



Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular
Centro de Ciências Exatas e da Natureza | Universidade Federal da Paraíba
Cidade Universitária - João Pessoa - PB - Brasil - CEP 58059-900 Telefone: (83)
3216 7407 - Fax: (83) 3216 7787 - e-mail: pgbcm@dbm.ufpb.br



RAFAEL XAVIER MARTINS

**HERBICIDA ÁCIDO 2,4-DICLOROFENOXIACÉTICO (2,4-D):
INVESTIGAÇÃO DOS EFEITOS SOBRE O DESENVOLVIMENTO,
ESTRESSE OXIDATIVO E PARÂMETROS HEPÁTICOS EM EMBRIÕES E
LARVAS DE ZEBRAFISH (*Danio rerio*)**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS
E DA NATUREZA DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA MOLECULAR PÓS-
GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR**

JOÃO PESSOA – PB

2021



Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular
Centro de Ciências Exatas e da Natureza | Universidade Federal da Paraíba
Cidade Universitária - João Pessoa - PB - Brasil - CEP 58059-900 Telefone: (83) 3216
7407 - Fax: (83) 3216 7787 - e-mail: pgbcm@dbm.ufpb.br



RAFAEL XAVIER MARTINS

**HERBICIDA ÁCIDO 2,4-DICLOROFENOXIACÉTICO (2,4-D):
INVESTIGAÇÃO DOS EFEITOS SOBRE O DESENVOLVIMENTO,
ESTRESSE OXIDATIVO E PARÂMETROS HEPÁTICOS EM EMBRIÕES E
LARVAS DE ZEBRAFISH (*Danio rerio*)**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biologia Celular e Molecular, do Centro de Ciências Exatas e da Natureza da Universidade Federal da Paraíba, em cumprimento aos requisitos para obtenção do título de **MESTRE EM BIOLOGIA**

CELULAR E MOLECULAR.

Orientador: Prof. Dr. Davi Felipe Farias

**João Pessoa – PB
2021**

Catálogo na publicação
Seção de Catalogação e Classificação

M386h Martins, Rafael Xavier.

Herbicida ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) :
investigação dos efeitos sobre o desenvolvimento,
estresse oxidativo e parâmetros hepáticos em embriões e
larvas de zebrafish (Danio rerio) / Rafael Xavier
Martins. - João Pessoa, 2021.
62 f. : il.

Orientação: Davi Felipe Farias.
Dissertação (Mestrado) - UFPB/CCEN.

1. Agrotóxico. 2. Embriotoxicidade. 3. Biomarcadores.
4. Hepatotoxicidade. 5. Peixes. I. Farias, Davi Felipe.
II. Título.

UFPB/BC

CDU 661.163(043)

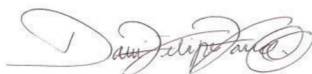
UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E DA NATUREZA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR

Ata da Sessão Pública para avaliar o Trabalho de Dissertação de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular do Mestrando **Rafael Xavier Martins**, submetido para obtenção do grau de Mestre em Biologia Molecular – Área de Concentração em Biologia Celular e Molecular.

Aos vinte e seis dias do mês fevereiro do ano de dois mil e vinte e um, às nove horas, em ambiente virtual, reuniram-se em cerimônia pública, os membros da banca examinadora, composta pelos Professores Doutores: **Davi Felipe Farias – UFPB (Orientador/Presidente)**, **Glaucia Veríssimo Faheina Martins – UFCG (Examinador interno)** e **Luis Fernando Marques dos Santos - UFPB (Examinador Externo)** a fim de examinarem o candidato **Rafael Xavier Martins** ao grau de Mestre em Biologia Celular e Molecular, área de concentração em Biologia Celular e Molecular. Iniciando, a Secretária Regina Emy Sales de Miranda do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular fez a abertura da sessão. Em seguida passou a palavra ao Professor Dr. Davi Felipe Farias, Presidente da banca, o qual comunicou aos presentes qual o fim da reunião e os procedimentos de encaminhamentos da mesma. A seguir, concedeu à palavra ao candidato para que o mesmo fizesse, oralmente, a exposição do trabalho intitulado: “**HERBICIDA ÁCIDO 2,4-DICLOROFENOXIACETICO (2,4-D): INVESTIGAÇÃO DOS EFEITOS SOBRE O DESENVOLVIMENTO, ESTRESSE OXIDATIVO E PARÂMETROS HEPÁTICOS EM EMBRIÕES E LARVAS DE ZEBRAFISH (Danio rerio)**”. Concluída a exposição, o Senhor Presidente solicitou que fosse feita a arguição por cada um dos examinadores. Após o candidato ser arguido por cada membro examinador, lhe foi concedido a palavra para que respondesse e esclarecesse as questões levantadas. Terminadas as arguições, a Banca Examinadora passou a proceder a avaliação e julgamento do mestrando. Em seguida, o Senhor Presidente declarou que a Banca Examinadora considerou, segundo o artigo 65 do Regulamento Geral dos Programas de Pós-Graduação Stricto Sensu da Universidade Federal da Paraíba, **APROVADA** a dissertação apresentada e defendida pelo mestrando **Rafael Xavier Martins** concedendo-lhe, assim, o grau de Mestre em Biologia Celular e Molecular, área de concentração em Biologia Celular Molecular. Logo após a avaliação da comissão julgadora, o orientador preencherá um formulário, juntamente com o relatório final de dissertação de mestrado, a fim de que o mesmo seja homologado pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular. E, para constar, eu, Regina Emy Sales de Miranda, secretária da reunião, lavrei a presente ata, que assino junto com os membros da banca examinadora. João Pessoa, 26 de fevereiro de 2021.

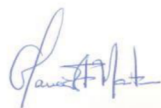
Regina Emy Sales de Miranda

Secretária



Prof. Dr. Davi Felipe Farias

Orientador/Presidente

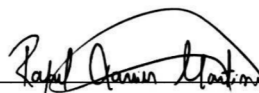


Profa. Dra. Glaucia Veríssimo Faheina Martins
Examinador interno



Prof. Dr. Luis Fernando Marques dos Santos
Examinador Externo

Assinatura do(a) Mestrando(a):



AGRADECIMENTOS

A Universidade Federal da Paraíba (UFPB), por possibilitar a minha formação acadêmica e profissional.

Ao Programa de Pós-graduação em Biologia Celular e Molecular (PGBCM). Ao seu corpo docente e técnico por toda partilha de conhecimento e suporte e também pela disponibilização da estrutura física para a realização dos experimentos realizados neste trabalho.

A Coordenação de Aperfeiçoamento Pessoal de Nível Superior (CAPES) por contribuir com este trabalho através da concessão da bolsa de mestrado.

Ao Prof. Dr. Davi Farias, por contribuir inestimavelmente com a minha formação profissional e pessoal. Tenho muita sorte de ter um orientador que se preocupa que a experiência acadêmica dos seus alunos seja saudável. Grato por tudo!

À Dra. Terezinha Souza, por várias vezes ter opinado e contribuído para o desenrolar desse projeto de mestrado.

À Marta Muniz, Juliana Souza, Leonardo Vieira, Iris Gonçalves, Igor Cauê, Eduarda Maia, Eduardo Afonso e aos demais estudantes do LabRisco, por todo o companheirismo, conhecimento compartilhado e prestatividade durante esses anos de laboratório.

Aos meus pais, Antônia Maria Xavier Martins e Joseildo dos Santos Martins, por todo o incentivo, sacrifício, dedicação, amor, carinho, compreensão e cuidado. Tenho muita sorte por ter vocês na minha vida. Sempre serei grato!

À Maria Luiza Queiroz de Brito, por todo companheirismo, apoio, amizade, risadas e amor. Você é uma parte especial da minha vida e dessa caminhada. A minha prima Maria Eduarda Maia, por todo o apoio não só no âmbito pessoal, mas também no profissional.

Aos meus amigos que fiz na graduação, Gilanna Falcão, Michelle Alencar, Luíse Simões, Luanna Pinheiro, Olívia Costa e todos os outros não citados. Apesar da distância e da saudade, o carinho não muda e sempre me apoiaram quando eu precisei. Gratidão! À Pâmela Gabriella, Anderson Santos, Micaela Eulálio, Marta Muniz, Kharla Almeida, Pierri Emanuel e aos demais estudantes da turma de 2018 do PGBCM, pela companhia, cervejinhas e cafés.

Muito grato!

LISTA DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1 – Exemplos de substâncias pertencentes a diferentes classes químicas de agrotóxicos.....	12
Figura 2 – Fórmula estrutural do 2,4-D.....	14
Figura 3 - Dimorfismo sexual do zebrafish (<i>D. rerio</i>) em sua fase adulta.....	19
Figura 4 – Ciclo de desenvolvimento do zebrafish (<i>D. rerio</i>).....	20
Figura 5 – Aspectos morfológicos de uma larva de zebrafish (<i>D. rerio</i>) com 96 hpf.....	21

LISTA DE ABREVIÇÕES

DDT – Dicloro-difenil-tricloroetano

OMS – Organização Mundial da Saúde

IBAMA – Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais

PARA – Programa de Análise de Resíduos de Agrotóxicos em Alimentos

ANVISA- Agência Nacional de Vigilância Sanitária

2,4-D – Ácido 2,4-diclorofenoxiacético

LARP – Laboratório de Análises de Resíduos de Parasitas

IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística

APIMEC- Associação dos Analistas e Profissionais de Investimento do Mercado de Capitais

CREA-PB- Conselho Regional de Engenharia e Agronomia das Paraíba

US EPA- *United States Environmental Protection Agency*, Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos

IARC – *International Agency for Research on Cancer*, Agência Internacional de Pesquisa Sobre o Câncer

Hpf – Horas pós-fertilização

LDH – Lactato desidrogenase

CAT – Catalase

GST – Glutathione-s-transferase

GPx – Glutathione Peroxidase

AST – Aspartato aminotransferase

ALT – Alanina aminotransferase

ALP – Fosfatase Alcalina

NADH – Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo

UE – União Européia

ROS- Espécies Reativas de Oxigênio

SUMÁRIO

	Pág.
1. INTRODUÇÃO.....	12
1.1. Agrotóxicos.....	12
1.2. Ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D).....	16
1.3. A problemática do uso ilegal do 2,4-D na abacaxicultura paraibana.....	18
1.4. Efeitos tóxicos do 2,4-D com ênfase em hepatotoxicidade.....	19
1.5. Zebrafish como modelo para ecotoxicologia de vertebrados aquáticos e avaliação de efeitos hepatotóxicos de substâncias.....	20
1.6. Biomarcadores de estresse oxidativo e metabólico.....	24
1.7. Biomarcadores de dano hepático.....	25
2. OBJETIVOS.....	25
2.1. Objetivo geral.....	26
2.2. Objetivos específicos.....	26
3. RESULTADOS.....	27
3.1. Artigo.....	27
4. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	53
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	54
Anexo I - Documentos de autorização do Comitê de Ética	62

RESUMO

O ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) foi um dos primeiros herbicidas sintéticos a ser introduzido no mercado e atualmente é ingrediente principal de mais de 1.500 produtos comercialmente disponíveis. Embora o 2,4-D seja intensivamente utilizado em nível mundial, diversos estudos relatam que a exposição a este químico é capaz de induzir efeitos tóxicos em diferentes organismos não alvo. Por desempenhar uma gama de funções vitais e participar diretamente no metabolismo de xenobióticos, o fígado é apontado como um dos alvos de diversos toxicantes. Portanto, o presente trabalho visou compreender o potencial hepatotóxico do 2,4-D em larvas de zebrafish (*Danio rerio*), numa perspectiva de contribuir para o conhecimento acerca dos mecanismos de toxicidade desse químico em um sistema modelo de vertebrados. Para isto, foram analisados a toxicidade aguda de acordo com o *FET test: Fish Embryo Acute Toxicity test*) do protocolo nº 236 da OECD (2013) e os efeitos de concentrações subletais (< CL₅₀) sobre a atividade das enzimas relacionadas à estresse oxidativo e metabólico (LDH, GST, CAT e GPx) e dano hepático (AST, ALT e ALP) após 48 h de exposição. Também foram realizadas análises morfológicas do fígado das larvas tratadas. Como resultado, o 2,4-D reduziu a taxa de sobrevivência das larvas (CL₅₀ 15,010 mg/L em 96 h de exposição), induziu a aparição de malformações, alterou a atividade de LDH, GST e CAT e aumentou expressivamente a atividade de biomarcadores de dano hepático (AST, ALT e ALP). Apesar de nenhuma alteração fenotípica (cor e tamanho relativo) no fígado das larvas ter sido observada após 48 h de exposição, a análise histopatológica revelou que o tratamento com 2,4-D provoca alterações graves no tecido hepático, tais como vacuolização do citosol, núcleo celular excêntrico, perda da arquitetura tecidual e das delimitações celulares. Dessa forma, nossos resultados mostram que o 2,4-D altera o perfil enzimático de resposta a estresse oxidativo e apresenta efeito hepatotóxico em larvas de zebrafish.

Palavras-chave: Agrotóxico; embriotoxicidade; biomarcadores; hepatotoxicidade; peixes

ABSTRACT

The 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) was one of the first synthetic herbicides to be introduced on the market and is currently the main ingredient of over 1500 commercially available products. Although 2,4-D is extensively used worldwide, several studies report that exposure to this chemical can induce toxic effects in non-target organisms. The liver is considered one of the targets of several toxicants because it performs a range of vital functions and directly participates in the metabolism of xenobiotics. Therefore, the present work aimed to understand the hepatotoxic potential of 2,4-D in zebrafish larvae (*Danio rerio*), as a contribution to the knowledge about the toxicity mechanisms of this chemical in a vertebrate model system. For this purpose, its acute toxicity to zebrafish embryos was assessed according to the OECD protocol No. 236 (2013), as well as its sub-lethal effects ($<LC_{50}$) on the activity of enzymes related to oxidative and metabolic stress (LDH, GST, CAT and GPx) and hepatic damage (AST, ALT and ALP) after 48 h of exposure. Morphological analysis of the liver of treated larvae were also performed. We found that 2,4-D reduced larvae survival (LC_{50} 15.010 mg/L in 96h of exposure), induced malformations, altered the activity of LDH, GST and CAT and significantly increased the activity of biomarkers for liver damage (AST, ALT and ALP). Although no morphological changes (relative color and size) in the larval liver were observed after 48 h of exposure, histopathological analysis revealed that treatment with 2,4-D causes severe changes in liver tissue, such as vacuolization of the cytosol, eccentric cell nucleus, as well as loss of tissue architecture and cell boundaries. Thus, our results show that 2,4-D alters the enzymatic profile for oxidative stress and shows hepatotoxic effects in zebrafish larvae.

Keywords: pesticide, embryotoxicity, biomarkers, hepatotoxicity, fish

1. INTRODUÇÃO

1.1 Agrotóxicos

O progresso científico e tecnológico atrelado ao advento da globalização possui papel fundamental sobre o desenvolvimento de diversos setores da economia mundial, dentre eles, o agronegócio. Consequentemente, as indústrias do ramo químico também foram beneficiadas, uma vez que a demanda por insumos agropecuários (agrotóxicos e fertilizantes) aumentou significativamente (CONCEIÇÃO, 2015).

Segundo a lei federal brasileira nº 7.802, de 11 de julho de 1989, regulamentada pelo Decreto nº 4.074, de 2002 (Artigo 2º, Inciso I), os agrotóxicos, também conhecidos como pesticidas, são definidos como:

“Produtos e agentes de processos físicos, químicos ou biológicos destinados ao uso nos setores de produção, armazenamento e beneficiamento de produtos agrícolas, nas pastagens, na proteção de florestas nativas ou implantadas e de outros ecossistemas e também em ambientes urbanos, hídricos e industriais, cuja finalidade seja alterar a composição da flora e da fauna, a fim de preservá-la da ação danosa de seres vivos considerados nocivos, bem como, substâncias e produtos empregados como desfolhantes, dessecantes, estimuladores e inibidores do crescimento.”

Os primeiros relatos do uso de agrotóxicos são por parte de civilizações antigas, que já possuíam conhecimento sobre o potencial pesticida de alguns produtos. Sumérios e chineses utilizavam o pó de enxofre para matar insetos e ervas daninhas à cerca de 2.500 a.C. (BRAIBANTE e ZAPPE, 2012). Posteriormente, compostos sulfurados e derivados de arsênio começaram a ser utilizados com a mesma finalidade antes do século XVII (GONÇALVES et al., 2020).

O primeiro pesticida sintético, o dicloro-difenil-tricloroetano (DDT), foi sintetizado pela primeira vez em 1874. Entretanto, a sua propriedade inseticida só foi descoberta no ano 1939 pelo químico suíço Paul Hermann Müller, que usou o DDT no combate à mosquitos vetores de doenças como dengue e malária (GONÇALVES et al., 2020).

O aumento significativo da utilização de agrotóxicos iniciou na década de 1950, com o surgimento de um movimento iniciado nos Estados Unidos, denominado “Revolução Verde”, que defendia a implementação de um novo modelo tecnológico de produção agrícola e levou à criação de novas atividades de produção de insumos (químicos, mecânicos e biológicos) ligados à agricultura (LOPES et al., 2018).

