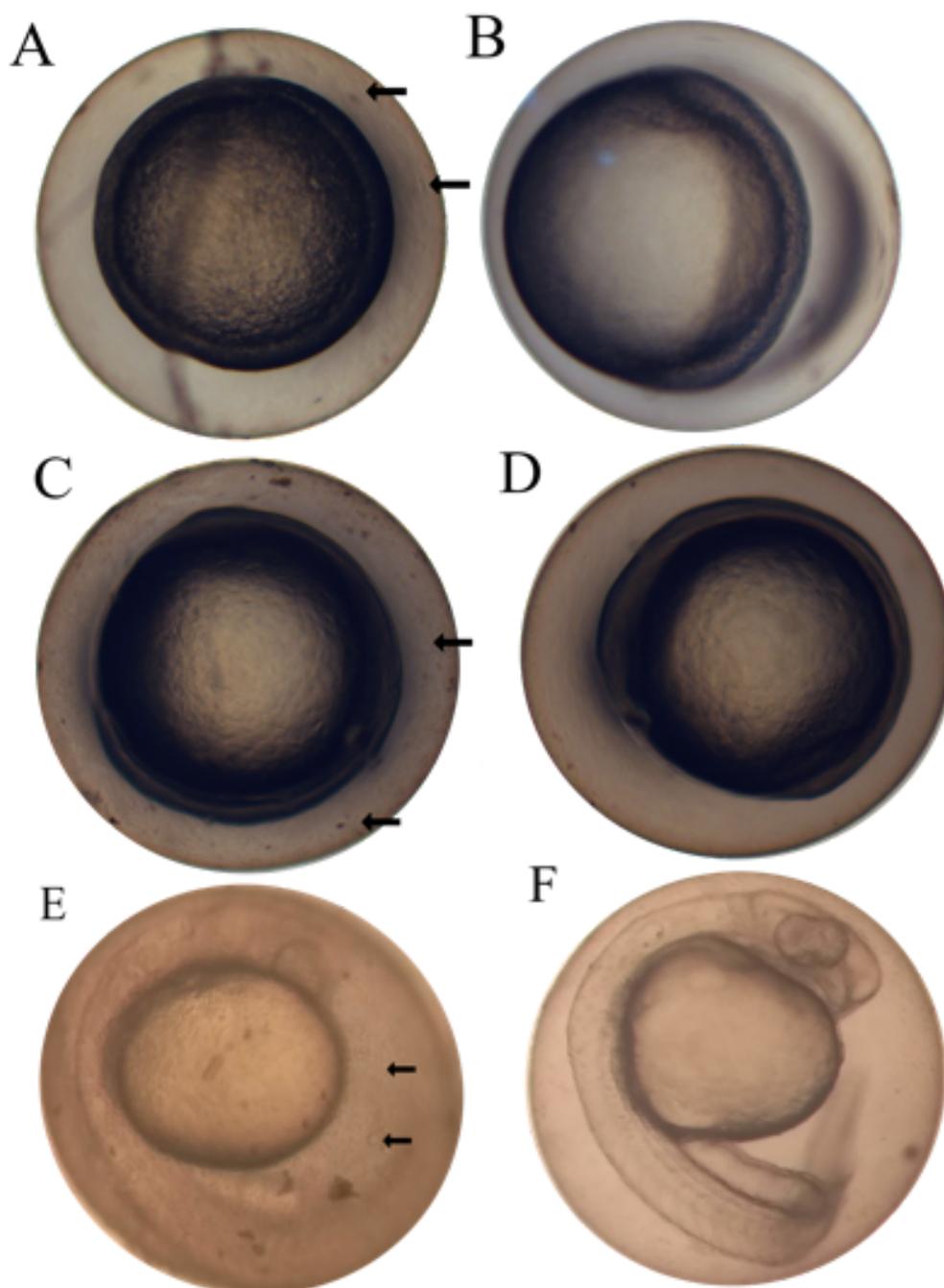
A partir do monitoramento da exposição dos embriões de peixe-zebra com aproximadamente 3 hpf à *Mo*-CBP<sub>3</sub> (50mg/L), durante 24 h, foi observado que o aparecimento das vesículas tem início após 1 h de exposição à proteína, ou seja, quando os embriões estão com 4 hpf (Figura 3A). Inicialmente as vesículas apresentam-se em pequeno tamanho e espaçadas, tornando-se maiores e mais numerosas até o final das 24 h de exposição (Figuras 3B e 3C). Deste tempo em diante, as vesículas formam agregados maiores e, posteriormente, uma estrutura em rede que envolve o embrião até o momento de sua morte.

### 5.2 Inibição da embriotoxicidade da *Mo*-CBP<sub>3</sub> com NAG

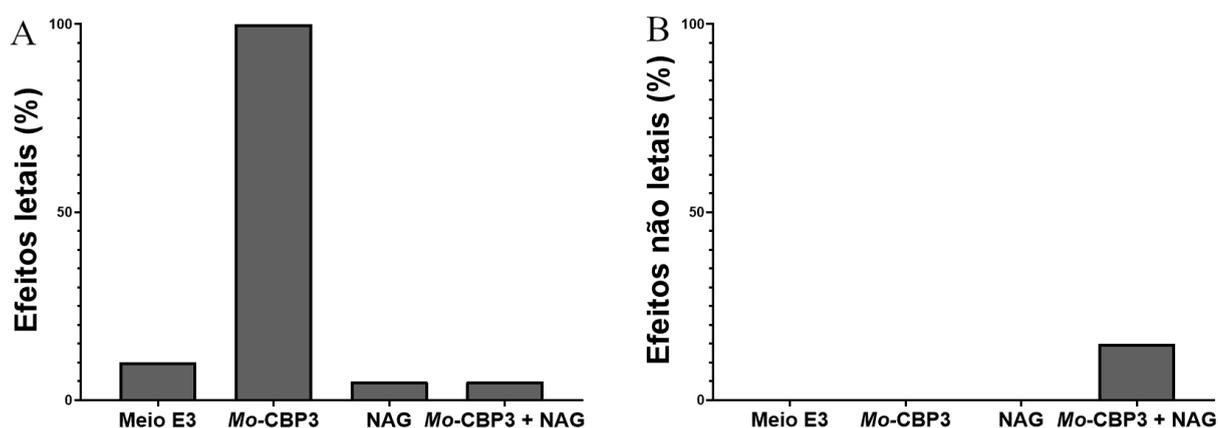
Os resultados da exposição de embriões de peixe-zebra com aproximadamente 3 hpf à *Mo*-CBP<sub>3</sub> (50mg/L), previamente incubada com NAG, estão mostrados na Figura 4. O grupo tratado somente com *Mo*-CBP<sub>3</sub> apresentou taxa de mortalidade de 100% dos embriões, enquanto o grupo tratado com a mesma concentração desta proteína previamente incubada com NAG apresentou 5% de mortalidade (Figura 4A). Os grupos expostos somente ao meio E3 ou ao grupo NAG apresentaram taxas de mortalidade (10% e 5%, respectivamente) com tendências similares à da *Mo*-CBP<sub>3</sub> (50 mg/L), previamente incubada com NAG (Figura Figura 4A).

