

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
CENTRO DE AQUICULTURA DA UNESP

**ALTERAÇÕES HEMATOLÓGICAS E HORMONAIS EM FÊMEAS DE
JUNDIÁ (*Rhamdia quelen*) PROVOCADAS POR ESTRESSE MECÂNICO E
CONTAMINAÇÃO DA ÁGUA POR HERBICIDA A BASE DE GLIFOSATO**

Auren Benck Soso

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Maria José Tavares Ranzani-Paiva

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Aquicultura, do Centro de Aquicultura da UNESP, Campus de Jaboticabal, como parte das exigências para obtenção do título de MESTRE em AQUICULTURA, Área de concentração em Aquicultura de Águas Continentais.

Jaboticabal
São Paulo – Brasil
2006

S715a Soso, Auren Benck
Alterações hematológicas e hormonais em fêmeas de jundiá
(*Rhamdia quelen*) provocadas por estresse mecânico e contaminação
da água por herbicida a base de glifosato / Auren Benck Soso. –
Jaboticabal, 2006
xiii, 71 f. : il. ; 28 cm

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Centro
de Aquicultura, 2006
Orientador: Maria José Tavares Ranzani-Piva
Banca examinadora: Carlos Massatoshi Ishikawa, Elisabeth
Criscuolo Urbinati
Bibliografia

1. *Rhamdia quelen*. 2. Hematologia. 3. Estresse e Glifosato. I.
Título. II. Jaboticabal - Centro de Aquicultura.

CDU 639.31

AGRADECIMENTOS

Primeiramente gostaria de agradecer a Deus, pela vida que é o início de tudo e pelas oportunidades concedidas, para que, desta maneira, eu consiga evoluir como pessoa e como espírito.

Agradeço ao CNPq pela bolsa de estudo, que possibilitou a continuidade dos meus sonhos e objetivos. A CSI-EMBRAPA-PRODETAB 0149/2001/2, por financiar o projeto de pesquisa.

Ao CAUNESP, pela oportunidade de dar continuação aos estudos, contribuindo para o meu crescimento profissional.

À Universidade de Passo Fundo, por abrir novamente suas portas e, desta maneira, contribuindo para a realização de mais uma etapa no meu crescimento profissional.

À Prof^ª. Dr^ª. Maria José Tavares Ranzani-Paiva (Mãezé), obrigada pela confiança depositada em mim, agradeço a hospitalidade, a paciência e acima de tudo, os ensinamentos. SOU TUA FÃ!

Ao Prof. Dr. Leonardo Barcellos, meu co-orientador neste trabalho, agradeço o apoio, os puxões de orelha quando necessário e também os ensinamentos, tu és muito estimado por mim.

À Grande Amiga Tális, não importava quão ruim estava o tempo, nem as dificuldades enfrentadas, você estava sempre ali com as mãos estendidas para me auxiliar.

Ao Prof. Dr. Luiz Carlos Kreutz, pelo empréstimo do Laboratório de Imunologia e Virologia HV-UPF e pelas sugestões para a realização do experimento.

À Prof^a. M.Sc. Stella Valle, pelo empréstimo do Laboratório de Análises Clínicas do HV-UPF.

À Leonardo Bolognesi (Leopids), Marina (Loca Veia), Jovani (Jojô), Filipe (Fifi) e Alexandra (Lindauva), obrigada pelo auxílio na condução do experimento, pelas risadas, conversas, festas e também por alguns fiasquinhos em Laguna...

À Mari, Paulo e Dirceu, obrigada pela paciência e pela contribuição para a harmoniosa condução do experimento.

Aos funcionários do HV-UPF, em especial a Naiara, obrigada ela ajuda.

Aos amigos do CAUNESP e de Jaboticabal, que direta ou indiretamente me prestaram auxílio no período em que residi nesta cidade. Agradeço a confiança, a hospitalidade, as festas e em especial a amizade.

À Michele e ao Nhaka, pela paciência, pelo companheirismo, pela amizade, pela ajuda e pelas festas. Tudo isso foi muito importante durante o período que morei com vocês.

Agradeço aos gaúchos que residiam em Jaboticabal. Michele, Leonardo Cericato, Alex, Cristian e Adriane, Sandra e Fabiano. A convivência e a presença de vocês em nossas confraternizações minimizavam a saudade do nosso Rio Grande do Sul.

Agradeço a minha Família. Aos meus pais, agradeço a vida, a confiança, o amor, o carinho, os ensinamentos; aos irmãos agradeço pelas brigas, pelas risadas e pelos divertimentos; aos meus avós e nonos agradeço pelo exemplo de vida; aos tios e primos, agradeço o carinho. A todos vocês, agradeço por terem acreditado em mim, amo vocês.

À todos que contribuíram de alguma forma para o meu crescimento pessoal e profissional, meus sinceros agradecimentos.

ÍNDICE

INTRODUÇÃO GERAL	9
REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICAS	20
 CAPÍTULO 1 – ALTERAÇÕES HEMATOLÓGICAS EM FÊMEAS DE JUNDIÁ (<i>Rhamdia quelen</i>) PROVOCADAS POR ESTRESSE MECÂNICO E CONTAMINAÇÃO DA PAGUA POR HERBICIDA A BASE DE GLIFOSATO	
Resumo	26
Abstract	28
Introdução	30
Materiais e Métodos	32
Resultados e Discussão	35
Referência Bibliográficas	39
 CAPÍTULO 2 – VITELOGENESIS DISRUPTION IN RHAMDIA QUELEN CAUSED BY CHRONIC STRESSE BUT NOT BY EXPOSURE TO GLYPHOSATE-BASED: A FIELD CONDITIONS APPROACH	
Abstract	46
Introduction	47
Methods	50
Results	53
Discussion	55
References	65

ÍNDICE DE FIGURAS

CAPÍTULO 1

Figura 1: Número de eritrócitos ($10^4/\mu\text{L}$) de fêmeas de *Rhamdia quelen*, do grupo controle, do grupo exposto ao estresse e do grupo exposto ao glifosato..... 43

Figura 2: Taxa de hemoglobina (mg/dL) de fêmeas de *Rhamdia quelen*, do grupo controle, do grupo exposto ao estresse e do grupo exposto ao glifosato..... 43

Figura 3: Hematócrito (%) de fêmeas de *Rhamdia quelen*, do grupo controle, do grupo exposto ao estresse e do grupo exposto ao glifosato..... 44

Figura 4 : Volume Globular Médio (fl) de fêmeas de *Rhamdia quelen*, do grupo controle, do grupo exposto ao estresse e do grupo exposto ao glifosato..... 44

Figura 5: Hemoglobina Globular Média (pg) de fêmeas de *Rhamdia quelen*, do grupo controle, do grupo exposto ao estresse e do grupo exposto ao glifosato..... 45

Figura 6: Concentração de hemoglobina globular média (%) de fêmeas de *Rhamdia quelen*, do grupo controle, do grupo exposto ao estresse e do grupo exposto ao glifosato..... 45

CAPÍTULO 2

Figure 1. Serum levels (mean + SEM, n = 8) of cortisol (A), 17 β -estradiol (B) and testosterone (C) in Rhamdia quelen submitted to chronic stress or to chronic exposition to an glyphosate-based herbicide, and control group, at the 1st, 10th, 20th, 30th and 40th day after beginning of stress and herbicide exposure. Different capital letters within the same day indicates statistical difference between treatments in this specific day and different small letters within treatments indicates statistical differences between different days of experiment. Anova, followed by Tukey's multiple range test, (P<0,05)..... 62

ÍNDICES DE TABELAS

Table 1. Values (mean $\pm$ S.E.M.) of Gonado-Somatic index (GSI) and Liver Somatic Index (LSI) in percentile (%), in control, handling stressed, and glyphosate-based herbicide exposed groups, at the 0, 1st, 10th, 20th, 30th and 40th day of the experiment..... 63

Table 2. Females responsible to hormonal induction (%), mean number of oocytes stripped and mean number and % of swim-up fry transferred to larviculture ponds in control, chronic stressed and glyphosate based herbicide chronic exposed females..... 64

INTRODUÇÃO GERAL

Com o crescimento da aquicultura, está ocorrendo grande interesse, por parte dos produtores, em elucidar dúvidas sobre a espécie de peixe a ser escolhida e qual o melhor manejo visando otimizar os lucros.

Entre as espécies de peixes criadas no Brasil encontra-se o jundiá (*Rhamdia quelen*). Segundo RADÜNZ NETO (1981), esta espécie apresenta boa aceitação no mercado consumidor, alta potencialidade de produção em açudes e também alto potencial de comercialização, sendo por isso uma ótima opção para cultivo em viveiros.

O jundiá (*Rhamdia quelen*) é um peixe de hábitos noturnos, habita lugares calmos e profundos. Possui hábito alimentar omnívoro, com tendências a piscívoro. Quando adulto, pode atingir 50 cm de comprimento e cerca de 3 kg de peso vivo. Atinge a maturidade sexual logo no primeiro ano de vida e possui dois picos de reprodução ao ano (primavera e verão). É encontrado desde a Argentina até o sul do México. No Brasil, o jundiá está sendo bastante produzido nas regiões do sul do país, onde se tem obtido bons resultados com a reprodução induzida, com alta taxa de fecundação (GOMES *et al.*, 2000).

Apesar de todas as vantagens citadas acima para a produção do jundiá, muitos são os fatores que podem interferir no sucesso da criação. Um desses fatores são os agrotóxicos aplicados em lavouras, que podem alcançar os cursos d'água.

Com a utilização errônea desses defensivos agrícolas, os corpos d'água tornam-se, muitas vezes, recipientes intermediários ou finais dos agrotóxicos, e, desta maneira, contribui para o desequilíbrio da fauna e flora existentes nos cursos d'água, gerando grande risco de contaminação para o meio ambiente.

Em ambientes aquáticos degradados, em especial aqueles em que os contaminantes encontram-se em doses crônicas e subletais, as alterações na estrutura e função dos organismos ocorrem com maior intensidade do que as mortalidades em massa. Desta maneira, a análise dos distúrbios ocasionados no organismo dos peixes e outros seres que habitam esses locais, torna-se um método para a detecção dos efeitos dos poluentes nas águas (SOUZA *et al.*, 2004).

Um herbicida que está sendo muito utilizado atualmente nas lavouras, principalmente no cultivo da soja, é o glifosato. Segundo dados do Centro de Controle de Intoxicação da Unicamp, o mesmo tem efeito cumulativo e o seu grau de intoxicação depende do tempo de contato com o agente (IDEC, 2004).

O glifosato é um herbicida pós-emergente, pertencente ao grupo químico das glicinas, classificado como não-seletivo e de ação sistêmica. Apresenta largo espectro de ação, o que possibilita um excelente controle de plantas daninhas anuais ou perenes, tanto de folhas largas como estreitas (MONSANTO, 2006)

Segundo informações da Idec - Instituto Brasileiro de Defesa do Consumidor - (IDEC, 2004), o ROUNDUP® possui na sua composição um surfactante (tem por objetivo diminuir a tensão superficial e melhorar a área de contato com a planta) que é mais tóxico que o próprio glifosato, e sendo assim, a

combinação dos dois aumenta a toxicidade do produto. Neste experimento, será utilizado ROUNDUP® WG em pó molhável produzido pela Monsanto.

A principal rota de degradação do glifosato são os microrganismos de solo e água (por processos aeróbios e anaeróbios), que o decompõem em compostos naturais. Uma característica importante do glifosato é a sua capacidade de ser adsorvido pelas partículas de solo e permanecer inativo até sua completa degradação, sendo que sua meia-vida média é de 32 dias. Esse resultado foi obtido em 47 estudos conduzidos em campos agrícolas e áreas de reflorestamento em diferentes localidades geográficas (GIESY *et al.*, 2000)

Outro fator que pode influenciar negativamente a produção de peixes é o estresse. O estresse pode ser definido como a alteração da função normal do organismo frente a um distúrbio. Na aquicultura, qualquer prática de manejo já é um fator estressante, não esquecendo de mencionar os fatores relacionados com a qualidade de água, alimentação e também as variações ambientais (BARCELLOS *et al.*, 1997).

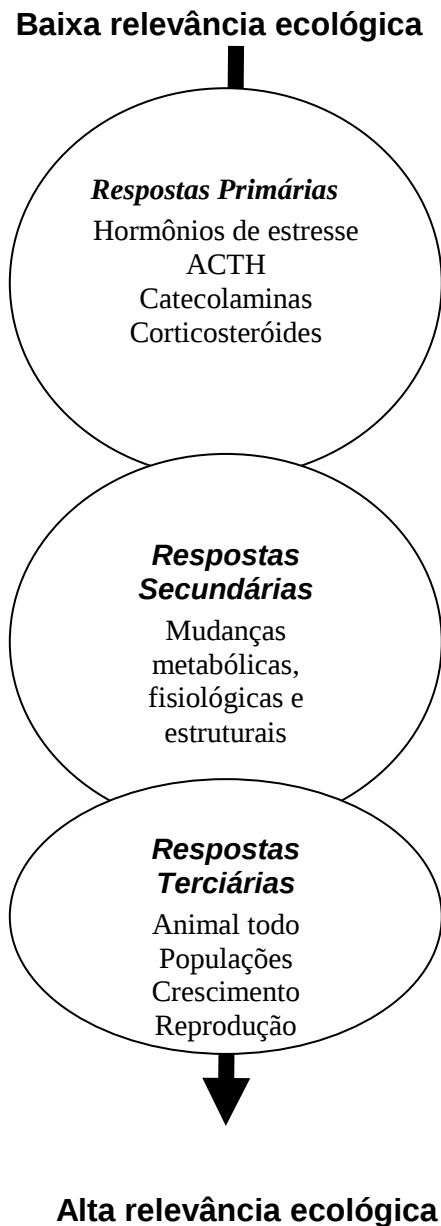
O organismo do peixe é capaz de responder fisiologicamente ao agente estressor para compensar o distúrbio que está ocorrendo. Porém, quando o estímulo estressor persiste e ultrapassa as capacidades fisiológicas de adaptação, ocorrerá a exaustão do sistema e incapacidade de responder ao estresse sofrido (SELYE, 1950).