A principal característica do novo modelo adotado foi o uso de quantidades massivas de pesticidas nas lavouras para controlar doenças e pragas causadas por fungos,

insetos e ervas daninhas que pudessem prejudicar as safras de maneira quantitativa e qualitativa e, dessa forma, conseguirem atender à crescente demanda de alimentos decorrente do aumento da população mundial (BRAIBANTE e ZAPPE, 2012).

De acordo com a Organização Mundial da Saúde (2009) e o Manual de Vigilância da Saúde de Populações Expostas a Agrotóxicos (OPAS/OMS, 1996), os agrotóxicos podem ser classificados quanto à quatro critérios: origem química, classe química, finalidade e nível de toxicidade.

Quanto a origem química, os agrotóxicos podem ser classificados como inorgânicos ou orgânicos (sintéticos ou de origem vegetal). Após os efeitos tóxicos em humanos e em outros mamíferos dos sais inorgânicos utilizados antigamente terem sido elucidados, aos poucos, compostos orgânicos de origem vegetal à base de nicotina, piretrina, sabadina e rotenona foram cada vez mais introduzidos na composição dos pesticidas (VILARINHO, 2011). Atualmente, os compostos orgânicos sintéticos à base de carbamatos, clorados, fosforados, e clorofosforados são os mais utilizados e exercem maior efeito fisiológico (PAVANI, 2016).

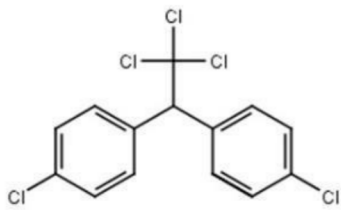
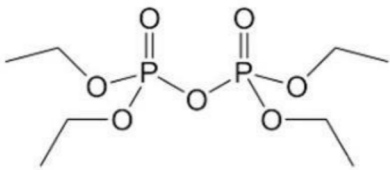
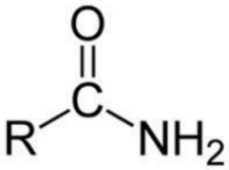
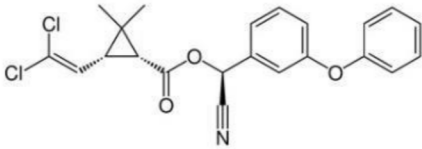
Em relação à classe química dos seus princípios ativos, os agrotóxicos podem ser classificados em quatro classes principais: carbamatos, organofosforados, organoclorados e piretróides (Figura 1). Os carbamatos e organofosforados são compostos derivados do ácido carbâmico e ácido fosfórico, respectivamente, e exercem a sua ação através da inibição da enzima colinesterase (PAVANI, 2016). Os compostos organoclorados são caracterizados por possuírem cinco ou mais átomos de cloro em sua estrutura, e agem no sistema nervoso central dos insetos, interferindo na transmissão de impulsos nervosos. A classe dos piretróides, análogos sintéticos das piretrinas, é uma das mais utilizadas atualmente na agricultura, possuem um amplo aspecto de ação entre os insetos e exercem seu efeito através da modulação de canais sódio (COSTA, 2015; PAVANI, 2016).

Existem mais de dez classificações para agrotóxicos baseados nas suas finalidades, entretanto, três dessas se destacam por serem as mais utilizadas: herbicidas, inseticidas e fungicidas (YADAV e DEVI, 2017). Os herbicidas são produtos destinados ao controle de ervas daninhas que se instalam nas plantações. Além de competirem por água, luz e nutrientes com a plantação que está sendo cultivada, ervas daninhas também servem como habitat para outros tipos de pragas, o que compromete a qualidade da safra. Os inseticidas são utilizados para o combate de insetos. Geralmente eles possuem um amplo espectro de ação, podendo ser estendido para larvas e ovos. Já os fungicidas são usados para eliminar ou controlar o crescimento de fungos que parasitam as plantas (YADAV e DEVI, 2017).

Em relação ao nível de toxicidade dos agrotóxicos para humanos, a Organização Mundial da Saúde (OMS) (2009) classifica os pesticidas em cinco níveis diferentes. Esses níveis variam entre a classe I (extremamente tóxico) até a classe IV (pouco tóxico), e são determinados com base na DL₅₀ (dose letal para 50% da população) dos compostos avaliados em animais modelo roedores, pelas vias de administração oral e dérmica.

Existe também uma portaria normativa do IBAMA (Nº84, de 15 de outubro de 1996) que classifica os agrotóxicos quanto ao seu potencial de periculosidade ambiental. Esta classificação varia de I – altamente perigoso até IV – pouco perigoso ao meio ambiente. Para a construção desse perfil de risco ambiental dos químicos, são considerados parâmetros como bioacumulação, transporte, persistência, toxicidade à diversos organismos, potencial mutagênico, teratogênico e carcinogênico.

Figura 1 – Exemplos de substâncias pertencentes a diferentes classes químicas de agrotóxicos.

Organoclorado	Organofosforado
 Dicloro-difenil-tricloroetano (DDT)	 Tetraetilpirofosfato (TEEP)
Carbamato	Piretróide
 Ácido Carbâmico	 Cipermetrina

Fonte: adaptado de Derksen (2007) e Cabral (2019)

O controle de doenças e pragas que afetam as plantações é fundamental para garantir o fornecimento de alimento para a população no modelo agrícola contemporâneo. Contudo, o uso de quantidades massivas de agrotóxicos nas lavouras tem ocasionado uma série de consequências ao ambiente e organismos não-alvo (GONÇALVES et al., 2020). Diversos estudos demonstram que os produtos pesticidas não atingem apenas as culturas

em que são aplicados. Presume-se que apenas 0,1% dos agrotóxicos aplicados nas lavouras ao redor do mundo exerçam efeito no alvo desejado, acarretando em um grande acúmulo de resíduos de agrotóxicos e seus metabólitos no ambiente (ISLAM et al., 2017).

No ambiente, esses compostos percorrem vias complexas antes de serem degradados ou desativados. Essas vias envolvem processos de retenção (sorção e absorção), transformação (degradação química e biológica) e transporte (deriva, volatilização, lixiviação e carreamento superficial) (SOUZA, 2006). Entretanto, os resíduos derivados desses compostos e pesticidas não degradados podem permanecer como contaminantes no ambiente por tempo suficiente para que possa exercer efeitos deletérios sobre o ecossistema (ISLAM et al., 2017). Fatores como propriedade físicoquímica, método de aplicação, histórico de contaminação, intensidade do uso e particularidades do ambiente influenciam o modo como o pesticida se comporta na natureza (VINHA et al., 2013).

Outro fator preocupante é a presença de resíduos de agrotóxicos nos alimentos. O programa de Análise de Resíduos de Agrotóxicos em Alimentos (PARA), criado pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), já detectou em amostras de alimentos a presença de agrotóxicos acima dos níveis permitidos, bem como a de químicos de uso não autorizado pela legislação brasileira (CARNEIRO et al., 2012). Além disso, a deficiência na fiscalização da venda, utilização e monitoramento ambiental de agrotóxicos por parte dos órgãos públicos dificulta a elaboração de estimativas mais precisas do consumo de agrotóxicos no país, levando a crer que os valores reais de utilização em território brasileiro são muito superiores aos relatados em dados oficiais (RIGOTTO et al., 2014).

A exposição, direta ou indireta, de humanos a essas substâncias está associada à incidência de doenças e anormalidades, como por exemplo: desenvolvimento de diferentes tipos de câncer, distúrbios endócrinos, problemas respiratórios, dermatites, distúrbios neurocomportamentais e alterações no sistema imunológico (KIM, et al., 2016). Dados disponibilizados pela OMS demonstram que cerca de 3.000.000 de casos de intoxicação por pesticidas e 220.000 mortes são relatadas nos países em desenvolvimento anualmente (MAHMOOD et al., 2017). Cerca de 2,2 milhões de pessoas, principalmente pertencentes a países em desenvolvimento, correm maior risco de exposição a pesticidas. Além disso, algumas pessoas são mais suscetíveis aos efeitos tóxicos de pesticidas, como por exemplo: bebês, crianças pequenas, trabalhadores agrícolas e aplicadores de agrotóxicos (MAHMOOD et al., 2017). Os dez países que mais fazem uso de pesticidas são os EUA, Argentina, Tailândia, Brasil, Itália, França, Canadá, Japão e Índia. Além

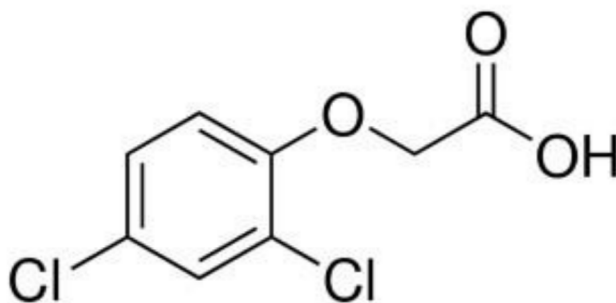
disso, estima-se que até o final de 2020 o uso mundial de agrotóxicos já tenha aumentado em até 3,5 milhões de toneladas (SHARMA et al., 2019).

Dentre as diferentes classes de pesticidas, os produtos com finalidade herbicida são os mais utilizados, representando cerca de 47,5% dos agrotóxicos aplicados nas lavouras em todo o mundo (SHARMA et al., 2019). No Brasil, segundo o IBAMA (2017), a classe de agrotóxicos que ocuparam as primeiras posições no ranking de vendas em 2017 também foram os herbicidas.

1.2 Ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D)

O ácido 2,4 diclorofenoxiacético (2,4-D) (Figura 2) é um herbicida da classe de compostos derivados do ácido fenoxiacético, que vem sendo utilizado mundialmente na agricultura desde 1946 (LI et al., 2017). Esse hidrocarboneto aromático clorado foi um dos primeiros herbicidas sintéticos a serem disponibilizados comercialmente e, atualmente, é ingrediente principal da formulação de mais de 1.500 produtos presentes no mercado (TIWARI et al., 2019; ISLAM et al., 2017).

Figura 2 - Fórmula estrutural do 2,4-D.



Fonte: Sigma aldrich, S/D.

Esse composto foi arquitetado para mimetizar o mecanismo de ação das auxinas, hormônios responsáveis pelo crescimento das plantas. Usado em baixas concentrações (20-50 mg/L) é capaz de induzir a divisão celular, acelerando o desenvolvimento das plantas e melhorando o aspecto visual e durabilidade de frutos. Contudo, quando usado em altas concentrações (maiores que 500 mg/L) exerce um efeito herbicida, matando seletivamente plantas dicotiledôneas através da indução de crescimento anormal de tecidos, obstrução do floema, morte do sistema radicular, epinastia das folhas, entre outros efeitos deletérios que levam organismos mais sensíveis à morte (RODRIGUES e ANDRIETTA, 2010; LI et al., 2017; TIWARI et al., 2019). Devido ao caráter seletivo,

esse composto é utilizado majoritariamente no combate de ervas daninhas em culturas monocotiledóneas, tais como trigo, aveia, cana-de-açúcar, milho e arroz. Também é usado para matar ervas daninhas na fase de pré-plantil de algumas culturas dicotiledóneas, como por exemplo a soja (GAAIED et al., 2019). Além do baixo custo, o 2,4-D possui uma fácil solubilização em água e outros tipos de solventes, facilitando a sua penetração nas estruturas das plantas, o que o torna um herbicida altamente eficaz e explica a sua utilização massiva em diversos tipos de lavouras em nível mundial (ISLAM et al., 2017). Os principais focos mercadológicos do 2,4-D são os Estados Unidos, América do Sul, Europa e Rússia, onde o consumo aumentou cerca de 40% entre 2002 e 2011 (ISLAM et al., 2017). Nos Estados Unidos, de acordo com dados referentes aos anos 1992 a 2000, foram usados mais de 20.000,000 ton. desse composto nas lavouras do país a cada ano, fato que lhe conferiu o posto de terceiro agrotóxico mais utilizado pelo país durante este tempo (LI et al., 2017). Já no Brasil, dados oficiais disponibilizados pelo IBAMA mostram que o 2,4-D foi o segundo herbicida mais comercializado desde 2013 (ficando atrás apenas do glifosato) e, em 2017, foram vendidas cerca de 57.389,35 ton. desse ativo no país. Num contexto local, esse cenário se inverte e o 2,4-D (202,65 ton.) foi em 2017 o agrotóxico mais utilizado no estado da Paraíba, aparecendo depois o glifosato (132,65 ton.) que é bastante utilizado nas lavouras de cana-de-açúcar do estado (IBAMA, 2017). Entretanto, assim como outros produtos pesticidas, o 2,4-D não atua apenas no alvo desejado, uma vez que ele pode ser lixiviado através do solo, ter acesso a corpos aquáticos e causar efeitos deletérios em organismos não alvo (LI et al., 2017; GONÇALVES et al., 2020). Dados atuais mostram que em ambientes de água doce a concentração estimada de 2,4-D pode variar entre 4 a 24 $\mu\text{g/L}$, chegando até 4.000 $\mu\text{g/L}$ em áreas próximas à culturas onde o herbicida é aplicado. Além disso, ele possui uma meia vida de aproximadamente 15 dias, podendo variar até 300 dias devido à parâmetros de qualidade da água e outras condições ambientais (DEHNERT et al., 2019; GAAIED et al., 2019). Além disso, o 2,4-D apresenta uma grande capacidade de deriva através do ar, o que reforça a possibilidade de ação em organismos não-alvo. No Rio Grande do Sul, onde esse herbicida é utilizado em plantações de soja, o uso do químico foi proibido por um período de aproximadamente um mês, em 2019, por causar prejuízos significativos em culturas sensíveis, como maçã, uva e oliveiras. Um estudo realizado pelo Laboratório de Análises de Resíduos de Pesticidas (LARP) (Santa Maria, Rio Grande do Sul) demonstrou que de 146 amostras coletadas de plantações de 24 municípios diferentes, cerca de 92% estava contaminada com o 2,4-D, o que demonstra a sua alta capacidade de dissipação (G1 RIO GRANDE DO SUL, 2019; UFSM, 2019).

1.3 Abacaxicultura no Estado da Paraíba e o uso ilegal do 2,4-D

Nas últimas décadas, a Paraíba vem ocupando uma posição de destaque no cenário nacional de produção de abacaxi e, em 2019, o estado foi o segundo maior produtor do fruto, sendo responsável por 19% da produção total do país (IBGE, 2019). Esse alto potencial de produção se dá pelas características climáticas e geográficas ideais da região para esse tipo de cultura, principalmente em algumas cidades do interior do estado. A variedade do produto cultivada em cerca de 90% das lavouras é o abacaxi pérola, caracterizado por seu formato de cone e sabor doce, que o faz ser apreciado e exportado para outros estados do Brasil, como: Rio de Janeiro, São Paulo, Minas Gerais, Rio Grande do Sul e Bahia (G1 PARAÍBA, 2014).

Por ser altamente produtivo, o plantil do abacaxi é uma das principais atividades econômicas do estado da Paraíba. De acordo com dados disponibilizados pela Associação dos Analistas e Profissionais de Investimento do Mercado de Capitais (APIMEC, 2015), no ano de 2010, a abacaxicultura injetou cerca de R\$ 229 milhões na economia do estado e gerou mais de 18 mil empregos diretos.

Assim como em vários outros tipos de cultura, é comum durante o cultivo do abacaxi a ocorrência de ervas daninhas que competem por água e nutrientes e prejudicam a produtividade da plantação. A principal estratégia empregada para controlar esse problema é a aplicação de herbicidas pré e pós-emergência na plantação (MODEL et al., 2010). Um dos herbicidas mais utilizados para solucionar esse tipo de problema nas lavouras nacionais é o 2,4-D. Esse agrotóxico é um químico de uso controlado e só pode ser utilizado em culturas para qual foi autorizado (soja, milho, cana-de-açúcar, trigo, arroz e pastagens formadas) em faixas de concentração pré-estabelecidas pela legislação brasileira (OLIVEIRA et al., 2002).

Entretanto, existem ocorrências do uso ilegal e armazenamento incorreto de embalagens desse herbicida por parte dos agricultores que cultivam abacaxi na Paraíba (CREA-PB, 2016), evidenciando a precariedade das estratégias de fiscalização de venda e monitoramento do uso correto desse químico pelos órgãos governamentais responsáveis. Além do uso do 2,4-D como herbicida, ele também é empregado de forma ilegal para acelerar o amadurecimento do abacaxi, bem como proporcionar um aumento de tamanho do fruto que para fins comerciais é uma característica bastante desejada.

1.4 Efeitos tóxicos do 2,4-D com ênfase em hepatotoxicidade

Diversas organizações enquadram o 2,4-D em seus sistemas de classificação de toxicidade de químicos. A Organização Mundial da Saúde (OMS) classifica o 2,4-D

quanto a sua toxicidade aguda como membro da classe II (moderadamente perigoso) e a Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos (US EPA) como ligeiramente à moderadamente tóxico (RUIZ DE ARCAUTE et al., 2016). Além disso, a Agência Internacional de Pesquisa Sobre o Câncer (IARC, 2015) classifica o 2,4-D quanto ao seu potencial carcinogênico para humanos, alocando o químico na classe IIB (possivelmente carcinogênico) em uma tabela que varia entre os níveis I (carcinogênico) à III (não carcinogênico).