De forma semelhante, não houve o efeito não letal do surgimento de vesículas nos grupos controle, NAG e nos embriões tratados com *Mo*-CBP<sub>3</sub> (50 mg/L) incubada com NAG. E o efeito não letal de coluna curvada surgiu no grupo de embriões tratado com a *Mo*-CBP<sub>3</sub> (50mg/L) incubada com NAG, apresentando apenas e 15% de embriões afetados, bem como não apareceram quadros não letais nos grupos controle (meio E3) e NAG (Figura 4B). Por outro lado, no grupo exposto à *Mo*-CBP<sub>3</sub> (50mg/L) foi possível verificar presença de vesículas em 100% dos embriões e 5% de larvas recém eclodidas apresentaram curvaturas na coluna (Figura 4B).

Figura 3 – Monitoramento de alterações morfológicas em embriões de peixe-zebra expostos à 50 mg/L de *Mo*-CBP<sub>3</sub> durante 24 h. A exposição teve início com embriões com aproximadamente 3 hpf, sendo acompanhada através de microscopia de luz, num aumento de 50 x. A, C e E são embriões expostos à *Mo*-CBP<sub>3</sub> com 5-6, 10-11 e 24 hpf, respectivamente. B, D e F são embriões controle (expostos somente à meio E3) com 5-6, 10-11 e 24 hpf. As setas apontam para as vesículas formadas após à exposição à *Mo*-CBP<sub>3</sub>.



**Figura 4** – Efeitos letais (A) e não letais (B) em embriões de peixe-zebra expostos à 50 mg/L de *Mo*-CBP<sub>3</sub>, com e sem incubação com *N*-acetilglucosamina (NAG), e controles (exposição somente à meio E3 ou à NAG) após 24 h. Coagulação e ausência de batimentos cardíacos foram os “endpoints” de letalidade observados, enquanto aparecimento de vesículas e coluna curvada foram os efeitos subletais registrados.

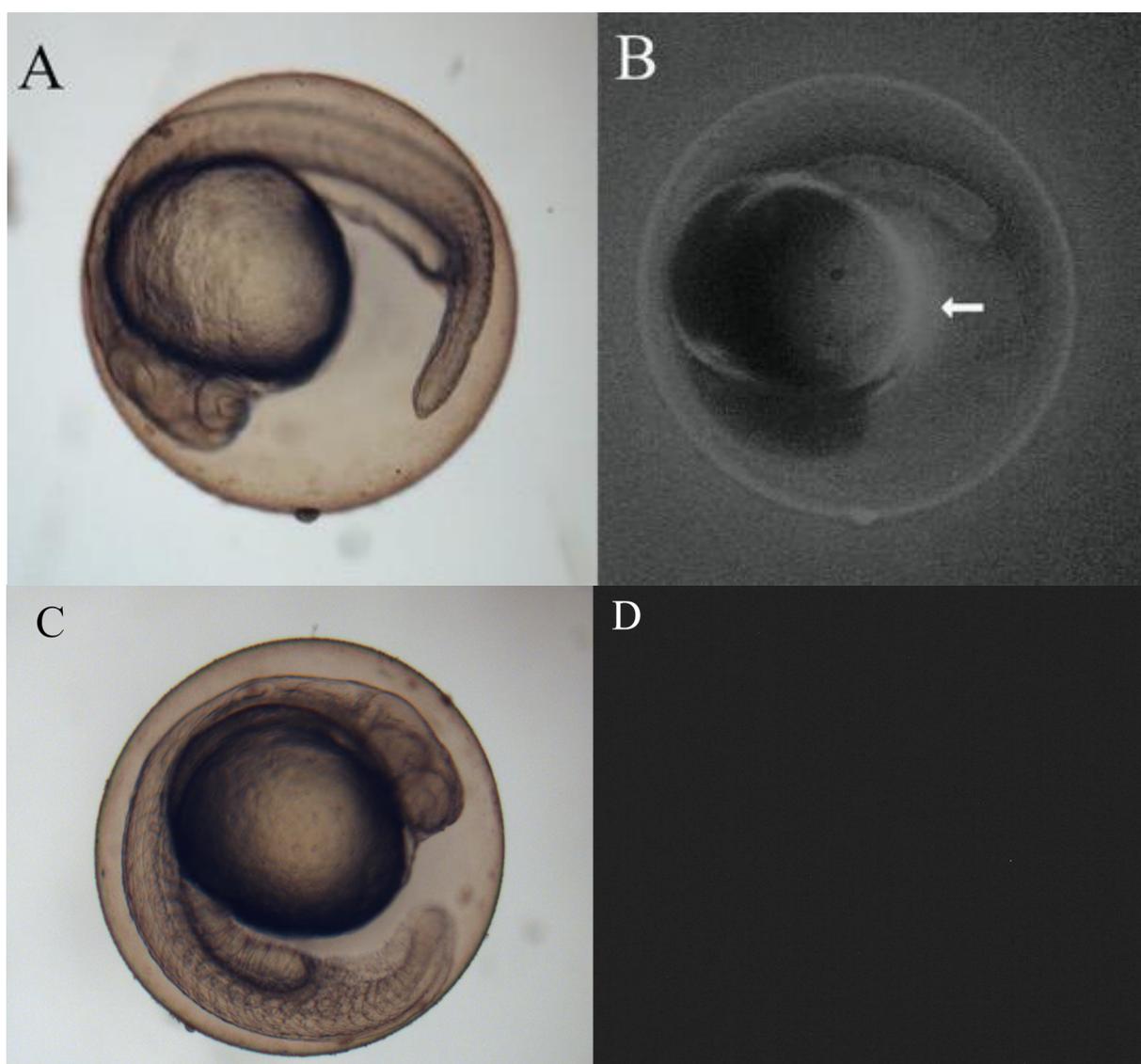


Fonte: Autor 2020

### 5.3 Bioacumulação de *Mo*-CBP<sub>3</sub>

A marcação fluorescente da *Mo*-CBP<sub>3</sub> com FITC possibilitou pressupor o percurso desta proteína e verificar a sua bioacumulação após contato com o embrião de peixe-zebra em meio aquoso. Como é possível observar na Figura 5B, é possível observar fluorescência (tons de cinza mais claros) ao longo da superfície do embrião, com maior intensidade na região do saco vitelínico. Dessa forma, a *Mo*-CBP<sub>3</sub> consegue atravessar a membrana coriônica e entra em contato com o embrião.

