



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA – UnB
FACULDADE DE MEDICINA
PÓS-GRADUAÇÃO EM PATOLOGIA MOLECULAR

**AVALIAÇÃO TOXICOLÓGICA DO HORMÔNIO 17
ALFA METILTESTOSTERONA EM ESPÉCIES
AQUÁTICAS.**

Carla Letícia Gediel Rivero Wendt

Tese apresentada ao curso de pós-graduação em Patologia Molecular da Universidade de Brasília como requisito para a obtenção do título de doutor.

Brasília – DF, 2013



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA – UnB
FACULDADE DE MEDICINA
PÓS-GRADUAÇÃO EM PATOLOGIA MOLECULAR

**AVALIAÇÃO TOXICOLÓGICA DO HORMÔNIO 17
ALFA METILTESTOSTERONA EM ESPÉCIES
AQUÁTICAS.**

Carla Letícia Gediél Rivero Wendt

Orientador: Prof^o Dr. Cesar Koppe Grisolia

Coorientador: Eduardo Cyrino Oliveira Filho

Tese apresentada ao curso de pós-graduação em Patologia Molecular da Universidade de Brasília como requisito para a obtenção do título de doutor.

Brasília – DF, 2013

FICHA CATALOGRÁFICA

Rivero-Wendt, Carla Letícia Gediel

AVALIAÇÃO TOXICOLÓGICA DO HORMÔNIO 17 ALFA METILTESTOSTERONA EM ESPÉCIES AQUÁTICAS.

Tese, Programa de Pós-Graduação em Patologia Molecular- Faculdade de Medicina/ Universidade de Brasília, 2013

Orientador: Cesar Koppe Grisolia

Coorientador: Eduardo Cyrino Oliveira Filho

1. genotoxicidade; 2. marcadores bioquímicos; 3. micronúcleo; 4. molusco; 5. peixes; 6. teste do cometa; 7. 17 alfa metiltestosterona.



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE DE MEDICINA
PÓS-GRADUAÇÃO EM PATOLOGIA MOLECULAR

Tese de doutorado
CARLA LETÍCIA GEDIEL RIVERO WENDT

Título:

Avaliação toxicológica do hormônio 17 Alfa metiltestosterona em espécies aquáticas.

Comissão examinadora:

Prof. Dr. Cesar Koppe Grisolia, Presidente/Orientador - GEM/IB/UnB

Profa. Marta Margareth Cestari, Membro Titular, Depto de Genética Universidade Federal do Paraná, UFPR

Prof. Membro Titular: Osmindo Rodrigues Pires Junior - CFS/IB/UnB

Prof. Membro Titular: Andrea Barretto Motoyama - Faculdade de Farmácia – UnB

Prof. Membro Titular: Carolina Madeira Lucci - CFS/IB/UnB

Brasília, 29 de julho de 2013

Dedico esta tese de doutorado a
todas as mulheres, esposas e
mamães pesquisadoras do
nosso Brasil e do Mundo.

“É tudo um grande mistério, no meio do caminho você acha que não vai conseguir, pois são muitas barreiras para cruzar, mas no fim tudo dá certo”.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus pela força e saúde que me concedeu, desta forma, consegui realizar minha pesquisa, cumprindo todas as obrigações;

Ao meu marido por toda a compreensão e ajuda durante o decorrer de todo o trabalho. Também a minha querida mãe que se manteve presente ajudando sempre e a todos que me apoiaram nos momentos alegres e nos difíceis;

Obrigada a Ingrid Freire e família, amiga querida, pelo carinho, apoio, teto e amizade sem tamanho;

À Universidade de Brasília, pelo espaço físico e incentivo à pesquisa;

Ao meu orientador Cesar Koppe Grisolia, por possibilitar meu amadurecimento científico acadêmico e pela amizade;

À Embrapa Cerrados, por apoiar minha pesquisa;

Ao meu coorientador, Eduardo Cyrino, por me ajudar na pesquisa com caramujos;

Aos meus amigos do Laboratório G-Tox, pessoas maravilhosas que me acompanharam e ajudaram em todos os momentos: Ana Luisa, Ingrid, Flávia, Luciana, Bélin, Adriana, Graciana.

À Universidade de Aveiro, Portugal, por me receberem de braços abertos para desenvolver parte da minha pesquisa;

Ao orientador de Portugal: Amadeu Soares, Obrigada por me ajudar e receber, proporcionando acesso total as instalações do laboratório e materiais necessários para concluir a pesquisa.

Aos amigos de Portugal, brasileiros e portugueses fantásticos: Rhaul, Carolina, Pablo, Fernanda, Marta, Inês e Mônica. Muito obrigada pela ajuda na pesquisa e amizade.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico - CNPq e Tecnológico e à Coordenação de aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior-CAPES, pelo suporte financeiro ao meu projeto de doutorado.

SUMÁRIO

Abreviaturas	
Lista de Tabelas	
Lista de Figuras	
Resumo	
Abstract	
1. Introdução geral	01
1.1. Contaminantes aquáticos e os desreguladores endócrinos	02
1.2. Piscicultura e <i>Oreochomis niloticus</i> no Brasil	03
1.3. O hormônio 17 α -metiltestosterona (MT)	04
1.4. Bioindicadores	07
1.4.1. Peixes	07
1.4.2. Uso de caramujo como bioindicador	11
1.5. Avaliação da genotoxicidade	12
1.5.1. Micronúcleo (MN) e anormalidades nucleares (AN)	12
1.5.2. Teste do cometa	15
1.6. Marcadores bioquímicos	17
2. Justificativa	20
3. Objetivos	23
4. Metodologia	26
4.1. Animais	27
4.2. Hormônio	29
4.3. Teste do micronúcleo (MN) e Anormalidades nucleares (AN)	29
4.4. Teste do cometa	32
4.5. Histologia das gônadas	35
4.6. Desempenho reprodutivo em caramujos	38

4.7. Toxicidade e teratogenicidade da 17 α -metiltestosterona em embriões de <i>Danio rerio</i>	39
4.8. Testes bioquímicos	40
4.9. Testes estatísticos	41
5. Resultados	43
5.1. Toxicidade aguda de cMT	44
5.1.1. Genotoxicidade aguda da cMT	44
5.1.2. Efeitos na reprodução da exposição aguda ao cMT	45
5.2. Toxicidade crônica de cMT	52
5.2.1. Genotoxicidade crônica de cMT em peixes	52
5.2.2. Efeitos crônicos na reprodução (histologia e morfometria de ovócitos maduros e espermatozoides)	54
5.3. Efeitos na reprodução de caramujos expostos ao cMT	64
5.3.1. Desempenho reprodutivo de <i>B. glabrata</i>	64
5.3.2. Análise histológica e morfométrica de ovócitos maduros e espermatozoides de <i>B. glabrata</i> .	65
5.4. Embriotoxicidade de aMT e cMT em <i>Danio rerio</i>	68
5.5. Análise da Toxicidade de aMT e cMT por marcadores bioquímicos (ChE, GST, LDH e VTG) em adultos de <i>Danio rerio</i> .	73
6. Discussão	82
6.1.1. Toxicidade aguda da cMT	83
6.1.2. Efeitos na reprodução da exposição aguda ao cMT	86
6.2. Toxicidade crônica de cMT	86
6.2.1. Genotoxicidade crônica de cMT em peixes	86
6.2.2. Efeitos crônicos na reprodução	88

6.3. Efeitos na reprodução de caramujos expostos ao cMT	89
6.3.1. Desempenho reprodutivo e análise morfológica da <i>B. glabrata</i>	89
6.4. Embriotoxicidade de aMT e cMT em <i>Danio rerio</i>	92
6.5. Análise da Toxicidade de aMT e cMT por marcadores bioquímicos (ChE, GST, LDH e VTG) em adultos de <i>Danio rerio</i> .	96
7. Conclusões	102
8. Referências	105
9. Anexos	132
9.1. Aceites dos artigos científicos	133
9.2. Artigos científicos publicados	135
9.3. Comitê de ética animal da UnB	181
9.4. Artigo científico submetido	182

ABREVIATURAS

A- acino

aMT- ingrediente ativo da metiltestosterona

AN – anormalidade nuclear

CAT-catalase

CDNB- 1 cloro- 2,4 dinitrobenzeno

CG- células germinativas

ChE- acetilcolinesterase

cm - centímetro

cMT- comercial metiltestosterona

DMSO- dimetilsulfóxido

DNA - deoxyribonucleic acid

EC- ensaio do cometa

EDTA - Ethylenediamine tetraacetic acid

ELISA- Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay

EPA – Environmental protection agency

ERO – espécie reativa de oxigênio

FAO – Food and agriculture organization

g- unidade de gravitacional

GDF- Governo do Distrito Federal

GH- glândula hermafrodita

GPx-glutationa peroxidase

GSH – glutationa reduzida

GST-glutationa S transferase

h- horas

H₂O₂- água oxigenada

HAM F10- meio nutritivo

ID- índice de danos

Kg – quilograma

L – litro

LC50- lethal dose

LDH-lactato

LM- lúmen

LMP- low melting point

M- molar

mA- mili amper

MB- membrana basal

mg- miligrama

mM- micro molar

MN – micronúcleo

MT- 17 α -metiltestosterona

N- nucleóides

Na₂HPO₄- fosfato de sódio dibásico

NaCl- cloreto de sódio

NaN₃- trinitreto de sódio

nm- nanometro

°C – grau celsio

ODCE- Organização para desenvolvimento e crescimento economico

OECD – Organisation for economic co-operation and development

oV- ovócito tipo 5

OVA- ovócito atrésico

Pb – chumbo

PBS- Phosphate buffered saline

pH- potencial hidrogeniônico

PO4- fosfato

S- soma

SOD – superóxido dismutase

sp- espermátócito primário

SPSS- Statistical Package for the Social Sciences

sptz- espermatozóides

ss- espermátócito secundário

st- espermátide

sz-espermatozóide

TBT – tributil estanho

TCD- tecido conjuntivo denso

TCF- tecido conjuntivo frouxo

UB- unidades de Bergmeyer

ug – micrograma

uL- microlitro

um- micrometro

V- volt

VTG -vitelogenina

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Genotoxicidade da MT em *O. niloticus*, mostrando os resultados de MN, AN e Teste do cometa depois da exposição por 96h.

Tabela 2. Genotoxicidade da cMT em *A. bimaculatus*, mostrando os resultados de MN, AN e Teste do cometa após 96h de exposição.

Tabela 3. Análise morfométrica das gônadas de machos da espécie *Oreochromis niloticus*, expostos por 96 horas as concentrações de cMT

Tabela 4. Análise morfométrica das gônadas de machos de *Astyanax bimaculatus*, expostos por 96 horas as concentrações de cMT.

Tabela 5. Avaliação de MN, AN e cometa, através da exposição por 28 dias, via ração contaminada com cMT.

Tabela 6. Avaliação de MN, AN e cometa dos alevinos de *Oreochromis niloticus* expostos por 28 dias, via ração contaminada com cMT na piscicultura.

Tabela 7. Análise morfométrica dos ovócitos maduros e produção de espermatozóis em *Oreochromis niloticus* and *Astyanax bimaculatus*.

Tabela 8. Médias e desvios padrões (DP) das áreas ocupadas por ovócitos maduros e espermatozóides nas gônadas de *Biomphalaria glabrata*, com ou sem exposição ao cMT.

LISTA DE FIGURAS E GRÁFICOS

Figura 1. Micronúcleo em células de eritrócitos de sangue periférico de *Oreochromis niloticus rendalli*, corados com Giemsa a 5%.

Figura 2. Formação de micronúcleo em eritroblasto. (a) ação do agente clastogênico com quebra cromossômica. (b) ação do agente no fuso mitótico. FONTE: Fenech, 2000.

Figura 3. Espécie exótica (alvo) *Oreochromis niloticus*.

Figura 4. Espécie nativa *Astyanax bimaculatus*.

Figura 5. Exemplar da espécie *Biomphalaria glabrata*.

Figura 6. Ilustração de um peixe adulto da espécie *Danio rerio*.

Figura 7. Representação das anormalidades nucleares analisadas nos eritrócitos periféricos de *O. niloticus*. (a) núcleo binucleado; (b) núcleo “notched”; (c) núcleo “lobed”; (d) núcleo “blebbed”.

Figura 8. Classificação dos níveis de fragmentação do DNA segundo o grau de lesão.

Figura 9. Três desovas de *B. glabrata* com uma média de 15 ovos cada FONTE: tese de doutorado (Oliveira-Filho, 2003).

Figura 10. Microfotografia de fêmea de *Oreochromis niloticus* do controle em maturação inicial, evidenciando ovócito tipo 5 (oV) com descolamento do tecido conjuntivo (indicado pela seta). Aumento 100x.

Figura 11. Microfotografia mostrando macho de *Oreochromis niloticus* do controle, em maturação, sendo possível observar cistos de espermatócito primário (sp), espermatócito secundário (ss), espermátides (st) e espermatozóides (sz). Aumento de 400x.

Figura 12. Microfotografia mostrando macho de *Oreochromis niloticus* exposto à concentração de 0,1 mg/L de cMT. Observado gônada em maturação inicial, com presença de cistos de espermatócitos primário (sp) e secundário (ss). Aumento 400x.

Figura 13. Microfotografia de gônadas maduras, fêmea de *Astyanax bimaculatus* do controle (a) e exposta ao MT (b), com a presença de vários ovócitos tipo 5 (oV), aumento de 100x.

Figura 14. Microfotografia mostrando macho de *Astyanax bimaculatus*, controle (a) e exposto 0,01mg/L de cMT (b), presença de sz observado no aumento de 400x.

Figura 15. Gônadas femininas de *Oreochromis niloticus* durante a coleta de material para análise histológica. (a) fêmea de *Oreochromis niloticus* do grupo controle; (b) fêmea de *Oreochromis niloticus* do grupo exposto a ração com cMT.

Figura 16. Observação das gônadas femininas de *Astyanax bimaculatus* durante a coleta de material para análise histológica. (a) fêmea de *Astyanax bimaculatus* do grupo controle; (b) fêmea de *Astyanax bimaculatus* do grupo exposto a ração com cMT.

Figura 17. Microfotografia mostrando gônadas femininas de *Oreochromis niloticus* (a e b). (a) fêmea do controle; (b) fêmea tratada com ração com cMT. (a) desenvolvimento normal do tecido ovariano em fêmeas de *Oreochromis niloticus* do grupo controle. (b) degeneração do tecido ovariano de fêmeas adultas de *Oreochromis niloticus* expostas à 60mg/L cMT por 28 dias. As setas significam degeneração ovariana. Aumento de 400x.

Figura 18. Microfotografia mostrando gônadas femininas de *Astyanax bimaculatus*. (a) ovócitos tipo V de fêmeas do grupo controle; (b) ovócitos tipo V do grupo tratado com ração contendo cMT. Aumento de 400x.

Figura 19. Microfotografia mostrando gônadas de machos de *Oreochromis niloticus*. (a) macho do grupo controle; (b) macho do grupo exposto por 28 dias ao cMT. Aumento de 400x.

Figura 20. Microfotografia mostrando gônadas de macho de *Astyanax bimaculatus*. (a) machos do grupo controle, presença de sz no interior dos túbulos seminíferos; (b) machos de *Astyanax bimaculatus* expostos por 28 dias ao cMT. Aumento de 400x.

Figura 21. Médias acumulativas do número de ovos (A) e desovas (B) produzidos por *B. glabrata* reprodutivamente maduros expostos ao cMT e etanol/água por 4 semanas. Um asterisco (*) indica que houve diferença entre as médias ($p < 0.05$ ANOVA e teste com múltiplas comparações de Dunnett's) em relação ao controle (0 mg/L) em 4 semanas.

Figura 22. Os cortes transversais das gônadas hermafroditas da *B. glabrata* em dois grupos controles e três grupos de exposição ao cMT por 4 semanas. A) controle sem álcool – na parte interna da gônada há presença de tecido conjuntivo frouxo e vários ácinos delimitados por uma membrana basal associada com epitélio pavimentoso cúbico, apresentando células germinativas pareadas dentro do ácino, na parte mais interna estão os ovócitos e espermatozoides; B) controle com álcool – não há alterações morfológicas; C) 0,01 mg/L – degeneração da membrana basal e regressão das células germinativas; D) 0,1 mg/L – deslocamento de células germinativas e formação do lúmen; E) 1 mg/L - colapso da membrana basal liberando o conteúdo dos lóbulos internos seguidos pela compactação de tecido conjuntivo frouxo (TCF) em tecido conjuntivo denso (TCD), o aumento da produção de esperma e da produção contínua de ovócitos, células estaminais crescentes e formação do lúmen (LM). Células germinativas (CG), espermatozóides (sptz) gônada hermafrodita (GH), lúmen (LM), membrana basal (MB), ovócitos (OV), ovócitos atresícos (OVA).

Figura 23. Visão geral dos efeitos do produto ativo metiltestosterona (aMT) e do produto comercializado (cMT) nos embriões e larvas de *D. rerio* durante 144 h (6 dias) de exposição. “Sol” refere-se ao controle com solvente (DMSO).

Figura 24. Gráfico demonstrando o percentual de eclosão dos ovos de *D. rerio* expostos ao produto ativo (aMT) e comercial da metiltestosterona (cMT). A linha com ponto cheio representa o 3º dia de exposição e a linha com ponto vazio 4º dia.

Figura 25. Comparação dos resultados da análise teratológica dos peixes expostos ao aMT e cMT, no quinto dia de exposição. No quinto dia, os embriões da concentração 13 mg/L de aMT já estavam todos mortos. “Sol” significa solvente.

Figura 26. Malformações embrionárias, tais como atraso no desenvolvimento da cabeça, dia 02 na concentração de 9mg/L de aMT, aumento de 4x (a), controle, dia 02, aMT, aumento de 4x (b), deformidades da cauda, dia 03, 7mg/L de cMT, aumento de 4x (c), controle dia 03, cMT, aumento 4x (d), edema cardíaco, dia 05, 9mg/L de cMT, aumento de 3x (e), controle dia 05 de cMT, aumento 3x (f).

Figura 27. Gráficos representam os resultados obtidos na análise de marcadores bioquímicos, realizado em embriões expostos ao ingrediente ativo da MT e ao produto comercializado no Brasil (cMT). Os asteriscos (*) referem-se aos resultados estatisticamente significativos para as atividades de ChE e LDH.

Figura 28. Atividade da VTG em embriões expostos ao ingrediente ativo da metiltestosterona (aMT) e produto comercializado no Brasil (cMT). Os (*) estão representando os resultados estatisticamente significativos em relação ao controle.

Figura 29. Atividade da Glutathione S transferase (GST) em machos e fêmeas de zebrafish, em diferentes órgãos (brânquias, intestino, cabeça e músculo), expostos ao aMT e cMT. Os asteriscos (*) representam os resultados estatisticamente significativos em relação ao controle negativo.

Figura 30. Atividade da colinesterase/ ChE em adultos, machos e fêmeas, de zebrafish nos órgãos da cabeça e músculo, expostos por 96h ao aMT e cMT. Os asteriscos (*) representam os resultados estatisticamente significativos em relação ao controle negativo.

Figura 31. Atividade da LDH em fêmeas e machos de zebrafish, expostos por 96 horas ao aMT e cMT, em diferentes órgãos (brânquias, intestino, músculo e cabeça). Os

arteriscos (*) representam os resultados estatisticamente significativos em relação ao controle negativo.

Figura 32. Representação dos gráficos do índice gonadossomático de machos e fêmeas adultos de zebrafish expostos ao aMT e cMT.

Figura 33. Representação gráfica do índice hepatossomático de machos e fêmeas de zebrafish expostos por 96 horas ao ingrediente ativo da MT (aMT) e produto comercializado no Brasil (cMT). Os asteriscos (*) referem-se aos resultados estatisticamente significativos ($p < 0,005$).

Figura 34. Representação da análise da vitelogenina (VTG), nos fígados e gônadas de machos e fêmeas de zebrafish, expostos por 96 horas ao ingrediente ativo (aMT) e produto comercializado da metiltestosterona (cMT).

RESUMO

A contaminação do meio ambiente aquático é motivo de muita preocupação para a sociedade e acadêmicos, pois a escassez deste recurso e a possibilidade de prejudicar a saúde do homem geram um grande interesse em desenvolver pesquisas para análises toxicológicas, visando prevenir maiores danos à saúde do ambiente aquático e do homem. Neste trabalho foram desenvolvidos estudos para avaliar os efeitos toxicológicos do hormônio 17α -metiltestosterona. No Brasil, este hormônio é utilizado para reverter fêmeas de *Oreochromis niloticus* em machos, com o objetivo de melhorar a produção para a comercialização do peixe. Entretanto, são necessários mais estudos como a realização de testes genotóxicos, testes sobre o desempenho reprodutivo e toxicológicos para verificarmos os possíveis riscos ao ambiente, espécie alvo e não alvo. Investigamos os efeitos do hormônio comercializado no Brasil (cMT) através de testes do cometa, micronúcleos, anormalidades nucleares, análises histopatológicas e desempenho reprodutivo. Os testes foram aplicados em duas espécies de peixes (*Oreochromis niloticus* e *Astyanax bimaculatus*) e uma de invertebrado (*Biomphalaria glabrata*) com exposição aguda e crônica. Foram realizados ensaios bioquímicos através da quantificação das enzimas colinesterase (ChE), lactato desidrogenase (LDH), Glutathione S-transferase (GST) e da vitelogenina (VTG). Além disso, analisamos os efeitos toxicológicos e de subletalidade do produto ativo da metiltestosterona (aMT) e do cMT através do teste de toxicidade em embriões e adultos de *Danio rerio*. Os nossos resultados mostraram que a cMT não causou genotoxicidade para as espécies testadas. As análises histológicas mostraram que os efeitos nas gônadas são variáveis, dependendo da espécie, dose e tempo de exposição. Encontramos alterações reprodutivas como atresia dos ovócitos, atraso da oogênese e inibição da produção de espermatozoides. No invertebrado *Biomphalaria glabrata* a cMT aumentou o número de desovas e estimulou a produção de espermatozoides na gônada hermafrodita. Nos testes com embriões e adultos de *Danio rerio*, tanto a aMT como a cMT

foram teratogênicas nas concentrações testadas, onde encontramos alterações morfológicas no embrião como úlceras na pele, atraso do desenvolvimento da cabeça e problemas no equilíbrio natatório. Os testes de subletalidade toxicológica através da avaliação dos níveis enzimáticos mostrou que os embriões foram mais sensíveis aos efeitos da MT quando comparados com os efeitos nos adultos. Observou-se quedas nos níveis de ChE e LDH nos embriões de modo concentração-dependente. Nos adultos de *D. rerio* também houve queda de ChE, LDH e GST, porém menos acentuadas. A produção de VTG nos embriões foi inibida, enquanto nos adultos este “endpoint” não sofreu alterações significativas. Os resultados encontrados mostram que a metiltestosterona apresenta riscos as espécies estudadas, sendo que são evidentes os problemas envolvendo o sistema reprodutivo, já que o produto testado é um esteroide androgênico. Os resultados dos níveis enzimáticos em zebrafish foram variados e por isso devemos continuar pesquisando sobre os efeitos deste hormônio em espécies não alvo.

Palavras-chave: efeitos reprodutivos, genotoxicidade, metiltestosterona, disruptores endócrinos.

ABSTRACT

Chemical contamination of aquatic environments have caused a great concern around the world. In order to protect water resources from anthropogenic activities, many toxicological assays were developed. In this work, a series of bioassays were carried out to evaluate the toxicological effects of the hormone 17 α -methyltestosterone (MT). In Brazil, this hormone is widely used in *Oreochromis niloticus*'s fish farms to induce monosex males, increasing the yield to the market. Bioassays of genotoxicity and reproductive toxicology were performed in *Oreochromis niloticus* (target organism) and in non-target organisms such as *Astyanax bimaculatus*, *Danio rerio* and *Biomphalaria glabrata*. Genotoxicity was evaluated through micronucleus test, nuclear abnormalities and comet assay. Reproductive toxicology was studied through gonadal histopathology and by the analysis of reproductive performance. Chemical biomarkers cholinesterase (ChE), lactate dehydrogenase (LDH), glutathione S-transferase (GST) and Vitelogenin (VTG) were measured in embryos and adults of *D. rerio*. Commercial MT (cMT) and a reference active MT (aMT) from Sigma-Aldrich were tested in chronic and subchronic assays. The results showed that MT did not induce genotoxicity to *O. niloticus*, *A. binaculatus* and *D. rerio*. The histological analysis showed a variability in the gonadal effects to the studied species, according to the exposure-time and exposure-concentration. Oocyte atresia, retardation of oogenesis and inhibition of sperm production were the main reproductive changes caused by MT in the tested-species. In the invertebrate *Biomphalaria glabrata* (Mollusk - Gastropoda) cMT increased the number of spawns and stimulated the production of sperm in the hermaphroditic gonad. In the embryo-larval toxicity assays carried out in *D. rerio*, both cMT and aMT showed teratogenicity, demonstrated by morphological abnormalities in the embryos, skin ulcers and delay of development. In the larvae, it was observed head malformations, loss of balance and alteration in swimming behavior. Results of chemical biomarkers on *D. rerio*

showed enzyme inhibition for ChE and LDH in embryos and ChE, LDH and GST inhibition in adults, however for embryos such decrease were more dramatic than adults. VTG was already decreased after exposure to MT. In conclusion, MT did not show mutagenic/genotoxic potential to the exposed species, however it was highly active as an endocrine disruptors causing changes in the reproduction of fish and mollusks.

Key words: endocrine disruptors, reproductive changes, genotoxicity, methyltestosterone,

1.INTRODUÇÃO GERAL

1.1. Contaminantes aquáticos e os desreguladores endócrinos

O crescimento da população fez aumentar a preocupação com o impacto de estressores ambientais sobre a saúde humana e manutenção dos ecossistemas. A contaminação do ambiente está diretamente relacionada ao aumento das atividades humanas como a agricultura, indústria e o comércio, que têm influência sobre a variabilidade genética, com consequente redução da biodiversidade e no pior caso extinção das espécies (Bickham *et al.*, 2000). A toxicidade com ação genética em ambientes aquáticos sob a influência de contaminantes pode ser avaliada por uma grande variedade de bioensaios e biomarcadores, tanto *in vitro* como *in vivo* (Vargas *et al.*, 1993; Ayllon and Garcia-Vazquez, 2000; Torres de Lemos and Erdtmann, 2000; Pacheco and Santos, 2002; Viganò *et al.*, 2002; Horn *et al.*, 2004; Terra *et al.*, 2006; Lemos *et al.*, 2007).

Dentre os compostos químicos prejudiciais ao ambiente aquático, estão os desreguladores endócrinos, que são substâncias exógenas ou misturas capazes de interferir em algumas funções do sistema endócrino, na fisiologia e na reprodução de uma enorme variedade de animais, tanto em experimentos laboratoriais como na vida silvestre (Sumpter, 1997; Moens *et al.*, 2006; Van Der Mude, 2011).

Existem dados que comprovam que os hormônios e seus produtos podem causar câncer em animais e no homem, com isto existe um debate contínuo entre os cientistas e a população em geral, sobre os possíveis riscos carcinogênicos dos produtos hormonais. Estradiol é o estrógeno mais importante, o hormônio sexual feminino natural tem pouca controvérsia sobre a ausência de atividade em testes de mutação de genes em bactérias e mamíferos. As células com ou sem ativação metabólica podem sofrer transformações levando à formação de catecol de estrogênio tais como 2 e 4-hidroxi-estradiol e os correspondentes formas hidroxiladas de estrona. Estes catecóis, os 4-hidroxi, em

particular, podem provocar mutações genéticas (Tsutsui *et al.*, 2000). Além disso, foi demonstrada a formação de aductos no fígado de ratos machos, após administração oral diária de 2 mg de estradiol / kg durante 2 semanas (Feser *et al.*, 1996) e no fígado e rins de hamsters após a injeção de dose única (Joosten *et al.*, 2004).

Estudos sobre desregulação endócrina por compostos estrogênicos presentes no ambiente aquático foram muito realizados (Mochida *et al.*, 2004), enquanto que os efeitos causados por substâncias androgênicas foram pouco estudados (Thomas *et al.*, 2002).

1.2. Piscicultura e produção de *Oreochromis niloticus* (tilapia) no Brasil

No Brasil, a prática da piscicultura é muito desenvolvida, é o segundo grupo de peixes mais produzido em viveiros, com uma produção mundial anual de 2,5 milhões de toneladas (FAO, 2008). Esta classificação é devido às características vantajosas de duas espécies de *Oreochromis niloticus*, *Oreochromis niloticus* e *O. aureus*, e de alguns híbridos para a aquicultura (Baroiller and Toguyeni, 2004).

Para intensificar a produção de uma espécie de peixe (*Oreochromis niloticus*) são aplicados hormônios com ação androgênica a base de 17 α -metiltestosterona (MT), que é usada ainda na fase larval deste animal. Os efeitos obtidos são a reversão sexual das fêmeas em machos, obtendo-se uma porcentagem de aproximadamente 90% de sucesso.

Peixes do gênero *Oreochromis*, em especial *Oreochromis niloticus*, são considerados importantes para as condições de cultivo brasileiras, graças à sua rápida taxa de crescimento, à adaptabilidade aos diversos sistemas de cultivo e à alta aceitação pelo mercado consumidor (Meurer *et al.*, 2000; Boscolo *et al.*, 2001). A produção de populações com um único sexo é vantajoso, superando o problema de superpopulação e desnutrição de uma cultura ambiental com machos e fêmeas (Toguyeni *et al.*, 1997).

Além disso, a *Oreochromis niloticus* macho possui uma taxa de crescimento duas vezes superior que a fêmea (Pandian and Sheela, 1995; Green *et al.*, 1997).

A técnica mais empregada para obter a reversão sexual nas *Oreochromis niloticus* é a adição do hormônio MT (Beardmore *et al.*, 2001), utilizando o protocolo de 30 a 60 mg de MT.Kg⁻¹ de ração nos primeiros 21 a 28 dias de cultivo (Phelps and Popma, 2000). Mesmo com repetidas garantias de que os hormônios podem ser utilizados com segurança (Green and Teichert-Coddington, 2000; Piferrer, 2001), a preocupação dos consumidores sobre os efeitos das substâncias químicas, particularmente os desreguladores endócrinos, tem diminuído o uso de produtos químicos na piscicultura (Strüssmann and Nakamura, 2002). O controle do processo reprodutivo dos peixes é importante e vantajoso para a aquicultura, sendo aplicado principalmente para as espécies de *Oreochromis niloticus*. Entretanto, as consequências do uso de esteroides devem ser avaliadas para garantir a segurança do homem que consome o peixe tratado (Goudie *et al.*, 1986).

1.3. O hormônio 17 α -metiltestosterona (MT)

A MT é um produto sintético, disponível comercialmente, um exógeno e um potente agonista do receptor de andrógeno (Selzsam *et al.*, 2005), é um derivado metilado da testosterona, é um esteroide, anabolizante e antineoplásico, usado na medicina para suprir a deficiência de testosterona e tratar os sintomas da andropausa nos homens (Bejma *et al.*, 2005). Além disso, é amplamente utilizado como produto químico de referência na piscicultura para induzir reversão sexual, produzindo monossexo macho (Pandian and Sheela, 1995).

MT é considerado um desregulador endócrino de peixes, causando anomalias fisiológicas e de desenvolvimento, tais como o aumento das concentrações de

vitelogenina e intersexualidade gonadal, podendo causar efeitos androgênicos em machos da espécie *Pimephales promelas* e efeitos estrogênicos em peixes da espécie *Cyprinus carpio* (Zerulla *et al.*, 2002; Moens *et al.*, 2006). A MT tem sido recomendada pela OECD consultoria especializada, para testes de desregulação endócrina em peixes, como um composto de referência para o desenvolvimento de protocolos (Seki *et al.*, 2004).

Há a preocupação e resistência ao uso de hormônios na produção de alimentos, e mais pesquisas têm sido realizadas para saber como os produtos androgênicos utilizados na aquicultura podem afetar negativamente a vida selvagem, reprodução e produção de alimentos. Os efeitos androgênicos de desreguladores endócrinos ambientais em organismos aquáticos têm recebido maior atenção, particularmente no que diz respeito aos peixes (Papoulias *et al.*, 2000).

O uso da MT adicionada à ração nas pisciculturas é comum, e esta ração impregnada de MT pode contaminar corpos de água limpa (Homklin *et al.*, 2011). A MT é suspeita por causar câncer em humanos e é conhecido por induzir tumores benignos no fígado (Soe *et al.*, 1992). Entretanto, os resultados das pesquisas não são suficientes para proibir a utilização deste composto nas pisciculturas do Brasil.

Nos Estados Unidos, pesquisas concluíram que o uso da MT adicionado na ração nas pisciculturas não gerou danos ao ambiente aquático. Entretanto, neste país, somente 8% das pisciculturas depositam os resíduos de MT no ambiente aquático e a MT não metabolizada e seus metabólitos são excretados pela espécie alvo, durante o tratamento de reversão e pode acumular na água de sistemas circulantes, com isto percebe-se que existe risco ao ambiente exposto à MT. Para minimizar os efeitos ambientais, recomenda-se que a quantidade de MT nos efluentes de pisciculturas seja inferior à 1µg/L (Green and Teichert-Coddington, 2000). Entretanto, estudos comprovam que a

MT e seus metabólitos com ação androgênica se acumulam nos sedimentos das lagoas de pisciculturas em condições aeróbicas, de redução de ferro III, redução de nitrato e metanogênicas (Homklin *et al.*, 2011).

O processamento da MT é mais lento no organismo do peixe quando comparado ao metabolismo da testosterona e a presença do grupo metil no esteroide sintético, aumentando a eficácia do composto em relação ao esteroide endógeno (Donaldson *et al.*, 1979). Outros estudos sugerem que a administração da MT adicionada à ração em *Oreochromis niloticuss* pode estar conectada com o aumento da liberação do hormônio de crescimento e/ou níveis de prolactina (Shepherd *et al.*, 1997).

Em um estudo realizado com a espécie *Pagrus major*, que apresenta diferenças de coloração entre machos e fêmeas da espécie, foi mostrado que a MT aplicada em juvenis em tratamento oral é capaz de alterar a coloração das fêmeas, através da indução do acúmulo da eumelanina, normalmente presente em grandes quantidades nos machos (Adachi *et al.*, 2010).

O estudo da MT normalmente está relacionado às possíveis alterações reprodutivas, mas estudos recentes mostraram que 20mg/Kg de MT combinada com 50mg/Kg de gossipol (pigmento extraído da semente de algodão com ação androgênica e tóxica), é capaz de aumentar o índice de apoptoses e a expressão de genes relacionados em ratos adultos expostos por seis semanas (Cui *et al.*, 2004).

Em testes de exposição da espécie *Pimephales promelas* por 21 dias, a MT na concentração nominal de 0,2mg/L foi observada redução da fecundidade (Ankley *et al.*, 2001).

1.4. Bioindicadores

1.4.1. Peixes

Os peixes são apropriados e têm se tornado populares como organismos teste para genotoxicidade ambiental, devido ao seu papel na cadeia trófica e à sua sensibilidade a baixas concentrações de substâncias tóxicas, características de ambientes aquáticos poluídos (Çavas e Ergene-Gözükara, 2005). São considerados excelentes modelos em estudos sobre desreguladores endócrinos, pois seu ambiente está em contato direto com diversas fontes de contaminação, como esgotos, efluentes industriais, águas corrente urbanas e agrícolas (Powers, 1989; Papoulias *et al.*, 2000; Grisolia and Starling, 2001; Sharpe *et al.*, 2004; Rivero *et al.*, 2008; Silva *et al.*, 2010).

Os peixes já vêm de longa data sendo empregados como organismos teste em bioensaios, todavia, várias características positivas têm levado diversas espécies desse grupo a serem cada vez mais utilizadas tais como: a) o pequeno tamanho do corpo; b) a existência de uma padronização e de técnicas válidas para as culturas em laboratório; c) o ciclo de vida relativamente rápido; d) a grande quantidade de informações existentes relacionadas aos atributos biológicos e toxicológicos básicos (Al-Sabti and Metcalfe, 1995; Miracle and Ankley, 2005). Além do fato de que os peixes podem acumular substâncias químicas pela exposição direta aos poluentes presentes na água ou indiretamente pela cadeia alimentar em que estão enquadrados (Ateeq *et al.*, 2002).

Inúmeros efeitos adversos à reprodução pela presença de desreguladores endócrinos têm sido relatados em espécies de peixes como *Thunnus obesus*, *Pimaphales promelas*, *Oncorhynchus mykiss*, *Cyprinus carpio* (Hashimoto *et al.*, 2000; Jobling *et al.*, 2003; Clemente *et al.*, 2010).

O estudo de espécies nativas é relevante para se avaliar os efeitos de substâncias contaminantes de ecossistema aquático em uma determinada região. O *Astyanax sp.* é

muito citado na literatura como organismo teste em análises da toxicidade de ambientes aquáticos contaminados (Martinez and Souza, 2002; Oliveira Ribeiro *et al.*, 2002; Lemos *et al.*, 2008; Ramsdorf *et al.*, 2012). O gênero *Astyanax sp.* possui uma ampla distribuição geográfica na América tropical e subtropical, incluindo os Estados Unidos (Gery, 1977). Esta espécie representa uma ótima fonte de alimento para espécies de peixes no topo da cadeia alimentar, como por exemplo, o *Hoplias malabaricus* e *Salminus maxillosus*, dentre outros piscívoros incluídos na dieta humana (Godoy, 1975; Leuzzi *et al.*, 2004). O *Astyanax bimaculatus* pode ser considerado onívoro que predominantemente consome insetos (Esteves and Galetti, 1995).

O *A. bimaculatus* pertence à família dos Characidae, está distribuído nas Bacias Amazônica, Araguaia-Tocantins, São Francisco, Prata e Atlântico Sul. É uma espécie onívora, que se alimenta de vários itens vegetais e animais (flores, frutos, sementes, insetos, crustáceos, algas, detritos etc.) e vive em vários tipos de habitats (Donaldson and Hunter, 1983; Esteves and Galetti, 1995; Vilela and Hayashi, 2001; Lemos *et al.*, 2008).

Em situações de campo, os poluentes dissolvidos ou suspensos na água requerem espécies nativas adequadas como no bioindicador *in situ*. *A. bimaculatus* é muito abundante na América do Sul. Esta espécie, além de desempenhar um papel central na cadeia alimentar de regiões ribeirinhas, é sensível à degradação ambiental. Estas características fazem dele um excelente bioindicador, comumente presente em lagoas e rios brasileiros, e ser um modelo não alvo potencial deste andrógeno (Silva *et al.*, 2010).

As *Oreochromis niloticus* são membros da família Cichlidae que são um grupo de peixes de água quente e se tornaram importantes para a aquicultura (FAO, 2003). A *Oreochromis niloticus*, uma espécie de peixe de origem africana introduzida no Brasil

na década de 50, com o objetivo de aumentar a nossa produção de pescado (Nyingi *et al.*, 2009), é de alta importância econômica, pois é um ciclídeo bentônico onívoro comumente encontrado em lagoas e córregos de muitos países tropicais, incluindo a Tailândia (Peebua *et al.*, 2007).

As *Oreochromis niloticus* são consideradas um paradoxo em relação à reprodução. Apresentam desovas parceladas e baixa fecundidade, o que no gênero *Oreochromis* pode alcançar índices de 6.000 a 13.000 ovos/kg/desova (Phelps and Popma, 2000). Esta baixa fecundidade é compensada pela característica de desovas assincrônicas, associada às altas taxas de sobrevivência das proles em virtude do cuidado parental, do tamanho das larvas ao nascer e da incubação bucal dos ovos e/ou larvas (Turner and Robinson, 2000). Apesar da simplicidade e facilidade de aplicação da técnica de reversão, fatores ambientais e hierarquias sociais prejudicam a obtenção da ração pelas larvas (Bromage, 1993), levando à redução das taxas de masculinização. Associado a este problema, existe a necessidade da redução da dosagem e do tempo de exposição nos tratamentos hormonais (Piferrer, 2001).

A reprodução dos peixes é fundamental para os processos produtivos em ambientes naturais e da aquicultura. A reprodução sexuada, que depende da presença de machos e fêmeas, não só garante a propagação, mas também a combinação de informações genéticas de dois indivíduos. Obviamente, a reprodução bem sucedida por um indivíduo depende da ontogênese normal das gônadas, um delicado processo de desenvolvimento que começa no início da vida (Sumpter, 1997).

Assim, o período crítico de gonadogênese precoce provavelmente tem uma chave para compreender os fenômenos de interesse atual, tais como disfunções reprodutivas causadas por pesticidas e outros produtos químicos com atividade de

desregulação endócrina, bem como os efeitos do aumento da temperatura global e mudanças climáticas imprevistas sobre os recursos naturais (Sumpter, 1997).

O *Danio rerio* é outra espécie amplamente utilizada e padronizada por protocolos nacionais e internacionais para a realização de testes de toxicidade e teratogenicidade embrionária, devido à facilidade da análise dos embriões translúcidos, manutenção dos peixes em condições laboratoriais e maturidade precoce. O desenvolvimento embrionário já foi descrito na literatura, o que facilita o uso desta espécie como base para a interpretação dos efeitos causados por poluentes ambientais (Nagel, 1998).

Dados provenientes de análises toxicológicas em peixes, como o *Danio rerio*, são utilizados para uma variedade de programas regulatórios nos Estados Unidos, incluindo os registros de novos pesticidas, os critérios de qualidade da água no meio ambiente e testes para classificação de químicos específicos, como os desreguladores endócrinos (Miracle and Ankley, 2005).

A escolha da espécie de peixe como bioindicador dependerá do conhecimento do poluente no ambiente aquático, se ocorre o depósito nos sedimentos, ou se permanecem na coluna de água, assim como a biologia e comportamento do animal. No caso de alguns compostos como os organoclorados, que sofrem biomagnificação em cadeia ecológica, os peixes carnívoros são utilizados como melhores bioindicadores para avaliação do potencial de biomagnificação da substância (Grisolia *et al.*, 2005).

As espécies *Oreochromis niloticus* e *Astyanax bimaculatus* (*Astyanax bimaculatus*) são excelentes modelos biológicos para testes e ensaios laboratoriais, com o objetivo de realizar pesquisas sobre os efeitos tóxicos das substâncias químicas em ambientes aquáticos (Grisolia and Cordeiro, 2000; Matsumoto and Cólus, 2000; Grisolia and Starling, 2001; Palhares and Grisolia, 2002; Alle *et al.*, 2004; Grisolia *et*

al., 2005; Lemos *et al.*, 2008; Silva *et al.*, 2010; Erbe *et al.*, 2011; Ghisi and Cestari, 2013).

1.3.2. Uso de caramujo como organismo teste

Assim como a espécie alvo dos hormônios nas pisciculturas (*O. niloticus*), outras espécies aquáticas estão envolvidas nos processos de reversão sexual de forma indireta, pois o hormônio utilizado na alimentação através da ração, não é aproveitado por completo e desta forma é liberado na água. Devido às diversas questões ambientais relacionadas ao uso de hormônio, como por exemplo, os possíveis efeitos de resíduos do tratamento na qualidade das águas e na redução da biodiversidade relacionada com as preocupações crescentes sobre a segurança alimentar, encontrar uma alternativa para o controle da reprodução dos peixes de forma segura para o consumidor e métodos que respeitem o ambiente, representa um grande desafio para a aquíicultura (Nakamura *et al.*, 2003).

O estudo de invertebrados como os moluscos é relevante, assim como outras espécies nativas e exóticas não utilizadas preferencialmente na aquíicultura, pois através destas análises se pode verificar os efeitos de hormônios em espécies comumente encontradas no ambiente aquático. Alguns mecanismos de ação dos esteroides sexuais têm características comuns entre moluscos e vertebrados. Além disso, os moluscos contêm os receptores de estrogênio encontrado nos vertebrados (Croll and Wang, 2007).

A espécie *Biomphalaria glabrata* é um organismo hermafrodita, que faz autofecundação, pode ser mantido isolado, havendo controle sobre a progênie. A sua biologia é bastante conhecida, pois foi muito estudada por ser o hospedeiro intermediário do *Schistosoma mansoni*, agente etiológico da esquistossomose. Tem pequeno porte, ciclo de vida curto, sendo possível mantê-la em laboratório. A *B. glabrata* tem ampla distribuição no território brasileiro e é bastante sensível a ação dos

agentes químicos poluidores do ambiente aquático. Há na literatura uma série de artigos reforçando o uso tanto da *B. glabrata* como da *B. tenagophila* em estudos de toxicidade aquática de agrotóxicos, poluentes industriais e outras substâncias químicas, demonstrando que são excelentes modelos para avaliação de toxicidade (Ravera, 1977; Münzinger, 1987; Grisolia and Bicalho-Valadares, 1997; Oliveira-Filho *et al.*, 2009a, b).

O uso de caramujos e peixes como organismos teste em estudos para avaliar os efeitos de desreguladores endócrinos é viável, pois já foram demonstrados que os efeitos da exposição à estrogênios, por exemplo, podem causar efeitos na reprodução de peixes (*Pimaphales promelas*, *Oncorhynchus mykiss*, *Cyprinus carpio*) e também no caramujo *Potamopyrgus antipodarum*. Nas espécies de peixes estudadas ocorreu o aumento da produção de vitelogenina e o aumento da produção de ovos foi verificado tanto nos peixes como no caramujo. Este estudo dá suporte ao uso de caramujos e peixes para observar os efeitos de desreguladores endócrinos na produção de ovos (Jobling *et al.*, 2003).

1.4. Avaliação da genotoxicidade

1.4.1. Micronúcleo (MN) e anormalidades nucleares (AN)

Os MNs são massas de cromatina originadas de fragmentos cromossômicos ou cromossomos inteiros, que se perdem durante a anáfase na divisão celular, devido aos eventos clastogênicos ou aneugênicos. Também podem ser formados pela interação de agentes químicos, físicos e biológicos com estruturas não genômicas, que promovem distúrbios na maquinaria mitótica e falha na segregação dos cromossomos (figura 1). A ação dos agentes pode originar os micronúcleos, um ou vários por célula, que resultam em fragmentos cromossômicos acêntricos ou cromossomos que se atrasam em relação

aos demais em migração para os pólos da célula durante a anáfase (figura 2) (Schmid, 1975; Rabello-Gay, 1991; Al-Sabti and Metcalfe, 1995; Fenech, 2000; Souza and Fontanetti, 2006).

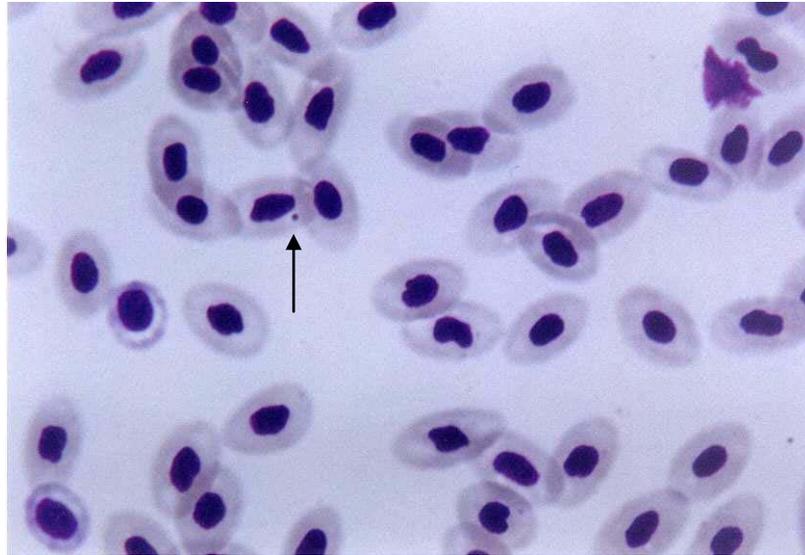


Figura 1. Micronúcleo em células de eritrócitos de sangue periférico de *Oreochromis niloticus rendalli*, corados com Giemsa a 5%. FONTE: RIVERO-WENDT, C.L.G.

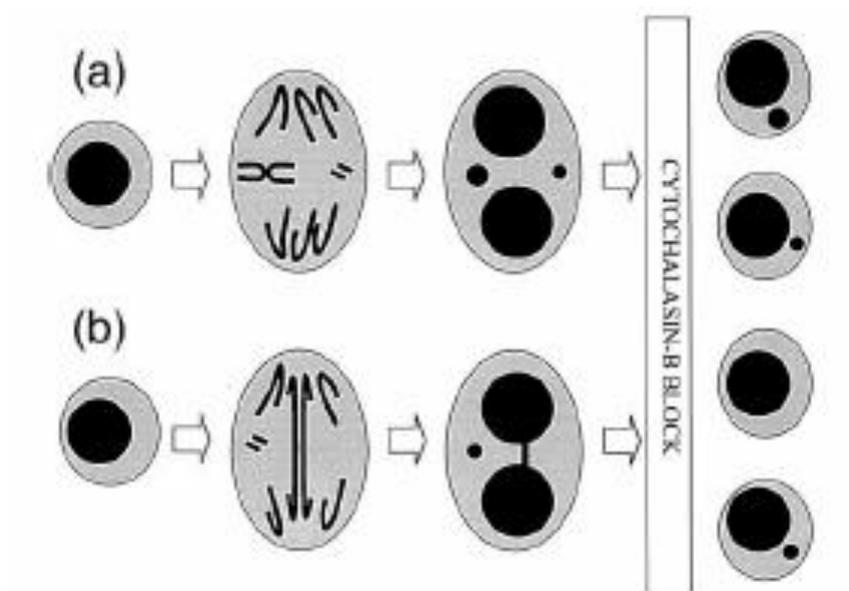


Figura 2. Formação de micronúcleo em eritroblasto. (a) ação do agente clastogênico com quebra cromossômica. (b) ação do agente no fuso mitótico. FONTE: Fenech, 2000.

O teste do micronúcleo é uma técnica vantajosa, pois pode ser usada em qualquer tipo de população celular em proliferação, sem que seja necessário o conhecimento prévio do cariótipo do animal (Hayashi *et al.*, 1998).

A técnica original desenvolvida por Schmid (1975) foi adaptada de roedores para a aplicação laboratorial em peixes (Hooftman and Raat, 1982). São muitos os estudos que utilizam o teste do micronúcleo para detectar os efeitos da exposição de substâncias químicas mutagênicas e cancerígenas em peixes (Ayllon and Garcia-Vazquez, 2000; Grisolia and Starling, 2001; Serrano-García and Montero-Montoya, 2001; Çavas and Ergene-Gözükara, 2003; Cestari *et al.*, 2004; Ferraro *et al.*, 2004; Masuda *et al.*, 2004; Bolognesi *et al.*, 2006; Vanzella *et al.*, 2007; Katsumiti *et al.*, 2009; Ramsdorf *et al.*, 2012).