Atualmente, tanto em ambientes naturais como em ambientes artificiais, os peixes vêm sendo expostos às mais variadas condições ambientais e também a inúmeros agentes estressores, e desta maneira,

acarretando efeitos negativos para a saúde, o desenvolvimento, a reprodução e a sobrevivência da espécie.

Os agentes estressores podem ser de origem química, biológica, física e estão quase sempre, no caso dos peixes, diretamente ligados ao manejo. Muitos peixes podem estar expostos a mais de um agente estressor (VAL *et al.*, 2004).

Ao se deparar com algum agente estressor ou com mudanças ambientais ou fisiológicas, o organismo do peixe é capaz de lançar mão de alguns ajustes biológicos para poder minimizar os efeitos advindo do estresse. Tais respostas podem ser primárias, secundárias ou terciárias (BARTON & IWANA, 1991). Esse conjunto de respostas apresenta uma graduação desde respostas de baixa relevância até respostas de alta relevância ecológica, conforme o que demonstra o esquema a baixo (VAL *et al.*, 2004):



Seqüência de respostas biológicas de peixes expostos a agentes estressores, com indicação da relevância biológica (Fonte: VAL *et al.*, 2004)

Ao perceber a presença do agente estressor, o organismo começa a promover uma série de adaptações para manter o equilíbrio do organismo. As respostas primárias são basicamente a liberação de hormônios para que se possa

acelerar alguns mecanismos de regulação, os chamados hormônios de estresse - cortisol e catecolaminas. As catecolaminas (adrenalina e noradrenalina) são liberadas dos tecidos cromafínicos e das terminações dos nervos adrenérgicos (RANDALL & PERRY, 1992) e o cortisol é liberado pelo tecido interrenal (BALM *et al.*, 1994).

A função das catecolaminas em peixes é estimular a contração esplênica, que irá resultar numa maior liberação de eritrócitos para a circulação sangüínea; regular o ambiente intraeritrocitário e aumentar a perfusão branquial, entre outras ações que vêm otimizar a transferência de oxigênio para os tecidos (VAL, 1993 *apud* VAL *et al.*, 2004; RANDALL & PERRY, 1992).

As catecolaminas são os primeiros hormônios a serem liberados, sendo que os maiores níveis sangüíneos ocorrem 30 segundos após a presença e percepção do agente que irá causar o estresse. Logo em seguida, após ocorrer a metabolização das catecolaminas, ocorre a liberação do cortisol, que, por sua vez, tem a maior concentração sangüínea cerca de 30 minutos após o começo das alterações provocadas pelo agente estressor. Após o aumento desses hormônios, há um aumento considerável na concentração de glicose sangüínea, que serve como uma reserva energética para pronto uso em uma resposta emergencial (ROTLLANT & TORT, 1997).

Alguns autores já realizaram trabalhos, onde peixes foram expostos a agrotóxicos. RANZANI-PAIVA *et al.* (1997) sugerem que o organofosforado Dipterex 500 acarreta uma série de alterações fisiológicas nos indivíduos que são expostos a ele. Além das alterações hematológicas e de bioquímica sangüínea,

outros trabalhos demonstram a ocorrência de efeitos do contaminantes sobre a morfologia de órgão, tais como fígado, baço e brânquias.

AYALA *et al.* (2004) também expuseram exemplares de *Rhamdia hilarii* a um acaricida muito utilizado na lavoura e estudaram os efeitos sobre a morfologia do fígado. RODRIGUES *et al.* (1997) observaram que, apesar de terem utilizado uma dose considerada subletal do organofosforado Dipterex 500 para *P. scrofa*, ocorreu prejuízo morfofuncional no baço dos animais expostos.

Outros trabalhos com glifosato demonstraram efeitos em brânquias de bagres *Rhamdia hilarii* (SOUZA *et al.*, 2004) e alterações metabólicas em piavas *Leporinus obtusidens* (GIODA *et al.*, 2004).

Em peixes teleósteos, a elevação plasmática do cortisol é reconhecida como a principal resposta hormonal de estresse sendo muitas vezes utilizada como indicadora da presença desta resposta (PATIÑO *et al.*, 1987 e BALM *et al.*, 1989). Porém, BARTON & IWAMA (1991) chamam a atenção para o fato de que algumas substâncias tóxicas, prejudiciais à saúde do peixe, não provocam elevação no nível de cortisol plasmático, o que pode levar à conclusão equivocada de que não são agressores.

Além de todos os distúrbios citados acima, há uma preocupação sobre os efeitos que os diversos agentes estressores e os agentes químicos possam vir a desencadear sobre o organismo do animal que se encontra em período de reprodução.

Em fêmeas de teleósteos existem diferentes esteróides ovarianos que desempenham diferentes papéis em diferentes estágios de desenvolvimento gonadal. O mais conhecido é o 17 β -estradiol (E2), produzido pelas camadas

foliculares, que induz a síntese hepática do precursor do vitelo, a vitelogenina (FOSTIER **et al.**, 1983; WALLACE, 1985).

Em fêmeas de jundiás em primeiro ciclo reprodutivo (puberdade), BARCELLOS **et al.**, (2001) encontraram aumento progressivo das concentrações do estradiol durante os meses antecedentes à desova. O primeiro grande aumento de estradiol (de 0,4 para 1,7 ng/mL) ocorreu quando apareceram, nos oócitos, as primeiras vesículas de vitelo, ocorreu o primeiro.

Como efeitos secundários do estresse são observadas alterações no quadro hormonal reprodutivo dos peixes. Vários autores como PICKERING **et al.** (1987) CARRAGHER **et al.** (1989, 1990) encontraram evidências de que o cortisol afeta negativamente a secreção e ação de hormônios esteróides sexuais. Por outro lado, PANKHURST **et al.** (1995) discordam, afirmando que os indícios do envolvimento do cortisol neste quadro não são muito claros.

Em peixes, a influência do cortisol na redução da atividade reprodutiva ainda permanece incerta. Segundo CARRAGHER **et al.** (1989), o cortisol liberado em situações de estresse, tem efeito deletério na reprodução, evidenciado pela redução de vários parâmetros reprodutivos de truta arco-íris (*O. mykiss*) e truta marrom (*S. trutta*) tratadas com cortisol exógeno. Os autores não descartam a possibilidade de que muitos desses efeitos sejam decorrentes da queda de condição geral do peixe, quando exposto a elevação crônica de corticosteróides. Entretanto, afirmam que o cortisol tem efeitos diretos na liberação de hormônios reprodutivos para os tecidos alvo.

CARRAGHER **et al.** (1990) encontraram, *in vitro*, efeito supressivo do cortisol na secreção de 17β -estradiol e testosterona em folículos ovarianos de

truta arco-íris (*O. mykiss*). No mesmo trabalho, algumas preparações de folículos responderam a doses de cortisol de cerca de 100 ng/mL e outras somente o fizeram quando esta dose foi aumentada para próximo de 1000 ng/mL. Tomando estes dados conjuntamente, os autores sugeriram que a variabilidade nas respostas pode ocorrer por outros fatores inerentes aos peixes doadores destes folículos, como por exemplo, experiência anterior em situações estressantes. Os autores levantaram a hipótese de que a ação ocorre em algum ponto mais inicial da via esteroidogênica ou devido à depressão geral no sistema secretório dos peixes e que o efeito pode ser diretamente nos folículos ou por rota indireta.

POTTINGER & PICKERING (1990) demonstraram em truta arco-íris (*O. mykiss*) que o cortisol diminui o número de sítios de ligação para o estradiol no fígado, diminuindo assim a vitelogênese.

Por outro lado, PANKHURST *et al.* (1995) levantam uma dúvida sobre o efeito do cortisol na reprodução. Numa série de experimentos *in vitro*, onde folículos ovarianos de três espécies, *Cyprinus carpio*, *Carassius auratus* e *Pagrus auratus*, foram incubados com ou sem cortisol, com GtH, testosterona ou 25-hidroxicolesterol (25OHC), não houve evidência de que o cortisol inibe diretamente a esteroidogênese ovariana. Os autores, porém, não descartam o envolvimento do cortisol na inibição da reprodução e especulam que outros hormônios, que são secretados em resposta ao estresse, devam estar envolvidos na inibição da reprodução.

Dentro das alterações secundárias, encontram-se também as alterações no quadro hematológico, principalmente aquelas relacionadas às células do sistema imunológico. O uso da hematologia em peixes é muito útil no diagnóstico

e no estabelecimento do prognóstico das mais variadas patologias que os acometem (STOSKOPF, 1993). A avaliação do sangue é uma rotina em se tratando de animais de estimação e de produção como gado e eqüinos, mas em peixes, esta avaliação está sendo utilizada a nível de pesquisa.

Muitos autores enfatizam que o conhecimento prévio sobre os valores hematológicos normais de peixes, quando deparados com os valores hematológicos de peixes submetidos a algum tipo de transtorno (intoxicação, estresse, jejum) constitui mais uma forma de análise que vem auxiliar no diagnóstico de possíveis injúrias que possam estar acometendo os animais (KAVAMOTO *et al.*, 1983 e RANZANI-PAIVA & GODINHO, 1985).

A imunodeficiência decorrente da resposta ao estresse é confirmada por diversos autores, entre eles KEBUS *et al.* (1992) e IWAMA (1993) e está comprovadamente correlacionada negativamente à elevação do cortisol plasmático, que por sua vez leva a diminuição do número de linfócitos circulantes. McLEAY (1973) demonstrou que peixes (*O. kisutch*) tratados com ACTH, o hormônio que promove a secreção do cortisol, apresentam uma diminuição no número de linfócitos circulantes MAULE *et al.* (1989) demonstraram que a aplicação de um estressor de apenas 30 segundos (imersão dos peixes) foi suficiente para, após quatro horas, suprimir em 25% a função dos linfócitos de salmão, *O. tshawytscha*. Neste estudo, a supressão e a recuperação foram inversamente correlacionadas com a elevação e diminuição das concentrações plasmáticas de cortisol. Acrescentando, SALONIUS & IWANA (1993) sugerem que a diminuição da resistência às doenças pode ocorrer por modulação da atividade dos macrófagos que está relacionada a um estresse.

Vários trabalhos sugerem que são os corticosteróides que inibem o sistema imunológico. Por exemplo, trutas arco-íris (*O. mykiss*) alimentadas com apenas uma refeição com dieta contendo cortisol apresentaram redução de 65% no número de linfócitos circulantes, retornando ao nível pré tratamento em 24 horas (PICKERING, 1984). Em outro estudo, a alimentação diária com cortisol, provocou 84% de redução no número de linfócitos, que permaneceu baixo enquanto o cortisol esteve aumentado. Também, SCHRECK *et al.* (1991) afirmaram que a supressão no sistema imunológico, provocada pelo cortisol, pode continuar por até várias semanas após a ocorrência do estressor.

Ainda para explicar como ocorre a imunossupressão, BARTON & IWAMA (1991) citam os trabalhos de TRIPP *et al.* (1987) e de KAATARI & TRIPP (1987), onde estes autores encontraram evidências de que o cortisol inibe a diferenciação dos linfócitos a partir de seus precursores, por inibir as interleuquinas, responsáveis pela diferenciação.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AYALA, C.O.; VERANI, N.F.; SÁ, O.R. Avaliação dos efeitos do acaricida Omite sobre a morfologia do fígado do bagre *Rhamdia hilarii* (Valeciennes, 1840). www.propg.ufscar.br/publica/4jc/ixcic/PIBIC/243-yala.htm, site acessado em 06 de agosto de 2004.
- BALM, P.H.M.; LAMBERT, J.D.G.; WENDELAAR BONGA, S.E. Corticosteroid biosynthesis in the interrenal cells of the teleost fish, *Oreochromis mossambicus*. *General and Comparative Endocrinology*, Duluth, v. 76, p. 53-62. 1989.
- BALM, P.H.M.; PEPELS, P.; HELFRICH, S.; HOVENS, M.L.M.; WENDELAAR BONGA, S.E. Adrenocorticotrophic hormone in relation to interregal function during stress in tilapia (*Oreochromis mossambicus*). *General and Comparative Endocrinology*, v. 96, p. 347-360. 1994.
- BARCELLOS, L.J.G.; SOUZA, S.M.G.; LUCERO, L.F. Estudos sobre o cortisol sérico em resposta ao estresse na tilápia-do-Nilo (*Oreochromis niloticus*). *Boletim do Instituto de Pesca*, v. 24, n. especial, p.239-245. 1997.
- BARCELLOS, L.J.G.; WASSERMANN, G.F.; SCOTT, A.P.; WOEHL, V.; KRIEGER, M.H.; QUEVEDO, R.M.; LULHIER, F. Steroid profiles of cultured female jundiá, the Siluridae *Rhamdia quelen* (Quoy and Gaimard, Pisces, Teleostei) during the first reproductive cycle. *General and Comparative Endocrinology*. v. 121, p. 325-332. 2001.

