

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO OESTE DO PARANÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO STRICTO SENSU EM CONSERVAÇÃO E
MANEJO DE RECURSOS NATURAIS – NÍVEL MESTRADO

ALINE NARDELLI

ESTUDO DOS EFEITOS DOS AGROTÓXICOS PROCLORAZ E PIRIPROXIFEM
SOBRE O DESENVOLVIMENTO DE *Megaleporinus macrocephalus*
(ANOSTOMIDAE: CHARACIFORMES)

CASCADEL-PR

02/2019

ALINE NARDELLI

ESTUDO DOS EFEITOS DOS AGROTÓXICOS PROCLORAZ E PIRIPROXIFEM
SOBRE O DESENVOLVIMENTO DE *Megaleporinus macrocephalus*
(ANOSTOMIDAE: CHARACIFORMES)

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação *Stricto Sensu* em Conservação e Manejo de Recursos Naturais – Nível Mestrado, do Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, da Universidade estadual do Oeste do Paraná, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Conservação e Manejo de Recursos Naturais

Área de Concentração: Ciências Ambientais

Orientador: Prof. Dr. Vladimir Pavan Margarido

Coorientadora: Profa. Dra. Rafaela Maria Moresco

CASCAVEL-PR

02/2019

Ficha de identificação da obra elaborada através do Formulário de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da Unioeste.

Nardelli, Aline

Estudo dos efeitos dos agrotóxicos procloraz e piriproxifem sobre o desenvolvimento de *Megaleporinus macrocephalus* (Anostomidae: Characiformes) / Aline Nardelli; orientador(a), Vladimir Pavan Margarido; coorientador(a), Rafaela Maria Moresco, 2019.

81 f.

Dissertação (mestrado), Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Campus de Cascavel, Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, Programa de Pós-Graduação em Conservação e Manejo de Recursos Naturais, 2019.

1. Desenvolvimento de peixes. 2. Xenobióticos. 3. Disruptores endócrinos. 4. Malformações. I. Margarido, Vladimir Pavan. II. Moresco, Rafaela Maria. III. Título.

ALINE NARDELLI

**ESTUDO DOS EFEITOS DOS AGROTÓXICOS PROCLORAZ E PIRIPROXIFEM
SOBRE O DESENVOLVIMENTO DE *Megaleporinus macrocephalus*.**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Conservação e Manejo de Recursos Naturais em cumprimento parcial aos requisitos para obtenção do título de Mestra em Conservação e Manejo de Recursos Naturais, área de concentração Ciências Ambientais, linha de pesquisa Biologia Comparada e Indicadores de Qualidade No Ambiente Aquático, APROVADO(A) pela seguinte banca examinadora:



Rafaela Maria Moresco

Universidade Estadual do Oeste do Paraná - Campus de Cascavel (UNIOESTE)



Jociléia Thums Konerat

Universidade Estadual do Oeste do Paraná - Campus de Cascavel (UNIOESTE)



Vanessa Bueno da Silva

Universidade Estadual do Oeste do Paraná - Campus de Cascavel (UNIOESTE)

Cascavel, 20 de fevereiro de 2019.

Dedico este trabalho às pessoas que me apoiaram neste processo: meu esposo Alexandre e aos meus pais Elio e Tereza.

AGRADECIMENTOS

À Universidade Estadual do Oeste do Paraná, por fornecer suporte físico para a realização da pesquisa e desenvolvimento de minha formação. Em especial ao Programa de Pós-Graduação em Conservação e Manejo de Recursos Naturais, à Coordenação, aos professores membros do programa por todos os ensinamentos, conselhos e apoio essenciais à minha formação. Muito obrigada, tenho muito carinho e gratidão por tudo.

À CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Ensino Superior) e CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico) pelo apoio financeiro.

Ao meu orientador, professor Dr. Vladimir Pavan Margarido sou muito grata pela confiança, pelos ensinamentos ao longo de todo esse percurso, pelo apoio ao desenvolvimento desta pesquisa, a qual representou um grande desafio.

A minha coorientadora professora Dra. Rafaela Maria Moresco por ter participado de forma essencial para a realização desta pesquisa, colaborando desde o delineamento até a execução de cada passo para obter o resultado final. Agradeço por todas as orientações que permitiram que eu crescesse nesse processo, buscando melhorar a minha formação, e mesmo diante dos obstáculos ofereceu suporte para que se chegasse a conclusão deste lindo trabalho.

Aos colegas de laboratório de Biologia e Conservação de Anamniotas da Unioeste: Anahiê, Simone, Leonardo, Lucas, Gabriela, Amanda, Luiz, Evandro, Samantha e Mariane, pelos momentos de aprendizado proporcionados pela relação de trabalho e de amizade.

À professora Dr. Jocicléia Thums Konerat pela atenção, pela amizade, pelos conhecimentos compartilhados e pelo carinho ao dar seus conselhos diante das adversidades que a pesquisa pode oferecer.

Ao professor Dr. Roberto Laridondo Lui pelas experiências que compartilhou, pelas palavras de força e apoio, por dar oportunidades de desenvolver outras habilidades que a pesquisa pode exigir.

