

## EFEITOS DA EXPOSIÇÃO AOS MICROPLÁSTICOS NO DESENVOLVIMENTO EMBRIONÁRIO DE *DANIO RERIO*

Davi Araújo Fernandes<sup>1</sup>

Juliana dos Santos Braz<sup>2</sup>

Maria Gabriela Andreoli Guedes<sup>3</sup>

Talita Sarah Mazzoni<sup>4</sup>

### Saúde Ambiental

#### Resumo

Os plásticos vêm se tornando uma crescente ameaça para o meio ambiente, afetando diversos organismos em quase todos os ecossistemas. Dentre os locais mais afetados destacam-se os ambientes aquáticos, onde as condições adversas transformam grandes pedaços de plásticos em microplásticos. Essas micropartículas entram na cadeia alimentar causando alterações fisiológicas que podem ser irreparáveis. Uma dessas alterações ocorre na reprodução. Foram testadas duas concentrações diferentes de microplásticos em adultos de *Danio rerio* e avaliados os efeitos no desenvolvimento embrionário. Verificou-se uma grande mortalidade de ovos quando adultos foram expostos a uma concentração de 0,5g/L, além de um atraso considerável no tempo de eclosão das larvas frente à exposição dos adultos à concentração de 2,5g/L. Tais resultados reafirmam os perigos destes materiais para os organismos aquáticos, especialmente para os peixes. Novos experimentos se fazem necessários para compreender melhor os mecanismos de ação dos microplásticos.

Palavras-chave: Plástico; Reprodução; *Danio rerio*; *Zebrafish*

<sup>1</sup> Mestrando - Centro de Aquicultura da Unesp - CAUNESP - Jaboticabal, SP – araujodavi995@gmail.com

<sup>2</sup> Graduanda em Ciências Biológicas – Licenciatura – Instituto de Ciências Naturais – UNIFAL – Alfenas, MG - julianabrazareado@gmail.com

<sup>3</sup> Graduanda em Ciências Biológicas – Bacharelado – Instituto de Ciências Naturais – UNIFAL – Alfenas, MG – mariiagabriella97@gmail.com

<sup>4</sup> Profa. Dra. - Departamento de Biologia Celular e do Desenvolvimento - Instituto de Ciências Biomédicas - UNIFAL - Alfenas, MG; talita.mazzoni@unifal-mg.edu.br.

## INTRODUÇÃO

Os efeitos da poluição causada pelos produtos plásticos vêm sendo alvo de diversos estudos nos últimos anos. Sabe-se que estes materiais necessitam de vários anos para se decomporem e que, por isso, acumulam-se nos ecossistemas causando danos em diversos níveis tróficos. Um dos locais mais afetados pelos plásticos são os ambientes aquáticos (WIT et al., 2019). Na água as condições adversas como acidez, radiação solar e intensa movimentação fazem com que os plásticos sejam fracionados em pequenos pedaços, os chamados microplásticos (MPs) que podem medir até 5 mm (IVLEVA et al., 2017; WELDEN, 2020). Estes MPs são facilmente confundidos com alimentos e ingeridos por diversas espécies. Dentro do organismo, os MPs podem causar inúmeras alterações fisiológicas uma vez que liberam ou, até mesmo, transportam substâncias tóxicas (BATEL et al., 2018).

Uma das funções mais importantes para os organismos aquáticos que é afetada pelos MPs é a reprodução. Já foi demonstrado em ostras que a produção de gametas diminui e a viabilidade da prole cai quase pela metade quando os adultos são tratados com MPs (SUSSARELLO et al., 2016). Em peixes sabe-se que os MPs podem ser transmitidos para a prole e causar alterações comportamentais nos embriões (PITT et al., 2018). Porém ainda há muitas descobertas a serem feitas sobre os impactos causados pelos plásticos na reprodução dos organismos aquáticos. Tendo como modelo o *Danio rerio* este estudo objetiva investigar os efeitos dos microplásticos no desenvolvimento embrionário dos peixes de água doce.

## METODOLOGIA

Para a realização deste trabalho foram utilizados 30 machos e 30 fêmeas de peixes da espécie *Danio rerio*, popularmente conhecidos como paulistinhas ou *zebrafish*. Os peixes foram divididos igualmente, 10 machos e 10 fêmeas, entre três aquários de 30 litros. Cada aquário recebeu diferentes concentrações de microplásticos: 0,5 g/L, 2,5 g/L e o controle, sem MPs. Os microplásticos utilizados eram constituídos por polietileno de baixa

densidade, mediam entre 0,5 mm e 5 mm, apresentavam formato irregular, cores diversas e foram obtidos em uma empresa especializada em reciclagem de sacolas plásticas. Durante 20 dias os peixes foram expostos aos microplásticos. Após o tempo de exposição, os animais aptos à desova foram transferidos para aquários individuais de 15 litros.