- BARTON, B.A. & IWAMA, G.K. Physiological changes in fish from stress in aquaculture with emphasis on the response and effects of corticosteroids. *Annual Reviews on Fish Diseases*, Vancouver, v.10, p. 3-26. 1991.
- CARRAGHER, J.F.; SUMTER, J.P.; POTTINGER, T.G.; PICKERING, A.D. The effect on the secretion of sex steroids from cultured ovarian follicles of rainbow trout. *General and Comparative Endocrinology*, Duluth, v.77, p.403-407. 1990.
- CARRAGHER, J.F.; SUMTER, J.P.; POTTINGER, T.G.; PICKERING, A.D. The deleterious effects of cortisol implantations on reproductive function in two species of trout, *Salmo trutta* and *Salmo gairdneri* Richardson. *General and Comparative Endocrinology*, Duluth, v.76, p.310-320. 1989.
- FOSTIER, A.; JALABERT, B.; BILLAR, R.; BRETON, B.; ZOHAR, Y. The gonadal steroids. In: HOAR, W.S.; RANDALL, D.J. & DANALDSON, E.M. (eds.) *Fish Physiology*, vol. 9B, *Endocrine Tissues and Hormones*. pp. 277-372. New York, Academic Press. 1983.
- GIESY, J. P.; DOBSON, S.; SOLOMON, K. R. Ecotoxicological risk assessment for Roundup herbicide. *Rev. Environ. Contam. Toxicol.*, Nova York, v. 167, pp. 35-120, 2000.
- GIODA, C.R.; VIEIRA, V.L.P.; SALBEGO, J.; PRETTO, A.; LAZZARI, R.; CRESTANI, M.; MEDEIROS, C.C.; FONSECA, M.B.; GLUSCZAK, L. Alterações metabólicas em piavas (*Leporinus obtusidens*) expostas ao herbicida glifosato. www.ufpel.edu.br/xiicic/relatorios/conteudo_CB.html, site acessado em 07 de agosto de 2004.

GOMES, L.C.; GOLOMBIESK, J.I.; GOMES, A.R.C.; **et al.** Biologia do jundiá *Rhamdia quelen* (Teleostei, Pimelodidae) – Revisão Bibliográfica. *Ciência Rural*, Santa Maria, v.30, n.1, p.179-185. 2000.

IDEC Riscos do glifosato, www.idec.org.br, site acessado em 07 de agosto de 2004.

IWAMA, G.K. *Intensive fish production: Course Manual* UBC Access Guided Independent Study. Vancouver: The University of British Columbia, p.130. 1993.

KAVAMOTO, E.T.; RANZANI-PAIVA, M.J.T.; TOKUMARU, M. Estudos hematológicos em “bagre” *Rhamdia hilarii* (Val. 1840), Teleósteo, no estágio de desenvolvimento gonadal maduro. *Boletim do Instituto de Pesca*, v. 10, n. único, p. 53 – 60. 1983.

KEBUS, M.J.; COLLINS, M.T.; BROWNFIELD, M.S.; AMUNDSON, C.H.; KAYES, T.B.; MALISON, J.S. Effects of rearing density of stress response and growth of rainbow trout. *Journal of Aquatic Animal Health*, Bathesda, v. 4, p.1-6. 1992.

MAULE, A.G.; TRIPP, R.A.; KAATTARI, S.L.; SCHRECK, C.B. Stress alters immune function and disease resistance in chinook salmon (*Onchorynchus tshawytscha*). *Journal of Endocrinology*, Cambridge, v.120, p.135-142. 1989.

McLEAY, D.J. Effects of ACTH on the pituitary-interrenal axis and abundance of white blood cell types in juvenile coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*). *General and Comparative Endocrinology*, Duluth, v. 21, p. 431-440.1973.

MONSANTO Glifosato –Alguns aspectos da utilização do herbicida glifosato na agricultura, www.monsanto.com.br/roundup/glifosato/pdf/livro_glifosato.pdf, site acessado em 17 de janeiro de 2006.

- PANKHURST, N.W.; VAN DER KRAAK, G.; PETER, R.E. Evidence that the inhibitory effects of stress on reproduction in teleost fish are not mediated by the action of cortisol on ovarian steroidogenesis. *General and Comparative Endocrinology*, Duluth, v. 99, p. 249-257. 1995.
- PATÍÑO, R.; REDDING, J.M.; SCHRECK, C.B. Interrenal secretion of corticosteroids and plasma cortisol and cortisone concentrations after acute stress and during seawater acclimation in juvenile coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*). *General and Comparative Endocrinology*, Duluth, v. 68, p. 431-439. 1987.
- PICKERING, A.D.; POTTINGER, T.G.; CARRAGHER, J.F.; SUMPTER, J.P. The effects of acute and chronic stress on the levels of reproductive hormones in the plasma of mature male brown trout, *Salmo trutta*. *General and Comparative Endocrinology*. Duluth, v. 68, p. 249-259. 1987.
- POTTINGER, T.G & PICKERING, A.D. The effect of cortisol administration on hepatic and plasma estradiol binding capacity in immature female rainbow trout (*Onchorynchus mykiis*). *General and Comparative Endocrinology*, Duluth, v. 80, p. 264-273. 1990.
- RANDALL, D.J. & PERRY, S.F. Catecholamines. In: HOAR, W.S.; RANDALL, D.J.; FARRELL, A.P. (eds.) *Fish Physiology*, vol. XIIB. New York, Academic Press, p. 255-300. 1992.

- RADÜNZ NETO, J. *Desenvolvimento de técnicas de reprodução e manejo de larvas de jundiá Rhamdia quelen*. Santa Maria, 77p. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) – Curso de Pós-graduação em Zootecnia. Universidade Federal de Santa Maria. 1981.
- RANZANI-PAIVA, M.J.T. & GODINHO, H.M. Estudos hematológicos em Curimbatá, *Prochilodus scrofa* Steindachner, 1881 (Osteichthyes, Cypriniformes, Prochilodontidae). Série vermelha. *Boletim do Instituto de Pesca*, v. 12, n. 2, p. 25 – 35. 1985.
- RANZANI-PAIVA, M.J.T.; RODRIGUES, E.L.; EIRAS, A.C.; VEIGA, M.L.; PACHECO, F.J. Alterações hematológicas em curimbatá, *Prochilodus scrofa* Steindachner, 1881, expostos ao Dipterex 500 (Triclorfon). *Boletim do Instituto de Pesca*, v. 24, n. especial, p. 187-196. 1997.
- RODRIGUES, E.L.; RANZANI-PAIVA, M.J.T.; PACHECO, F.J.; VEIGA, M.L.; EIRA, A.C. Efeito agudo do organofosforado Dipterex 500 (Triclorfon) em baço de curimbatá, *Prochilodus scrofa* (Steindachner, 1881). *Boletim do Instituto de Pesca*, v. 24, n. especial, p. 197-203. 1997.
- ROTLLANT, J. & TORT, L. Cortisol and glucose response after acute stress by net handling in the sparid red porgy previously subjected to crowding stress. *Journal of Fish Biology*, v. 51, p. 21-28. 1997.

- SALONIUS, K. & IWANA, G.K. Effects of early rearing environment on stress response, immune function, and disease resistance juvenile coho (*Oncorhynchus kisutch*) and chinook salmon (*O. tshawytscha*). *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, Ottawa, v. 50, p. 759-766. 1993.
- SCHRECK, C.B.; MAULE, A.G.; SLATER, C.H. Stresse affects the immune response and health of fish in aquicultural systems. In: INTERNATIONAL MARINE BIOTECHNOLOGY CONFERENCE, 2, 1991. Resumo na base de dados Life Science, CD-ROM. 1991.
- SELYE, H. Stress and the general adaptation syndrome. *British Medical Journal*, London, v. 1, n. 4667, p. 1383-1392. 1950.
- SOUZA, F.C.; VERANI, N.F.; SÁ, O.R. Efeitos crônicos do agrotóxico Roundup sobre as brânquias de juvenis do bagre bagre *Rhamdia hilarii* (Vallenciennes, 1840). www.prog.ufscar.br/publica/4jc/ixcic/PIBIC/258-souza.htm, site acessado em 06 de agosto de 2004.
- STOKOPF, M.K. *Fish Medicine*. Philadelphia, Saunders. 915p. 1993.
- VAL, L.A.; SILVA, M.N.P.; VAL, V.M.F.A. Estresse em peixes – Ajustes fisiológicos e distúrbios orgânicos. In: RANZANI-PAIVA, M.J.T.; TAKEMOTO, R.M.; LIZAMA, M.A.P. *Sanidade de organismos Aquáticos*. p.75-88. 2004.
- WALLACE, R.A. Vitellogenesis and oocyte growth in nonmammalian vertebrates. In: BROWDER, L.W. (ed.) *Developmental Biology*. vol. 1, p. 127-177. New York: Plenum.

RESUMO

O presente estudo teve o objetivo de analisar os possíveis distúrbios que o estresse e a contaminação da água com herbicida a base de glifosato acarretam ao organismo de fêmeas de jundiá (*Rhamdia quelen*) em período de maturação gonadal. Foram utilizados dois tratamentos (glifosato – GG e estresse – GE) e um grupo controle (GC), todos em duplicata. Os peixes pesavam entre 200 e 600 g, e tinham idade média de 8 meses. Foram mantidos em tanque escavados de 100m², com densidade de um peixe/2m² e renovação de água de 6 L/min, que propiciaram ao experimento condições semelhantes às condições de produção. O estresse utilizado nos peixes foi o de agitação. A concentração de glifosato aplicada nos tanques foi de 3,6 mg/L. Foram realizadas cinco coletas de sangue a cada dez dias, para hematologia e perfis hormonal e bioquímico. Na primeira coleta ocorreu um aumento no número de eritrócitos do GE com relação ao GC e GG (GE 281,06; GC 217,06 e GG 187,67 10⁴/μL, respectivamente). Ocorreu a diminuição dos valores da taxa de hemoglobina do GG na terceira e quinta coleta (GG 7,7 – 8,73; GC 9,56 – 10,75 e GE 9,38 – 9,24 mg/dL, respectivamente). O hematócrito demonstrou aumento no GG em relação aos demais grupos na quarta coleta (GG 44,06, GC 34,43 e GE 40 %, respectivamente). O volume globular médio (VGM) apresentou-se diminuído no GE na primeira coleta quando comparado com os demais grupos (GE 140,77; GC 164,45 e GG 2002,99 pg, respectivamente). Os valores da concentração de hemoglobina globular média (CHGM) não tiveram diferença significativa entre os grupos. A hemoglobina globular média (HGM) do GG demonstrou aumento significativo em relação ao GC (GG 42,3; GC 36,56 e GE 39,06 fl, respectivamente). Os índices gonadossomático (IGS) e índice hepatossomático (IHS) não demonstraram diferenças significativas entre os grupos testados. Os valores de cortisol no 10º dia diferiram estatisticamente entre GC e GE (GC 60,71; GE 123,43 e GG 69,37, ng/mL, respectivamente). No 40º dia de coleta o cortisol do grupo exposto ao glifosato atingiu o maior aumento (168,87 ng/mL). No que se refere à dosagem de

testosterona e 17β -estradiol, pode-se observar que, quando a concentração de testosterona está elevada, a concentração de 17β -estradiol está diminuída e vice-versa. Na análise da AST não foi observada diferença estatística..Após os 40 dias iniciais de experimento, 42 fêmeas de cada tratamento foram sincronizadas e induzidas à desova com extrato hipofisário de carpa. No GC 38, no GE 24 e GG 34 fêmeas, foram responsivas às induções. Após a extração dos ovócitos, os mesmos foram quantificados. O GE demonstrou diminuição do número de ovócitos perante os demais grupos (GE 6.480; GC 8.100 3 GG 7.890 ovócitos /fêmea). Os ovócitos foram fertilizados e incubados segundo o protocolo do Laboratório de Aqüicultura para produção comercial de alevinos de jundiá. A taxa de fertilidade do GC se sobressaiu perante o GE e não diferiu do GG (GC 82,15; GG 70,69 e GE 61,58%, respectivamente).

Palavras – chave: *Rhamdia quelen*, glifosato, estresse, hematologia, perfil hormonal

ABSTRACT

The present study aimed to analyze the possible disturbs that the stress and the water contamination of with glyphosate-based herbicides may cause to the organism of females of jundiá (*Rhamdia quelen*) during the period of gonadal maturation. Two treatments had been used (glyphosate - GG and stress - EG) and a group was used as control (CG), all in duplicate. The fish weighed between 200 and 600 g, and had average age of 8 months. They were kept in earthen ponds of 100m², with a density of one fish/m², and water renewal in a rate of 6L/min, that had propitiated to the experiment similar conditions to the field conditions. As stressor for the fish was used the water agitation. The concentration of glyphosate based herbicide applied in the tanks was 3.6mg/L. Five blood samples were collected with 10-day interval and used for hormonal, hematologic and serum biochemistry determinations. In the first sample time an increase in the number of RBC of EG was found in relation to CG and GG (EG 281.06, CG 217.06 and GG 187.67 10⁴/μL respectively). The reduction of the values of the hemoglobin content of the GG group was found in third and fifth sample time (GG 7.7 – 8.73; CG 9.56 – 10.75 and EG 9.38 – 9.24 mg/dL, respectively). The hematocrit had demonstrated an increase in the GG group in relation to EG and CG groups in the fourth collection (GG 44.06, CG 34.43 and EG 40 %, respectively). The medium globular volume (VGM) was diminished in EG in the first sample when compared with other treatments (EG 140.77; CG 164.45 and GG 2002.99 pg, respectively). The values of the medium concentration of globular hemoglobin (CHGM) had not demonstrated significant difference between the groups. The medium globular hemoglobin (HGM) of the GG demonstrated significant increase in relation to CG (GG 42.3; CG 36.56 and EG 39.06 fl, respectively). The gonadosomatic index (GSI) and hepatosomatic index (HSI) had not demonstrated significant differences between the tested groups. The cortisol concentration in 10th day show statistically difference between CG and EG (CG 60.71; EG 123.43 and GG 69.37 ng/mL,

respectively). In the sample of 40th day the cortisol concentration of the group exposed to glyphosate-based herbicide reached the peak increase (168.87 ng/mL). Regarding testosterone (T) and 17 β -estradiol (E2) concentrations it can be observed that, when the T concentration is raised, the E2 concentration is diminished and vice-versa. After the 40 days of experiment, 42 females of each treatment had induced to the spawning with pituitary carp extract. In the CG group 38, in EG 24 and GG 34 females, had been responsive to the inductions. After the oocyte stripping, they had been quantified. The EG group show a reduction of the oocyte number in relation to other treatments (EG 6,480; CG 8,100 and GG 7,890 oocytes per female). The oocytes were fertilized and incubated according to routinery protocol of the Laboratory of Aquicultura used for commercial production of jundiá fingerlings. The fertility rate of the CG were higher than found to EG and not different to GG (CG 82.15; 70.69 GG and EG 61.58%, respectively).