Ao Dr. Leonardo Paiz pela atenção e pelo apoio, compartilhando sua experiência adquirida em todo o percurso de sua formação.

À Anahiê Bortoncello Prestes por dividir momentos que variaram de alegrias a frustrações, por incentivar quando eu precisei e por ter se mostrado mais que uma amiga, uma irmã, amizade que levarei com certeza para toda a vida.

À Evelyn pelas conversas, pela troca de ideias, experiências, e incentivos que nos permitiram chegar até aqui.

Aos meus colegas de mestrado que compartilharam experiências, que se tornaram especial para mim, cada um com sua característica única, em especial a Mel, a Dani, a Maiara e a Evelyn.

À minha família por todo apoio e motivação. Ao meu esposo Alexandre por ter me ouvido quando precisei, por ter apoiado de forma incondicional meu desenvolvimento profissional, por ter apoiado meus sonhos e mesmos nos momentos difíceis teve palavras para incentivar. Por demonstrar que cada dia a

vida deve ser vivida, e que eu posso conciliar estudos, família, momentos de prazer e de alegria em meio a um turbilhão de informações. Meu muito obrigada!!

Aos meus Pais, Elio e Tereza por terem me dado a vida, pelos ensinamentos dos valores morais e éticos que me fazem ser o que eu sou como pessoa e reflete no meu profissional. A realização desse sonho também é de vocês, pois sei que sempre quiseram o melhor para mim e torceram para que eu vencesse mais essa etapa.

Aos pais do Alexandre, Ingo e Loemi que acabaram se tornando apoiadores e vibraram a cada conquista.

Aos meus irmãos Douglas, Albani e Carine que representam forças para mim em qualquer momento.

A todos os que, de alguma forma, se envolveram em etapas do processo de minha formação, e que eventualmente não foram citados, meu muito obrigada!!!

“Tenho a impressão de ter sido uma criança brincando à beira-mar, divertindo-me em descobrir uma pedrinha mais lisa ou uma concha mais bonita que as outras, enquanto o imenso oceano da verdade continua misterioso diante de meus olhos”.

(Isaac Newton)

SUMÁRIO

Resumo.....	i
Abstract	ii
CAPÍTULO 1: Indução de malformações ósseas em peixes neotropicais (<i>Megaleporinus macrocephalus</i>) expostos ao piriproxifem durante o estágio inicial de desenvolvimento	155
RESUMO.....	166
ABSTRACT	177
INTRODUÇÃO	20
MATERIAIS E MÉTODOS.....	22
RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	244
CONCLUSÃO.....	288
REFERÊNCIAS.....	299
Capítulo 2: Efeito de procloraz e piriproxifem no desenvolvimento sexual de piapara (<i>Megaleporinus macrocephalus</i>)	41
RESUMO.....	42
ABSTRACT	43
INTRODUÇÃO	466
MATERIAIS E MÉTODOS.....	488
RESULTADOS	50
DISCUSSÃO	52
REFERÊNCIAS.....	566

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO 1

Figura 1. Imagem de estereoscopia e raio X de exemplares de *M. macrocephalus* com presença de malformações. Através de técnica de diafanização pode-se comprovar em registro de escoliose e cifose (A e B); desenvolvimento reduzido do membro anterior (C) e flexão anormal da nadadeira caudal (D). Através da técnica de raio X evidenciou-se as alterações na morfologia e organização das vértebras de exemplar com escoliose e cifose (F) em comparação com animal normal (E). Barra = 1cm..... 39

Figura 2. Fotografia de exemplares de *M. macrocephalus* evidenciando as nadadeiras. Em A, B e C vista ventral, em D, E e F vista lateral. Em A e D indivíduos do grupo controle; em B ausência da nadadeira pélvica; em C e E malformações da nadadeira peitoral. Barra = 1cm..... 40

CAPÍTULO 2

FIGURA 1 - Cromossomos metafásicos de *M. macrocephalus* corados por Giemsa. (a) Cromossomos metafásicos de machos (b) Cromossomos metafásicos de fêmeas. Em (b) a seta preta evidencia o cromossomo W. Barra=10µm. 62

FIGURA 2 - Cortes histológicos de gônadas de *M. macrocephalus* aos 240 dias após a eclosão. (A) Testículo do macho do grupo controle (B) Ovário de fêmea do grupo controle (C) Testículo do macho do grupo tratado com procloraz (D) Ovário de fêmea do grupo tratado com procloraz (E) Testículo do macho do grupo tratado com piriproxifem (F) Ovário de fêmea do grupo tratado com piriproxifem (E) Testículo do macho do grupo tratado com a mistura (F) Ovário de fêmea do grupo tratado com a mistura. **gon**-espermatogônia, **oci1**-espermatócito primário, **oci2**-espermatócito secundário, **ati**-espermátide, **oid**-espermatozoide, **oog**-oogônia, **mat**-ovócito em maturação, **per**-ovócito perinucleolar, **nuc**-ovócito nucleolar, **deg**-ovócito em degeneração. Coloração hematoxilina-eosina. Barra (A,C,E,G) 200 µm, (B,D,F,H) 100 µm. 63