**Figura 5** - Embrião de peixe-zebra após exposição à *Mo*-CBP<sub>3</sub> marcada com FITC, numa concentração de 25 mg/L, por 24 h. A e B referem-se a mesma imagem de embrião exposto à *Mo*-CBP<sub>3</sub> em campo claro e escuro, respectivamente. A imagem B foi tratada com o software GIMP (<https://www.gimp.org>) para facilitar a visualização da fluorescência. Seta indicando o saco vitelínico onde há uma maior emissão de fluorescência. As imagens C e D representam o embrião controle, respectivamente nos campos claro e escuro, onde não há fluorescência. O embrião controle no campo escuro também foi editado no software GIMP, para que a observação seja equivalente.



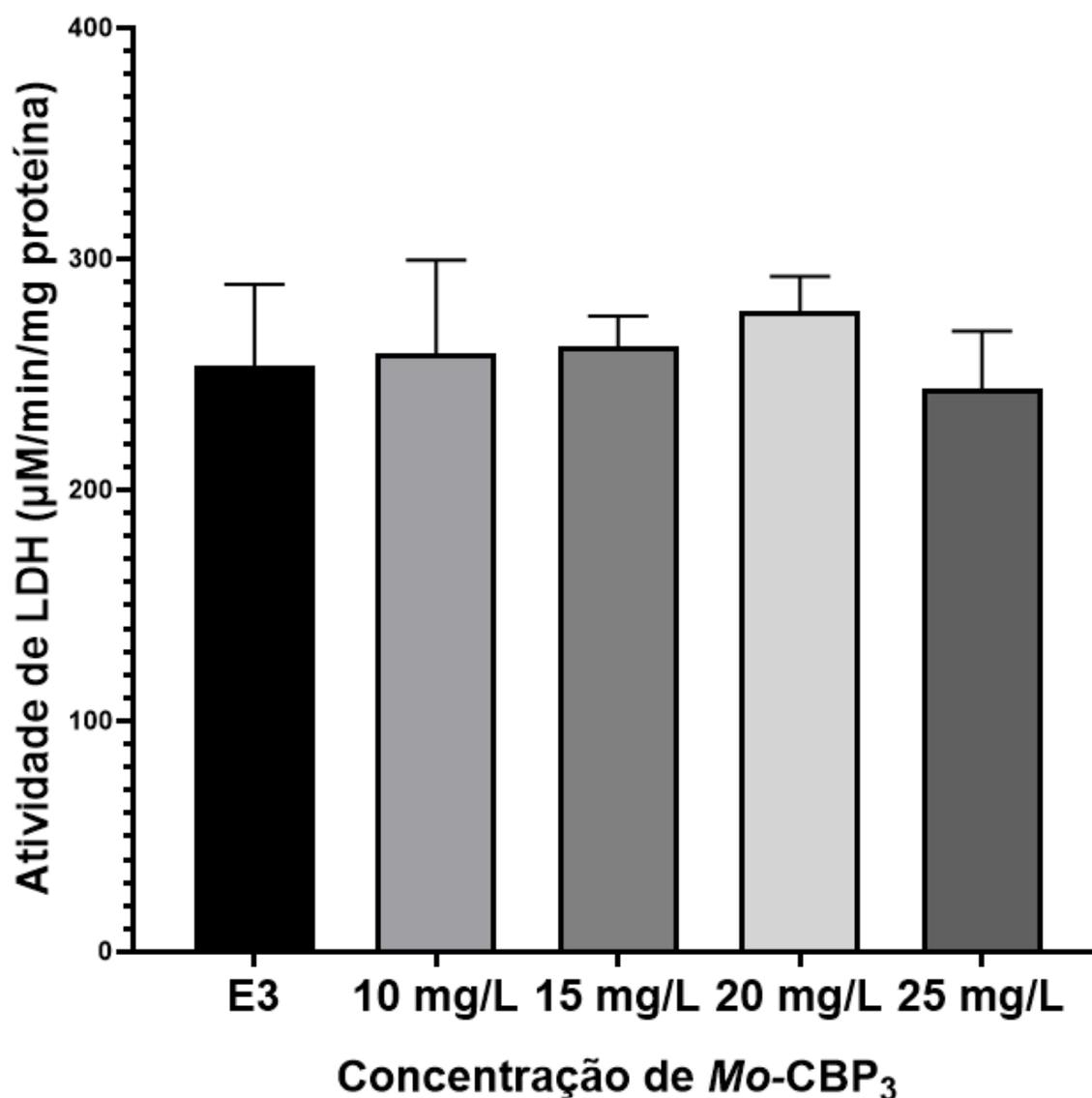
Fonte: Autor 2021.

#### 5.4 Quantificação enzimática de LDH

A quantificação da atividade enzimática de LDH em embriões de peixe-zebra expostos a

concentrações subletais de *Mo*-CBP<sub>3</sub> não demonstrou um aumento significativo ( $p > 0,05$ ) na atividade enzimática de LDH para nenhum dos grupos expostos a *Mo*-CBP<sub>3</sub> (com valores para as concentrações 10, 15, 20 e 25 mg/L de 259,4 ± DP; 262,3; 277,3 e 243,7 μM/min./mg de proteína, respectivamente), quando comparado ao grupo controle exposto somente ao meio E3 (253,4 μM/min./mg de proteína) (Figura 6).

Figura 6 - Quantificação de atividade enzimática de lactato desidrogenase (LDH) em larvas de peixe-zebra expostas a diferentes concentrações (10, 20, 30 e 40 mg/L) da *Mo*-CBP<sub>3</sub> ou somente ao meio embrionário E3, grupo controle, durante 96 h. Os resultados são expressos como média ± desvio padrão. Não foi verificada diferença significativa ( $p > 0,05$ ) entre os grupos teste e o controle.