Key-words: *Rhamdia quelen*, stress, glyphosate, hematology, hormonal profile

INTRODUÇÃO

O uso da hematologia em peixes é muito útil no diagnóstico e no estabelecimento do prognóstico das mais variadas patologias que os acometem (STOSKOPF, 1993). A avaliação do sangue é uma rotina em se tratando de animais de estimação como cães e gatos, e, de produção como gado e eqüinos, mas em peixes, esta avaliação está sendo utilizada somente em nível de pesquisa.

Muitos autores enfatizam que o conhecimento prévio sobre os valores hematológicos normais de peixes, quando deparados com os valores hematológicos de peixes submetidos a algum tipo de transtorno (intoxicação, estresse, jejum) constitui mais uma forma de análise que vem auxiliar no diagnóstico de possíveis injúrias que possam estar acometendo os animais (KAVAMOTO *et al.*, 1983 e RANZANI-PAIVA & GODINHO, 1985).

O estudo da hematologia em peixes pode contribuir para a compreensão da fisiologia comparativa, relações filogenéticas, condições alimentares e outros parâmetros ecológicos que estão envolvidos com estes animais (LARSSON *et al.*, 1976).

Mesmo os indivíduos da mesma espécie, que habitam lugares diferentes, por possuírem tamanhos diferentes liberam energia em quantidades diversas de acordo com o seu tamanho corporal, podendo assim, interferir com o seu quadro hematológico (TAVARES DIAS *et al.*, 2000).

Fatores como o estado nutricional, maturação gonadal, sexo, sazonalidade e variação genética podem influenciar expressivamente nas variáveis hematológicas (KORI-SIAKPERE, 1985).

Além das alterações que podem ser provocadas pelos fatores citados acima, a forma de coleta de sangue, tipo de anticoagulante utilizado, também podem atuar como fonte de variação dos resultados hematológicos em peixes (TAVARES-DIAS *et al.*, 2002).

SOSO *et al.* (2002) e TAVARES-DIAS *et al.* (2002) estabeleceram valores hematológicos para machos de jundiá mantidos em cativeiro. CERICATO *et al.* (2002) e BARCELLOS *et al.* (2004) demonstraram as diferenças que ocorrem na hematologia quando os peixes são submetidos a estresse agudo e estresse crônico BARCELLOS *et al.* (2003) observaram os efeitos imunossupressores do estresse para *Rhamdia quelen*.

O objetivo do presente estudo foi o de analisar os possíveis distúrbios que o estresse e a contaminação da água com glifosato acarretam ao organismo de fêmeas de jundiá em período de maturação gonadal, através de análises hematológicas.

MATERIAIS E MÉTODOS

O experimento teve início no mês de setembro de 2004 e término em abril de 2005.

O experimento foi realizado no Centro de Pesquisa e Extensão Agropecuária (CEPAGRO) da Universidade de Passo Fundo (UPF), na cidade de Passo Fundo, estado do Rio Grande do Sul. Foram utilizados tanques escavados de 100 m², que propiciaram ao experimento condições semelhantes às condições de produção. As análises foram realizadas nos Laboratórios de Ictiopatologia, Laboratório de Análise Clínicas e Laboratório de Imunologia e Virologia do Hospital Veterinário da Universidade de Passo Fundo, na cidade de Passo Fundo.

Foram utilizadas fêmeas adultas de jundiá (*Rhamdia quelen*), pesando entre 200 a 600 g, com idade média de 8 meses, criadas e mantidas no CEPAGRO.

Os animais foram mantidos nos tanques escavados, com densidade de um peixe/2m² e renovação d'água de 6 L/min. A água de renovação dos tanques permaneceu em uma lagoa efluente, por cerca de 30 dias. Os peixes eram alimentados uma vez ao dia *al libitum* com ração comercial peletizada para peixes (30% de proteína bruta, Alisul Rações LTDA).

Foi utilizado como produto químico o ROUNDUP® WG em pó molhável produzido pela Monsanto. O estresse foi provocado por agitação da água com auxílio de puçá, fazendo com que houvesse movimentação no interior

do tanque. O estressor foi aplicado diariamente e o produto químico foi colocado nos tanques a cada nove dias.

A aclimação dos animais nos tanques foi de 5 dias, nas mesmas condições que foram mantidas durante o experimento. Foram coletados quatro animais por tanque por dia de coleta, totalizando 120 fêmeas para coleta de sangue e órgãos. Para desova e índices de fertilidade foram coletadas 21 fêmeas por tanque.

Após os peixes terem sido retirados dos tanques, foram anestesiados com MS222 (Finquel[®] Sandoz, 300 mg/l) e o sangue imediatamente retirado por punção caudal, com auxílio de seringas descartáveis e acondicionados em tubos de ensaio contendo EDTA. Foram realizadas as seguintes análises: número de eritrócitos em câmara de Neubauer; hematócrito pelo método do microhematócrito, segundo GOLDENFARB *et al.* (1971); taxa de hemoglobina pelo método da cianometahemoglobina, segundo COLLIER (1944).

Com os resultados da taxa de hemoglobina (Hb), do número de eritrócitos (Er) e do hematócrito (Ht) foram calculados os índices hematimétricos absolutos (VGM – Volume Globular Médio, HGM – Hemoglobina Globular Média e CHGM – Concentração de Hemoglobina Globular Média), segundo WINTROBE (1934).

Foi utilizado o delineamento inteiramente casualizado (DIC) em parcelas subdivididas no tempo. As parcelas foram dois tanques controle, dois tanques de contaminação pelo Glifosato, dois tanques para estresse e as sub-parcelas seis tempos de coleta (0, 1, 10, 20, 30 e 40 dias). A

distribuição dos animais para os diferentes testes foi ao acaso. A significância entre as médias dos tratamentos foram comparadas por ANOVA seguida pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade (ZAAR, 1996).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os parâmetros hematológicos são considerados bons indicadores de respostas ao estresse em peixes, visto que as catecolaminas e o cortisol induzem variações e mudanças nas células sangüíneas (MAZEAUD & MAZEAUD, 1981).

Com a presença do estímulo estressor, ocorre a liberação de catecolaminas e cortisol. Um dos efeitos observados após a liberação destas substâncias é o aumento de consumo de oxigênio pelos tecidos (MORGAN & IWANA, 1996) e, sendo assim, há necessidade de rápida diferenciação e proliferação de eritrócitos. Por outro lado, o aumento da concentração de catecolaminas pode resultar na liberação de eritrócitos na circulação (MCDONALD & MILLIGAN, 1997). Assim, pode-se acreditar que ocorre aumento nos níveis de hemoglobina, porcentagem de hematócrito e número de células vermelhas na circulação sangüínea após um evento estressor.

Em posse destas informações e dos resultados obtidos no presente trabalho, no primeiro dia de coleta o número de eritrócitos no grupo estresse comportou-se como o padrão esperado para esta situação (figura 1). Ou seja, ocorreu aumento significativo nos valores médios deste parâmetro no 1º dia após a exposição ao estresse. Alterações na contagem de eritrócitos após estímulos estressantes podem indicar hemoconcentração ou hemodiluição.

A hemoglobina é uma proteína conjugada, composta por quatro grupamentos protéicos, a globina, e por um grupamento heme, onde seu principal composto químico é o ferro (GARCIA-NAVARRO & PACHALY,

1994). Nos peixes, o heme é idêntico para todas as espécies, já a globina difere de espécie para espécie (VAL & ALMEIDA-VAL *apud*. TAVARES-DIAS & MORAES, 2004).

Nos peixes do grupo glifosato, a hemoglobina mostrou valores diminuídos na terceira e quinta coleta, quando comparado com os demais grupos (figura 2).

A função da hemoglobina é fazer o transporte de oxigênio e gás carbônico pelo organismo (BERNARD *et al.*, 2000). Desta maneira, a taxa de hemoglobina indica como está sendo o transporte de oxigênio pelos tecidos corporais. Com posse dos valores de hemoglobina, número de eritrócitos e hematócrito, pode-se observar se o organismo do animal está passando por um processo anêmico ou por um estado de policitemia (aumento do número de eritrócitos). Muitos são os fatores que podem estar relacionados a processos anêmicos, entre eles podemos citar: parasitoses, perdas de sangue por ferimento, diminuição da produção medular. A diminuição da produção medular pode estar relacionada a alguma neoplasia ou por intoxicações químicas, que causaram uma deficiência de produção medular.

Em plantas, o glifosato atua como um potente inibidor da atividade da 5-enolpituvilshiquimato-3-fosfato sintetase (EPSPS), que é catalisadora de uma das reações de síntese dos aminoácidos aromáticos fenilalanina, tirosina e triptofano, influencia também em outros processos, como a inibição da síntese de clorofila (COLE, 1985; RODRIGUES, 1994 *apud* MONSANTO, 2006).

Pelo hematócrito pode-se observar a porcentagem de células sangüíneas em relação à parte líquida do sangue (soro). Com base nos dados de referência do

padrão normal para a espécie, pode-se confirmar, através do hematócrito, se esse animal encontra-se desidratado (o percentual de células é superior ao percentual de soro), ou ainda, se este animal está com alguma deficiência sangüínea.

O hematócrito dos animais do GG demonstrou diminuição na quarta coleta, isso pode ser atribuído a um desequilíbrio osmótico que possa estar acometendo esses animais, levando os mesmos a um estado de desidratação (figura 3).

O volume globular médio (VGM) expressa o tamanho médio dos eritrócitos. No grupo estresse, no primeiro dia de coleta, o VGM apresentou-se diminuído (figura 4). Isso sugere que está ocorrendo uma liberação de eritrócitos na corrente sangüínea pelo estímulo estressor (MCDONALD & MILLIGAN, 1997), visto que houve o aumento do número de eritrócitos e diminuição do hematócrito. Nas extensões sangüíneas, pode-se observar várias eritrócitos imaturos, que por sua vez apresentavam tamanho menor (eritroblasto ortocromático) que o eritrócito adulto e coloração mais acentuada. Essa coloração mais acentuada deve-se a basofilia do RNA, que se sobrepõe a acidofilia do pigmento da hemoglobina (TAVARES-DIAS & MORAES, 2004).

A hemoglobina globular média (HGM) indica o peso médio da hemoglobina dentro dos eritrócitos. A HGM encontra-se diminuída no grupo estresse na primeira coleta (figura 5). Esta diminuição pode ser explicada pelo fato de estar presente entre os eritrócitos adultos, formas imaturas, que possuem quantidade menor de hemoglobina no seu interior.

A concentração de hemoglobina globular média (CHGM) determina o peso da hemoglobina em 100 mL de sangue (RANZANI-PAIVA, 1993). Neste trabalho, não foi observada diferença estatística para este índice.

Com os resultados obtidos no presente estudo e comentados acima, podemos ressaltar que tanto o estresse como a contaminação da água por glifosato, podem acarretar distúrbios na hematologia de fêmeas de jundiá. Podendo assim conferir prejuízos a saúde dos animais.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BARCELLOS, L.J.G.; KREUTZ, L.C.; SOUZA, C.; RODRIGUES, L.B.; FIOREZE, I.; QUEVEDO, R.M.; CERICATO, L.; SOSO, A.B.; FAGUNDES, M.; CONRAD, J.; LACERDA, L.A.; TERRA, S. Hematological changes in jundiá (*Rhamdia quelen* Quoy and Gaimard *Pimelodidae*) after acute and chronic stress caused by usual aquacultural management, with emphasis on immunosuppressive effects. *Aquaculture*, v. 237, p. 229-236. 2004.
- BARCELLOS, L.J.G.; KREUTZ, L.C.; SOUZA, C.; RODRIGUES, L.B.; FIOREZE, I.; QUEVEDO, R.M.; CERICATO, L.; CONRAD, J.; SOSO, A.B.; FAGUNDES, M.; LACERDA, L.A.; TERRA, S. Haematological and biochemical characteristics of male jundiá (*Rhamdia quelen* Quoy & Gaimard *Pimelodidae*): changes after acute stress. *Aquaculture Research*, v. 34, p. 1465-1469. 2003.
- BERNARD, J.; LEVY, J.P.; VARET, B.; CLAUVEL, J.P.; RAIN, J.D.; SULTAN, Y. *Hematologia*. 9° Ed. Rio de Janeiro, Medsi. 2000.
- CERICATO, L.; SOSO, A.B.; CONRAD, J.; BRUNETTO, G.; MABILIA, R.G.; RODRIGUES, L.B.; KREUTZ, L.C.; QUEVEDO, R.M.; FIOREZE, I.; BARCELLOS, L.J.G. Efeitos do estresse agudo sobre o perfil hematológico e bioquímica sanguínea de jundiás (*Rhamdia quelen*) pós despesca. XII SIMPÓSIO BRASILEIRO DE AQUICULTURA, Goiânia, ABRAq. Anais, p. 275. 2002.