FIGURA 3 - Cortes histológicos de gônada de *M. macrocephalus* aos 240 dias após a eclosão. (A) Testículo do macho do grupo procloraz com presença de folículos ovarianos testiculares (B) Ovário de fêmea com invasão linfocitária (C) Testículo de indivíduo ZW, sexo genético feminino, tratado com piriproxifem (D) Testículo de indivíduo ZW, sexo genético feminino, tratado com a mistura. **gon**-espermatogônia, **oci1**-espermatócito primário, **oci2**-espermatócito secundário, **oid**-espermatozoide, **oog**-oogônia, **mat**-ovócito em maturação, **per**-ovócito perinucleolar, **nuc**-ovócito nucleolar, **deg**-ovócito em degeneração. Coloração hematoxilina-eosina. Barra (A,B) 200 µm, (C,D) 100 µm. 64

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 1

Tabela 1 - Frequência de mal formações (%) em <i>M. macrocephalus</i> do grupo controle e expostos ao piriproxifem (200ug/l).....	38
---	----

LISTA DE GRÁFICOS

CAPÍTULO 1

Gráfico 1. Frequência de malformações observadas em <i>M. macrocephalus</i>	38
---	----

CAPÍTULO 2

GRÁFICO 1 - Frequência de indivíduos machos, fêmeas e intersexo por grupo..	65
---	----

RESUMO

Os xenobióticos são compostos químicos estranhos aos organismos encontrados de forma não natural. Os pesticidas são exemplos de xenobióticos, e têm sua utilização na agricultura para o controle de pragas e de vetores de doenças. Estes compostos formam um grupo de substâncias químicas muito diverso, o que faz com que possam ter diferentes modos de ação, inclusive como disruptores endócrinos. O procloraz é um composto amplamente estudado com efeitos sobre organismos não alvo de forma não específica, podendo afetar a reprodução, o desenvolvimento e a taxa de sobrevivência. O piriproxifem, por sua vez, apresenta poucos estudos, mas já tem demonstrado um amplo espectro de efeitos, mesmo a doses reduzidas. Tem levado ao aumento da mortalidade, malformações, além de interagir com outros compostos. Dessa forma existe a preocupação de que estes compostos cheguem até os corpos d'água afetando organismos como os anamniotas, que tem seu ciclo de vida associado a estes locais. O objetivo deste trabalho foi avaliar os efeitos do procloraz e piriproxifem, de forma isolada e combinada, sobre o desenvolvimento larval de *Megaleporinus macrocephalus*, uma espécie gonocórica, com sistema de cromossomos sexuais ZZ/ZW. Foram observados dentre os indivíduos do grupo procloraz, machos com presença de folículos ovarianos testiculares. Nos indivíduos do grupo tratado com piriproxifem houve presença de indivíduos com reversão do sexo feminino para o masculino, mesmo resultado foi encontrado no grupo de indivíduos expostos a mistura dos dois compostos. Nos tratamentos piriproxifem e mistura foi observado a presença de malformações ósseas de coluna vertebral, com presença de cifose e escoliose e malformações nas nadadeiras caudal, peitorais e pélvicas, a última com presença apenas do broto das nadadeiras. Estes dados reforçam a necessidade de novos estudos do composto piriproxifem, visto que se mostrou não específico e com efeitos teratogênicos mesmo em doses muito reduzidas.

PALAVRAS-CHAVE: doses reduzidas, malformações, reversão sexual, xenobióticos.

Effects study of pyriproxyfen and prochloraz pesticides on *Megaleporinus macrocephalus* (Anostomidae: Characiformes) development

ABSTRACT

Xenobiotics are chemical compounds foreign to the organism, found in an unnatural way. Pesticides are examples of xenobiotics, and used in agriculture for the control of pests and vectors of diseases. These compounds form a very diverse group of chemicals that have different modes of action like endocrine disruptors. Prochloraz is a widely studied compound with effects on non-target organisms in a nonspecific way, which may affect reproduction, development and survival rate. Pyriproxyfen, for its part, has few studies, but has already demonstrated a broad spectrum of effects, even at reduced doses, leading to increased mortality, malformations, and interacting with other compounds. Thus, there is a concern that these compounds reach to the aquatic environment affecting anamniotes, which have their life cycle associated with these places. The objective of this work was to evaluate the effects of prochloraz and pyriproxyfen, either alone or in combination, on the larval development of *Megaleporinus macrocephalus*, a gonocoric species with ZZ / ZW sexual system. Male individuals with the presence of testicular ovarian follicles were observed in the prochloraz group. The group treated with pyriproxyfen had intersex individuals with reversion from female to male, coinciding with the group of individuals exposed to the mixture of the two compounds. In the pyriproxyfen and combination treatments, spinal bone malformations were observed, with the presence of kyphosis, scoliosis, and malformations in the caudal, pectoral and pelvic fins, the latter with the presence of only a limb bud. These data point to the need for further studies of the compound pyriproxyfen, since it was unspecific and with effects at very small doses in both reproductive and teratogenic aspects.