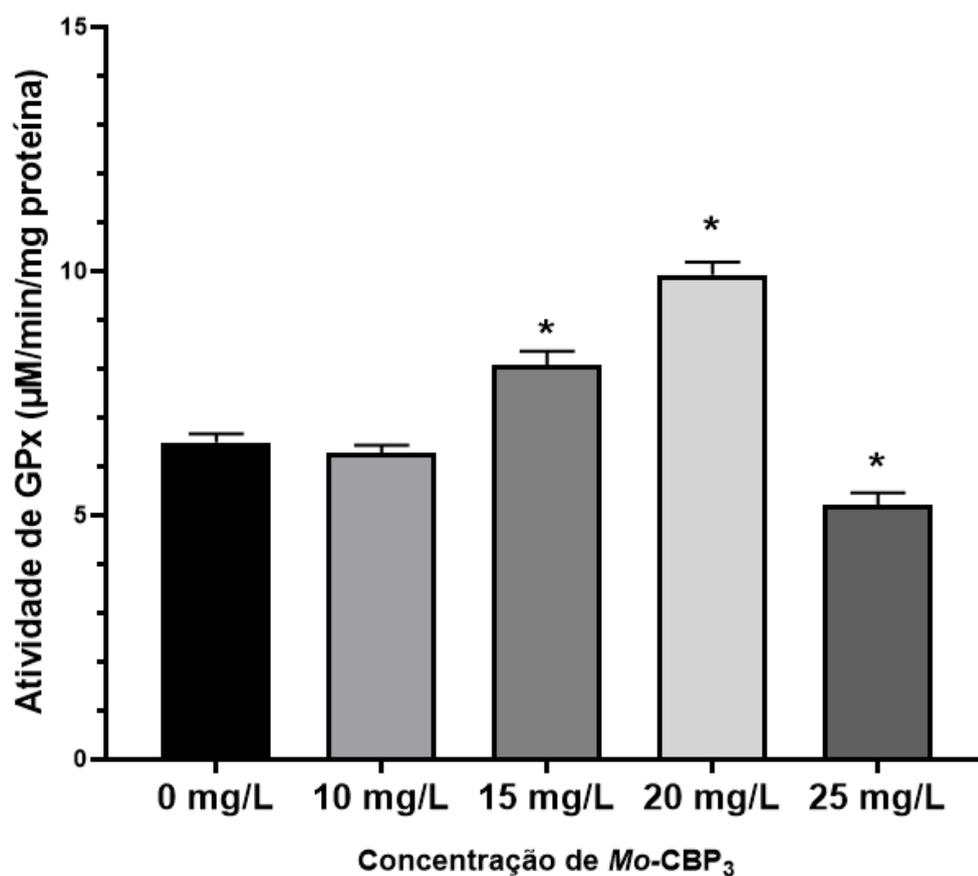


Fonte: Autor 2020

### 5.5 Quantificação enzimática de GPx

A quantificação da atividade enzimática de GPx revelou um aumento significativo ( $p < 0,05$ ) nas concentrações de 15 e 20 mg/L de *Mo*-CBP<sub>3</sub> ( $8,077 \pm DP$  e  $9,931 \pm \mu\text{M}/\text{min}/\text{mg}$  de proteína, respectivamente), quando comparadas ao grupo controle E3 ( $6,492 \pm$ ) (Figura 7). Por outro lado, teve uma redução significativa ( $p < 0,05$ ) da atividade na concentração mais alta, 25 mg/L de *Mo*-CBP<sub>3</sub> ( $5,221 \pm \mu\text{M}/\text{min}/\text{mg}$  de proteína). Da mesma forma, na concentração mais baixa de *Mo*-CBP<sub>3</sub>, 10 mg/mL, houve uma tendência de redução de atividade ( $6,274 \pm \mu\text{M}/\text{min}/\text{mg}$  de proteína) em relação ao controle, mas que não foi significativa ( $p < 0,05$ ).

**Figura 7** - Quantificação de atividade enzimática de Glutathiona Peroxidase (GPx) em larvas de peixe-zebra expostas a diferentes concentrações (10, 20, 30 e 40 mg/L) da *Mo*-CBP<sub>3</sub> ou somente ao meio embrionário E3 (E3), grupo controle, durante 96 h. Os resultados são expressos como média  $\pm$  desvio padrão, com asteriscos (\*) indicando diferença significativa ( $p < 0,05$ ) entre os grupos teste e o controle.



Fonte: Autor, 2020

Previamente, Marchi (2018) mostrou que a proteína antifúngica *Mo*-CBP<sub>3</sub> isolada das sementes de *M. oleifera* é tóxica para embriões do vertebrado modelo peixe-zebra, apresentando uma CL<sub>50</sub> 36,71 ± 1,7 mg/L em 96 h de exposição. Esta proteína apresentou também efeitos subletais em larvas tais como coluna curvada, além de promover alterações na atividade de enzimas do sistema antioxidante GST e CAT (Glutationa S-Transferase e Catalase) e no processo de neurotransmissão (AChE), o que revela que a *Mo*-CBP<sub>3</sub> atua, em parte, através de mecanismos de indução de estresse oxidativo e neurotoxicidade. Uma vez que esta proteína é uma candidata promissora para o desenvolvimento de plantas transgênicas para conferir resistência ao ataque de fungos fitopatogênicos, faz-se necessária uma maior compreensão dos seus efeitos tóxicos em organismos não-alvo. Neste sentido, este estudo objetivou ampliar o conhecimento sobre os mecanismos de toxicidade da *Mo*-CBP<sub>3</sub> aos estágios iniciais do desenvolvimento do peixe-zebra, dando suporte ao desenvolvimento de um produto biotecnológico com menos impactos aos ecossistemas.

O único “endpoint” de letalidade descrito por Marchi (2018) após exposição de embriões de peixe-zebra à *Mo*-CBP<sub>3</sub> foi coagulação embrionária. O mesmo autor relatou que nas primeiras 24 h de exposição a concentrações > 25 mg/L desta proteína e anteriormente à verificação de morte dos embriões era possível visualizar o aparecimento gradual de grânulos (chamados aqui de vesículas) no espaço perivitelínico (espaço entre o córion e a superfície embrionária), que aumentavam até formar uma camada amorfa que envolvia o embrião. Nesta condição, os embriões intensificaram os movimentos espontâneos, que Marchi (2018) hipotetizou como sendo um mecanismo de defesa ou ainda de resposta a estresse prolongado. Ademais, o autor afirmou que esses efeitos mostraram que possivelmente a *Mo*-CBP<sub>3</sub> seja capaz de atravessar a membrana coriônica através de mecanismos que ainda precisavam ser elucidados. Após o exposto, foi proposto no presente estudo monitorar o aparecimento das vesículas ao longo de 24 h de exposição à *Mo*-CBP<sub>3</sub> como um possível marcador da passagem desta proteína através da membrana coriônica e início do desencadeamento dos processos de toxicidade. Além disso, essa informação seria útil para os testes de exposição à *Mo*-CBP<sub>3</sub> marcada com FITC para verificação de bioacumulação dessa proteína no embrião como será discutido adiante.

O aparecimento de vesículas nos embriões de peixe-zebra iniciou poucas horas após o início da exposição à *Mo*-CBP<sub>3</sub>, entre 2 e 3 h, e atingiu um máximo após 24 h de exposição. Isto revela que o primeiro contato entre a proteína e a membrana coriônica seguido do cruzamento desta barreira, deve ter ocorrido logo nas primeiras horas da exposição, acontecendo por meio de difusão, sendo favorecido pela diferença de concentração na região pericoriônica. Como descrito por Marchi

(2018), a quantidade de vesículas observadas é dependente da concentração de proteína a qual os embriões são expostos. É importante ressaltar que não foi em todas as exposições à *Mo*-CBP<sub>3</sub> (em concentrações > 25 mg/L) que foi possível visualizar as vesículas e, em seguida, constatar a morte dos embriões e também nem todos os embriões afetados pelas vesículas apresentaram morte, contudo, o surgimento dessas estruturas pode ser um bom marcador da entrada e interação da *Mo*-CBP<sub>3</sub> com a superfície do embrião, que pode ser bastante útil em testes para elucidação dos mecanismos de toxicidade desta proteína, tais como marcação com sondas fluorescentes e estudos ômicos (metabolômica, transcriptômica e proteômica).