Já o IBAMA, aloca o 2,4-D como químico de Classe III em sua Classificação do Potencial de Periculosidade Ambiental, que varia de I – altamente perigoso até IV – pouco perigoso ao meio ambiente (BESTER et al., 2020). Entretanto, estudos que relatam os efeitos tóxicos agudos e crônicos ocasionados pela exposição a esse herbicida têm-se tornado mais frequentes na literatura (ZHANG et al., 2017; DEHNERT et al., 2019; GONÇALVES et al., 2020), o que sugere que seja feita uma reavaliação de risco ambiental, o que, provavelmente, realocaria o 2,4-D em outras classes nesse sistema de classificação.

Exemplos de efeitos e *endpoints* (sinais de letalidade) associados à exposição crônica ou aguda ao 2,4-D são: alteração na taxa de batimentos cardíacos e na expressão de genes que modulam o desenvolvimento do coração (cardiotoxicidade) (LI et al., 2017); aumento da ocorrência de anormalidades nucleares e quebras primárias na sequência do DNA (genotoxicidade) (RUIZ DE ARCAUTE et al., 2016); diminuição da atividade de enzimas antioxidantes e alterações histológicas renais (nefrotoxicidade) (TROUDI et al., 2011); aumento da geração de radicais livres no cérebro (neurotoxicidade) (MATVIISHYN et al., 2014); comprometimento da qualidade de gametas e alteração no nível de enzimas e expressão de genes envolvidos no processo de gametogênese (toxicidade reprodutiva) (TAN et al., 2016; ZHANG et al., 2016).

Como relatado, a exposição ao 2,4-D provoca um impacto danoso através da alteração estrutural e metabólica de vários sistemas e órgãos de diferentes tipos de organismos. Entretanto, é importante destacar a quantidade significativa de estudos que relatam o potencial hepatotóxico desse herbicida. Esses trabalhos utilizam principalmente roedores como modelo e apontam diferentes efeitos tóxicos associados ao mal funcionamento do fígado, como por exemplo: redução significativa da atividade de enzimas antioxidantes hepáticas, diminuição drástica dos níveis de glicogênio, aumento dos níveis de peroxidação lipídica, perda da integridade da membrana plasmática, ruptura da medula hepática, necrose focal, dilatação de vasos e formação de núcleos picnóticos

no tecido hepático (TAYEB et al., 2010; MATVIISHYN et al., 2014; DAKHAKHNI et al., 2016).

Tendo em vista que o fígado desempenha um papel crucial em diversos processos biológicos de diferentes organismos (metabolismo de glicose, lipídios, proteínas, processamento de xenobióticos e hormônios, produção de vitelogenina) (KIETZMANN, 2017), a exposição a uma substância que seja capaz de alterar padrões estruturais, metabólicos e morfofisiológicos do tecido hepático pode potencialmente induzir à aparição de doenças e síndromes que oferecem um sério risco a vida dos organismos não alvo e, consequentemente, ao equilíbrio dos ecossistemas os quais habitam.

1.5 Zebrafish como modelo para ecotoxicologia de vertebrados aquáticos e avaliação de efeitos hepatotóxicos de substâncias

Os roedores (como ratos e camundongos) são animais amplamente utilizados em estudos de toxicidade por apresentarem homologias morfofisiológicas e genéticas com o ser humano (LIESCHKE et al., 2007). Entretanto, o trabalhoso manejo desses animais, associado a questões éticas, econômicas e uma maior observância em relação ao princípio dos 3Rs (*Replacement, Reduction e Refinement* – traduzidos para substituição, redução e refinamento) tem feito com que diversos pesquisadores busquem por modelos alternativos, de baixo custo e alto rendimento que possam ser utilizados na descoberta de mecanismos moleculares a fim de estabelecer limites seguros de exposição e facilitar a classificação de substâncias de acordo com o seu grau de toxicidade (BHATTACHARYA et al., 2011; MADHEVAN et al., 2011; NRC, 2017).

Nesse contexto, surge o zebrafish (*Danio rerio*) (Figura 3), um pequeno teleósteo de 3-4 cm, pertencente à família Cyprinidae, já estabelecido como modelo em diversas áreas da ciência (ADATTO et al., 2011) e que, devido a diversas características inerentes à biologia do desenvolvimento da espécie, seus embriões e larvas vêm-se destacando como um sistema modelo de vertebrados altamente eficaz em estudos de toxicidade (HOWE et al., 2013).

Figura 3 - Dimorfismo sexual do zebrafish (*D. rerio*) em sua fase adulta.

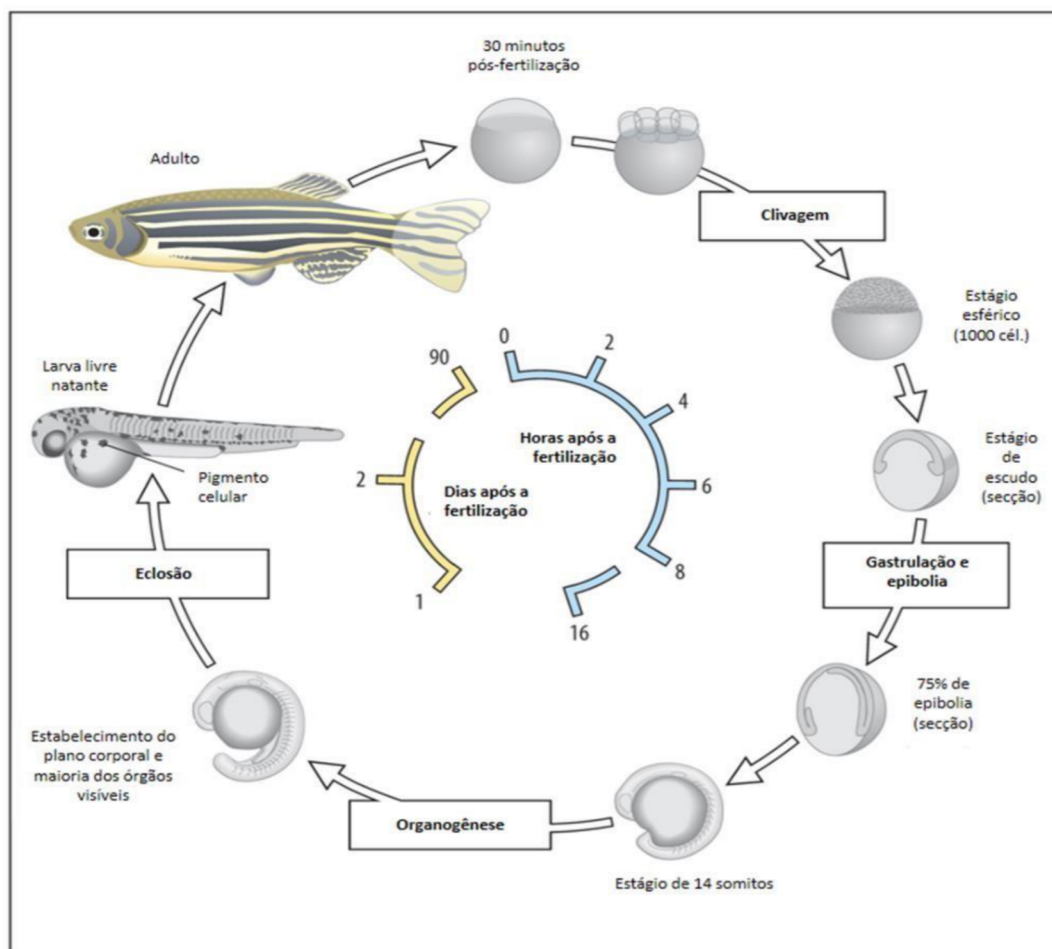


Fonte: adaptado de Rechi (2015)

O zebrafish oferece uma gama de vantagens como modelo animal para pesquisa. Primeiramente, a praticidade de manejo e baixo custo de manutenção atrelados a alta taxa de fecundidade faz desse modelo uma ferramenta promissora na elaboração de estratégias de predição do potencial toxicante de novos fármacos e químicos (BAMBINO et al., 2017). Além disso, o processo de maturação do *D. rerio* acontece em um período de tempo relativamente curto, onde, entre 48 e 72 horas evolui do estágio embrionário para o larval e se torna sexualmente maduro por volta dos três meses de vida (Figura 4), o que torna uma ferramenta prática e viável para a execução de trabalhos de hereditariedade, avaliação de toxicidade crônica e triagens em larga escala (MEYERS, 2018).

Outras características importantes são o desenvolvimento externo e translucidez dos embriões e larvas, que permitem a visualização do desenvolvimento morfológico externo e interno do animal em tempo real sem a necessidade de equipamentos robustos e sofisticados. Com isso, em estudos de toxicologia, é possível identificar alterações morfológicas anormais no embrião e correlacioná-las com os efeitos deletérios da substância avaliada (TAVARES e LOPES, 2013). Além das vantagens inerentes a suas características morfológicas, a alta similaridade do seu genoma com o genoma humano confere uma conservação especial de processos envolvidos em respostas tóxicas (HOWE et al., 2013).

Figura 4 – Ciclo de desenvolvimento do zebrafish (*D. rerio*).



Fonte: adaptado de D'Costa e Shepherd (2009).

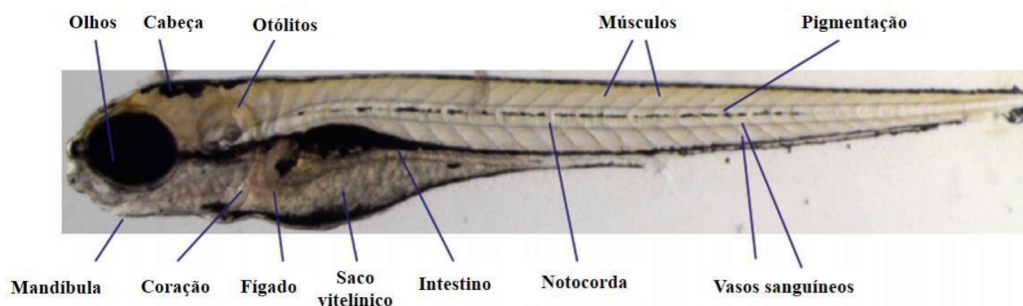
Atualmente, larvas de zebrafish tem se mostrado um modelo vantajoso para diferentes tipos de estudos, dentre eles os que visam avaliar o potencial hepatotóxico de substâncias (BAMBINO et al., 2019). A hepatotoxicidade é um dos principais efeitos tóxicos observados, em diversos organismos, em resposta a exposição a diferentes classes de compostos químicos (PANDIT et al., 2012). A lesão hepática induzida por drogas é um dos principais desafios enfrentados no desenvolvimento de novos fármacos pela indústria farmacêutica, bem como um dos principais responsáveis pela retirada de medicamentos aprovados do mercado (ZHANG et al., 2017).

Os estudos precoces de hepatotoxicidade, antes dos ensaios clínicos, geralmente são realizados em roedores ou utilizam-se células de fígado *in vitro*. Entretanto, essas metodologias apresentam algumas limitações. Primeiro, a avaliação em cultura celular não reflete com precisão o mecanismo da substância *in vivo*. Segundo, apesar de ensaios realizados em mamíferos apresentarem resultados confiáveis e abrangentes, a grande quantidade da substância utilizada, alto custo para manejo e alta demanda de tempo

tornam esses modelos inadequados para uma triagem de alto rendimento (BAMBINO et al., 2019). Essas limitações reforçam a ineficiência desses modelos para determinados tipos de estudo e apontam a necessidade da busca por novos modelos que consigam suprir essa carência.

Larvas de zebrafish são uma alternativa palpável e eficiente na predição de efeitos hepatotóxicos de substâncias. O seu pequeno tamanho e corpo transparente durante as fases iniciais de vida possibilitam que alterações morfológicas no fígado sejam monitoradas sem a necessidade de dissecação a partir de 72 hpf, quando o órgão está totalmente perfundido por sangue e funcional (ZHANG et al., 2017). Estudos com embriões e larvas de zebrafish requerem relativamente pouca quantidade da substância a ser analisada e podem ser realizadas em placas de microtitulação, tornando possíveis a obtenção de informações robustas *in vivo* em um formato *in vitro* (DOMINGUES e GRAVATO, 2018). Além de apresentarem uma alta similaridade dos estágios iniciais da hepatogênese, o fígado do zebrafish e de mamíferos possuem a maioria dos compartimentos celulares em comum (com exceção das células de Kupffer) bem como aspectos metabólicos e funcionais, o que reforça o potencial da utilização desse modelo em estudos de predição do efeito hepatotóxico de substâncias (BAMBINO et al., 2019).

Figura 5 – Morfologia de uma larva de zebrafish (*D. rerio*) com 96 hpf



Fonte: adaptado de Diekmann e Hill (2013)

Em estudos de avaliação de toxicidade, a análise de enzimas biomarcadoras clássicas é uma abordagem amplamente utilizada por pesquisadores (DOMINGUES e GRAVATO, 2018). Metodologias espectrofotométricas permitem observar possíveis alterações dos níveis e atividade dessas moléculas e auxiliar a compreender quais os mecanismos envolvidos na indução do quadro de toxicidade pelo composto avaliado.

Larvas de zebrafish podem ser utilizadas como modelo para análise de biomarcadores de toxicidade (GONÇALVES et al., 2020). Após a exposição à substância

teste, um conjunto de indivíduos do mesmo grupo amostral pode ter seu sobrenadante pós-mitocondrial extraído, e este ser usado para as análises (ZHANG et al., 2016). Apesar dos ensaios espectrofotométricos terem sido elaborados para cubetas, com as larvas é possível adaptar esses métodos para realização em microplacas de 96 poços, reduzindo os volumes de amostras e reagentes necessários e possibilitando análises de alto rendimento (DOMINGUES e GRAVATO, 2018).

1.6 Biomarcadores de estresse oxidativo e metabólico

O estresse oxidativo é uma condição biológica em que ocorre desequilíbrio entre a produção de espécies reativas de oxigênio e a sua neutralização por mecanismos celulares antioxidantes, e é uma resposta comum dos organismos frente a substâncias tóxicas (DOMINGUES e GRAVATO, 2018). Algumas das enzimas as quais suas atividades catalíticas são costumeiramente mensuradas em fluídos e tecidos biológicos para avaliar esse panorama são: glutathione-*S*-transferase (GST), catalase (CAT) e glutathione peroxidase (GPx).

A GST desempenha um papel central no metabolismo de detoxificação através da catálise da reação de conjugação da glutathione reduzida a xenobióticos eletrofílicos. Além disso, variações na atividade dessa enzima frequentemente são correlacionadas com uma resposta ao estresse oxidativo, uma vez que a GSH (um importante substrato da GST) participa diretamente da neutralização de espécies reativas de oxigênio (ROS) (MASSARKY et al., 2016; RIVEIRO-WENDT et al., 2016). Por sua vez, a CAT é responsável pela conversão do peróxido de hidrogênio resultante da neutralização dos radicais livres em água e oxigênio, sendo assim a alteração dos seus níveis é um indicio de resposta antioxidante (NANDI et al., 2019).

A GPx é responsável pela conversão do peróxido de hidrogênio, resultante da neutralização dos radicais livres, em O₂ e água, gerando assim a glutathione oxidada. A reação inversa é realizada pela enzima glutathione redutase, que promove a regeneração enzimática da glutathione (em sua forma reduzida) usando a energia proveniente da redução do NADH. A atividade de GPx é identificada através do decréscimo dos níveis de NADH e é utilizada como indicativo de resposta antioxidante (VELKI et al., 2017).

A LDH participa da produção de energia celular via metabolismo anaeróbio, e é fundamental para a fisiologia muscular durante a exposição a estressores químicos. Alterações na sua atividade indicam uma modificação no metabolismo energético, que pode estar associada a baixa disponibilidade de oxigênio e/ ou injúria celular (ARYA et

al., 2010; MAHARAJAN et al., 2018). Frequentemente, a alteração dos níveis de LDH está associada também a estresse oxidativo (MOKWATSI et al., 2016).

Com a análise desses componentes é possível compreender melhor o perfil de resposta antioxidante ao estresse oxidativo induzido por compostos tóxicos.

1.7 Biomarcadores de dano hepático

Com a finalidade de identificar melhor o mecanismo de hepatotoxicidade induzido por substâncias, podem ser mensurados os níveis de enzimas biomarcadoras clássicas de injúrias ao tecido hepático. Primeiro, as transaminases: aspartato aminotransferase (AST) e alanina aminotransferase (ALT), que são enzimas centrais utilizadas pelo fígado para a fabricação de glicogênio a partir da glicose, e podem auxiliar na identificação de toxicidade, doenças e dano hepático quando seus níveis são mensurados comparativamente (DANIEL, 2019).

Enquanto a AST é encontrada em diversos tipos de tecidos (fígado, cérebro, rins, pâncreas, coração) a ALT é encontrada primordialmente no fígado e qualquer modificação nos seus níveis é uma indicação direta de injúria hepática, sendo a razão AST/ALT um dos marcadores de hepatotoxicidade mais bem estabelecidos, inclusive em larvas de zebrafish (DANIEL, 2019; LI et al., 2020; ZHAO et al., 2019; Jia et al., 2019). E, por fim, a fosfatase alcalina (ALP), que está localizada nas membranas de revestimento dos canalículos biliares e é encontrada em concentrações elevadas em desordens do trato biliar, que é um sinal indicativo de hepatotoxicidade (TELLI et al., 2016). Além disso, através de análises histopatológicas do fígado das larvas de zebrafish, é possível avaliar a arquitetura tecidual, integridade das células e obter informações valiosas sobre a toxicidade de substâncias com efeitos potencialmente deletérios (ZHANG et al., 2016).