KEY WORDS: lower doses, malformations, sexual reversion, xenobiotic.

CAPÍTULO 1: Indução de malformações ósseas em peixes neotropicais (*Megaleporinus macrocephalus*) expostos ao piriproxifem durante o estágio inicial de desenvolvimento

Aline Nardelli^a, Anahiê Bortoncello Prestes^b, José Luís Olivan Birindelli^c, Rafaela Maria Moresco^a, Vladimir Pavan Margarido^{a,b*}

^a Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, Rua Universitária, 1619, Cascavel, Paraná, Brasil

^b Universidade Estadual de Maringá. Av. Colombo, 5790, Maringá, Paraná, Brasil

^c Universidade Estadual de Londrina. Rodovia Celso Garcia Cid - PR 445 Km 380, Londrina, Paraná, Brasil

*Autor correspondente: Tel. +55 45 3220-3235

Email: vladimir.margarido@unioeste.br

Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Programa de Pós-Graduação em Conservação e Manejo de Recursos Naturais, Rua Universitária 2069, Jardim Universitário, 85819-110 Cascavel, PR, Brasil

RESUMO

O piriproxifem é um composto utilizado no controle de pragas agrícolas e, nos últimos anos, seu uso foi ampliado para o controle do mosquito *Aedes aegypti*, vetor de doenças neotrópicas como dengue, febre chikungunya, febre zika e febre amarela. Nos insetos, o piriproxifem age como análogo de hormônio juvenil, inibindo a embriogênese e o desenvolvimento das características adultas através da inibição da ecdisona. Apesar de seu uso aprovado, é considerado altamente tóxico e não há concordância sobre os efeitos relacionados ao tempo de exposição e a dose utilizada. O piriproxifem tem demonstrado efeitos, em organismos não alvo, na taxa de sobrevivência, com efeitos sobre o comportamento, e sobre a morfologia durante o desenvolvimento. Neste estudo *Megaleporinus macrocephalus* foi exposto a uma dose de 2,5µg/L de piriproxifem no 8º dia após eclosão e avaliado quanto a presença de malformações ósseas. Do total dos indivíduos, 43% apresentaram algum tipo de malformação óssea: 24% apresentaram escoliose e cifose da coluna vertebral, 9% apresentaram redução da nadadeira peitoral, 5% apresentaram malformação na nadadeira anal e 5% ausência da nadadeira pélvica de pelo menos um dos lados do corpo. Estes dados reforçam a ação do piriproxifem como um teratogênio, atuante no desenvolvimento larval em doses reduzidas, que podem ser encontradas no ambiente. Nosso estudo alerta que estas moléculas podem interagir no mecanismo de expressão gênica mediada pelo ácido retinoico, importante morfógeno durante a embriogênese e organogênese, o que reforça a urgência em estudar como interagem as moléculas, além de propor cautela no uso do composto no controle de vetores até que se tenha conhecimento sobre sua segurança.

Palavras-chave: Bioindicadores Aquáticos, Desenvolvimento, Malformações do Sistema Esquelético, Xenobióticos.

ABSTRACT

Pyriproxyfen is a compound used to control agricultural pests and in the last few years its use has been broadened to control of the mosquito *Aedes aegypti*, vector of neotropical diseases such as dengue fever, chikungunya fever, zika fever and yellow fever. In insects, pyriproxyfen acts as a juvenile hormone analogue, inhibiting embryogenesis and the development of characteristics of adults through the inhibition of ecdysone. Despite its approved use, it is considered highly toxic and there is no accord between the effects related to the time of exposure and the dose used. Pyriproxyfen has demonstrated effects on the survival rate, behavior, and morphology during development of non-target organisms. Therefore, in this study *Megaleporinus macrocephalus* was exposed to a dose of 2.5µg/L of pyriproxyfen on the 8th day after hatching and the presence of bone malformations was evaluated. Out of the total of the individuals, 43% had some type of bone malformation: 24% had scoliosis and kyphosis of the vertebral column, 9% had reduction of pectoral fins, 5% had malformation in the anal fin and 5% absented at least one of the pelvic fins. These data reinforce the action of pyriproxyfen as a teratogen, acting on larval development in reduced doses, which can be found in the environment. Our study warns that these molecules might interact in the mechanism of gene expression mediated by retinoic acid, important morphogen during embryogenesis and organogenesis. Furthermore, not only does it reinforce the urgency to study how these molecules interact but also suggests caution when using the compound as a controller for vectors until the true security is acknowledged.

Key words: Aquatic Bioindicators, Development, Skeletal System Malformations, Xenobiotics.

Este trabalho teve o financiamento do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e Fundação de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico do Paraná (Fundação Araucária). A coleta dos animais teve a permissão do Instituto Chico Mendes de Conservação de Biodiversidade (ICMBio): Licença permanente do Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade (SISBIO) para coleta e transporte de peixes (10522-1). O experimento foi realizado no laboratório de Biologia de Anamniotas da Unioeste – *Campus* Cascavel, com aprovação do Comitê de Ética no uso de animais da Unioeste: 16-03-2017 – CEUA/Unioeste).