Esse método pode ser utilizada também *in situ*, como indicador biológico de poluentes em peixes (Missini *et al.*, 1996) e para avaliar os efeitos mutagênicos de substâncias como o mercúrio, cromo e outros agentes clastogênicos (Al-Sabti and Metcalfe, 1995; Mersch and Beuvais, 1997; Nepomuceno *et al.*, 1997; Grisolia and Cordeiro, 2000; Matsumoto and Cólus, 2000; Lemos *et al.*, 2001).

O teste do micronúcleo é um método amplamente utilizado para o monitoramento de danos genotóxicos em populações expostas às substâncias mutagênicas e carcinogênicas. A frequência de MN observada em um determinado momento pode ser considerada uma resposta complexa entre a atividade genotóxica e a eficiência do mecanismo fisiológico de defesa do organismo teste (Mersch *et al.*, 1996).

No meio ambiente aquático, o teste pode ser aplicado principalmente em vertebrados como: as espécies de peixes *Cyprinus carpio* (Nepomuceno *et al.*, 1997) e *Umbra pygmaea* (Hooftman and Raat, 1982); e em larvas de anfíbios *Pleurodeles waltl*, *Ambystoma mexicanum* e *Xenopus laevis* (Fernandez *et al.*, 1993).

Durante as análises, alguns autores costumam observar as AN, sugerindo que essas anomalias sejam levadas em consideração durante a análise convencional de micronúcleos, pois podem estar relacionadas aos processos de citotoxicidade, ações sobre a divisão celular e a genotoxicidade ou mutagenicidade. Em peixes, algumas anomalias nucleares são registradas após a exposição a substâncias químicas ou poluentes da água (Ayllon and Garcia-Vazquez, 2000; Çavas and Ergene-Gözükara, 2003; Souza and Fontanetti, 2006; Grisolia *et al.*, 2009; Katsumiti *et al.*, 2009; Ramsdorf *et al.*, 2012; Ghisi and Cestari, 2013).

A formação de alterações morfológicas no envelope nuclear como núcleo que apresenta uma pequena evaginação do envelope nuclear, o qual contém euromatina (“blebbed”), núcleo apresentando evaginações maiores que o núcleo blebbed (“lobed”) e o núcleo apresenta um corte notável no conteúdo do material nuclear (“notched”) que também são relatados em eritrócitos de peixes como uma consequência da exposição destes animais à contaminantes químicos tóxicos, genotóxicos, mutagênicos ou carcinogênicos no meio ambiente, apesar dos mecanismos moleculares que levam a tais alterações nucleares ainda não tenham sido totalmente esclarecidos (Palhares and Grisolia, 2002). Recentes estudos mostram que as anormalidades nucleares podem surgir de instabilidades no genoma das células, como ampliações gênicas, translocações e duplicações cromossômicas, fusões centroméricas, entre outras (Fenech and Crott, 2002; Fenech *et al.*, 2011).

1.4.2. Teste do cometa

O teste do cometa proposto por (Ostling and Johanson, 1984; Singh *et al.*, 1988), pode ser aplicado em uma série de estudos incluindo genética toxicológica, ecogenotoxicologia, em estudos de reparo de DNA e apoptose. O método é simples,

rápido e podem-se obter resultados rapidamente (Mitchelmore and Chipman, 1998; Lee and Steinert, 2003; Simoniello *et al.*, 2009). Também é possível utilizar poucas células para a realização de um experimento e os mais diferentes tipos celulares podem ser utilizados nessa investigação, desde células vegetais, à de invertebrados e vertebrados. Células isoladas são visualizadas e é possível detectar diferenças intercelulares em resposta aos agentes que danificam o DNA (Lee and Steinert, 2003; Moller, 2005).

Singh e colaboradores (1988) modificaram e aprimoraram o ensaio do cometa, com a introdução de condições alcalinas desenvolvendo uma eletroforese de células isoladas, demonstrando desta maneira que a sensibilidade do teste está relacionada ao fato de ele detectar as quebras de fita simples do DNA, diferente dos testes citogenéticos que detectam quebras na dupla fita do DNA (Singh *et al.*, 1988). A maioria dos grupos de pesquisa adotou estas modificações do ensaio do cometa para aplica-lo em testes de genética toxicológica (Moller, 2005).

Esta técnica possui um procedimento sensível para quantificar lesões no DNA em células individuais, tornando-se excelente para o biomonitoramento ambiental, pois é eficiente em detectar os efeitos de poluentes genotóxicos em águas superficiais e sedimentos (Pandurangi *et al.*, 1995; Mitchelmore and Chipman, 1998; Jha, 2008), pode ser utilizado para detectar quebras em fitas simples em baixos níveis de danos em células individuais (Belpaeme *et al.*, 1996; Horváthová *et al.*, 1998; Kim and Hyun, 2006). O ensaio pode ser utilizado para avaliar danos em células eucarióticas em proliferação ou não, em sistemas celulares *in vivo* ou *in vitro* (Belpaeme *et al.*, 1996; Hartmann *et al.*, 2001; Filipak Neto *et al.*, 2007).

Os organismos aquáticos, como os peixes, acumulam poluentes diretamente da água ou indiretamente pelo alimento, portanto os eritrócitos destes animais são muito utilizados em estudos genotoxicológicos (Al-Sabti and Metcalfe, 1995; Missini *et al.*,

1996; Hayashi *et al.*, 1998), como por exemplo, o estudo dos efeitos da exposição ao TBT (tributil estanho) e ao Chumbo (Pb II), contaminando de forma trófica peixes neotropicais, *Hoplias malabaricus* (Cestari *et al.*, 2004; Ferraro *et al.*, 2004), como também a contaminação com metilmercúrio (Vicari *et al.*, 2012). Também, para investigar os efeitos da exposição da espécie *Cyprinus carpio* em águas contaminadas com os produtos tóxicos de desinfetantes que contém cloro (Buschini *et al.*, 2004), e a espécie endêmica *Geophagus brasiliensis* nas águas das lagoas de Santa Marta e Camacho (SC) contaminadas com agrotóxicos de culturas de arroz e hormônios da criação de suínos (Benincá *et al.*, 2012).

Quando o ensaio do cometa é comparado a outras técnicas para detectar lesões no DNA de organismos aquáticos causadas por agentes genotóxicos, como o teste do micronúcleo, o método de eluição alcalina, aberrações cromossômicas, dentre outros, os resultados indicam que o teste do cometa é bastante sensível (Belpaeme *et al.*, 1996; Lee and Steinert, 2003; Ferraro *et al.*, 2004; Ramsdorf *et al.*, 2009). Entretanto, na literatura, o teste do cometa é muito utilizado em conjunto com outros testes (micronúcleo) para a avaliação de estudos genotoxicológicos usando o peixe como bioindicador (Belpaeme *et al.*, 1996; Buschini *et al.*, 2004; Cestari *et al.*, 2004; Ferraro *et al.*, 2004).

1.5. Marcadores bioquímicos

Outro tipo de avaliação toxicológica, muito aplicada em peixes, utilizada para verificar o efeito de desreguladores endócrinos, como no caso da MT, são as análises de enzimas e produtos responsáveis pela manutenção das vias que regulam os efeitos causados por substâncias químicas estressantes.

A produção de espécies reativas de oxigênio (ERO) podem induzir danos oxidativos em organismos aquáticos, que vivem em ambientes que recebem contaminantes pela água. Os contaminantes ambientais, tais como herbicidas, inseticidas e metais pesados são conhecidos por sistemas defensivos e podem causar danos oxidativos em organismos aquáticos. A produção de ERO pode ser medida por meio de superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathione peroxidase (GPx) e GST (Glutathione S-transferase), bem como as atividades da GSH (glutathione reduzida) e a peroxidação lipídica (Habig *et al.*, 1974; Monteiro *et al.*, 2006a; Silva *et al.*, 2011a).

A lactato desidrogenase (LDH) é uma enzima importante na fisiologia muscular, o aumento dos níveis de atividade da LDH foram observados em condições de estresse químico quando altos níveis de energia são necessários para constituir um marcador de dano tecidual (Vassault, 1983b; Diamantino *et al.*, 2001).

A vitelogenina-VTG é frequentemente usada como um biomarcador sensível para compostos estrogênicos artificiais ou xenoestrógenos em ambientes aquáticos (Tyler *et al.*, 1999). Nos peixes, o estrógeno não é apenas responsável pela indução da VTG, mas também desempenha papel importante nos processos de reprodução e desenvolvimento, incluindo a maturação e a diferenciação sexual (Marcino and Guillette, 1996).

A VTG é um precursor da gema do ovo, que é normalmente produzida nos ovários fêmeas, como uma resposta aos estrogênios circulantes no plasma, é secretada no fígado de organismos do sexo feminino em fase reprodutiva (Solé *et al.*, 2001). Embora os peixes machos não sintetizem essa proteína, carregam o gene da VTG e a exposição a qualquer estrogênios naturais ou sintéticos podem provocar a sua expressão (Sumpter and Jobling, 1995). A exposição de peixes machos da espécie

Zoarces viviparus por 10 dias demonstrou que a MT pode afetar o processo natural de produção de vitelogenina, reduzindo os níveis de VTG no sangue (Korsgaard, 2006).

2. JUSTIFICATIVA

A legislação brasileira exige que substâncias químicas usadas em processos produtivos e liberadas no meio ambiente, com potencial risco às espécies silvestres e ao homem, sejam avaliadas, dentro de um processo regulatório e devidamente registradas de acordo com as especificidades de destino.

“Lei nº 9605, de 12.2.1998, que dispõe sobre as sanções penais e administrativas derivadas de condutas e atividades lesivas ao meio ambiente, e dá outras providências.”

“Constituição Federal, capítulo IV- do meio ambiente do artigo 225, inciso V controlar a produção, a comercialização e o emprego de técnicas, métodos e substâncias que comportem risco para a vida, a qualidade de vida e o meio ambiente”.

O hormônio 17- α - metiltestosterona é utilizado no Brasil para a produção de monossexo machos em piscicultura e ainda não foi devidamente registrado nos órgãos competentes.

Existe uma preocupação mundial em relação aos poluentes ambientais e substâncias químicas produzidas pelas indústrias, que mimetizam os hormônios sexuais, pois já se constataram muitos casos de alterações na reprodução de espécies selvagens em diferentes países. As principais agências ambientais ao redor do mundo definiram protocolos para a detecção e avaliação de substâncias químicas que agem como desreguladores hormonais, e passaram a exigir testes específicos a fim de regulamentação para a liberação comercial (OECD/OCDE, 2009)

No Brasil, os criatórios comerciais de peixes com alta conversão alimentar como as *Oreochomis niloticuss* estão em plena expansão e dentro das técnicas para a obtenção de maior produtividade, estão presentes o uso de rações com a presença do hormônio

17- α - metiltestosterona para a produção de monossexo machos (Phelps and Popma, 2000).

Portanto, existe um grande interesse no estudo dos efeitos deste hormônio sobre o material genético, no desempenho reprodutivo, no desenvolvimento embrionário e na bioquímica de espécies aquáticas alvo bem como espécies não alvo para a regulamentação do uso desta substância e averiguação dos riscos ao meio ambiente aquático.

3. OBJETIVOS

3.1. Geral

Verificar a toxicidade do hormônio 17- α -metiltestosterona (MT) em espécies aquáticas.

3.2. Específicos

- Verificar:
 - a mutagenicidade da MT na espécie *Oreochromis niloticus* através dos testes do micronúcleo (MN), anormalidades nucleares (AN) e danos no DNA através do ensaio do cometa (EC) em eritrócitos;
 - A mutagenicidade da MT na espécie *Astyanax bimaculatus* através dos testes do micronúcleo (MN), anormalidades nucleares (AN), e a genotoxicidade através ensaio do cometa (EC) em eritrócitos;
 - A mutagenicidade/genotoxicidade *in situ* da MT sobre a espécie *O. niloticus* após a exposição por 28 dias ao hormônio, que ocorre na Piscicultura da Secretaria de Agricultura do Governo do Distrito Federal, que fornece os alevinos monossexo aos produtores;
- Os efeitos do hormônio sobre as gônadas das espécies *O. niloticus* e *A. bimaculatus* através de técnica histológica;
- Determinar os efeitos da MT sobre o desempenho reprodutivo do molusco *Biomphalaria glabrata* por meio da quantificação da produção de ovos e desovas;
- Avaliar os efeitos da MT sobre o desenvolvimento embrionário da espécie *Danio rerio* (zebrafish), através da análise de malformações;
- Analisar possíveis alterações bioquímicas sobre o peixe *Danio rerio*, após a exposição aguda a diferentes concentrações do MT, através da quantificação de

enzimas metabólicas como a lactato desidrogenase-LDH, glutathiona-S transferase-GST, colinesterase-ChE e as variações nas concentrações de Vitelogenina-VTG.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Animais

As espécies *O. niloticus* (figura 3) e *A. bimaculatus* (figura 4), utilizadas nos testes de genotoxicidade, análise histopatológica e fragmentação do DNA, são provenientes do Centro de Tecnologia em Piscicultura do Governo do Distrito Federal – Granja do Ipê (Secretaria de Agricultura do GDF), de onde se tem o controle de origem e sanitário. Os animais foram mantidos no laboratório de Genética Toxicológica da Universidade de Brasília, aclimatados em tanques de 200 litros por 7 dias com controle de temperatura, pH, amônia, fotoperíodo de 14h:10h claro/escuro e com aeração constante. A espécie *O. niloticus* é amplamente utilizada como modelo para testes genotóxicos (Grisolia & Cordeiro, 2000; Palhares & Grisolia, 2002; Çavas & Gozukara, 2003; Grisolia *et al.*, 2005; Souza & Fontanetti, 2006). Os peixes da espécie *O. niloticus* escolhidos para os testes, estavam com aproximadamente três meses de vida (9 a 14 cm de comprimento), isto é, no início da fase fértil, pesando aproximadamente 19 ± 2 g. Os peixes da espécie *A. bimaculatus* estavam com três meses de vida e com 6 a 8 cm de comprimento, pesando aproximadamente 19 ± 2 g.



Figura 3. Espécie exótica (alvo) *Oreochromis niloticus*. Fonte:(Fonseca, 2001).



Figura 4. Espécie nativa *Astyanax bimaculatus*. Fonte: (Fonseca, 2001).

Os caramujos da espécie *Biomphalaria glabrata* (figura 5) pertencem à colônia mantida no Laboratório de Ecotoxicologia da Embrapa Cerrados e são cultivados na água mole sintética (40 ± 2 mg/L CaCO_3), em aquários de 20 litros, sendo alimentados duas vezes por semana com alface e ração de peixe.



Figura 5. Exemplar da espécie *Biomphalaria glabrata*. Fonte: Acervo pessoal.

A espécie *Danio rerio* (figura 6) utilizada para os testes de toxicidade, teratogenicidade e avaliação bioquímica, são mantidos no laboratório de Ecotoxicologia da Universidade de Aveiro, em Portugal. Os peixes são mantidos em um sistema automatizado, com controle de temperatura, foto período (14h:10h – claro/escuro respectivamente), pH, condutividade em sistema de fluxo contínuo, com esterilização por luz ultra-violeta e alimentados diariamente com ração própria para peixes.



Figura 6. Ilustração de um peixe adulto da espécie *Danio rerio*. Fonte: (<http://www.onestopcountrypet.com/danios.html>).

4.2. Hormônio

A 17- α -metiltestosterona comercial (cMT) foi adquirida através de um receituário pelo médico veterinário responsável pela piscicultura do GDF. Foram usados 4 g do hormônio da marca Bioativa – Farmácia de Manipulação, para a diluição da solução estoque. O produto ativo (aMT), foi comprado da Sigma-Aldrich – 99.9%, usado como o químico de referência. Nos testes de genotoxicidade e efeitos no sistema reprodutivo de peixes e do caramujo foram utilizadas 3 concentrações (0,01; 0,1 e 1 mg/L de cMT), determinadas através de cálculos relacionando a quantidade de água contaminada com MT despejada no ambiente aquático a jusante da piscicultura do GDF. Os testes de Biomarcadores e VTG realizados com *Danio rerio* foram usadas as mesmas concentrações para cMT e aMT (0,004; 0,02; 0,14; 0,83 e 5 mg/L de MT), determinadas pelos cálculos da LC 50%. No teste de toxicidade em embriões de *Danio rerio*, foram utilizadas as concentrações de 5, 7, 9, 11 and 13 mg/L para ambos compostos, estas concentrações foram determinadas com valores acima da LC 50%. A diluição da MT nos testes de genotoxicidade e efeitos na reprodução foram feitas em álcool absoluto, enquanto que nos testes com o *Danio rerio* foram diluídas em dimetil sulfóxido – DMSO. Apesar de o etanol ser utilizado nas pisciculturas e a utilização dele no trabalho teve a intenção de simular o uso real, utilizamos o DMSO, com o mesmo potencial para diluir o hormônio, para o teste enzimático baseado nos protocolos (Habig and Jakoby, 1981; Vassault, 1983a; Monteiro *et al.*, 2006b).

4.3. Teste do micronúcleo (MN) e Anormalidades nucleares (AN)

O MN em peixes é similar ao teste em mamíferos (Schmid, 1975) e foi adaptado para as características do organismo-teste baseado em protocolos descritos em outros experimentos realizados com peixes (Hooftman and Raat, 1982; Cestari *et al.*, 2004;

Ferraro *et al.*, 2004; Grisolia *et al.*, 2005; Rivero *et al.*, 2008). Através deste teste é possível verificar quebras em cromossomos, erro de fuso mitótico e perdas cromossômicas.

Foram realizados testes de genotoxicidade no sangue de peixes expostos através de diferentes metodologias. O ciclo de renovação das células no tecido hematopoiético dos peixes (*Tilapia rendalli*, *Oreochromis niloticus* e *Cyprinus carpio*) foi estimado em aproximadamente 96 horas (Grisolia and Cordeiro, 2000). Logo, para verificar os possíveis efeitos genotóxicos do MT e possibilitar uma melhor visualização das lesões no DNA, padronizamos os experimentos em 96 horas.

Nas pisciculturas o hormônio é utilizado na alimentação, via absorção oral, juntamente com a ração. As concentrações de MT para as exposições dos peixes nos aquários foram baseadas nas concentrações presentes na ração usada nas pisciculturas (60 mg/L), afim de verificar os efeitos nestes organismos, simulando o meio ambiente possivelmente contaminado pelo hormônio. Para isso, foi previamente diluída em 200 mL de álcool, devido a sua insolubilidade em água.

A outra metodologia foi de exposição dos peixes reprodutivamente adultos que ficaram 28 dias sendo alimentados com a mesma ração utilizada para a indução do monossexo macho das larvas nos viveiros da piscicultura.

Outro teste realizado foi a avaliação genotóxica do sangue dos peixes expostos ao MT desde o período de eclosão das larvas até a maturidade na piscicultura, teste *in situ*. Após a eclosão das larvas de *O. niloticus* da estação de piscicultura do GDF, inicia-se a aplicação do MT através da ração em pó. Neste estudo foram analisados dois lotes de *Oreochromis niloticus*, um exposto 28 dias ao hormônio (60 mg/L) e outro sem exposição.

O sangue periférico foi coletado com seringas heparinizadas. As lâminas de esfregaço foram feitas com aproximadamente uma gota de sangue (50 μ L) de cada espécime e ficaram secando por 24 horas em temperatura ambiente. O material foi então fixado em metanol por 15 minutos e corado com Giemsa a 5% para serem analisadas em microscópio de luz em objetiva de 100x, onde foram contadas 3000 células por animal.

Nas mesmas lâminas preparadas para avaliação da genotoxicidade do teste de micronúcleo foi analisada a citotoxicidade através das anomalias nucleares, onde foram contadas células binucleadas, células com núcleos “bleebed”, “lobed” e “notched” (figura 7) em 1000 células de cada indivíduo. A frequência das médias e os valores dos desvios padrões para células binucleadas e aquelas com alterações morfológicas foram classificadas de acordo com Souza & Fontanetti (2006), e calculadas dentro de cada grupo de espécie. Deve-se lembrar que a origem das alterações na morfologia do núcleo ainda não é conhecida, logo foi interpretado como um grupo único para a análise estatística.

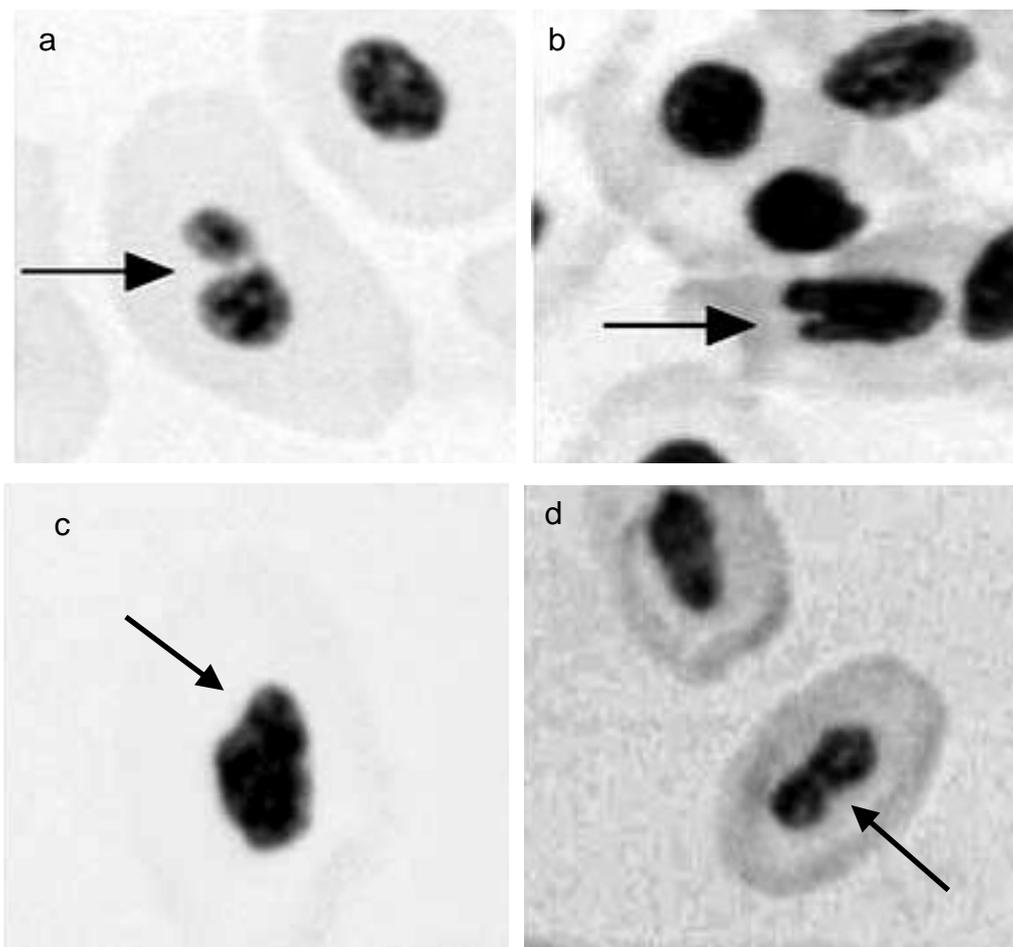


Figura 7. Representação das anormalidades nucleares analisadas nos eritrócitos periféricos de *O. niloticus*. (a) núcleo binucleado; (b) núcleo “notched”; (c) núcleo “lobed”; (d) núcleo “blebbed”. Fonte: Acervo pessoal.

4.4. Teste do cometa

O teste foi realizado segundo a técnica descrita por Singh *et al.* (1988), com algumas modificações para adaptar a técnica para peixes (Rivero *et al.*, 2008). O sangue coletado, aproximadamente 50 μ L foi diluído em 500 μ L de meio nutritivo HAM- F10 (Difco) para posterior aplicação do ensaio.

1. lâminas de 26 x 76 mm foram imersas em um recipiente contendo agarose com ponto de fusão normal a 1,5% (300mg em 20 mL de PBS), diluída em tampão PBS (NaCl 1,5

M; Na₂HPO₄ 0,1M; NaN₃ 0,02%, pH 7,2) e depois mantidas à temperatura ambiente, pelo período de 12 horas para secagem da agarose.

2. 120 µL de *Low melting point agarose* (LMP) a 0,5%, diluído em tampão PBS e aquecido a 37°C em banho-maria, foram rapidamente misturados a 10 µL da amostra de sangue (50 µL) diluído em 500 µL de meio HAM – F10 e imediatamente gotejados em uma lâmina pré-coberta com agarose com ponto de fusão normal. Uma lamínula foi colocada sobre o conjunto e levado à geladeira;

3. após 5 minutos na geladeira, a lamínula foi removida e as lâminas mergulhadas em um frasco Koplín coberto com papel alumínio, contendo solução de lise final gelada (2,5M NaCl, 100mM EDTA, 10mM Tris, 1X de Triton X-100);

4. após pelo menos uma hora imersas no tampão de lise a 4°C, as lâminas foram colocadas em uma cuba de eletroforese contendo tampão de eletroforese (300 mM NaOH, 1mM EDTA) fresco, pH 13. Após 30 minutos em repouso, procedeu-se a eletroforese a 25 V e 300 mA por um período de 30 minutos;

5. após a eletroforese, as lâminas foram lavadas com solução neutralizadora (0,4M Tris, pH 7,5). Esse processo foi repetido por três vezes em intervalos de 5 minutos;

6. o material neutralizado foi fixado em etanol absoluto por 5 minutos e em seguida, deixado para secar em temperatura ambiente.

7. a coloração dos nucleóides foi feita gotejando-se sobre as lâminas 30 µL de solução aquosa de Brometo de Etídio (20 µL/mL – solução estoque 10X)

A contagem de 100 nucleóides por peixe foi efetuada em microscópio de epi-fluorescência Axioskop-II Carl Zeiss, filtro de 510-560 nm, barreira de filtro de 590 nm e aumento total de 400x.

Desta maneira, foi feita a caracterização do tamanho e integridade da cauda do cometa que representa os níveis de lesões no DNA, que ocorrem nos eritrócitos do

sangue periférico. Deste modo, as células foram classificadas em classes de 0 a 4, segundo seu grau de lesão, conforme a figura 8.

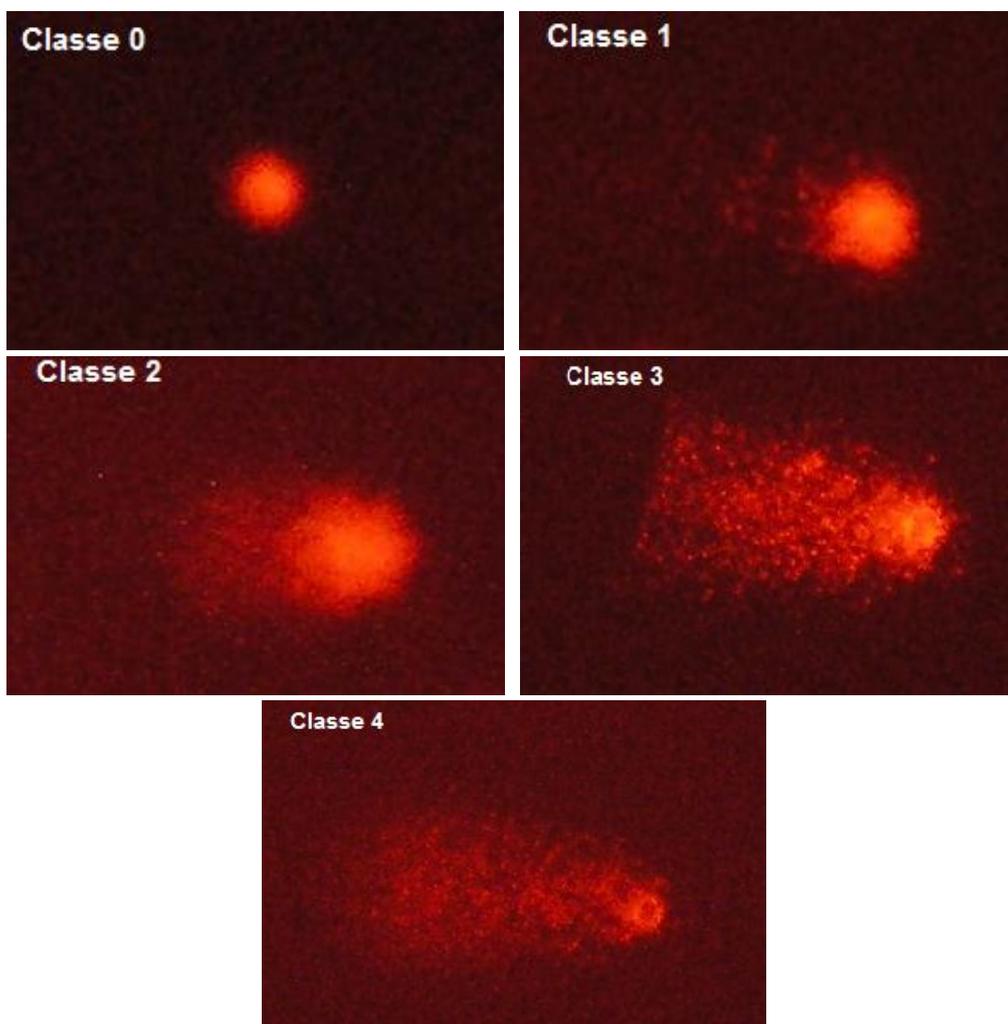


Figura 8. Classificação dos níveis de fragmentação do DNA segundo o grau de lesão.
Fonte: Acervo pessoal.

Para a quantificação do dano no DNA, o escore total para 100 células analisadas variou de 0 (dano mínimo = nenhuma célula danificada) a 400 (dano máximo = todas as células com dano de classe 4) (Jaloszynski *et al.*, 1999), sendo empregada a fórmula:

$$ID (ua) = \frac{N1 + 2N2 + 3N3 + 4N4}{S/100}$$

Onde,

ID = índice de danos no DNA;

ua = unidade arbitrária;

N1 a N4 = nucleóides nas classes 1, 2, 3 e 4;

S = número de nucleóides analisados, incluindo os da classe 0.

O teste do cometa tem sido proposto como uma excelente ferramenta de avaliação da genotoxicidade. O teste evidencia danos na molécula do DNA pela migração diferencial do material nuclear quando aplicado em eletroforese (Belpaeme *et al.*, 1996; Mitchelmore and Chipman, 1998; Lee and Steinert, 2003; Buschini *et al.*, 2004; Ferraro *et al.*, 2004; Kim and Hyun, 2006).

4.5. Histologia das gônadas

Inicialmente quatro grupos de dez peixes (*Oreochromis niloticus* e *Astyanax bimaculatus*) foram mantidos por 96 horas em três concentrações diferentes da MT (0,01; 0,1; 1 mg/L), além do respectivo grupo controle (sem exposição).

Posteriormente, foi realizado outro teste de exposição em laboratório com as mesmas espécies, administrando a ração que alimenta os peixes na Piscicultura Granja do Ipê. A ração em “pellets”, que é preparada através da adição de 500 mL de etanol para cada kg de ração, sendo 60 mL da solução estoque e 440 mL de etanol hidratado (96GL) preparada com 1 grama de metiltestosterona diluído em 1 litro de etanol absoluto. Após esse tratamento a ração fica em repouso, exposta ao ar em ambiente protegido da luz por 15 dias, para que o etanol evapore naturalmente.

Após as exposições, as gônadas foram retiradas, fixadas com a solução Davidson (glicerol, álcool etílico absoluto, ácido acético glacial e água destilada) por 24 horas, seguindo-se então o protocolo de rotina de clarificação, inclusão e coloração histológica de hematoxilina e eosina.

1. A parte posterior das gônadas foram colocadas em cassetes e mergulhadas em álcool 70% após as 24 horas, são imersas no fixador Davidson;
2. Após 24 horas, colocam-se em álcool 80%, 90%, 100% I, 100% II, 100% III, cada um por 40 minutos.
3. Na etapa da clarificação o xilol foi aplicado duas vezes por 20 minutos cada;
4. Para a inclusão, o material foi mergulhado em parafina tipo I, II e III por 40 minutos em cada tipo;
5. Na etapa da coloração, a sequência nas cubas com o tempo determinado: xilol I, xilol II, álcool 100 I, álcool 100 II, álcool 100 III, álcool 90, álcool 80, álcool 70 (todos por 1 minuto). Em seguida as lâminas ganham um banho de água para completar a hidratação do material e são colocadas em uma cuba contendo hematoxilina por 40 segundos.
6. As lâminas recebem um banho de água de aproximadamente 1 minuto para extrair o excesso de hematoxilina e são colocadas em uma cuba contendo eosina por mais 40 segundos.
7. Após o banho na eosina, retira-se o excesso desse corante com água e inicia-se o processo de desidratação, começando com o álcool 70, seguido por álcool 80, álcool 90, álcool 100 I, álcool 100 II, álcool 100 III, xilol I e xilol II.
8. Após a desidratação o material é montado, fixando-se a lamínula com acrílex e deixa-se o material secar em estufa à 50 °C por aproximadamente 1 hora.

Os ovócitos das espécies *O. niloticus* e *A. bimaculatus* apresentam desova parcelada e para classificar os tipos de ovócitos utilizou-se a seguinte escala de maturação:

OVÓCITO I: As secções histológicas mostravam ovócitos e ovogônias ocupando virtualmente toda a extensão do corte, pequenos e com núcleo grande circundado por

citoplasma delgado levemente basófilo. O nucléolo era grande e, geralmente, único; os ovócitos tinham tamanhos variados, forma esférica e poligonal.

OVÓCITO II: (em repouso) Havia predomínio de ovócitos poligonais organizados em lamelas que se projetavam da parede das gônadas e fortemente basófilos, com núcleo relativamente grande, nucléolos numerosos e periféricos; algumas ovogônias foram observadas.

OVÓCITO III: (maturação) Nessa fase as gônadas eram mais volumosas. Além dos ovócitos descritos no estágio II, havia ovócitos maiores, que apresentavam citoplasma com basofilia moderada, grande número de vesículas periféricas e nucléolos em grande número; havia, também, ovócitos ainda maiores, com deposição de grânulos de vitelo em extensões variáveis, sugerindo a função de fixação do folículo ovariano no ambiente.

OVÓCITO IV: (desovando) Nessa fase os ovócitos eram grandes e abundantes; na extensão das gônadas apareceram espaços gelatinosos, em fêmeas que já haviam eliminado muitos ovócitos, os quais, além de grandes, eram repletos de vitelo, tinham o núcleo amorfo e ocupavam quase todo o ovário. Havia ovócitos poligonais, similares aos do estágio II (repouso), preenchendo os interstícios deixados pelas células anteriores. Foram observados, também, folículos vazios.

OVÓCITO V: (esgotado) Nessa fase os ovócitos eram grandes, repletos de vitelo e continham grande número de ovócitos vitelinados em absorção.

O material foi analisado em microscópio de luz no aumento de 40, 100 e 400x para determinação do estágio de maturação.

Para analisar os efeitos do hormônio MT na reprodução das espécies de peixes estudadas, avaliamos o diâmetro dos ovócitos tipo V e a área abrangida pelos espermatozóides. A morfometria foi realizada com o programa Image-pro Plus 5.1,

onde ± 30 ovócitos expostos a cada concentração de MT e do controle, foram usados para a realização da análise comparativa do diâmetro.

O método de histologia utilizado foi aplicado para todos os organismos testados (*Oreochromis niloticus*, *Astyanax bimaculatus* e *Biomphalaria glabrata*). A gônada hermafrodita do caramujo apresenta – se em formato de cacho (acinos), onde encontramos ovócitos de diferentes tamanhos e fases da espermatogênese provenientes do mesmo folículo (Silva *et al.*, 2009b).

4.6. Desempenho reprodutivo em caramujos

Foram utilizados 50 moluscos gastropoda, da espécie *Biomphalaria glabrata*, dispostos individualmente em copos de 300 mL e alimentados com alface e ração para peixes. As concentrações de MT foram 0,01; 0,1; 1 mg/L e para os controles usou-se água mole sintética de dureza 40 ± 2 mg/L em CaCO₃ (sulfato de cálcio, cloreto de potássio, bicarbonato de sódio e sulfato de magnésio) preparada conforme as normas da Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT, 2004) e a mesma concentração de álcool absoluto (0,043mL/L ou 31,6mg/L) que foi utilizado na concentração de 1 mg/L também foi utilizada no controle com álcool. Caramujos com 3 meses de vida foram expostos individualmente em copos de vidro de 300 mL e mantidos sob condições ambientais controladas (25 ± 1 °C e ciclo de luz/escuro de 16: 8 h). As soluções teste foram renovadas duas vezes por semana e os caramujos foram alimentados com alface orgânica fresca (1cm²) mais 1 mg de ração comercial para peixes.

Os caramujos (N=10 por grupo) foram expostos em água contendo MT, seguindo os tratamentos: (1) controle com álcool; (2) 0.01 mg/L de MT; (3) 0.1 mg/L de MT; (4) 1 mg/L de MT. Para poder analisar as desovas os copos foram internamente cobertos com papel celofane (Olivier and Haskins, 1960; Oliveira-Filho *et al.*, 2009b,

a) Os papéis foram trocados duas vezes por semana e o número de ovos e desovas por caramujo foram contados. Os ovos e desovas produzidos pelos caramujos foram avaliados por 4 semanas consecutivas, um tempo considerado suficiente para observação de efeitos reprodutivos (Oliveira-Filho *et al.*, 2009a).



Figura 9. Três desovas de *B. glabrata* com uma média de 15 ovos cada FONTE: tese de doutorado (Oliveira-Filho, 2003).

4.7. Toxicidade e teratogenicidade da 17 α -metiltestosterona em embriões de *Danio rerio*

Os ovos de *Danio rerio* coletados logo após a fecundação, foram dispostos em placas do tipo ELISA de 24 poços, expostos as diferentes concentrações do hormônio e analisados de acordo com o tempo de exposição. Em seguida, as placas foram incubadas na temperatura de 26 ± 1 °C e a cada 2h horas foram avaliados os diferentes “endpoints” da teratogenicidade, sub letalidade e letalidade da substância-teste com o auxílio de um microscópio estereoscópico, de acordo com o protocolo descrito no “OECD Guideline

on Fish Embryo Toxicity Test” (OECD, 2006). O teste é considerado válido, se o grupo controle não apresentar nenhuma letalidade e sub letalidade.

4.8. Testes bioquímicos

Depois da realização dos bioensaios, as amostras foram congeladas em microtubos de 1,5 mL à 80°C no tampão adequado para as análises. A ChE foi analisada a 414 nm, utilizando acetiltiocolina como substrato de acordo com o método de Ellman (Ellman *et al.*, 1961), adaptado para microplacas (Guilhermino *et al.*, 1996). As determinações de LDH seguirão a metodologia descrita por Vassault *et al.* (1983), com as modificações introduzidas por Diamantino *et al.* (2001). A atividade enzimática será determinada em quadruplicata e expressa em nanomoles de substrato hidrolisado por minuto, por mg de proteína.

Para a avaliação do estresse oxidativo, através da enzima glutathione-S-transferase (GST), todas as atividades enzimáticas foram quantificadas espectrofotometricamente a 25 °C e seguimos as metodologias descritas em Monteiro *et al.* (2006). A atividade da GST foi medida de acordo com 1-cloro-2, 4 dinitrobenzeno (CDNB) como substrato (Habig *et al.*, 1974). A formação de adutos glutathione S-2 ,4-dinitrofenil foi acompanhada pelo aumento da absorbância a 340 nm contra o branco. O coeficiente de extinção molar utilizado para CDBN foi de 9,6 mM⁻¹ cm⁻¹. A atividade foi expressa como a quantidade de enzima que catalisa a formação de um nmol de produto formado por minuto por miligrama de proteína.

Para toda a análise acima mencionada, a concentração de proteína nas amostras foi determinada em quadruplicata pelo método de Bradford (Bradford, 1976), a 595 nm,

utilizando- γ -globulina como padrão. Um Labsystem Multiskan EX leitor de microplacas foi usado para todas as determinações de proteínas.

Para a análise da vitelogenina, as amostras de peixes (fígado e gônada) (n = 10 por exposição) foram homogeneizadas através de sonicação em 1 mL de tampão de homogeneização (contendo 125 mM NaCl, 25 mM Tris-HCl, 5 mM EDTA e 1 mM dithiothreitol em pH 8) por 200 g de tecido de peixe (fígado e gônada) e então foi centrifugado à 12.000 g por 20 min na temperatura de 4 °C. VTG foi determinada pelo método indireto álcali-lábil fosfato (Gagné and Blaise, 2000) com algumas alterações (Hallgren *et al.*, 2009). Briefly, 100 μ L do sobrenadante foi misturado com 54 μ L de acetona (35% do volume final) por 5-10 minutos em temperatura ambiente e então misturado com um agitador vortex à 25 °C para depois centrifugar em 10.000 g por 5 minutos. Após a remoção da acetona, 50-100 μ L (dependendo do tamanho do pellet gerado), 1M NaOH foi adicionado as amostras que então foram mantidas por 90 minutos a 70 °C (Hallgren *et al.*, 2009), para permitir a hidrólise do fosfato ligado (Gagné and Blaise, 2000). O nível de fosfato livre foi determinado na fase aquosa de acordo com o método de fosfomolibdenio (Stanton, 1968). Os resultados foram expressos em mg PO₄/mg proteína.

4.9. Testes estatísticos

As análises estatísticas para os testes de genotoxicidade e efeitos na reprodução dos peixes foram efetuadas pelo software SPSS, versão 17. Para determinar o teste a ser aplicado, todas as amostras foram submetidas ao teste de normalidade Shapiro-Wilk, para verificar qual tipo de teste a ser aplicado, paramétrico ou não paramétrico. De acordo com os resultados da normalidade foram aplicados os testes não paramétricos: teste t para amostras independentes dois-a-dois ou Mann Whitney, e os paramétricos:

ANOVA ou Bonferroni. Os valores de p foram determinados pelo teste de Kruskal Wallis. Os dados foram apresentados como médias e erro padrão das médias.

Os grupos analisados foram divididos da seguinte maneira para as análises estatísticas: controle negativo (grupo 1), controle com álcool (0,043ml/L ou 31,6mg/L)(grupo 2), concentração de 0,01 mg/L de MT (grupo 3), 0,1 mg/L de MT (grupo 4) e 1 mg/L de MT (grupo 5).

Para determinação das Diferenças no número de ovos e desovas produzidas entre os caramujos testados e os do grupo controle foi utilizada a ANOVA seguida pelo teste de comparação múltipla de Dunnett (Dunnett, 1955). O Software contendo o teste de Dunnett (versão 1.5) foi disponível no site da Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos. As análises dos oócitos e análises dos espermatozóides foram realizados pelo software GraphPad Prim 5.0 e as possíveis diferenças entre os grupos foram investigadas por ANOVA ou de Kruskal-Wallis (quando os dados não são normalmente distribuídos), seguido, respectivamente, pelo teste de Bonferroni ou Mann-Whitney U para realizar comparações de dois em dois.

Para as análises de embriotoxicidade e subletalidade em adultos de zebrafish foi utilizado um software de estatística, Sigma Stat versão 11. One-way ANOVA foi realizada quando os dados não ultrapassavam a normalidade pelo teste de Kolmogorov Smirnov, em outros casos o teste de Kruskal–Wallis foi realizado. Se resultados significativos são encontrados, teste Dunnett ou Dunn's foi utilizado para verificar as diferenças entre as concentrações testadas e controle. As concentrações letais em 50% dos animais em desenvolvimento inicial foi calculado com o programa probit versão 1,63. Todas as análises estatísticas foram realizadas levando em consideração o nível de significância de 5%.

5. RESULTADOS

5.1. Toxicidade aguda de cMT

5.1.1. Genotoxicidade aguda da cMT

A MT não induziu MN na espécie *O. niloticus* nas maiores concentrações de 0,1 e 1 mg/L de cMT. Entretanto na concentração mais baixa de 0,01 mg/L ocorreu um aumento da frequência de MN ($p < 0,05$) comparado com ambos os controles. Observando os resultados de AN, nas concentrações de 0,01 e 1 mg/L foram estatisticamente relevantes em relação apenas ao controle com álcool. A frequência de AN no grupo controle com etanol foi menor do que os valores encontrados no controle com água, evidenciando que o etanol não influencia nos resultados obtidos (tabela 1).

No teste do cometa, a cMT não induziu danos no DNA. Na espécie *A. bimaculatus*, a cMT não induziu lesões no DNA ou AN. Já o grupo controle com etanol apresentou menos danos significativamente quando comparado com os grupos expostos ao cMT. Na menor concentração de 0,01 mg/L houve um aumento na frequência de MN ($p < 0,05$) em relação aos dois controles (tabela 2).

Tabela 1. Genotoxicidade da MT em *O. niloticus*, mostrando os resultados de MN, AN e Teste do cometa depois da exposição por 96h.

Grupo	Animal	Tratamento	MN/3000cel	AN/1000cel	Danos no DNA
1	10	Controle	0.10 ± 0.10	5.00 ± 1.42	$81.00 \pm 3.96^*$
2	10	Etanol	0.09 ± 0.09	0.73 ± 0.63	68.50 ± 3.70
3	10	0.01 mg/L	$1.43 \pm 0.53^*$	$12.43 \pm 4.55^*$	59.14 ± 6.73
4	10	0.1 mg/L	0.63 ± 0.26	7.88 ± 3.50	69.56 ± 6.68
5	10	1.0 mg/L	0.25 ± 0.16^f	11.13 ± 4.84	79.79 ± 2.31
P-values			0.010	0.003	0.043

* Indicam diferenças estatísticas significantes em relação aos controles.

Tabela 2. Genotoxicidade da cMT em *A. bimaculatus*, mostrando os resultados de MN, AN e Teste do cometa após 96h de exposição.

Grupo	Peixes	Tratamento	MN/3000cel	AN/1000cel	Danos no DNA
1	10	Controle	0,22 ± 0,09	2,70 ± 0,83	59,18 ± 5,73
2	10	Etanol	0,81 ± 0,31	3,71 ± 0,71	43,05 ± 6,67
3	10	0,01 mg/L	2,25 ± 0,50*	2,30 ± 0,83	62,88 ± 5,04
4	10	0,1 mg/L	0,00 ± 0,00	1,94 ± 0,60	74,10 ± 3,36*
5	10	1,0 mg/L	0,56 ± 0,22	3,38 ± 0,75	72,23 ± 6,22*
P-values			0,000	0,162	0,011

* Indicam diferenças estatísticas significantes em relação aos controles.

5.1.2. Efeitos na reprodução da exposição aguda ao cMT

Na caracterização das gônadas de *Oreochomis niloticus*, foi observado que tanto as fêmeas do controle como dos tratamentos com cMT estavam em estágio de maturação inicial, com a presença de poucos ovócitos tipo 5. Tanto os ovócitos em estágio inicial de maturação como os de tipo 5 apresentaram descolamento do tecido conjuntivo, possível atresia dos ovócitos (figura 10). Não foi evidenciado ovotestis nesta exposição.

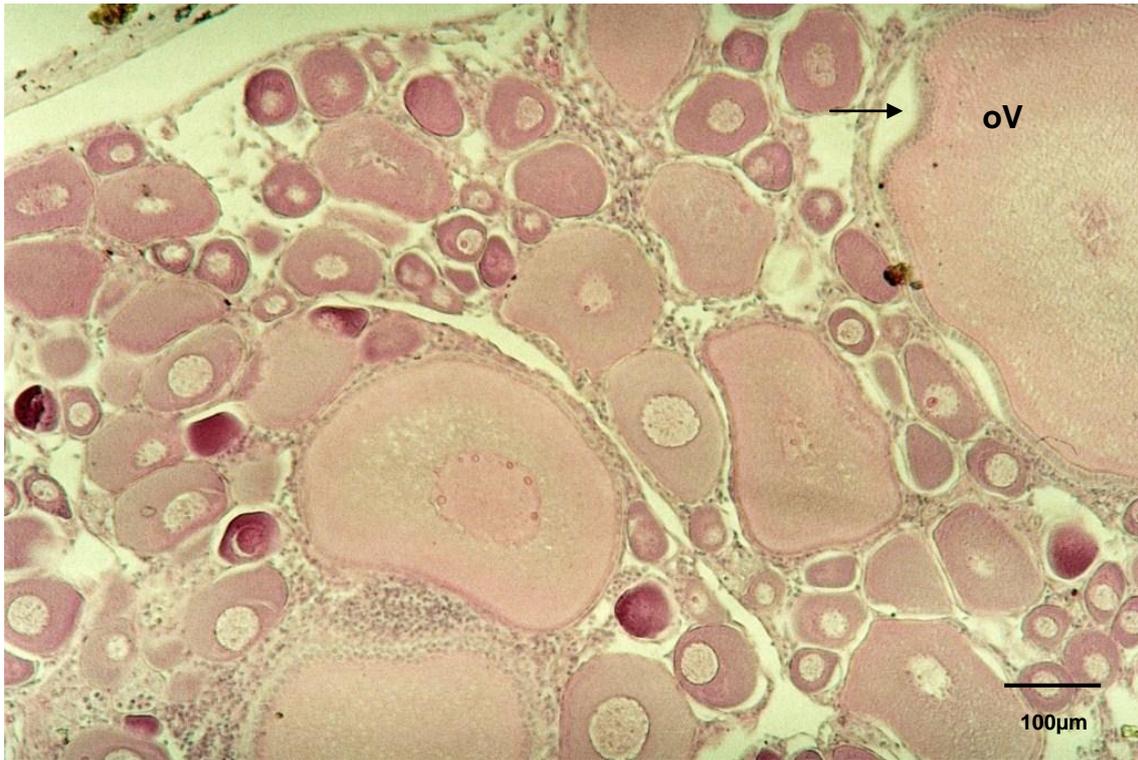


Figura 10. Microfotografia da gônada de fêmea de *Oreochromis niloticus* do controle em maturação inicial, evidenciando ovócito tipo 5 (oV) com descolamento do tecido conjuntivo (indicado pela seta). Aumento 100x.

As gônadas dos machos de *Oreochromis niloticus* do controle foram classificadas como em maturação (figura 11) e as gônadas expostas por 96h ao cMT apresentaram-se em maturação inicial (figura 12), com a presença de cistos de espermatócitos primários (sp), secundários (ss) e poucos cistos de espermatídes (st), com raros espermatozoides (sz).