2. OBJETIVOS

2.1. Geral:

Investigar os efeitos tóxicos agudos do herbicida ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) em embriões e larvas de zebrafish (*D. rerio*), com ênfase aos mecanismos de estresse oxidativo e dano hepático.

2.2. Específicos:

- Analisar alterações morfológicas em embriões e larvas expostos ao 2,4-D.

- Mensurar o estresse oxidativo e metabólico através da determinação de marcadores enzimáticos em larvas de zebrafish expostas a concentrações subletais do 2,4-D.
- Avaliar o potencial hepatotóxico do 2,4-D em larvas de zebrafish via determinação de marcadores enzimáticos de hepatotoxicidade e análise morfológica do fígado.

3. RESULTADOS

3.1. Artigo

Título: Exposure to 2,4-D herbicide induces hepatotoxicity in zebrafish larvae

Autores: Rafael Xavier Martins, Leonardo Rogério Vieira, Juliana Alves Costa Ribeiro Souza, Marília da Guia Flor Silva, Marta Silva Muniz, Fernando Ramos Queiroga, Mônica Rodrigues Ferreira Machado, Patrícia Mirella da Silva Scárdua e Davi Felipe Farias

Periódico (a ser submetido): Chemosphere (Qualis A1, Fator de impacto 5.778)

Exposure to 2,4-D herbicide induces hepatotoxicity in zebrafish larvae

Rafael Xavier Martins¹, Leonardo Vieira¹, Juliana Alves Costa Ribeiro Souza¹, Marília Guia Flor Silva¹, Marta Silva Muniz¹, Fernando Ramos Queiroga¹, Mônica Rodrigues Ferreira Machado², Patrícia Mirella Silva Scárdua¹, Davi Farias^{1,*}

¹Laboratory for Risk Assessment of Novel Technologies (LabRisk), Department of Molecular Biology, Federal University of Paraíba, João Pessoa, Brazil.

²Laboratory of Biotechnology and Physiology of Fishes (LabFish), Federal University of Jataí, Jataí, Brazil.

*Corresponding author:

Professor Davi Farias

E-mail: davi@dbm.ufpb.br

Phone: +55 85 999987403

ORCID: 0000-0001-5438-1919

List of abbreviations:

2,4-D – dichlorophenoxyacetic acid

Hpf – hours post-fertilization

DMSO – Dimethyl sulfoxide

FET – Fish Embryo Acute Toxicity

OECD – Organisation for Economic Co-operation and Development

LDH – Lactate dehydrogenase

CAT – Catalase

GST – Glutathione S-transferase

GPx – Glutathione peroxidase

AST – Aspartate aminotransferase

ALT – Alanine aminotransferase

ALP – Alkaline phosphatase

Highlights

- 2,4-D impacted the survival of zebrafish embryos and larvae ($LC_{50} = 15.010$ mg/L).

- 2,4-D induced malformations mostly pericardial and yolk sac edema.
- 2,4-D altered the activity levels of enzymes associated with metabolic and oxidative stress.
- 2,4-D increased the activity levels of enzymes associated with liver damage.
- 2,4-D exposure promotes histopathological damage to zebrafish larva liver.

Abstract

2,4-Dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) herbicide is the main ingredient in over 1,500 commercially available products. Although the liver has been identified as one of the organs that are affected by this herbicide, reports on its hepatotoxic effects available in the literature are restricted to rats. Thus, there is a gap in information on other organisms that may be vulnerable to 2,4-D exposure, such as fish. Therefore, the present work aimed to assess the hepatotoxic potential of 2,4-D in fish using zebrafish (*Danio rerio*) larvae as a model system. For this purpose, its acute toxicity to zebrafish embryos was assessed, as well as its sublethal effects ($< LC_{50}$) on the activity of enzymes related to oxidative (GST, CAT and GPX) and metabolic (LDH) stress and liver parameters (AST, ALT and ALP) after 48 h of exposure. Morphological analysis of the liver was also assessed in zebrafish larvae. As a result, 2,4-D reduced larvae survival (LC_{50} 15.010 mg/L in 96h of exposure), induced malformations, altered the activity of LDH, GST and CAT enzymes and significantly increased the activity of all biomarkers for liver damage. Although no changes in the color or size larval liver were observed after 48 h of exposure, histopathological analysis revealed that treatment with 2,4-D caused severe changes in liver tissue, such as vacuolization of the cytosol, eccentric cell nucleus, as well as loss of tissue architecture and cellular boundaries. Thus, our results show that 2,4-D alters the enzymatic profile related to oxidative stress and induces liver damage.

Keywords: biomarkers, embryotoxicity, fish, liver and pesticide.

1. Introduction

Products with herbicidal purposes represent about 47.5% of pesticides applied to crops worldwide (SHARMA et al., 2019). Among them, 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) is a chemical belonging to the class of the phenoxyacetic acids, which was one of the first synthetic herbicides to be introduced on the market in the 1940s, and is currently the main ingredient of over 1,500 products (TIWARI et al., 2019; ISLAM et al., 2017). The major consumers of 2,4-D are the United States, South America, Europe and Russia, where consumption increased by around 40% between the years 2002 and 2011 (ISLAM et al., 2017). This compound was designed to mimic auxins, hormones that coordinate plant growth. It induces cell division at low concentrations (20-50 mg/L), accelerating the development of plants and improving the visual aspects and durability of fruit. However, when used in high concentrations (≥ 500 mg/L) it exerts herbicidal effects, selectively killing dicotyledonous plants by inducing abnormal tissue growth, among other

deleterious effects that ultimately culminate in death (LI et al., 2017; TIWARI et al., 2019).

A significant part of the pesticides applied in crops does not reach only the desired target, resulting in a large accumulation of pesticide residues and their transformation products in the environment (ISLAM et al., 2017; GONÇALVES et al., 2020). Current data show that the estimated concentrations of 2,4-D in freshwater environments range between 4 to 24 µg/L, reaching up to 4,000 µg/L in areas surrounding application sites. Its half-life in water is approximately 15 days, reaching up to 300 days depending on the physicochemical parameters of the water and other environmental conditions (DEHNERT et al., 2019; GAAIED et al., 2019).

Many aquatic organisms are susceptible to 2,4-D toxicity, whose documented effects include changes in biochemical, morphophysiological and behavioural parameters in several fish species (DeQuattro and Kasarov, 2016; Ruiz de Arcaute et al., 2016; Dehnert et al., 2019). Studies using different life stages of zebrafish (*Danio rerio*) have shown that exposure to the herbicide induces oxidative stress, affects hatching rate, causes neurological and behavioral changes, interferes with cardiac development, and causes the appearance of different types of malformation such as pericardial and yolk sac edema (Li et al., 2017; Dehnert et al., 2019; Gaaied et al., 2019; Gaaied et al., 2020; Pompermaier et al., 2020; Thiel et al., 2020). In addition, its potential for genotoxicity, reproductive toxicity, and endocrine disruption has also been described in other fish species such as *Cnesterodon decemmaculatus* and *Pimephales promelas* (DeQuattro and Kasarov, 2016; Ruiz de Arcaute et al., 2016).

Several studies indicate that the liver is one of the organs affected by 2,4-D exposure, but these reports of hepatotoxic effects are restricted to rats (Tayeb et al., 2010; Dakhakhni et al., 2015; Tichati et al., 2020). Surely, the expansion of 2,4-D hepatotoxicity studies to other experimental models may contribute to the assessment of ecotoxicological risks of aquatic organisms such as fish to this herbicide. In this sense, zebrafish larvae have been shown to be suitable models for studying and predicting hepatotoxicity. In addition to features such as ease of handling, low cost, high fertility and external development, early life stages of the zebrafish are transparent, allowing direct observation of liver morphology without dissection from 72 hpf, when the organ is fully perfused and functional (Adatto et al., 2011; Zhang et al., 2017). In addition, biochemical and histopathological parameters related to liver damage can be assessed at this stage of life (Zhang et al., 2017; Zhao et al., 2019). Thus, this study aimed to assess the hepatotoxic

effects of 2,4-D to zebrafish larvae following acute exposure and measuring of lethal and sublethal effects, enzymatic biomarkers and liver morphological parameters.

2. Materials and Methods

2.1. Chemicals

The herbicide 2,4-D (2,4-dichlorophenoxyacetic acid, CAS 94-75-7, D7299) was obtained from Sigma Aldrich Co. (St. Louis, MO, USA), while the organic solvent dimethyl sulfoxide (DMSO, CAS 67-68-5, 01D1011.01.BJ) was purchased from the company Labsynth (Diadema, São Paulo, Brazil). 2,4-D was dissolved in pure DMSO to prepare a stock solution at a concentration of 75,000 mg/L, which was subsequently diluted to reach the tested concentrations (2.5, 5, 10, 20, 25 and 40 mg/L). All other chemical reagents used were of analytical grade.

2.2. Animals

Zebrafish embryos (AB wild-type strain) with approximately 1 hpf (hour postfertilization) were provided by the Production Unit for Alternative Model Organisms (UniPOM), Federal University of Paraíba, João Pessoa, Brazil. The parents were kept in a recirculation system with regular monitoring of water quality parameters (pH, ammonia and nitrite levels) which is in a room with temperature (26 ± 1 °C) and photoperiod (14:10 light/dark cycle) controlled. The day before the experiment, zebrafish adults (male to female ratio of 2:1) were transferred to a breeding tank with a bottom mesh and a quickopening valve for embryo collection. Embryos were collected on the day of the experiment and placed in E3 medium (5.0 mM NaCl, 0.17 mM KCl, 0.33mM CaCl and 0.33mM MgSO₄). Only spawning with a fertilization rate $\geq 70\%$ were used. Viable embryos (normal cleavage pattern and without morphological changes) were selected under a light microscope (Televal 31, Zeiss, Germany, 50x magnification).

The experiments carried out in this study were approved by the Ethics Committee on the Use of Animals at the Federal University of Paraíba, protocol No. 8881290419.

2.3. Acute toxicity test

The acute toxicity test was carried out in accordance with the FET test (Fish Embryo Acute Toxicity test), OECD's protocol No. 236 (2013). For this experiment, 24 embryos (≈ 3 hpf) were distributed in a 24-well plate (1 embryo/well in 2 mL of 2,4-D

solution). Of these embryos, 20 were kept in static exposure conditions ($26 \pm 1^\circ\text{C}$, 14:10h D light/dark cycle) for 96 h in solutions of 2,4-D at concentrations ranging from 5 to 40 mg/L, while the remaining embryos were exposed only to E3 medium (internal control). Two additional plates were prepared: one with embryos in E3 medium (negative control) and another with embryos in a 0.1% DMSO solution (solvent control). The chosen test concentrations were based on the tests carried out by Li and collaborators (2017). Here, we repeat this toxicity assessment to account for potential variations in sensitivity of the zebrafish strains (PARICHY, 2015), and also to determine sublethal concentrations for the further tests.

Lethal and non-lethal effects were observed daily for 96 h. Embryos showing lethality endpoints (coagulation, no formation of somites, no detachment of tail, or absence of heartbeat) were considered dead. The data obtained were used to determine: (1) survival rate % (number of alive organisms/total number of organisms $\times$ 100) per tested concentration and exposure time; (2) cumulative lethal and non lethal effects % (number of affected organisms/total number of organisms $\times$ 100) per tested concentration during 96 h; (3) affected organisms by specific non lethal effects % (number of affected organisms/ number of alive organisms $\times$ 100) per tested concentration during 96 h; and (4) also the mean lethal concentration (LC_{50}) by using *probit* regression analysis (Finney, 1972).

2.4. Enzyme activity assays

2.4.1 Oxidative and metabolic stress

We assessed oxidative and metabolic stress in zebrafish larvae exposed to 2,4-D for 48 h between 5 and 7 dpf to understand the antioxidant response profile and hypoxa/cellular injury in larvae with fully formed livers. Additionally, zebrafish larvae do not require feeding up to 7 dpf, but their livers are already perfused with blood and fully functional by 72 hpf (ZHANG et al., 2017; ZHAO et al., 2019).

For the enzymatic assays, 5 dpf-old zebrafish larvae in 5 groups of 10 organisms per concentration were exposed to sublethal concentrations of 2,4-D below the calculated LC_{50} (2.5, 5 and 10 mg/L) in 24 well plates (2 mL/well) for 48 h. A negative control group exposed to E3 medium and a solvent control group exposed to 0.01% DMSO were also prepared. After the exposure, larvae were collected and distributed in microtubes containing cold distilled water, in the proportion of 1 larva to every 50 μL of water. Subsequently, the larvae were mechanically macerated with a pistil and then centrifuged

(10,000 x g, for 20 min) to obtain the post-mitochondrial supernatant, which was used to determine the content of soluble proteins and the activity of selected enzymes. The content of soluble proteins was measured following the Bradford method (1976). Then, activity of the enzymes glutathione S-transferase (GST) and catalase (CAT) were determined according to Domingues and Gravato (2018), while the activity of glutathione peroxidase (GPx) was measured according to the procedure described by Massarsky and collaborators (2017). The activity of lactate dehydrogenase (LDH) was determined as described by Domingues and collaborators (2010). All analyses were performed with quadruplicate measurements for each sample.

2.4.2 Hepatotoxicity biomarkers

The activity levels of liver damage marker enzymes were measured according to the methodology described by Zhao et al. (2019), with adaptations. Groups of zebrafish larvae (n = 50/concentration, 5 dpf) were exposed to 2,4-D solutions under the same conditions described in item 2.4.1. A negative control (E3 medium) and a solvent control (0.01% DMSO) were also prepared. The obtained supernatants were used to determine the total protein content (Bradford, 1976) and the activities of the enzymes aspartate aminotransferase (AST), alanine aminotransferase (ALT) and alkaline phosphatase (ALP), using spectrophotometry-based diagnostic kits (Dóles, Goiás, Brazil) and following the manufacturer's instructions. To calculate each enzymatic activity was adopted a specific factor (AST = 6.3, ALT = 6.3 and ALP = 18.45) applied to the general formula: Activity ($\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ protein) = $[(\Delta\text{ABS}/\text{min}) \times (\text{well volume}/ \text{sample volume})/ \text{protein concentration (mg/mL)} \times \text{specific factor} \times \text{well height cm}] \times 1000$. All analyses were performed with quadruplicate measurements for each sample.

2.5. Liver morphology analysis

Changes in the size and color of the liver may be associated with organ degeneration, inflammation and necrosis, which are problems that can be induced by exposure to different substances with hepatotoxic potential in zebrafish (He et al., 2012). In our study, groups of six zebrafish larvae (5 dpf) were exposed for 48 h to four concentrations of 2,4-D (2.5, 5, 10 and 20 mg/L). After exposure, larvae were euthanized with eugenol and arranged horizontally on glass slides. The side-laying larvae were then photographed under a stereomicroscope (Olympus, SZX2-TR30, Japan) at 56x magnification. The images obtained were used to measure liver area (mm^2) and mean gray scale values using the free software ImageJ.

2.6. Histological procedures

Whole larvae were fixed in a 10% formaldehyde solution for 24 h and subjected to standard histological procedures as follows: (1) dehydration in increasing alcohol series of 70% for 24 h and 80, 96, (2 baths) and 100% (2 baths) for 1 h each; (2) diaphanization in xylene: 100% alcohol (1:1) for 1 h, followed by two successive baths in 100 % xylene for 1 h each; and finally (3) embedding in two successive baths of liquid paraffin (around 50°C) for 1 h each. Samples were embedded in fresh paraffin.

Histological sections (5 μ m) were stained with Harry's hematoxylin-eosin for analysis under a light microscope (Olympus BX-41). The livers of 5 larvae from each group (control, 5 mg and 10 mg) were analyzed for cell and tissue alterations.

2.5. Statistical analysis

The data on enzyme activity, liver area, and average gray scale values were analyzed using the statistics software GraphPad Prism 8 and are represented as mean $\pm$ standard deviation. The results were tested for normality and homogeneity of variances using the Shapiro-Wilk and Levene's tests. Subsequently, the data that met these conditions were analyzed by one-way ANOVA and Tukey's post-hoc test ($p < 0.05$). Data that did not meet the requirements were analyzed with a Kruskal-Wallis test ($p < 0.05$).

3. Results

3.1. Lethal and non lethal effects

Embryonic coagulation was the only endpoint of lethality observed in all treatments, resulting in a LC_{50} (96 h) of 15.010 mg/L (11.218 – 20.083 mg/L, 95% confidence interval). This endpoint appeared in a concentration-dependent manner, with 100% mortality after 96 h of exposure at the highest concentrations tested (25 and 40 mg/L) (Figure 1A).

As shown in Figures 1B, 1C and 2, non lethal effects appeared at concentrations between 10 and 20 mg/L. The cumulative non lethal effects (96 h) observed were pericardial edema, yolk sac edema, delayed hatching, and spinal malformation, the first three being more prevalent. At 10 mg/L, about 88% of the animals that survived until 96 h showed pericardial edema, 47% delayed hatching, and 18% yolk sac edema. In turn, at 20 mg/L about 77% of the surviving animals had pericardial edema, 77% delayed

hatching and 69% sac edema. No non lethal effects were observed at the lowest concentration tested (5 mg/L).