- COLLIER, H.B. The standardization of blood haemoglobin determinations. *Can. Med. Ass. J.*, Toronto, v. 50, p. 550 - 552. 1944.
- GARCIA-NAVARRO, C.E.K. & PACHALY, J.R. Manual de vematologia Veterinária. São Paulo, Editora Varela. 1994.
- GOLDENFARB, P.B.; BOWYER, F.P.; HALL, E.; BROUSIUS, E.. Reproducibility in the hematology laboratory: the microhematocrit determination. *Amer. J. Clin. Path.*, Philadelphia, v. 56, n. 1, p. 59 - 59. 1971.
- KAVAMOTO, E.T.; RANZANI-PAIVA, M.J.T.; TOKUMARU, M. Estudos hematológicos em “bagre” *Rhamdia hilarii* (Val. 1840), Teleósteo, no estágio de desenvolvimento gonadal maduro. *Boletim do Instituto de Pesca*, v. 10, n. único, p. 53 – 60. 1983.
- KORI-SIAKPERE, O. Haematological characteristics of *Clarias isheriensis* Sydenham. *Journal of Fish Biology*, London, v.27,p.259-263. 1985.
- LARSSON, A.; JOHANSSON-SJOBECK, M.J.; FANGE, R. Comparative study of some and biochemical blood parameters in fishes from the Skagerrak. *Journal os Fish Biology*, London, v.9,p.425-440. 1976.
- MAZEAUD. M.M. & MAZEAUD, F. Adrenergic responses to stress in fish. In: PICKERING, A.D. (ed.) *Stress in fish*. Academic Press, pp. 49-47. 1981.
- McDONALD, G.; MILLIGAN, L. Ionic, osmotic and acid-base regulation in stress. In: IWAMA, G.W.; PICKERING, A.D.; SUMPTER, J.P.; SCHRECK, C.B. (Eds). *Fish stress and Health in Aquaculture*. Cambridge: Universty Press, p.119-144. 1997.

MONSANTO Glifosato –Alguns aspectos da utilização do herbicida glifosato na agricultura, www.monsanto.com.br/roundup/glifosato/pdf/livro_glifosato.pdf, site acessado em 17 de janeiro de 2006.

MORGAN, J.D.; IWAMA, G.K. Cortisol-induced changes in oxygen consumption and ionic regulation in coastal cutthroat trout (*Oncorhynchus clarki clarki*) parr. *Fish Physiology Biochem.* v15(5). p385-394. 1996.

RANZANI-PAIVA, M.J.T. *Características hematológicas associadas à biologia e parasitismo em Mugil platanus GÜNTHER, 1880 (Osteichthyes, Mugilidae) da região estuarino-lagunar de Cananéia – SP (Lat. 25° 00'S – Long. 47° 55'W).* São Carlos. 255p. Tese (Doutorado em Ciências) – Programa de Pós-Graduação em Ecologia e Recursos Naturais. Universidade Federal de São Carlos. 1993.

RANZANI-PAIVA, M.J.T. & GODINHO, H.M. Estudos hematológicos em Curimatá, *Prochilodus scrofa* Steindachner, 1881 (Osteichthyes, Cypriniformes, Prochilodontidae). Série vermelha. *Boletim do Instituto de Pesca*, v. 12, n. 2, p. 25 – 35. 1985.

SOSO, A.B.; CERICATO, L.; CONRAD, J.; BRUNETO, G.; RODRIGUES, L.B.; KREUTZ, L.C. QUEVEDO, R.M.; BARCELLOS, L.J.G. Perfil hematológico de jundiá (*Rhamdia quelen*) mantidos em cativeiro. XII SIMPÓSIO BRASILEIRO DE AQUICULTURA, Goiânia, ABRAq. Anais, p. 285, 2002.

STOKOPF, M.K. *Fish Medicine*. Philadelphia, Saunders. 915p. 1993.

TAVARES-DIAS, M.; FRASCA-SCORVO, C.M.D.; NOVATO, P.F.C. **et al.**

Hematological characteristics of hibrid Florida red tilapia, *Oreochromis urolepis hornorun* x *O. mossambicus* under intensive rearing: In: PROCEEDINGS INTERNATIONAL SIMPOSIUM ON TILAPIA AQUACULTURE, 5, 2000. Rio de Janeiro. Anais...Rio de Janeiro: Fitzmmmons. K., Carvalho Filhos, J. (Ed), p.533-541. 2000.

TAVARES-DIAS, M.; MELO, J.F.B.; MORAES, G.; MORAES, F.R. Características hematológicas de teleósteos brasileiros. IV. Variáveis do jundiá *Rhamdia quelen* (Pimelodidae). *Ciência Rural*, v. 32, n. 4, p. 693-698. 2002.

TAVARES-DIAS, M. & MORAES, F.R. *Hematologia de peixes teleósteos*. Ribeirão Preto, 144p. 2004.

WINTROBE, M.M. Variations in the size and hemoglobin content of erythrocytes in the blood of various vertebrates. *Folia Haematologica*, v. 52, p. 32-49. 1934.

ZAAR, J.H. *Biostatistical Analysis*. New Jersey: Prentice Hall. 800p. 1996.

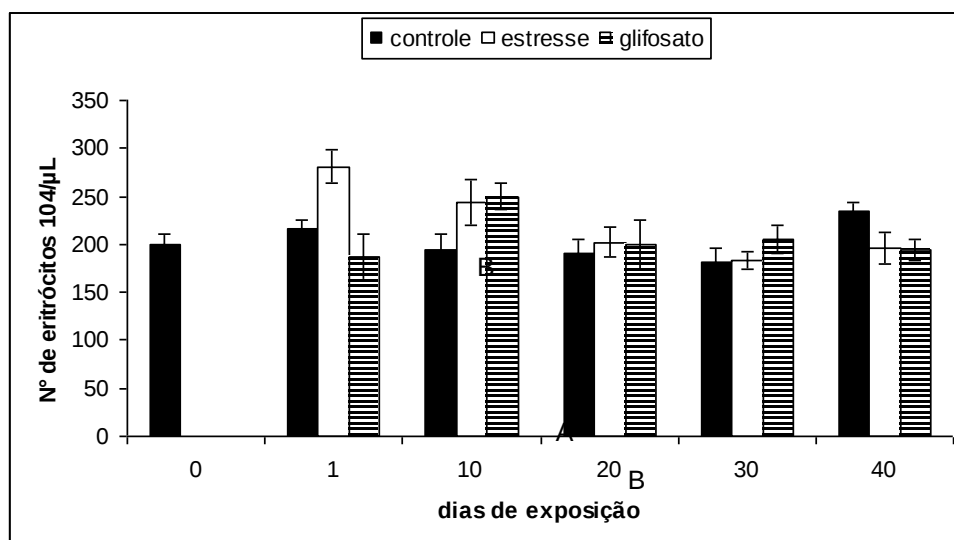


Figura 1: Número de eritrócitos ($10^4/\mu\text{L}$) de fêmeas de *Rhamdia quelen*, do grupo controle, do grupo exposto ao estresse e do grupo exposto ao glifosato.

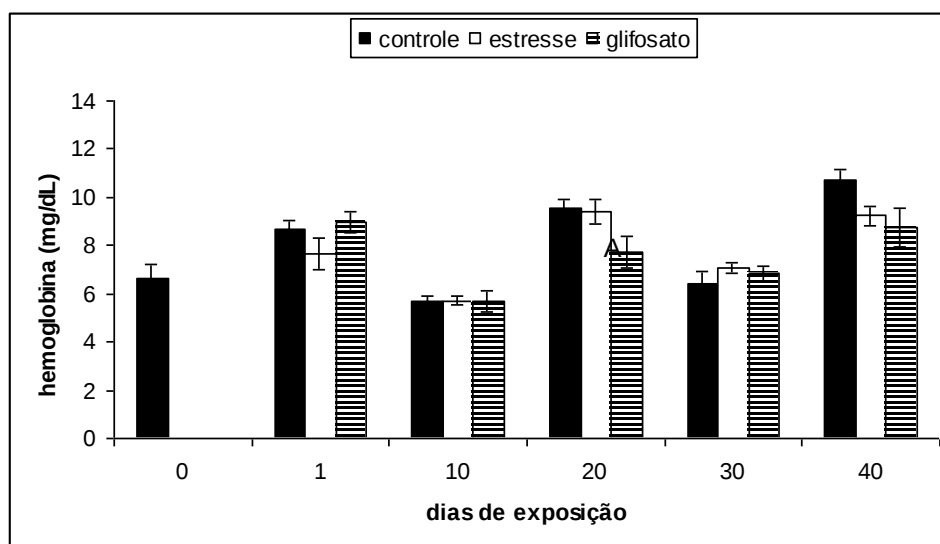


Figura 2: Taxa de hemoglobina (mg/dL) de fêmeas de *Rhamdia quelen*, do grupo controle, do grupo exposto ao estresse e do grupo exposto ao glifosato.

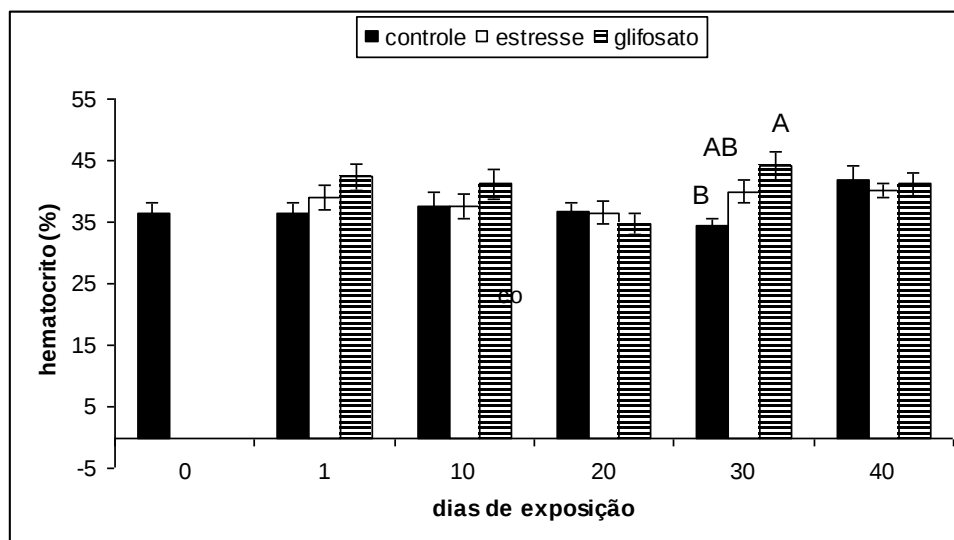


Figura 3: Hematócrito (%) de fêmeas de *Rhamdia quelen*, do grupo controle, do grupo exposto ao estresse e do grupo exposto ao glifosato.

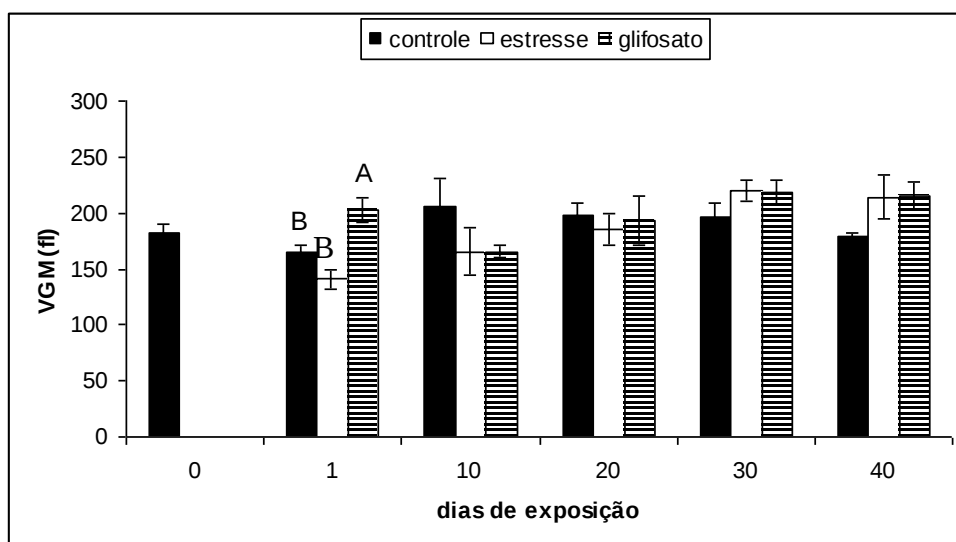


Figura 4 : Volume Globular Médio (fl) de fêmeas de *Rhamdia quelen*, do grupo controle, do grupo exposto ao estresse e do grupo exposto ao glifosato.