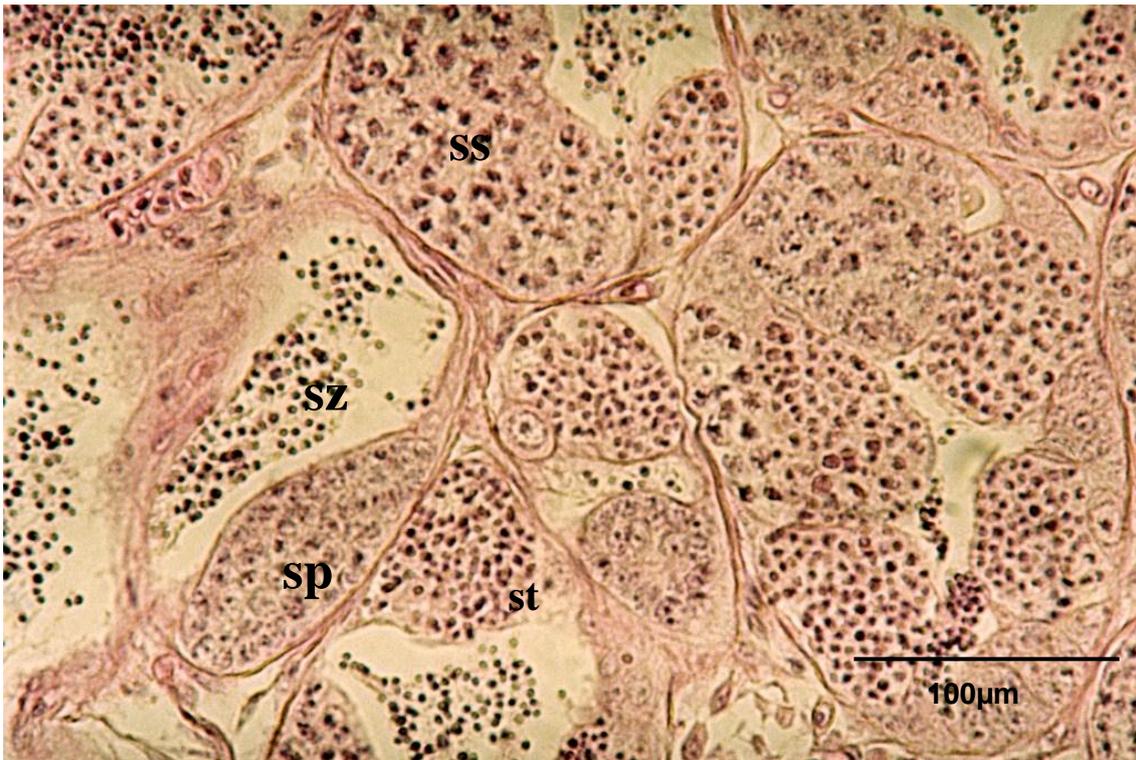


Figura 11. Microfotografia da gônada de *Oreochromis niloticus* do controle, em maturação, sendo possível observar cistos de espermatócito primário (sp), espermatócito secundário (ss), espermatídes (st) e espermatozóides (sz). Aumento de 400x.

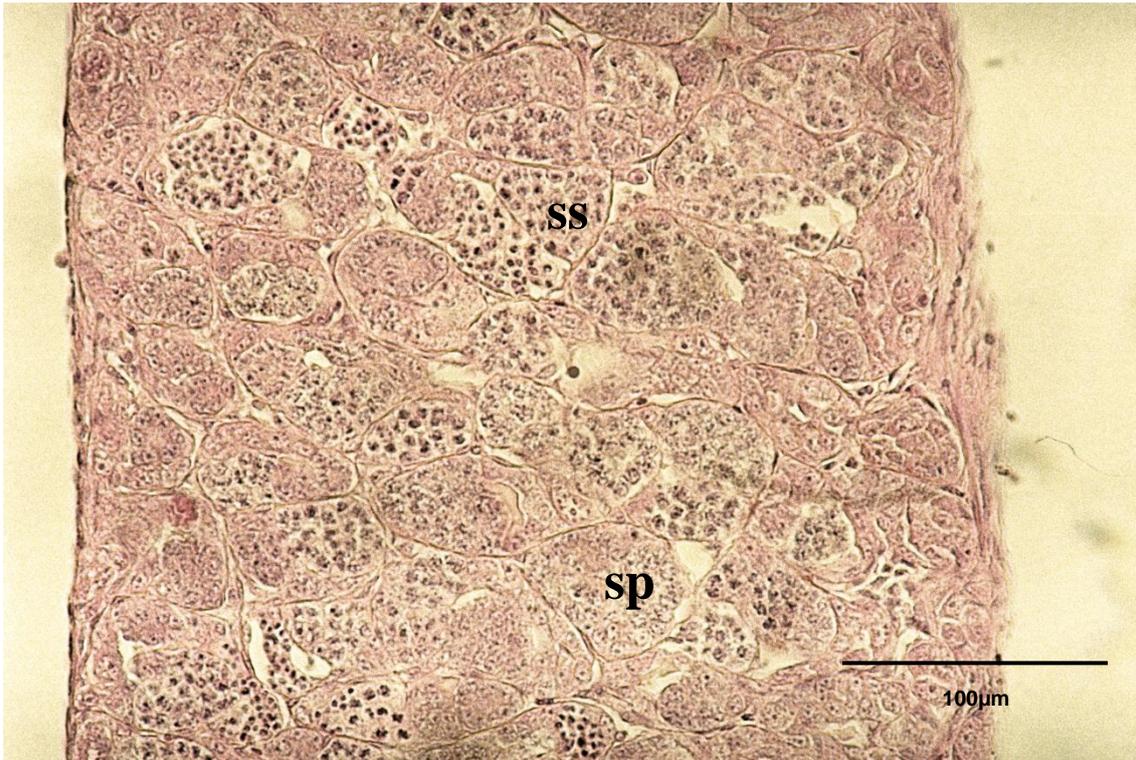


Figura 12. Microfotografia da gônada de macho de *Oreochromis niloticus* exposto à concentração de 0,1 mg/L de cMT. Observado gônada em maturação inicial, com presença de cistos de espermatócitos primário (sp) e secundário (ss). Aumento 400x.

Na tabela 3 podemos observar uma diferença significativa na produção de espermatozoides de machos de *Oreochromis niloticus* em relação ao controle negativo com álcool. Todavia, dentre os indivíduos analisados no controle sem álcool, não foram encontrados machos, apesar da prévia sexagem dos peixes antes da exposição ao composto.

Tabela 3. Análise morfométrica das gônadas de machos da espécie *Oreochromis niloticus*, expostos por 96 horas as concentrações de cMT

Grupo	Tratamento	Área (μm^2)
1	Etanol	2073,53 \pm 225,57
2	0,01 mg/L	228,47 \pm 48,48*
3	0,1 mg/L	354,37 \pm 48,13*
4	1,0 mg/L	254,32 \pm 21,44*
P-valor		0,000

- Indicando diferenças estatísticas significativas em relação ao controle (*p<0,01).

As gônadas de *Astyanax bimaculatus* possuem desova parcelada e os animais do controle e os expostos estavam reprodutivamente maduros, com a presença de muitos ovócitos tipo 5 nas fêmeas (figura 13) e espermatozóides nos machos (figura 14). As fêmeas de *Astyanax bimaculatus* expostas ao cMT não mostraram diferenças significativas quando comparadas com os controles.



Figura 13. Microfotografia de gônadas maduras, fêmea de *Astyanax bimaculatus* do controle (a) e exposta ao MT (b), com a presença de vários ovócitos tipo 5 (oV), aumento de 100x.

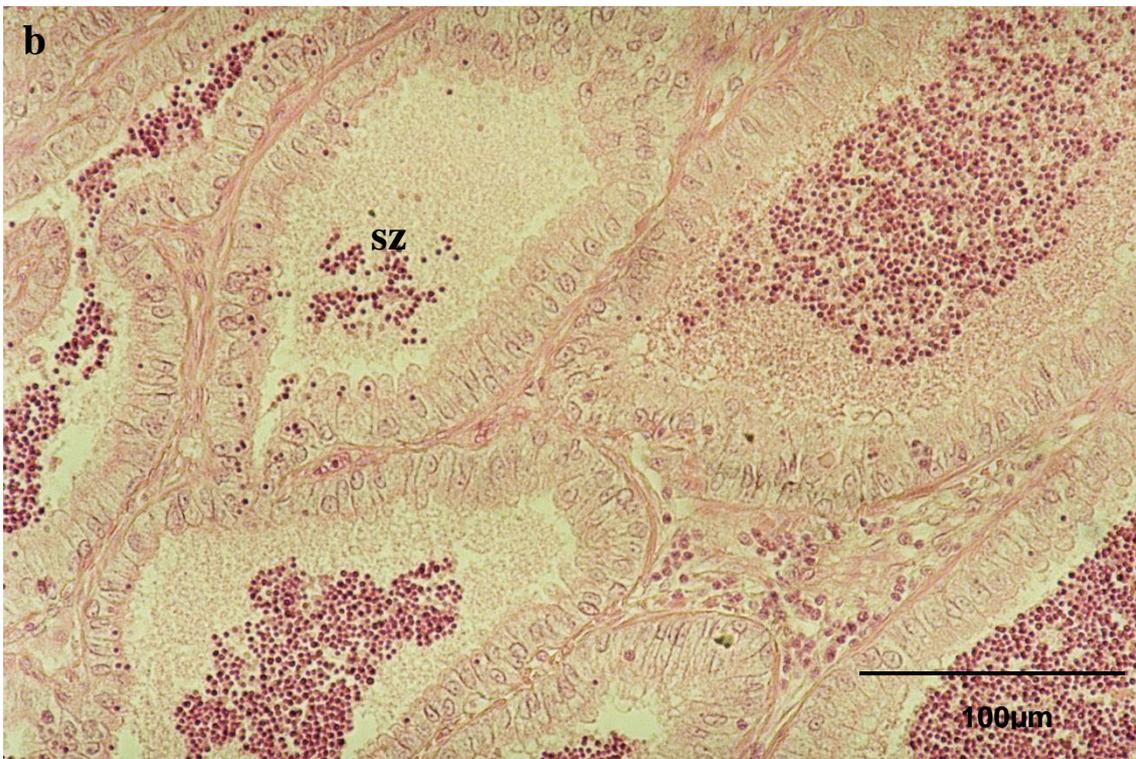
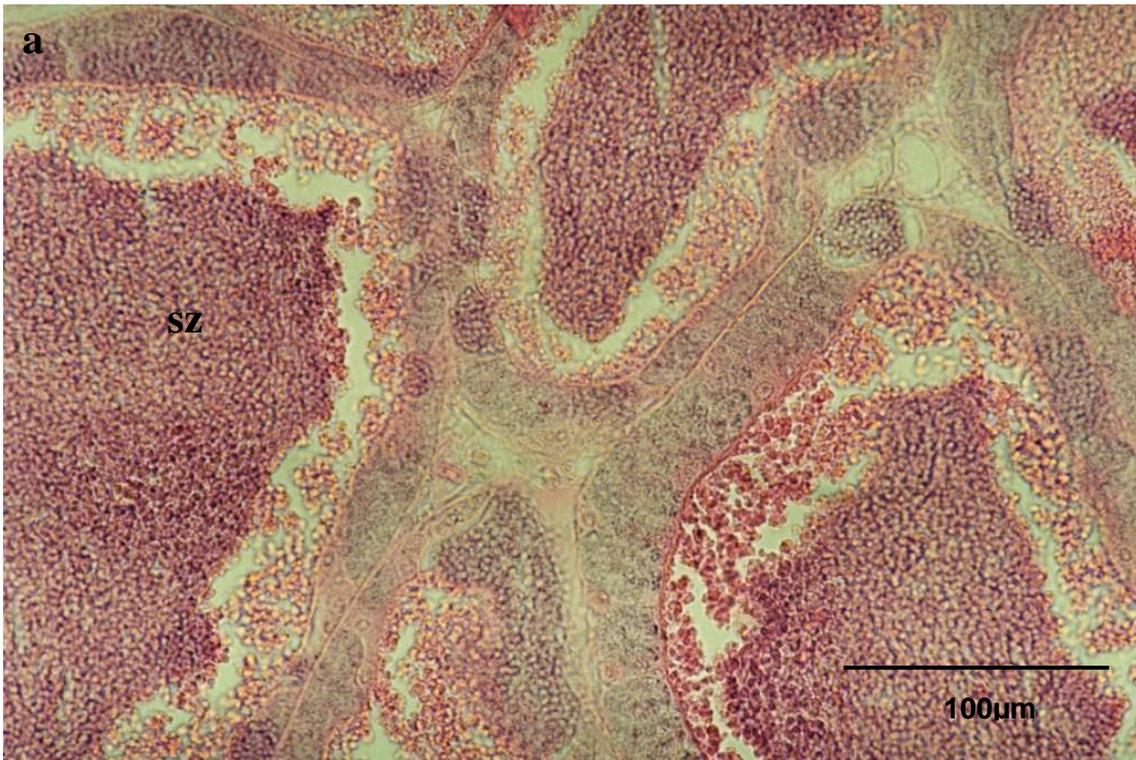


Figura 14. Microfotografia da gônada de *Astyanax bimaculatus* macho, controle (a) e exposto 0,01mg/L de cMT (b), presença de espermatozoides (sz) observado no aumento de 400x.

De acordo com a tabela 4, podemos verificar que ocorreu uma diminuição significativa da produção de espermatozoides nos *Astyanax bimaculatus* expostos as concentrações de 0,01; 0,1 e 1 mg/L de cMT quando comparados ao controle sem álcool.

Tabela 4. Análise morfométrica das gônadas de machos de *Astyanax bimaculatus*, expostos por 96 horas as concentrações de cMT.

Grupo	Tratamento	Área (μm^2)
1	Controle	7364,54 \pm 335,36
2	Etanol	4346,16 \pm 228,07
3	0,01 mg/L	4680,12 \pm 320,65
4	0,1 mg/L	890,61 \pm 55,59*
5	1,0 mg/L	1807,15 \pm 244,43*
P-valor		0,000

* Indicando diferenças estatisticamente significativas em relação ao controle com álcool (*p<0,01).

5.2. Toxicidade crônica de cMT

5.2.1. Genotoxicidade crônica de cMT em peixes

Os resultados não foram significativos para genotoxicidade em relação aos testes estatísticos aplicados ($p > 0,05$). A via de exposição foi à alimentação, com o intuito de simular os efeitos da mesma dieta aplicada nas larvas da piscicultura para promover a reversão sexual, só que em indivíduos reprodutivamente maduros. Os resultados encontrados para a espécie *O. niloticus* e *A. bimaculatus* estão representados na tabela 5, onde podemos observar a ausência de genotoxicidade. Apenas houve diferença significativa entre o grupo controle e exposto ao cMT nas anormalidades nucleares para *A. bimaculatus* ($p=0,002$). Não houve diferenças significativas para MN e danos no

DNA em ambas às espécies (tabela 5). O *Astyanax bimaculatus*, como espécie não alvo, mostrou-se mais sensível aos efeitos da cMT, através das alterações nucleares.

Através dos testes de genotoxicidade já descritos anteriormente, foi possível observar através do teste t para amostras independentes, que o cMT também não causou efeitos genotóxicos para os alevinos de *Oreochomis niloticus* tratados na piscicultura para reversão sexual (tabela 6).

Tabela 5. Avaliação de MN, AN e cometa, através da exposição por 28 dias, via ração tratada com cMT.

Grupo	Tratamento	MN	AN	% dano total	% de danos moderados	% de danos elevados
<i>Oreochomis niloticus</i>						
1	Controle	0,10 ± 0,10	9,80 ± 4,00	55,52 ± 4,22	22,46 ± 2,40	33,06 ± 6,43
2	Ração com MT	0,00 ± 0,00	12,80 ± 4,07	47,18 ± 3,55	25,45 ± 1,55	21,73 ± 4,77
	P-valores	0,317	0,288	0,155	0,330	0,187
<i>Astyanax bimaculatus</i>						
1	Controle	0,00 ± 0,00	2,80 ± 0,66	60,14 ± 5,15	20,97 ± 3,11	39,17 ± 8,01
2	Ração com MT	0,40 ± 0,22	9,00 ± * 1,70	57,58 ± 6,28	19,08 ± 2,86	38,50 ± 8,97
	P-valores	0,068	0,002	0,757	0,401	0,895

* Indicando diferenças estatisticamente significativas em relação ao controle.

Tabela 6. Avaliação de MN, AN e cometa dos alevinos de *Oreochomis niloticus* expostos por 28 dias, via ração tratada com cMT na piscicultura.

Grupo	Tratamento	MN	AN	% dano total	% de danos moderados	% de danos elevados
1	Controle	0,71±0,29	18±1,81	45,69±2,91	29,72±0,67	15,97±3,02
2	Ração com MT	1,9±0,43*	18,4±2,79	47,88±2,94	29,33±0,99	18,55±3,22
	P-valores	0,038	0,915	0,609	0,760	0,575

* Indicando diferenças estatisticamente significativas em relação ao controle com álcool (*p<0,01).

5.2.2. Efeitos crônicos na reprodução (histologia e morfometria de ovócitos maduros e espermatozóides)

A morfologia das gônadas foi similar ao de outros teleósteos. Os ovários foram encontrados na região dorsal da cavidade celômica e tivemos boa visibilidade dos ovócitos já que eram indivíduos adultos. Durante a retirada das gônadas foi possível observar as diferenças de tamanho das gônadas expostas ao cMT em relação ao controle, principalmente na espécie *A. bimaculatus* (figura 15 e 16).



Figura 15. Observação das gônadas femininas de *Oreochromis niloticus* durante a coleta de material para análise histológica. (a) fêmea de *Oreochromis niloticus* do grupo controle; (b) fêmea de *Oreochromis niloticus* do grupo exposto a ração com cMT.

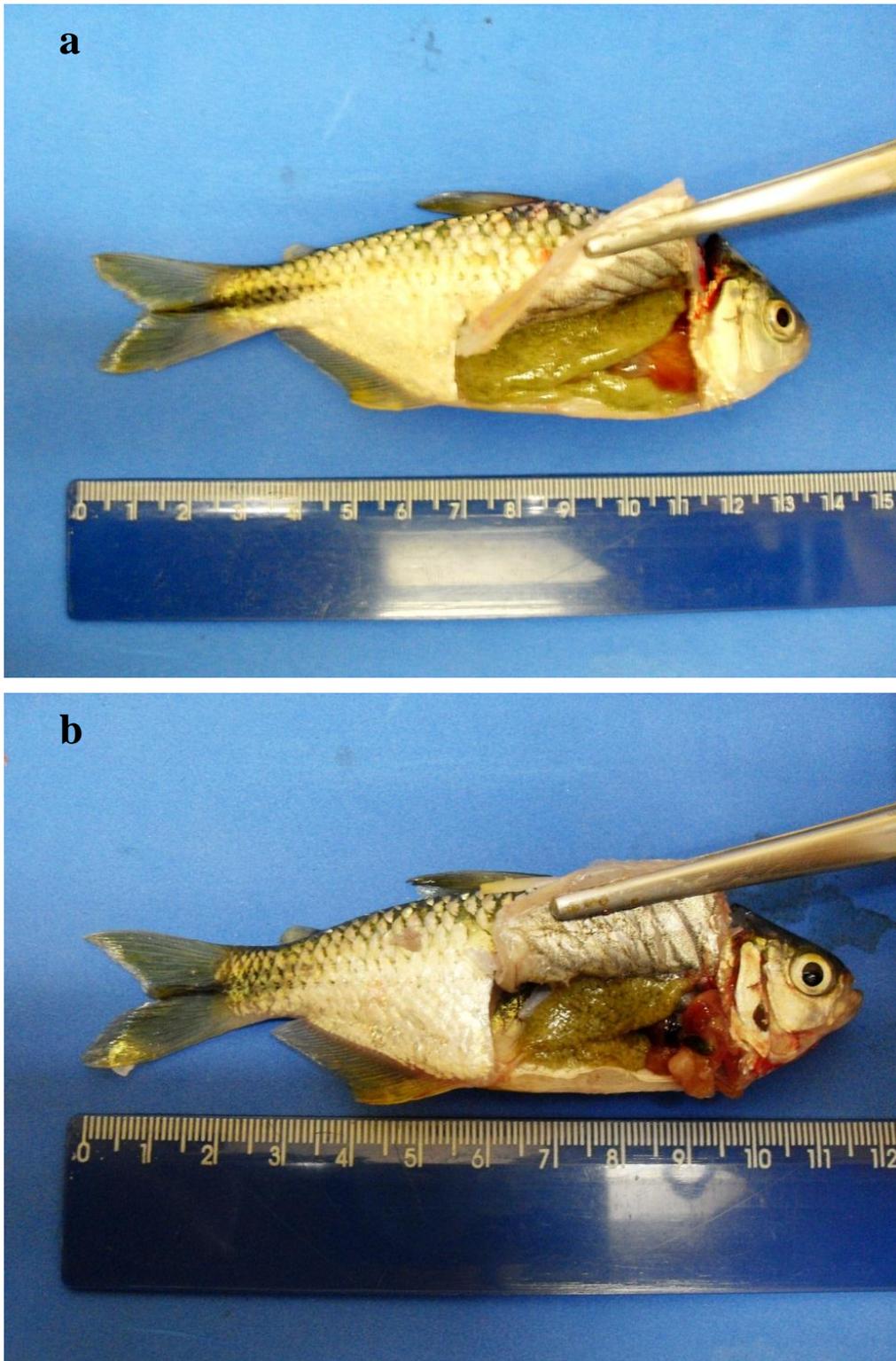


Figura 16. Observação das gônadas femininas de *Astyanax bimaculatus* durante a coleta de material para análise histológica. (a) fêmea de *Astyanax bimaculatus* do grupo controle; (b) fêmea de *Astyanax bimaculatus* do grupo exposto a ração com cMT.

O. niloticus apresenta uma típica oogênese com desova parcial, ao contrário do *A. bimaculatus* que apresenta desova total. A profusão de tecido em processo degenerativo, por vezes, é facilmente detectada como folículo atrésico, que difere histologicamente das gônadas do grupo controle, especialmente em *O. niloticus*. Ovócitos tipo V de *O. niloticus* diminuiu significativamente no diâmetro quando expostos ao grupo MT comparação com o controle ($p = 0,000$) (Tabela 7, Fig. 17a e 17b). Por outro lado, em *A. bimaculatus* não foi observada diferença significativa nos diâmetros de ovócitos V (Figuras 18a e 18b).

Tabela 7. Análise morfométrica dos ovócitos maduros e produção de espermatozóides em *Oreochromis niloticus* e *Astyanax bimaculatus*.

Grupo	Animais	Tratamento	Diâmetro (μm)	Área (μm^2)
<i>O. niloticus</i>				
1	10	Controle	$722,47 \pm 47,2$	$2410,13 \pm 122,84$
2	10	MT	$383 \pm 14,65^*$	$3125,31 \pm 349,29$
		P-valores	0,000	0,667
<i>A. bimaculatus</i>				
1	10	Controle	$497,11 \pm 17,26$	$8653,94 \pm 387,92$
2	10	MT	$476,21 \pm 13,87$	$6932,12 \pm 387,69^*$
		P-valores	0,239	0,006

* Indicando diferenças estatisticamente significativas em relação ao controle.

Os testículos foram localizados dorsalmente e o esperma era visível macroscopicamente, indicando a maturidade sexual. Todos os testículos foram histologicamente avaliados e apresentaram epitélio germinativo masculino dentro dos túbulos seminíferos. Este epitélio germinativo é formado por espermatogônias primária e secundária, espermatócitos I e II e espermatídes. O desenvolvimento destas células ocorre através de cistos, exceto para as espermatogônias primárias e espermatozóides.

Os espermatozoides preenchem o lúmen e drenam em direção à região central, que é formada por um tecido conjuntivo denso com vascularização arterial abundante e canais deferentes de drenagem cobertas por epitélio. Nos machos, os efeitos sobre a produção de esperma foram observados para *O. niloticus* (Figura 19a e 19b), mas a produção de esperma diminuiu significativamente no grupo de MT em relação ao controle na espécie *A. bimaculatus* ($p = 0,006$) (Tabela 7, Fig. 20a e 20b).

A completa masculinização e desenvolvimento de ovotestis não ocorreram em nenhuma das duas espécies.

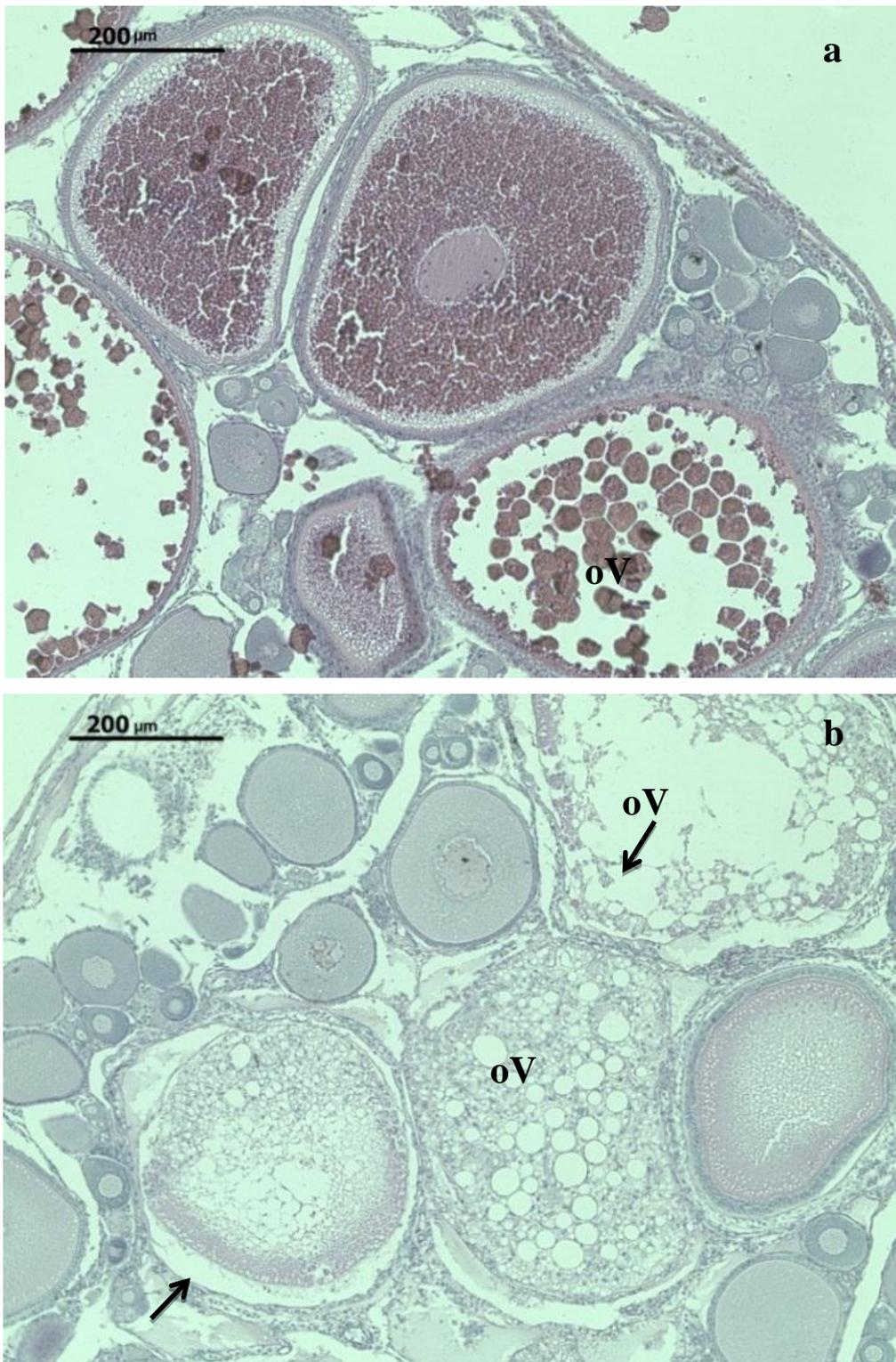


Figura 17. Microfotografia mostrando a histologia de gônadas femininas de *Oreochromis niloticus* (a e b). (a) fêmea do controle; (b) fêmea tratada com ração com cMT. (a) desenvolvimento normal do tecido ovariano em fêmeas de *Oreochromis niloticus* do grupo controle. (b) degeneração do tecido ovariano de fêmeas adultas de

Oreochromis niloticus expostas à 60mg/L cMT por 28 dias. As setas significam degeneração ovariana. Aumento de 400x.

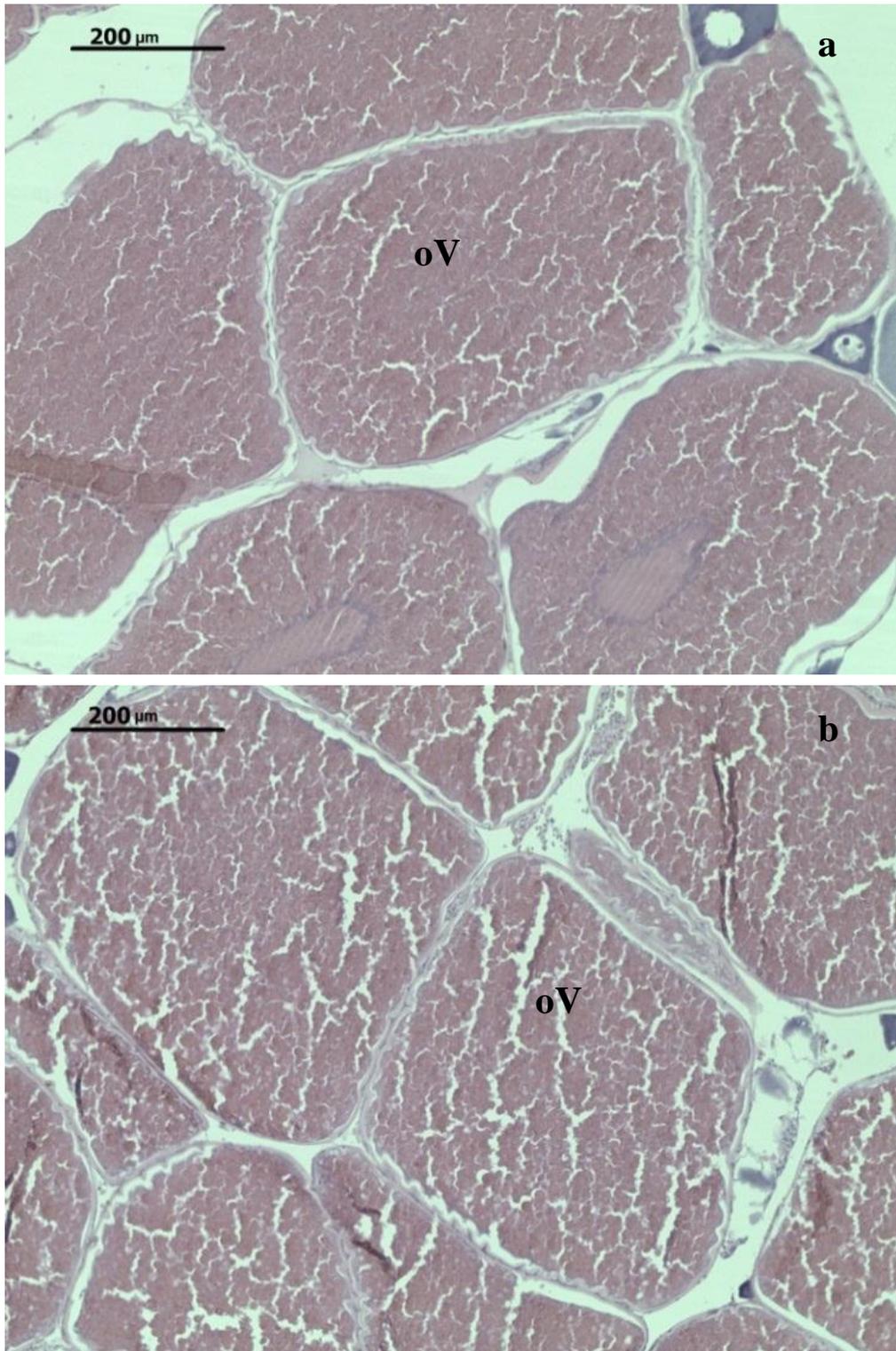


Figura 18. Microfotografia mostrando a histologia de gônadas femininas de *Astyanax bimaculatus*. (a) ovócitos tipo V de fêmeas do grupo controle; (b) ovócitos tipo V do grupo tratado com ração contendo cMT. Aumento de 400x.

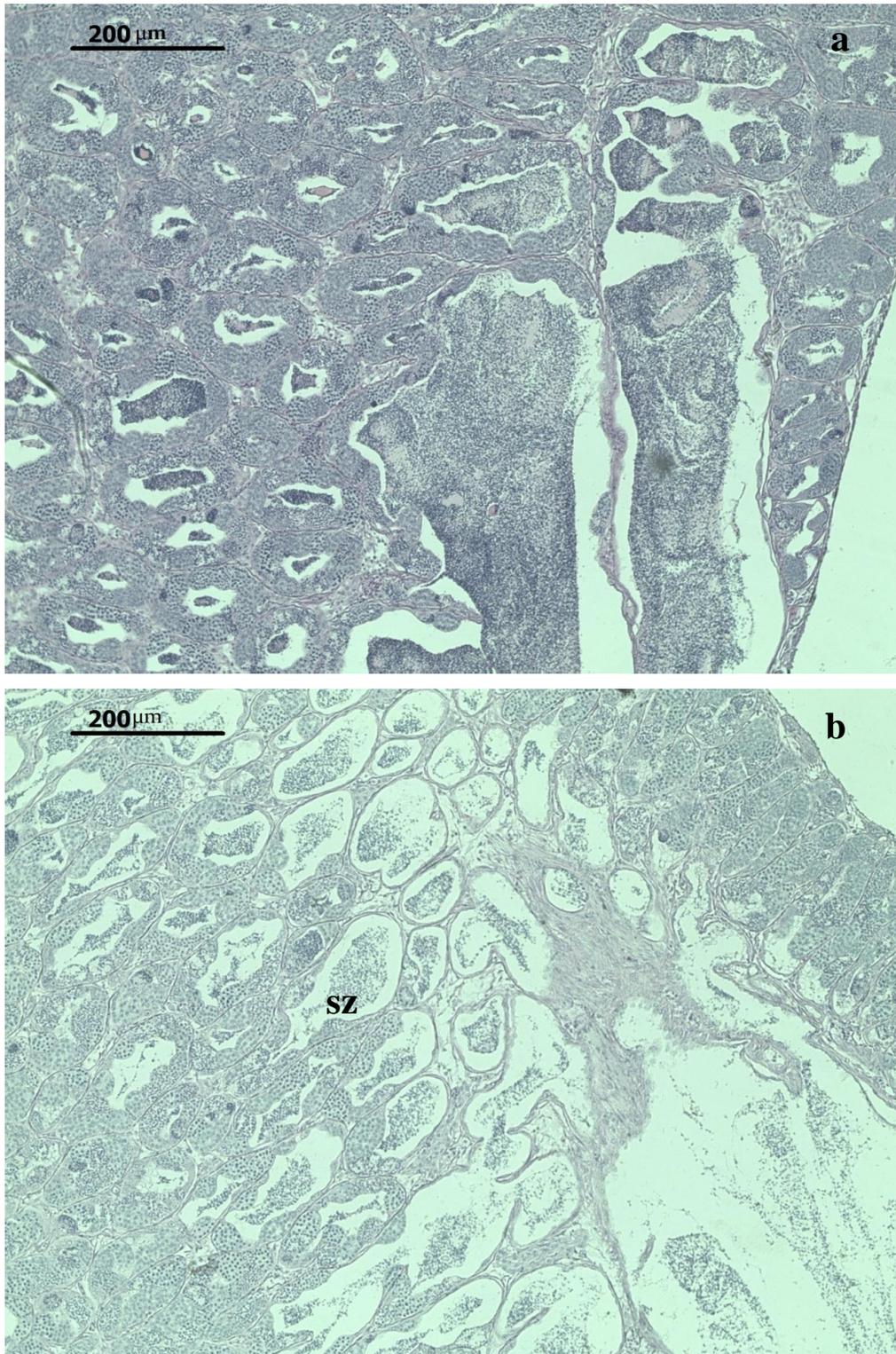


Figura 19. Microfotografia mostrando a gônadas de machos de *Oreochomis niloticus*.
(a) macho do grupo controle; (b) macho do grupo exposto por 28 dias ao cMT.
Aumento de 400x.

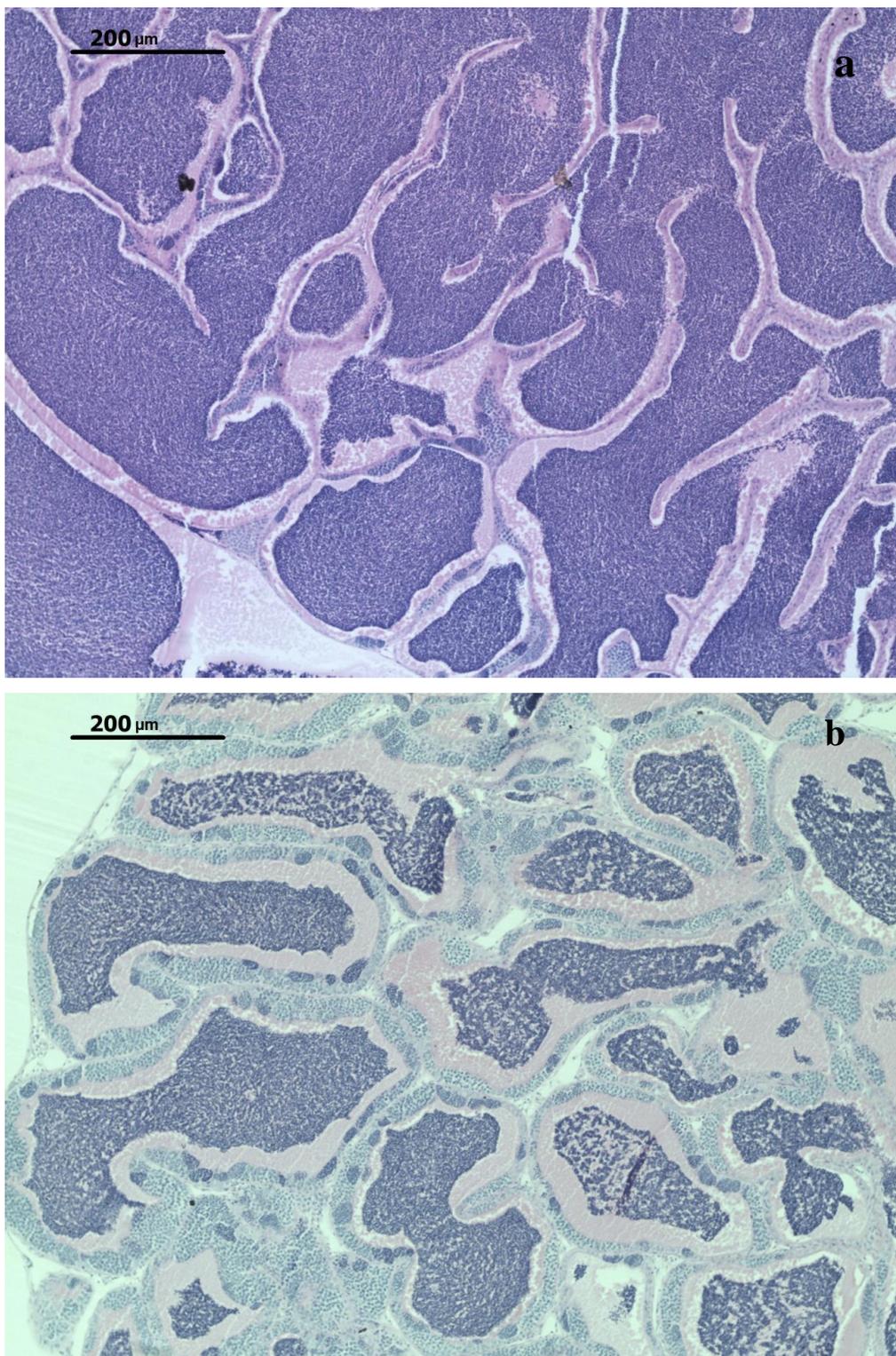


Figura 20. Microfotografia mostrando a gônadas de macho de *Astyanax bimaculatus*. (a) machos do grupo controle, presença de sz no interior dos túbulos seminíferos; (b) machos de *Astyanax bimaculatus* expostos por 28 dias ao cMT. Aumento de 400x.

5.3. Efeitos na reprodução de caramujos expostos ao cMT

5.3.1. Desempenho reprodutivo de *B. glabrata*

Os efeitos da exposição por 4 semanas ao cMT na fecundidade da *B. glabrata* são mostradas nas figuras 21a e 21b. Após 4 semanas de exposição ao cMT, em todas as concentrações testadas, não houve diferenças significativas na produção de ovos por caramujo comparado com o grupo não exposto ou controle com etanol. Entretanto, na menor concentração 0,01 mg/L de cMT, foi observada diferença significativa com o aumento no número de desovas por caramujo ($p < 0,05$, $\text{media} \pm \text{erro padrão} = 26,9 \pm 1,5$ desovas por indivíduo) quando comparado aos números registrados no controle (20.1 \pm 2.6 desovas por indivíduo) e controle com álcool (17.0 \pm 1.6 desovas por indivíduo). O solvente etanol não causou toxicidade à *B. glabrata* durante o tratamento, não ocorreu mortalidade em nenhum grupo estudado.

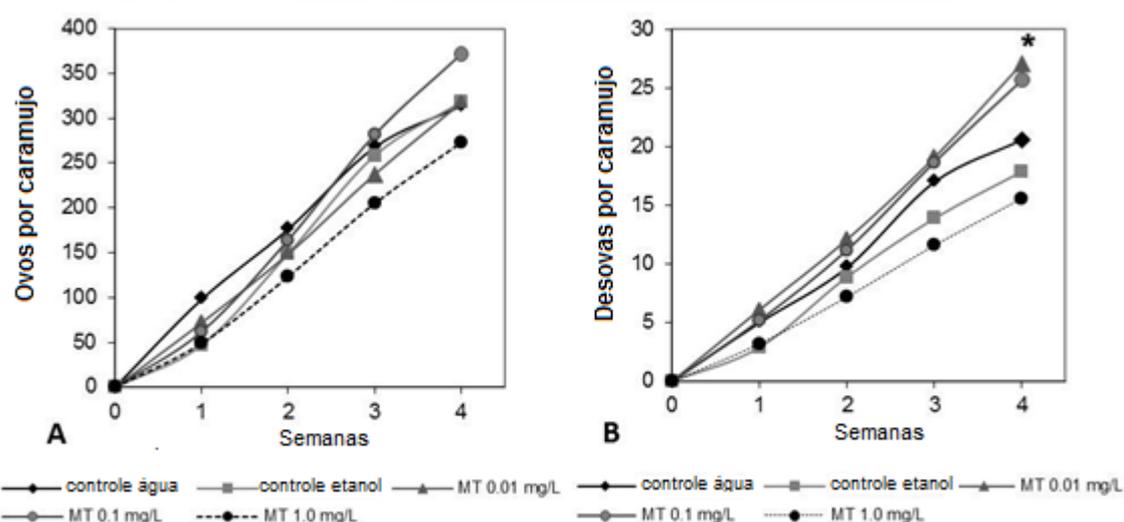


Figura 21. Médias acumulativas do número de ovos (A) e desovas (B) produzidos por *B. glabrata* reprodutivamente maduros expostos ao cMT e etanol/água por 4 semanas. Um asterisco (*) indica que houve diferença entre as médias ($p < 0,05$ ANOVA e teste com múltiplas comparações de Dunnett's) em relação ao controle (0 mg/L) em 4 semanas.

5.3.2. Análise histológica e morfométrica de ovócitos maduros e espermatozoides de *B. glabrata*.

As mudanças histopatológicas foram observadas a partir da concentração de 0,01 mg/L, o que significa que houve degeneração precoce da membrana basal (MB), que envolve o acino (A) em adição à regressão e descolamento das células germinais (CG) (Figura 22). Na concentração de 0,1 mg / L, essas alterações foram persistentes, liberando as células germinais e ocasionando a formação de um lúmen (LM), que pode ser observado, devido ao tecido conjuntivo danificado e pela compressão causando um processo de metaplasia, unindo a membrana basal com o acino. A morfologia dos ovócitos foi alterada pelo mesmo processo irregular que causou a atresia. Na concentração de 1,0 mg / L, a interrupção da MB ao redor do acino foi observada. A cMT estimulou uma grande produção de espermatozoides e manteve a produção de ovócitos sem alterações.

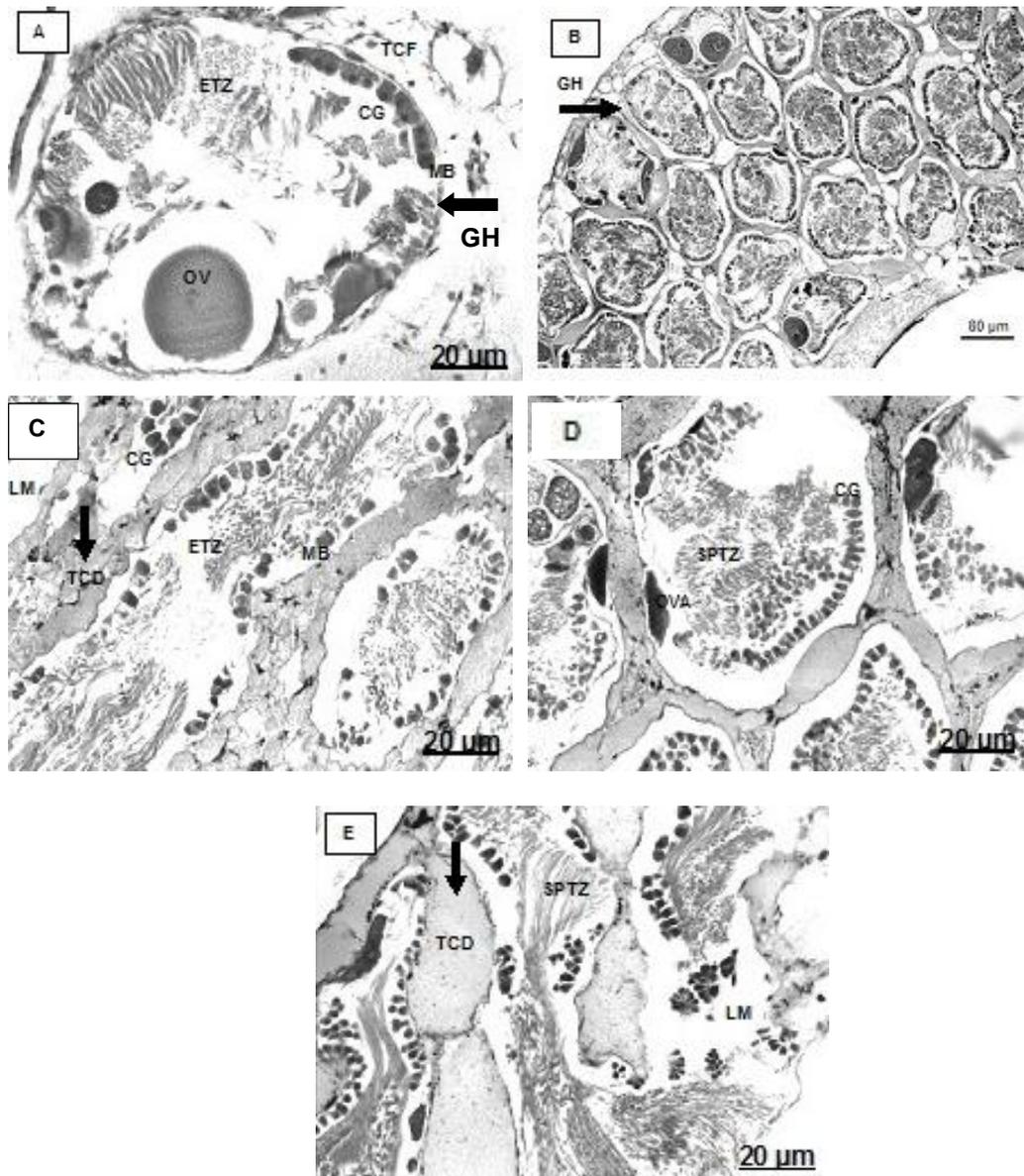


Figura 22. Os cortes transversais das gônadas hermafroditas da *B. glabrata* em dois grupos controles e três grupos de exposição ao cMT por 4 semanas. A) controle sem álcool – na parte interna da gônada há presença de tecido conjuntivo frouxo e vários ácinos delimitados por uma membrana basal associada com epitélio pavimentoso cúbico, apresentando células germinativas pareadas dentro do ácino, na parte mais interna estão os ovócitos e espermatozoides; B) controle com álcool – não há alterações morfológicas; C) 0,01 mg/L – degeneração da membrana basal e regressão das células germinativas; D) 0,1 mg/L – deslocamento de células germinativas e formação do lúmen; E) 1 mg/L - colapso da membrana basal liberando o conteúdo dos lóbulos

internos seguidos pela compactação de tecido conjuntivo frouxo (TCF) em tecido conjuntivo denso (TCD), o aumento da produção de esperma e da produção contínua de ovócitos, células estaminais crescentes e formação do lúmen (LM). Células germinativas (CG), espermatozóides (sptz) gônada hermafrodita (GH), lúmen (LM), membrana basal (MB), ovócitos (OV), ovócitos atresícos (OVA).

A tabela 8 mostra que as medias das áreas ocupadas por ovócitos maduros tipo V, não diferem estatisticamente do grupo controle. Na área dos espermatozóides, a análise morfométrica mostrou um aumento significativo da produção de esperma nas concentrações mais elevadas de 0,1 e 1 mg/L de cMT, comparado com ambos controles. Além disso, podemos observar o aumento da produção de espermatozoides no controle com solvente em relação ao controle com água.

Tabela 8. Médias e desvios padrões (DP) das áreas ocupadas por ovócitos maduros e espermatozóides nas gônadas de *Biomphalaria glabrata*, com ou sem exposição ao cMT.

Tratamentos	Médias áreas espermatozoides (µm)	DP das áreas de espermatozoides (µm)	Médias áreas ovócitos (µm)	DP áreas ovócitos (µm)
Etanol	14201,41	15076,58	3627,21	1863,07
Controle água	7327,22	9448,02	3234,16	2176,45
0,01 mg/L	2618,03	1551,08	7649,86	8371,04
0,1 mg/L	12919,73*	8745,82	3006,34	2042,61
1,0 mg/L	12671,74*	9742,38	3204,10	1824,85

* Diferença significativa comparado ao controle com água.

5.4. Embriotoxicidade de aMT e cMT em *Danio rerio*

Neste estudo, ovos fertilizados de zebrafish foram expostos por 6 dias a várias concentrações de cMT e aMT. Nossos resultados mostraram alta toxicidade da aMT no primeiro dia de exposição (24h-LC50 11.34 mg/L), entretanto após 6 dias, ambos compostos, cMT (96h-LC50 10.30 mg/L) e aMT (96h-LC50 10.85 mg/L) mostraram valores similares de toxicidade. A figura 23 mostra a proporção de ovos mortos e embriões durante o experimento. O grupo controle apresenta um desenvolvimento normal dos embriões (Kimmel *et al.*, 1995). A mortalidade de embriões no grupo controle não excedeu 10% (8.3% em 96 h) estando de acordo com as regras para validar nosso teste. A eclosão dos ovos foi inibida a partir do terceiro dia de exposição na concentração de 7 mg/L, considerando ambos produtos testados (Figura 24).