3.2. *Enzymatic activity*

3.2.1 Oxidative and metabolic stress

Figure 3 shows the activity graphs of enzymatic biomarkers analyzed after 48 h of exposure to three sublethal concentrations of 2,4-D. Out of four biomarkers evaluated, three of them showed changes in activity after exposure to the herbicide. GPx activity did not change at any of the tested concentrations (Figure 3A). However, GST activity significantly increased at the lowest concentration tested (2.5 mg/L), compared to the control group in E3 medium (Figure 3B), while CAT activity decreased in larvae treated with the intermediate concentration of 5 mg/L (Figure 3C). Finally, LDH activity in all treated groups was higher than that of the E3 control group (Figure 3D).

3.2.2 Hepatotoxicity biomarkers

After 48 h of exposure, significant changes in the enzymatic activity of ALT, AST and ALP were observed in groups of larvae treated with concentrations below the LC_{50} (Figure 4). All three biomarkers showed increased activity starting at the lowest concentration tested (2.5 mg/L), in a concentration-dependent manner. The groups treated with 5 mg/L of 2,4-D showed an increase in ALT and AST activity of approximately 83 and 172%, respectively, compared to the negative control group (Figures 4A and 4B). In relation to ALP, the group exposed to 10 mg/L showed an activity 99% higher than the group in E3 medium only (Figure 4C).

3.3. *Liver morphology analysis*

After 48 hours of exposure, no significant difference was observed between the liver area (Supplementary Figures 1A and 1B) or average gray scale values (Supplementary Figure 1C) of larvae exposed to 2,4-D in concentrations below the LC_{50} (2.5, 5, 10 and 20 mg/L) and those of the control group (E3 medium).

3.4. *Liver histopathology*

Animals from the control group showed normal liver and hepatocyte appearance. Cells were tightly connected to each other and the cytoplasm was evenly and homogeneously distributed. Hepatocytes were round with central nucleus and welldefined cell boundaries (Figure 5A). Animals from the group treated with 5 mg/L of 2,4D showed moderate liver alterations. The tissue presented a low degree of disorganization, and

hepatocytes had heterogeneous eosinophilic cytosols, evidenced by irregular staining distribution. Cytosol vacuolization was also observed, and cell nucleus were eccentric (Figure 5B). Animals from the group treated with 10 mg/L of 2,4-D showed heavy liver alterations. Tissue and cell disorganization were evident, as well as loss of cell boundaries. In some animals, the liver presented a necrotic appearance with probable cell disruption and release of cytosolic content among adjacent cells (Figure 5C and D).

4. Discussion

The acute toxicity test showed that exposure to 2,4-D decreases survival of zebrafish embryos and larvae, with mortality appearing as embryo coagulation (OECD, 2013) and yielding an LC_{50} value of 15.010 mg/L after 96h of exposure. Data available in the literature reveal different LC_{50} values for early stages of zebrafish exposed to 2,4D. In acute exposure assays (≤ 96 h) with zebrafish embryos, Gaaied et al. (2020) and Li et al. (2017) found LC_{50} values of 2.86 and 46.71 mg/L, respectively. Several factors may influence this gap among LC_{50} values, such as the composition and purity of 2,4-D used in exposure assays. While our study and that performed by Li et al. (2017) used analytical grade 2,4-D (purity $> 97\%$), Gaaied et al. (2020) used a commercial herbicide formulation which has 2,4-D as an active ingredient (600 g/L). A comparative study showed that zebrafish embryos and larvae are less sensitive to pure 2,4-D than to the commercial herbicide, suggesting that the inert ingredients of the commercial formulation (such as fragrances, solvents, surfactants and preservatives) may influence the toxicity of the active ingredient (Dehnert et al., 2019). Another factor that can contribute to the differences in LC_{50} values is a documented variation in sensitivity between the different strains of zebrafish, which is probably due to a high degree of heterogeneity within this species, even in laboratory environments (PARICHY, 2015).

Among the non lethal effects observed in our study, pericardial and yolk sac edema were the most prevalent. These edemas are often reported for early life stages of zebrafish exposed to toxic substances such as organic pollutants, heavy metals, and nanoparticles, suggesting that these effects may represent a general response related to the sensitivity of these organisms in a toxic environment (Li et al., 2017; Sant and TimmeLaragy, 2018). Moreover, pericardial edema is one of the most recurrent adverse effects in zebrafish embryos and larvae exposed to 2,4-D (Li et al., 2017, Gaaied et al., 2020, Dehnert et al., 2019). Additionally, Li et al. (2017) demonstrated that exposure to 2,4-D alters the expression of genes related to the cardiac system development in

zebrafish, suggesting that the developing heart may be affected by the compound (Li et al., 2017).

Notably, we observed biochemical changes at the concentration of 2.5 mg/L, which is a level that could be found in 2,4-D hotspots (Gaaied et al., 2019). Its estimated concentrations in environmental samples are generally lower (0.004 - 0.024 mg/L), but 2,4-D is potentially bioaccumulative and remains in fresh water for 15-300 days (Borges et al., 2004; Li et al., 2017; Gaaied et al., 2019; Dehnert et al., 2019), which raises the possibility of chronic damage due to exposure at lower concentrations of this chemical.

Larvae exposed to sub-lethal concentrations of 2,4-D showed changes in LDH activity which is an enzymatic marker of hypoxia/cellular injury, and also of CAT and GST activities involved in oxidative stress responses. LDH participates in energy production via anaerobic metabolism, in addition to being fundamental to muscle physiology during exposure to chemical stressors. Changes in its activity indicate changes in energy metabolism, which may be associated with low oxygen availability and/or tissue injury (Arya et al., 2010; Maharajan et al., 2018). Our data show that all 2,4-D treatments increased LDH activity, indicating upregulation of anaerobic metabolism as well as a cytotoxic effect, as evidenced by hepatic damage observed in our study.

At the concentration of 5 mg/L, a suppression of CAT activity was observed. This enzyme catalyzes the conversion of the free radical H_2O_2 to water in the peroxisomes (Krysko et al., 2010), and a decreased in its activity levels was also described in zebrafish larvae after exposure to the fungicide azoxystrobin, possibly reflecting damages to antioxidant systems due to oxidative stress, since the chemical induced the production of ROS and increased the activity of other defense enzymes (Jiang et al., 2018). Thus, the observed suppression of CAT activity after exposure to 2,4-D may have occurred by similar mechanisms, since enzymes correlated with antioxidant responses were also stimulated. In addition, changes in CAT levels may be linked to 2,4-D hepatotoxicity, since changes in the activity of this enzyme are frequently observed in exposures to hepatotoxic substances, and peroxisomes are widely distributed in the liver (Krysko et al., 2010; Jia et al., 2019; Teng et al., 2019; Jiao et al., 2020).

GST is another enzyme that is abundant in the zebrafish liver (Tierbach et al., 2018) and with activity and/or expression related to hepatotoxicity (Zhang et al., 2019; Zhang et al., 2016; Li et al., 2020). In this study, 2,4-D increased GST activity at the lowest concentration tested (2.5 mg/L), indicating that the chemical elicits specific responses, as GST is directly linked to the metabolism of xenobiotics and participates in phase II biotransformation, playing a central role in detoxifying xenobiotics by

conjugation with reduced glutathione (Gaaied et al., 2019). While GST is part of a specific mechanism for metabolizing xenobiotics, CAT are part of the first-line, non-specific antioxidant defense, and our results suggest that 2,4-D may induce responses to oxidative stress spanning both mechanisms.

At the whole-organism level, the liver plays a central role in the metabolism of xenobiotics, and toxicant-induced oxidative stress has been considered one of the main reasons for loss of functional and structural integrity of the liver tissue (Kietzman, 2017; Farzaei et al., 2018). In our study, 2,4-D induced a significant increase in the activity of liver enzymes (AST, ALT and ALP) in zebrafish larvae. AST and ALT are highly concentrated aminotransferases in the liver, and increased levels of these enzymes are associated with hepatocellular lesions, with the AST/ALT ratio being one of the best established markers of liver injury, including for zebrafish larvae (Li et al., 2020; Zhao et al., 2019; Jia et al., 2019). Meanwhile, increased ALP activity is common in cases of hepatobiliary disorders, since this enzyme is located on the epithelial surface of the bile ducts within the liver (Giannini et al., 2005; Fernandes et al., 2011). Although no changes in the size or color of the liver of the treated larvae were observed, cell damage in the liver tissue was confirmed by histopathological analysis through identification of regions with cytosol vacuolization, increased frequency of eccentric nuclei, damage to tissue architecture, loss of cell boundaries and necrotic aspect of the liver in some larvae. Liver tissue injuries linked to increased activity of liver biomarkers (mostly ALT/AST ratio) are frequently reported in studies that aim to identify hepatotoxic effects in zebrafish larvae (Zhang et al., 2018; Jia et al., 2019; Zhao et al., 2020). For example, Zhao and collaborators (2019) exposed zebrafish larvae (4 dpf) for 24 h to *Euphorbia kansui* extract, and showed that the hepatic tissue had vacuoles, loss of architecture and cellular shape, as well as increased activity of ALT and AST. In addition, Jia and collaborators (2019), Qiu and collaborators (2019) and Li et al. and collaborators (2020) reported that substances with hepatotoxic effects are capable of altering the activity of oxidative stress biomarkers in zebrafish larvae. This suggests that the increased production of free radicals induced by substances may be one of the mechanisms responsible for promoting liver damage. Therefore, our results indicate that the liver is affected by 2,4-D in zebrafish larvae and the change in activity levels of enzymes involved in the response to free radical production suggests that oxidative stress may be one of the agents involved in the herbicide's mechanism of toxicity.

5. Conclusions

Our results showed that 2,4-D decreases survival of zebrafish embryos and larvae in a concentration-dependent manner and induces non lethal adverse effects, with yolk sac, pericardial edemas and hatching delay being the most recurrent. In addition, we have shown that exposure to sub-lethal concentrations of 2,4-D induced changes in enzymatic oxidative and metabolic stress responses, as well as a significant increase in the activity of biomarker enzymes for liver damage in zebrafish larvae, indicating that the compound possesses hepatotoxic properties. Therefore, this study provides information that refines the understanding of 2,4-D toxicity in a vertebrate model system.

6. References

- Adatto, I.; Lawrence, C.; Thompson, M.; Zon, L. I. A new system for the rapid collection of large numbers of developmentally staged zebrafish embryos. **Plos One**. v. 6, 2011.
- Arya, D. S.; Arora, S.; Malik, S. et al. Effect of *Piper betle* on cardiac function, marker enzymes, and oxidative stress in isoproterenol-induced cardiotoxicity in rats. **Toxicol Mech Methods**. v. 20, p.564–571, 2010.
- Bambino, K.; Chu, J.; Morrison, J. Hepatotoxicity in Zebrafish Larvae. **Methods in Molecular Biology**. v. 1965, p.129-138, 2019.
- Borges, S.; Dzubow, C.; Orrick, G.; Stavola, A. 2,4- Dichlorophenoxyacetic acid analysis of risks to endangered and threatened salmon and steelhead. **Environmental Field Branch Office of Pesticide Programs**, USA, 2004.
- Bradford, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal Biochem**. V. 72, p. 248-254, 1976.
- Dakhakhni, T.; Ahmed, G.; Qusti, S. Evaluation of the toxic effect of the herbicide 2, 4D on rat hepatocytes: an FT-IR spectroscopic study. **European Biophysics Journal**. v. 45, p. 311-320, 2015.
- Dehnert, G.; Karasov, W.; Wolman, M. 2,4-Dichlorophenoxyacetic acid containing herbicide impairs essential visually guided behaviors of larval fish. **Aquatic Toxicology**. v. 209, p. 1-12, 2019.
- DeQuattro, Z. A.; Karasov, W. H. Impacts of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid aquatic herbicide formulations on reproduction and development of the fathead minnow (*Pimephales promelas*). *Environ Toxicol Chem*. 2016 Jun;35(6):1478-88. doi: 10.1002/etc.3293. Epub 2016 Apr 5. PMID: 26510165.
- Domingues, I.; Oliveira, R.; Lourenço, J.; Mendo, S.; Soares, A. Biomarkers as a tool to assess effects of chromium (VI): Comparison of responses in zebrafish early life stages and adults. **Comparative biochemistry and physiology**. v. 152, p. 338-345, 2010.

- Farzaei, M. H.; Zobeiri, M.; Parvizi, F.; El-Senduny, F.; Marmouzi, I. et al. Curcumin in Liver Diseases: A Systematic Review of the Cellular Mechanisms of Oxidative Stress and Clinical Perspective. **Nutrients**. v. 10, 2018.
- Fernandes, M.; Iano, F.; Rocia, V.; Yanai, M.; Leite, A. et al. Alkaline Phosphatase Activity in Plasma and Liver of Rats Submitted to Chronic Exposure to Fluoride. *Brazilian Archives of Biology and Technology*. v. 54, p. 1187-1192, 2011.
- Finney, D.J. Probit analysis: a statistical treatment of the sigmoid response curve, 2nd edn. Cambridge University Press, New York, NY, US, 1952.
- Gaaied, S.; Oliveira, M.; Domingues, I.; Banni, M. 2,4-Dichlorophenoxyacetic acid herbicide effects on zebrafish larvae: development, neurotransmission and behavior as sensitive endpoints. **Environ Sci Pollut Res Int**. v. 27, p. 3686-3696, 2019.
- Gaaied, S.; Oliveira, M.; Le B. F.; Cachot, J.; Banni, M. Gene expression patterns and related enzymatic activities of detoxification and oxidative stress systems in zebrafish larvae exposed to the 2,4-Dichlorophenoxyacetic acid herbicide. **Chemosphere**. v. 224. p. 289-297, 2019.
- Giannini, E.; Testa, R.; Savarino, V. Liver enzyme alteration: A guide for clinicians. **Canadian Medical Association journal**. v. 172, p. 367-79. 2005.
- Gonçalves, I. F. S.; Souza, T. M.; Vieira, L. R.; Marchi, F. C.; Nascimento, A. P.; Farias, D. F. Toxicity testing of pesticides in zebrafish – a systematic review on chemicals and associated toxicological endpoints. **Environ Sci Pollut Res**. v. 27, p. 10185-10204, 2020.
- He, J. H.; & Guo, S. Y.; Zhu, F.; Zhu, J. J.; Chen, Y. X.; Huang, C. J.; Gao, J. D. Q. X.; Xuan, Y. X.; Li, C. Q. A zebrafish phenotypic assay for assessing drug-induced hepatotoxicity. **Journal of pharmacological and toxicological methods**. v. 67, p. 2532, 2012 .
- Islam, F.; Wang, J.; Farooq, M. A.; Khan, M. S. S. et al. Potential impact of the herbicide 2,4-dichlorophenoxyacetic acid on human and ecosystems. **Environment international**. v. 111, p. 332-351, 2017.
- Jia, Z. L.; Cen, J.; Wang, J. B.; Zhang, F.; Xia, Q. et al. Mechanism of isoniazid-induced hepatotoxicity in zebrafish larvae: Activation of ROS-mediated ERS, apoptosis and the Nrf2 pathway. **Chemosphere**. v. 227, p. 541-550, 2019.
- Jiang, J.; Shi, Y.; Yu, R.; Chen, L.; Zhao, X. Biological response of zebrafish after shortterm exposure to azoxystrobin. **Chemosphere**. v. 202, p. 56-64, 2018.
- Jiao, Y.; Tao, Y.; Yang, Y.; Tuyiringire, D. et al. Monobutyl phthalate (MBP) can dysregulate the antioxidant system and induce apoptosis of zebrafish liver. **Environmental Pollution**. v. 257, 2020.
- Kietzmann, T. Metabolic zonation of the liver: The oxygen gradient revisited. **Redox Biol**. v. 11, p. 622-630. 2017.
- Krysko, O.; Stevens, M.; Langenberg, T.; Fransen, M. et al. Peroxisomes in zebrafish: Distribution pattern and knockdown studies. **Histochemistry and cell biology**. v. 134, p. 39-51, 2010.