São raros os estudos publicados que utilizaram o embrião de peixe-zebra corionado para investigação dos efeitos tóxicos de compostos de alta massa molecular como é o caso da *Mo*-CBP<sub>3</sub>, que é uma glicoproteína básica semelhante a uma merolectina de 14,3 kDa (GIFONI et al., 2012). Certamente, um dos principais motivos para isso é que a membrana coriônica é impermeável a moléculas com massa molecular superior à 3,5 kDa (BONSIGNORIO et al., 1996; OECD, 2013). Um dos poucos exemplos é aquele da lectina WSMoL (do inglês “water-soluble lectin from *Moringa oleifera* seeds”), de 60 kDa, que causou a mortalidade (CL<sub>50</sub> 200 mg/L) de embriões de peixe-zebra com córion intacto, além de alterar o comportamento natatório e a atividade da AChE em concentrações subletais (SILVA et al., 2017). É sabido que esta classe de proteína possui um ou mais domínios de ligação à açúcar que são capazes de interagir reversivelmente com glicoproteínas de membranas biológicas, serem internalizadas e, em seguida, podem exercer uma variedade de atividades biológicas, que podem incluir atividade antifúngica, antibacteriana, antiprotozoário, dentre outras (SANTOS et al., 2014). Junto a isso é conhecido que a membrana coriônica possui uma grande diversidade de carboidratos presentes em suas glicoproteínas (BONSIGNORIO et al., 1996), podendo se configurarem como sítios potenciais de interação com moléculas exógenas. Uma vez que a *Mo*-CBP<sub>3</sub> possui um sítio de ligação à carboidratos é provável que sua passagem através do córion de embriões de peixe-zebra seja a partir da interação inicial com as glicoproteínas de membrana.

A fim de testar esta hipótese foi proposta a incubação da *Mo*-CBP<sub>3</sub> com NAG, açúcar que é utilizado na purificação desta proteína através de cromatografia de afinidade em coluna de quitina (GIFONI et al., 2012). Após a incubação com NAG, os embriões de peixe-zebra foram expostos à proteína para verificação da ocorrência dos efeitos letais e não letais previamente relatados. Essa estratégia foi utilizada também por Gifoni e colaboradores (2012), que mostraram que a incubação prévia da *Mo*-CBP<sub>3</sub> com NAG não interferiu em suas propriedades antifúngicas. Ao contrário do que foi encontrado por Gifoni et al. (2012), a incubação prévia da *Mo*-CBP<sub>3</sub> com NAG afetou a atividade tóxica letal da proteína em peixe-zebra, diminuindo drasticamente a mortalidade e efeitos

não letais em embriões e larvas tratados. Portanto, a interação do sítio de ligação a carboidrato da *Mo*-CBP<sub>3</sub> com carboidrato(s) presente(s) na membrana coriônica faz parte (pelo menos, parcialmente) dos mecanismos de internalização desta proteína e, conseqüentemente, do contato com a superfície embrionária. Esta constatação pode ser extremamente interessante ao analisar o interesse científico e industrial na *Mo*-CBP<sub>3</sub>. Já que a presença do NAG não impede esta proteína de exercer seu papel de inibição sobre a proliferação fúngica, é possível propor modificações estruturais a fim de debelar a porção ligante a carboidratos e, dessa forma, tornar a proteína mais segura para os organismos não-alvo. No entanto, mais informações sobre a estrutura e interação da *Mo*-CBP<sub>3</sub> com outras moléculas é necessário para obtenção de conclusões mais robustas sobre os efeitos de possíveis modificações estruturais nas atividades biológicas desta molécula.

Após a passagem através da membrana coriônica, foi possível verificar pela marcação da *Mo*-CBP<sub>3</sub> com FITC que, após 24 h de exposição, esta proteína recobriu toda a superfície embrionária, mas concentrou-se de forma mais intensa na região do saco vitelínico. Fazendo um paralelo com o surgimento das vesículas, é possível inferir que estas resultam da presença da proteína no fluido viscoso encerrado no espaço perivitelínico (entre o córion e a superfície do embrião) (HAMM et al., 2018) e/ou seja um produto da interação entre a proteína e o próprio embrião. Isto é corroborado pelo fato de que o aparecimento das vesículas atingiu seu máximo (dentro do período analisado) quando foi possível visualizar a *Mo*-CBP<sub>3</sub> concentrada na região do saco vitelínico.

O fato da *Mo*-CBP<sub>3</sub> acumular nesta região do embrião é difícil de explicação com os dados atuais na literatura, mas é sugerimos neste trabalho que possa estar relacionado à presença de carboidratos na membrana vitelínica do embrião de peixe-zebra que possam interagir com o sítio de ligação da proteína. O fato é que a região do saco vitelínico é vastamente irrigada por vasos sanguíneos que transportam os nutrientes para o embrião em desenvolvimento (SANT E TIMME LARAGY, 2018) e que podem, portanto, viabilizar a absorção e o transporte da *Mo*-CBP<sub>3</sub> por todo o embrião. Após distribuição sistêmica da proteína é possível que os mecanismos de toxicidade em seus diversos níveis (moleculares, bioquímicos e fisiológicos) possam ser desencadeados, que envolvem, em parte, a alteração do equilíbrio de ROS e neurotoxicidade (MARCHI, 2018). Dada a importância do vitelo para a nutrição e desenvolvimento do embrião, é provável que a *Mo*-CBP<sub>3</sub> também interfira na mobilização e distribuição dos nutrientes assim como descrito para outros toxicantes (SANT E TIMME LARAGY, 2018).

A fim de ampliar o conhecimento dos mecanismos de toxicidade da *Mo*-CBP<sub>3</sub> foi feita uma nova exposição de embriões de peixe-zebra a concentrações subletais desta proteína para determinação da atividade de GPx e LDH. A GPx é uma enzima que pertence a uma família de

selenoproteínas, e sua função é catalisar a redução do peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ), o que a torna muito importante na defesa celular contra ROS (ICHODARO, et al. 2018). O aumento da atividade de GPx nas concentrações de 10, 15 e 25 mg/L de *Mo*-CBP<sub>3</sub> é diferente de resultados encontrados por (MARCHI, 2018) em outras enzimas, que mostrou que CAT e GST, também envolvidas na neutralização de ROS, tiveram suas atividades reduzidas após exposição de embriões às mesmas concentrações. O aumento de GPx, em contraste com a diminuição de GST e CAT nessas concentrações, pode indicar que vias bioquímicas catalisadas por esta enzima foram priorizadas para neutralizar as ameaças causadas por ROS, já que esta enzima é considerada mais importante do que a CAT por ter uma afinidade maior e conseguir eliminar  $H_2O_2$  quando este está numa concentração muito mais baixa (DUAN, 2015).