Destaques

- Exemplos de *Megaleporinus macrocephalus* foram expostos a uma única dose de 2,5µg/L de piriproxim em no 8º dia após eclosão;
- A dose testada foi capaz de induzir a malformações ósseas em *M. macrocephalus* do tipo escoliose, cifose, ausência/ou redução de nadadeiras foram encontradas;
- Foi identificado caráter inespecífico da ação do piriproxim como um teratogênio;
- Efeitos do piriproxim sobre organismos não alvos, indiretamente expostos, devem ser esclarecidos, devido à ampla utilização do mesmo no controle do mosquito *Aedes aegypti*, vetor de doenças urbanas.

INTRODUÇÃO

Nos últimos anos, o nível de compostos xenobióticos nos ecossistemas aquáticos tem aumentado em larga escala, o que está associado ao crescimento da indústria e da agricultura (Cajaraville et al., 2000; Red et al., 2011). Poluentes ambientais como metais, pesticidas e outros produtos orgânicos, representam grandes riscos para muitos organismos aquáticos (Scott and Sloman, 2004).

O piriproxifem é um pesticida usado no manejo de insetos na agricultura, em cultivos não alimentares e gramados, e no controle de pulgas e carrapatos em animais de estimação (Hallman et al., 2015). Este composto tem sido utilizado nos últimos anos como estratégia para combater a proliferação do mosquito *Aedes aegypti*, vetor responsável por doenças tropicais como dengue, febre chikungunya, febre zika e febre amarela (Sihuincha et al., 2005). A dengue é destaque como um problema internacional de saúde pública (Wilder-Smith and Gubler, 2008) e, no Brasil, desde 2014 o piriproxifem vem sendo usado em programas de controle do vetor a uma dose de 0,01mg de ingrediente ativo/litro de água (Brasil. Ministério da Saúde, 2014), dose baseada na avaliação toxicológica da Organização Mundial da Saúde (OMS) (WHO, 2018).

O piriproxifem pertence ao grupo químico éter piridiloxipropílico, a base de piridina. Assim como o fenoxicarbe, o hidropreno, o metopreno e o quinopreno, atua como análogo de hormônio juvenil (HJ) em insetos (IRAC, 2017; Sullivan and Goh, 2008). Estes análogos possuem moléculas quimicamente estáveis e agem, nos insetos, através da competição pelos sítios de ligação dos receptores do hormônio juvenil, de forma que uma exposição contínua a estas moléculas leva à manutenção do estágio imaturo, pois inibe a ação de ecdisona (Sullivan and Goh, 2008). Além disso, estes compostos afetam a reprodução de insetos, alterando as taxas de fecundidade e fertilidade, e impactando as gerações seguintes, além de acarretar em aumento na mortalidade (Singh and Kumar, 2015; Tay and Lee, 2014; Xu et al., 2015). O piriproxifem age como supressor da embriogênese e da formação adulta (Ishaaya and Horowitz, 1992) e, embora estruturalmente não tenha relação com o HJ, sua atividade biológica reproduz seus efeitos, pois a alta estabilidade permite à ele competir pelos mesmos sítios de ligação dos receptores ao HJ (Palma et al., 1993; Riddiford, 1994). O metoprene, também análogo de

hormônio juvenil, mostrou ser interferente na transcrição gênica em vertebrados, através da ação de seus derivados sobre os fatores de transcrição responsivos ao ácido retinóico (Harmon et al., 1995).

Estudos de toxicidade do piriproxifem em mamíferos demonstraram que indivíduos jovens não parecem ser significativamente mais sensíveis que os adultos, sendo que este composto não se mostrou genotóxico e nem apontou risco carcinogênico para humanos (WHO, 2007). Porém, estudos recentes em peixes, têm demonstrado efeitos divergentes ou não conclusivos mesmo em doses extremamente reduzidas. Em adultos de *Xiphoporus maculatus* expostos ao piriproxifem foram observadas alterações comportamentais (Caixeta et al., 2016), durante o desenvolvimento levou a alterações morfológicas (Azevedo-Linhares et al., 2018), além do aumento de mortalidade (Azevedo-Linhares et al., 2018; Dzieciolowska et al., 2017). Neste último estudo, observou-se interação agonista do piriproxifem com a microcistina - um composto aquático natural produzido por algas - a uma dose que pode ser encontrada no ambiente, potencializando seus efeitos (Azevedo-Linhares et al., 2018).