- Li, K.; Wu, J. Q.; Jiang, L. L.; Shen, L. Z. et al. Developmental toxicity of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid in zebrafish embryos. **Chemosphere**, v. 171, p. 40–48, 2017.
- Li, S.; Jiang, Y.; Sun, Q.; Coffin, S. et al. Tebuconazole induced oxidative stress related hepatotoxicity in adult and larval zebrafish (*Danio rerio*). **Chemosphere**. 2020 Feb; v. 241, p.125-129, 2020.
- Maharajan, K.; Muthulakshmi, S.; Nataraj, B.; Ramesh, M.; Kadirvelu, K. Toxicity assessment of pyriproxyfen in vertebrate model zebrafish embryos (*Danio rerio*): A multi biomarker study. **Aquat Toxicol**. v. 196, p. 132-145, 2018.
- OECD. Test No. 236, “Fish Embryo Acute Toxicity (FET) Test,” OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 2. Paris: OECD Publishing, 2013.
- Parichy, D. M. Advancing biology through a deeper understanding of zebrafish ecology and evolution. **eLife**. v. 4, 2015.
- Pompermaier, A.; Kirsten, K.; Soares, S.; Fortuna, M.; et al. Waterborne agrichemicals compromise the anti-predatory behavior of zebrafish. **Environmental Science and Pollution Research**, p. 1-9, 2020.
- Qiu, L.; Jia, K.; Huang, L.; Liao, X. et al. Hepatotoxicity of tricyclazole in zebrafish (*Danio rerio*). **Chemosphere**. v. 232, p. 171-179, 2019.
- RUIZ DE ARCAUTE, C. et al. Toxic and genotoxic effects of the 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D)-based herbicide on the Neotropical fish *Cnesterodon decemmaculatus*. **Ecotoxicol Environ Saf**. v. 9, p. 128-222, 2016.
- Sant, K.; Timme-Laragy, A. Zebrafish as a Model for Toxicological Perturbation of Yolk and Nutrition in the Early Embryo. **Current Environmental Health Reports**. v. 5, p. 125-133, 2018.
- Sharma, A.; Kumar, V.; Shahzad, B.; Tanveer, M. et al. Worldwide pesticide usage and its impacts on ecosystem. **SN Applied Sciences**. v. 1, 2019.
- Tayeb, W.; Nakbi, A.; Trabelsi, M.; Attia, N.; Miled, A.; Hammami, M. Hepatotoxicity induced by sub-acute exposure of rats to 2,4-Dichlorophenoxyacetic acid based herbicide "Désormone lourde". **J Hazard Mater**. v. 180, n. 1-3, p. 225-33, 2010.
- Teng, M.; Zhou, Y.; Song, M.; Dong, K.; Chen, X.; et al. Chronic Toxic Effects of Flutolanil on the Liver of Zebrafish (*Danio rerio*). **Chemical Research in Toxicology**. v. 32, p. 995-1001, 2019.
- Thiel, N.; Sachett, A.; Schneider, S.; Garbinato, C.; Decui, L. et al. Exposure to the herbicide 2,4-dichlorophenoxyacetic acid impairs mitochondrial function, oxidative status, and behavior in adult zebrafish. **Environmental Science and Pollution Research**. v. 36, p. 45874-45882, 2020.
- Tichati, L.; Trea, F.; Ouali, K. Potential Role of Selenium Against Hepatotoxicity Induced by 2,4-Dichlorophenoxyacetic Acid in Albino Wistar Rats. **Biol Trace Elem Res**. v.194, p. 228-236, 2020.

Tierbach, A.; Groh, K. J.; Schönenberger, R.; Schirmer, K.; Suter, M. J. Glutathione S-Transferase Protein Expression in Different Life Stages of Zebrafish (*Danio rerio*). **Toxicol Sci.** v. 162, p. 702-712, 2018.

Tiwari, B.; Kharwar, S. Tiwari, D. N. Pesticides and Rice Agriculture. **Cyanobacteria from basic science basic applications.** p. 303-325, 2019.

Zhang, Y.; Li, J.; Chen, Y.; Han, L.; He, Q.; Chu, J.; Liu, K. The role of hepatic antioxidant capacity and hepatobiliary transporter in liver injury induced by isopsoralen in zebrafish larvae. **Human & Experimental Toxicology.** v. 38, p. 36-44, 2019.

Zhang, Y.; Han, L.; He, Q.; Chen, W. et al. Journal of Pharmacological and Toxicological Methods A rapid assessment for predicting drug-induced hepatotoxicity using zebra fish. **Journal of Pharmacological and Toxicological Methods,** v. 84, p. 102–110, 2017.

Zhang, Y.; Liu, K.; Hassan, H.; Hongli, G. et al. L-FABP-deficiency provoked oxidative stress, inflammation and apoptosis-mediated hepatotoxicity induced by pyrazinamide on zebrafish larvae. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy.** v. 60, p. 7347-7356, 2016.

Zhao, C.; Wang, M.; Jia, Z.; Li, E.; Zhao, X. et al. Similar hepatotoxicity response induced by Rhizoma Paridis in zebrafish larvae, cell and rat. **Journal of Ethnopharmacology.** v. 62, 2020.

Zhao, C.; Jia, Z.; Li, E.; Zhao, X.; Han, T. et al. Hepatotoxicity evaluation of Euphorbia kansui on zebrafish larvae in vivo. **Phytomedicine.** v. 62, 2019.

Figure captions

Figure 1. Overview of zebrafish embryos and larvae exposure to increasing concentrations of 2,4-D herbicide for 96 h. (A) Survival rate at different concentrations and exposure times. (B) Lethal and non lethal cumulative effects after 96 h. (C) Non lethal effects at different concentrations after 96 h. No effect: morphological characteristics similar to the control organisms; non lethal effect: presence of non lethal alterations; mortality: presence of lethality endpoints.

Figure 2. Lethal and non lethal effects observed in zebrafish embryos and larvae after exposure to increasing concentrations of 2,4-D. (a), (b), (c) and (d) are control organisms

with normal development after 24, 48, 72 and 96 hpf, respectively, exposed only to E3 medium; (e) and (f) 24 and 48 hpf embryos, respectively, exposed to 10 mg/L of 2,4-D and showing no adverse effects; (g) and (h) 72 hpf embryo and 96 hpf larva, respectively, exposed to 10 mg/L presenting pericardial edema (PE) and spine malformation (SM); (i) 24 hpf embryo exposed to 20 mg/L showing no tail detachment (NTD) and body malformation (BM); (j) and (k) 48 hpf embryos exposed to 20 mg/L showing yolk sac (YSE) and pericardial edema, respectively; (l) 72 hpf embryo exposed to 20 mg/L showing yolk sac and pericardial edema; (m) 96 hpf larvae exposed to 20 mg/L showing yolk sac edema, pericardial edema and delayed hatching.

Figure 3. Enzymatic activity of glutathione peroxidase (GPx) (A), glutathione Stransferase (GST) (B), catalase (CAT) (C) and lactate dehydrogenase (LDH) (D) in zebrafish larvae exposed to increasing concentrations of 2,4-D for 48 h. Results are expressed as mean $\pm$ standard deviation. Different letters (a, b, c and d) mean statistical difference between groups. The data were analyzed by one-way ANOVA followed by Tukey's post-hoc test, with different letters indicating significant difference ($p < 0.05$).

Figure 4. Enzymatic activity of alanine aminotransferase (ALT) (A), aspartate aminotransferase (AST) (B) and alkaline phosphatase (ALP) (C) of zebrafish larvae exposed to different concentrations of 2,4-D for 48 h. Results are expressed as mean $\pm$ standard deviation. Different letters (a, b and c) mean statistical difference between groups. The data were analyzed by one-way ANOVA followed by Tukey's post-hoc test, with different letters indicating significant difference ($p < 0.05$).

Figure 5. Histological images of zebrafish liver (Harry's hematoxylin-eosin staining, bar = 20 μ m for all images). (A) Control group: Round hepatocytes with central nucleus and well-defined cell boundaries (arrow heads). Cells were juxtaposed in the tissue with homogeneous cytosol. (B) Treated group with 5 mg/L of 2,4-Dichlorophenoxyacetic acid: Hepatocytes showing cytosol with heterogeneous eosinophilic content (*) and presence of vacuoles (arrows). Nucleus trended towards to periphery (dashed arrows). (C) and (D). Treated group with 10 mg/L of 2,4-Dichlorophenoxyacetic acid: Hepatocytes lost cell boundaries, and cytosol was disorganized (circled areas). Vacuolization was also observed (arrows). Ys: Yolk sac. g: gut. L: liver

Figure 1.

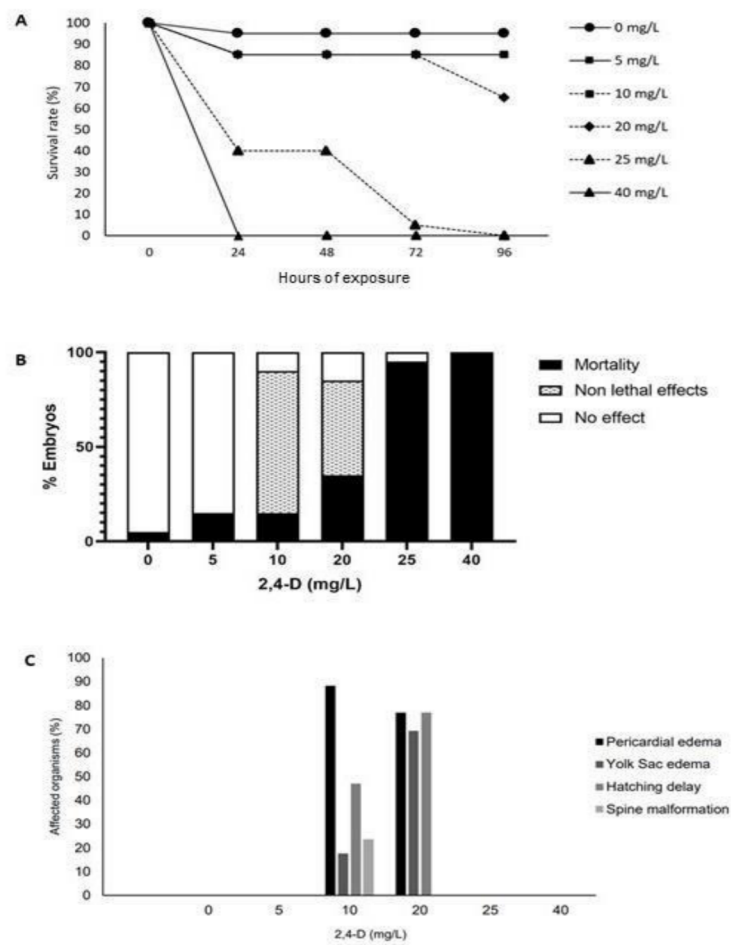


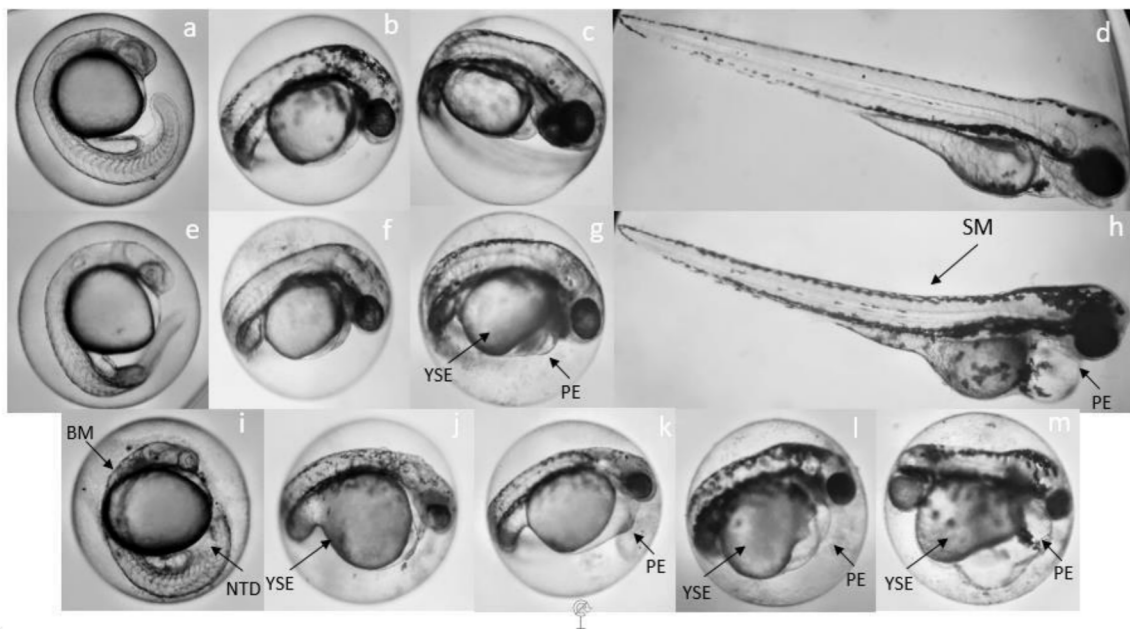
Figure 2.

Figure 3.

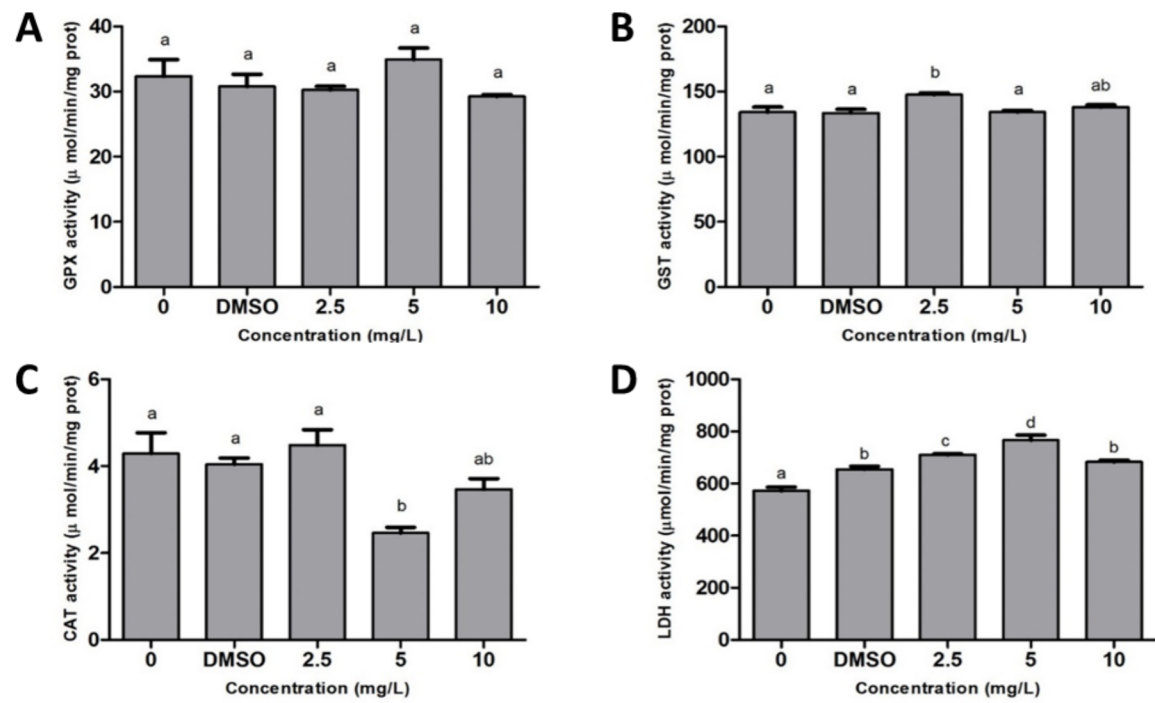


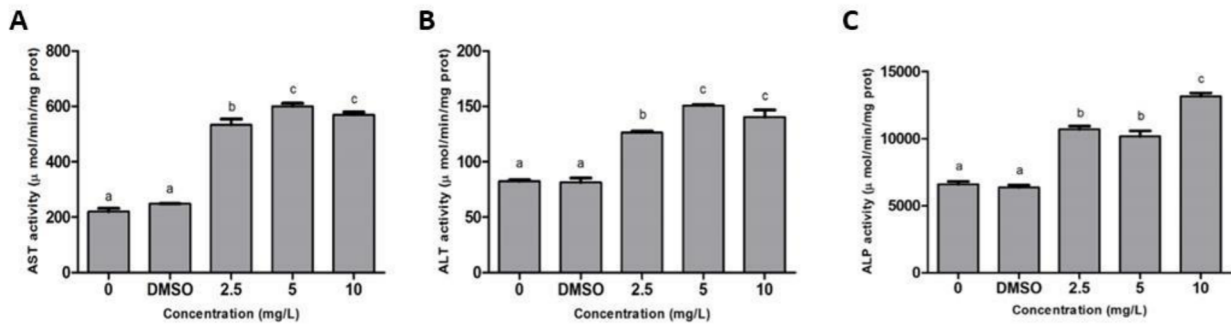
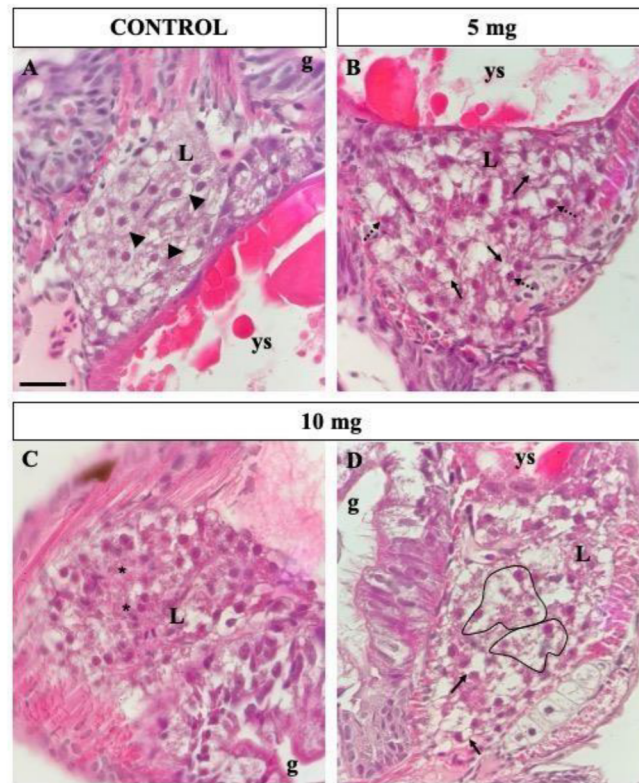
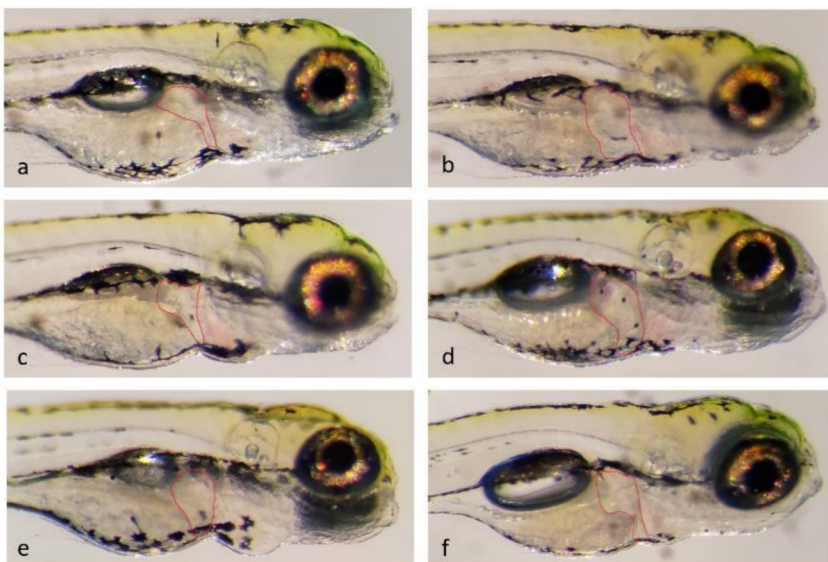
Figure 4.