Por sua vez, a LDH é uma enzima responsável por converter o piruvato no final da glicólise em lactato. Uma mudança no padrão desta enzima, pode indicar uma alteração no metabolismo energético, já que ela é importante na via metabólica anaeróbica, e também é essencial para o desenvolvimento muscular, sendo considerada como um marcador de hipóxia e lesão celular em células do fígado, coração, pâncreas, rins, músculos esqueléticos, cérebro e glóbulos vermelhos (DOMINGUES et al. 2010; VIEIRA et al. 2008). A exposição dos embriões à *Mo*-CBP<sub>3</sub> não mostrou uma alteração significativa na atividade de LDH, evidenciando que os mecanismos de toxicidade não perfazem a indução de estresse metabólico via hipóxia.

## 6. CONCLUSÃO

Os resultados mostraram que a *Mo*-CBP<sub>3</sub> é capaz de atravessar a membrana coriônica de embriões de peixe-zebra (*Danio rerio*) através de mecanismos que envolvem, pelos menos em parte, sua interação com carboidratos presentes nesta estrutura. Que a interação da proteína com o açúcar NAG pode inibir sua atividade tóxica letal. Após chegar ao espaço perivitelínico, *Mo*-CBP<sub>3</sub> se acumula na superfície corporal do embrião, concentrando-se na região do saco vitelínico. Além disso, foi visto que concentrações subletais de *Mo*-CBP<sub>3</sub> alteraram a atividade de GPx, sugerindo que a proteína afeta o sistema de defesa contra espécies reativas de oxigênio e gera estresse oxidativo. O conjunto de dados apresentados neste trabalho reportam pela primeira vez os mecanismos básicos pelos quais uma proteína de alta massa molecular, neste caso uma lectina, é capaz de atravessar a membrana coriônica de peixe-zebra e promover efeitos tóxicos. Por fim, é importante que mais estudos ecotoxicológicos sejam realizados com *Mo*-CBP<sub>3</sub> a fim de dar suporte ao uso desta proteína no desenvolvimento de produtos biotecnológicos com menos impactos aos ecossistemas aquáticos.

## 7. REFERÊNCIAS

- ALTENHOFEN, Stefani et al. Envolvimento dos sistemas purinérgico, colinérgico e dopaminérgico na neurotoxicidade induzida por metais e agrotóxicos em peixe-zebra (*Danio rerio*). 2017.
- ANDERSON, Kym; NIELSEN, Chantal Pohl. GMOs, Food Safety and the Environment: What Role for Trade Policy and the WTO?. 2002.
- ARYA, Dharamvir Singh et al. Effect of Piper betle on cardiac function, marker enzymes, and oxidative stress in isoproterenol-induced cardiotoxicity in rats. **Toxicology mechanisms and methods**, v. 20, n. 9, p. 564-571, 2010. *ATO Nº 62, DE 13 de setembro DE 2019 - ATO Nº 62, DE 13 de setembro DE 2019 - DOU - Imprensa Nacional*. (n.d.). Retrieved May 2, 2020, from <http://www.in.gov.br/en/web/dou/-/ato-n-62-de-13-de-setembro-de-2019-216556339>
- BATISTA, Adelina B. et al. New insights into the structure and mode of action of Mo-CBP3, an antifungal chitin-binding protein of *Moringa oleifera* seeds. **PloS one**, v. 9, n. 10, p. e111427, 2014.
- BLAGOJEVIĆ, Dajana et al. Evaluation of cyanobacterial toxicity using different biotests and protein phosphatase inhibition assay. **Environmental Science and Pollution Research**, p. 1-12, 2021.
- BONSIGNORIO, Daniele et al. Structure and macromolecular composition of the zebrafish egg chorion. **Zygote**, v. 4, n. 2, p. 101-108, 1996.
- Brachydanio rerio – Zebra ‘*Danio*’ (*Brachydanio frankei*, *Danio rerio*) — Seriously Fish. (n.d.). Retrieved May 3, 2020, from <https://www.seriouslyfish.com/species/danio-rerio/>
- BURALLI, Rafael Junqueira et al. Data on pesticide exposure and mental health screening of family farmers in Brazil. **Data in brief**, v. 25, p. 103993, 2019.
- CHAKRABORTY, Chiranjib et al. Zebrafish: a complete animal model for in vivo drug discovery and development. **Current drug metabolism**, v. 10, n. 2, p. 116-124, 2009.
- CHAKRAVARTHY, Sridhara et al. Zebrafish as an in vivo high-throughput model for genotoxicity. **Zebrafish**, v. 11, n. 2, p. 154-166, 2014.
- DELVECCHIO, Chris; TIEFENBACH, Jens; KRAUSE, Henry M. The zebrafish: a powerful platform for in vivo, HTS drug discovery. **Assay and drug development technologies**, v. 9, n. 4, p. 354-361, 2011.
- DE SANTANA SILVA, Livia Lais et al. Ecotoxicity of water-soluble lectin from *Moringa oleifera* seeds to zebrafish (*Danio rerio*) embryos and larvae. **Chemosphere**, v. 185, p. 178-182, 2017.
- DIAMOND, Jared. Evolution, consequences and future of plant and animal domestication. **Nature**, v. 418, n. 6898, p. 700-707, 2002.

- DOMINGUES, Inês et al. Biomarkers as a tool to assess effects of chromium (VI): comparison of responses in zebrafish early life stages and adults. **Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology**, v. 152, n. 3, p. 338-345, 2010.
- DUAN, Yafei et al. Oxidative stress response of the black tiger shrimp *Penaeus monodon* to *Vibrio parahaemolyticus* challenge. **Fish & shellfish immunology**, v. 46, n. 2, p. 354-365, 2015.
- FAHEY, Jed W. Moringa oleifera: a review of the medical evidence for its nutritional, therapeutic, and prophylactic properties. Part 1. **Trees for life Journal**, v. 1, n. 5, p. 1-15, 2005.
- FAO, WHO, IFAD, WFP, & UNICEF. (2019). The State of Food Security and Nutrition in the World 2019. Safeguarding against economic slowdowns and downturns. In *FAO*. <https://doi.org/10.4060/CA5162EN>
- FARIAS, Davi Felipe et al. Evaluation of cytotoxic and antimicrobial effects of two Bt Cry proteins on a GMO safety perspective. **BioMed research international**, v. 2014, 2014.
- FARIAS, Davi F. et al. Food safety knowledge on the Bt mutant protein Cry8Ka5 employed in the development of coleopteran-resistant transgenic cotton plants. **Bioengineered**, v. 6, n. 6, p. 323-327, 2015.
- FORGET, Gilles. Pesticides and the third world. **Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A Current Issues**, v. 32, n. 1, p. 11-31, 1991.
- FREIRE, Carmen; KOIFMAN, Rosalina Jorge; KOIFMAN, Sergio. Hematological and hepatic alterations in Brazilian population heavily exposed to organochlorine pesticides. **Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A**, v. 78, n. 8, p. 534-548, 2015.
- FREIRE, José EC et al. Mo-CBP 3, an Antifungal chitin-binding protein from *Moringa oleifera* seeds, is a member of the 2S albumin family. **PLoS One**, v. 10, n. 3, p. e0119871, 2015.
- RANGEL, Gabriel. From corgis to corn: a brief look at the long history of GMO technology. **Science in the News, Harvard University, MA, USA**, 2015.
- FUGLIE, Lowell J. et al. The miracle tree: *Moringa oleifera*, natural nutrition for the tropics. 1999.
- GASSENSCHMIDT, Ursula et al. Isolation and characterization of a flocculating protein from *Moringa oleifera* Lam. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects**, v. 1243, n. 3, p. 477-481, 1995.
- GIFONI, Juliana M. et al. A novel chitin-binding protein from *Moringa oleifera* seed with potential for plant disease control. **Peptide Science**, v. 98, n. 4, p. 406-415, 2012.
- GOLDSMITH, Jason R.; JOBIN, Christian. Think small: zebrafish as a model system of human pathology. **Journal of Biomedicine and Biotechnology**, v. 2012, 2012.
- GONÇALVES, Íris Flávia Sousa et al. Toxicity testing of pesticides in zebrafish—a systematic review on chemicals and