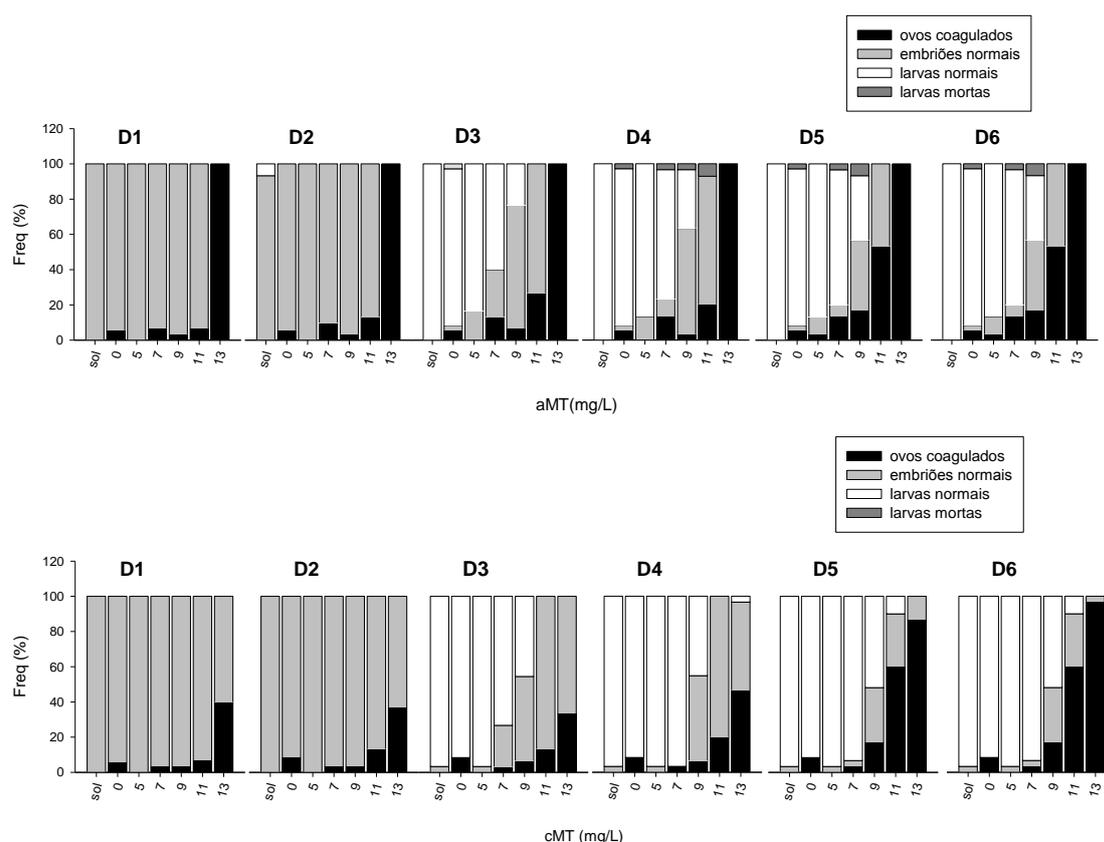


Figura 23. Visão geral dos efeitos do produto ativo metiltestosterona (aMT) e do produto comercializado (cMT) nos embriões e larvas de *D. rerio* durante 144 h (6 dias) de exposição. “Sol” refere-se ao controle com solvente (DMSO).

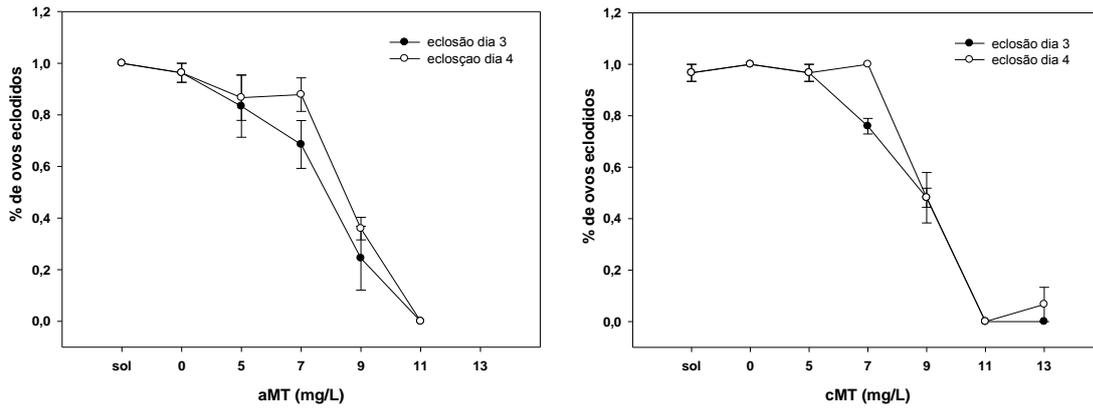


Figura 24. Gráfico demonstrando o percentual de eclosão dos ovos de *D. rerio* expostos ao produto ativo (aMT) e comercial da metiltestosterona (cMT). A linha com ponto cheio representa o 3º dia de exposição e a linha com ponto vazio 4º dia.

No 5º dia de exposição, 53,3 % dos embriões expostos ao aMT, na concentração de 11 mg/L, morreram. Enquanto, os embriões expostos a 11 mg/L de cMT, 60% morreram. A partir do 5º dia, observamos uma similaridade no desenvolvimento das alterações morfológicas, assim como o aumento das ulcerações na pele, atraso do desenvolvimento da cabeça, edema cardíaco e malformações na cauda tanto para os peixes expostos ao aMT como cMT nas concentrações acima de 9 mg/L (Figura 25 e 26).

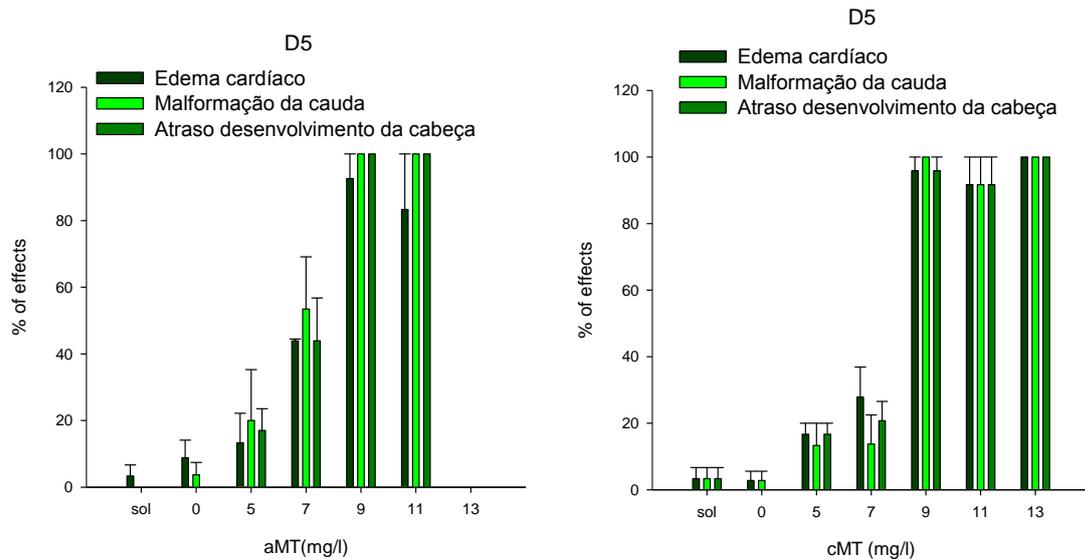


Figura 25. Comparação dos resultados da análise teratológica dos peixes expostos ao aMT e cMT, no quinto dia de exposição. No quinto dia, os embriões da concentração 13 mg/L de aMT já estavam todos mortos. “Sol” significa solvente.

Em um segundo teste de sub letalidade, as concentrações de 0,004; 0,02; 0,14; 0,83 e 5 mg/L foram testadas em análise de marcadores bioquímicos. Os resultados apresentados na figura 27, mostram uma diminuição significativa dos níveis de ChE e LDH em 5 mg/L de metiltestosterona (aMT and cMT). A atividade da GST não causou alterações significativas nos embriões de zebrafish em nenhuma das concentrações de MT quando comparado ao controle.

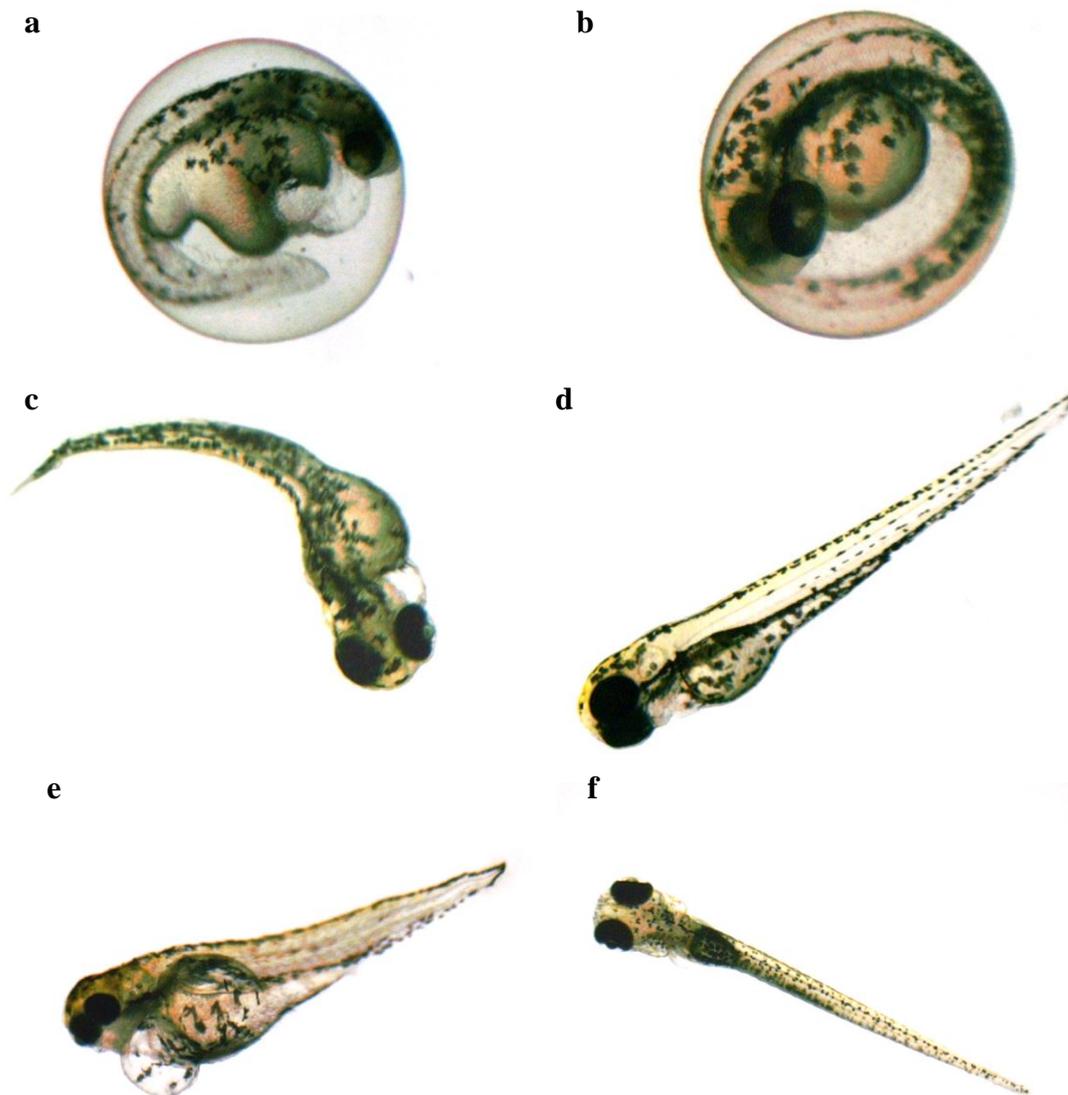


Figura 26. Malformações embrionárias, tais como atraso no desenvolvimento da cabeça, dia 02 na concentração de 9mg/L de aMT, aumento de 4x (a), controle, dia 02, aMT, aumento de 4x (b), deformidades da cauda, dia 03, 7mg/L de cMT, aumento de 4x (c), controle dia 03, cMT, aumento 4x (d), edema cardíaco, dia 05, 9mg/L de cMT, aumento de 3x (e), controle dia 05 de cMT, aumento 3x (f).

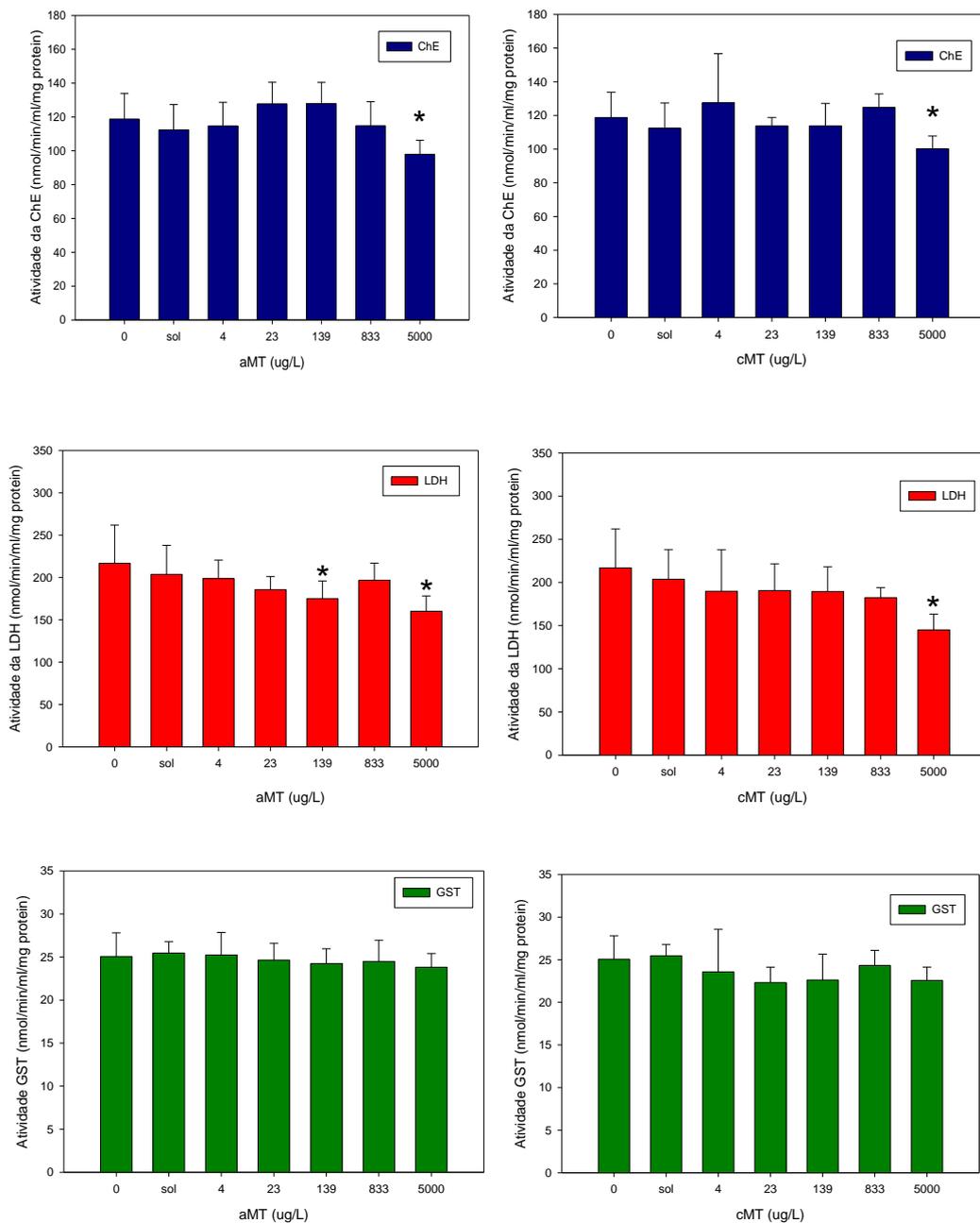


Figura 27. Gráficos representam os resultados obtidos na análise de marcadores bioquímicos, realizado em embriões expostos ao ingrediente ativo da MT e ao produto comercializado no Brasil (cMT). Os asteriscos (*) referem-se aos resultados estatisticamente significativos para as atividades de ChE e LDH.

Os níveis de VTG ligadas as proteínas em embriões de zebrafish foram significativamente menores em todas as concentrações de aMT e nas duas maiores

concentrações para cMT (figura 28). Mostrando que tanto o composto puro, quanto o produto comercializado no Brasil da metiltestosterona causam alterações na produção de vitelogenina nesta espécie de peixe.

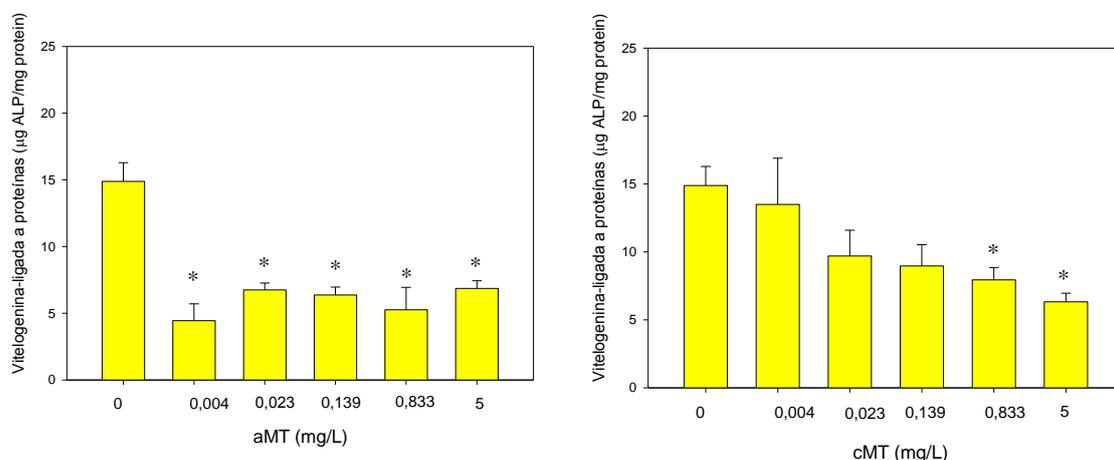


Figura 28. Atividade da VTG em embriões expostos ao ingrediente ativo da metiltestosterona (aMT) e produto comercializado no Brasil (cMT). Os (*) estão representando os resultados estatisticamente significativos em relação ao controle.

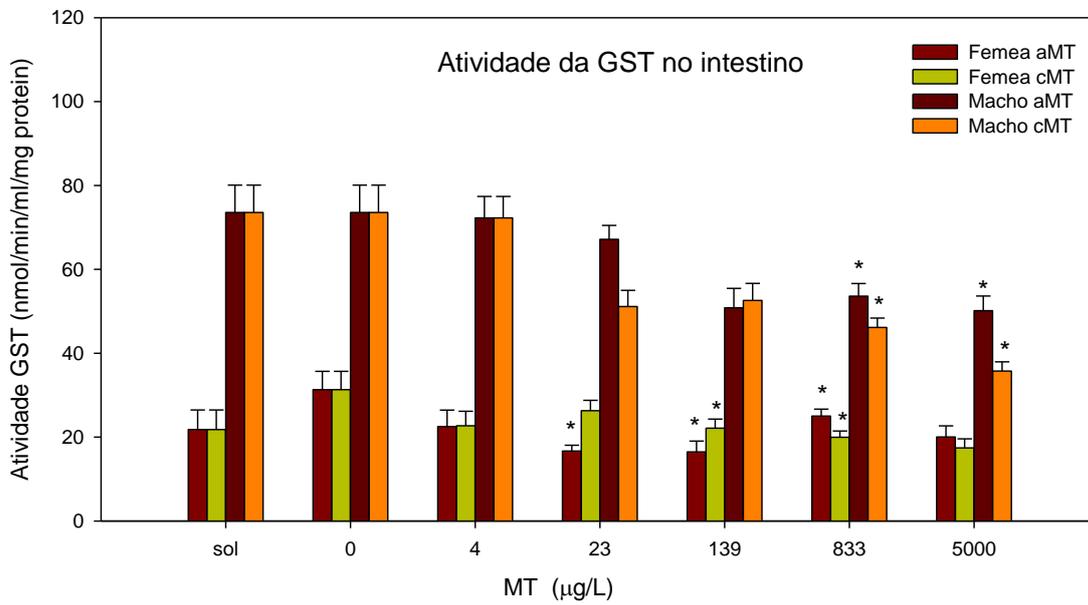
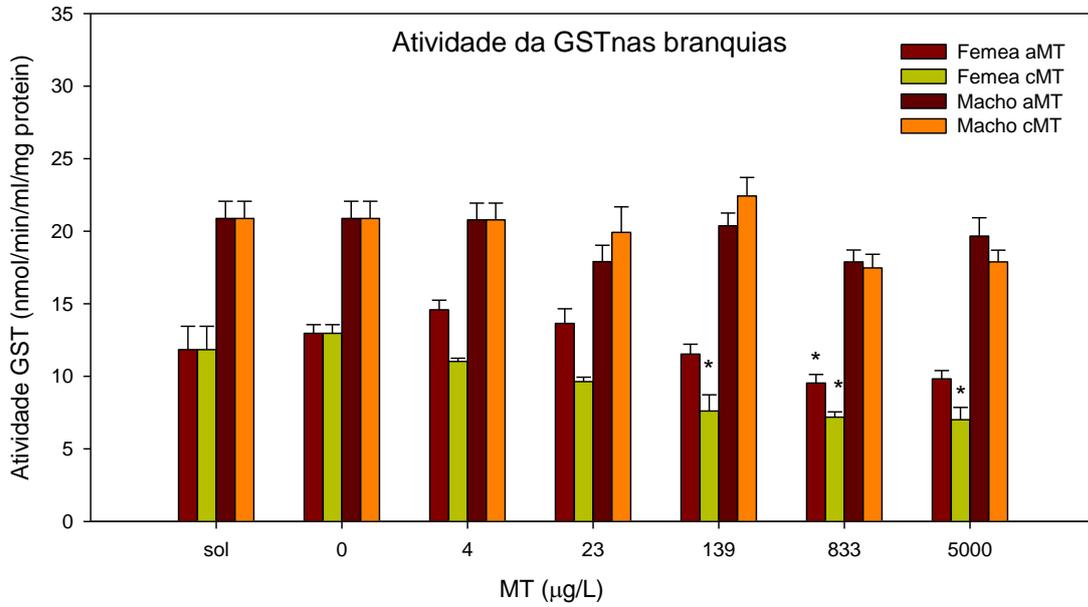
5.5. Análise da Toxicidade de aMT e cMT por marcadores bioquímicos (ChE, GST, LDH e VTG) em adultos de *Danio rerio*.

Os resultados mostraram que o biomarcador mais responsivo foi a GST com inibição dose-dependente verificado em diferentes órgãos de zebrafish (figura 29). Nas brânquias houve interação entre os tipos de MT e os gêneros ($p=0,001$), no intestino houve interação entre o tipo de MT e os gêneros ($P=0,001$), e entre os tipos de MT ($P=0,012$); na cabeça houve interação entre todos os parâmetros ($P= 0,038$).

Nas análises da ChE na cabeça, foi observada uma inibição dos níveis dependente do gênero e os tipos de MT e entre as MT ($P=0,001$, $P=0,032$) (figura 30).

Nos resultados da LDH na cabeça, houve inibição dos níveis dependente da interação entre o gênero e aMT ($P=0,013$) e gênero com cMT ($P=0,014$). No intestino, a LDH também foi inibida dependente da interação entre os tipos de MT e o gênero

($P=0,001$). A resposta do LDH apresentou alta variabilidade e por isso não é possível tirar conclusões sobre os efeitos da MT na via anaeróbica de produção de energia (figura 31).



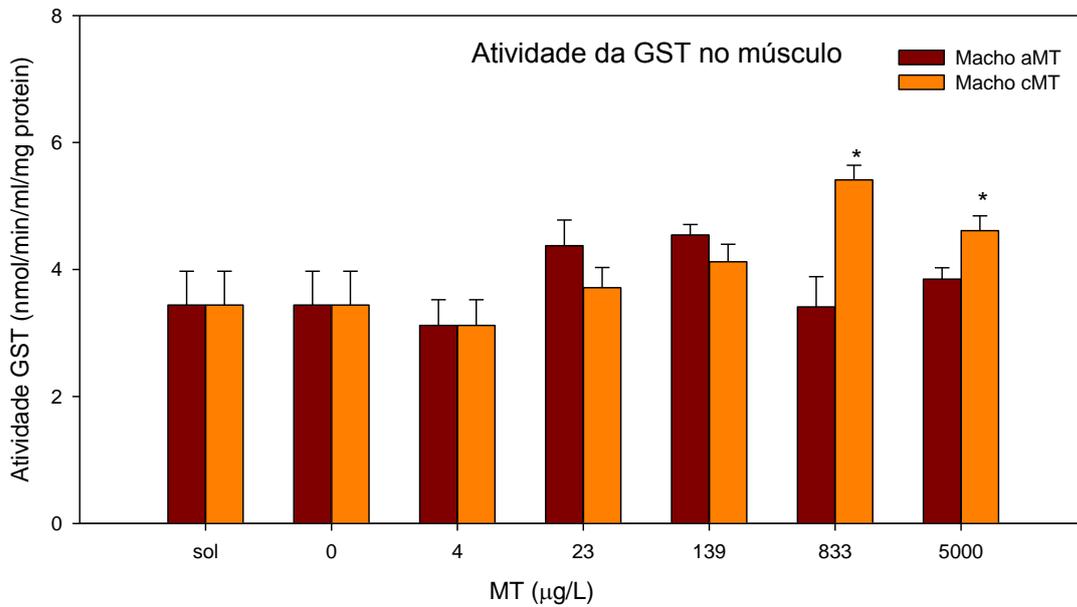
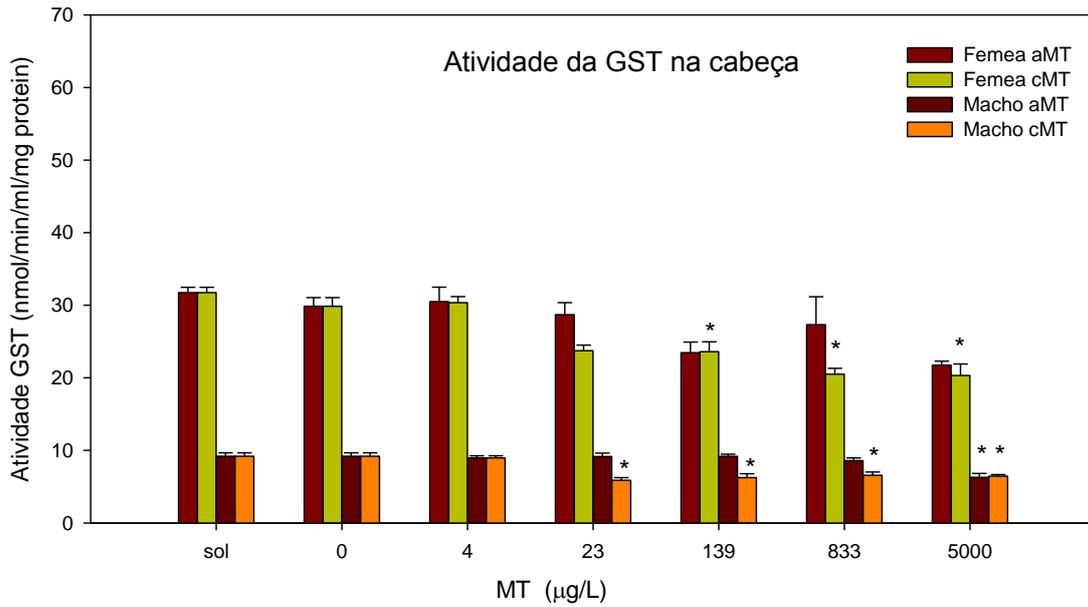


Figura 29. Atividade da Glutathione S transferase (GST) em machos e fêmeas de zebrafish, em diferentes órgãos (brânquias, intestino, cabeça e músculo), expostos ao aMT e cMT. Os asteriscos (*) representam os resultados estatisticamente significativos em relação ao controle negativo.

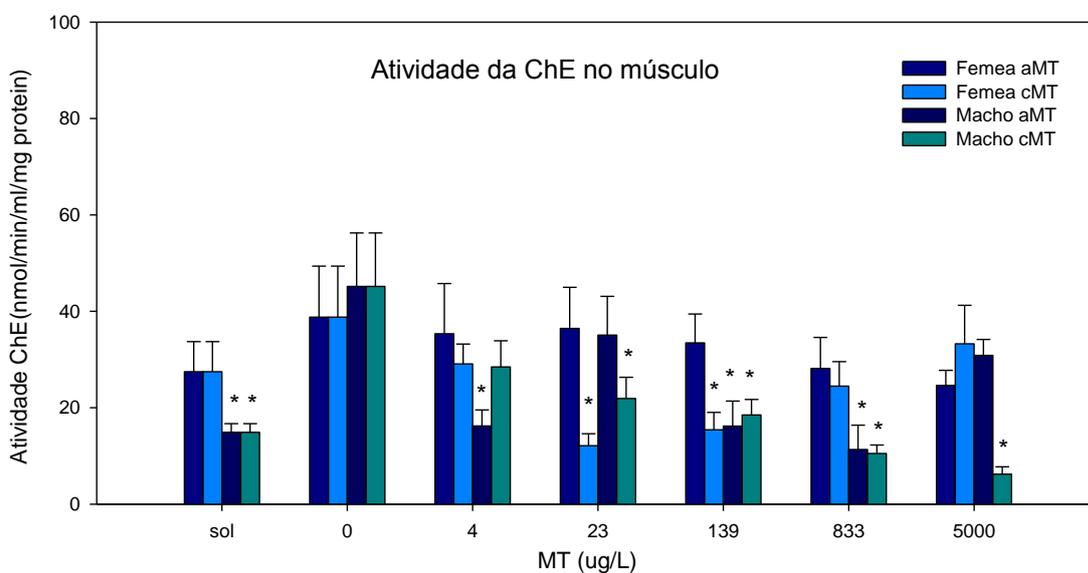
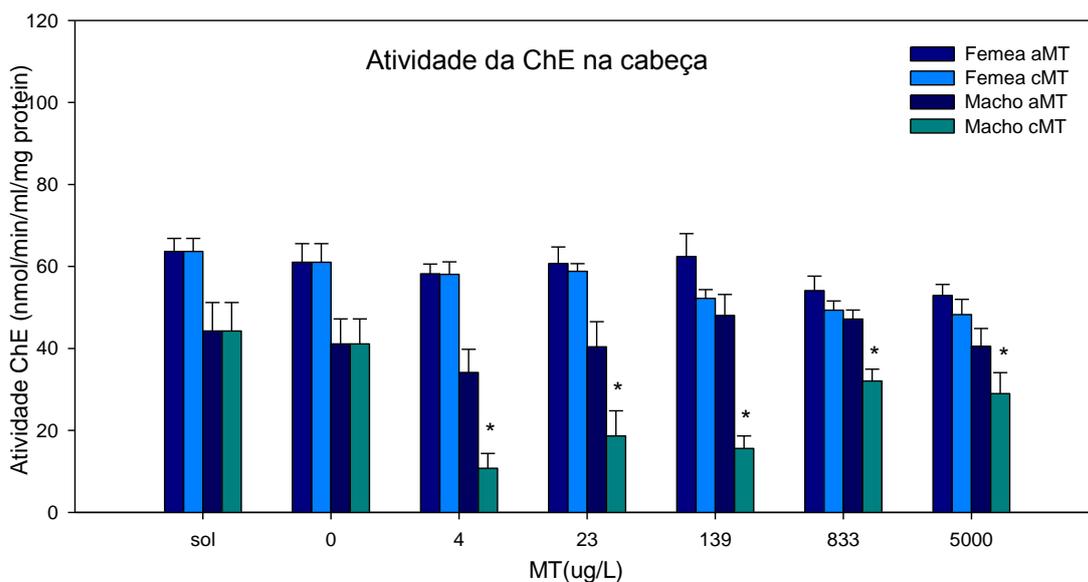
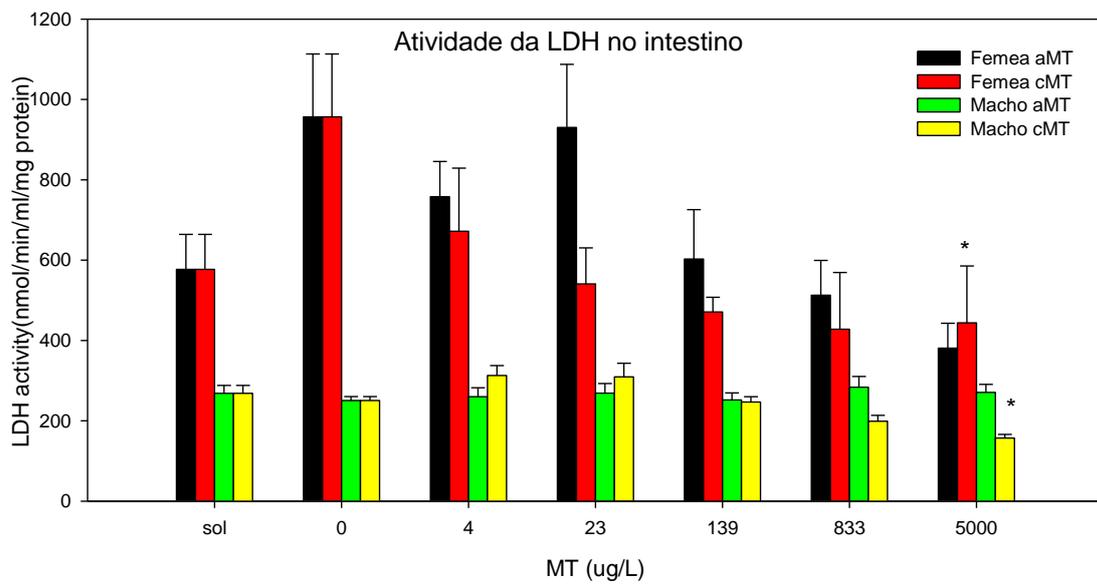
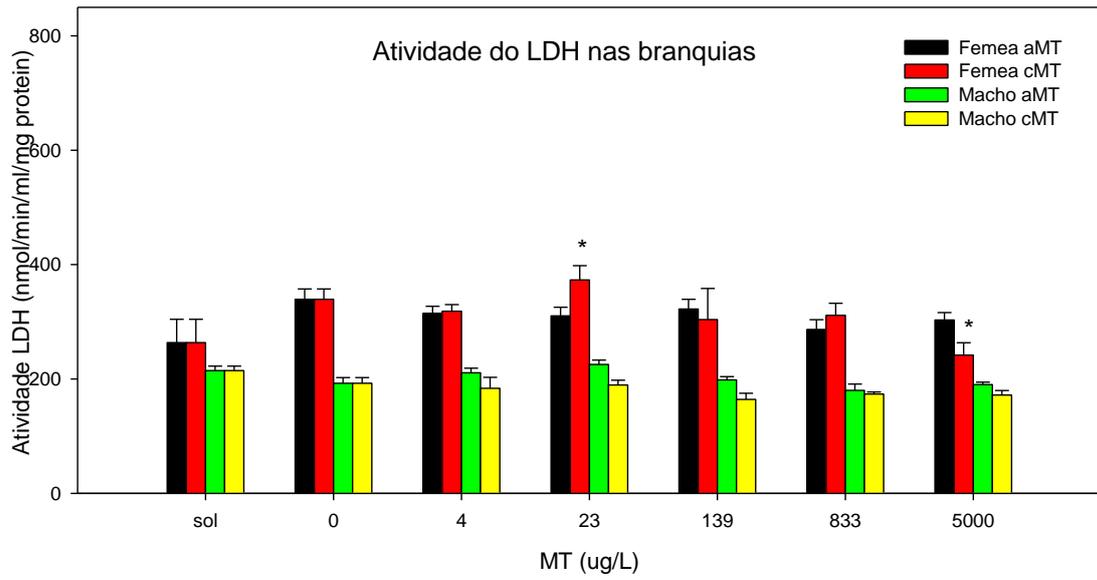


Figura 30. Atividade da colinesterase/ ChE em adultos, machos e fêmeas, de zebrafish nos órgãos da cabeça e músculo, expostos por 96h ao aMT e cMT. Os asteriscos (*) representam os resultados estatisticamente significativos em relação ao controle negativo.



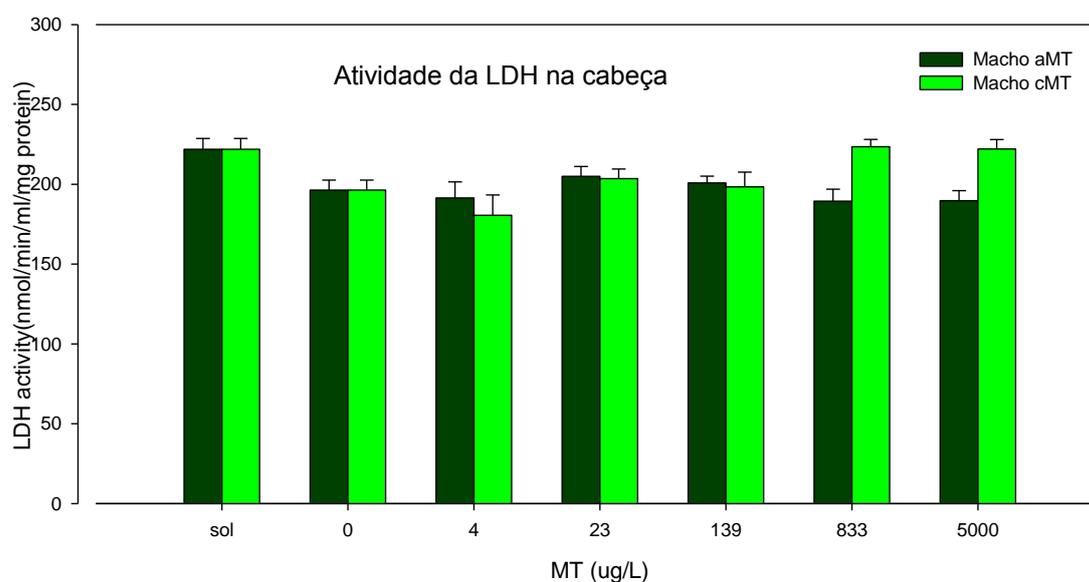
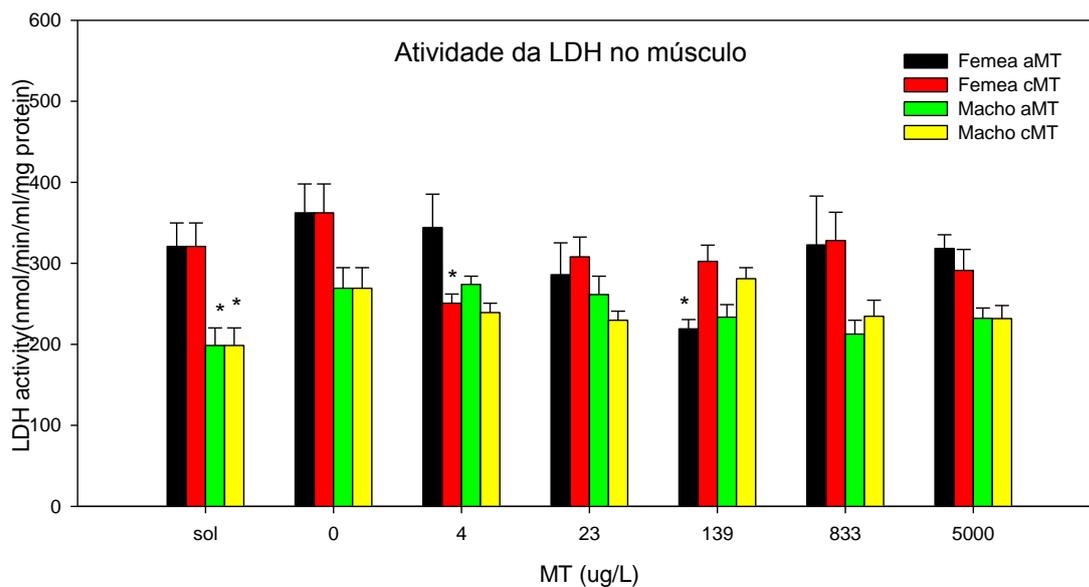


Figura 31. Atividade da LDH em fêmeas e machos de zebrafish, expostos por 96 horas ao aMT e cMT, em diferentes órgãos (brânquias, intestino, músculo e cabeça). Os asteriscos (*) representam os resultados estatisticamente significativos em relação ao controle negativo.

Os resultados não apresentaram diferenças significativas em relação ao índice gonadossomático-GSI nem em machos ou fêmeas expostas ao aMT ou cMT (fêmeas aMT, $P=0,473$ e cMT, $P=0,581$; machos aMT, $P=0,606$ e cMT, $P=0,342$) (figura 32). O

índice hepatossomático-HSI foi significativamente mais elevado em fêmeas de zebrafish expostas à concentração mais alta (5000 ug/L, P=0,001) de aMT e nos machos expostos à menor concentração de cMT (4 ug/L, P=0,001), sugerindo que o MT pode induzir toxicidade hepática, como esperado uma vez que o fígado é o principal órgão de metabolização de esteroides androgênicos (figura 33).

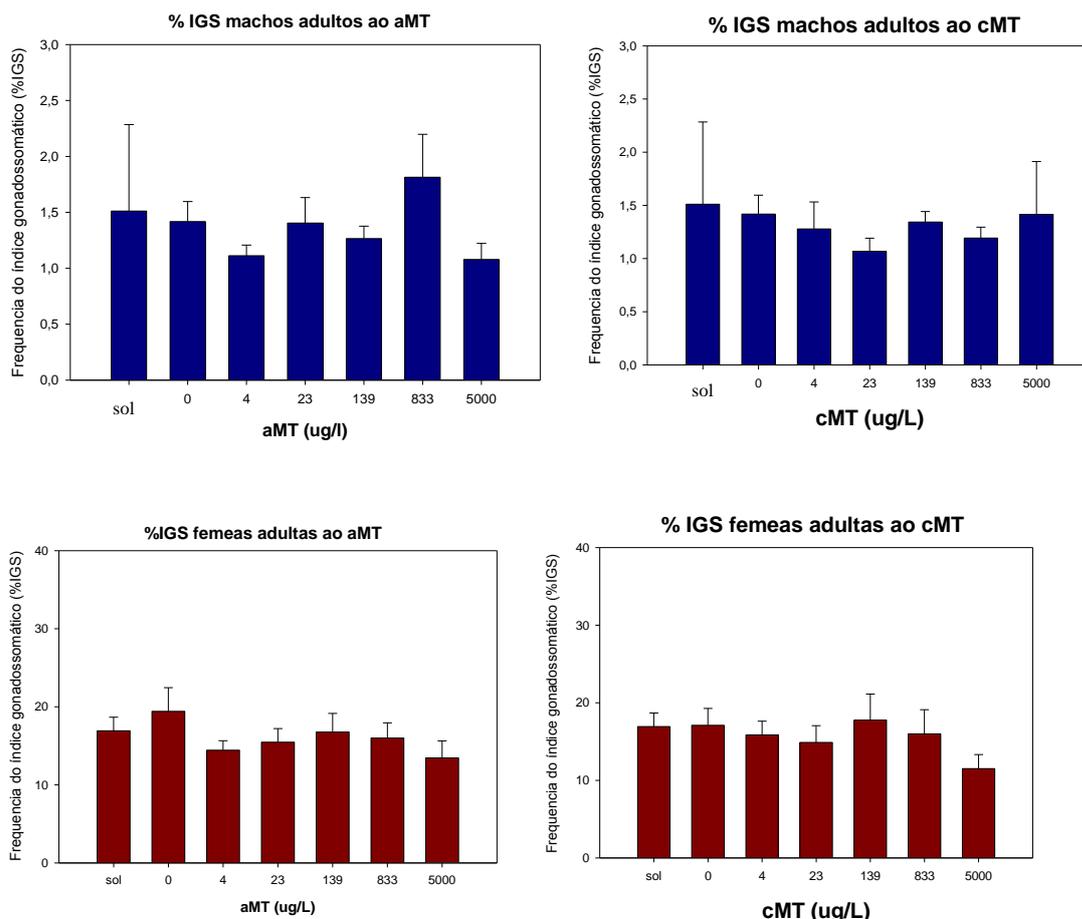


Figura 32. Representação dos gráficos do índice gonadosomático de machos e fêmeas adultos de zebrafish expostos ao aMT e cMT.

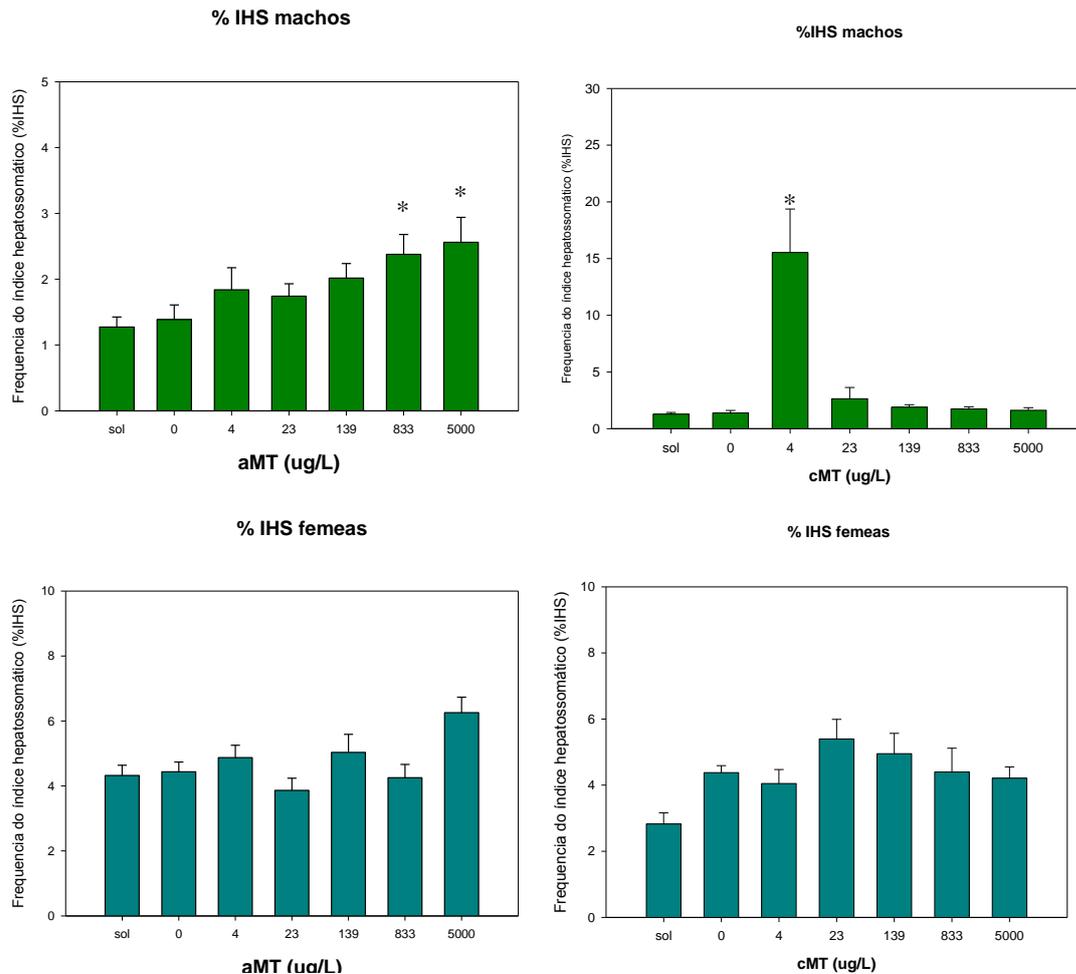


Figura 33. Representação gráfica do índice hepatossomático de machos e fêmeas de zebrafish expostos por 96 horas ao ingrediente ativo da MT (aMT) e produto comercializado no Brasil (cMT). Os asteriscos (*) referem-se aos resultados estatisticamente significativos ($p < 0,005$).

As concentrações hepática e nas gônadas de vitelogenina em adultos não apresentaram diferenças significativas com aMT ou cMT (figura 34). Os machos e fêmeas adultos já possuem o sistema endócrino completamente desenvolvido e devem ser capazes de lidar com o estresse causado pela MT como foi evidenciado pelo aumento do IHS encontrado no experimento ainda não publicado.

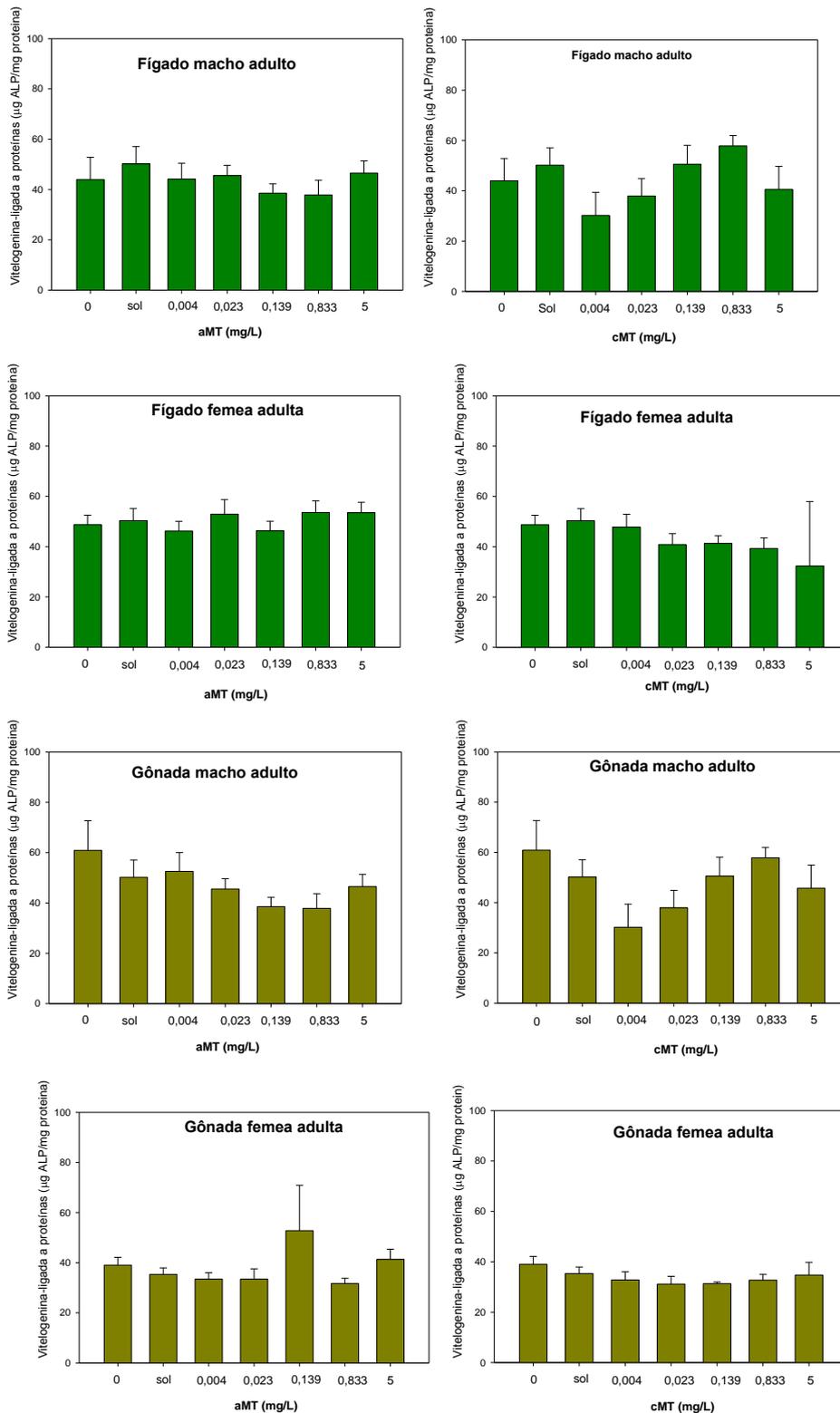


Figura 34. Representação da análise da vitelogenina (VTG), nos fígados e gônadas de machos e fêmeas de zebrafish, expostos por 96 horas ao ingrediente ativo (aMT) e produto comercializado da metiltestosterona (cMT).