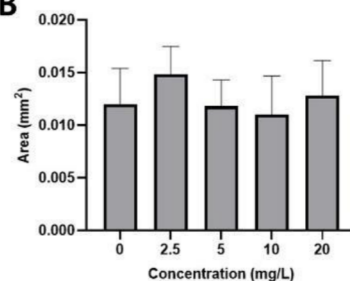
Figure 5.

Supplementary Figure 1. (A) Morphological aspects of the livers of zebrafish larvae with 7 dpf. (a) and (b) are control organisms exposed for 48 hours only in the E3 medium. (c), (d), (e) and (f) are test organisms exposed for 48 h at 20, 10, 5 and 2.5 mg / L of 2,4D. (B) and (C) present the area and average gray scale value, respectively, of the liver. No significant difference ($p < 0.05$) was detected after analyzing the data by one-way ANOVA followed by Tukey's post-hoc test or Kruskal-Wallis test for heterogeneous data.

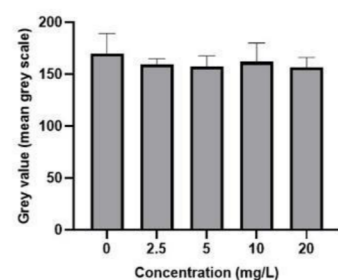
A



B



C



4. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Este estudo mostrou que a exposição aguda ao 2,4-D é capaz de causar impactos negativos sobre a taxa de sobrevivência e desenvolvimento dos estágios iniciais da vida do zebrafish, como evidenciado pela presença de alterações morfológicas como edema de saco vitelínico e de pericárdio em embriões e larvas. Além disso, através da análise de parâmetros bioquímicos, foi possível observar que a exposição a concentrações subletais do 2,4-D promoveram uma alteração no perfil de resposta antioxidante e aumentou de maneira expressiva a atividade de enzimas biomarcadoras de lesão hepatocelular, sugerindo que o estresse oxidativo e metabólico pode estar envolvido com danos causados ao tecido hepático de larvas de zebrafish.

Portanto, o presente estudo contribui para o conhecimento acerca dos mecanismos de toxicidade de um herbicida amplamente utilizado no mundo e reforçando a necessidade de reavaliação de sua classificação toxicológica e necessidade de monitoramento dos seus efeitos em organismos não alvo.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADATTO, I.; LAWRENCE, C.; THOMPSON, M.; ZON, L. I. A new system for the rapid collection of large numbers of developmentally staged zebrafish embryos. **Plos One**. v. 6, 2011.

ARYA, D. S.; ARORA, S.; MALIK, S.; et al. Effect of *Piper betle* on cardiac function, marker enzymes, and oxidative stress in isoproterenol-induced cardiotoxicity in rats. **Toxicol Mech Methods**. v. 20, p. 564–571, 2010.

ASSOCIAÇÃO DOS ANALISTAS E PROFISSIONAIS DE INVESTIMENTO DO MERCADO DE CAPITAIS (APIMEC). 2015. Disponível em:<http://www.apimec.com.br/apimecNE/show.aspx?id_canal=2457&id_materia=34447>. Acesso em: 10/12/2019.

BAMBINO, K.; CHU, J.; MORRISON, J. Hepatotoxicity in Zebrafish Larvae. **Methods in Molecular Biology**. v. 1965, p. 129–138, 2019.

BAMBINO, K.; CHU, J. Zebrafish in Toxicology and Environmental Health. **Current Topics in Developmental Biology**, [s. l.], v. 124, p. 331–367, 2017.

BRASIL. Decreto Federal nº 4.074, de 044 de janeiro de 2002. Regulamenta a Lei no 7.802, de 11 de julho de 1989. Brasília: **Diário Oficial da União**. Publicado no D.O.U. de 08 de janeiro de 2002. Disponível em:<http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/decreto/2002/d4074.htm>. Acesso em: 24 de março de 2018.

BRAIBANTE.E.F.; ZAPPE, J.A. A química dos agrotóxicos. **Revista Química Nova na Escola**. v. 34, n. 1, p. 10-15, 2012. Disponível em:<http://qnesc.sbq.org.br/online/qnesc34_1/03-QS-02-11.pdf>. Acesso em: 24 de março de 2018.

BRASIL (1996) Portaria Normativa Ibama nº 84, de 15 de outubro de 1996. Estabelecer procedimentos a serem adotados junto ao Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis - IBAMA, para efeito de registro e avaliação do potencial de periculosidade ambiental - (ppa) de agrotóxicos, seus componentes e afins. **Diário Oficial da União**, Edição nº 203, Seção 1, Brasília, DF 18 out. 1996. Disponível em:<http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/mma_ibama/1996/prt0084_15_10_1996.html>. Acesso em: 24 de março de 2018

BESTER, A. U.; MELLO, O. B.; MELLO, M. B.; CARVALHO, N. L.; PEREIRA, E. P.; LUCCHESI, O. A. The effects of 2,4-D, Acefato, and tebuconazol molecules on the environment and non target organisms. **Rev. Monogr. Ambient. Santa Maria**, v. 19, 2020.

BHATTACHARYA, S.; ZHANG, Q.; CARMICHAEL, P. L.; BOEKELHEIDE, K.; ANDERSEN, M. E. Toxicity Testing in the 21st Century: Defining New Risk Assessment Approaches Based on Perturbation of Intracellular Toxicity Pathways. **PLoS One**, e20887, 2011.

CABRAL, G. Pet Química. Classificação química dos agrotóxicos. 2019. Disponível em:<<http://www.petquimica.ufc.br/classificacao-quimica-dos-agrotoxicos/>>. Acesso em: 19 de dezembro de 2020.

CARNEIRO, F. F.; PIGNATI, W.; RIGOTTO, R. M.; AUGUSTO, L. G. S.; RIZOLLO, A.; MULLER, N. M. Dossiê ABRASCO: um alerta sobre os impactos dos agrotóxicos na saúde 1ª Parte. Rio de Janeiro: **ABRASCO**; 2012.

CARVALHO, F. Pesticides, environment, and food safety. **Food and Energy Security**. v. 6. p. 48-60, 2017.

CONCEIÇÃO, M. R. Trabalho, Meio Ambiente e Agricultura no Brasil: Um estudo do impacto dos agrotóxicos na saúde do trabalhador rural. p. 294-309, 2015. Disponível em:<https://www.researchgate.net/publication/280075088_TRABALHO_MEIO_AMBIENTE_E_AGRICULTURA_NO_BRASIL_um_estudo_do_impacto_dos_agrotoxicos_na_saude_do_trabalhador_rural>. Acesso em: 09 de março de 2019.

COSTA, L. The neurotoxicity of organochlorine and pyrethroid pesticides. **Handbook of Clinical Neurology**. v. 131, p. 135-148, 2015.

CONSELHO REGIONAL DE ENGENHARIA E AGRONOMIA DA PARAÍBA (CREA-PB). Denúncia resulta em operação relâmpago do CREA-PB na zona rural. 2016. Disponível em:< <https://creapb.org.br/noticias/denuncia-resulta-em-operacaorelampago-do-crea-pb-na-zona-rural/>>. Acesso em: 15/05/2019.

DAKHAKHNI, T. H.; RAOUF, G. A.; QUSTI, S. Y. Evaluation of the toxic effect of the herbicide 2, 4-D on rat hepatocytes: an FT-IR spectroscopic study. **European Biophysics Journal**, v. 45, n. 4, p. 311–320, 2016.

DANIEL, C. Overview of ALT and AST liver enzymes. Verywell health. 2019. Disponível em:< <https://www.verywellhealth.com/liver-enzymes-1759916>>. Acesso em: 02/8/2019.

D’COSTA, A.; SHEPHERD, I. T. Zebrafish development and genetics: introducing undergraduates to developmental biology and genetics in a large introductory laboratory class. **Zebrafish**. v. 6, n. 2, p. 168-177. 2009.

DERKSEN, B. Wikipedia. Cipermetrina. 2007. Disponível em:<<https://pt.wikipedia.org/wiki/Cipermetrina#/media/Ficheiro:Alphacypermethrin.svg>>. Acesso em: 19 de dezembro de 2020.

DEHNERT, G.; KARASOV, W.; WOLMAN, M. 2,4-Dichlorophenoxyacetic acid containing herbicide impairs essential visually guided behaviors of larval fish. **Aquatic Toxicology**. v. 209, p. 1-12, 2019.

DIEKMANN, H.; HILL, A. ADMETox in zebrafish. **Drug Discovery Today: Disease Models**. v. 10, p. 31-35, 2013.

DOMINGUES, I.; GRAVATO, C. Oxidative Stress Assessment in Zebrafish Larvae. **Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)**, [s. l.], v. 1797, p. 477–486, 2018.

G1 PARAÍBA. Produtores de abacaxi de Sapé, na Paraíba, tem boa colheita este ano. 2014. Disponível em:< <http://g1.globo.com/pb/paraiba/noticia/2014/10/produtores-deabacaxi-de-sape-na-paraiba-tem-boa-colheita-este-ano.html>>. Acesso em: 12 de abril de 2019.

G1 RIO GRANDE DO SUL. Uso do herbicida 2,4-D é suspenso até o fim do ano pela secretaria da agricultura do RS. 2019. Disponível em: < <https://g1.globo.com/rs/riogrande-do-sul/noticia/2019/12/03/uso-do-herbicida-24-d-e-suspenso-ate-o-fim-do-anopela-secretaria-da-agricultura-do-rs.ghtml> >. Acesso em: 01 de março de 2020.

GAAIED, S.; OLIVEIRA, M.; LE B. F.; CACHOT, J.; BANNI, M. Gene expression patterns and related enzymatic activities of detoxification and oxidative stress systems in zebrafish larvae exposed to the 2,4-Dichlorophenoxyacetic acid herbicide. **Chemosphere**. v. 224. p. 289297, 2019.

GONÇALVES, I. F. S.; SOUZA, T. M.; VIEIRA, L. R.; MARCHI, F. C.; NASCIMENTO, A. P.; FARIAS, D. F. Toxicity testing of pesticides in zebrafish – a systematic review on chemicals and associated toxicological endpoints. **Environ Sci Pollut Res**. v. 27, p. 10185-10204, 2020.

HABIG, W. H.; JAKOBY, W.B. Assays for differentiation of glutathione S-Transferases. **Methods in enzymology**. v. 77, p. 398-405, 1981.

HE, J. H.; GUO, S. Y.; ZHU, F.; ZHU, J. J.; CHEN, Y. X.; HUANG, C. J.; GAO, J. D. Q. X.; XUAN, Y. X.; LI, C. Q. A zebrafish phenotypic assay for assessing drug-induced hepatotoxicity. **Journal of pharmacological and toxicological methods**. v. 67, p. 2532, 2012.

HOWE, K.; MATTHEW, D. C. et al. The zebrafish reference genome sequence and its relationship to the human genome. **Nature**, v. 496, p. 498–503, 2013.

IBAMA – INSTITUTO BRASILEIRO DO MEIO AMBIENTE E DOS RECURSOS NATURAIS RENOVÁVEIS. 2017. Relatórios de comercialização de agrotóxicos. Disponível em: < <http://www.ibama.gov.br/agrotoxicos/> >. Acesso em: 12 Set 2018.

IBGE – INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. 2019. Produção agrícola municipal. Disponível em: < <https://sidra.ibge.gov.br/Tabela/1612> >. Acesso em 10 de fevereiro de 2021.

INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER. Iarc monographs on the evaluation of carcinogenic risks to human. 2018. Disponível em: <https://monographs.iarc.fr/wp-content/uploads/2018/07/mono113.pdf>. Acesso em : 11 de março de 2019

ISLAM, F.; WANG, J.; FAROOQ, M. A.; KHAN, M. S. S.; XU, L.; ZHU, J.; ZHAO, M.; MUÑOS, S.; & LI, Q.; ZHOU, W. Potential impact of the herbicide 2,4dichlorophenoxyacetic acid on human and ecosystems. **Environment international**. v. 111, p. 332-351, 2017.

KIETZMANN, T. Metabolic zonation of the liver: The oxygen gradient revisited. **Redox Biol**. v. 11, p. 622-630. 2017.

KIM, K. H.; KABIR, E.; JAHAN, S. A. Exposure to pesticides and the associated human health effects. **Sci Total Environ**. v. 575, p. 525-535, 2017.

KU, B.; CHO, S.; YUM, J. Metabolic Adjustments of Lactate Dehydrogenase Isozymes to the Environmental Temperature in Bluegill (*Lepomis macrochirus*). **Journal of Life Science**. v. 26, p. 1105-1112, 2016.

LAZZERI, T. Agrotóxicos: Brasil libera quantidade até 5.000 vezes maior do que Europa. Repórter Brasil. 27 de novembro de 2017. Disponível em: <<https://reporterbrasil.org.br/2017/11/agrotoxicos-alimentos-brasil-estudo/>>. Acesso em: 01/05/2019.

LEI FEDERAL Nº 7.802 DE 11 DE JULHO DE 1989. Dispõe sobre a pesquisa, a experimentação, a produção, a embalagem e rotulagem, o transporte, o armazenamento, a comercialização, a propaganda comercial, a utilização, a importação, a exportação, o destino final dos resíduos e embalagens, o registro, a classificação, o controle, a inspeção e a fiscalização de agrotóxicos, seus componentes e afins. Disponível em: <http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/Leis/L7802.htm>. Acesso em: 19 abr. 2019.

LI, K. WU, J.Q.; JIANG, L. L.; SHEN, L. Z.; LI, J. Y.; HE, Z. H.; WEI, P.; LY, Z.; HE, M. F. Developmental toxicity of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid in zebrafish embryos. **Chemosphere**, v. 171, p. 40–48, 2017.

LIESCHKE, G. J.; CURRIE, P. D. Animal models of human disease: zebrafish swim into view. *Nat Rev Genet* 8:353-67. **Nature reviews. Genetics**. v. 8, p. 353-367. 2007.

LOPES, C. V. A., ALBUQUERQUE, G. S. C. Agrochemicals and their impacts on human and environmental health: a systematic review. **Saúde Debate**. v. 42. n. 117. p. 518-534. Rio de Janeiro. 2018.

MAHARAJAN, K.; MUTHULAKSHMI, S.; NATARAJ, B.; RAMESH, M.; KADIRVELU, K. Toxicity assessment of pyriproxyfen in vertebrate model zebrafish embryos (*Danio rerio*): A multi biomarker study. **Aquat Toxicol**. v. 196, p.132-145, 2018.

I.; IMADI, S.R.; SHAZADI, K.; GUL, A.; HAKEEM, K.R. Effects of pesticides on Environment. In: Hakeem K., Akhtar M., Abdullah S. (eds) *Plant, Soil and* . **Springer**, Cham, 2017.

MAHMOOD,

Microbes

MADHEVAN, B.; SNYDER, R. D.; WATERS, M. D.; BENZ, R. D.; KEMPER, R. A.; TICE, R. R.; RICHARD, A. M. Genetic toxicology in the 21st century: reflections and future directions. **Environmental and Molecular Mutagenesis**. p. 339–354, 2011.

MATVIISHYN, T. M.; KUBRAK, O. I.; HUSAK, V. V.; STOREY, K. B.; LUSHCHAK, V. I. Tissue-specific induction of oxidative stress in goldfish by 2,4dichlorophenoxyacetic acid: Mild in brain and moderate in liver and kidney. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 37, n. 2, p. 861–869, 2014.