associated toxicological endpoints. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 27, n. 10, p. 10185-10204, 2020.

GOTTULA, J.; FUCHS, M. Toward a quarter century of pathogen-derived resistance and practical approaches to plant virus disease control. **Advances in virus research**, v. 75, p. 161-183, 2009.

GREEN, Floyd J. **Sigma-Aldrich handbook of stains, dyes, and indicators**. Aldrich Chemical Co., 1990.

GRISOLIA, Cesar Koppe et al. Genotoxic evaluation of different delta-endotoxins from *Bacillus thuringiensis* on zebrafish adults and development in early life stages. **Mutation research**, 672(2), 119–123, 2009.

HAMILTON, Francis. **An account of the fishes found in the river Ganges and its branches**. Archibald Constable, 1822.

HARPER, Claudia; LAWRENCE, Christian. **The laboratory zebrafish**. Crc Press, 2016.

HAMM, Jon T. et al. Characterizing sources of variability in zebrafish embryo screening protocols. **ALTEX-Alternatives to animal experimentation**, v. 36, n. 1, p. 103-120, 2019.

HILL, A. J.; HOWARD, C. V.; COSSINS, A. R. Efficient embedding technique for preparing small specimens for stereological volume estimation: zebrafish larvae. **Journal of microscopy**, v. 206, n. 3, p. 179-181, 2002.

HILL, Adrian J. et al. Zebrafish as a model vertebrate for investigating chemical toxicity. **Toxicological sciences**, v. 86, n. 1, p. 6-19, 2005.

HISAOKA, K. Kenneth; FIRLIT, C. F. Ovarian cycle and egg production in the zebrafish, *Brachydanio rerio*. **Copeia**, p. 788-792, 1962.

HOWE, Kerstin et al. The zebrafish reference genome sequence and its relationship to the human genome. **Nature**, v. 496, n. 7446, p. 498-503, 2013.

IGHODARO, O. M.; AKINLOYE, O. A. First line defence antioxidants-superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) and glutathione peroxidase (GPX): Their fundamental role in the entire antioxidant defence grid. **Alexandria journal of medicine**, v. 54, n. 4, p. 287-293, 2018.

KANE, Sally M.; REILLY, John M.; TOBEY, James. A Sensitivity Analysis of the Implications of Climate Change for World Agriculture. In: **Economic Issues in Global Climate Change**. CRC Press, 2019. p. 117-131.

KARAMI-MOHAJERI, Somayyeh; ABDOLLAHI, Mohammad. Toxic influence of organophosphate, carbamate, and organochlorine pesticides on cellular metabolism of lipids, proteins, and carbohydrates: a systematic review. **Human & experimental toxicology**, v. 30, n. 9, p. 1119-1140, 2011.

KHALAFALLA, Mutasim M. et al. Active principle from *Moringa oleifera* Lam leaves effective against two leukemias

and a hepatocarcinoma. **African Journal of Biotechnology**, v. 9, n. 49, p. 8467-8471, 2010.

KUMAR, Krishan et al. Genetically modified crops: current status and future prospects. **Planta**, v. 251, n. 4, p. 1-27, 2020.

KWIATKOWSKA, Marta; HURAS, Bogumiła; BUKOWSKA, Bożena. The effect of metabolites and impurities of glyphosate on human erythrocytes (in vitro). **Pesticide biochemistry and physiology**, v. 109, p. 34-43, 2014.

LAALE, Hans W. The biology and use of zebrafish, *Brachydanio rerio* in fisheries research. A literature review. **Journal of Fish Biology**, v. 10, n. 2, p. 121-173, 1977.

LIN, Jiun-Nong et al. Increased risk of dementia in patients with acute organophosphate and carbamate poisoning: a nationwide population-based cohort study. **Medicine**, v. 94, n. 29, 2015.

LING, XuePing et al. Superoxide dismutase, catalase and acetylcholinesterase: biomarkers for the joint effects of cadmium, zinc and methyl parathion contamination in water. **Environmental technology**, v. 32, n. 13, p. 1463-1470, 2011.

MARCHI, F **AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE DA PROTEÍNA ANTIFÚNGICA MO-CBP<sub>3</sub> DE *Moringa oleifera* Lam. AOS ESTÁGIOS INICIAIS DO DESENVOLVIMENTO DO PEIXE-ZEBRA (*Danio rerio*)**, Trabalho de conclusão de curso (Graduação em Biotecnologia) - Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, p. 60. 2018.

MIYAWAKI, Izuru. Application of zebrafish to safety evaluation in drug discovery. **Journal of Toxicologic Pathology**, v. 33, n. 4, p. 197-210, 2020.

MNIF, Wissem et al. Effect of endocrine disruptor pesticides: a review. **International journal of environmental research and public health**, v. 8, n. 6, p. 2265-2303, 2011.

*Moringa oleifera* (horse radish tree). (n.d.). Retrieved May 3, 2020, from <https://www.cabi.org/isc/datasheet/34868#tosummaryOfInvasiveness>

MRÍZOVÁ, Katarína et al. Transgenic barley: A prospective tool for biotechnology and agriculture. **Biotechnology advances**, v. 32, n. 1, p. 137-157, 2014.

NICOLIA, Alessandro et al. An overview of the last 10 years of genetically engineered crop safety research. **Critical reviews in biotechnology**, v. 34, n. 1, p. 77-88, 2014.

NIIMI, A. J.; LAHAM, Q. N. Influence of breeding time interval on egg number, mortality, and hatching of the zebra fish *Brachydanio rerio*. **Canadian journal of zoology**, v. 52, n. 4, p. 515-517, 1974.