Espécies que utilizam o ambiente aquático estão constantemente expostas a um grande número de substâncias tóxicas oriundas de diversas fontes de emissão (Bolognesi and Cirillo, 2014; Rashed, 2001; van der Oost et al., 2003). Estas substâncias tem maior efeito nas fases iniciais da vida, quando os peixes são mais sensíveis ao estresse químico, devido à maior taxa metabólica, ao sistema imunitário imaturo e à relação de área de volume/superfície elevada (Truong et al., 2016). Em *Megaleporinus obtusidens* (comumente citado na literatura até 2016 como *Leporinus elongatus*, ver Britski et al., 2012), espécie nativa da região Neotropical, o período de organogênese e morfogênese inicia 32 horas após a eclosão (HPE) e permanece até o 10º dia após a eclosão (DPE), aproximadamente (Sousa et al., 2014). Neste estágio, estruturas do esqueleto e do sistema nervoso central em vertebrados se apresentam em desenvolvimento. A migração de células da crista neural, que dará origem a estruturas esqueléticas crânio-faciais como cartilagens e ossos, se dá por importantes morfógenos como o ácido retinóico endógeno que se mostra envolvido em muitas etapas do desenvolvimento (Kopinke et al., 2006; Savory et al., 2014). O composto tem ação sobre a expressão de genes relacionados a determinação dos eixos corporais, a

diferenciação celular, ao processo de desenvolvimento, biossíntese de moléculas, dentre outros (Navarro-Martín et al., 2018). O esqueleto, em peixes, é um tecido metabolicamente ativo complexo que sofre remodelação contínua ao longo da vida (Lall and Lewis-mccrea, 2007) e estes compostos, devem ser controlados de forma espacial e temporal, sem interferências externas, porque pequenas mudanças podem levar a alterações no fenótipo do indivíduo.

Em decorrência do aumento do consumo do piriproxifem por sua utilidade no controle do *Aedes aegypti*, e dada a sua baixa especificidade, é grande a necessidade em avaliar os efeitos deste xenobiótico em organismos não alvo. De La Torre et al. (2005) destaca que peixes nativos apresentam maior sensibilidade a xenobióticos, podendo ser considerados biomarcadores de toxicidade. Neste trabalho, *Megaleporinus macrocephalus*, uma espécie nativa da região neotropical, foi utilizada como modelo para avaliar os efeitos do piriproxifem sobre o desenvolvimento larval a uma dose passível de ser encontrada no ambiente.

MATERIAIS E MÉTODOS

2.1. Exposição ao piriproxifem

As larvas de *M. macrocephalus* foram obtidas de uma piscicultura - a partir de progenitores selvagens, provenientes de riachos afluentes do rio Paraná - 96 horas após a eclosão dos ovos (HPE). A coleta dos animais teve a permissão do Instituto Chico Mendes de Conservação de Biodiversidade (ICMBio): Licença permanente SISBIO para coleta/transporte de peixes (10522-1). O experimento foi realizado no laboratório de Biologia e Conservação de Anamniotas da Unioeste – Campus Cascavel, com aprovação do Comitê de Ética no uso de animais da Unioeste: 16-03-2017 – CEUA/Unioeste). Foram utilizados 2,5µg/L de piriproxifem (≥ 98.0 % de pureza, peso molecular: 321.37) Sigma-Aldrich® (St. Louis, MO, EUA) (2,5µg/L diluídos em 2,2µL de acetonitrila). A dose experimental de piriproxifem foi escolhida a partir de um teste piloto com 5µg/L, que demonstrou elevada mortalidade. As larvas foram mantidas aclimatadas até o 8º dia em água limpa, antes do início da exposição, e alimentadas com artêmia salina duas vezes ao dia. Para o período experimental, dois aquários foram utilizados com água desclorada, aeração constante e temperatura e fotoperíodo controlados (10 horas

claro e 14 horas escuro). Os indivíduos foram alimentados com artêmia salina, duas vezes ao dia, até a idade suficiente para a alimentação através de ração. Um dos aquários recebeu uma única dose de contaminação de 2,5µg/L de piriproxifem, e ficaram expostos durante 60 dias. Um aquário controle manteve larvas sob as mesmas condições, mas sem receber tratamento com agrotóxico. Após este período ontogênico, os animais dos dois grupos foram mantidos por 240 dias em aquários com água desclorada e todas as variáveis anteriormente citadas, controladas. Ao final do experimento os animais foram anestesiados e sacrificados com solução de Eugenol (Griffiths, 2000).

2.2. Análise de mal formações

Para a avaliação do sistema esquelético de *M. macrocephalus* foi utilizada a técnica de diafanização, conforme Taylor and Van Dyke (1985). Animais do grupo controle e animais tratados que apresentaram efeitos morfológicos visíveis, foram eviscerados, fixados em formol tamponado (10%) e desidratados em série crescente de álcoois. As cartilagens foram coradas em solução de Azul de Alcian 8GX, ácido acético glacial (30%), e álcool etílico absoluto (70%). Foi realizada a neutralização com solução de Bórax saturado ($\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$) 30% e água destilada, o clareamento com H_2O_2 (10%) em solução de KOH (0,5%) e a limpeza com o uso da enzima tripsina 0,45g em 400ml de solução de Bórax saturado. Os ossos foram corados com KOH (0,5%) e Alizarina red (0,1% de Alizarina red S em H_2O destilada), e lavados com H_2O destilada. Em seguida foi realizada a remoção das escamas dos indivíduos e armazenamento em solução enzimática durante 4 dias. Para conservação, o material foi mantido em Glicerina 40% + 60% de KOH 0,5% (12h); glicerina 70% + 30% de KOH 0,5% (12h); glicerina 100% + cristais de timol. As imagens foram capturadas com câmera acoplada a um estereoscópio Olympus.