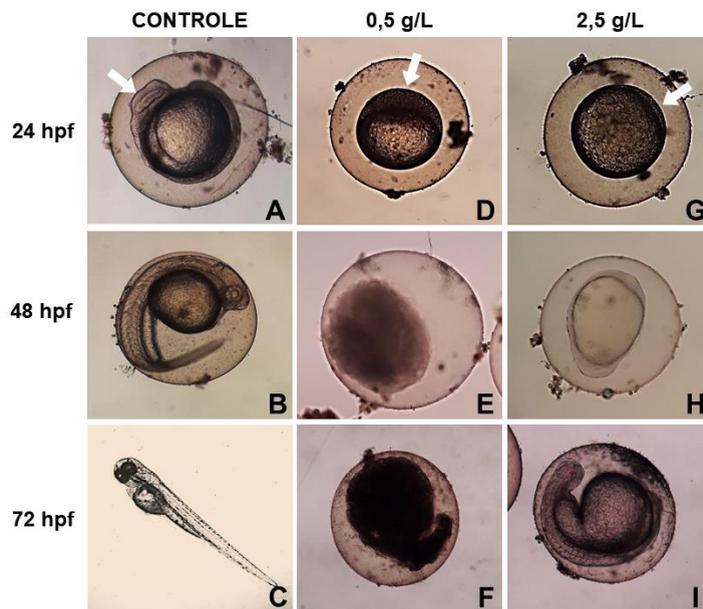
Os aquários de reprodução foram monitorados até que a desova e a fertilização dos ovos fossem concluídas. Decorrido o tempo necessário (2 dias), os adultos foram retirados dos aquários e os ovos foram fotografados diariamente até o nascimento das larvas. O experimento foi aprovado pela comissão de ética (CEUA nº 4503250320 – UNESP).

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

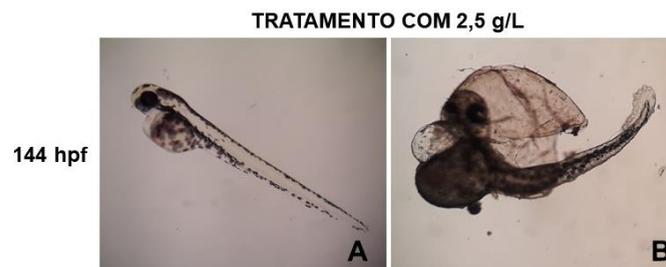
O desenvolvimento embrionário levou até o dobro do tempo para acontecer, quando os adultos foram expostos aos microplásticos antes de desovarem (Figuras 1 e 2). Com 24 horas pós-fertilização (24 hpf), os grupos tratados ainda estavam nos estágios iniciais de desenvolvimento. No primeiro grupo de tratamento (0,5 g/L), o zigoto permanecia no estágio de gastrulação (epibolia) (Fig 1d). Já no segundo grupo de tratamento (2,5 g/L), o zigoto mostrou-se mais atrasado, passando pelo período de clivagem (Fig 1g). No grupo controle, foi possível perceber a formação dos olhos e da cauda (Fig 1a).

A partir do segundo dia de desenvolvimento (48 hpf), os ovos do primeiro grupo passaram a apresentar sinais de morte celular e não concluíram a embriogênese (Fig 1e, f). No segundo grupo, o embrião ainda estava no início do período de segmentação (Fig 1h). Em contrapartida, no grupo controle o embrião já estava com a cauda totalmente formada e foi possível observar seus primeiros movimentos no interior do ovo (Fig 1b).

Com 72 horas pós-fecundação (72 hpf), as larvas do grupo controle eclodiram (Fig 1c). Somente neste momento foi possível perceber a cauda bem pronunciada e se desprendendo do vitelo no segundo grupo de tratamento (Fig 1i). Foram necessários mais três dias para que os embriões do segundo grupo completassem o seu desenvolvimento, e ainda assim somente uma larva conseguiu eclodir (Fig 2a). Os demais indivíduos morreram antes de completar 72 hpf (Fig 2b).