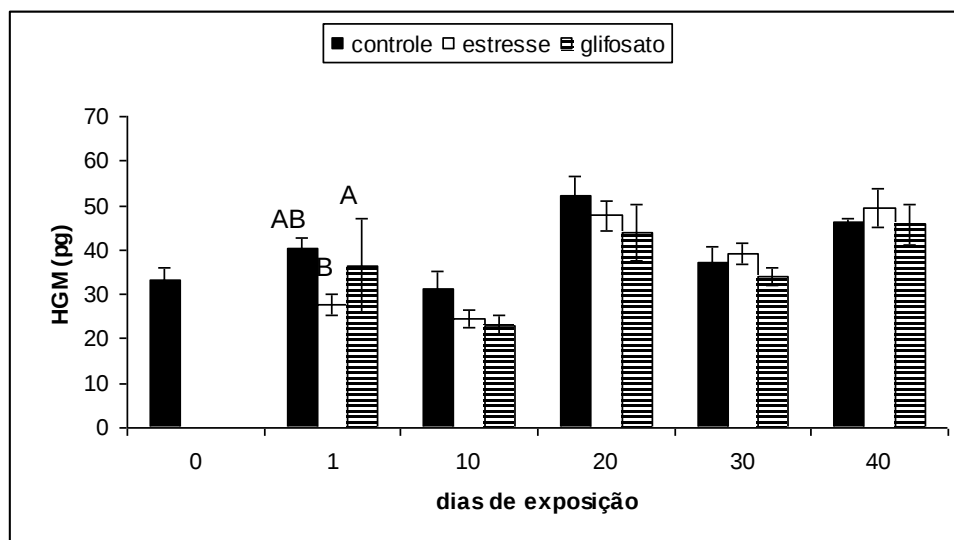


Figura 5: Hemoglobina Globular Média (pg) de fêmeas de *Rhamdia quelen*, do grupo controle, do grupo exposto ao estresse e do grupo exposto ao glifosato.

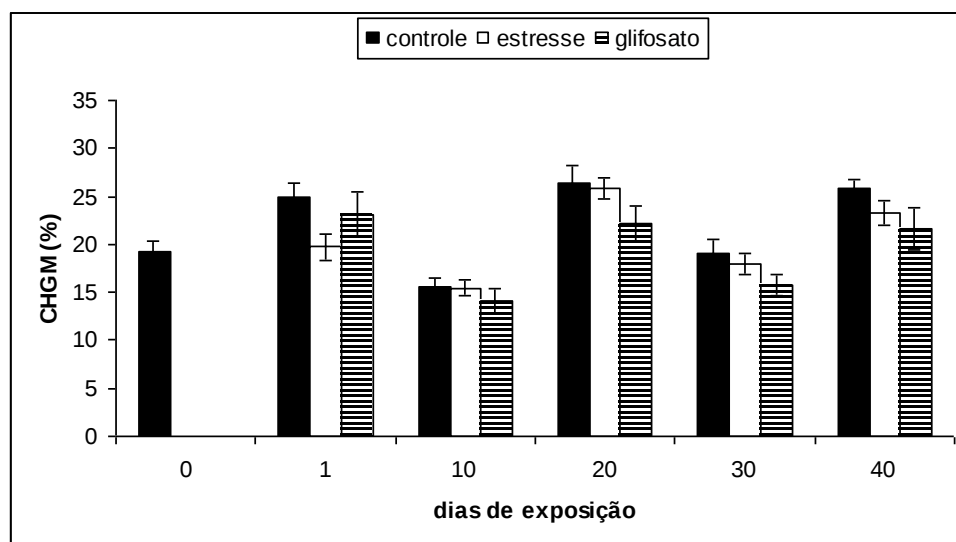


Figura 6: Concentração de hemoglobina globular média (%) de fêmeas de *Rhamdia quelen*, do grupo controle, do grupo exposto ao estresse e do grupo exposto ao glifosato.

**VITELLOGENESIS DISRUPTION IN RHAMDIA QUELEN CAUSED BY
CHRONIC STRESS BUT NOT BY EXPOSURE TO GLYPHOSATE-
BASED HERBICIDE: A FIELD CONDITIONS APPROACH.**

ABSTRACT

Stressful breeding conditions and chemical contamination of water can negatively modulate fish reproduction. Thus, the aim of the present work was to determine the cortisol (F) response to chronic handling stress (HS) or exposure to glyphosate-based herbicide (HE) and its relationship with 17β -estradiol (E_2) and testosterone (T) concentrations, during the vitellogenesis period in Rhamdia quelen females. The experimental design aimed to reproduce the environment and management of hatcheries in southern South America in which most ponds are located close to agricultural areas and might eventually become contaminated due to aerially application of herbicides in soybean culture during summer. Eight females of each treatment, control (CT), HS and RE, were sampled at day 0 and at the 1st, 10th, 20th, 30th and 40th day after stress or exposure to herbicide. Stress provoked a typical F response; in the 10th day, the HS group presents higher F level in contrast to CT. The correlation between F and E_2 levels in this day was higher ($r = -0.9838$). This fact indicates an endocrine disrupted E_2 production and/or release. The concomitant reduction on E_2 and increase in T levels probably implies inhibition of cytochrome P450-aromatase ($P450_{arom}$), which catalyses the T to E_2 conversion step, that appears to be reversible, since the E_2 and T levels tend to normalize at the 20th and consecutive days following stress. The hormonal

profile verified in 10th day in HS females probably was the cause of the lower number of oocytes stripped and swim-up fry from these females due to inhibition of E₂-dependent processes during early vitellogenesis. Based on the results presented herein, the stressful non-planned management of hatchery seems to be more harmful to R. quelen reproduction than eventual entrance of sub lethal doses of glyphosate-based herbicide in the ponds in which brood stock were maintained. Also, since the E₂ levels were lower at the exact moment that T levels increased, data also suggest that, at least in part, the disruption in E₂ appears to be generated by inhibition of P450_{arom} activity, and also seems to be reversible. At this stage, more studies, including in vitro assays, are necessary the complete elucidation of stress-induced inhibition of R. quelen steroid profiles and this will be the focus of continuing studies.

INTRODUCTION

The jundiá (Rhamdia quelen) is a Siluridae fish commonly found in rivers and natural or artificial ponds in the southern part of South America. Because of its high prolific rates and high weight gain in the warmer months, jundiá has become intensively cultured and have even been used as a model to improve management of several fish of this family (Gomes et al., 2000). However, most ponds are located near or inside agricultural areas or are fed with water springs that runs through cultivated areas; thus, water contamination with herbicides associated with poor management and stressful raising conditions are amongst the main cause of reduced productivity in many farms.

Stress response is the reaction of the organism to a variety of adverse factors, called stressors, and comprises a number of physiological processes coordinated by the hypothalamus – pituitary – interrenal cells (HPI) axis. Cortisol (F), as the main end product of the HPI axis in teleost fish, exert several physiological actions (as reviewed by Barton and Iwama, 1991 and Wendelaar Bonga, 1997) and has been measured in fish blood to evaluate the stress response to several stimuli. In *R. quelen*, stress response has already been evaluated in several ages and phases of life cycle (Barcellos *et al.* 2001a, b; 2002; 2003, 2004a, b, and *in press*).

Besides stress, the environment in which fish are raised is continuously loaded with foreign chemicals originated from agricultural activities (Van der Oost *et al.*, 2003); classical laboratory tests for endpoints ecotoxicity are based on survival, growth and reproduction of individual. Herbicides have the potential to cause a large disruption of the ecological balance causing damage to a variety of non-target organisms including fish (reviewed by Crestani *et al.*, *in press*). Several types of herbicides are used in summer cultures (soybean and corn) in South America but glyphosate is the most widespread mainly following the introduction of glyphosate-resistant transgenic soybean.

Glyphosate is a herbicide used in several cultures for the selective control of mono and dicotyledonous and has been considered relatively secure (Giesy *et al.*, 2000); however, in native species as the jundiá, studies aiming to evaluate eventual effects of this herbicide are scarce. Glyphosate may reach water bodies because of its use in agriculture and/or direct application in the water to control macrophyte plants (Szarek *et al.*, 2000).

In teleost females, there are several different ovarian steroids that play different roles at different stages of oocyte development. The best known is 17 β -estradiol (E₂), produced by the follicular layer, which induces the production and secretion of vitellogenin (Vtg), a yolk precursor protein synthesized by the liver (Wallace, 1985). In addition, testosterone (T) has been reported in the plasma of a number of female teleosts (Rinchard *et al.*, 1993), acting as substrate for E₂; testosterone production is explained by a two-cell type model, where the thecal cell layer, under influence of gonadotropins, secrete T which is converted to E₂ by the cytochrome P450-aromatase (P450_{arom}) in the granulosa cell layer (Nagahama, 1987). The P450_{arom} is also the key enzyme in ovarian differentiation and sex determination and also in sex reversal of protogynous fish species (as reviewed by Watts *et al.*, 2004). The pattern of E₂ and T secretion and the phases of the productive cycle, in *R. quelen*, have already been determined (Barcellos *et al.*, 2001b).

Regarding chemical pollutants, Kime (1995) postulated that the sub lethal pollution might result in a disturbance of the reproductive endocrine systems. The hormone regulation of reproduction may be impaired as a consequence of exposure to environmental pollutants (Spies *et al.*, 1990) and the physiological response of a female to stress could have considerable consequence in their reproductive performance (Schreck *et al.*, 2001), including a suppressive effect on reproductive endocrinology (Carragher and Sumpter, 1990; Pottinger and Pickering, 1990).

Considerable work has been done on acute stress responses and its effects on fish reproduction (Pankhurst, 2001); however, very few studies have been

conducted with chronic stressors and chronically effects on fish reproduction. Suppressive effects of F on E₂ synthesis and/or secretion have been related by several authors (Carragher and Sumpter,1990; Pottinger and Pickering, 1990). In contrast other authors as Pankhurst ***et al.*** (1995) not founded any evidence for F suppression in vitellogenesis.

Since stress and chemical contamination can negative modulates fish reproduction, the aim of the present work was to determine the F response to chronic handling stress and to exposition to glyphosate-based herbicide and its relationship with E₂ and T concentrations during the vitellogenesis period in field conditions.

METHODS

The objective of the experimental design of this study was to reproduce the exact environment (earthen ponds, 100 m², 1.2m deep) and management conditions (noise, crowding, chasing, daily handling for capture of females to induce reproduction) of R. quelen hatcheries in southern South America. The fish group exposed to sub lethal glyphosate concentration aimed to reproduce the entrance of this herbicide in culture ponds, similar to that caused by aerially application in soybean cultured near to ponds during R. quelen reproductive cycle (Sept-Apr, Barcellos ***et al.***, 2001b; 2002).

This study was conducted between September 2004 and April 2005, at the facilities of the University of Passo Fundo, Rio Grande do Sul, Brazil (28°15'S / 52°24'W, 687 m asl).

The fish used in the present study were adult females jundiá (2nd reproductive cycle) weighing between 200 and 600g. They were kept in 100m² tanks with one meter of maximum depth at a rate of 1 fish/2m². The water flow rate was 6 l/min and the level of dissolved oxygen varied from 5.0 to 7.0 mg/l and the pH from 7.0 to 7.2. The fish were fed once a day ad libitum with commercial fish pellets (30% of crude protein, Alisul Rações Ltda. Brazil).

To prevent deleterious effects of glyphosate on natural water bodies, the water exchanged in each tank remained by at least 30 days on an isolated, impermeable lagoon for evaporation and glyphosate turnover, and after that it was percolated in the soil.

The treatments tested were: chronic handling stress (HS), provoked by daily handling with a pen net, and to chemical contamination (RE) with glyphosate-based herbicide (RoundupWG[®]) at a concentration of 3.6 mg/L corresponding to 50% of the CL_{50-96h} for R. quelen (7.2 mg/L; Kreutz *et al.*, 2006, submitted). To maintain the glyphosate concentration, the product was reapplied in the ponds with 9 days intervals, based on estimated half-life of the active principle (Rodrigues and Almeida, 1998). A third treatment was the control group (CT) that did not receive any physical or chemical challenges.

Sampling schedule and procedures

Four females (eight per treatment) of each pond were sampled at day 0 and 1, 10, 20, 30 and 40 days following the beginning of exposure to the stressors. The fish were captured with a pen net in the early morning (0800h) and immediately anaesthetized with buffered MS222 (Finquel[®] Sandoz, 300 mg/l). After the

anesthetic immobilization of the fish, blood samples (2-5 ml) were taken from the caudal vein using sterile syringes, and transferred to assay tubes with and without EDTA. The biochemical analyses were made with fresh samples, and part of plasma was stored at -25°C .

Cortisol (F), 17β -estradiol (E_2) and testosterone (T) were measured in duplicate samples in serum samples using a commercial EIA kits. These kits were validated for jundiá serum samples in a previous work (Barcellos *et al.*, 2004).

After blood collection, the fish were killed by spinal section and decapitation and both ovaries removed and weighed ($\pm 0.001\text{g}$) and the gonado-somatic index (GSI) calculated as the gonad weigh (GW) divided by total body weight (BW) multiplied by 100 ($\text{GSI} = \text{GW}/\text{BW} \times 100$). Simultaneously, the liver was also removed, weighed ($\pm 0.001\text{g}$) and the liver-somatic index (LSI) calculated as the weight of liver (LW) divided by total body weight (BW) and multiplied by 100 ($\text{LSI} = \text{LW}/\text{BW} \times 100$).

Histological analysis – a small piece of ovaries removed for GSI calculation, was fixed in Bouin's solution for 24 h for histological examination. Tissues were embedded in paraplast[®], cut into $5\mu\text{m}$ sections and stained with hematoxylin-eosin.

Fertility - after the 40th day of experiment, all remaining females of each treatment were captured for hormonal induction, oocyte stripping, fertilization and incubation, following the protocol used by the Aquaculture Laboratory for *R. quelen* commercial production of fingerlings; the semen of several males, not stressed neither exposed to glyphosate-based herbicide, were mixed in order to diminish the “male effect” on fertility rate. Fertility was observed as the number of swim-up fry at

the time they were transferred to external ponds, divided by the number of oocytes stripped out of each female, counted immediately before fertilization, as number of oocytes/g multiplied by oocyte mass weight. The diameter of the oocyte was not measured. Data are expressed in percentile.

Data Analysis

All data are expressed as means $\pm$ S.E.M. Data was statistically analyzed by an analysis of variance (ANOVA) followed by the comparison of means using Tukey's multiple range tests (Zaar, 1996), at a significance level of 0.05. A Hartley test was carried out to verify the homogeneity of variance, and a log-transformation was performed when necessary.