2.3. Imagem radiológica

Animais do grupo controle e animais tratados com piriproxifem com malformações visíveis, foram radiografados em raio X digital, usando configurações padrão em visão lateral e laterolateral, com o objetivos de contribuir

na visualização de malformações macroscópicas no sistema esquelético de *Megaleporinus macrocephalus*.

2.4. Fotografia

Animais do grupo controle e do grupo piriproxifem foram fotografados com Tablet Samsung Galaxy SM-T800, câmera 8.0 Megapixels para observação de malformações no sistema esquelético de *Megaleporinus macrocephalus*.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

As análises em indivíduos de *Megaleporinus macrocephalus* do grupo controle não apresentaram malformações (Fig. 1E, 2A), mostrando morfologia da coluna vertebral e nadadeiras normais (Fig. 2A e D), enquanto o grupo exposto a uma única dose de 2,5µg/L de piriproxifem no 8º dia após a eclosão, mostraram 43% dos indivíduos com malformações esqueléticas (Gráfico 1). Dentre os indivíduos com displasias, 24% apresentaram escoliose e cifose da coluna vertebral (Fig. 1A, B e F), 9% apresentaram redução da nadadeira peitoral (Fig. 1C, 2C e E), 5% apresentaram malformação na nadadeira anal (Fig. 1D) e 5% ausência da nadadeira pélvica em pelo menos um dos lados do corpo (Fig. 2B), sendo que todos os indivíduos apresentaram brotos das nadadeiras como estruturas rudimentares que, em alguns casos, não concluíram o seu desenvolvimento.

Os variados tipos de malformações, encontradas em *M. macrocephalus*, expostos ao pesticida refletem a ação desses compostos na complexa ontogenia da formação do esqueleto, principalmente das espécies com prolongados períodos larvais (Boglione et al., 2013). O esqueleto axial se origina do mesoderma paraxial e durante a organogênese, sofre ossificação pericondral transformando-se na coluna vertebral, com as vértebras formadas a partir de blocos cartilagosos (Bird and Mabee, 2003), evento que coincide com o momento da exposição de *M. macrocephalus* ao piriproxifem, podendo ter levado aos fenótipos observados na coluna vertebral, dos tipos escoliose e cifose (Fig. 1A, B e F), mostrando interferência no processo de ossificação. O endoesqueleto das nadadeiras é formado por ossificação endocondral, enquanto os raios das

nadadeiras são formadas pelo processo de ossificação intramembranosa (revisão Yano & Tamura, 2013, Yamanaka, 1988; Bird e Mabee, 2003). Os brotos surgem durante a embriogênese e já estariam formados no momento da exposição, o que explica a presença do broto da nadadeira pélvica, mesmo na ausência da nadadeira pélvica (Fig. 2B). Sabe-se que pequenas alterações na concentração de morfógenos, como o ácido retinóico, em escala temporal e espacial, principalmente durante a embriogênese até e durante processo de morfogênese, podem levar a alterações irreversíveis que se expressam no fenótipo do indivíduo e explicam alterações desde ausência de nadadeiras, malformações nas nadadeiras sem um padrão de morfologia, apenas redução (Fig. 2C e E).

Diversos fatores bióticos e abióticos podem influenciar nas mudanças morfológicas durante os estágios iniciais de desenvolvimento. Em peixes, os fatores nutricionais possuem grande relevância, com destaque para a importância das vitaminas, que desempenham papel fundamental no desenvolvimento larval (Cahu et al., 2003). No entanto, além do piriproxifem, diversos xenobióticos são capazes de atuar sobre o desenvolvimento, com efeitos sobre a morfologia. Em *zebrafish* *Danio rerio*, o uso do organofosforado profenofós, levou a formação de embriões com desenvolvimento anormal, defeitos esqueléticos e morfologia cardíaca alterada, de forma dependente da concentração (Pamanji et al., 2015). De maneira similar, no bagre africano *Clarias gariepinus*, o regulador do crescimento de insetos buprofezina levou a malformações em embriões e larvas (Marimuthu et al., 2013). Apesar da semelhança nos fenótipos observados, é possível que o piriproxifem, bem como os compostos citados, atuem de modo distinto, pois conforme Gilbert, (2010), as moléculas são quimicamente diferentes e os processos de embriogênese e organogênese apresentam elevada complexidade de fenômenos.