6. DISCUSSÃO

6.1.1. Toxicidade aguda da cMT

De acordo com nossos resultados a cMT não causou mutagenicidade/genotoxicidade nas espécies estudadas na exposição de 96 horas. Apesar de apresentar alguns resultados significativos para o teste de MN, AN e cometa, como na menor concentração de 0,01 mg/L, onde ocorreu um aumento da frequência de MN em relação aos dois controles testados ($P < 0,05$) para *Oreochromis niloticus* e *Astyanax bimaculatus*, mostrando um baixo potencial para a genotoxicidade. Entretanto, a ação genotóxica de hormônios como a MT, deve continuar sendo estudada. Como exemplo, o perfil genotóxico de hormônios esteróides sintéticos em cromossomos de camundongos machos tem sido pesquisado e tanto a testosterona, como piridoandrosterona e seus derivados não induziram aberrações cromossômicas. Entretanto, o derivado pirimidinoandrostenol, tanto em doses baixas como em altas doses, causam um aumento significativo nas médias de aberrações cromossômicas, mostrando que esteroides andrógenos sintéticos devem ser estudados como possíveis causadores de efeitos genotóxicos (Hana *et al.*, 2008).

Em um estudo sobre o efeito do trembolone, um esteróide sintético de ação androgênica, em testes *in vitro* e *in vivo*, com até 72 horas de exposição, não mostrou a formação de micronúcleos nos testes *in vivo* na medula óssea de camundongos (Richold, 1988). A espécie *Astyanax bimaculatus* (*Astyanax bimaculatus*) é mais sensível aos efeitos genotóxicos causados por exposição a extratos de microcistinas do que a espécie *O. niloticus* (Silva *et al.*, 2010; Silva *et al.*, 2011b).

Hormônios esteróides sexuais geralmente respondem negativamente a testes padrão de genotoxicidade, mas são considerados cancerígenos pela epigenética porque podem modificar a expressão gênica (Martelli *et al.*, 2003). Em uma avaliação da genotoxicidade de estradiol, etinilestradiol e nonilfenol através do teste do cometa em

Scrobicularia plana, um molusco estuarino foi encontrado o efeito genotóxico apenas na maior concentração de exposição (Petridis *et al.*, 2009). A exposição ao MT em baixa concentração pode causar uma estimulação direta da via receptor, após a sua ativação e, conseqüentemente, distúrbios celulares. Isso poderia explicar os resultados obtidos em nosso estudo, onde apenas a menor concentração mostrou um potencial de genotoxicidade em relação à maior concentração (Calabrese and Mattson, 2011). Como não houve efeito dose-resposta, podemos suspeitar que MT tenha um baixo risco de genotoxicidade. O etanol utilizado não excedeu 0,001% na água e observou-se que não interferiu nos resultados com exceção do teste do cometa que teve uma tendência ao decréscimo do ID.

Em testes com hepatócitos humanos e de ratos não foi verificado reparo do DNA quando expostos a metiltestosterona. Verificou-se também a indução de troca de cromátides irmãs em cultura de linfócitos e em células de medula óssea de camundongo *in vivo* após a exposição ao fluoximesterone (Dhillon *et al.*, 1995; Martelli *et al.*, 2003).

As conseqüências de distúrbios na molécula de DNA, tal como aductos, as quebras de cadeia simples ou dupla, podem causar lesões que se tornam permanentes. O uso de ensaios citogenéticos, como teste de MN, é um excelente meio para avaliar qualquer dano permanente no material genético (Vanzella *et al.*, 2007). A avaliação da indução de micronúcleos em células sanguíneas de *P. lineatus* expostos a fração solúvel em água do diesel (DWSF) sob condições agudas e sub-crônicas, demonstraram que este teste é eficiente na detecção de compostos mutagênicos presentes na fração testada (Vanzella *et al.*, 2007). Vários estudos têm demonstrado os efeitos genotóxicos de poluentes a nível celular (Teste do Cometa) e sem verificar se há danos clastogênicos e aneugênicos pelo teste MN (Bucker *et al.*, 2006; Vanzella *et al.*, 2007; Silva *et al.*, 2011b).

O teste do cometa (TC) tem sido aplicado com sucesso em condições de laboratório e de campo como um biomarcador não específico, sensível, rápido e econômico para a detecção de danos genéticos em diferentes espécies (Jha, 2008; Katsumiti *et al.*, 2009; Ramsdorf *et al.*, 2012). Este autor também sugeriu que o teste do cometa é capaz de detectar as bases do DNA oxidadas em peixes expostos a contaminantes ambientais. Nossos resultados mostraram que o TC não detectou danos no DNA, entretanto, o MN mostrou alterações na menor concentração testada. No TC, provavelmente, o tempo de exposição ao composto (96h), foi suficiente para a renovação celular ocorrer e corrigir eventuais lesões no DNA causados pela MT quando visualizados os resultados. Como não ocorreu uma relação concentração resposta, não podemos afirmar que o hormônio seja uma substância mutagênica, apesar do efeito significativo do controle com etanol.

O teste do MN em peixes também tem potencial para a detecção de substâncias clastogênicas em meio aquoso. Os eritrócitos dos peixes teleósteos apresentam-se nucleados, e os micronúcleos podem ser facilmente contabilizados na avaliação da clastogenicidade de substâncias químicas (Al-Sabti and Metcalfe, 1995). O teste do micronúcleo é utilizado para avaliar respostas mutagênicas em diversos tecidos de *Cyprinus carpio* e *Oncorhynchus mykiss* comparando os resultados com o teste do cometa. (Kim and Hyun, 2006).

Na menor concentração de exposição (0,01 mg / L), a cMT induziu MN em ambas as espécies, bem como a indução de AN apenas em *Oreochromis niloticus*. Estes efeitos não foram observados no TC. Como não houve uma resposta correspondente do tipo concentração-efeito, pode-se interferir que nesse estudo a MT apresentou um fraco potencial mutagênico.

6.1.2. Efeitos na reprodução da exposição aguda ao cMT

Concentrações elevadas do hormônio podem reduzir o crescimento gonadal, causar a intersexualidade e feminização ou desenvolvimento anormal das gônadas com fibroses e necroses resultando na esterilidade do animal (Demska-Zakes and Zakes, 1997). Existem também relatos na literatura, que demonstram que a aplicação da MT pode resultar em uma baixa reprodutividade, inibição da produção de esperma, alterações na espermatogênese e baixa fertilidade em várias espécies de teleósteos (Porter, 1996).

Entretanto, nossos resultados indicam que a cMT possui uma ação genotóxica moderada para as espécies e nas concentrações estudadas. Evidenciando algumas alterações na frequência de MNs, NA e cometas. Não havendo uma relação efeito-concentração definida, não podemos inferir um efeito mutagênico grave para este composto. Estes resultados demonstram que a cMT causa alterações no sistema reprodutivo de espécies nativas, demonstrando o risco ambiental do uso e despejo do hormônio no ambiente aquático.

6.2. Toxicidade crônica de cMT

6.2.1. Genotoxicidade crônica de cMT em peixes

Nossos resultados demonstraram que a exposição da cMT via oral por 28 dias não causou danos genotóxicos para *O. niloticus* (*Oreochromis niloticus*) e nem para *A. bimaculatus* (*Astyanax bimaculatus*). A espécie não alvo (*Astyanax bimaculatus*) mostrou-se mais sensível ao cMT, pois foi verificadas anormalidades nucleares, evidenciando um efeito citotóxico da MT. Estudos genéticos sobre os efeitos da administração oral do MT em *Oreochromis niloticus* geram muitas controvérsias em relação à ação genotóxica deste hormônio (Carrasco *et al.*, 1999).

Durante a análise de micronúcleos, alguns autores observaram a ocorrência de anormalidades nucleares além dos de micronúcleos, sugerindo que as anormalidades devem ser consideradas juntamente com a análise de micronúcleos convencional. A formação de alterações morfológicas no envelope nuclear, como núcleos blebbed (aqueles que apresentam uma pequena evaginação do envelope, que parece conter eucromatina), núcleos lobeds (apresentando evaginações maiores do que os de núcleos blebbed) e núcleos notched (apresentando um entalhe notável com material nuclear) têm sido relatados em eritrócitos de peixes, em consequência da exposição a contaminantes ambientais e químicos com ação genotóxica, mutagênicas ou cancerígenas, embora os mecanismos responsáveis por tais anomalias não têm sido descritas ainda (Souza and Fontanetti, 2006). No entanto, estas alterações têm sido utilizadas por diversos autores como indicadores de dano genotóxico e toxicidade citogenético (Ayllon and Garcia-Vazquez, 2000; Çavas and Ergene-Gözükara, 2003).

Uma investigação por cromatografia da presença da MT no músculo, fígado e rins de *Oreochomis niloticus*, após uma alimentação diária com 30 mg/Kg de MT por 30 dias, mostrou que não ficam resíduos do hormônio nestas partes do organismo (Curtis *et al.*, 1991). Demonstrando que a MT é metabolizada e eliminada quando administrada via oral, juntamente com a ração.

Em um estudo com a truta arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*), tratados com uma única dose oral de 30 mg de MT por Kg de peixe, a biodisponibilidade oral de metiltestosterona proveniente do alimento foi de cerca de 70%. Esta percentagem foi calculada utilizando a perfis de concentração plasmática-temporal, e os resultados sugeriram que a MT administrada oralmente a partir de alimentos foi metabolizado mais lentamente do que a testosterona (Vick and Hayton, 2001). Nosso estudo sugere que

existe uma ação mutagênica moderada da cMT nas espécies estudadas, como demonstrado pelos testes de MN e cometa.

6.2.2. Efeitos crônicos na reprodução

Os nossos resultados mostraram uma diminuição significativa da oogênese na *Oreochromis niloticus* e diminuição significativa da espermatogênese nos *Astyanax bimaculatus*. Os andrógenos são uma classe de esteroides responsáveis pelas características primárias e secundárias do sexo masculino. Estes esteroides possuem propriedades anabólicas ou de forte promoção do crescimento (Hana *et al.*, 2008). Controles estrogênicos / androgênicos sobre a reprodução / desenvolvimento em peixes podem diferir bastante daqueles dos vertebrados superiores ao ponto de que os métodos de triagem de mamíferos (rato) podem não identificar potenciais produtos químicos desreguladores endócrinos (DE) nesta importante classe de animais (Ankley *et al.*, 2001). Existem poucas pesquisas sobre a ação de produtos químicos androgênicos, como cMT, as quais podem afetar negativamente a reprodução de peixes (Ankley *et al.*, 2001; Kang *et al.*, 2008). Em oposição aos efeitos na saúde humana, existem evidências significativas de efeitos adversos dos DE numa variedade de espécies animais, incluindo os peixes (Ankley *et al.*, 2001). A cMT tem sido relatada como causadora de alterações gonadais em algumas espécies de peixes, produzindo a reversão sexual morfológica em fêmeas jovens de *Pimephales promelas* (Zerulla *et al.*, 2002), degeneração de ovócitos (isto é, gotículas de óleo; indicativo de regressão de oogenesis), masculinização das características sexuais secundárias femininas e redução da fecundidade dos adultos medaka (*Oryzias latipes*), além de alterações nas taxas de eclodibilidade e sobrevivência dos embriões desta espécie (Kang *et al.*, 2008).

O nosso estudo corrobora os estudos anteriores, uma vez que o tratamento com cMT via oral, provocou a inibição e a degeneração de ovócitos maduros em *Oreochromis niloticus* (verificado através da diminuição do diâmetro dos ovócitos), enquanto que em *A. bimaculatus*, causou redução na produção de espermatozóides. A ação de cMT em *O. niloticus* está de acordo com a sua utilização nas pisciculturas brasileiras, onde é utilizada para produzir monossexo machos. Nossos resultados sugerem que a descarga de água das pisciculturas nos ecossistemas aquáticos de superfície pode ser prejudicial para as espécies nativas, já que *A. bimaculatus*, uma espécie nativa do Brasil, teve comprometida sua espermatogênese pela cMT.

Os desreguladores endócrinos podem alterar a biologia reprodutiva de machos em vários níveis do sistema endócrino, ao lado da interação com os níveis de receptores celulares. As alterações da função neuroendócrina (ex. hormônio gonadotropina) e as modificações da biotransformação dos hormônios no fígado podem alterar a biologia endócrina de machos, levando a feminização ou masculinização (Milnes *et al.*, 2006).

Outras espécies de peixe, como o *Cyprinus carpio*, foram expostas ao MT desde o período larval e foi verificado um aumento do crescimento na proporção de macho e diferentes tipos de gônadas (testículos, ovários e ovotestis). Estes resultados foram obtidos pela exposição da espécie à água poluída com MT (Hulak *et al.*, 2008).

6.3. Efeitos na reprodução de caramujos expostos ao cMT

6.3.1. Desempenho reprodutivo e análise morfológica da *B. glabrata*

Nossos resultados mostraram que não houve diferenças significativas no desempenho reprodutivo da *B. glabrata* exposta por 4 semanas ao cMT. Indivíduos reprodutivamente maduros da espécie *L. stagnalis* foram expostos ao MT por 8 semanas e isto não afetou a fecundidade através do número de desovas. Entretanto, na maior

concentração testada (100ng/L) a MT começou a causar processos degenerativos na glândula albúmen, enquanto mudanças histológicas no pulmão e no pé do molusco estiveram ausentes (Czech *et al.*, 2001). *Mulinia lateralis* exposta ao MT aumentou a razão de machos em relação às fêmeas (Moss, 1989). Nossos resultados apresentaram uma ausência de efeitos adversos severos com no molusco gastropoda *B. glabrata*; entretanto, a espécie teve seu desempenho reprodutivo afetado, especialmente na menor concentração (0,01 mg/L de cMT) diminuindo a produção de desovas.

A observação destes efeitos em organismos reprodutivamente adultos pode ser interpretada como uma resposta hormética, por exemplo, um aumento do efeito sobre o desempenho reprodutivo na menor concentração pode estar relacionado com a indução do processo de estresse e resistência causado por um mecanismo de compensação, tal como o mecanismo de reparação (Stebbing, 1982; Calabrese and Baldwin, 2003b). Estudos recentes têm mostrado respostas horméticas como sendo relativamente comuns nos testes de toxicidade (Calabrese and Baldwin, 2003a) e ecotoxicidade (Cedergreen *et al.*, 2005) podendo ser visto como uma adaptação evolucionária (Forbes, 2000). Outros estudos relatam os efeitos endócrinos da cipermetrina em invertebrados e isto tem apoiado esta hipótese (Moore and Waring, 2001; Singh and Singh, 2008).

A alteração induzida pelo estresse na regulação endócrina do comportamento alimentar causada pela exposição à hormônios pode ter fortes repercussões sobre as populações de invertebrados aquáticos e precisa de mais atenção na ecotoxicologia.

O etanol utilizado não excedeu 0,001% na água (Smith, 1974). O etanol usado como um solvente, em ensaios reprodutivos nos invertebrados pode provocar controvérsia, porque alguns autores relatam que, na concentração de 100 µl/L (79mg/L) não há nenhuma interferência na reprodução de espécies de invertebrados, enquanto

outros consideram que a concentração máxima de etanol não deve exceder 20 µl/L (15,8mg/L) (Hutchinson *et al.*, 2006).

No nosso trabalho foi observado que a MT associada com etanol pode ter estimulado a produção de esperma, quando comparado com os organismos não expostos. Os resultados do grupo controle solvente mostrou que *B. glabrata* exposta ao nível de concentração de 31,6mg/L de etanol, pode ter influenciado o desempenho reprodutivo, estimulando a produção de desovas na concentração mais baixa de 0,01 mg/L (0,316mg/L de álcool), de MT e o aumento da produção de esperma em concentrações mais elevadas de 0.1mg/L (3,16mg/L de álcool) e 1,0 mg/L (31,6mg/L de álcool), de cMT em comparação com animais não expostas ao solvente.

Em estudos anteriores com a espécie *B. teganophila*, o etanol foi testado nas concentrações de 19,8, 198,0 e 1980,0 mg/L (ou 0,0025%, 0,025% e 0,25% v / v). Isto resultou em uma redução da fecundidade em F0 e F1 em níveis $\geq 198,0$ mg/L e reduziu drasticamente a proporção da eclosão dos embriões da geração F2 (Oliveira-Filho *et al.*, 2009a). Em um estudo com o propionato de testosterona, diluído de 0,83 g e 0,89 g por 30 ml de etanol, para realizar ensaios genotóxicos e reprodutivos em camundongos, não foi evidenciado qualquer interferência do etanol nos resultados (Hana *et al.*, 2008). Para verificar os efeitos da testosterona na espécie *Marisa cornuarietis*, foi adicionado etanol absoluto numa concentração final na água de 0,001% e os caramujos foram expostos por 50, 100 e 150 dias. Os autores não mencionam qualquer interferência do etanol nos resultados observados (Janer *et al.*, 2006). No entanto, de acordo com os nossos resultados, o etanol deve ser considerado um agente eficaz no desempenho reprodutivo de *B. glabrata*, pois foi detectada a estimulação da produção de desovas e produção de esperma no grupo de controle com etanol, bem como nas maiores concentrações de 0,1

mg/L e 1,0 mg/L de cMT. Podendo ser relacionado com um efeito transportador do solvente, facilitando a entrada de cMT nas células deste invertebrado.

Na piscicultura, a cMT é comumente usado dissolvido em etanol e em termos de avaliação do risco ambiental, podemos considerar que a MT usada para alimentar embriões de peixes nas pisciculturas também pode conter resíduos do etanol e por isso, testamos o etanol, o que realmente evidencia o que está acontecendo no campo.

Neste estudo, a cMT afetou o desempenho reprodutivo de *Biomphalaria glabrata*, uma espécie não-alvo. A exposição ao cMT não alterou a maturação de ovócito, mas influenciou a produção de esperma, o número de ovos e de desovas.

Isto mostra o efeito desregulador do sistema endócrino da cMT nas concentrações testadas. Pode ter ocorrido um efeito compensatório do organismo estimulando as desovas, mas a cMT claramente diminuiu a quantidade de ovos, mostrando o efeito da substância sobre a fecundidade da espécie.

O solvente etanol não causou toxicidade durante o tratamento de exposição, mas a estimulação da produção de desovas e espermatozoides observadas no grupo de controle com o etanol, bem como para a produção de esperma em exposições mais elevadas cMT, pode estar relacionado com um efeito transportador do solvente, facilitando a entrada de cMT nas células. Estes resultados sugerem que o etanol deve ser considerado um agente eficaz no desempenho reprodutivo de *B. glabrata*. Além disso, devemos destacar a importância deste estudo sobre a descarga de águas residuais provenientes de pisciculturas que utilizam a MT, em ecossistemas aquáticos.

6.4. Embriotoxicidade de aMT e cMT em *Danio rerio*

Os efeitos da MT sobre a reprodução e desenvolvimento de diferentes espécies tem sido muito estudado (Pandian and Sheela, 1995; Papoulias et al., 2000; Sharpe et

al., 2004; Moens et al., 2006). Nosso estudo teve o objetivo de comparar os efeitos toxicológicos da MT, ingrediente ativo (aMT), com o produto comercializado e utilizado em pisciculturas no Brasil (cMT) em embriões de zebrafish (*Danio rerio*), espécie aceita como organismo teste.

No primeiro dia de exposição, os embriões morreram na concentração acima de 11 mg/L. Entretanto, a aMT mostrou maior toxicidade quando comparado com a cMT.

Apesar da cMT apresentar menor toxicidade, a taxa de mortalidade ao final do experimento foi de 86.7%. Baseado nos valores da LC50 calculados, a aMT causou maior toxicidade no primeiro dia de exposição, enquanto que depois do 4º dia, ambos compostos testados apresentaram toxicidade semelhantes.

No teste de toxicidade em embriões de peixe (FET), ambos compostos inibiram a eclosão dos embriões em concentrações acima de 7 mg/L. A MT deve inibir o processo natural do andrógeno endógeno, que provavelmente desempenha um papel importante na maturação final e / ou a libertação de ovos de peixe fêmea (Goetz *et al.*, 1987). Os efeitos negativos da MT na eclosão de embriões foram observados não apenas em vertebrados, mas também no grupo de invertebrados, onde ovos de lagosta expostos a 100g/L (0.33 mol/L) de MT resultou em uma diminuição da eclosão, prolongação do período de desenvolvimento embrionário, redução do crescimento e porcentagem significativa de malformações (Vogt, 2007).

Na literatura, não há muitas referências para comparar os resultados dos efeitos MT em embriões de zebrafish ou embriões de outras espécies não-alvo. No entanto, a exposição de embriões de zebrafish ao composto alcoólico 8:2-fluorotelomer, que provou ser um desregulador endócrino com efeitos estrogênicos, causou uma diminuição na taxa de eclosão de embriões de zebrafish (Liu *et al.*, 2010).

Nossos resultados mostraram alterações como atraso no desenvolvimento da cabeça, úlceras na pele e edemas cardíacos, os quais foram encontrados nas exposições a concentrações acima de 9 mg/L de aMT e cMT.

Os resultados obtidos mostraram que os embriões de zebrafish parecem ser sensíveis a ambas apresentações do hormônio, uma vez que a resposta foi observada nos biomarcadores, ChE, LDH e VTG para aMT e cMT.

As ChEs são uma família de enzimas importantes para a neurotransmissão, sendo responsáveis pela degradação do neurotransmissor acetilcolina nas sinapses colinérgicas. No nosso trabalho, a ChE foi inibida nos embriões na concentração de 5 mg/L para as duas substâncias-teste, sugerindo uma perturbação do sistema nervoso, que pode causar efeitos nocivos em várias funções do organismo, incluindo a respiração, a alimentação e comportamento nadatório (Cunha *et al.*, 2007).

A LDH é uma enzima chave para a via anaeróbica da produção de energia, responsável pela catalise de interconversão do piruvato para lactate na glicólise; além disso, tem sido utilizada como biomarcador de estresse em peixes (Almeida *et al.*, 2001; Osman *et al.*, 2007; Vieira *et al.*, 2008). A exposição das larvas as altas concentrações de aMT e cMT, causou uma inibição da atividade da LDH. Não existem estudos sobre os efeitos da MT nos níveis de LDH de zebrafish, mas nossos resultados estão de acordo com estudos prévios com outros estressores, tal como metais e alguns pesticidas. As variações dos níveis de LDH refletem em alterações metabólicas em larvas expostas ao Cr (VI) (Domingues *et al.*, 2010). Outros estudos indicam que muitos peixes tem mostrado uma diminuição dos níveis de LDH após a exposição a metais. Alguns exemplos são as larvas de catfish africano (pós eclosão) (*Clarias gariepinus*) expostas ao nitrato (Osman *et al.*, 2007), o *Channa punctatus* após a exposição ao cloreto de

mercúrio (Sastry and Rao, 1984) e *Oreochromis niloticus* exposta ao cádmio (Almeida *et al.*, 2001).

A exposição de larvas ao aMT e cMT em todas as concentrações analisadas, não alteraram os níveis de GST. As GSTs são uma família de enzimas que fazem parte da fase II da via central dos mecanismos de biotransformação envolvido na detoxificação de xenobióticos e compostos endógenos, entretanto, uma indução da atividade da GST também tem sido utilizada como um biomarcador ambiental (Hyne and Maher, 2003). Nossos resultados não mostraram indução da GST, nestas condições de exposição. A MT não afetou a produção metabólica que compete com os substratos da GST e também não influencia nos mecanismos de manutenção da homeostase do zebrafish.

Nossos achados evidenciam que a exposição aguda, 96 horas, dos embriões de zebrafish ao MT diminuem a síntese da VTG em todas as concentrações da aMT, enquanto que para os embriões expostos ao cMT, ocorreu a diminuição da síntese da VTG apenas nas concentrações mais elevadas (833 e 5000 µg/L). Em outro trabalho, por exemplo, juvenis de zebrafish expostos a 100, 260 e 500 ng de MT/L, a concentração de VTG no homogeneizado de corpo inteiro diminuiu, enquanto que no peixe juvenil exposto a 1000 ng de MT/L os níveis de VTG voltaram a aumentar (Örn *et al.*, 2003). Uma resposta similar tem sido mostrada em juvenis de fathead minnow- *Pimephales promelas* expostos a 6900, 29.500 e 152.400 ng/L de MT por 21 dias (Zerulla *et al.*, 2002).

A observação de que a MT também induz a expressão do gene da VTG em *Cyprinus carpio* é consistente com os efeitos estrogênicos da MT observados em fathead minnow (Ankley *et al.*, 2001; Zerulla *et al.*, 2002; Moens *et al.*, 2006). A MT induziu efeitos tanto estrogênicos como androgênicos em fathead minnows (Zerulla *et al.*, 2002; Moens

et al., 2006). O mecanismo básico do efeito estrogênico para este composto é a aromatização da MT para 17- α -metilestradiol (Hornung *et al.*, 2004).

Os níveis de VTG encontrados em um experimento com medaka após 60 dias de exposição ao MT, em concentrações baixas, foram maiores que o controle. A MT deve alterar as respostas estrogênicas, sendo metabolizado para estrogênio pela aromatase, e o metabólito deve levar ao aumento dos níveis hepáticos da VTG nos machos de medaka (Seki *et al.*, 2004). Outros estudos mostraram que a exposição por uma semana e 21 dias ao MT aumentou a indução de VTG em espécies como o *Carassius auratus* (goldfish) e fathead minnows (Hori *et al.*, 1979; Ankley *et al.*, 2001), ambos os autores sugerem que a MT foi aromatizada, resultando na indução da síntese de VTG.

Baseado nestes diferentes estudos, sugerimos que as diferentes respostas da VTG ao MT devem estar relacionadas com o estágio de vida do organismo e as concentrações de exposição deste hormônio.

6.5. Análise da Toxicidade de aMT e cMT por marcadores bioquímicos (ChE, GST, LDH e VTG) em adultos de *Danio rerio*.

A toxicidade da aMT e cMT em adultos de *Danio rerio* foi avaliada usando parâmetros bioquímicos e de letalidade. Foi calculada a LC₅₀ apenas para a exposição ao cMT (3,071 ug/L ou 0,003071mg/L), pois a aMT não causou mortalidade em 96h de exposição. Em 24h a LC₅₀ para cMT foi de 5,499ug/L, com intervalo de confiança de 4.568-6.673ug/L.

Analisando os resultados obtidos para a enzima GST, verificamos que houve uma reação diferente entre machos e fêmeas. Este resultado remete a uma série de possíveis conclusões, entretanto, temos que levar em consideração o gênero do animal

para estudos posteriores, pois fica evidente que eles sofrem de maneira diferente na presença do composto.

O tipo de MT testado não mostrou diferenças nas respostas para a GST, sendo uma resposta positiva, pois significa que o composto utilizado nas pisciculturas brasileiras não possui constituintes que alteram a toxicidade.

A funcionalidade desta enzima é dependente da concentração testada. Inicialmente, costuma ocorrer uma inibição seguida de um aumento da atividade e posterior inibição. Nossos resultados indicam um decréscimo da atividade, sendo possível atrelar este dado às altas concentrações utilizadas. Portanto, sugerimos em estudos futuros verificar os efeitos da MT em concentrações mais baixas.

Em todos os órgãos testados (brânquias, intestino e cabeça) os níveis de GST foram significativamente responsivos em relação ao controle. A GST é uma enzima relacionada ao processo de detoxificação do organismo e está envolvida nas defesas do estresse oxidativo. Nas brânquias e intestinos ocorreu a inibição da atividade da GST em relação ao sexo, enquanto que na cabeça houve o aumento da atividade.

A inibição da GST pode estar relacionada com a produção de diferentes metabólitos pela MT que competem com os substratos da GST ou causam a alteração nas subunidades de composição, estas alterações também podem estar relacionadas ao processo de manutenção da homeostase do organismo (Domingues *et al.*, 2011). A GST faz parte de uma família de enzimas envolvidas no processo geral de detoxificação de xenobióticos com centros eletrofilicos. Esta atividade é induzida em situações de estresse para o organismo, entretanto, a inibição da atividade da GST, como mostra este trabalho, também foi descrita na literatura por vários tipos de compostos. As diferenças entre machos e fêmeas observadas não dizem respeito apenas ao tipo de tecido que foi

responsivo, mas sim a sensibilidade (em geral os machos foram mais sensíveis do que as fêmeas).

Os tecidos possuem níveis diferentes de enzimas e os nossos resultados mostraram que o intestino do peixe *Danio rerio* é o órgão que demonstrou melhor resposta a exposição ao hormônio para a GST.

Nas análises da ChE na cabeça, foi observada uma inibição dos níveis dependente do gênero e os tipos de MT (P=0,001, P=0,032). Os resultados mostram uma inibição da ChE, que está relacionado a interferência da MT no processo de produção da enzima no zebrafish, sendo que a colinesterase é uma enzima chave no processo da neurotransmissão, importante para o processo de desenvolvimento muscular e neural do zebrafish (Hanneman, 1992; Olsen *et al.*, 2001; Behra *et al.*, 2002). A inibição da ChE perturba o funcionamento do sistema nervoso e poderá causar efeitos adversos sobre várias funções, incluindo a respiração, alimentação e comportamento (Coeurdassier *et al.*, 2004). Os machos se mostraram mais sensíveis aos testes quando comparados as fêmeas, isso foi observada nos resultados da ChE avaliada na cabeça do peixe, onde a inibição foi observada (indicando uma possível desregulação do sistema nervoso pela MT) embora um padrão dose-dependente não tenha sido observado.

No músculo tivemos resposta da ChE no controle solvente e por isso devemos comparar as respostas com o controle solvente. Neste tecido os resultados tiveram uma grande variabilidade, nos mostrando que existe uma possível inibição, mas sugerimos testes posteriores para verificar a resposta da ChE preferivelmente na cabeça da espécie *Danio rerio*.

Nos resultados da LDH na cabeça, não houve inibição dos níveis dependente da interação entre o gênero e tipo de MT. No intestino, a LDH foi inibida dependente da

interação entre os tipos de MT, concentração e o gênero ($P=0,001$). A LDH é uma enzima que é responsável pela manutenção do fígado, coração e rins (Adham *et al.*, 2002). A LDH faz parte de uma importante via de detoxificação da amônia e as alterações dos níveis de amônia no plasma de peixes estão positivamente relacionadas com mudanças da produção do LDH (Adham *et al.*, 2002).

Na literatura, não existem dados sobre os efeitos da MT verificados pelos testes enzimáticos. Testes com metais, efluentes e fungicidas, mostram que o aumento da produção de LDH está relacionado ao estresse causado pelos poluentes (Adham *et al.*, 2002; Cunha *et al.*, 2007; Silva *et al.*, 2009a). Entretanto, não podemos observar os resultados de forma isolada, desta maneira verificamos uma tendência a inibição da resposta da LDH, mas de forma geral não houve efeitos toxicológicos causados pelos compostos avaliados.

O índice hepatossomático-HSI foi significativamente mais elevado em fêmeas de zebrafish expostas à concentração mais alta (5000 ug/L, $P=0,001$) de aMT e nos machos expostos à menor concentração de cMT (4 ug/L, $P=0,001$), sugerindo que o MT pode induzir toxicidade hepática, como esperado uma vez que o fígado é o principal órgão de metabolização de esteroides androgênicos. Estes resultados estão de acordo com o que encontramos na literatura, que mostra os efeitos significativos da MT no fígado de algumas espécies de peixes, onde causa aumento do peso do fígado, refletindo a ação hepatotrófica do hormônio com elevados índices hepatossomáticos e esta resposta do IHS pode estar relacionada com a relação dose-efeito e não com a espécie (Simone, 1990).

Os machos de *Danio rerio* sofreram uma inibição da produção de VTG, enquanto as fêmeas não apresentaram alterações. Estes resultados mostram que a MT altera o processo normal de produção da VTG, reduzindo os níveis circulantes. Estes

resultados estão de acordo com o que encontramos na literatura, onde em um experimento com *Zoarcetes viviparus* os machos previamente expostos ao estradiol, foram submetidos a diferentes concentrações de MT e tiveram seus níveis de VTG diminuídos (Korsgaard, 2006). As concentrações utilizadas neste experimento, entretanto, são maiores que as utilizadas em trabalhos anteriores (Zerulla *et al.*, 2002; Hornung *et al.*, 2004).

No entanto, a utilização de andrógenos tais como a MT, tem um claro potencial para complicar a interpretação dos resultados. Já foi constatado que a exposição ao MT altera a produção de VTG, mas estes resultados são contraditórios, pois existem dados que mostram que a exposição a 25ng/L de MT induz a produção de VTG em machos e fêmeas de zebrafish (Andersen *et al.*, 2003). Outro trabalho mostrou que 1000 ng/L de MT reduz a produção de VTG nas fêmeas de *Fundulus heteroclitus*, esta redução nas fêmeas deve-se a diminuição da produção e circulação do E2 (Sharpe *et al.*, 2004). Outras conclusões semelhantes foram obtidas em estudos com *Oreochromis niloticus*, em que os níveis de E2 no plasma e a expressão dos genes foram deprimidos pela MT (Lazier *et al.*, 1996).

Comparando nossos resultados com outros estudos, a espécie *Pimephales promelas*, teve falta de indução VTG em machos o indica que a MT pode não ser eficazmente aromatizada em zebrafish, ou que as exposições foram muito curtas para converter quantidades suficientes de MT para E2 para estimular VTG síntese (Sharpe *et al.*, 2004).

Os efeitos causados pela exposição ao MT foram observados em nível de subletalidade, e devem ser avaliados com mais detalhes numa perspectiva de avaliação de risco do uso da MT em organismos não alvo. Além disso, as diferenças de respostas para cada gênero devem ser levadas em consideração, uma vez que diferentes

mecanismos fisiológicos de resposta devem ocorrer em organismos aquáticos afetados pelos efluentes contendo resíduos MT. Finalmente, a utilização da cMT deve ser cuidadosamente estudada para que o estabelecimento de uma legislação adequada possa definir regras para o uso da MT nas pisciculturas de forma segura ao meio ambiente e para o homem.

7. CONCLUSÕES

1. A cMT, mostrou-se moderadamente genotóxica as espécies *Oreochromis niloticus* e *Astyanax bimaculatus*, pela análise de MNs, Cometa e AN, tanto na exposição de 96 horas quanto a de 28 dias.

2. Efeitos nas gônadas

- As gônadas de machos de *Oreochromis niloticus* e *Astyanax bimaculatus* expostos por 96h, tiveram a produção de espermatozoides diminuída significativamente.
- As gônadas de fêmeas de *Oreochromis niloticus*, expostas por 28 dias ao cMT, tiveram seus ovócitos tipo V diminuídos, evidenciando uma diminuição da oogênese.
- As gônadas de machos de *Astyanax bimaculatus* expostos 28 dias ao cMT tiveram uma diminuição significativa da produção de espermatozoides.

3. O desempenho reprodutivo da espécie *Biomphalaria glabrata* apresentou diferenças significativas o número de desovas na menor concentração testada (0,01 mg/L de cMT) e alteração da produção de esperma no controle com etano e nas maiores concentrações testadas, evidenciando uma possível influencia na reprodução do etanol na gônada masculina deste caramujo.

4. Efeitos nos embriões de *Danio rerio*:

- Os dois compostos testados (aMT e cMT) foram teratogênicos para os embriões.
- As MTs não causam estresse oxidativo nos embriões.
- As MTs possivelmente causam uma perturbação no sistema nervoso e na via anaeróbica de produção de energia nos embriões.
- Os dois compostos testados influenciam na síntese da VTG nos embriões de zebrafish.

5. Efeitos da aMT e cMT em adultos de *Danio rerio*:

- Nos adultos de *Danio rerio*, os hormônios não causam toxicidade.
- A MT pode induzir toxicidade hepática.
- A MT não alterou a síntese de VTG nos adultos de zebrafish.

Os efeitos causados pela exposição ao MT foram observados em nível de subletalidade e devem ser avaliados com mais detalhes numa perspectiva de avaliação de risco do uso da MT em organismos não alvo como o *Astyanax bimaculatus*, *biomphalari glabrata* e *Danio rerio*. Além disso, as diferenças de respostas para machos e fêmeas devem ser levadas em consideração, uma vez que diferentes mecanismos fisiológicos de resposta devem ocorrer em organismos aquáticos afetados pelos efluentes com MT. Finalmente, a aparente eficácia da cMT deve ser cuidadosamente estudada para que a legislação adequada possa estabelecer o uso da MT para as pisciculturas de forma segura ao meio ambiente e para o homem.

7. REFERÊNCIAS

- ABNT, 2004. Ecotoxicologia aquática - toxicidade aguda - método de ensaio com *Daphnia* spp (Cladocera, Crustacea). Associação Brasileira de Normas Técnicas. NBR 12713.
- Adachi, K., Wakamatsu, K., Ito, S., Matsubara, H., Nomura, K., Tanaka, H., Kato, K., 2010. A close relationship between androgen levels and eumelanogenesis in the teleost red seabream (*Pagrus major*): Quantitative analysis of its seasonal variation and effects of oral treatment with methyl-testosterone. *Comparative Biochemistry and Physiology - Part A: Molecular & Integrative Physiology* 156, 184-198.
- Adham, K.G., Ibrahim, H.M., Hamed, S.S., Saleh, R.A., 2002. Blood chemistry of the Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* (Linnaeus, 1757) under the impact of water pollution. *Aquatic Ecology* 36, 549-557.
- Al-Sabti, K., Metcalfe, C.D., 1995. Fish micronuclei for assessing genotoxicity in water. *Mutation Research/Genetic Toxicology* 343, 121-135.
- Alle, E., Fenocchio, A.S., Pastori, M.C., Ribeiro, C.A.O., Cestari, M.M., Zacharzewski, C., 2004. Evaluation of the effects of $(\text{NO}_3)_2$ Pb on *Oreochromis niloticus* (Pisces, Cichlidae) by means of cytogenetic techniques. *Cytology* 4.
- Almeida, J.A., Novelli, E.L.B., Silva, M.D., Alves, R., 2001. Environmental cadmium exposure and metabolic responses of the Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*. *Environmental Pollution* 114, 169-175.
- Andersen, L., Bjerregaard, P., Korsgaard, B., 2003. Vitellogenin induction and brain aromatase activity in adult male and female zebrafish exposed to endocrine disrupters. *Fish Physiology and Biochemistry* 28, 319-321.
- Ankley, G.T., Jensen, K.M., Kahl, M.D., Korte, J.J., Makynen, E.A., 2001. Description and evaluation of a short-term reproduction test with the fathead minnow

- (*Pimephales promelas*). *Environmental Toxicology and Chemistry* 20, 1276-1290.
- Ateeq, B., Abul, F.M., Ali, N.M., Ahmad, W., 2002. Induction of micronuclei & erythrocyte alterations in the catfish *Clarias batrachus* by 2,4-dichlorophenoxyacetic acid and butachlor. *Mutation research* 518.
- Ayllon, F., Garcia-Vazquez, E., 2000. Induction of micronuclei and other nuclear abnormalities in European minnow *Phoxinus phoxinus* and mollie *Poecilia latipinna*: an assessment of the fish micronucleus test. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis* 467, 177-186.
- Baroiller, J.F., Toguyeni, A., 2004. The Tilapiini tribe: environmental and social aspects of reproduction and growth. *Fisheries and Aquaculture, Encyclopedia of life support systems (EOLSS)* 3.
- Beardmore, J.A., Mair, G.C., Lewis, R.I., 2001. Monosex male production in finfish as exemplified by tilapia: applications, problems, and prospects. *Aquaculture* 197, 283-301.
- Behra, M., Cousin, X., Bertrand, C., Vonesch, J., Biellmann, D., Chatonnet, A., Strähle, U., 2002. Acetylcholinesterase is required for neuronal and muscular development in the zebrafish embryo. *Nature Neuroscience* 5, 111-118.
- Bejma, J., Walsh, D., Kendirci, M., Hellstrom, W., 2005. Controversies regarding testosterone supplementation in the prostate cancer patient. *Current Sexual Health Reports* 2, 41-44.
- Belpaeme, I.C., Delbeke, K., Zhu, L., Kirsch-Volders, M., 1996. Cytogenetic studies of PCB77 on brown trout (*Salmo trutta fario*) using the micronucleus test and the alkaline comet assay. *Mutagenesis* 11, 485-492.

- Benincá, C., Ramsdorf, W.A., Vicari, T., Ribeiro, C.A.d.O., Almeida, M.I.d., Assis, H.C.S.d., Cestari, M.M., 2012. Chronic genetic damages in *Geophagus brasiliensis* exposed to anthropic impact in Estuarine Lakes at Santa Catarina Coast–Southern of Brazil. *Environ Monit Assess* 184, 2045-2056.
- Bickham, J.W., Sandhu, S., Hebert, P.D.N., Chikhi, L., Athwal, R., 2000. Effects of chemical contaminants on genetic diversity in natural populations: implications for biomonitoring and ecotoxicology. *Mutation Research/Reviews in Mutation Research* 463, 33-51.
- Bolognesi, C., Perrone, E., Roggieri, P., Pampanin, D.M., Sciutto, A., 2006. Assessment of micronuclei induction in peripheral erythrocytes of fish exposed to xenobiotics under controlled conditions. *Aquatic Toxicology* 78, S93-S98.
- Boscolo, W.R., Hayashi, C., Soares, C.M., Furuya, W.M., Meurer, F., 2001. Desempenho e Características de Carcaça de Machos Revertidos de Tilápias do Nilo (*Oreochromis niloticus*), Linhagens Tailandesa e Comum, nas Fases Inicial e de Crescimento. *Revista Brasileira de Zootecnia* 30, 1391-1396.
- Bromage, N., 1993. 'Broodstock Management and Egg and Larval Quality': An International Symposium held at the University of Stirling, 23–27 June 1992. *Aquaculture Research* 24, 143-143.
- Bucker, A., Carvalho, W., Alves-Gomes, J.A., 2006. Avaliação da mutagênese e genotoxicidade em *Eigenmannia virescens* (Teleostei: Gymnotiformes) expostos ao benzeno. *Acta Amazonica* 36, 357-364.
- Buschini, A., Martino, A., Gustavino, B., Monfrinotti, M., Poli, P., Rossi, C., Santoro, M., Dörr, A.J.M., Rizzoni, M., 2004. Comet assay and micronucleus test in circulating erythrocytes of *Cyprinus carpio* specimens exposed in situ to lake

- waters treated with disinfectants for potabilization. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis* 557, 119-129.
- Calabrese, E.J., Baldwin, L.A., 2003a. The hormetic dose-response model is more common than the threshold model in toxicology. *Toxicology Science* 71, 246-250.
- Calabrese, E.J., Baldwin, L.A., 2003b. Toxicology rethinks its central belief. *Nature* 421, 691-692.
- Calabrese, E.J., Mattson, M.P., 2011. Hormesis provides a generalized quantitative estimate of biological plasticity. *J Cell Commun Signal* 5, 25-38.
- Carrasco, L.A.P., Penman, D.J., A., V.S., Bromage, N., 1999. The effects of oral administration with 17alpha-methyltestosterone on chromosomal synapsis in *Oreochromis niloticus* (Pisces, Cichlidae). *Mutation Research* 430, 87-98.
- Çavas, T., Ergene-Gözükara, S., 2003. Micronuclei, nuclear lesions and interphase silver-stained nucleolar organizer regions (AgNORs) as cyto-genotoxicity indicators in *Oreochromis niloticus* exposed to textile mill effluent. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis* 538, 81-91.
- Cedergreen, N., Spliid, N.H., Streibig, J.C., 2005. Improved empirical models describing hormesis. *Environmental Toxicology and Chemistry* 24, 3166-3172.
- Cestari, M.M., Lemos, P.M.M., Ribeiro, C.A.d.O., Costa, J.R.M.A., Pelletier, E., Ferraro, M.V.M., Mantovani, M.S., Fenocchio, A.S., 2004. Genetic damage induced by trophic doses of lead in the neotropical fish *Hoplias malabaricus* (Characiformes, Erythrinidae) as revealed by the comet assay and chromosomal aberrations. *Genetics and Molecular Biology*.
- Clemente, Z., Busato, R.H., Ribeiro, C.A.O., Cestari, M.M., Ramsdorf, W.A., Magalhães, V.F., Wosiack, A.C., Assis, H.C.S., 2010. Analyses of paralytic

- shellfish toxins and biomarkers in a southern Brazilian reservoir. *Toxicon*, 396-406.
- Coeurdassier, M., Vaufleury, A., Scheifler, R., Morhain, E., Badot, P.M., 2004. Effects of cadmium on the survival of three life-stages of the freshwater pulmonate *Lymnaea stagnalis* (Mollusca, Gastropoda). *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 72, 1083-1090.
- Croll, R.P., Wang, C., 2007. Possible roles of sex steroids in the control of reproduction in bivalve molluscs. *Aquaculture* 272, 76-86.
- Cui, G.H., Xu, Z.L., Yang, Z.J., Xu, Y.Y., Xue, S.P., 2004. A combined regimen of gossypol plus methyltestosterone and ethinylestradiol as a contraceptive induces germ cell apoptosis and expression of its related genes in rats. *Contraception* 70, 335-342.
- Cunha, I., Mangas-Ramirez, E., Guilhermino, L., 2007. Effects of copper and cadmium on cholinesterase and glutathione S-transferase activities of two marine gastropods (*Monodonta lineata* and *Nucella lapillus*). *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology* 145, 648-657.
- Curtis, L.R., Diren, F.T., Hurley, M.D., Seim, W.K., Tubb, R.A., 1991. Disposition and elimination of 17 α -methyltestosterone in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*)*. *Aquaculture* 9, 193-201.
- Czech, P., Weber, K., Dietrich, D.R., 2001. Effects of modulating substances on reproduction in the hermaphroditic snail *Lymnaea stagnalis*. *Aquatic toxicology* 53, 103-114.
- Demska-Zakes, K., Zakes, Z., 1997. Effect of 17 α -methyltestosterone on gonadal differentiation in pikeperch, *Stizostedion lucioperca* L. *Aquaculture Research* 28, 59-63.

- Dhillon, V.S., Singh, J., Singh, H., Kler, R.S., 1995. In vitro and in vivo genotoxicity of hormonal drugs VI. Fluoxymesterone. *Mutation Research/Genetic Toxicology* 342, 103-111.
- Diamantino, T.C., Almeida, E., Soares, A.M.V.M., Guilhermino, L., 2001. Lactate dehydrogenase activity as an effect criterion in toxicity tests with *Daphnia magna* Straus. *Chemosphere* 45, 553-560.
- Domingues, I., Oliveira, R., Lourenço, J., Grisolia, C.K., Mendo, S., Soares, A.M.V.M., 2010. Biomarkers as a tool to assess effects of Chromium (VI): comparison of responses in zebrafish early life stages and adults. *Comparative Biochemistry and Physiology C - Pharmacology Toxicology & Endocrinology* 152, 338-345.
- Domingues, I., Oliveira, R., Musso, C., Cardoso, M., Soares, A.M.V.M., Loureiro, S., 2011. Prochloraz effects on biomarkers activity in zebrafish early life stages and adults. *Environmental Toxicology*, n/a-n/a.
- Donaldson, E.M., Fagerlund, U.H.M., Higgs, D.A., McBride, J.R., 1979. Hormonal enhancement of growth. *Fish Physiology and Biochemistry* 8, 456-578.
- Donaldson, E.M., Hunter, G.A., 1983. 7 Induced Final Maturation, Ovulation, and Spermiation in Cultured Fish. In: W.S. Hoar, D.J.R., Donaldson, E.M. (Eds.), *Fish Physiology*. Academic Press, pp. 351-403.
- Dunnett, C.W., 1955. Multiple comparison procedure for comparing several treatments with a control. *J Am Stat Assoc* 50, 1096-1121.
- Ellman, G.L., Courtney, K.D., Andreas, V.J., Featherstone, R.M., 1961. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochemical Pharmacology* 7, 88-95.
- Erbe, M.C.L., Ramsdorf, W.A., Vicari, T., Cestari, M.M., 2011. Toxicity evaluation of water samples collected near a hospital waste landfill through bioassays of

- genotoxicity piscine micronucleus test and comet assay in fish *Astyanax* and ecotoxicity *Vibrio fischeri* and *Daphnia magna*. *Ecotoxicology* 20, 320-328.
- Esteves, K.E., Galetti, P.M.J., 1995. Food partitioning among some characids of a small Brazilian floodplain Lake from the Paraná River basin. *Environmental Biology of Fishes* 42, 357-389.
- FAO, 2003. Etat de l'Aquaculture dans le monde. Circulaire sur les pêches 2, 114.
- FAO, 2008. FAO/Fisheries and Aquaculture Information and Statistics Service. 57.
- Fenech, M., 2000. The in vitro micronucleus technique. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* 455, 81-95.
- Fenech, M., Crott, J.W., 2002. Micronuclei, nucleoplasmic bridges and nuclear buds induced in folic acid deficient human lymphocytes—evidence for breakage–fusion-bridge cycles in the cytokinesis-block micronucleus assay. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* 504, 131-136.
- Fenech, M., Kirsch-Volders, M., Natarajan, A.T., Surralles, J., Crott, J.W., Parry, J., Norppa, H., Eastmond, D.A., Tucker, J.D., Thomas, P., 2011. Molecular mechanisms of micronucleus, nucleoplasmic bridge and nuclear bud formation in mammalian and human cells. *Mutagenesis* 26, 125-132.
- Fernandez, M., L'Haridon, J., Gautier, L., Soy-Moreux, C., 1993. Amphibian micronucleus test(s): a simple and reliable method for evaluating in vivo genotoxic effects of freshwater pollutants and radiations Initial assessment. *Mutation Research* 292, 83-99.
- Ferraro, M.V.M., Fenocchio, A.S., Mantovani, M.S., Ribeiro, C.O., Cestari, M.M., 2004. Mutagenic effects of tributyltin and inorganic lead (Pb II) on the fish *H.*

- malabaricus as evaluated using the comet assay and the piscine micronucleus and chromosome aberration tests. *Mutation Research* 27, 103-107.
- Feser, W., Kerdar, R.S., Blode, H., Reimann, R., 1996. Formation of DNA-adducts by selected sex steroids in rat liver. *Human & Experimental Toxicology* 15, 556-562.
- Filipak Neto, F., Zanata, S.M., Silva de Assis, H.C., Bussolaro, D., Ferraro, M.V.M., Randi, M.A.F., Alves Costa, J.R.M., Cestari, M.M., Roche, H., Oliveira Ribeiro, C.A., 2007. Use of hepatocytes from *Hoplias malabaricus* to characterize the toxicity of a complex mixture of lipophilic halogenated compounds. *Toxicology in Vitro* 21, 706-715.
- Fonseca, F.O., 2001. Olhares sobre o Lago Paranoá.
- Forbes, V.E., 2000. Is hormesis an evolutionary expectation? *Function Ecology* 14, 12-24.
- Gagné, F., Blaise, C., 2000. Organic alkali-labile phosphates in biological materials: A generic assay to detect vitellogenin in biological tissues. *Environmental Toxicology* 15, 243-247.
- Gery, J., 1977. *Characoids of the World*. T.F.H. Publications, 671.
- Ghisi, N.d.C., Cestari, M.M., 2013. Genotoxic effects of the herbicide Roundup® in the fish *Corydoras paleatus* (Jenyns 1842) after short-term, environmentally low concentration exposure. *Environmental Monitoring Assessment* 185.
- Godoy, M.P., 1975. Peixes do Brasil Sub Ordem Characoidei S. P.Franciscana, Ed. 4, 847.
- Goetz, F.W., Fostier, A.Y., Breton, B., Jalabert, B., 1987. Hormonal changes during meiotic maturation and ovulation in the brook trout (*Salvelinus fontinalis*). *Fish Physiology and Biochemistry* 3 203-211.