OERKE, E.-C. Crop losses to pests. **The Journal of Agricultural Science**, v. 144, n. 1, p. 31-43, 2006.

OERKE, E.-C. et al. **Crop production and crop protection: estimated losses in major food and cash crops**. Elsevier, 2012

PARRY, Martin L. **Climate change and world agriculture**. Routledge, 2019.

PARICHY, David M. The natural history of model organisms: Advancing biology through a deeper understanding of zebrafish ecology and evolution. **Elife**, v. 4, p. e05635, 2015.

PEREIRA, Francisco Sávio Gomes et al. Moringa oleifera: a promising agricultural crop and of social inclusion for Brazil and semi-arid regions for the production of energetic biomass (biodiesel and briquettes). **OCL**, v. 25, n. 1, p. D106, 2018.

PINTO, Clidia EM et al. Food safety assessment of an antifungal protein from Moringa oleifera seeds in an agricultural biotechnology perspective. **Food and Chemical Toxicology**, v. 83, p. 1-9, 2015.

ROY, William R. Pesticide Profiles: Toxicity, Environmental Impacts, and Fate. **Journal of Environmental Quality**, v. 27, n. 4, p. 984-984, 1998.

SACCARO JR, Nilo L. A regulamentação de acesso a recursos genéticos e repartição de benefícios: disputas dentro e fora do Brasil. **Ambiente & Sociedade**, v. 14, n. 1, p. 229-244, 2011.

SECRETÁRIO-GERAL DAS NAÇÕES UNIDAS, Protocolo de Cartagena sobre biossegurança, Convenção sobre diversidade biológica, 11 setembro de 2003

SENADO NOTÍCIAS. **Entenda o que é o protocolo de cartagena sobre biossegurança, Agência senado**. Disponível em <https://www12.senado.leg.br/noticias/materias/2006/03/13/entenda-o-que-e-o-protocolo-de-cartagena-sobre-biosseguranca>. Acesso em 11 jun. 2021

SEOK, Seung-Hyeok et al. In vivo alternative testing with zebrafish in ecotoxicology. **Journal of veterinary science**, v. 9, n. 4, p. 351, 2008.

SANT, Karilyn E.; TIMME-LARAGY, Alicia R. Zebrafish as a model for toxicological perturbation of yolk and nutrition in the early embryo. **Current environmental health reports**, v. 5, n. 1, p. 125-133, 2018.

SANTOS, Andréa FS et al. Lectins: Function, structure, biological properties and potential applications. 2014.

SHARMA, Hari C. et al. Prospects for using transgenic resistance to insects in crop improvement. **Electronic Journal of Biotechnology**, v. 3, n. 2, p. 21-22, 2000.

SHARMA, Anket et al. Worldwide pesticide usage and its impacts on ecosystem. **SN Applied Sciences**, v. 1, n. 11, p. 1-16, 2019.

SHIN, Jordan T.; FISHMAN, Mark C. From zebrafish to human: modular medical models. **Annual Review of Genomics and Human Genetics**, v. 3, n. 1, p. 311-340, 2002.

- SOPEZKI, Mauricio da Silva. Avaliação transcricional de Glutathionas-transferases em PEIXE-ZEBRA (*Danio rerio*) e alterações causadas pela exposição á Microcistina-LR. 2013. Dissertação de Mestrado.
- SOUZA, Murilo Mendonça Oliveira et al. Agrotóxicos e transgênicos: retrocessos socioambientais e avanços conservadores no Governo Bolsonaro. **Revista da ANPEGE**, v. 16, n. 29, p. 317-350, 2020.
- SPENCE, R. et al. Diet, growth and recruitment of wild zebrafish in Bangladesh. **Journal of Fish Biology**, v. 71, n. 1, p. 304-309, 2007.
- SPITSBERGEN, Jan M.; KENT, Michael L. The state of the art of the zebrafish model for toxicology and toxicologic pathology research—advantages and current limitations. **Toxicologic pathology**, v. 31, n. 1\_suppl, p. 62-87, 2003.
- STRAIN, Katherine E.; LYDY, Michael J. The fate and transport of the Cry1Ab protein in an agricultural field and laboratory aquatic microcosms. **Chemosphere**, v. 132, p. 94-100, 2015.
- Taming the savage cabbage* | *Kew*. (n.d.). Retrieved May 3, 2020, from <https://www.kew.org/read-and-watch/savage-cabbage>
- TAVARES, Bárbara; LOPES, Susana Santos. The importance of Zebrafish in biomedical research. **Acta medica portuguesa**, v. 26, n. 5, p. 583-592, 2013.
- TIEMANN, U. In vivo and in vitro effects of the organochlorine pesticides DDT, TCPM, methoxychlor, and lindane on the female reproductive tract of mammals: a review. **Reproductive Toxicology**, v. 25, n. 3, p. 316-326, 2008.
- TRIPP, Rob (Ed.). **Biotechnology and agricultural development: Transgenic cotton, rural institutions and resource-poor farmers**. Routledge, 2009.
- TSAKNIS, J. et al. Characterization of Moringa oleifera variety Mbololo seed oil of Kenya. **Journal of Agricultural and food chemistry**, v. 47, n. 11, p. 4495-4499, 1999.
- VIEIRA, Leonardo R. et al. Proteomics analysis of zebrafish larvae exposed to 3, 4-dichloroaniline using the fish embryo acute toxicity test. **Environmental toxicology**, v. 35, n. 8, p. 849-860, 2020.
- VIEIRA, L. R. et al. Acute effects of Benzo [a] pyrene, anthracene and a fuel oil on biomarkers of the common goby *Pomatoschistus microps* (Teleostei, Gobiidae). **Science of the total environment**, v. 395, n. 2-3, p. 87-100, 2008.
- WANI, Shabir Hussain et al. Engineering salinity tolerance in plants: progress and prospects. **Planta**, v. 251, n. 4, p. 1-29, 2020.
- WESSELING, Catharina et al. Long-term neurobehavioral effects of mild poisonings with organophosphate and n-methyl carbamate pesticides among banana workers. **International Journal of Occupational and Environmental Health**, v. 8, n. 1, p. 27-34, 2002.

*World Hunger Statistics*. (n.d.). Retrieved May 2, 2020, from  
<https://www.foodaidfoundation.org/world-hunger-statistics.html>

YU, Hui-Lin; LI, Yun-He; WU, Kong-Ming. Risk Assessment and Ecological Effects of Transgenic *Bacillus thuringiensis* Crops on Non-Target Organisms F. **Journal of Integrative Plant Biology**, v. 53, n. 7, p. 520-538, 2011.

Zadoks, J. C. (1996). Crop production and crop protection: Estimated losses in major food and cash crops. *Agricultural Systems*. [https://doi.org/10.1016/0308-521x\(96\)81487-9](https://doi.org/10.1016/0308-521x(96)81487-9)