RESULTS

Gonado-somatic Index and Liver-somatic Index (GSI, LSI Table I)

GSI values varies from $3.97 \pm 0.32\%$ to $9.27 \pm 0.98\%$ in control group; in the HS and HE groups, GSI values ranged from $5.79 \pm 1.12\%$ to $12.64 \pm 1.05\%$ and $5.07 \pm 1.37\%$ to $9.61 \pm 1.48\%$, respectively. Statistically, there was no difference between groups in any specific sampled days. LSI followed a similar pattern, overall varying from $1.22 \pm 0.49\%$ to $2.36 \pm 0.40\%$. Although no statistical difference could be observed, the LSI was higher in the HE group, except in the 30th day of the experiment.

Maturational Stages

In the histological examination, perinucleolus at primary and secondary stages, cortical alveoli and vitellogenic oocytes were found. Based in this features and the macroscopic appearance of ovary and on the Gonadosomatic Index (GSI),

the experimental females stage was considered as “vitellogenesis”, following the classification proposed previously (Barcellos *et al.*, 2001a).

Hormonal profiles

Cortisol (Fig.1A)

A typical stress response was observed ten days after the beginning of handling (physical stress), with F values reaching 123.43 ± 21.12 ng/mL, much different from CT values ($P < 0.001$). After this day, F values from CT increased not significantly, but approximate of HG and RE values, did not differ between three treatments in all sample days (Fig. 1A). Cortisol concentrations in HE group increased up to 168.87 ± 36.70 ng/mL in 40th day, significantly higher than other days ($P < 0.01$).

17 β -estradiol (Fig. 1B)

Levels of E₂ were statistically different among groups only at the 10th day in which HS E₂ values decreased to 1.99 ± 0.55 ng/mL, a value significantly lower than CT and HE groups. After the 10th day values did not differ between treatments (Fig. 1B). High negative correlation ($r = - 0.9838$) was found between F and E₂ concentrations at the 10th day in HS group.

Testosterone (fig. 1C)

Similarly to E₂, T levels showed statistic differences among groups only at the 10th day, in which T values of the HS group increased to 12.5 ± 1.49 ng/mL, a value significantly higher than that observed for the CT and HE groups. After this day, values did not differed among treatments (Fig. 1C). High negative correlation

($r = -0.90182$) was found between E_2 and T concentrations at 10th day in the HS group.

Fertility, table 2

The females that were subjected to chronic handling stress (HS group) had a lower response to hormonal induction than the females from the CT and HE group. Also, from the HS females, a lower number of oocytes were stripped in relation to CT and HE females and, from these oocytes, a lower number of swim-up fry reached the stage to be transferred to earthen larviculture ponds than from the CT and HE female groups.

DISCUSSION

Animal reproduction is regulated by a complex interplay of several hormones that might be, individually or collectively, up or down regulated by management and environmental factors. Amongst well-known reproduction-interfering management factors are stressful raising conditions that induce an increase in cortisol response and might interfere with reproduction parameters. Report on disrupted reproduction caused by acute stress have been frequent for several fish species (Carragher and Sumpter, 1990; Pottinger and Pickering, 1990; Pankhurst, 2001), however, few study have been conducted aiming to investigate the effect of chronic stress or chemical pollutants on fish reproduction (Watts *et al.*, 2004).

The GSI has been used as a useful index for monitoring the progression of the gametogenesis in female teleost fish. In the present study, the GSI of Rhamdia quelen females reached similar values in the three treatments tested (chronic

stress, glyphosate exposure and control group), without differences between control and treatment groups. The higher value of $12.64 \pm 1.05\%$ of the body weight was very similar to previously found in the same specie ($12.28 \pm 0.76\%$, Barcellos *et al.*, 2001a). As expected, values of E_2 were also very similar to those previously reported (Barcellos *et al.*, 2001a), typical of the vitellogenesis stage.

Considering the macroscopic appearance of ovary, the GSI and the types of oocytes found in histological examination, the reproductive stage of experimental females were considered as “vitellogenesis” following a classification proposed by Barcellos *et al.* (2001a). Even though no statistical difference was observed on the LSI between treatments, the higher numerical levels found in the HE group, in all days (except 30th) tested, is consistent with data reported previously (reviewed by Slooff *et al.*, 1983) that established a relationship between liver enlargement, caused by hepatocyte hypertrophy, and exposure to chemical pollutants.

Cortisol levels were higher in HS group only at the 10th day. After this day, CT fish also showed elevated F levels, probably because of human interference of management and of stress application in adjacent ponds. From the data obtained, it seemed that the pattern of F secretion did not interfered with the E_2 and T levels in all other sampled days. Pickering and Pottinger (1989) reported that the F concentrations in truly unstressed fish could be < 1 ng/ml. Such low concentrations can only be achieved, however, if the fish are removed from all forms of human interference (including sight and sound) for at least two weeks. These were far from the conditions used in the present study – which accounts for the high F values of the CT group and the even higher values in the experimental tanks.

Only in the 10th day of consecutive handling the E₂ levels were significantly lower in comparison to control and HE group. Interestingly, just in this day the HS females presented higher F level in contrast to CT ones. The correlation between F and E₂ levels in this day was higher than 98%. This fact is an indication of endocrine disrupted E₂ production and/or release. The suppression of E₂ synthesis and/or secretion by cortisol has been reported previously for rainbow trout (Oncorhynchus mykiss; Carragher and Sumpter, 1990), which also postulated that the cortisol might act directly in the follicle or in the steroidogenic pathway. In the same fish, Pottinger and Pickering (1990) reported that the suppressive effect of F on vitellogenesis might be due to a reduction of ligand sites for E₂ in the liver. In contrast, Pankhurst ***et al.*** (1995) working with in vitro conditions, found no evidence for F suppression of vitellogenesis in Cyprinus carpio, Carassius auratus and Pagrus auratus.

The T levels found in the present study were very similar to that previously determined for R. quelen females that were not in the first reproductive cycle (puberty); an increasing pattern of T secretion is in accordance with the progression of the vitellogenesis (Barcellos ***et al.***, 2001b).

The chronic pattern of our experiment combined with the field condition employed, provoked a wide range of systemic effects of F and made unclear whether this reflected a direct effect on reproduction, or secondary effects of immune suppression and metabolic changes provoked by continuously elevated F levels (reviewed in Pankhurst and Van Der Kraak, 1997).

However, the concomitant reduction on E₂ and increase in T levels implies inhibition of cytochrome P450-aromatase (P450_{arom}), which catalyses the T to E₂

conversion step (Simpson *et al.*, 1994), that appears to be reversible, since the E₂ and T levels tend to normalize at the 20th day. The inhibition of P450_{arom} caused by thermal stress is reported in Salmo salar, also with concomitant reduction of E₂ and increase of T levels (Watts *et al.*, 2004).

In an extensive review, Kime (1995) indicated that sub lethal pollution might result in a disturbance of the reproductive endocrine system; however, analyzing the data herein reported, this hypothesis does not apply to R. quelen exposed to glyphosate-based herbicide. Giesy *et al.* (2000) postulated that glyphosate-based herbicide does not show bioaccumulation in terrestrial and aquatic animals; thus, because of those features and of low cost and low environmental toxicity, this type of herbicide is used worldwide. Nonetheless, an eventual disruption of the endocrine system of R. quelen, using higher glyphosate doses for prolonged period of time shall not be discharged; however, because of the herbicide dosage and biodegradability characteristics, fish exposure to higher doses should be a rare event.

Regarding fertility, chronic stress and consequent E₂ disruption, appeared to affect both the number and the quality of the gametes, since a lower number of oocytes were stripped from HS and from these fertilized eggs, a lower number of viable swim-up fry were transferred to earthen larviculture ponds. This decreased reproductive efficiency may have occurred due to inhibition of E₂-dependent processes during early vitellogenesis (10th day of experiment) that might be, at least partially reversible, in that several HS females concluded the vitellogenesis and successful spawn.

Oocyte diameter was not measured but they were highly homogeneous (data not shown); however, the poor reproductive performance of the HS group of females could be related to decreased vitellogenin (Vtg) synthesis caused by E₂ decrease in early vitellogenesis and, consequently to smaller eggs, as also found for *Salmo salar* (Watts *et al.*, 2004) and for *Oncorhynchus mykiss* (Campbell *et al.*, 1992; Contreras-Sanchez *et al.*, 1998), however, repeated stress application during the entire vitellogenic period caused no effect on egg size and egg fecundity (Contreras-Sanchez *et al.*, 1998). The effect of stress verified in *R. quelen* appeared to be more related to absolute number of oocytes and egg viability, expressed as small number of swim-up fry from HS females.

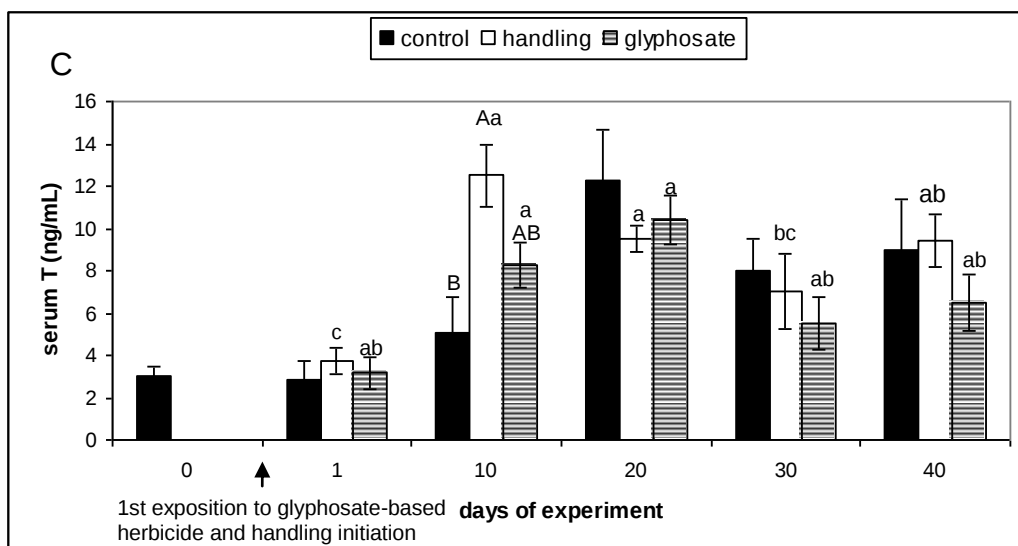
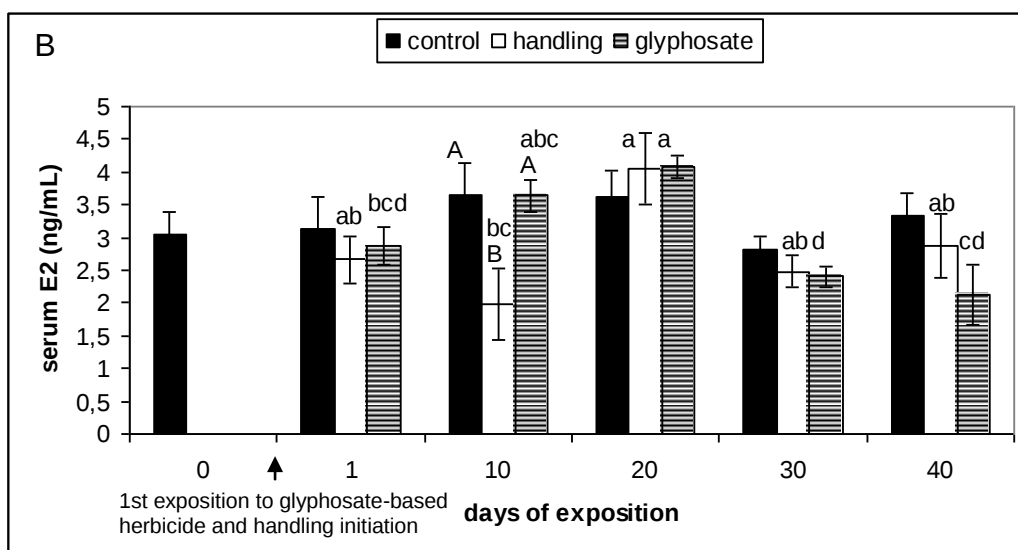
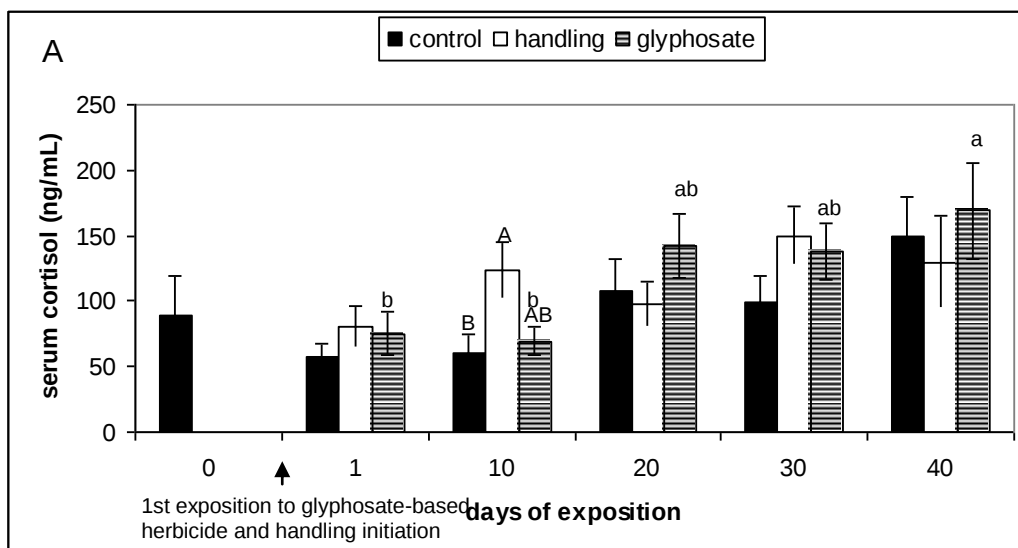
The percentile of swim-up fry from CT group females was very similar to that obtained during routine production of jundiá fingerlings (80-85%, unpublished data). In addition, chronic exposure to glyphosate-based herbicide had no effect on the oocyte and swim-up fry number and viability.