- Goudie, C.A., Shelton, W.L., Parker, N.C., 1986. Tissue distribution and elimination of radiolabelled methyltestosterone fed to adult blue tilapia. *Aquaculture* 58, 227-240.
- Green, B.W., Teichert-Coddington, D.R., 2000. Human Food Safety and Environmental Assessment of the Use of 17 α -Methyltestosterone to Produce Male Tilapia in the United States. *Journal of the World Aquaculture Society* 31, 337-357.
- Green, B.W., Veverica, K.L., Fitzpatrick, M.S., 1997. Fry and fingerling production. In: Egna, H., Boyd, C. (Eds.), *Dynamics of Pond Aquaculture*. 215-243.
- Grisolia, C.K., Bicalho-Valadares, M.E., 1997. Toxicity and genotoxicity of the fungicide triphenyltin hydroxide. *Brazilian J. Genet* 20, 243-246.
- Grisolia, C.K., Cordeiro, C.M.T., 2000. Variability in micronucleus induction with different mutagens applied to several species of fish. *Genetics and Molecular Biology* 23, 235-239.
- Grisolia, C.K., Oliveira, A.B.B., Bonfim, H., Klatau-Guimarães, M.d.N., 2005. Genotoxicity evaluation of domestic sewage in a municipal wastewater treatment plant. *Genetics and molecular Biology* 28, 334-338.
- Grisolia, C.K., Rivero, C.L.G., Starling, F.L.R.M., Silva, I.C.R.d., Barbosa, A.C., Dorea, J.G., 2009. Profile of micronucleus frequencies and DNA damage in different species of fish in a eutrophic tropical lake. *Genetics and Molecular Biology* 32, 138-143.
- Grisolia, C.K., Starling, F.L.R.M., 2001. Micronuclei monitoring of fishes from Lake Paranoá, under influence of sewage treatment plant discharges. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis* 491, 39-44.

- Guilhermino, L., Lopes, M.C., Carvalho, A.P., Soares, A.M.V.M., 1996. Inhibition of acetylcholinesterase activity as effect criterion in acute test with juvenile *Daphnia magna*. *Chemosphere* 32, 727-738.
- Habig, W.H., Jakoby, W.B., 1981. Assays for differentiation of glutathione S-transferase. *Methods in enzymology*. Academic press, pp. 398-405.
- Habig, W.H., Pabst, M.J., Jakoby, W.B., 1974. Glutathione S-transferases. *The Journal of Biological Chemistry* 249, 7130-7137.
- Hallgren, P., Mårtensson, L., Mathiasson, L., 2009. Improved spectrophotometric vitellogenin determination via alkali-labile phosphate in fish plasma—a cost effective approach for assessment of endocrine disruption. *International Journal of Environmental Analytical Chemistry* 89, 1023 - 1042.
- Hana, H.Y., Khalil, W.K.B., Elmakawy, A.I., Elmegeed, G.A., 2008. Androgenic profile and genotoxicity evaluation of testosterone propionate and novel synthesized heterocyclic steroids. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* 110, 284-294.
- Hanneman, E.H., 1992. Diisopropylfluorophosphate inhibits acetylcholinesterase activity and disrupts somitogenesis in the Zebrafish *Journal of Experimental Zoology* 263, 41-53.
- Hartmann, A., Kiskinis, E., Fjällman, A., Suter, W., 2001. Influence of cytotoxicity and compound precipitation on test results in the alkaline comet assay. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis* 497, 199-212.
- Hashimoto, S., Bessho, H., Hara, A., Nakamura, M., Iguchi, T., Fujita, K., 2000. Elevated serum vitellogenin levels and gonadal abnormalities in wild male flounder (*Pleuronectes yokohamae*) from Tokyo Bay, Japan. *Marine Environmental Research* 49, 37-53.

- Hayashi, M., Ueda, T., Ueyno, K., Wada, K., Saotome, K., Tanaka, N., Takai, A., Sasaki, Y.F., Asano, N., Sofuni, T., Ojima, Y., 1998. Development of genotoxicity assay systems that use aquatic organisms. *Mutation Research* 399, 125-133.
- Homklin, S., Ong, S.K., Limpiyakorn, T., 2011. Biotransformation of 17[alpha]-methyltestosterone in sediment under different electron acceptor conditions. *Chemosphere* 82, 1401-1407.
- Hooftman, R.N., Raat, W.K., 1982. Induction of nuclear anomalies (micronuclei) in the peripheral blood erythrocytes of the eastern mudminnow *Umbra pygmaea* by ethyl methanesulphonate. *Mutation Research* 104, 147-152.
- Hori, S.H., Kodama, T., Tanahashi, K., 1979. Induction of vitellogenin synthesis in goldfish by massive doses of androgens. *General Comparative Endocrinology* 37.
- Horn, R.C., Rocha, J.A.V., Vargas, V.M.F., 2004. Determination of sediment mutagenicity and cytotoxicity in an area subjected to petrochemical contamination. *Mutagenesis* 19, 445-451.
- Hornung, M.W., Jensen, K.M., Korte, J.J., Kahl, M.D., Durhan, E.J., Denny, J.S., Henry, T.R., Ankley, G.T., 2004. Mechanistic basis for estrogenic effects in fathead minnow (*Pimephales promelas*) following exposure to the androgen 17 α -methyltestosterone: conversion of 17 α -methyltestosterone to 17 α -methyleneestradiol. *Aquatic Toxicology* 66, 15-23.
- Horváthová, E., Slamenová, D., Hlinciková, L., Mandal, T.K., Gábelová, A., Collins, A.R., 1998. The nature and origin of DNA single-strand breaks determined with the comet assay. *Mutation Research* 409, 163-171.
- <http://www.onestopcountrypet.com/danios.html>.

- Hulak, M., Paroulek, M., Simek, P., Kocour, M., Gela, D., Rodina, M., Linhart, O., 2008. Water polluted by 17 α -methyltestosterone provides successful male sex inversion of common carp (*Cyprinus carpio* L.) from gynogenetic offspring. *Journal of Applied Ichthyology* 24, 707-710.
- Hutchinson, T.H., Shillabeer, N., Wintera, M.J., Pickford, D.B., 2006. Acute and chronic effects of carrier solvents in aquatic organisms: A critical review. *Aquatic Toxicology Reviews in Fish Biology and Fisheries* 76, 69-92.
- Hyne, R.V., Maher, W.A., 2003. Invertebrate biomarkers: links to toxicosis that predict population decline. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 54, 366-374.
- Jaloszynski, P., Kujawski, M., Wasowicz, M., Szulc, R., Szyfter, K., 1999. Genotoxicity of inhalation anesthetics halothane and isoflurane in human lymphocytes studied in vitro using the comet assay. *Mutation Research* 439, 199-206.
- Janer, G., Lyssimachou, A., Bachmann, J., Oehlmann, J., Schulte-Oehlmann, U., Porte, C., 2006. Sexual dimorphism in esterified steroid levels in the gastropod *Marisa cornuarietis*: The effect of xenoandrogenic compounds. *Steroids* 71, 435-444.
- Jha, A.N., 2008. Ecotoxicological applications and significance of the comet assay. *Mutagenesis* 23, 207-221.
- Jobling, S., Casey, D., Rodgers-Gray, T., Oehlmann, J., Schulte-Oehlmann, U., Pawlowski, S., Baunbeck, T., Turner, A.P., Tyler, C.R., 2003. Comparative responses of molluscs and fish to environmental estrogens and an estrogenic effluent. *Aquatic Toxicology* 65, 205-220.
- Joosten, H.F.P., van Acker, F.A.A., van den Dobbelen, D.J., Horbach, G.J.M.J., Krajnc, E.I., 2004. Genotoxicity of hormonal steroids. *Toxicology Letters* 151, 113-134.

- Kang, I.J., Yokota, H., Oshima, Y., Tsuruda, Y., Shimasaki, Y., Honjo, T., 2008. The effects of methyltestosterone on the sexual development and reproduction of adult medaka (*Oryzias latipes*). *Aquatic Toxicology* 87, 37-46.
- Katsumiti, A., Valdez Domingos, F.X., Azevedo, M., da Silva, M.D., Damian, R.C., Almeida, M.I.M., Silva de Assis, H.C., Cestari, M.M., Randi, M.A.F., Ribeiro, O.C.A., Freire, C.A., 2009. An assessment of acute biomarker responses in the demersal catfish *Cathorops spixii* after the Vicuña Oil Spill in a harbour estuarine area in Southern Brazil. *Environmental Monitoring Assessment* 152, 209–222.
- Kim, I.-Y., Hyun, C.-K., 2006. Comparative evaluation of the alkaline comet assay with the micronucleus test for genotoxicity monitoring using aquatic organisms. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 64, 288-297.
- Kimmel, C.B., Ballard, W.W., Kimmel, S.R., Ullmann, B., Schilling, T.F., 1995. Stages of embryonic-development of the zebrafish. *Developmental Dynamics* 203, 253-310.
- Korsgaard, B., 2006. Effects of the model androgen methyltestosterone on vitellogenin in male and female eelpout, *Zoarces viviparus* (L) *Marine Environmental Research* 62, 205-210.
- Lee, R.F., Steinert, S., 2003. Use of the single cell gel electrophoresis/comet assay for detecting DNA damage in aquatic (marine and freshwater) animals. *Mutation Research/Reviews in Mutation Research* 544, 43-64.
- Lemos, C.T., Rodel, P.M., Terra, N.R., Erdtmann, B., 2001. Evaluation of basal micronucleus frequency and hexavalent chromium effects in fish erythrocytes. *Environmental Toxicology and Chemistry* 20, 1320-1324.

- Lemos, C.T.d., Iranço, F.d.A., Oliveira, N.C.D., Souza, G.D., Fachel, J.M.G., 2008. Biomonitoring of genotoxicity using micronuclei assay in native population of *Astyanax jacuhiensis* (Characiformes: Characidae) at sites under petrochemical influence. *Science of The Total Environment* 406, 337-343.
- Lemos, C.T.d., Rödel, P.M., Terra, N.R., de Oliveira, N.C.D.A., Erdtmann, B., 2007. River water genotoxicity evaluation using micronucleus assay in fish erythrocytes. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 66, 391-401.
- Leuzzi, M.S.P., Almeida, F.S.d., Orsi, M.L., Sodr , L.M.K., 2004. Analysis by RAPD of the genetic structure of *Astyanax altiparanae* (Pisces, Characiformes) in reservoirs on the Paranapanema River, Brazil. *Genetic and Molecular Biology* 27, 355-362.
- Liu, C., Deng, J., Yu, L., Ramesh, M., Zhou, B., 2010. Endocrine disruption and reproductive impairment in zebrafish by exposure to 8:2 fluorotelomer alcohol. *Aquatic Toxicology* 96, 70-76.
- Marcino, J.J., Guillette, L.J., 1996. Vitellogenin induction and reduced serum testosterone concentrations in feral male carp (*Cyprinus carpio*) captured near a major metropolitan sewage treatment plant. *Environ Health Perspect* 104.
- Martelli, F.M., Angiola, M., Reimann, R., Brambila, G., 2003. Species, sex and inter-individual differences in DNA repair induced by nine steroids in primary cultures of rat and human hepatocytes. *Mutation Research* 536, 69-78.
- Martinez, C.B.R., Souza, M.M., 2002. Acute effects of nitrite on ion regulation in two neotropical fish. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A* 133, 151-160.
- Masuda, S., Deguchi, Y., Masuda, Y., Watanabe, T., Nukaya, H., Terao, Y., Takamura, T., Wakabayashi, K., Kinae, N., 2004. Genotoxicity of 2-[2-(acetylamino)-4-

[bis(2-hydroxyethyl)amino]-5-methoxyphenyl]-5-amino-7-bromo-4-chloro-2H-benzotriazole (PBTA-6) and 4-amino-3,3'-dichloro-5,4'-dinitro-biphenyl (ADDDB) in goldfish (*Carassius auratus*) using the micronucleus test and the comet assay. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis* 560, 33-40.

Matsumoto, F.E., Cólus, I.M.S., 2000. Micronucleus frequencies in *Astyanax bimaculatus* (Characidae) treated with cyclophosphamide or vinblastine sulfate. *Genetics and Molecular Biology* 23, 489-492.

Mersch, J., Beauvais, M.-N., Nagel, P., 1996. Induction of micronucleus in haemocytes and gill cells of zebra mussels, *Dreissena polymorpha*, exposed to clastogens. *Mutation Research* 371, 47-55.

Mersch, J., Beauvais, M.-N., 1997. The micronucleus assay in the zebra mussel, *Dreissena polymorpha*, to in situ monitor genotoxicity in freshwater environments. *Mutation Research* 393, 141-149.

Meurer, F., Hayashi, C., Soares, C.M., Boscolo, W.R., 2000. Utilização de levedura spray dried na alimentação de alevinos de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus* L.) *Acta Scientiarum* 22, 479-484.

Milnes, M.R., Bermudez, D.S., Bryan, T.A., Edwards, T.M., Gunderson, M.P., Larkin, I.L.V., Moore, B.C., Guillette Jr, L.J., 2006. Contaminant-induced feminization and demasculinization of nonmammalian vertebrate males in aquatic environments. *Environmental Research* 100, 3-17.

Miracle, A.L., Ankley, G.T., 2005. Ecotoxicogenomics: linkages between exposure and effects in assessing risks of aquatic contaminants to fish. *Reproductive Toxicology* 19, 321-326.

- Missini, S., Ciccoti, E., Rizzoni, M., 1996. Micronucleus test in erythrocytes of *Barbus plebejus* (Teleostei, Pisces) from two natural environments: a bioassay for the in situ detection of mutagens in freshwater. *Mutation research* 367, 245-251.
- Mitchelmore, C.L., Chipman, J.K., 1998. DNA strand breakage in aquatic organisms and the potential value of the comet assay in environmental monitoring. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* 399, 135-147.
- Mochida, K., Ohkubo, N., Matsubara, T., Ito, K., Kakuno, A., Fujii, K., 2004. Effects of endocrine-disrupting chemicals on expression of ubiquitin C-terminal hydrolase mRNA in testis and brain of the Japanese common goby. *Aquatic Toxicology* 70, 123-136.
- Moens, L.N., van der Ven, K., Van Remortel, P., Del-Favero, J., De Coen, W.M., 2006. Expression Profiling of Endocrine-Disrupting Compounds Using a Customized *Cyprinus carpio* cDNA Microarray. *Toxicological Sciences* 93, 298-310.
- Moller, P., 2005. Genotoxicity of environmental agents assessed by the alkaline comet assay. *Basic & Clinical Pharmacology and Toxicology* 96.
- Monteiro, D.A., de Almeida, J.A., Rantin, F.T., Kalinin, A.L., 2006a. Oxidative stress biomarkers in the freshwater characid fish, *Brycon cephalus*, exposed to organophosphorus insecticide Folisuper 600 (methyl parathion). *Comparative Biochemistry and Physiology C-Toxicology & Pharmacology* 143, 141-149.
- Monteiro, M., Quintaneiro, C., Pastorinho, M., Pereira, M.L., Morgado, F., Guilhermino, L., Soares, A.M.V.M., 2006b. Acute effects of 3,4-dichloroaniline on biomarkers and spleen histology of the common goby *Pomatoschistus microps*. *Chemosphere* 62, 1333-1339.

- Moore, A., Waring, C.P., 2001. The effects of a synthetic pyrethroid pesticide on some aspects of reproduction in Atlantic Salmon (*Salmo salar* L.). *Aquatic Toxicology* 52, 1-12.
- Moss, S.M., 1989. Effects of exogenous androgens on growth, biochemical composition and reproduction of the coot clam *Mulinia lateralis*. *Pac Sci* 43, 200.
- Münzinger, A., 1987. *Biomphalaria glabrata* (say), a suitable organism for a biotest. *Environmental Technology Lett* 8, 141-148.
- Nagel, R., 1998. Fish embryo toxicity test with the zebrafish *Danio rerio*. Initial consideration for a OECD Draft Guideline. In W. Heg e r, S. Jung, S. Martin et al. (eds.), , 80-93.
- Nakamura, M., Bhandari, R.K., Higa, M., 2003. The role estrogens play in sex differentiation and sex changes of fish. *Fish Physiology and Biochemistry* 28, 113-117.
- Nepomuceno, J.C., Ferrari, I., Spanó, M.A., Centeno, A.C., 1997. Detection of micronuclei in peripheral erythrocytes of *Cyprinus carpio* exposed to metallic mercury. *Environmental and Molecular Mutagenesis* 30, 293-297.
- Nyingi, D., De Vos, L., Aman, R., Agnèse, J.-F., 2009. Genetic characterization of an unknown and endangered native population of the Nile tilapia *Oreochromis niloticus* (Linnaeus, 1758) (Cichlidae; Teleostei) in the Loboï Swamp (Kenya). *Aquaculture* 297, 57-63.
- OECD, 2006. Fish Embryo Toxicity Test. Organization for Economic Co-Operation and Development.
- OECD/OCDE, 2009. OECD Guideline for the testing of chemicals.
- Oliveira-Filho, 2003. Efeito de substâncias químicas sobre a reprodução de molucos de água doce: Estudos com caramujos do gênero *Biomphalaria*. Tese de doutorado

- em Toxicologia e Saúde, Escola Nacional de Saúde Pública da Fundação Oswaldo Cruz., 138.
- Oliveira-Filho, E.C., Grisolia, C.K., Paumgartten, F.J.R., 2009a. Effects of endosulfan and ethanol on the reproduction of the snail *Biomphalaria tenagophila*: a multigeneration study. *Chemosphere* 75, 398-404.
- Oliveira-Filho, E.C., Grisolia, C.K., Paumgartten, F.J.R., 2009b. Trans-generation study of the effects of nonylphenol ethoxylate on the reproduction of the snail *Biomphalaria tenagophila*. *Ecotoxicology Environmental Safety* 72, 458-465.
- Oliveira Ribeiro, C.A., Schatzmann, M., Silva de Assis, H.C., Silva, P.H., Pelletier, E., Akaishi, F.M., 2002. Evaluation of Tributyltin Subchronic Effects in Tropical Freshwater Fish (*Astyanax bimaculatus*, Linnaeus, 1758). *Ecotoxicology and Environmental Safety* 51, 161-167.
- Olivier, L., Haskins, W.T., 1960. The effects of low concentrations of sodium pentachlorophenate on the fecundity and egg viability of *Australorbis Glabratus*. *Am J Trop Med Hyg* 9, 199-205.
- Olsen, T., Ellerbeck, L., Fisher, T., Callaghan, A., Crane, M., 2001. Variability in acetylcholinesterase and glutathione S-transferase activities in *Chironomus riparius meigen* deployed in situ at uncontaminated field sites. *Environ. Toxicol. Chem.* 20, 1725-1732.
- Örn, S., Holbech, H., Madsen, T.H., Norrgren, L., Petersen, G.I., 2003. Gonad development and vitellogenin production in zebrafish (*Danio rerio*) exposed to ethinylestradiol and methyltestosterone. *Aquatic Toxicology* 65, 397-411.
- Osman, A.G.M., McKkawy, I.A., Verreth, J., Kirschbaum, F., 2007. Effects of lead nitrate on the activity of metabolic enzymes during early developmental stages

- of the African catfish, *Clarias gariepinus* (Burchell, 1822). *Fish Physiology and biochemistry* 33, 1-13.
- Ostling, O., Johanson, K.J., 1984. Microelectrophoretic study of radiation-induced DNA damages in individual mammalian cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 123, 291-298.
- Pacheco, M., Santos, M.A., 2002. Biotransformation, genotoxic, and histopathological effects of environmental contaminants in European eel (*Anguilla anguilla* L.). *Ecotoxicology and Environmental Safety* 53, 331-347.
- Palhares, D., Grisolia, C.K., 2002. Comparison between the micronucleus frequencies of Kidney and gill erythrocytes in tilapia fish, following mitomycin C treatment. *Genetics and Molecular Biology* 25, 281-284.
- Pandian, T.J., Sheela, S.G., 1995. Hormonal induction of sex reversal in fish. *Aquaculture* 138, 1-22.
- Pandurangi, R., Petras, M., Ralph, S., Vrzoc, M., 1995. Alkaline single cell gel (comet) assay and genotoxicity monitoring using bullheads and carp. *Environment and Molecular Mutagenesis* 26, 345-346.
- Papoulias, D.M., Noltie, D.B., Tillitt, D.E., 2000. Effects of methyl testosterone exposure on sexual differentiation in medaka, *Oryzias latipes*. *Marine Environmental Research* 50, 181-184.
- Peebua, P., Kosiyachinda, P., Pokethitiyook, P., Kruatrachue, M., 2007. Evaluation of Alachlor Herbicide Impacts on Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus*) using Biochemical Biomarkers. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 78, 138-141.

- Petridis, P., Jha, A.N., Langston, W.J., 2009. Measurements of the genotoxic potential of (xeno-)oestrogens in the bivalve mollusc *Scrobicularia plana*, using the Comet assay. *Aquatic Toxicology* 94, 8-15.
- Phelps, R.P., Popma, T.J., 2000. Sex reversal of tilapia. *Tilapia Aquaculture in the Americas*, Vol. 2. , 34-59.
- Piferrer, F., 2001. Endocrine sex control strategies for the feminization of teleost fish. *Aquaculture* 197, 229-281.
- Porter, M.D., 1996. Effects of Methyltestosterone on Largemouth Bass, *Micropterus salmoides*. *Journal of Applied Aquaculture* 6, 39-45.
- Powers, D.A., 1989. Fish as model systems. *Science* 246, 352-358.
- Rabello-Gay, M.N., 1991. Teste de micronúcleo em medula óssea. In: *Mutagênese, Teratogênese e Carcinogênese: métodos e critérios de avaliação*. Sociedade Brasileira de Genética, 83- 90.
- Ramsdorf, W.A., Ferraro, M.V.M., Oliveira-Ribeiro, C.A., Costa, J.R.M., Cestari, M.M., 2009. Genotoxic evaluation of different doses of inorganic lead (PbII) in *Hoplias malabaricus*. *Environ Monit Assess.*
- Ramsdorf, W.A., Vicari, T., Almeida, M.I.M., Artoni, R.F., Cestari, M.M., 2012. Handling of *Astyanax* sp. for biomonitoring in Cangüiri Farm within a fountainhead (Iraí River Environment Preservation Area) through the use of genetic biomarkers
Environmental Monitoring Assessment 184.
- Ravera, O., 1977. Effects of heavy metals (cadmium, copper, chromium and lead) on a freshwater snail: *Biomphalaria glabrata* Say (Gastropoda, Prosobranchia). *Malacologia* 16, 231-236.

- Richold, M., 1988. The genotoxicity of trenbolone, a synthetic steroid. *Archives of Toxicology* 61, 249-258.
- Rivero, C., Barbosa, A., Ferreira, M., Dorea, J., Grisolia, C., 2008. Evaluation of genotoxicity and effects on reproduction of nonylphenol in *Oreochromis niloticus* (Pisces: cichlidae). *Ecotoxicology* 17, 732-737.
- Sastry, K.V., Rao, D.R., 1984. Effect of mercuric-chloride on some biochemical and physiological parameters of the fresh water murrel, *Channa punctatus*. *Environmental Research* 34, 343-350.
- Schmid, W., 1975. The micronucleus test. *Mutation Research* 31, 9-15.
- Seki, M., Yokota, H., Matsubara, H., Maeda, M., Tadokoro, H., Kobayashi, K., 2004. Fish full life-cycle testing for androgen methyltestosterone on medaka (*Oryzias latipes*). *Environmental Toxicology and Chemistry* 23, 774-781.
- Selzsam, B., Grote, K., Gericke, C., Niemann, L., Wittfoht, W., Chahoud, I., 2005. Effects of methyltestosterone on reproduction in the Japanese quail (*Coturnix coturnix japonica*). *Environmental Research* 99, 327-334.
- Serrano-García, L., Montero-Montoya, R., 2001. Micronuclei and chromatid buds are the result of related genotoxic events. *Environmental and Molecular Mutagenesis* 38, 38-45.
- Sharpe, R.L., MacLatchy, D.L., Courtenay, S.C., Van Der Kraak, G.J., 2004. Effects of a model androgen (methyl testosterone) and a model anti-androgen (cyproterone acetate) on reproductive endocrine endpoints in a short-term adult mummichog (*Fundulus heteroclitus*) bioassay. *Aquatic Toxicology* 67, 203-215.
- Shepherd, B.S., Ron, B., Burch, A., Sparks, R., Richman III, N.H., Shimoda, S.K., Stetson, M.H., Lim, C., Grau, E.G., 1997. Effects of salinity, dietary level of protein and 17 α -methyltestosterone on growth hormone (GH) and prolactin

- (tPRL177 and tPRL188) levels in the tilapia, *Oreochromis mossambicus*. *Fish Physiology and Biochemistry* 17: 279–288, 1997. 17, 279-288.
- Silva, C.A., Oliveira Ribeiro, C.A., Katsumiti, A., Araújo, M.L.P., Zandoná, E.M., Costa Silva, G.P., Maschio, J., Roche, H., Silva de Assis, H.C., 2009a. Evaluation of waterborne exposure to oil spill 5 years after an accident in Southern Brazil. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 72, 400-409.
- Silva, C.A.d., Oba, E., Ramsdorf, W.A., Magalhães, V.F., Cestari, M.M., Ribeiro, C.A.O., Assis, H.C.S.d., 2011a. First report about saxitoxins in freshwater fish *Hoplias malabaricus* through trophic exposure. *Toxicon* 57, 141-147.
- Silva, R.F.d., Cubas, J.J.M., Moraes, J.d., 2009b. Aspectos histológicos das gônadas hermafroditas de *Biomphalaria glabrata* e *Bradybaena similaris* (Mollusca, Gastropoda, Pulmonata). *Papeis Avulsos da Zoologia* 49, 459-466.
- Silva, R.R.P., Pires-Junior, O.R., Grisolia, C.K., 2010. Toxicity and genotoxicity in *Astyanax bimaculatus* (Characidae) induced by microcystins from a bloom of *Microcystis* spp. *Genetics and Molecular Biology* 33, 750-755.
- Silva, R.R.P., Pires, O.R., Grisolia, C.K., 2011b. Genotoxicity in *Oreochromis niloticus* (Cichlidae) induced by *Microcystis* spp bloom extract containing microcystins. *Toxicon* 58, 259-264.
- Simone, D.A., 1990. The Effects of the Synthetic Steroid 17-Alpha-Methyltestosterone on the Growth and Organ Morphology of the Channel Catfish (*Ictalurus punctatus*). *Aquaculture* 84, 81-93.
- Simoniello, M., Gigena, F., Poletta, G., Loteste, A., Kleinsorge, E., Campana, M., Scagnetti, J., Parma, M., 2009. Alkaline Comet Assay for Genotoxic Effect Detection in Neotropical Fish <i>Prochilodus lineatus</i> (Pisces,

- Curimatidae). *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 83, 155-158.
- Singh, N.P., McCoy, M.T., Tice, R.R., Schneider, E.L., 1988. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Experimental Cell Research* 175, 184-191.
- Singh, P.B., Singh, V., 2008. Cypermethrin induced histological changes in gonadotrophic cells, liver, gonads, plasma levels of estradiol-17B and 11-ketotestosterone, and sperm motility in *Heteropneustes fossilis* (Bloch). *Chemosphere* 72, 422-431.
- Smith, R.J.F., 1974. Effects of 17 alpha methyltestosterone on the dorsal pad and tubercles of fathead minnows (*Pimephales promelas*). *Canadian Journal of Zoology* 52, 1031-1038.
- Soe, K.L., Soe, M., Glud, C., 1992. Liver pathology associated with the use of anabolic-androgenic steroids. *Liver* 12, 73-79.
- Solé, M., Porte, C., Barceló, D., 2001. Analysis of the estrogenic activity of sewage treatment works and receiving waters using vitellogenin induction in fish as a biomarker. *TrAC Trends in Analytical Chemistry* 20, 518-525.
- Souza, T.d.S., Fontanetti, C.S., 2006. Micronucleus test and observation of nuclear alterations in erythrocytes of Nile tilapia exposed to waters affected by refinery effluent. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis* 605, 87-93.
- Stanton, M.G., 1968. Colorimetric determination of inorganic phosphate in the presence of biological material and adenosine triphosphate. *Analytical Biochemistry* 22, 27-34.

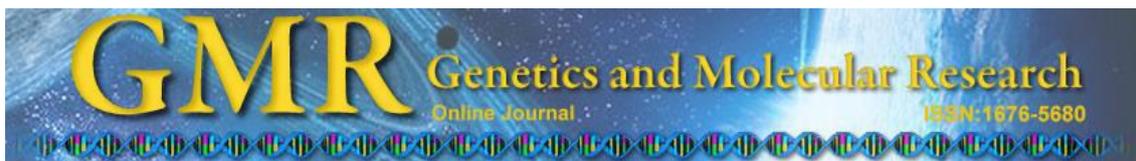
- Stebbing, A.R.D., 1982. Hormesis—the stimulation of growth by low levels of inhibitors. *Science of The Total Environment* 22, 213-234.
- Strüssmann, C., Nakamura, M., 2002. Morphology, endocrinology, and environmental modulation of gonadal sex differentiation in teleost fishes. *Fish Physiology and Biochemistry* 26, 13-29.
- Sumpter, J.P., 1997. Environmental control of fish reproduction: a different perspective. *Fish Physiology and Biochemistry* 17, 25-31.
- Sumpter, J.P., Jobling, S., 1995. Vitellogenesis as a biomarker for estrogenic contamination of the aquatic environment. *Environmental Health Perspectives* 103, 173 - 178.
- Terra, N.R., Feiden, I.R., Moreira, J.d.S., Nunes, E.A., 2006. Inibição reprodutiva em *Daphnia magna* Straus, 1820, expostas a amostras de sedimento de uma área sob impacto de indústria petroquímica. *Acta Limnologica Brasiliensia* 18, 229-237.
- Thomas, K.V., Hurst, M.R., Matthiessen, P., McHugh, M., Smith, A., Waldock, M.J., 2002. An assessment of in vitro androgenic activity and the identification of environmental androgens in United Kingdom estuaries. *Environmental Toxicology and Chemistry* 21, 1456-1461.
- Toguyeni, A., Fauconneau, B., Boujard, T., Fostier, A., Kuhn, E.R., Mol, K.A., Baroiller, J.F., 1997. Feeding Behaviour and Food Utilisation in *Tilapia*, *Oreochromis niloticus*: Effect of Sex Ratio and Relationship with the Endocrine Status. *Physiology & Behavior* 62, 273-279.
- Torres de Lemos, C., Erdtmann, B., 2000. Cytogenetic evaluation of aquatic genotoxicity in human cultured lymphocytes. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis* 467, 1-9.

- Tsutsui, T., Tamura, Y., Hagiwara, M., Miyachi, T., Hikiba, H., Kubo, C., Barrett, J.C., 2000. Induction of mammalian cell transformation and genotoxicity by 2-methoxyestradiol, an endogenous metabolite of estrogen. *Carcinogenesis* 21, 735-740.
- Turner, G.F., Robinson, R.L., 2000. Reproductive biology, mating systems and parental care. In: Beveridge, M.C.M.; McAndrew, B.J. (Eds.) *Tilapias: biology and exploitation*. London: Kluwer Academic Publishers, p.33-58.
- Tyler, C.R., van Aerle, R., Hutchinson, T.H., Maddix, S., Trip, H., 1999. An in vivo testing system for endocrine disruptors in fish early life stages using induction of vitellogenin. *Environmental Toxicology and Chemistry* 18, 337-347.
- Van Der Mude, A., 2011. Endocrine-disrupting chemicals: testing to protect future generations. *Boston College Environmental Affairs Law Review* 38, 509-535.
- Vanzella, T.P., Martinez, C.B.R., Cólus, I.M.S., 2007. Genotoxic and mutagenic effects of diesel oil water soluble fraction on a neotropical fish species. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis* 631, 36-43.
- Vargas, V.M.F., Motta, V.E.P., Henriques, J.A.P., 1993. Mutagenic activity detected by the Ames test in river water under the influence of petrochemical industries. *Mutation Research/Genetic Toxicology* 319, 31-45.
- Vassault, A., 1983a. Lactate Dehydrogenase. In: Bergmeyer, H.O. (Ed.), *Methods of Enzymatic Analysis, Enzymes: oxidoreductases transferases*. Academic Press, New York, pp. 118-126.
- Vassault, A., 1983b. Lactate Dehydrogenase. In: Bergmeyer HO (ed) *Methods of enzymatic analysis, enzymes: oxyreductases transferases*. Academic, New York, 118-126.

- Vicari , T., Ferraro , M.V.M., Ramsdorf , W.A., Mela, M., Ribeiro, C.A.d.O., Cestari , M.M., 2012. Genotoxic evaluation of different doses of methylmercury (CH₃Hg⁺) in *Hoplias malabaricus*. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 82, 47-55.
- Vick, A.M., Hayton, W.L., 2001. Methyltestosterone pharmacokinetics and oral bioavailability in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquatic Toxicology* 52, 177-188.
- Vieira, L.R., Sousa, A., Frasco, M.F., Lima, I., Morgado, F., Guilhermino, L., 2008. Acute effects of Benzo[a]pyrene, anthracene and a fuel oil on biomarkers of the common goby *Pomatoschistus microps* (Teleostei, Gobiidae). *The Science of the Total Environment* 395, 87-100.
- Viganò, L., Camoirano, A., Izzotti, A., D'Agostini, F., Polesello, S., Francisci, C., De Flora, S., 2002. Mutagenicity of sediments along the Po River and genotoxicity biomarkers in fish from polluted areas. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis* 515, 125-134.
- Vilela, C., Hayashi, C., 2001. Desenvolvimento de juvenis de lambari *Astyanax bimaculatus* (Linnaeus, 1758), sob diferentes densidades de estocagem em tanques-rede. *Acta Scientiarum* 23, 491-496.
- Vogt, G., 2007. Exposure of the eggs to 17[alpha]-methyl testosterone reduced hatching success and growth and elicited teratogenic effects in postembryonic life stages of crayfish. *Aquatic Toxicology* 85, 291-296.
- Zerulla, M., Länge, R., Steger-Hartmann, T., Panter, G., Hutchinson, T., Dietrich, D.R., 2002. Morphological sex reversal upon short-term exposure to endocrine modulators in juvenile fathead minnow (*Pimephales promelas*). *Toxicology Letters* 131, 51-63.

9. ANEXOS

9.1. Aceites dos artigos científicos



Ribeirão Preto, 11 de abril de 2013.

Prezados Autores,

Informamos que o artigo **“Effects of 17 α -methyltestosterone on the reproduction of the freshwater snail *Biomphalaria glabrata*”, GMR 2833**, de autoria **Carla Letícia Gediel Rivero-Wendt, Alessa Cavalcante Borges, Eduardo Cyrino Oliveira-Filho, Ana Luisa Miranda-Vilela, Maria Fernanda Nince Ferreira, Cesar Koppe Grisolia** foi aceito para publicação na *Genetics and Molecular Research (GMR)*.

Aproveitamos a oportunidade para informar que a GMR está indexada em 74 bases de dados, entre elas: Index Medicus, PubMed, Medline e ISI. E tem fator de impacto 1,184, segundo JCR - junho 2012.

Atenciosamente,



Francine Muniz
Coordenadora editorial (Mtb 44.300)
Genetics and Molecular Research
www.funpecrp.com.br/gmr
Tel. (16) 3620-1251 – Fax. (16) 3621-1991



Ribeirão Preto, 11 de Janeiro de 2013.

Prezados Autores,

Informamos que o artigo “**Cytogenetic toxicity and gonadal effects of 17 α -methyltestosterone in *Astyanax bimaculatus* (Characidae) and *Oreochromis niloticus* (Cichlidae)**”, GMR 2544, de autoria **Carla Letícia Gediel Rivero-Wendt, Ana Luisa Miranda-Vilela, Maria Fernanda Nince Ferreira, Adalmyr Moraes Borges, Cesar Koppe Grisolia**, foi aceito para publicação na *Genetics and Molecular Research (GMR)*.

Aproveitamos a oportunidade para informar que a GMR está indexada em 74 bases de dados, entre elas: Index Medicus, PubMed, Medline e ISI. E tem fator de impacto 1,184, segundo JCR - junho 2012.

Atenciosamente,

A handwritten signature in blue ink, appearing to read 'Francine Muniz', is positioned above the printed name.

Francine Muniz
Coordenadora editorial (Mtb 44.300)
Genetics and Molecular Research
www.funpecrp.com.br/gmr
Tel. (16) 3620-1251 - Fax. (16) 3621-1991

9.2. Artigos científicos aceitos

Effects of 17 α -methyltestosterone on the reproduction of the freshwater snail *Biomphalaria glabrata*

Carla Letícia Gediel Rivero-Wendt¹, Alessa Cavalcante Borges¹ Eduardo Cyrino Oliveira-Filho², Ana Luisa Miranda-Vilela¹, Maria Fernanda Nince Ferreira¹, Cesar Koppe Grisolia¹

¹*Department of Genetics and Morphology, Institute of Biological Sciences, University of Brasília, Brasilia, Brazil*

²*Laboratory of Ecotoxicology, Embrapa Cerrados, Rod. BR020, Km 18, Planaltina DF 73310-970, Brazil.*

Running title: Methyltestosterone effects on reproduction of *Biomphalaria glabrata*

*Corresponding author: Eduardo Cyrino Oliveira-Filho

Laboratory of Ecotoxicology, Embrapa Cerrados, Rod. BR020, Km 18, Planaltina, DF, 73310-970, Brazil. Tel: 55 61 3388-9894/9857; Fax: 55 61 3388-9879

E-mail: cyrino@cpac.embrapa.br

Abstract

17- α -methyltestosterone (MT) is a synthetic hormone used in fish-farming to induce male monosex. Few studies have been performed to assess its possible reproductive effects on invertebrates. Snails have been recommended as promising candidates for test model to assess endocrine active chemicals. *Biomphalaria glabrata* is a gastropod mollusk, easily maintained in aquaria, which allows it to be used as an accessible tool for contamination bioassays. This study evaluated the reproductive effects of MT on *B. glabrata* through reproductive performance and histological analyses. *B. glabrata* showed marked metabolic responses when exposed to MT, affecting its reproduction. Ten snails per group were exposed for 4 weeks (chronic laboratory bioassays) to different concentrations of methyltestosterone (0.01, 0.1 and 1.0 mg/L). Evaluations of the total number of laid eggs (TNLE), egg mass per group, size of type V oocytes and production of spermatozooids were carried out. At lowest exposure level of 0.01 mg/L MT caused a statistically significant increase in the number of egg-masses per snail as compared to those numbers recorded for unexposed controls. Histopathology analyses showed an increase in the sperm production at highest MT exposures of 0.1 and 1.0 mg/L. The solvent ethanol did not cause toxicity during the exposure treatment, but the stimulation of egg-mass and sperm production observed in the ethanol control group, as well as in the sperm production at highest MT exposures, can be related to a carrier effect of the solvent, facilitating the entry of MT into snail cells. These results suggest that ethanol should be considered as an effective agent in the reproductive performance of *B. glabrata*, and also highlight the importance of this study to give more support to the regulatory authorities concerning the discharge of wastewater from fish-farms in aquatic ecosystems.

Keywords: 17- α -methyltestosterone; endocrine disruptor; *Biomphalaria glabrata*; reproductive performance; histopathology

1. Introduction

Xenobiotics in the environment have been shown to induce adverse effects on animals and humans by interfering with their endocrine functions with different modes of action, such as increased frequencies of sex-hormone dependent cancers (breast, testis, prostate, etc.), genital abnormalities, premature puberty in females, and increased occurrence of endometriosis in humans (Gist, 1998; Swan, 2000).

The androgenic effects of environmental endocrine disruptor chemicals (EDC) on aquatic organisms have received increased attention, since they are the target of chemicals that induce sexual reversion (Papoulias *et al.*, 2000). One such, 17- α methyltestosterone (MT), is a synthetic hormone used in fish-farming to induce anabolic and androgenic effects (Vick and Hayton, 2001), such as sexual reversion in cultivated fish species. So, there is a concern about and resistance to the use of these hormones in food production and more efforts should be made to know how androgenic chemicals used in aquaculture can adversely affect wildlife. The synthetic androgen MT is widely used as a reference chemical to induce male monosex, and it is considered as an endocrine disrupter to fish (Smith, 1974; Pandian and Sheela, 1995; Ankley *et al.*, 2001; Zerulla *et al.*, 2002; Arslan and Phelps, 2004; Hornung *et al.*, 2004; Pawlowski *et al.*, 2004; Kang *et al.*, 2008; Grisolia *et al.*, 2009).

In aquatic environments, invertebrates constitute more than 90% of the present species (Jha, 1998) and gastropod mollusks seem to be a reliable invertebrate model for such evaluations, allowing analysis of successive stages of their life-cycle for ecological assessment of chemicals (Gourmelon and Ahtiainen, 2007). Mollusks are effective

sentinels because they are ubiquitous, have highly conserved regulatory pathways and are sensitive to anthropogenic inputs (Gupta and Singh, 2011).

Furthermore, responses to androgens comprised the development of imposex (occurrence of induced male sex characteristics superimposed on normal female gastropods) and the reduction of fertility or embryo production in the freshwater mudsnail *Potamopyrgus antipodarum*, the freshwater ramshorn snail *Marisa cornuarietis*, and the marine netted whelk *Nassarius reticulatus* (Duft *et al.*, 2007). Disturbances in their metabolism, development and reproduction are of concern for the preservation of biodiversity of ecosystems. In fact, the reproduction of aquatic organisms is one of the end-points currently employed to evaluate the effect of toxicants (Cheung and Lam, 1998; Gomot, 1998; Coeurdassier *et al.*, 2003; Cervera *et al.*, 2004; Coeurdassier *et al.*, 2004; Coeurdassier *et al.*, 2005). The use of mollusks as test organisms is becoming widespread, since they are able to accumulate contaminants and facilitate their detection, even when only minute amounts of trace contaminants are present (Moriarty, 1990; Cooney, 1995)). However, few studies have been performed assessing the possible effect of MT on invertebrates like the snail *Biomphalaria glabrata* or on any aspect of their reproduction. Freshwater mollusks of the genus *Biomphalaria* can be considered good indicators for biomonitoring studies (Münzinger, 1987; Abd-Allah *et al.*, 1999; Nakano *et al.*, 2003; Ansaldo *et al.*, 2006).

The present work was designed to test the hypothesis that commercial MT may impact on crucial stages of the reproductive cycle of *B. glabrata* *i.e.* number of eggs, egg mass, maturation of oocytes and spermatozoid production. The adult organisms were maintained for 4 weeks in water containing MT, to assess the possible side-effects on reproduction. The gonadal effects and interference on reproductive maturity were

carried out through morphometric analysis performed by optical microscopy, for type V oocytes and quantification of spermatozoa.

2. Materials and Methods

2.1. Test organism

Biomphalaria glabrata (Mollusca; Gastropoda) is a tropical freshwater pulmonate snail found in Brazilian water bodies. It is a simultaneous hermaphrodite and can breed by self- and cross-fertilization. At 25°C, egg-laying generally starts when snails are about two months old, and eggs hatch between the sixth and ninth day after oviposition (Paraense, 1972). *Biomphalaria* snails are easily bred and kept under laboratory conditions and many authors have suggested that these mollusks could be suitable organisms for evaluation of reproductive toxicity and harmful effects of endocrine disruptors (Oliveira-Filho *et al.*, 2009b, a) on aquatic biota. All snails used in this study come from the breeding stock of *B. glabrata* maintained at the Laboratory of Ecotoxicology of Embrapa Cerrados.

2.2. Test medium, test substances and nominal concentrations

All snails were kept in synthetic softwater (pH 7.2 ± 0.1 , hardness 40-48 mg/L as CaCO₃) prepared as recommended by guidelines of the Brazilian Association for Technical Standardization (ABNT, 2004). The hormone 17 α -methyltestosterone (MT; 90% purity) was purchased from Bioativa pharmacy (Paraná, Brazil). The nominal concentrations were prepared from a stock solution (23 mg/L), prepared by dissolving MT in absolute ethanol (density 0.790 - 0.793 g/cm³ (20 °C); 99.9% purity from Merck). MT was added in absolute ethanol (0.005 ml) to reach a concentration of 0.001% of ethanol in water.

2.3. Experimental design

This study evaluated the effects of 17 α -methyltestosterone (MT) on the fecundity of mature *B. glabrata*. Three-month-old snails were individually exposed (10 snails per concentration) in glass vessels of 300 mL and kept under controlled environmental conditions (25 \pm 1°C and light/dark cycle 16/8 h). The test solutions were renewed twice a week and snails were fed with fresh lettuce leaves grown without using pesticides (a piece of approximately 1 cm²) plus 1 mg of a small flake of commercial fish chow. Snails (N=10 per group) were exposed to water containing MT, according to the following treatments: (1) synthetic softwater (negative control); (2) MT at 0.01 mg/L; (3) MT at 0.1 mg/L; (4) MT at 1 mg/L. To recover egg-masses laid by snails, glasses were internally covered with cellophane sheets as proposed by (Olivier and Haskins, 1960) and adapted by Oliveira-Filho et al. (2009a, 2009b). Cellophane sheets were changed twice a week and numbers of eggs and egg masses per snail were recorded. Egg and egg mass production of snails were evaluated for four consecutive weeks, a time considered by Oliveira-Filho et al. (2009a, 2009b) as enough for the observation of reproductive effects.

After exposure, 50 snails were anesthetized with lidocaine gel, without removal of organs, and fixed with Davidson solution for 24 h, transferred to 70% ethanol, embedded in paraffin using a automatic tissue processor (OMA[®] DM-40, São Paulo, Brazil), cut to thickness of 5 μ m in a Leica RM2235 manual microtome (Leica Microsystems, Nussloch, Germany) and stained with hematoxylin-eosin for histological analyses (light microscopy). Oocytes were classified into five stages according to maturation scale (Wallace and Selman, 1981). Morphometric analyses were performed with the software Image-pro Plus 5.1, where 30 oocytes at stage V (mature oocytes) of

each treatment were analyzed for the accomplishment of the comparative analysis of the diameter of the oocytes (Homklin *et al.*, 2011). For males, quantification of sperm was done by the same program.

Photomicrography from the slides of controls and those snails exposed to the hormone were analyzed at magnification of 400X. After this, 10 (ten) seminiferous tubules from the end portion of gonads were selected to calculate the area and estimate whether the hormone stimulated or inhibited the growth of the reproductive system.

2.4. Statistical Analysis

Differences in the number of eggs and egg-masses produced between tested groups and control group were evaluated by one-way ANOVA followed by Dunnett's multiple comparison test (Dunnett, 1955). Dunnett procedure software (Version 1.5) is available from the United States Environmental Protection Agency. Oocytes and spermatozooids analyses were tested by GraphPad Prim 5.0 software, and possible differences between the groups were investigated by ANOVA or Kruskal-Wallis test (when the data were not normally distributed), followed, respectively, by the Bonferroni or the Mann-Whitney U tests to carry out 2-to-2 comparisons.

3. Results

3.1. Reproductive performance

The effects of 4-week exposure to MT on the fecundity of *B. glabrata* are shown in Figures 1A and 1B. Exposure to MT in all tested concentrations did not cause significant difference in the number of eggs produced per snail, after four weeks, compared with the unexposed control group or with the ethanol group. On the other hand, at the lowest tested-concentration of 0.01 mg/L, MT caused a statistically significant ($p < 0.05$) increase in the number of egg-masses per snail (Mean \pm SE; 26.9

± 1.5 egg-masses per snail) as compared to those numbers recorded for water control (20.1 ± 2.6 egg-masses per snail) and for ethanol control (17.0 ± 1.6 egg-masses per snail). The solvent ethanol did not cause toxicity in *B. glabrata* during the exposure treatment, without deaths in either group.

3.2. Histology and morphometric analysis of mature oocytes and sperm

Histopathological changes were already observed at exposure-concentration of 0.01 mg/L, which means early degeneration of the basal membrane (BM) surrounding the acino (A) in addition to regression and detachment of germ cells (GC) (Figure 2). At the exposure level of 0.1 mg/L, such alterations were persistent, releasing germ cells and causing formation of a lumen (LM), which could be noted due to damaged connective tissue and by compression causing a process of metaplasia, fusing the basal membrane with the acino. The morphology of oocytes was changed in the same irregular process that causes atresia. At the level of 1.0 mg/L, disruption of BM surrounding the acino was observed. The 17 α -methyltestosterone stimulated a large production of sperm, which maintained the production of oocytes at normal level.

Table 1 shows that the mean areas of the mature oocytes were not statistically different from the control group. In the sperm areas, the morphometric analyses showed a significant increase in sperm production at the highest concentrations of 0.1 and 1.0 mg/L, compared with both control groups.