**Figura 1:** Fases do desenvolvimento embrionário de *D. rerio*. (A) Formação dos olhos (apontados pela seta branca), da cauda e dos somitos. (B) Cauda completamente formada, momento em que o embrião realizava seus primeiros movimentos. (C) Larva eclodida após três dias de desenvolvimento. (D) Estágio de epibolia, multiplicação celular apontada pela seta branca. (E) Ovo em estágio de decomposição avançado. (F) Ovo em estágio de decomposição. (G) Período de clivagem celular, apontado pela seta branca. (H) Período de gastrulação. (I) Cauda proeminente e já se separando do vitelo. hpf = horas pós-fertilização. Aumento de 100x em microscópio óptico.



**Figura 2:** (A) Larva eclodida após seis dias de desenvolvimento. (B) Larva com seis dias de desenvolvimento morta antes de eclodir. hpf = horas pós-fertilização. Aumento de 100x em microscópio óptico.

A capacidade do plástico em interferir na reprodução de organismos aquáticos é preocupante. Sabe-se que nanopartículas de poliestireno, pedaços de plástico menores que 100 nm, podem ser passadas da mãe para os filhos, causando disfunções fisiológicas diversas (PITT et al., 2018). Recentemente foi demonstrado que expor ovos de *D. rerio* a MPs de poliestireno pode levar a uma eclosão precoce e a uma menor taxa de sobrevivência das larvas (MALAFAIA et al., 2020). No presente estudo, demonstrou-se que a prole de adultos expostos aos MPs é altamente prejudicada e possivelmente o plástico tem o

potencial de causar danos irreparáveis às espécies aquáticas.

## CONSIDERAÇÕES FINAIS

Embora a presença dos MPs não tenha modificado os padrões de cortejo entre os casais, tampouco influenciado no comportamento reprodutivo e desova, a prole resultante de pais tratados com MPs foi significativamente afetada. Assim, foi demonstrado que os MPs influenciaram o desenvolvimento embrionário do *D. rerio*, atrasando os eventos celulares e impedindo o progresso da diferenciação celular. Como consequência, uma grande quantidade de ovos e embriões não se desenvolveram em tempo hábil e acabaram por morrer. Entretanto, análises mais aprofundadas dos mecanismos envolvidos neste processo se fazem necessárias para mapear os caminhos percorridos pelos MPs dentro dos organismos aquáticos e as suas conseqüentes alterações a nível celular, levando a um impacto significativo na homeostase do organismo como um todo.

## REFERÊNCIAS

- BATEL, A.; BORCHERT, F.; REINWALD, H.; ERDINGER, L.; BRAUNBECK, T. **Microplastic accumulation patterns and transfer of benzo [a] pyrene to adult zebrafish (*Danio rerio*) gills and zebrafish embryos.** Environmental Pollution, v. 235, p. 918-930. 2018.
- IVLEVA, N. P.; WIESHEU, A. C.; NIESSNER, R. **Microplastic in aquatic ecosystems.** Angewandte Chemie International Edition, v. 56(7), p. 1720-1739. 2017.
- MALAFAIA, G.; DE SOUZA, A. M.; PEREIRA, A. C.; GONÇALVES, S.; DA COSTA ARAÚJO, A. P.; RIBEIRO, R. X.; ROCHA, T. L. **Developmental toxicity in zebrafish exposed to polyethylene microplastics under static and semi-static aquatic systems.** Science of The Total Environment, v. 700, p. 134867. 2020.
- PITT, J. A.; TREVISAN, R.; MASSARSKY, A.; KOZAL, J. S.; LEVIN, E. D.; DI GIULIO, R. T. **Maternal transfer of nanoplastics to offspring in zebrafish (*Danio rerio*): A case study with nanopolystyrene.** Science of the Total Environment, v. 643, p. 324-334. 2018.
- SUSSARELLO, R.; SUQUET, M.; THOMAS, Y.; LAMBERT, C.; FABIoux, C.; PERNET, M. E. J.; CORPOREAU, C. **Oyster reproduction is affected by exposure to polystyrene microplastics.** Proceedings of the National Academy of Sciences, v. 113(9), p. 2430-2435. 2016.
- WELDEN, N. A.; LUSHER, A. **Microplastics: from origin to impacts.** In Plastic Waste and Recycling, p. 223-249). Academic Press. 2020.
- WIT, W.; HAMILTON, A.; SCHEER R.; STAKES, T.; ALLAN, S. **Solucionar A Poluição Plástica: Transparência e Responsabilização.** Suíssa: WWF-Fundo Mundial para a Natureza. 2019.