Based on the results presented herein, the non-planned stressful management of hatchery seems to be more harmful to *R. quelen* reproduction than the eventual entrance of sub lethal doses of glyphosate into the tanks; furthermore, the chronic and/or repeated exposure to stress can negatively alter jundiá reproduction, pointing to the need of well planned management of brood stocks in order to prevent the deleterious effects of cumulative stress, mainly during the vitellogenesis period. Also, since the E₂ levels decreased at the exact moment that T levels increased, it suggest that, at least in part, the disruption in E₂ appeared to be generated by inhibition of P450_{arom} activity, which could be reversible. At this stage, more studies, including *in vitro* assays, are necessary to the complete

elucidation of stress-induced inhibition of R. quelen steroid profiles, and this will be the focus of continuing studies.

Figure captions

Figure 1. Serum levels (mean + SEM, n = 8) of cortisol (A), 17 β -estradiol (B) and testosterone (C) in Rhamdia quelen submitted to chronic stress or to chronic exposition to an glyphosate-based herbicide, and control group, at the 1st, 10th, 20th, 30th and 40th day after beginning of stress and herbicide exposure. Different capital letters within the same day indicates statistical difference between treatments in this specific day and different small letters within treatments indicates statistical differences between different days of experiment. Anova, followed by Tukey's multiple range test, (P<0,05).



Tables

Table 1. Values (mean $\pm$ S.E.M.) of Gonado-Somatic index (GSI) and Liver Somatic Index (LSI) in percentile (%), in control, handling stressed, and glyphosate-based herbicide exposed groups, at the 0, 1st, 10th, 20th, 30th and 40th day of the experiment.

		Days after exposition					
	Treatment*	0	1	10	20	30	40
GSI (%)	CT	6.75 $\pm$ 1.30	3.97 $\pm$ 0.32	6.39 $\pm$ 1.32	8.85 $\pm$ 0.68	7.41 $\pm$ 1.63	9.27 $\pm$ 0.98
	HS		6.54 $\pm$ 1.07	5.79 $\pm$ 1.12	7.30 $\pm$ 1.25	10.02 $\pm$ 1.50	12.64 $\pm$ 1.05
	HE		5.07 $\pm$ 1.37	6.48 $\pm$ 0.76	8.46 $\pm$ 1.89	9.35 $\pm$ 1.89	9.61 $\pm$ 1.48
LSI (%)	CT	1.99 $\pm$ 0.31	1.70 $\pm$ 0.17	1.82 $\pm$ 0.12	1.74 $\pm$ 0.22	1.76 $\pm$ 0.31	1.46 $\pm$ 0.13
	HS		1.22 $\pm$ 0.19	1.81 $\pm$ 0.35	2.04 $\pm$ 0.38	2.02 $\pm$ 0.18	1.36 $\pm$ 0.08
	HE		1.81 $\pm$ 0.17	2.36 $\pm$ 0.40	2.09 $\pm$ 0.39	1.73 $\pm$ 0.15	1.63 $\pm$ 0.15

* CT, control group; HS, handling stressed group; HE, glyphosate based herbicide exposed group.

Table 2. Females responsible to hormonal induction (%), mean number of oocytes stripped and mean number and % of swim-up fry transferred to larviculture ponds in control, chronic stressed and glyphosate based herbicide chronic exposed females.

	CT	HS	HE
Females induced	42	42	42
Females responsive	38	24	34
to induction (%)	(90%)	(57%)	(80%)
Oocytes stripped by female	8,100 $\pm$ 250 A	6,480 $\pm$ 250 B	7,890 $\pm$ 190 A
Transferred swim-up fry (%)	6,654 $\pm$ 168 A (82.15% $\pm$ 2.1)	3,990 $\pm$ 489 B (61.58% $\pm$ 7.55)	5,577 $\pm$ 497 A (70.69% $\pm$ 6.03)

* CT, control group; HS, handling stressed group; HE, glyphosate based herbicide exposed group.

Different capital letters in the line indicated statistically different means (Anova, Tukey's multiple range test).

REFERENCES

- Barcellos, L.J.G., Wassermann, G.F., Scott, A.P., Woehl, V., Krieger, M.H., Quevedo, R.M., Lulhier, F. 2001a. Steroid profiles of cultured female jundiá, the Siluridae Rhamdia quelen (Quoy and Gaimard, Pisces, Teleostei) during the first reproductive cycle. Gen.Comp.Endocrinol.121, 325-332.
- Barcellos, L.J.G., Woehl, V.M., Wassermann, G.F., Krieger, M.H., Quevedo, R.M., Lulhier, F. 2001b. Plasma levels of cortisol and glucose in response to capture and tank transference in Rhamdia quelen (Quoy & Gaimard), a South American Catfish. Aqua.Res.32(3), 123-125.
- Barcellos, L.J.G., Wassermann, G.F., Scott, A.P., Woehl, V.M., Lulhier, F., Quevedo, R.M., Ittzés, I., Krieger, M.H. 2002. Plasma steroid concentrations in relation to the reproductive cycle of cultured male Rhamdia quelen. J. Fish Biol. 61(3), 751-763.
- Barcellos, L.J.G., Kreutz, L.C., Rodrigues, L.B., Fioreze, I., Quevedo, R.M., Cericato, L., Conrad, J., Soso, A.B., Lacerda, L.A., Terra, S. 2003. Haematological and biochemical characteristics of male jundiá (Rhamdia quelen Quoy & Gaimard Pimelodidae) and hormonal and biochemical changes after acute stress. Aquac.Res.34, 1465-1469.
- Barcellos, L.J.G., Kreutz, L.C., Quevedo, R.M., Fioreze, I., Soso, A.B., Cericato, L., Fagundes, M., Conrad, J., Baldissera, R., Bruschi, A., Ritter, F. 2004a. Nursery rearing of jundiá, Rhamdia quelen (Quoy & Gaimard) in cages: cage type, stocking density and stress response to confinement. Aquaculture, 232(1-4), 383-394.

- Barcellos, L.J.G., Kreutz, L.C., Quevedo, R.M., Fioreze, I., Rodrigues, L.B., Soso, A.B., Ritter, F., Conrad, J., Cericato, L., Fagundes, M., Lacerda, L.A., Terra, S. 2004b. Hematological changes in jundiá (Rhamdia quelen Quoy & Gaimard Pimelodidae) provoked by usual aquaculture practices, with emphasis on immunosuppressive effects. Aquaculture, 237(1-4), 229-236.
- Barcellos, L.J.G., Kreutz, L.C. and Quevedo, R.M. Previous chronic stress does not alter the cortisol response to an additional acute stressor in jundiá (Rhamdia quelen, Quoy & Gaimard) fingerlings. Aquaculture, In press.
- Barton, B.A. and Iwama, G.K. 1991. Physiological changes in fish from stress in aquaculture with emphasis on the response and effects of corticosteroids. An.Rev.Fish Dis. 10,3-26.
- Campbell, P.M., Pottinger, T.G. and Sumpter, J.P. 1992. Stress reduces the quality of gametes produced by Rainbow trout. Biol.Reprod., 47, 1140-1150.
- Carragher, J.F. and Sumpter, J.P. 1990. The effect of cortisol on the secretion of sex steroids from cultured ovarian follicles of Rainbow trout. Gen.Comp.Endocrinol. 77,403-407.
- Contreras-Sánchez, W.M., Schreck, C.B., Fitzpatrick, M.S. and Pereira, C.B. 1998. Effect of stress on the reproductive performance of Rainbow trout (Oncorhynchus mykiss). Biol.Reprod., 58, 439-447.
- Giesy, J.P., Dobson, S. and Solomon, K.R. 2000. Ecotoxicological risk assessment for Roundup herbicide. Rev. Environ.Contam.Toxicol., 167,35-110.
- Gomes, L.C., Golombieski, J., Chippari-Gomes, A.R., Baldisserotto, B. 2000. Biologia do jundiá Rhamdia quelen (Teleostei, Pimelodidae). Ciencia Rural, 30(1), 179-185.

- Kime, D.E. 1995. The effects of pollution on reproduction in fish. Rev.Fish Biol.Fish., 5, 52-96.
- Kreutz, L.C., Barcellos, L.J.G., Quevedo, R.M., Anziliero, D., Martins, D., Silva, T.O., da Silva, L.B., Ritter, F., Bedin, A.C., Finco, J.A. Toxicological risk assessment for several products in Rhamdia quelen. I. Acute toxicity tests. Ecotoxicology and Environmental Safety. 2006. Submitted.
- Nagahama, Y. 1987. Gonadotropin action on gametogenesis and steroidogenesis in teleost gonads. Zool.Sci., 4, 209-222.
- Pankhurst, N.W. 2001. Stress inhibition of reproductive endocrine processes in a natural population of the spiny damselfish Acanthochromis polyacanthus. Mar.Fresh.Res., 52(5), 753-761.
- Pankhurst, N.W., Van Der Kraak, G., Peter, R.E. 1995. Evidence that the inhibitory effects of stress on reproduction in teleost fish are not mediated by the action of cortisol on ovarian steroidogenesis. Gen.Comp.Endocrinol. 99,249-257.
- Pankhurst, N.W. and Van Der Kraak, G. 1997. Effects of stress on reproduction and growth of fish. In: "Fish Stress and Health in Aquaculture" (G.K.Iwama, A.D.Pickering, J.P.Sumpter and C.B.Schreck, Eds.), Society for Experimental Biology Seminar Series 62, pp. 73-93.Cambridge Univ.Press, Cambridge, UK.
- Pankhurst, N.W. and Van Der Kraak, G. 2000. Evidence that acute stress inhibits ovarian steroidogenesis in Rainbow trout In Vivo through the action of cortisol. Gen.Comp.Endocrinol., 117, 225-237.

- Pickering, A.D. and Pottinger, T.G. 1989. Stress response and disease resistance in salmonid fish: Effects of chronic elevation of plasma cortisol. Fish Physiol.Biochem. 7(6),253-258.
- Pottinger, T.G. and Pickering, A.D. 1990. The effect of cortisol administration on hepatic e plasma estradiol binding capacity in immature female rainbow trout (Onchorynchus mykiis). Gen.Comp.Endocrinol. 80,264-273.
- Rinchard, J., Kestemont, P.; Kühn, E.R. and Fostier, A. 1993. Seasonal changes in plasma levels of steroid hormones in an asynchronous fish, the gudgeon, Gobio gobio L. (TELEOSTEI, Cyprinidae). Gen.Comp.Endocrinol., 92, 168-178.
- Rodrigues, B.N and Almeida, F.S. 1998. Guia de herbicidas. Londrina, Paraná, Brasil. 648pp.
- Schreck, C.B., Contreras-Sanchez, W. And Fitzpatrick, M.S. 2001. Effects of stress on fish reproduction, gamete quality and progeny. Aquaculture, 197, 3-23.
- Simpson, E.R., Mahendroo, M.S., Means, G.D., Kilgore, M.W., Hinshelwood, M.M., Graham-Lorence, S., Amarneh, B., Ito, Y., Fisher, C., Michael, M.D., Mendelson, C.R. and Bulun S.E. 1994. Aromatase cytochrome P450, the enzyme responsible for estrogen biosynthesis. Endocr.Rev., 15, 342-355.
- Slooff, W., van Kreijl, C.F. and Baars, A.J. 1983. Relative liver weights and xenobiotic-metabolizing enzymes of fish from polluted surface waters in the Netherlands. Aquat.Toxicol., 4, 1-14.
- Spies, R.B., Stegeman, J.J., Rice, D.W., Jr Woodlin, B., Thomas, P., Hose, J.E., Cross, J.N. and Prieto, M. 1990. Sublethal responses of Platichthus stellatus to

- organic contamination in San Francisco Bay with emphasis on reproduction. In: McCarthy, J.F., Shugart, L.R. (eds.), *Biomarkers on Environmental Contamination*. Lewis Publishers. Boca Raton, FL. USA. Pp.87-122.
- Szarek, J., Siwicki, A., Andrzejewska, A., Terech-Majewska, E., Banaszkiewicz, T. 2000. Effects of the herbicide Roundup on the ultrastructural pattern of hepatocytes in carp (*Cyprinus carpio*). Mar. Environm. Res., 50, 263-266.
- Van der Oost, R., Beyer, J. and Vermeulen, N.P.F. 2003. Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review. Environm. Toxicol. Pharmacol., 13:57-149.
- Wallace, R.A. (1985) Vitellogenesis and oocyte growth in nonmammalian vertebrates. In: *Developmental Biology* (Browder, L.W., ed.), vol 1, pp:127-177. New York: Plenum.
- Watts, M., Pankhurst, N.W. and King, H.R. 2004. Maintenance of Atlantic salmon (*Salmo salar*) at elevated temperature inhibits cytochrome P450 aromatase activity in isolated ovarian follicles. Gen. Comp. Endocrinol., 135, 381-390.
- Wendelaar Bonga, S.E. 1997. The stress response in fish. *Physiol. Rev.* 77, 591-625.
- Zaar, J.H. (1996) *Biostatistical Analysis*. New Jersey: Prentice Hall. 800p.