4. Discussion

Sexually mature *L. stagnalis* were exposed to methyltestosterone for 8 weeks. It did not affect the fecundity evaluated through the number of egg masses, but at the highest tested concentration of 100 ng/L, MT exposure caused very low histological

damage in the albumen and prostate glands (Czech *et al.*, 2001). *Mulinia lateralis* exposed to MT caused an increased male/female ratio (Moss, 1989). Our results showed that MT did not cause severe adverse effects on the invertebrate *B. glabrata*; however, it affected reproductive performance, especially at the lowest concentration level of 0.01mg/L, decreasing egg-mass production. The observed effects on adult organisms could be interpreted as a hormetic response, i.e. an increased effect on reproductive performance at low exposure-concentration, related to the induction of stress-resistance process caused by a compensating mechanism such as a repair (Stebbing, 1982; Calabrese and Baldwin, 2003b). Recent studies have shown that hormetic responses are relatively common in toxicology (Calabrese and Baldwin, 2003a) and ecotoxicology (Cedergreen *et al.*, 2005) and can be seen as an evolutionary adaptation (Forbes, 2000). Studies reporting endocrine effects of cypermethrin on invertebrates have supported such hypotheses (Moore and Waring, 2001; Singh and Singh, 2008). The stress-induced alteration of endocrine regulation of foraging/feeding behavior caused by insecticide exposure can have strong repercussions on aquatic invertebrate populations and needs further attention in ecotoxicology.

The ethanol used did not exceed 0.001% in the water, as recommended by Smith (1974). Ethanol used as a solvent in such reproductive assays on invertebrates can elicit controversy, because some authors report that at the concentration of 100 µl/L there is no interference in reproduction of invertebrate species, while others consider that the maximum concentration of ethanol should not exceed 20 µl. It was observed that MT associated with ethanol could have stimulated sperm production when compared with unexposed organisms. Results of solvent control group showed that *B. glabrata* exposed at the concentration level of 0.001% of ethanol could have influenced reproductive performance, stimulating the egg-masses at the lowest concentration of 0.01mg/L and

increasing sperm production at higher concentrations of 0.1mg/L and 1.0 mg/L compared to unexposed animals. In our previous study with *B. tenagophila*, ethanol was tested at concentrations of 19.8, 198.0 and 1980.0 mg/L (or 0.0025%, 0.025% and 0.25% v/v). This resulted in a reduction of fecundity in F0 and F1 at levels ≥ 198.0 mg/L and drastically reduced the proportion of hatching among F2 embryos (Oliveira-Filho *et al.*, 2009a). (Hana *et al.*, 2008), diluted testosterone propionate at 0.83 g and 0.89 g per 30 mL of ethanol to carry out genotoxic and reproductive assays on mice. The authors did not refer to any kind of ethanol interference in their observed results. (Janer *et al.*, 2006) tested effects of testosterone on reproduction of freshwater ramshorn snail *Marisa cornuarietis*. Testosterone was added in absolute ethanol at a final concentration in water of 0.001% and snails were exposed for 50, 100 and 150 days. The authors did not mention any interference of ethanol in the observed results. However, according to our results, ethanol should be considered as an effective agent in the reproductive performance of *B. glabrata*. The stimulation of egg-mass production and sperm production observed in the ethanol control group, as well as at the highest concentrations of 0.1mg/L and 1.0 mg/L, can be related to a carrier effect of the solvent, facilitating the entry of MT into snail cells. On fish farms, MT is commonly used dissolved in ethanol. In terms of environmental risk evaluation we might consider that MT used to feed fish larvae on fish farms could also contain residues of ethanol, so by using ethanol we have tested what is really going to the field.

5. Conclusion

In this study, MT affected the reproductive performance of *Biomphalaria glabrata*, a non-target species. Exposure to MT did not alter oocyte maturation, but it influenced sperm production, number of eggs and number of egg-masses. The solvent

ethanol did not cause toxicity during the exposure treatment, but the stimulation of egg-mass and sperm production observed in the ethanol control group, as well as in the sperm production at highest MT exposures, can be related to a carrier effect of the solvent, facilitating the entry of MT into snail cells. These results suggest that ethanol should be considered as an effective agent in the reproductive performance of *B. glabrata*, and also highlight the importance of this study to give more support to the regulatory authorities concerning the discharge of wastewater from fish-farms in aquatic ecosystems.

6. Acknowledgements

Research supported by the Ministry of Fisheries grant 578541/2008-4, the Brazilian National Council for Technological and Scientific Development (CNPq) and the Brazilian Enterprise for Agricultural Research (EMBRAPA).

References

- Abd-Allah, A.T., Thompson, S.N., Borchardt, D.B., Wanas, M.Q.A., 1999. *Biomphalaria glabrata*: a laboratory model illustrating the potential of pulmonate gastropods as freshwater biomonitoring of heavy metal pollutants. *Malacologia* 41, 345-353.
- ABNT, 2004. *Ecotoxicologia aquática - toxicidade aguda - método de ensaio com Daphnia spp (Cladocera, Crustacea)*. Associação Brasileira de Normas Técnicas. NBR 12713.

- Ankley, G.T., Jensen, K.M., Kahl, M.D., Korte, J.J., Makynen, E.A., 2001. Description and evaluation of a short-term reproduction test with the fathead minnow (*Pimephales promelas*). *Environ. Toxicol. Chem.* 20, 1276-1290.
- Ansaldo, M., Nahabedian, D.E., Holmes-Brown, E., Agote, M., Ansay, C.V., Verrengia Guerrero, N.R., Wider, E.A., 2006. Potential use of glycogen level as biomarker of chemical stress in *Biomphalaria glabrata*. *Toxicology* 224, 119-217.
- Arslan, T., Phelps, R.P., 2004. Production of monosex male black crappie, *Pomoxis nigromaculatus*, populations by multiple androgen immersion. *Aquaculture* 234, 561-573.
- Calabrese, E.J., Baldwin, L.A., 2003a. The hormetic dose-response model is more common than the threshold model in toxicology. *Toxicol. Sci.* 71, 246-250.
- Calabrese, E.J., Baldwin, L.A., 2003b. Toxicology rethinks its central belief. *Nature* 421, 691-692.
- Cedergreen, N., Spliid, N.H., Streibig, J.C., 2005. Improved empirical models describing hormesis. *Environ. Toxicol. Chem.* 24, 3166-3172.
- Cervera, A., Maymó, A.C., Sendra, M., Martínez-Pardo, R., Garcerá, M.D., 2004. Cadmium effects on development and reproduction of *Oncopeltus fasciatus* (Hemiptera: Lygaeidae). *J. Insect Physiol.* 50, 737-749.
- Cheung, C.C.C., Lam, P.K.S., 1998. Effect of cadmium on the embryos and juveniles of a tropical freshwater snail *Physa acuta* (Draparnaud, 1805). *Water Sci. Technol.* 38, 263-270.
- Coourdassier, M., Vaufleury, A., Badot, P.M., 2003. Bioconcentration of cadmium and toxic effect on life-history traits of pond snails (*Lymnaea palustris* and *Lymnaea stagnalis*) in laboratory bioassays. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 45, 102-109.

- Coeurdassier, M., Vaufleury, A., Crini, N., Scheifler, R., Badot, P.M., 2005. Assessment of whole effluent toxicity on aquatic snails: bioaccumulation of Cr, Zn and Fe and individual effects in bioassays. *Environ. Toxicol. Chem.* 24, 198-204.
- Coeurdassier, M., Vaufleury, A., Scheifler, R., Morhain, E., Badot, P.M., 2004. Effects of cadmium on the survival of three life-stages of the freshwater pulmonate *Lymnaea stagnalis* (Mollusca, Gastropoda). *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 72, 1083-1090.
- Cooney, J.D., 1995. In: Rand GM, editor. *Freshwater tests in Fundamentals of Aquatic Toxicology*. Washington, DC: Taylor & Francis, 91-138.
- Czech, P., Weber, K., Dietrich, D.R., 2001. Effects of modulating substances on reproduction in the hermaphroditic snail *Lymnaea stagnalis*. *Aquat. Toxicol.* 53, 103-114.
- Duft, M., Schmitt, C., Bachmann, J., Brandelik, C., Schulte-Oehlmann, U., Oehlmann, J.r., 2007. Prosobranch snails as test organisms for the assessment of endocrine active chemicals – an overview and a guideline proposal for a reproduction test with the freshwater mudsnail *Potamopyrgus antipodarum*. *Ecotoxicol.* 16, 169-182.
- Dunnett, C.W., 1955. Multiple comparison procedure for comparing several treatments with a control. *J. Am. Stat. Assoc.* 50, 1096-1121.
- Elder, J. F., Collins, J. J., 1991. Freshwater molluscs as indicators of bioavailability and toxicity of metals in surface-water systems. *Rev. Environ. Contam. Toxicol.* 122, 37-79.
- Forbes, V.E., 2000. Is hormesis an evolutionary expectation? *Function Ecology* 14, 12-24.
- Gist, G.L., 1998. National Environmental Health Association Position on Endocrine Disrupters. *J. Environ. Health* 60, 21.

- Gomot, A., 1998. Toxic effects of cadmium on reproduction, development, and hatching in the freshwater snail *Lymnaea stagnalis* for water quality monitoring. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 41B, 288-297.
- Gourmelon, A., Ahtiainen, J., 2007. Developing test guidelines on invertebrate development and reproduction for the assessment of chemicals, including potential endocrine active substances. The OECD perspective. *Ecotoxicol.* 16, 161-167.
- Grisolia, C.K., Rivero, C.L.G., Starling, F.L.R.M., Silva, I.C.R.d., Barbosa, A.C., Dorea, J.G., 2009. Profile of micronucleus frequencies and DNA damage in different species of fish in a eutrophic tropical lake. *Genet. Mol. Biol.* 32, 138-143.
- Hana, H.Y., Khalil, W.K.B., Elmakawy, A.I., Elmegeed, G.A., 2008. Androgenic profile and genotoxicity evaluation of testosterone propionate and novel synthesized heterocyclic steroids. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 110, 284-294.
- Homklin, S., Ong, S.K., Limpiyakorn, T., 2011. Biotransformation of 17[alpha]-methyltestosterone in sediment under different electron acceptor conditions. *Chemosphere* 82, 1401-1407.
- Hornung, M.W., Jensen, K.M., Korte, J.J., Kahl, M.D., Durhan, E.J., Denny, J.S., Henry, T.R., Ankley, G.T., 2004. Mechanistic basis for estrogenic effects in fathead minnow (*Pimephales promelas*) following exposure to the androgen 17[alpha]-methyltestosterone: conversion of 17[alpha]-methyltestosterone to 17[alpha]-methylestradiol. *Aquat. Toxicol.* 66, 15-23.
- Janer, G., Lyssimachou, A., Bachmann, J., Oehlmann, J., Schulte-Oehlmann, U., Porte, C., 2006. Sexual dimorphism in esterified steroid levels in the gastropod *Marisa cornuarietis*: The effect of xenoandrogenic compounds. *Steroids* 71, 435-444.
- Jha, A.N., 1998. Use of aquatic invertebrates in genotoxicological studies. *Mutat. Res.* 399, 1-2.

- Kang, I.J., Yokota, H., Oshima, Y., Tsuruda, Y., Shimasaki, Y., Honjo, T., 2008. The effects of methyltestosterone on the sexual development and reproduction of adult medaka (*Oryzias latipes*). *Aquat. Toxicol.* 87, 37-46.
- Moore, A., Waring, C.P., 2001. The effects of a synthetic pyrethroid pesticide on some aspects of reproduction in Atlantic Salmon (*Salmo salar* L.). *Aquat. Toxicol.* 52, 1-12.
- Moss, S.M., 1989. Effects of exogenous androgens on growth, biochemical composition and reproduction of the coot clam *Mulinia lateralis*. *Pac. Sci.* 43, 200.
- Münzinger, A., 1987. *Biomphalaria glabrata* (say), a suitable organism for a biotest. *Environ. Technol. Lett.* 8, 141-148.
- Nakano, E., Watanabe, L.C., Pires Ohlweiler, F., de Bragança Pereira, C.A., Kawano, T., 2003. Establishment of the dominant lethal test in the fresh water mollusk *Biomphalaria glabrata* (Say, 1818). *Mutat. Res.* 536, 145-154.
- Oliveira-Filho, E.C., Grisolia, C.K., Paumgarten, F.J.R., 2009a. Effects of endosulfan and ethanol on the reproduction of the snail *Biomphalaria tenagophila*: a multigeneration study. *Chemosphere* 75, 398-404.
- Oliveira-Filho, E.C., Grisolia, C.K., Paumgarten, F.J.R., 2009b. Trans-generation study of the effects of nonylphenol ethoxylate on the reproduction of the snail *Biomphalaria tenagophila*. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 72, 458-465.
- Olivier, L., Haskins, W.T., 1960. The effects of low concentrations of sodium pentachlorophenate on the fecundity and egg viability of *Australorbis Glabratus*. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 9, 199-205.
- Pandian, T.J., Sheela, S.G., 1995. Hormonal induction of sex reversal in fish. *Aquaculture* 138, 1-22.

- Papoulias, D.M., Noltie, D.B., Tillitt, D.E., 2000. Effects of methyl testosterone exposure on sexual differentiation in medaka, *Oryzias latipes*. *Marine Environ. Res.* 50, 181-184.
- Paraense, W.L., 1972. Fauna planorbídica do Brasil In: Lacaz, C.S., Baruzzi, R.G., Siqueira, J.W. (Eds.). *Introdução à geografia médica do Brasil*. Edgar Blucher, São Paulo, 213-239.
- Pawlowski, S., Sauer, A., Shears, J.A., Tyler, C.R., Braunbeck, T., 2004. Androgenic and estrogenic effects of the synthetic androgen 17[alpha]-methyltestosterone on sexual development and reproductive performance in the fathead minnow (*Pimephales promelas*) determined using the gonadal recrudescence assay. *Aquat. Toxicol.* 68, 277-291.
- Singh, P.B., Singh, V., 2008. Cypermethrin induced histological changes in gonadotrophic cells, liver, gonads, plasma levels of estradiol-17B and 11-ketotestosterone, and sperm motility in *Heteropneustes fossilis* (Bloch). *Chemosphere* 72, 422-431.
- Smith, R.J.F., 1974. Effects of 17 alpha methyltestosterone on the dorsal pad and tubercles of fathead minnows (*Pimephales promelas*). *Can. J. Zool.* 52, 1031-1038.
- Stebbing, A.R.D., 1982. Hormesis—the stimulation of growth by low levels of inhibitors. *Sci. Total Environ.* 22, 213-234.
- Swan, S.H., 2000. The Question of Declining Sperm Density Revisited: An Analysis of 101 Studies Published 1934-1996. *Environ. Health Perspect.* 108, 961-966.
- Vick, A.M., Hayton, W.L., 2001. Methyltestosterone pharmacokinetics and oral bioavailability in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquat. Toxicol.* 52, 177-188.

Wallace, R.A., Selman, K., 1981. Cellular and dynamic aspects of oocyte growth in teleosts. *Am. Zool.* 21, 325-343.

Zerulla, M., Länge, R., Steger-Hartmann, T., Panter, G., Hutchinson, T., Dietrich, D.R., 2002. Morphological sex reversal upon short-term exposure to endocrine modulators in juvenile fathead minnow (*Pimephales promelas*). *Toxicol. Lett.* 131, 51-63.

Figure Captions

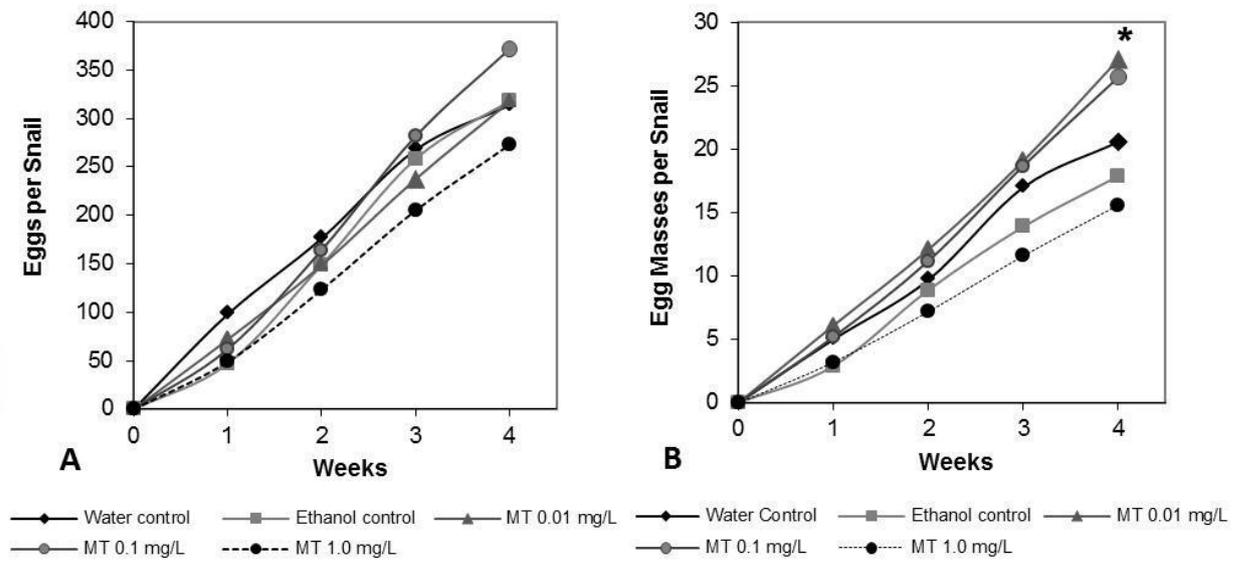


Figure 1. Cumulative means of number of eggs (A) and egg masses (B) laid by mature *B. glabrata* snails exposed to methyltestosterone and to ethanol/water during four weeks' exposure. An asterisk (*) indicates that the mean differs ($p < 0.05$ ANOVA and Dunnett's multiple comparisons test) from that of water control (0 mg/L) at the fourth week.

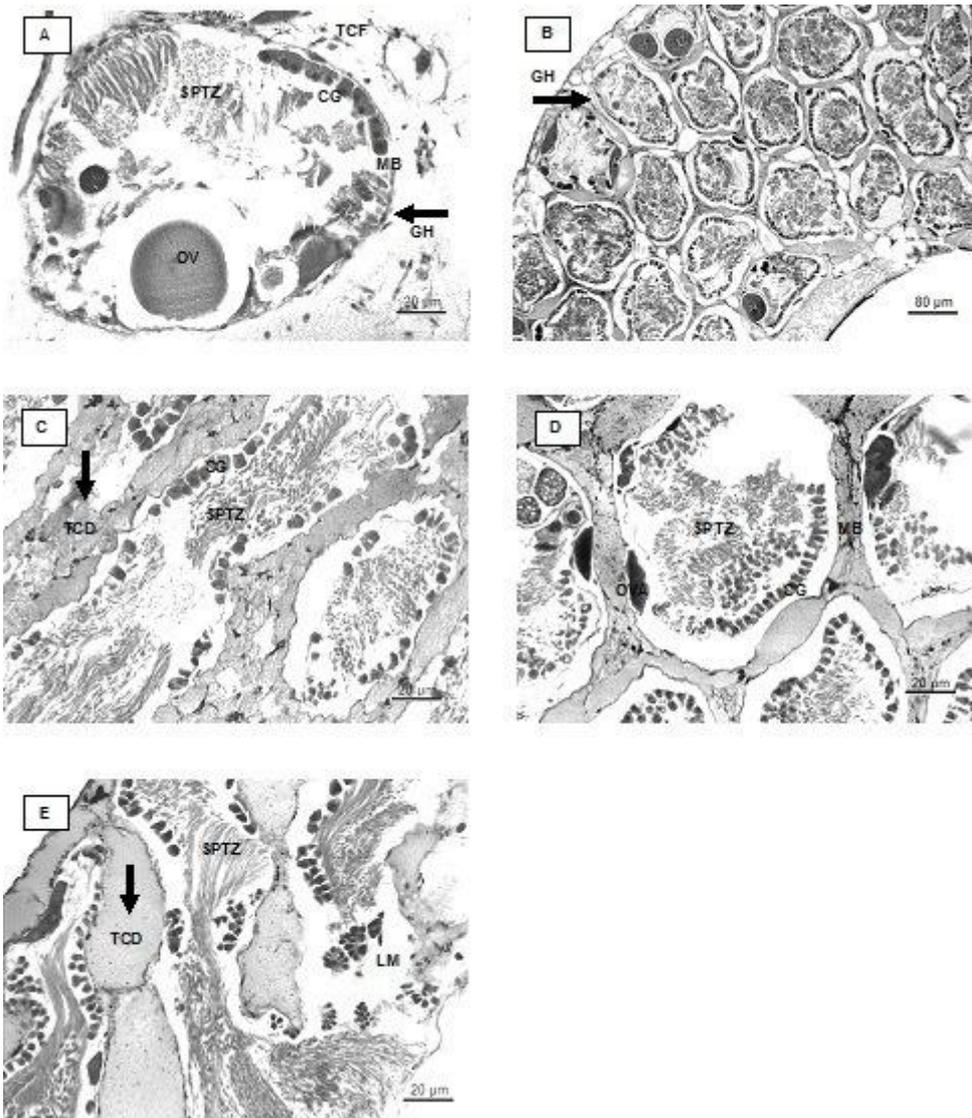


Figure 2. The gonad of hermaphroditic *B. glabrata* cross sections of two control groups and three groups of exposure to MT for 4 weeks. **A)** control without ethanol - the presence of loose connective tissue inside the gonad and several acini delimited by a basement membrane associated with squamous epithelium presenting paired germ cells within the acinus; in the innermost part there are eggs and sperm; **B)** control with ethanol - there are no morphological changes; **C)** 0.01 mg/L - degeneration of the basal membrane and the regression of germ cells; **D)** 0.1 mg/L - detachment of germ cells and formation of a lumen; **E)** 1.0 mg/L - breakdown of the basement membrane releasing the contents of the inner lobes followed by compaction of loose connective tissue (LCT) in dense connective tissue (DCT), an increase in sperm production and continuing

production of oocytes, increasing stem cells and formation of the lumen (LM). Germ cells (GC), spermatozooids (sptz) hermaphrodite gonad (HG), lumen (LM), basal membrane (BM) oocytes (OV) in oocyte atresia (OVA), loose connective tissue (LCT), dense connective tissue (DCT).

Cytogenetic toxicity and gonadal effects of 17 α -methyltestosterone in *Astyanax bimaculatus* (Lambari) and *Oreochromis niloticus* (Tilapia)

Carla Letícia Gediel Rivero-Wendt*, Ana Luisa Miranda-Vilela, Maria Fernanda Nince Ferreira, Adalmyr Morais Borges, Cesar Koppe Grisolia

Department of Genetics and Morphology, Institute of Biological Sciences, University of Brasília, Brasilia, Brazil

Running title: Methyltestosterone's genotoxic and gonadal effects

*Corresponding author: Carla Letícia Gediel Rivero-Wendt (pode por vc Cesar!!! E o endereço eles pedem em português mesmo)

Laboratório de Genética Toxicológica, Departamento de Genética e Morfologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade de Brasília, Brasilia, Brasil. Tel: 55 61 3107-3085, FAX +55 61 3107-2923. E-mail: grisolia@unb.br

Abstract

17- α -methyltestosterone (MT) is a synthetic hormone used in fish-farming to induce male monosex. Its androgenic effects on different fish species have been reported, but few studies have been performed to assess its possible genotoxic effects, although controversial results in tests have raised concerns in this respect. It was evaluated the genotoxic and gonadal effects of MT on adults of *Oreochromis niloticus* (target for MT in fish-farming) and *Astyanax bimaculatus* (non-target). Fish were exposed for 28 days through food containing MT (60mg/L), as normally occurs in fish-farming. Evaluation of MT genotoxicity was carried out through micronucleus test, nuclear abnormalities and comet assay analyses on peripheral erythrocyte cells from cardiac puncture. There were no significant differences in micronuclei frequencies and DNA damage for either species, but MT caused cytogenetic toxicity to the non-target species *A. bimaculatus*, showing an increased level of erythrocyte nuclear abnormalities. Histopathological analyses of the female gonads of *O. niloticus* revealed that MT significantly inhibited the development of mature oocytes, while in *A. bimaculatus* it provoked a significant inhibition of spermatozoa production. Results obtained with *A. bimaculatus* indicate that discharge of fish-farming water into the surface of aquatic ecosystems can compromise the reproduction of native species, among other harmful effects.

Keywords: 17- α -methyltestosterone; endocrine disruptor; fish micronucleus; comet assay; histopathology

1. Introduction

17- α -methyltestosterone (MT) is a synthetic hormone used in fish-farming to induce anabolic and androgenic effects (Vick and Hayton, 2001), such as sexual reversion in cultivated fish species. The androgenic effects of environmental endocrine disruptor chemicals (EDC) on aquatic organisms have received increasing attention, particularly in respect to fish, since they are the target of these chemicals to induce sexual reversion (Papoulias *et al.*, 2000). In fact, in polluted aquatic areas and aquaculture physiologic and developmental abnormalities have been reported in feral fish, including increased vitellogenin (VTG) concentrations, gonadal intersexuality in male fish (Kang *et al.*, 2008), decreased plasma concentrations of sex steroids, and adversely affected gonadal status (relative weight and histopathology) in both sexes (Ankley *et al.*, 2001). So there is concern about and resistance to the use of hormones in food production, and more efforts need to be made to understand how androgenic chemicals used in aquaculture can adversely affect wildlife, fish reproduction and food production.

The synthetic androgen MT, widely used as a reference chemical to induce male monosex, is considered as an endocrine disrupter in fish (Smith, 1974; Pandian and Sheela, 1995; Ankley *et al.*, 2001; Zerulla *et al.*, 2002; Arslan and Phelps, 2004; Hornung *et al.*, 2004; Pawlowski *et al.*, 2004; Kang *et al.*, 2008; Grisolia *et al.*, 2009). However, few studies have been performed to assess the possible genotoxic effect of MT or to examine any aspect of DNA damage caused by testosterone treatment in organs of intact animals. This paucity of studies may be because sex steroids are recognized as non-genotoxic carcinogens. However, controversial results have been reported in this regard (Hana *et al.*, 2008). Since the micronucleus test is a very sensitive and useful method that can detect both clastogenic and aneugenic activity (Al-

Sabti and Metcalfe, 1995), it is a good tool for monitoring this damage. Moreover, because the comet assay is widely accepted as a standard method for assessing DNA damage type in individual cells, it could be also used to evaluate this for genotoxicity (Dusinska and Collins, 2008; McKenna *et al.*, 2008; Collins, 2009). Although this is not the only way to measure oxidative DNA damage, it is one of the most sensitive and accurate (Collins, 2009). It is a valuable tool for population monitoring, for example in assessing mechanisms of mutagenesis, genotoxicity, ecological monitoring and as a tool to investigate DNA damage and repair in different cell types in response to a range of DNA-damaging agents, among others (Dusinska and Collins, 2008; McKenna *et al.*, 2008; Collins, 2009). Thus, the micronucleus test (MN) test, the nuclear abnormalities (AN) (Souza and Fontanetti, 2006) and the comet assay (CA) are excellent techniques used *in vivo* to test the genotoxicity of environmental pollutants such as EDC (Al-Sabti and Metcalfe, 1995; Grisolia and Starling, 2001; Pacheco and Santos, 2002; Bolognesi *et al.*, 2006; Kim and Hyun, 2006; Rivero *et al.*, 2008).

The micronucleus test in peripheral erythrocytes of fish has been widely employed for both *in situ* exposure to environmental waters and laboratory treatments *in vivo* (Ayllon and Garcia-Vazquez, 2000). There are many compounds that induce genotoxic effects with or without directly damaging DNA. Micronuclei can be produced from chromosomal fragments or whole chromosomes that lag behind in cell division due to lack of centromere, damage in centromere or defect in cytokinesis (Udroiu, 2006). Comet assay has been used in aquatic genotoxicology with both vertebrate and invertebrate organisms. *In vivo* data on fish were obtained with redbreast sunfish (*Lepomis auritus*), hard head cat fish (*Anus felis*), bullhead (*Ameiurus nebulosus*) and carp (*C. carpio*) (Buschini *et al.*, 2004).

In Brazilian fish-farming, this hormone is used to induce male monosex in *Oreochromis niloticus* larvae through feeding with fish chow containing MT for 28 days. In our study, adult individuals in reproductive period of *Oreochromis niloticus* (target for MT in fish-farming) and *Astyanax bimaculatus* (non-target for MT in fish-farming) were fed for 28 days with food containing MT to check the possible genotoxic and reproduction effects on the species studied. The genotoxic effects of MT were evaluated by micronuclei test (MN), nuclear abnormalities (AN) and comet assay, and the gonad effects and reproductive maturation were evaluated through morphometric analysis performed by optical microscopy, to type V oocytes and the quantification of the spermatozoa for both species.

2. Materials and methods

2.1. Test chemical

17 α -methyltestosterone (MT; 90% purity) was purchased from Bioativa pharmacy (Paraná, Brazil). In laboratory conditions, fish exposure occurred in similar way of fish-farms. An MT stock solution (1000 mg/L) was prepared by dissolving MT in absolute alcohol. The working solution was prepared adding 60 mL of stock solution and 440 mL of hydrated ethanol (96 GL) per Kg of dry food (60mg/L), which allowed the addition of the required dosage to the water of a tank with less than 0.05 ml of alcohol solution (Smith, 1974). After this, food containing MT solution was dried in the dark for 15 days, for the natural evaporation of the alcohol, and then it was stored at 4°C. The daily amount of feed accounted for 20% of the body weight of the larvae in the first two weeks and 10% of body weight in the last two weeks.

2.2. Study design

A. bimaculatus and *O. niloticus* were obtained from fish-farms in Brasilia, Brazil and were kept in the laboratory in glass tanks of 200 liters for one week to acclimatize, with monitoring of water temperature of 24 ± 2 °C, pH = 7.0, ammonia level and with constant aeration. Fish chosen for the tests (9 to 14 cm of length) were in the initial maturation stage (reproductively active), weighing approximately 19 g. The animals were randomly divided into two treatment groups: those which received MT food and those which received food without MT. The tanks were monitored per 28 days. After that, animals were euthanized, blood samples were collected to perform MN test and comet assay, and gonads were surgically removed for histological processing.

All procedures described were reviewed and approved by the institutional Ethics Committee for Animal Research (Institute of Biological Science, University of Brasília), number 100273/2009.

2.3. Analysis of micronucleus and nuclear abnormalities

The micronucleus test was carried out as described by (Hooftman and Raat, 1982) for fish erythrocyte cells. Peripheral blood was drawn from cardiac puncture with a heparinized syringe and immediately smeared with a drop of blood (50 µL). Slides were dried at room temperature for 24 h, fixed with methanol for 15 min and stained with Giemsa. Two smears were performed for each individual. Three thousand erythrocytes were analyzed per fish for the presence or absence of micronucleus and nuclear abnormalities, under immersion objective (1000x). The criteria for the identification of fish micronucleated erythrocytes were as follows: (a) MN should be smaller than one-third of the main nuclei, (b) MN must not touch the main nuclei, (c) MN must not be refractive and should be the same color and intensity as the main

nuclei. Groups of 10 *O. niloticus* and *A. bimaculatus* were exposed to control group and treatment group with MT in a 200 l aerated aquarium for 28 days.

2.4. Comet assay

This assay was performed as described by (Singh *et al.*, 1988), with some modifications for fish as previously reported by Rivero *et al.* (2008), as described below. The cell suspension sampled in the microtubule was mixed with 120 μ L low melting agarose (37 °C). Then, 500 μ L of the erythrocyte-agarose suspension was placed on a fully frosted slide pre-coated with standard agarose (1.5%) and covered with a coverslip. The slides were then placed on ice for 15 min to allow complete agarose polymerization and afterwards in a chilled lysing solution (NaCl 2.5 M; EDTA 100 mM; Tris 10 mM; N-lauroyl-sarcosine 1%; Triton-X 1%; DMSO 10%; pH = 10). Then the slides were placed on a horizontal gel electrophoresis platform and covered with a chilled alkaline solution consisting of 300 mM NaOH and 1 mM Na₂EDTA (pH = 13), left in the dark at 4 °C for 30 min, and then the DNA was electrophoresed at 4 °C in the dark for 30 min at 25 V and approximately 350 mA. The slides were gently rinsed twice with 400 mM Tris (pH = 7.5) to neutralize the alkali. Each slide was stained with 30 μ L of 20 μ g/mL ethidium bromide and covered with a coverslip. One hundred cells from each replicate were randomly chosen (50 from each duplicate slide), and analyzed under an optical fluorescence microscope (Axioskop-2, Carl Zeiss), with a 510-560 nm filter and a 590 nm barrier filter, with a magnification of 400x. For damage index calculation, cells were sorted into four classes, according to tail size. The index of damage (ID) is the sum of classes of the 100 cells analyzed per fish, and may vary from 0 (all cells undamaged – 0X100) to 400 (all cells highly damaged – 4X100). The

damage index is based on the length of migration and on the amount of DNA in the tail, and it is considered a sensitive measurement of detectable DNA damage.

$$ID_{(au)} = \frac{N1 + 2N2 + 3N3 + 4N4}{S/100}$$

where ID = index of DNA damage, au = arbitrary unit, N1 - N4 = nucleoids in levels 1, 2, 3 and 4, S = number of nucleoids analyzed, including level 0 (Jaloszynski *et al.*, 1999; Collins, 2004).

2.5. *Histology of the gonads*

After exposure, gonads of both sexes were collected, fixed with Davidson solution for 24 h, transferred to 70% ethanol, included in paraffin using an automatic tissue processor (OMA[®] DM-40, São Paulo, Brazil), cut to 5 µm of thickness in a Leica RM2235 manual microtome (Leica Microsystems, Nussloch, Germany) and stained with hematoxylin-eosin for histological analyses (light microscopy). Oocytes were classified into five stages according to maturation scale (Wallace and Selman, 1981). Morphometric analyses were performed with the software Image-pro Plus 5.1, where 30 oocytes at stage V (mature oocytes) of each treatment were analyzed for the accomplishment of the comparative analysis of the diameter of the oocytes (Homklin *et al.*, 2011). For males, quantification of sperm was carried out by areas average calculation of the spermatid cysts.

2.4. *Statistical analysis*

Statistical analysis was carried out using SPSS (Statistical Package for the Social Sciences) version 17.0. Data were expressed as mean ± SEM (standard error of mean) and values of p<0.05 were considered statistically significant. The continuous variables were tested for normal distribution with Shapiro-Wilk. Possible differences between the

groups were investigated by the Independent-samples T Test or the Mann Whitney U Test test (when the data were not normally distributed).

3. Results

3.1. MN frequency, nuclear abnormalities and DNA damage

The only significant difference between the control and MT groups was for nuclear abnormalities of *A. bimaculatus* ($p=0.002$). There were no significant differences for micronuclei frequencies and DNA damage in either species (Table 1).

3.2. Histology and morphometric analysis of mature oocytes and sperm

The gonadal histology was similar to that of other teleosts. Ovaries were found in the dorsal region of the coelomic cavity and presented good visibility of oocytes since they were adult individuals. *O. niloticus* shows typical oogenesis for partial spawning, unlike *A. bimaculatus*, which presents total spawning. The profusion of tissue in the degeneration process, sometimes easily detected as atresic follicle, differs histologically as regards the control gonads, especially in *O. niloticus*. Oocytes V from *O. niloticus* significantly decreased in diameter when exposed to MT group compared to control ($p=0.000$) (Table 2, Fig. 1a and 1b). On the other hand, with *A. bimaculatus* no significant difference was observed for the oocyte V diameters (Figures 1e and 1f).

Testes were located dorsally and sperm was visible macroscopically, indicating sexual maturity. All the histologically assessed testicles showed male germinative epithelium within the seminiferous tubules. This germinative epithelium was formed by primary and secondary spermatogonia, spermatocytes I and II and spermatids. The development of these cells takes place through cysts except for the primary spermatogonia and spermatozooids. The spermatozooids fill in the lumen and drain in the direction of the central region, which is formed by dense conjunctive tissue, with

abundant blood vascularization and sperm drainage ducts covered by epithelium. In males, effects on sperm production were observed for *O. niloticus* (Figures 1c and 1d), but sperm production decreased significantly in the MT group with respect to the control for *A. bimaculatus* ($p = 0.006$) (Table 2, Fig. 1g and h).

Complete masculinization and ovotest development did not occur for either species.

4. Discussion

4.1. Genotoxicity biomarkers and biological system

During micronuclei analyses, some authors have observed the occurrence of nuclear abnormalities other than micronuclei, suggesting that they must be taken into consideration along with conventional micronuclei analysis. The formation of morphological alterations in the nuclear envelope, such as blebbed nuclei (those that present a relatively small evagination from the envelope, which seems to contain euchromatin), lobed nuclei (presenting evaginations larger than those from blebbed nuclei) and notched nuclei (presenting a remarkable notch containing nuclear material) have been reported in fish erythrocytes, as a consequence of exposure to environmental and chemical contaminants of genotoxic, mutagenic or carcinogenic action, although the mechanisms responsible for such abnormalities have not been described yet (Souza and Fontanetti, 2006). However, these abnormalities have been used by several authors as indicators of genotoxic damage and cytogenetic toxicity (Ayllon and Garcia-Vazquez, 2000; Çavas and Ergene-Gözükara, 2003). In our study, 17 α -methyltestosterone has no genotoxic or clastogenic effect evaluated, respectively, by comet assay or micronucleus frequency on the two studied species. However, the non-target species, *A. bimaculatus*,

showed sensitivity to MT as regards nuclear abnormalities, indicating that MT presented cytogenetic toxicity for this species.

There has been a study of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) treated with a single oral dose of food containing 30 mg methyltestosterone per kg of fish; the oral bioavailability of methyltestosterone from food was about 70%. This percentage was calculated using the plasma concentration–time profiles, and results suggested that MT orally administered from food was more slowly metabolized than testosterone (Vick and Hayton, 2001). In our study, results of *A. bimaculatus* suggest that this species is more sensitive than *O. niloticus*, and the slower metabolism of MT can be the main cause of the cytotoxicity found, although the effect of secondary metabolites cannot be discarded.

4.2. Histology of gonads

Androgens are a class of steroids that are responsible for the primary and secondary sex characteristics of the male. These steroids possess potent anabolic or growth-promoting properties (Hana *et al.*, 2008). Estrogenic/androgenic controls on reproduction/development in fish may differ enough from those in higher vertebrates to the point that mammalian (rat) screening methods may not identify potential endocrine-disrupting chemicals (EDCs) in this important class of animals (Ankley *et al.*, 2001). Little research has addressed how androgenic chemicals, such as MT, adversely affect the reproduction of fish (Ankley *et al.*, 2001; Kang *et al.*, 2008), but as opposed to human health effects, significant evidence currently exists for adverse EDC effects in a variety of wildlife species, including fish (Ankley *et al.*, 2001). MT has been reported as provoking gonadal alterations in some fish species, producing morphological sex reversal in juvenile females of fathead minnow (*Pimephales promelas*) (Zerulla *et al.*, 2002), degenerate oocytes (that is, oil droplet; indicative of regression of oogenesis),

masculinization of the secondary sex characteristics in female and reduction in fecundity of adult medaka (*Oryzias latipes*), besides hatchability and survival rate of the offspring of this species (Kang *et al.*, 2008). Our study corroborates these previous reports, since the treatment with MT provoked inhibition and degeneration of mature oocytes in *O. niloticus* (verified by decreasing the diameter of the oocytes), while in *A. bimaculatus*, it caused reduction in spermatozoa production. The action of MT in *O. niloticus* is in accordance with its use in fish-farming to produce monosex males. Our results suggest that discharge of fish-farming water into surface aquatic ecosystems can be harmful to native species, since in *A. bimaculatus*, a native Brazilian species, MT was cytotoxic and compromised spermatogenesis.

5. Conclusions

In this study, MT presented cytogenetic toxicity only for *A. bimaculatus*, besides provoking inhibition and degeneration of mature oocytes of *O. niloticus* and reduction in spermatozoa production in *A. bimaculatus*. Although the reproductive effects on *O. niloticus* are in accordance with its use in fish-farming to produce monosex males, results obtained with *A. bimaculatus* highlight the importance of this study for the environment, indicating that discharge of fish-farming water into the surface of aquatic ecosystems can compromise the reproduction of native species, among other harmful effects.

Acknowledgements

We are grateful to the Ministry of Agriculture, Fisheries and Food (MAPA), the Brazilian National Council for Technological and Scientific Development (CNPq) and the Coordination for Further Training of Graduate Staff (CAPES) for financial support,

as well as the Pisciculture station of the Federal District Government for the supply of fish for the study.

References

- Abd-Allah, A.T., Thompson, S.N., Borchardt, D.B., Wanas, M.Q.A., 1999. *Biomphalaria glabrata*: a laboratory model illustrating the potential of pulmonate gastropods as freshwater biomonitoring of heavy metal pollutants. *Malacologia* 41, 345-353.
- ABNT, 2004. Ecotoxicologia aquática - toxicidade aguda - método de ensaio com *Daphnia* spp (Cladocera, Crustacea). Associação Brasileira de Normas Técnicas. NBR 12713.
- Al-Sabti, K., Metcalfe, C.D., 1995. Fish micronuclei for assessing genotoxicity in water. *Mutation Research/Genetic Toxicology* 343, 121-135.
- Ankley, G.T., Jensen, K.M., Kahl, M.D., Korte, J.J., Makynen, E.A., 2001. Description and evaluation of a short-term reproduction test with the fathead minnow (*Pimephales promelas*). *Environmental Toxicology and Chemistry* 20, 1276-1290.
- Ansaldo, M., Nahabedian, D.E., Holmes-Brown, E., Agote, M., Ansay, C.V., Verrengia Guerrero, N.R., Wider, E.A., 2006. Potential use of glycogen level as biomarker of chemical stress in *Biomphalaria glabrata*. *Toxicology* 224, 119-217.
- Arslan, T., Phelps, R.P., 2004. Production of monosex male black crappie, *Pomoxis nigromaculatus*, populations by multiple androgen immersion. *Aquaculture* 234, 561-573.

- Ayllon, F., Garcia-Vazquez, E., 2000. Induction of micronuclei and other nuclear abnormalities in European minnow *Phoxinus phoxinus* and mollie *Poecilia latipinna*: an assessment of the fish micronucleus test. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis* 467, 177-186.
- Bolognesi, C., Perrone, E., Roggieri, P., Pampanin, D.M., Sciutto, A., 2006. Assessment of micronuclei induction in peripheral erythrocytes of fish exposed to xenobiotics under controlled conditions. *Aquatic Toxicology* 78, S93-S98.
- Buschini, A., Martino, A., Gustavino, B., Monfrinotti, M., Poli, P., Rossi, C., Santoro, M., Dörr, A.J.M., Rizzoni, M., 2004. Comet assay and micronucleus test in circulating erythrocytes of *Cyprinus carpio* specimens exposed in situ to lake waters treated with disinfectants for potabilization. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis* 557, 119-129.
- Calabrese, E.J., Baldwin, L.A., 2003a. The hormetic dose-response model is more common than the threshold model in toxicology. *Toxicology Science* 71, 246-250.
- Calabrese, E.J., Baldwin, L.A., 2003b. Toxicology rethinks its central belief. *Nature* 421, 691-692.
- Carrasco, L.A.P., Penman, D.J., A., V.S., Bromage, N., 1999. The effects of oral administration with 17alpha-methyltestosterone on chromosomal synapsis in *Oreochromis niloticus* (Pisces, Cichlidae). *Mutation Research* 430, 87-98.
- Çavas, T., Ergene-Gözükar, S., 2003. Micronuclei, nuclear lesions and interphase silver-stained nucleolar organizer regions (AgNORs) as cyto-genotoxicity indicators in *Oreochromis niloticus* exposed to textile mill effluent. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis* 538, 81-91.

- Cedergreen, N., Spliid, N.H., Streibig, J.C., 2005. Improved empirical models describing hormesis. *Environmental Toxicology and Chemistry* 24, 3166-3172.
- Cervera, A., Maymó, A.C., Sendra, M., Martínez-Pardo, R., Garcerá, M.D., 2004. Cadmium effects on development and reproduction of *Oncopeltus fasciatus* (Hemiptera: Lygaeidae). . 50, 737-749.
- Cheung, C.C.C., Lam, P.K.S., 1998. Effect of cadmium on the embryos and juveniles of a tropical freshwater snail *Physa acuta* (Draparnaud, 1805). *Water Science and Technology* 38, 263-270.
- Coeurdassier, M., Vaufleury, A., Badot, P.M., 2003. Bioconcentration of cadmium and toxic effect on life-history traits of pond snails (*Lymnaea palustris* and *Lymnaea stagnalis*) in laboratory bioassays. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 454, 102-109.
- Coeurdassier, M., Vaufleury, A., Crini, N., Scheifler, R., Badot, P.M., 2005. Assessment of whole effluent toxicity on aquatic snails: bioaccumulation of Cr, Zn and Fe and individual effects in bioassays. *Environmental Toxicology and Chemistry* 24, 198-204.
- Coeurdassier, M., Vaufleury, A., Scheifler, R., Morhain, E., Badot, P.M., 2004. Effects of cadmium on the survival of three life-stages of the freshwater pulmonate *Lymnaea stagnalis* (Mollusca, Gastropoda). *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 72, 1083-1090.
- Collins, A., 2004. The comet assay for DNA damage and repair. *Molecular Biotechnology* 26, 249-261.
- Collins, A.R., 2009. Investigating oxidative DNA damage and its repair using the comet assay. *Mutation Research/Reviews in Mutation Research* 681, 24-32.
- Cooney, J.D., 1995. In: Rand GM, editor. *Freshwater tests in Fundamentals*

- of Aquatic Toxicology. Washington, DC: Taylor & Francis, 91-138.
- Curtis, L.R., Diren, F.T., Hurley, M.D., Seim, W.K., Tubb, R.A., 1991. Disposition and elimination of 17 α -methyltestosterone in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Aquaculture* 99, 193-201.
- Czech, P., Weber, K., Dietrich, D.R., 2001. Effects of modulating substances on reproduction in the hermaphroditic snail *Lymnaea stagnalis*. *Aquatic toxicology* 53, 103-114.
- Duft, M., Schmitt, C., Bachmann, J., Brandelik, C., Schulte-Oehlmann, U., Oehlmann, J.r., 2007. Prosobranch snails as test organisms for the assessment of endocrine active chemicals—an overview and a guideline proposal for a reproduction test with the freshwater mudsnail *Potamopyrgus antipodarum*. *Ecotoxicology* 16, 169-182.
- Dunnett, C.W., 1955. Multiple comparison procedure for comparing several treatments with a control. *J Am Stat Assoc* 50, 1096-1121.
- Dusinska, M., Collins, A.R., 2008. The comet assay in human biomonitoring: gene–environment interactions. *Mutagenesis* 23, 191-205.
- Falone, S.Z., 2007. Desenvolvimento de métodos para a determinação do hormônio 17-alfa-metiltestosterona em amostras de água e de sedimentos de piscicultura: ensaios ecotoxicológicos com cladóceros. Tese de doutorado em Ciências da Engenharia Ambiental. Universidade de São Paulo., 155.
- Forbes, V.E., 2000. Is hormesis an evolutionary expectation? *Function Ecology* 14, 12-24.
- Gist, G.L., 1998. National Environmental Health Association Position on Endocrine Disrupters. *Journal of Environmental Health* 60, 21.

- Gomot, A., 1998. Toxic effects of cadmium on reproduction, development, and hatching in the freshwater snail *Lymnaea stagnalis* for water quality monitoring. *Ecotoxicology Environmental Safety* 41B, 288-297.
- Goudie, C.A., Shelton, W.L., Parker, N.C., 1986. Tissue distribution and elimination of radiolabelled methyltestosterone fed to adult blue tilapia. *Aquaculture* 58, 227-240.
- Gourmelon, A., Ahtiainen, J., 2007. Developing test guidelines on invertebrate development and reproduction for the assessment of chemicals, including potential endocrine active substances. The OECD perspective. *Ecotoxicology* 16, 161-167.
- Green, B.W., Teichert-Coddington, D.R., 2000. Human Food Safety and Environmental Assessment of the Use of 17 α -Methyltestosterone to Produce Male Tilapia in the United States. *Journal of the World Aquaculture Society* 31, 337-357.
- Grisolia, C.K., Rivero, C.L.G., Starling, F.L.R.M., Silva, I.C.R.d., Barbosa, A.C., Dorea, J.G., 2009. Profile of micronucleus frequencies and DNA damage in different species of fish in a eutrophic tropical lake. *Genetics and Molecular Biology* 32, 138-143.
- Grisolia, C.K., Starling, F.L.R.M., 2001. Micronuclei monitoring of fishes from Lake Paranoá, under influence of sewage treatment plant discharges. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis* 491, 39-44.
- Hana, H.Y., Khalil, W.K.B., Elmakawy, A.I., Elmegeed, G.A., 2008. Androgenic profile and genotoxicity evaluation of testosterone propionate and novel synthesized heterocyclic steroids. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* 110, 284-294.

- Homklin, S., Ong, S.K., Limpiyakorn, T., 2011. Biotransformation of 17[alpha]-methyltestosterone in sediment under different electron acceptor conditions. *Chemosphere* 82, 1401-1407.
- Hooftman, R.N., Raat, W.K., 1982. Induction of nuclear anomalies (micronuclei) in the peripheral blood erythrocytes of the eastern mudminnow *Umbra pygmaea* by ethyl methanesulphonate. *Mutation Research* 104, 147-152.
- Hornung, M.W., Jensen, K.M., Korte, J.J., Kahl, M.D., Durhan, E.J., Denny, J.S., Henry, T.R., Ankley, G.T., 2004. Mechanistic basis for estrogenic effects in fathead minnow (*Pimephales promelas*) following exposure to the androgen 17[alpha]-methyltestosterone: conversion of 17[alpha]-methyltestosterone to 17[alpha]-methylestradiol. *Aquatic Toxicology* 66, 15-23.
- Jaloszynski, P., Kujawski, M., Wasowicz, M., Szulc, R., Szyfter, K., 1999. Genotoxicity of inhalation anesthetics halothane and isoflurane in human lymphocytes studied in vitro using the comet assay. *Mutation Research* 439, 199-206.
- Janer, G., Lyssimachou, A., Bachmann, J., Oehlmann, J., Schulte-Oehlmann, U., Porte, C., 2006. Sexual dimorphism in esterified steroid levels in the gastropod *Marisa cornuarietis*: The effect of xenoandrogenic compounds. *Steroids* 71, 435-444.
- Jha, A.N., 1998. Use of aquatic invertebrates in genotoxicological studies. *Mutation Research* 399, 1-2.
- Jha, A.N., 2008. Ecotoxicological applications and significance of the comet assay. *Mutagenesis* 23, 207-221.
- Joosten, H.F.P., van Acker, F.A.A., van den Dobbelsteen, D.J., Horbach, G.J.M.J., Krajnc, E.I., 2004. Genotoxicity of hormonal steroids. *Toxicology Letters* 151, 113-134.