MEYERS, J. Zebrafish: Development of a Vertebrate Model Organism: Zebrafish : Development of a Vertebrate Model Organism. **Current Protocols Essential Laboratory Techniques**. v. 36, p. 19, 2018.

MODEL N. S.; FAVRETO R.; RODRIGUES A. E. C. Efeito de tratamentos de controle de plantas daninhas sobre produtividade, sanidade e qualidade de abacaxi. **Pesquisa Agropecuária Gaúcha**, v. 16, p. 51-58, 2010.

MOKWATSI, G. G.; SCHUTTE, A. E.; KRUGER, R. A biomarker of tissue damage, lactate dehydrogenase, is associated with fibulin-1 and oxidative stress in blacks: the SAfrEIC study. **Biomarkers**. v. 21, p. 48-55, 2016.

NANDI, A.; YAN, L. J.; JANA, C. K.; DAS, N. Role of Catalase in Oxidative Stress- and AgeAssociated Degenerative Diseases. **Oxid Med Cell Longev**. p. 1-19, 2019.

NRC- National Research Council. Toxicity Testing in the 21st Century: A Vision and a Strategy. Washington, DC: The National Academies Press, 2017. OECD. Test No. 236, "Fish Embryo Acute Toxicity (FET) Test," OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 2. Paris: OECD Publishing, 2013.

OLIVEIRA, J. Conceitos importantes no estudo do comportamento dos herbicidas no solo. **Boletim Informativo da Sociedade Brasileira de Ciência do Solo**. v. 27, p. 9-12, 2002.

OLSON, H.; BETTON, G.; ROBINSON, D.; THOMAS, K.; MONRO, A.; KOLAJA, G.; LILLY, P.; SANDERS, J.; SIPES, G.; BRACKEN, W.; DORATO, M.; VAN DEUN, K.; SMITH, P.; BERGER, B.; HELLER, A. Concordance of the toxicity of pharmaceuticals in humans and in animals. **Regulatory Toxicology Pharmacology**. p. 56-67, 2000.

ORGANIZAÇÃO PAN-AMERICANA DA SAÚDE (OPAS), ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE (OMS). **Manual de vigilância da saúde de populações expostas a agrotóxicos**. Brasília, DF, 1996. Disponível em: <<http://portalarquivos2.saude.gov.br/images/pdf/2015/julho/08/1-Manual-de-Vigil-ncia-daSa--de-de-Popula---es-Expostas-a-Agrot--xicos.pdf>>. Acesso em: 1 abr. 2018.

PANDIT, A.; SACHDEVA, T.; BAFNA, P. Drug-Induced Hepatotoxicity : A Review. **Journal of Applied Pharmaceutical Science**. v. 02, n. 05, p. 233-243, 2012.

PAVANI, N. D. Pesticidas: Uma revisão dos aspectos que envolvem esses compostos. 2016. 64 f. Trabalho de conclusão de curso- Curso de licenciatura plena em química, Universidade Estadual Paulista. Bauru. 2016.

PERES, F.; MOREIRA, J. C. Saúde e ambiente em sua relação com o consumo de agrotóxicos em um pólo agrícola do Estado do Rio de Janeiro, Brasil Health, environment, and pesticide use in a farming area in Rio de Janeiro State, Brazil. **Cad. Saúde Pública**, v. 23, n. 4, p. 612-621, 2007.

PEDLOWSKI, M. A.; CANELA, M. C.; TERRA, M. A. C.; FARIA, R. A. M. Modes of pesticides utilization by Brazilian smallholders and their implications for human health and the environment. **Crop Protection**, v. 31, p. 113-118, 2012.

RUIZ DE ARCAUTE, C.; SOLONESKI, S.; LARRAMENDY, M. L. Toxic and genotoxic effects of the 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D)-based herbicide on the

Neotropical fish *Cnesterodon decemmaculatus*. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 128, p. 222–229, 2016.

RIGOTTO, R. M. et al. Pesticide use in Brazil and problems for public health. **Cadernos de Saúde Pública**. p. 1360–1362, 2014.

RODRIGUES, N. R.; ANDRIETTA, M. G. S. Biodegradação do diclosulam por bactérias isoladas de solos cultivados com soja. **Planta Daninha**. v. 28, p. 393–400, 2010.

RIVERO-WENDT, C. L. G. et al.. Steroid androgen 17 α -methyltestosterone induces malformations and biochemical alterations in zebrafish embryos. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 44, p. 107–113, 2016.

SHARMA, A.; KUMAR, V.; SHAHZAD, B.; TANVEER, M.; SIDHU, G. P. S.; HANDA, N.; KOHLI, S.; YADAV, P.; BALI, A.; PARIHAR, R.; DAR, O.; SINGH, K.; JASROTIA, S.; BAKSHI, P.; RAMAKRISHNAN, M.; KUMAR, S.; BHARDWAJ, R.; THUKRAL, A. Worldwide pesticide usage and its impacts on ecosystem. **SN Applied Sciences**. v. 1. p. 1446–1485, 2019.

SIGMA ALDRICH. S/D. Disponível em:<
https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/d7299?lang=pt®ion=BR&gclid=CjwKCAiA_eb-BRB2EiwAGBnXXshMPwVFxM2FLx7n911Z5X95UY_Y9_Ge0swfzMq43IFjfa4srMaRVhoCu4UQAvD_BwE>. Acesso em: 10 de novembro de 2020.

SOUZA, M. V. Resíduos de agrotóxicos ditiocarbamatos e organofosforados em alimentos consumidos no restaurante universitário-UnB: avaliação da exposição humana. Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde). Universidade de Brasília, Brasília, 2006.

TAN, Z.; ZHOU, J.; CHEN, H.; ZOU, Q.; WENG, S.; LUO, T.; TANG, Y. Toxic effects of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid on human sperm function &in vitro &. **The Journal of Toxicological Sciences**, v. 41, n. 4, p. 543–549, 2016.

TAVARES, B.; LOPES, S. The Importance of Zebrafish in Biomedical Research. **Acta medica portuguesa**. p. 26, v. 583–592, 2013.

TAYEB, W.; NAKBI, A.; TRABELSI, M.; ATTIA, N.; MILED, A.; HAMMAMI, M. Hepatotoxicity induced by sub-acute exposure of rats to 2,4-Dichlorophenoxyacetic acid based herbicide “ Désormone lourde”. **Journal of Hazardous Materials**, v. 180, n. 1–3, p. 225–233, 2010.

TELLI, E. M. R. P., FRIGERI, M., MELLO, S. R. Evaluation of hepatic enzyme activity in dependent, ex-dependent and non-users of ethanol. **Brazilian Journal of Clinical Analyses**. v. 48. n. 3. p. 245– 252. 2016.

THORSTENSEN, K. L. Pesticides induce oxidative stress in zebrafish embryo. Dissertação de Mestrado. The University of Bergen. 2014.

TIWARI, B.; KHARWAR, S. TIWARI, D. N. Pesticides and Rice Agriculture. **Cyanobacteria from basic science basic applications**. p. 303–325, doi:10.1016/B9780-12-814667-5.000155, 2019.

TROUDI, A.; SOUDANI, N.; MAHJOUBI, S. A.; BEM, A. I.; ZEGHAL, N. 2,4-

Dichlorophenoxyacetic acid effects on nephrotoxicity in rats during late pregnancy and early postnatal periods. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 74, n. 8, p. 2316–2323, 2011.

UFSM – UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA. 2019. UFSM inaugura novo prédio para análise de contaminantes em alimentos e no meio ambiente. Disponível em: <<https://www.ufsm.br/2019/11/12/ufsm-inaugura-novo-predio-para-analise-decontaminantes-em-alimentos-e-no-meio-ambiente/>>. Acesso em: 10 de fevereiro de 2021.

VASSAULT, A. Lactate dehydrogenase, UV-method with pyruvate and NADH. **Methods in enzymatic analysis**, v. 3, p. 118, 1983.

VELKI, M.; MEYER, A. H.; SEILER, T. B.; HOLLERT, H. Enzymatic activity and gene expression changes in zebrafish embryos and larvae exposed to pesticides diazinon and diuron. **Aquatic Toxicology**, v. 193, p. 187-200, 2017.

VILARINHO, F. Pesticidas. 2011. Disponível em: http://repositorio.insa.pt/bitstream/10400.18/772/1/Pesticidas_2011.pdf. Acesso em: 12 de novembro de 2015.

VINHA, M. B.; PINTO, C. L. O.; PINTO, C. M. F.; SOUZA, C. F.; SOUZA, M. R. M.; OLIVEIRA, L. L. Impactos do uso indiscriminado de agrotóxicos em frutas e hortaliças. **Revista Brasileira de Agropecuária Sustentável**, v. 3, n. 1, 2013.

Wendel, A. Glutathione peroxidase. In: Jacoby WB, editor. **Enzymatic basis of detoxification**. v. 1. New York: Academic Press. p. 333–353, 1980.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **The WHO Recommended Classification of Pesticides by Hazard and Guidelines to Classification 2009**. Disponível em: <http://www.who.int/ipcs/publications/pesticides_hazard_2009.pdf>. Acesso em: 11 de março de 2019.

Yadav, I.; Devi, N. Pesticides Classification and Its Impact on Human and Environment. **Environ. Sci. & Engg.** v. 6, p. 140-158, 2017

ZHANG, D.; WU, Y.; YUAN, Y.; LIU, W.; KUANG, H.; YANG, J.; YANG, B.; WU, L.; ZOU, W.; XU, C. Exposure to 2,4-dichlorophenoxyacetic acid induces oxidative stress and apoptosis in mouse testis. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 141, p. 18–22, 2016.

ZHANG, Y.; HAN, L.; HE, Q.; CHEN, W.; SUN, C.; WANG, X.; CHEN, X.; WANG, R.; HSIAO, C.; LIU, K. Journal of Pharmacological and Toxicological Methods A rapid assessment for predicting drug-induced hepatotoxicity using zebra fi sh. **Journal of Pharmacological and Toxicological Methods**, v. 84, p. 102–110, 2017.

ANEXO I – Documentos de autorização da Comissão de Ética



Universidade
Federal da
Paraíba

Comissão de Ética no
Uso de Animais



CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "Avaliação dos impactos à vida aquática e à saúde humana de poluentes emergentes no Brasil: uso do peixe-zebra (*Danio rerio*) como sistema modelo", protocolada sob o CEUA nº 8881290419 (05/07/2019), sob a responsabilidade de **Davi Felipe Farias** e equipe; Igor Cauê Alves Araruna; Marília da Guia Flor da Silva; Marta Silva Muniz; Rafael Xavier Martins; Juliana Alves da Costa Ribeiro - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovada** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal da Paraíba (CEUA/UFPB) na reunião de 05/07/2019.

We certify that the proposal "Evaluation of the impacts to aquatic life and human health of emerging pollutants in Brazil: use of zebrafish (*Danio rerio*) as a model system", utilizing 444 Fishes (males and females), protocol number CEUA 8881290419 (05/07/2019), under the responsibility of **Davi Felipe Farias** and team; Igor Cauê Alves Araruna; Marília da Guia Flor da Silva; Marta Silva Muniz; Rafael Xavier Martins; Juliana Alves da Costa Ribeiro - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **approved** by the Ethic Committee on Animal Use of the Federal University of Paraíba (CEUA/UFPB) in the meeting of 07/05/2019.

Finalidade da Proposta: **Pesquisa (Acadêmica)**

Vigência da Proposta: de 08/2019 a 07/2021

Área: **Ciências Biológicas**

Origem: **Unidade de Produção de Organismos Modelo Não Convencionais (UnPOM)**

Espécie: **Peixes**

sexo: **Machos e fêmeas**

idade: **1 a 3 horas**

Nº: **444**

Linhagem: **Danio rerio**

Peso: **0 a 0 g**

Local do experimento: Todos os experimentos serão realizados no Laboratório de Avaliação de Risco de Novas Tecnologias que divide infraestrutura com a Unidade de Produção de Organismos Modelo Não Convencionais, Depto. de Biologia Molecular, Campus I, UFPB.

João Pessoa, 02 de fevereiro de 2021

Prof. Dra. Jailane de Souza Aquino
Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade Federal da Paraíba

Prof. Dr. Carlos Augusto Alanis Clemente
Vice-Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade Federal da Paraíba



Universidade
Federal da
Paraíba

Comissão de Ética no
Uso de Animais



João Pessoa, 16 de julho de 2020
CEUA N 8881290419

Ilmo(a). Sr(a).

Responsável: Davi Felipe Farias
Área: Ciências Biológicas

Título da proposta: "Avaliação dos impactos à vida aquática e à saúde humana de poluentes emergentes no Brasil: uso do peixe-zebra (*Danio rerio*) como sistema modelo".

Parecer Consubstanciado da Comissão de Ética no Uso de Animais UFPA (nº 002/204)

A Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal da Paraíba, no cumprimento das suas atribuições, analisou e **APROVOU** a Emenda (versão de 08/maio/2020) da proposta acima referenciada.

Resumo apresentado pelo pesquisador: "RESPOSTA AO PARECER CONSUBSTANCIADO PROCESSO 8881290419 - EMENDA A solicitação de emenda foi ajustada de acordo com as recomendações do revisor. A parte 1 foi excluída (inclusão de novas amostras), deixando apenas a parte 2 que trata da inclusão de testes adicionais com as amostras previamente aprovadas. Esta emenda justifica-se pela necessidade de darmos continuidade ao presente projeto a partir da realização de alguns ensaios adicionais. Preliminarmente, obtivemos dados sobre a toxicidade dos contaminantes ambientais moxidectina (antiparasitário de uso veterinário) e o 2,4-D (herbicida). A moxidectina apresentou concentração letal média (CL50) > 20 mg/L (a concentração mais elevada testada). Nenhum sinal de letalidade foi observado, mas 100% dos embriões apresentaram [atraso da eclosão]. Esse efeito demonstra uma propensão da moxidectina à neurotoxicidade. Para o 2,4-D foi possível confirmar a alta toxicidade desse herbicida contra embriões e larvas de peixe-zebra a partir do cálculo de uma CL50 de 15,77 mg/L. Além disso, as enzimas biomarcadoras analisadas lactato desidrogenase e glutatona-S-transferase mostraram-se alteradas. Portanto, propomos a realização de novas exposições à moxidectina a fim de avaliarmos os impactos do efeito adverso [atraso da eclosão] sobre o desenvolvimento larval de peixe-zebra, bem como a partir da execução de ensaios comportamentais para confirmarmos os efeitos neurotóxicos hipotetizados anteriormente. Por sua vez, a realização de um novo ensaio de exposição de larvas de peixe-zebra ao 2,4-D seguido de mensuração da formação de espécies reativas de oxigênio por microscopia de fluorescência pode nos fornecer novas informações sobre os mecanismos de toxicidade desse contaminante. Para tanto, os seguintes testes e as respectivas quantidades de embriões necessárias estão descritos resumidamente a seguir: (1) Avaliação dos efeitos da moxidectina sobre a eclosão de larvas de peixe-zebra: - 5 concentrações diferentes x 24 embriões (nº embriões/concentração/placa) = 120; - 1 grupo controle x 24 embriões = 24; Subtotal = 144 embriões. (2) Análises comportamentais em larvas de peixe-zebra tratadas com moxidectina: - Teste do campo aberto: 3 grupos experimentais x 20 embriões (nº larvas/grupo) = 60; - Teste do tanque novo: 3 grupos experimentais x 20 embriões (nº larvas/grupo) = 60; - Teste do objeto novo: 3 grupos experimentais x 20 embriões (nº larvas/grupo) = 60; - Teste de interação social: 3 grupos experimentais x 20 embriões (nº larvas/grupo) = 60; - Subtotal = 240 embriões. (3) Avaliação da produção de espécies reativas de oxigênio em larvas expostas a 2,4-D: - 3 concentrações diferentes x 5 embriões (nº embriões/concentração/poço) = 15; - 3 controles x 5 embriões (nº embriões/concentração/poço) = 15; - Subtotal = 30 embriões. Total de embriões (A + B + C) = 144 + 240 + 30 = 414 embriões. Esta solicitação de emenda pode ser vista em mais detalhes no arquivo em anexo.".

Comentário da CEUA: "PARECER CONSUBSTANCIADO PROCESSO 8881290419 - EMENDA O pesquisador acatou as recomendações da CEUA e removeu a Parte 1 da presente emenda, que tratava da inclusão de cinco novas amostras a serem testadas, permanecendo na emenda apenas a Parte 2, a saber, a realização de testes adicionais com as amostras originalmente propostas para o estudo. O pesquisador apresentou a justificativa para a emenda, que baseia-se no fato de que os dados obtidos nos experimentos realizados inicialmente devem ser complementados com experimentos adicionais para permitir uma conclusão dos efeitos das amostras. Ainda, os grupos experimentais propostos foram novamente descritos e o N amostral justificado com referências bibliográficas apropriadas. Considerando o exposto, somos de parecer favorável à aprovação da emenda solicitada. A Comissão".

Jailane de Souza Aquino

Prof.ª Dra. Jailane de Souza Aquino
Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade Federal da Paraíba

Carlos A. A. Clemente

Prof. Dr. Carlos Augusto Alanis Clemente
Vice-Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade Federal da Paraíba