- Kang, I.J., Yokota, H., Oshima, Y., Tsuruda, Y., Shimasaki, Y., Honjo, T., 2008. The effects of methyltestosterone on the sexual development and reproduction of adult medaka (*Oryzias latipes*). *Aquatic Toxicology* 87, 37-46.
- Kim, I.-Y., Hyun, C.-K., 2006. Comparative evaluation of the alkaline comet assay with the micronucleus test for genotoxicity monitoring using aquatic organisms. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 64, 288-297.
- Martelli, F.M., Angiola, M., Reimann, R., Brambila, G., 2003. Species, sex and inter-individual differences in DNA repair induced by nine steroids in primary cultures of rat and human hepatocytes. *Mutation Research* 536, 69-78.
- McKenna, D.J., McKeown, S.R., McKelvey-Martin, V.J., 2008. Potential use of the comet assay in the clinical management of cancer. *Mutagenesis* 23, 183-190.
- Moens, L.N., van der Ven, K., Van Remortel, P., Del-Favero, J., De Coen, W.M., 2006. Expression Profiling of Endocrine-Disrupting Compounds Using a Customized *Cyprinus carpio* cDNA Microarray. *Toxicological Sciences* 93, 298-310.
- Moore, A., Waring, C.P., 2001. The effects of a synthetic pyrethroid pesticide on some aspects of reproduction in Atlantic Salmon (*Salmo salar* L.). *Aquatic Toxicology* 52, 1-12.
- Moriarty, F., 1990. *Ecotoxicology: the study of pollutants in ecosystems*. 2nd. ed. London: Academic Press.
- Moss, S.M., 1989. Effects of exogenous androgens on growth, biochemical composition and reproduction of the coot clam *Mulinia lateralis*. *Pac Sci* 43, 200.
- Münzinger, A., 1987. *Biomphalaria glabrata* (say), a suitable organism for a biotest. *Environmental Technology Lett* 8, 141-148.

- Nakano, E., Watanabe, L.C., Pires Ohlweiler, F., de Bragança Pereira, C.A., Kawano, T., 2003. Establishment of the dominant lethal test in the fresh water mollusk *Biomphalaria glabrata* (Say, 1818). *Mutation Research* 536, 145-154.
- OECD, 1992. Test No 203: Fish Acute Toxicity Test. Organization for Economic Co-Operation and Development.
- Oliveira-Filho, E.C., Grisolia, C.K., Paumgarten, F.J.R., 2009a. Effects of endosulfan and etanol on the reproduction of the snail *Biomphalaria tenagophila*: a multigeneration study. *Chemosphere* 75, 398-404.
- Oliveira-Filho, E.C., Grisolia, C.K., Paumgarten, F.J.R., 2009b. Trans-generation study of the effects of nonylphenol ethoxylate on the reproduction of the snail *Biomphalaria tenagophila*. *Ecotoxicology Environmental Safety* 72, 458-465.
- Olivier, L., Haskins, W.T., 1960. The effects of low concentrations of sodium pentachlorophenate on the fecundity and egg viability of *Australorbis Glabratus*. *Am J Trop Med Hyg* 9, 199-205.
- Pacheco, M., Santos, M.A., 2002. Biotransformation, genotoxic, and histopathological effects of environmental contaminants in European eel (*Anguilla anguilla* L.). *Ecotoxicology and Environmental Safety* 53, 331-347.
- Pandian, T.J., Sheela, S.G., 1995. Hormonal induction of sex reversal in fish. *Aquaculture* 138, 1-22.
- Papoulias, D.M., Noltie, D.B., Tillitt, D.E., 2000. Effects of methyl testosterone exposure on sexual differentiation in medaka, *Oryzias latipes*. *Marine Environmental Research* 50, 181-184.
- Paraense, W.L., 1972. Fauna planorbídica do Brasil In: Lacaz, C.S., Baruzzi, R.G., Siqueira, J.W. (Eds.). *Introdução à geografia médica do Brasil*. Edgar Blucher, São Paulo, 213-239.

- Pawlowski, S., Sauer, A., Shears, J.A., Tyler, C.R., Braunbeck, T., 2004. Androgenic and estrogenic effects of the synthetic androgen 17[alpha]-methyltestosterone on sexual development and reproductive performance in the fathead minnow (*Pimephales promelas*) determined using the gonadal recrudescence assay. *Aquatic Toxicology* 68, 277-291.
- Petridis, P., Jha, A.N., Langston, W.J., 2009. Measurements of the genotoxic potential of (xeno-)oestrogens in the bivalve mollusc *Scrobicularia plana*, using the Comet assay. *Aquatic Toxicology* 94, 8-15.
- Rivero, C., Barbosa, A., Ferreira, M., Dorea, J., Grisolia, C., 2008. Evaluation of genotoxicity and effects on reproduction of nonylphenol in *Oreochromis niloticus* (Pisces: cichlidae). *Ecotoxicology* 17, 732-737.
- Silva, R.R.P., Pires-Junior, O.R., Grisolia, C.K., 2010. Toxicity and genotoxicity in *Astyanax bimaculatus* (Characidae) induced by microcystins from a bloom of *Microcystis* spp. *Genetics and Molecular Biology* 33, 750-755.
- Silva, R.R.P., Pires, O.R., Grisolia, C.K., 2011. Genotoxicity in *Oreochromis niloticus* (Cichlidae) induced by *Microcystis* spp bloom extract containing microcystins. *Toxicon* 58, 259-264.
- Singh, N.P., McCoy, M.T., Tice, R.R., Schneider, E.L., 1988. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Experimental Cell Research* 175, 184-191.
- Singh, P.B., Singh, V., 2008. Cypermethrin induced histological changes in gonadotrophic cells, liver, gonads, plasma levels of estradiol-17B and 11-ketotestosterone, and sperm motility in *Heteropneustes fossilis* (Bloch). *Chemosphere* 72, 422-431.

- Smith, R.J.F., 1974. Effects of 17 alpha methyltestosterone on the dorsal pad and tubercles of fathead minnows (*Pimephales promelas*). *Canadian Journal of Zoology* 52, 1031-1038.
- Souza, T.d.S., Fontanetti, C.S., 2006. Micronucleus test and observation of nuclear alterations in erythrocytes of Nile tilapia exposed to waters affected by refinery effluent. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis* 605, 87-93.
- Stebbing, A.R.D., 1982. Hormesis—the stimulation of growth by low levels of inhibitors. *Science of The Total Environment* 22, 213-234.
- Swan, S.H., 2000. The Question of Declining Sperm Density Revisited: An Analysis of 101 Studies Published 1934-1996. *Environmental Health Perspectives* 108, 961-966.
- Udroiu, I., 2006. The micronucleus test in piscine erythrocytes. *Aquatic Toxicology* 79, 201-204.
- Vanzella, T.P., Martinez, C.B.R., Cólus, I.M.S., 2007. Genotoxic and mutagenic effects of diesel oil water soluble fraction on a neotropical fish species. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis* 631, 36-43.
- Vick, A.M., Hayton, W.L., 2001. Methyltestosterone pharmacokinetics and oral bioavailability in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquatic Toxicology* 52, 177-188.
- Wallace, R.A., Selman, K., 1981. Cellular and dynamic aspects of oocyte growth in teleosts. *American Zoologist* 21, 325-343.
- Zerulla, M., Länge, R., Steger-Hartmann, T., Panter, G., Hutchinson, T., Dietrich, D.R., 2002. Morphological sex reversal upon short-term exposure to endocrine

modulators in juvenile fathead minnow (*Pimephales promelas*). *Toxicology Letters* 131, 51-63.

Figure Captions

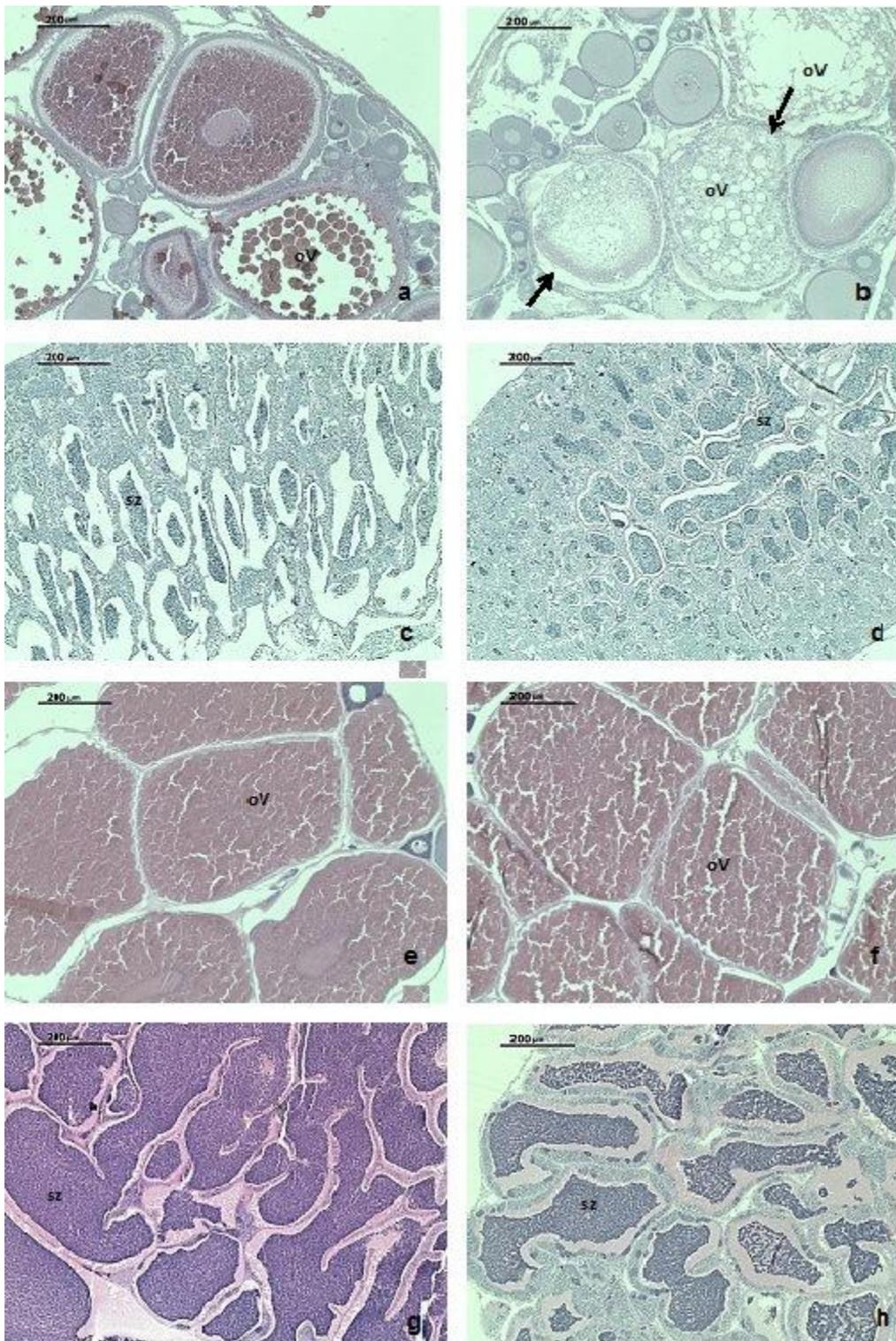


Figure 1. Histology of the gonads of *Oreochromis niloticus* (a to d) and *Astyanax bimaculatus* (e to h). a and e. control females; b and f. females treated with food containing MT; c and g. control males; d and h. males treated with food

containing MT. **(a)** Normal development of ovarian tissue in female *O. niloticus* in the control group. **(b)** degeneration of ovarian tissue of adult *O. niloticus* exposed to 60mg/L methyltestosterone for 28 days. The arrows indicate ovarian degeneration. **(g)** Normal production of cysts of spermatozooids in male *A. bimaculatus* in the control group. **(h)** Decrease in spermatogenesis in *A. bimaculatus* males exposed to 60mg/L methyltestosterone for 28 days. Hematoxylin and eosin stain; scale bar, 200um. (oV) mature oocytes; (sz) spermatozooids.

Tables

Table 1. Analysis of micronucleus, nuclear abnormalities and comet assay of *Oreochromis niloticus* and *Astyanax bimaculatus*

Group	Animals (N)	Micronucleus Test		Comet assay		
		MN	NA	% moderate damage	% high damage	
<i>O. niloticus</i>						
Control	10	0.10 ± 0.10	9.80 ± 4.00	22.46 ± 2.40	33.06 ± 6.43	
MT	10	0.00 ± 0.00	12.80 ± 4.07	25.45 ± 1.55	21.73 ± 4.77	
		P-values	0.317	0.288	0.330	0.187
<i>A. bimaculatus</i>						
Control	10	0.00 ± 0.00	2.80 ± 0.66	20.97 ± 3.11	39.17 ± 8.01	
MT	10	0.40 ± 0.22	9.00 ± 1.70	19.08 ± 2.86	38.50 ± 8.97	
		P-values	0.068	0.002	0.401	0.895

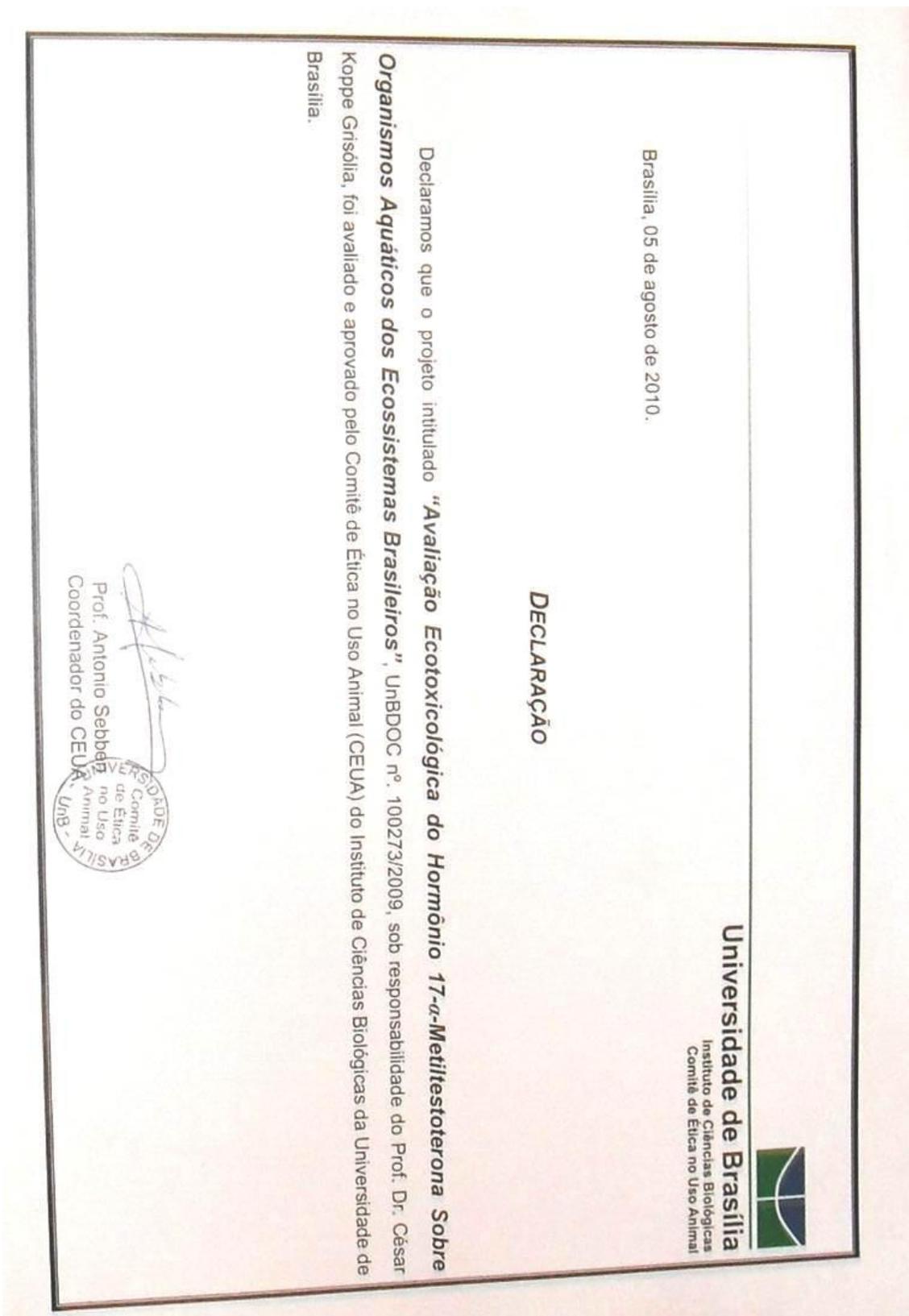
N= sample size; MT= food containing 17 α -methyltestosterone; MN= micronucleus frequency; NA= nuclear abnormalities. The data correspond to the means and to the standard error of mean (SEM) of the frequencies of MN, NA and percentage of comets of class 1 and 2 (moderate damage) and of comets of class 3 and 4 (elevated damage) with respect to the total damage. For *O. niloticus*, p values of MN and NA were generated by the Independent-samples T test, while the other p-values were generated by the Mann Whitney U test. For *A. bimaculatus*, p-values were generated by the Mann Whitney U test.

Table 2. Morphometric analysis of mature oocytes and sperm of *Oreochromis niloticus* and *Astyanax bimaculatus*

Group	Animals (N)	Diameter (μ m)	Area (μ m)
<i>O. niloticus</i>			
Control	10	722.47 ± 47.2	2410.13 ± 122.84
MT	10	383 ± 14.65	3125.31 ± 349.29
		P-values	0.000
<i>A. Bimaculatus</i>			
Control	10	497.11 ± 17.26	8653.94 ± 387.92
MT	10	476.21 ± 13.87	6932.12 ± 387.69
		P-values	0.006

N= sample size; MT= food containing 17 α -methyltestosterone. P-values were generated by the Mann Whitney U test.

9.3. Comitê de ética animal da UnB



9.4. Artigos científicos submetidos

Lack of genotoxicity in *Astyanax bimaculatus* and *Oreochromis niloticus* of 17 α -methyltestosterone used in fish farm to induce monosex in males

Carla Letícia Gediél Rivero-Wendt¹, Ana Luisa Miranda-Vilela¹, Maria Fernanda Nince Ferreira¹, Fabiula Sousa Amorim², Verônica Alves Gonçalves da Silva², cesar Koppe Grisolia^{1*}

¹Departamento de Genética e Morfologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade de Brasília, Brasília, Brasil

²Laboratório de Química Analítica Ambiental, Instituto Química, Universidade de Brasília, Brasília, Brasil

Running title: Genotoxic assessment of methyltestosterone in fish

***Corresponding author:** Cesar Koppe Grisolia¹

Laboratório de Genética Toxicológica, Departamento de Genética e Morfologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade de Brasília, Brasília, Brasil. Phone: +55 61 3107-3085, e-mail: grisolia@unb.br

ABSTRACT

17 α -methyltestosterone (MT) is widely used in fish farms of many countries to induce monosex in males. Its genotoxic risk to fish species is not well known and studies in other *in vivo* models are still inconclusive. MT was tested for genotoxicity in the fish species *Oreochromis niloticus* (*Oreochromis niloticus*) target species and *Astyanax bimaculatus* (*Astyanax bimaculatus*), a native non-target species. Genotoxicity was evaluated considering micronucleus test (MN), nuclear abnormalities (NA) and comet assay from peripheral erythrocytes of both species after 96 h of exposure at concentrations of 0.01, 0.1 and 1.0 mg/L of water. At the lower exposure level of 0.01 mg/L, MT induced MN in both species and induction of NA only in *O. niloticus*. These effects were not observed in the comet assay. Chemical analyses by chromatography of water samples collected from aquariums at the beginning and end of each experiment showed that MT was consumed, during 96 h of exposure. At the highest level of exposure (1.0 mg/L) 81.69% hormones were consumed during exposure-period of 96 h. The chromatogram showed that at the lowest concentration level of 0.01 mg/L, MT was 99.56% consumed by the end of the exposure period of 96 h. Thus, exposure to MT did not cause genotoxicity to both fish species.

Keywords: Fish micronucleus, Comet assay, Endocrine disruptors, Fish-farm,

INTRODUCTION

MT is a synthetic hormone widely used as a reference chemical in fish-farming to induce sexual reversion, producing male monosex, because this is economically more viable (Pandian and Sheela, 1995). MT is considered an endocrine disruptor in fish, causing physiological and developmental abnormalities such as increasing vitellogenin concentrations and gonadal intersexuality in male fish (Zerulla *et al.*, 2002). There is concern about and resistance to the use of hormones in food production, and more efforts might be made to know how androgenic chemicals used in aquaculture can adversely affect wildlife, fish reproduction and food production. The androgenic effects of environmental endocrine disruptor chemicals (EDC) on aquatic organisms have received increased attention, particularly in respect to fish, since they are the target of chemicals such as these to induce sexual reversion (Papoulias *et al.*, 2000).

Few studies have been reported assessing the possible genotoxic effect of MT or on any aspect of DNA damage caused by testosterone exposure in target and non-target fish species. Sex steroid hormones are considered non-genotoxic carcinogens, but controversial results have been reported on this subject (Hana *et al.*, 2008). In a study using microarray technology to evaluate the effects of EDCs on *Cyprinus carpio* gene expressions, it was observed that MT induced expression in a group of genes such as serum lectin, interleukin 2 and vitellogenin, which are associated with immune response, lipid transport and oogenesis respectively (Moens *et al.*, 2006). A literature review by (Joosten *et al.*, 2004) showed that testosterone and its esters are not mutagenic in bacteria, the same occurring for methyltestosterone. The anabolics trenbolone, fluoxymesterone and oxymetholone were found to be negative in bacterial and mammalian cell systems.

In fish, the combination of MN, nuclear abnormalities test (NA) and the comet assay (CA) can be carried out in the same organism to give more consistency to *in vivo* evaluation of the genotoxicity of environmental pollutants (Al-Sabti and Metcalfe, 1995; Grisolia and Starling, 2001; Pacheco and Santos, 2002; Bolognesi *et al.*, 2006; Kim and Hyun, 2006; Rivero *et al.*, 2008). In this study, *Oreochromis niloticus*, a target species for MT in fish-farming, and *Astyanax bimaculatus*, a non-target species for MT in fish-farming, were exposed to MT, to evaluate its possible genotoxicity. This genotoxic assessment was performed, using these three endpoints simultaneously, from the peripheral erythrocytes of both fish species.

MATERIAL AND METHODS

Test chemical

MT, 90% purity, was purchased from Bioativa pharmacy (Paraná, Brazil), which is commonly used in Brazilian aquaculture dissolved in fish chow. As MT is insoluble in water, it was dissolved in 0.05 mL of absolute ethanol and then diluted in water to give the final concentrations of 0.01, 0.1 and 1.0 mg/L of water.

Chemical analysis of MT in aquarium water

Samples of 50 mL of water were collected from aquariums at the beginning and end of each experiment and stored in refrigerator at 4°C. The analytical method used was an adaptation of (Falone, 2007) for analysis of the MT in water samples and sediments from fish farms. Solid phase extraction was carried out using cartridges with silica gel stationary phase chemically bonded to the nonpolar organic group C18. The cartridges of polypropylene syringes (AccuBondII-Agilent Technologies) contained 1000 mg of stationary phase and a volume of 6mL. Conditions of solid phase extraction

were: C18 – cartridge methanol/water (1:1 v/v); ethanol as solvent for eluting the analyte; volume of 5 mL of solvent for extraction; final volume of 3 mL containing the analyte. Chromatographic analysis was carried out thus: after performing extraction of water samples, high performance liquid chromatography was used as an analytical technique for the quantification of the hormone 17-alpha-methyltestosterone (Perkin Elmer series 200). Chromatographic conditions were: detector UV-Vis, C18 – octadecylsilane, flow rate of 0.4 mL/min, wavelength 236 nm, injected volume of 20 µL. Mobile phase methanol / water - 80:20 (v / v), isocratic mode. Retention time was 11.6 min at room temperature.

Experimental design

O. niloticus and *A. bimaculatus* were obtained from a fish farm in the local municipality, where breeding and health conditions were controlled and monitored constantly. The criterion for fish selection was body length of 7–10 cm for *O. niloticus* and 9 – 12 cm for *A. bimaculatus*. Fish were acclimatized in the Laboratory of Genetic Toxicology at the University of Brasilia/ Brazil for two weeks in tanks of 250 L, with continuously aerated filtered and dechlorinated tapwater. They were maintained at a constant temperature of 26 ± 2 °C and fed *ad libitum* with fish chow, based on soybeans protein. The ammonium level in the water was constantly monitored, and the conductivity and pH were kept at 500 mS and 7.2, respectively. Groups of ten (10) *O. niloticus* and ten (10) *A. bimaculatus* were exposed for 96 h (OECD, 1992) in a glass aquarium of 30 L as follows: control group, ethanol control group at 0.05 mL/L of water, 0.01; 0.1 and 1.0 mg/L of MT. The exposure concentrations were chosen based on the amount of hormone used daily in fish farming tanks. Experiments were carried out in duplicate, ten fishes per replicate. Peripheral blood was obtained by cardiac

puncture with a heparinized syringe and immediately smeared for the MN and NA count, as well as 50 μ L were collected for the CA.

Micronucleus and nuclear abnormalities tests

For each treatment, all ten fish were sampled and three thousand erythrocyte cells with complete cytoplasm were scored per fish (total of 30,000 cells per treatment). Slides were stained by giemsa and analyzed at magnification of 1000X, to score MN and NA. The criteria for the identification of fish micronucleated erythrocytes were as follows: (a) MN should be smaller than one-third of the main nuclei; (b) MN must not touch the main nucleus; (c) MN must be of the same color and intensity as the main nucleus (Hooftman and Raat, 1982). NAs were classified as blebbed, lobed, notched and binucleated (Souza and Fontanetti, 2006).

Comet assay

This assay was performed as described by (Singh *et al.*, 1988), with some modifications for fish as previously reported by (Rivero *et al.*, 2008), as described below. The cell suspension sampled in the microtubule was mixed with 120 μ L low melting agarose (37 °C). Then, 500 μ L of the erythrocyte-agarose suspension was placed on a fully frosted slide pre-coated with standard agarose (1.5%) and covered with a coverslip. The slides were then placed on ice for 15 min to allow complete agarose polymerization and afterwards in a chilled lysing solution (NaCl 2.5 M; EDTA 100 mM; Tris 10 mM; N-laurolyl-sarcosine 1%; Triton-X 1%; DMSO 10%; pH = 10) for at least 1 hour, required to cell membrane rupture, thus exposing the genetic material for analysis. Then the slides were placed on a horizontal gel electrophoresis platform and covered with a chilled alkaline solution consisting of 300 mM NaOH and 1 mM Na₂EDTA (pH = 13), left in the dark at 4 °C for 30 min, and then the DNA was

electrophoresed at 4 °C in the dark for 30 min at 25 V and approximately 350 mA. The slides were gently rinsed twice with 400 mM Tris (pH = 7.5) to neutralize the alkali. Each slide was stained with 30 µL of 20 µg/mL ethidium bromide and covered with a coverslip. One hundred cells from each replicate were randomly chosen (50 from each duplicate slide), and analyzed under an optical fluorescence microscope (Axioskop-2, Carl Zeiss), with a 510-560 nm filter and a 590 nm barrier filter, with a magnification of 400x. For damage index calculation, cells were sorted into four classes, according to tail size. The index of damage (ID) is the sum of classes of the 100 cells analyzed per fish, and may vary from 0 (all cells undamaged – 0X100) to 400 (all cells highly damaged – 4X100). The damage index is based on the length of migration and on the amount of DNA in the tail, and it is considered a sensitive measurement of detectable DNA damage.

Statistical analyses

Statistical analysis was carried out using SPSS (Statistical Package for the Social Sciences) version 15.0. Data were expressed as mean ± SEM (standard error of mean) and values of $p < 0.05$ were considered statistically significant. The continuous variables were tested for normal distribution with Shapiro-Wilk. Possible differences between the groups were investigated by ANOVA or Kruskal-Wallis test (when the data were not normally distributed), followed, respectively, by the Bonferroni or the Mann-Whitney U tests to carry out 2-to-2 comparisons.

RESULTS

MT did not induce MN in *O. niloticus* at the highest exposed concentrations of 0.1 and 1.0 mg/L. However, at the lowest concentration of 0.01 mg/L an increased level of MN was observed ($p < 0.05$) compared with both control groups. Regarding results

of nuclear abnormalities, exposures at 0.01 and 1.0 mg/L were statistically significant when compared only with ethanol control group. Level of NA in the ethanol control group was lower than water control, showing that ethanol did not have an influence on observed results of MT exposures (Table 1). In the CA, MT did not induce DNA damage at three exposure levels. The ethanol control groups showed no influence on DNA damage. In *A. bimaculatus*, MT did not induce DNA damage or NA. However, at the lowest concentration of 0.01 mg/L an increased level of MN was observed ($p < 0.05$) compared with both control groups (Table 2).

Chemical analyses by chromatography of water samples collected from aquariums at the beginning and end of each experiment showed that at the lowest concentration level of 0.01 mg/L, MT was 99.56% consumed (Figure 1), while at the highest level of exposure (1.0 mg/L), 81.69% of hormones were consumed (Figure 2), during the exposure period of 96 h.

DISCUSSION

Genotoxic profile of several androgenic synthetic steroids on male mice chromosomes has been evaluated and testosterone, pyridoandrostene and its derivatives did not induce chromosomal aberrations. However, pyrimidinoandrostene, at both low and high doses, caused a significant increase in the mean value of chromosomal aberrations, showing that synthesized heterocyclic steroid androgens might be investigated for their possible genotoxic effects (Hana et al., 2008). The effects of MT on chromosomal synapsis in *O. niloticus* exposed orally at 50 mg/kg for 30 days has been also examined and MT did not significantly alter the pattern of synaptonemal complex, or number and morphology of chromosomes (Carrasco *et al.*, 1999). In our study, a lower exposure level of 0.01 mg/L showed a weak potential for genotoxicity,

which means induction of MN in both species as well as induction of NA only in *O. niloticus*; these effects were not observed in CA. The CA has been successfully applied in laboratory and field conditions as a non-specific, sensitive, rapid and economical biomarker for the evaluation of genetic damage in natural biota (Jha, 2008), which suggested also that comet assay is a suitable biomarker for detecting oxidized DNA bases in fish exposed to environmental oxidative stressors. Our results of CA showed that the MT was not genotoxic, which means did not induce DNA damage regarding three exposure levels in both species. The MN test in fish peripheral erythrocyte cells is a suitable genetic biomarker for detecting mutagens in aquatic environment. Since erythrocytes in teleost fish are nucleated cells, scoring micronuclei as an endpoint of genotoxicity has been widely used. Thus, many studies in the literature have shown micronucleus induction after exposure to different water pollutants in field and laboratory conditions (Hooftman and Raat, 1982; Al-Sabti and Metcalfe, 1995; Silva *et al.*, 2011). Disturbances in the DNA molecule such as adducts, single and double-strand breaks might cause permanent damages that induces micronucleus, being then an excellent biomarker to evaluate any permanent damage in the genetic material (Vanzella *et al.*, 2007). Increased MN frequencies in blood cells of neotropical fish *Prochilodus lineatus* exposed to diesel water soluble fraction under acute and subchronic conditions, demonstrated as an efficient endpoint for detecting mutagenic compounds in water (Vanzella *et al.*, 2007).

Sex steroid hormones generally respond negatively to standard genotoxicity assays, but are considered epigenetic carcinogens because can modify gene expression (Martelli *et al.*, 2003). (Petridis *et al.*, 2009) evaluated the genotoxicity of estradiol, ethinylestradiol and nonylphenol through CA on *Scrobicularia plana*, an estuarine clam. They found genotoxic effect only at the highest exposure level. Exposure to MT

at low concentration may cause a direct stimulation of receptor pathway, following its activation, and consequently cell disturbances. This could explain the results obtained in our study, where only the lowest concentration showed a potential for genotoxicity in respect to the higher concentration (Calabrese and Mattson, 2011). On the other hand, due to its rapid degradation in water, organisms are exposed only to low concentrations. As there was no dose-response effect, we can suspect that MT has a low risk of genotoxicity. The ethanol used did not exceed 0.001% in the water and we observed that did not interfere with the results. In field situations, pollutants dissolved or suspended in the water require an appropriate native species as *in situ* bioindicator. *A. bimaculatus*, a potamodromous native fish species, commonly known as the ‘*Astyanax bimaculatus*’, is widely abundant throughout South America. The species, besides playing a central role in riverine food webs, is sensitive to environmental degradation. These characteristics make it an excellent bio-indicator, commonly present in Brazilian ponds and rivers and being a potential non-target of this androgen (Silva *et al.*, 2010).

Fish-farm units in which fish are fed with MT-treated chow may exert environmental impacts when water is discharged. In a study in which sexually undifferentiated *Oreochromis niloticus* were fed radiolabeled (^3H -) MT for 30 days, and 10 days later this was withdrawn; only trace amounts of ^3H -MT metabolites were then detected. Remaining radioactivity was located mainly in the liver. Normally, *Oreochromis niloticus* are marketed as gutted fish or as fillets (Goudie *et al.*, 1986; Curtis *et al.*, 1991; Green and Teichert-Coddington, 2000). Unmetabolized androgen and its metabolites may accumulate in water, affecting non-target fish species. MT and metabolites discharged into receiving waters are expected to biotransform. Evidence for this transformation was present in our chromatographic studies, showing that in a period of 96 h MT was almost completely degraded in laboratory conditions, comparing the

peaks in figure A with figure B. Degradation of MT in natural conditions is expected to be faster due to bacterial decomposition and photodegradation by sunlight. Currently, MT is not approved for use on Brazilian fish-farms to induce male monosex. Regarding that MT have induced MN only at the lower exposure level of 0.01 mg/L in both species, as well as NA only in *O. niloticus*, and do not induced comets, it could be concluded this compound show a low risk for genotoxicity. Chemical analyses by chromatography of water samples collected from aquariums at the beginning and end of each experiment showed that at the lowest concentration level of 0.01 mg/L, MT was 99.56% consumed, while at the highest level of exposure (1.0 mg/L), 81.69% of hormones were consumed during the exposure period of 96 h. In conclusion, this results suggests that MT do not show genotoxicity to both fish species and that this hormone in water samples has a fast rate of consumption/degradation, being available only at very low concentration level and in a short-time.

ACKNOWLEDGEMENTS

Research was supported by the Brazilian National Council for Technological and Scientific Development (CNPq), grant 578541/2008-4, and the University of Brasília. Carla L. G. Rivero-Wendt, Fabiula S. Amorim and Verônica A. G. da Silva received a fellowship from CNPq, and Ana Luisa Miranda-Vilela had a post-doc fellowship from the Brazilian Ministry of Education (CAPES).

REFERENCES

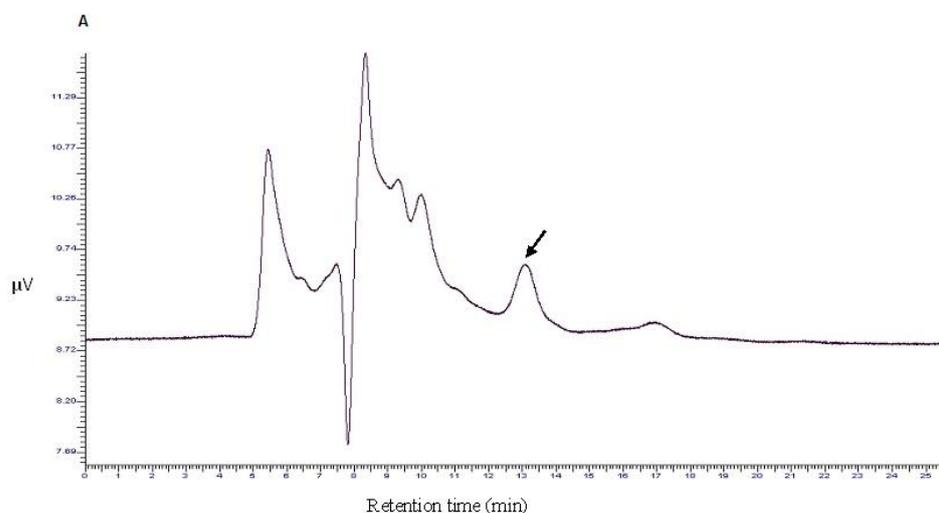
Al-Sabti, K., Metcalfe, C.D., 1995. Fish micronuclei for assessing genotoxicity in water. *Mutation Research/Genetic Toxicology* 343, 121-135.

- Bolognesi, C., Perrone, E., Roggieri, P., Pampanin, D.M., Sciutto, A., 2006. Assessment of micronuclei induction in peripheral erythrocytes of fish exposed to xenobiotics under controlled conditions. *Aquatic Toxicology* 78, S93-S98.
- Calabrese, E.J., Mattson, M.P., 2011. Hormesis provides a generalized quantitative estimate of biological plasticity. *J Cell Commun Signal* 5, 25-38.
- Carrasco, L.A.P., Penman, D.J., A., V.S., Bromage, N., 1999. The effects of oral administration with 17 α -methyltestosterone on chromosomal synapsis in *Oreochromis niloticus* (Pisces, Cichlidae). *Mutation Research* 430, 87-98.
- Curtis, L.R., Diren, F.T., Hurley, M.D., Seim, W.K., Tubb, R.A., 1991. Disposition and elimination of 17 α -methyltestosterone in Nile *Oreochromis niloticus* (*Oreochromis niloticus*). *Aquaculture* 99, 193-201.
- Falone, S.Z., 2007. Desenvolvimento de métodos para a determinação do hormônio 17-alfa-metiltestosterona em amostras de água e de sedimentos de piscicultura: ensaios ecotoxicológicos com cladóceros. Tese de doutorado em Ciências da Engenharia Ambiental. Universidade de São Paulo., 155.
- Goudie, C.A., Shelton, W.L., Parker, N.C., 1986. Tissue distribution and elimination of radiolabelled methyltestosterone fed to adult blue *Oreochromis niloticus*. *Aquaculture* 58, 227-240.
- Green, B.W., Teichert-Coddington, D.R., 2000. Human Food Safety and Environmental Assessment of the Use of 17 α -Methyltestosterone to Produce Male *Oreochromis niloticus* in the United States. *Journal of the World Aquaculture Society* 31, 337-357.
- Grisolia, C.K., Rivero, C.L.G., Starling, F.L.R.M., Silva, I.C.R.d., Barbosa, A.C., Dorea, J.G., 2009. Profile of micronucleus frequencies and DNA damage in different species of fish in a eutrophic tropical lake. *Genetics and Molecular Biology* 32, 138-143.
- Grisolia, C.K., Starling, F.L.R.M., 2001. Micronuclei monitoring of fishes from Lake Paranoá, under influence of sewage treatment plant discharges. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis* 491, 39-44.
- Hana, H.Y., Khalil, W.K.B., Elmakawy, A.I., Elmegeed, G.A., 2008. Androgenic profile and genotoxicity evaluation of testosterone propionate and novel synthesized heterocyclic steroids. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* 110, 284-294.

- Hooftman, R.N., Raat, W.K., 1982. Induction of nuclear anomalies (micronuclei) in the peripheral blood erythrocytes of the eastern mudminnow *Umbra pygmaea* by ethyl methanesulphonate. *Mutation Research* 104, 147-152.
- Jha, A.N., 2008. Ecotoxicological applications and significance of the comet assay. *Mutagenesis* 23, 207-221.
- Joosten, H.F.P., van Acker, F.A.A., van den Dobbelsteen, D.J., Horbach, G.J.M.J., Krajnc, E.I., 2004. Genotoxicity of hormonal steroids. *Toxicology Letters* 151, 113-134.
- Kim, I.-Y., Hyun, C.-K., 2006. Comparative evaluation of the alkaline comet assay with the micronucleus test for genotoxicity monitoring using aquatic organisms. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 64, 288-297.
- Martelli, F.M., Angiola, M., Reimann, R., Brambila, G., 2003. Species, sex and inter-individual differences in DNA repair induced by nine steroids in primary cultures of rat and human hepatocytes. *Mutation Research* 536, 69-78.
- Moens, L.N., van der Ven, K., Van Remortel, P., Del-Favero, J., De Coen, W.M., 2006. Expression Profiling of Endocrine-Disrupting Compounds Using a Customized *Cyprinus carpio* cDNA Microarray. *Toxicological Sciences* 93, 298-310.
- OECD, 1992. Test No 203: Fish Acute Toxicity Test. Organization for Economic Co-Operation and Development.
- Pacheco, M., Santos, M.A., 2002. Biotransformation, genotoxic, and histopathological effects of environmental contaminants in European eel (*Anguilla anguilla* L.). *Ecotoxicology and Environmental Safety* 53, 331-347.
- Pandian, T.J., Sheela, S.G., 1995. Hormonal induction of sex reversal in fish. *Aquaculture* 138, 1-22.
- Papoulias, D.M., Noltie, D.B., Tillitt, D.E., 2000. Effects of methyl testosterone exposure on sexual differentiation in medaka, *Oryzias latipes*. *Marine Environmental Research* 50, 181-184.
- Petridis, P., Jha, A.N., Langston, W.J., 2009. Measurements of the genotoxic potential of (xeno-)oestrogens in the bivalve mollusc *Scrobicularia plana*, using the Comet assay. *Aquatic Toxicology* 94, 8-15.
- Rivero, C., Barbosa, A., Ferreira, M., Dorea, J., Grisolia, C., 2008. Evaluation of genotoxicity and effects on reproduction of nonylphenol in *Oreochromis niloticus* (Pisces: cichlidae). *Ecotoxicology* 17, 732-737.

- Silva, R.R.P., Pires-Junior, O.R., Grisolia, C.K., 2010. Toxicity and genotoxicity in *Astyanax bimaculatus* (Characidae) induced by microcystins from a bloom of *Microcystis* spp. *Genetics and Molecular Biology* 33, 750-755.
- Silva, R.R.P., Pires, O.R., Grisolia, C.K., 2011. Genotoxicity in *Oreochromis niloticus* (Cichlidae) induced by *Microcystis* spp bloom extract containing microcystins. *Toxicon* 58, 259-264.
- Simoniello, M., Gigena, F., Poletta, G., Loteste, A., Kleinsorge, E., Campana, M., Scagnetti, J., Parma, M., 2009. Alkaline Comet Assay for Genotoxic Effect Detection in Neotropical Fish &i&tProchilodus lineatus&i&t; (Pisces, Curimatidae). *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 83, 155-158.
- Singh, N.P., McCoy, M.T., Tice, R.R., Schneider, E.L., 1988. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Experimental Cell Research* 175, 184-191.
- Vanzella, T.P., Martinez, C.B.R., Cólus, I.M.S., 2007. Genotoxic and mutagenic effects of diesel oil water soluble fraction on a neotropical fish species. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis* 631, 36-43.
- Zerulla, M., Länge, R., Steger-Hartmann, T., Panter, G., Hutchinson, T., Dietrich, D.R., 2002. Morphological sex reversal upon short-term exposure to endocrine modulators in juvenile fathead minnow (*Pimephales promelas*). *Toxicology Letters* 131, 51-63.

Figure Captions



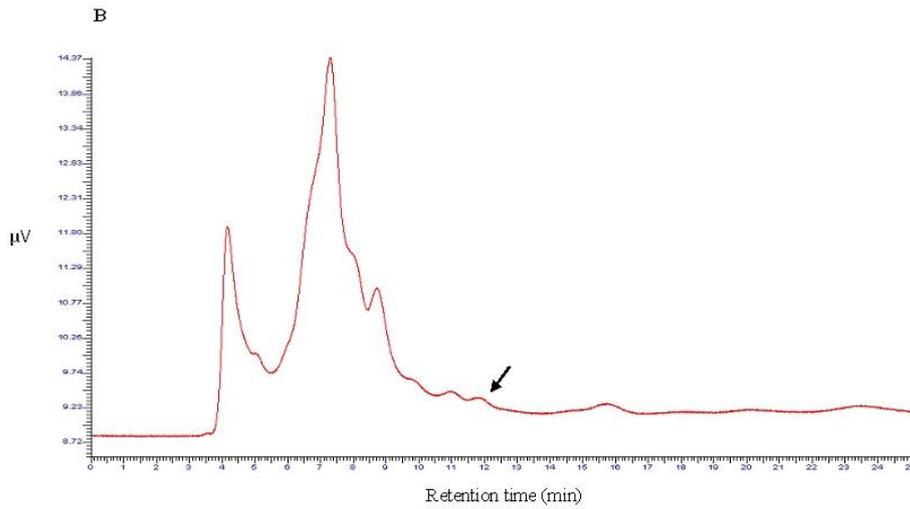
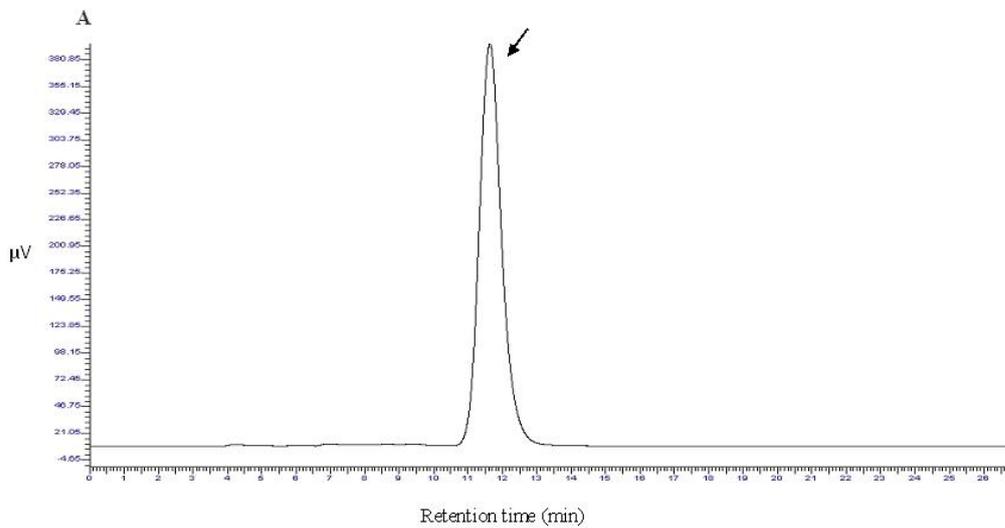


Figure 1. Chromatogram from aquarium water samples of group 3 (0.01 mg/L), taken at the beginning of exposure (A) and after 96 h exposure (B). There was a consumption of 99.56% of the hormone in the period of 96 h.

Arrow shows the peak of MT at retention time between 12 and 13 min.



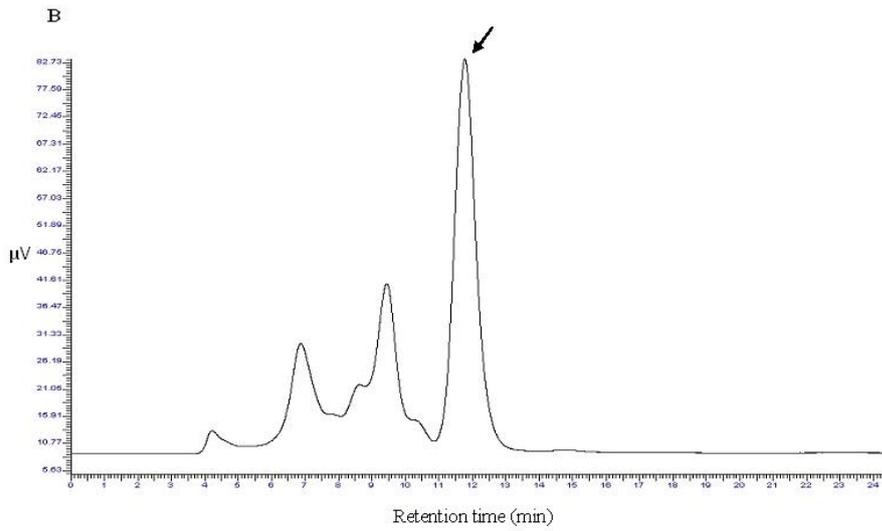


Figure 2. Chromatogram from aquarium water samples of group 5 (1.0 mg/L), taken at the beginning of exposure (A) and after 96 h exposure (B). There was a consumption of 81.69% of the hormone in the period of 96 h.

Arrow shows the peak of MT at retention time between 12 and 13 min.

Table 1. Genotoxicity in *O. niloticus*, showing results of MN, NA and comet assay after 96 h of exposure to MT.

Group	Fish	Treatment	MN/3000cells	NA/1000cells	DNA damage
1	10	Control	0.10 ± 0.10 ^a	5.00 ± 1.42 ^a	61.00 ± 3.96
2	10	Ethanol	0.09 ± 0.09 ^c	0.73 ± 0.63 ^{b,c}	68.50 ± 3.70
3	10	0.01 mg/L	1.43 ± 0.53 ^{b,d,e}	12.43 ± 4.55 ^d	59.14 ± 6.73
4	10	0.1 mg/L	0.63 ± 0.26 ^d	7.88 ± 3.50	69.56 ± 6.68
5	10	1.0 mg/L	0.25 ± 0.16 ^f	11.13 ± 4.84 ^d	79.79 ± 2.31
P-values			0.010	0.003	0.043

MN= micronucleus; NA= nuclear abnormality. Data were expressed as mean ± standard error of mean (SEM). P-values were generated by the Kruskal-Wallis test. The lower-case letters indicate significant differences detected by the Mann-Whitney in the 2-to-2 comparisons (a ≠ b; c ≠ d; e ≠ f).

Table 2. Genotoxicity in *A. bimaculatus*, showing results of MN, NA and comet assay after 96 h of exposure to MT.

Group	Fish	Treatment	MN/3000cells	NA/1000cells	DNA damage
1	10	Control	0.22 ± 0.09 ^a	2.70 ± 0.83	59.18 ± 5.73
2	10	Ethanol	0.81 ± 0.31 ^c	3.71 ± 0.71	43.05 ± 6.67 ^a
3	10	0.01 mg/L	2.25 ± 0.50 ^{b,d,e}	2.30 ± 0.83	62.88 ± 5.04 ^b
4	10	0.1 mg/L	0.00 ± 0.00 ^{b,f,g}	1.94 ± 0.60	74.10 ± 3.36 ^b
5	10	1.0 mg/L	0.56 ± 0.22 ^{f,h}	3.38 ± 0.75	72.23 ± 6.22 ^b
P-values			0.000	0.162	0.011

MN= micronucleus; NA= nuclear abnormality. Data were expressed as mean ± standard error of mean (SEM). P-values were generated by the Kruskal-Wallis test. The lower-case letters indicate significant differences detected by the Mann-Whitney in the 2-to-2 comparisons (a ≠ b; c ≠ d; e ≠ f).