Outros estudos com piriproxifem em peixes, também demonstraram efeitos sobre o desenvolvimento. Truong et al (2016), ao exporem embriões de *zebrafish* ao composto a uma única dose reduzida, não observaram efeitos sobre a taxa de sobrevivência. Porém, após renovação diária o composto levou ao aumento da mortalidade e efeitos morfológicos adversos, incluindo defeitos craniofaciais a doses mais elevadas (5,2µM). Em estudos de Azevedo-Linhares et al. (2018) no estágio de gástrula em *Rhamdia quelen*, foi observada alta toxicidade do

composto, onde doses muito pequenas afetaram a sobrevivência e causaram malformações. Dzieciolowska et al. (2017), demonstraram elevada mortalidade: em embriões de *zebrafish* com redução de 50% na taxa de sobrevivência após quatro dias da fertilização expostos a 1mg/L, enquanto 10mg/L de piriproxifem levou à morte de 100% dos embriões 2 dias após a fertilização. Além destes efeitos sobre o desenvolvimento, Caixeta et al. (2016) observaram movimentos natatórios inadequados em adultos de *Xiphophorus maculatus* expostos a 5 µg/L de piriproxifem.

Além dos peixes, outros organismos não alvo também tem demonstrado alterações mediante exposição ao piriproxifem. É o caso dos predadores de pragas agrícolas *Chrysoperla externa* e *Eriopis conexa*, que apresentaram aumento da mortalidade (Rimoldi et al., 2017); do microcrustáceo *Daphnia magna*, que sofreu aumento de prole masculina dependente da concentração, tempo de exposição e a etapa do desenvolvimento, além do aumento da mortalidade (Ginjupalli and Baldwin, 2013; Watanabe et al., 2018); e de larvas de abelhas com efeitos sobre a formação das asas e interferência no comportamento social (Fourrier et al., 2015), o que destaca a importância em entender de que forma agem os análogos de hormônio juvenil em organismos não alvos.

O hormônio juvenil e alguns de seus análogos pertencem à classe dos terpenoides. Pertencente a esta mesma classe, se encontra o ácido retinóico, o qual segundo Holder and Hill (1991) pode atuar como teratogêno nas estruturas do esqueleto e no sistema nervoso central de vertebrados quando exógeno, desde peixes à mamíferos. O mesmo é capaz de levar a efeitos juvenilizantes em insetos (Němec et al., 1993; Palli et al., 1991), demonstrando que este pode ser o modo pela qual o piriproxifem pode interagir no desenvolvimento. Ademais, o análogo de HJ metopreno e seus derivados, podem estimular a transcrição de genes em vertebrados, atuando através dos fatores de transcrição responsivos ao ácido retinóico (AR), os receptores retinóides X (RXRs). O ácido metopreno, metabólito de metopreno, compete com o ácido 9-cis retinóico ([³H] 9cRA) pela ligação a RXR α de uma maneira dependente da concentração (Harmon et al., 1995).

O ácido retinóico (RA) é crucial para o desenvolvimento do embrião, regulando os processos celulares, o padrão embrionário e a organogênese

(Samarut et al., 2015). Sua ação se dá pela ligação do AR a receptores nucleares (RAR), os quais fazem combinações heterodiméricas com receptores retinóides (RXRs), e se ligam a motivos do DNA (RAREs) (Kumar and Duester, 2011, Rhinn and Dolle, 2012). A degradação de AR é importante na maturação ou atividade osteoblástica, e é mediada pela expressão dos genes *cyp26b1*. Sem a expressão de *cyp26b1* ou a adição de AR, ocorre a redução na cartilagem da linha média e a hiperossificação facial e axial, levando a fusões de primórdios vertebrais (Laue et al., 2008). Em *M. macrocephalus* as malformações esqueléticas podem expressar a ação do piriproxifem agindo em mecanismos associados ao desenvolvimento da estrutura esquelética axial e dos apêndices, podendo acelerar o processo de ossificação sem a correto formação da estrutura esquelética. Este efeito é semelhante ao fenotipo resultante da concentração de AR elevada, seja por adição de AR exógeno, ou por inibição da *cyp26b1*, podendo agir de forma análoga, não pela sua estrutura química, mas pela sua ação biológica.

Em insetos, a base molecular da sinalização do hormônio juvenil permanece obscura, mas modelos estruturais indicam que os imitadores biologicamente ativos metopreno e piriproxifem, se ancoram dentro do domínio Per-Arnt-Sim (PAS) do receptor metopreno tolerante (Met), com maior afinidade que o hormônio juvenil (Charles et al., 2011). Estes domínios do tipo PAS são encontrados em um grande número de organismos metazoários, em um grande número de família de coativadores de receptores (Pecenova and Farkas, 2016) Em ratos, a ligação de AR ao heterodímero RAR/RXR induz a uma mudança na sua conformação substituindo fatores repressivos por co-ativadores que levarão ao relaxamento da cromatina e a ativação gênica (Cunningham and Duester, 2015).

Apesar de o piriproxifem ter o mesmo efeito de análogos de hormônio juvenil, em insetos, a sua estrutura biológica é diferente. Os estudos sugerem que ele interaja em mecanismos que apresentam domínios PAS em insetos, mas que também estão presentes nas famílias de coativadores de receptores nucleares, os quais incluem o mecanismo mediado por ácido retinóico (Charles et al., 2011; Cunningham and Duester, 2015; Pecenova and Farkas, 2016). Conforme observado nas malformações esqueléticas de *M. macrocephalus* (1B, C, D e F e 2B, C e E) o composto pode agir sobre mecanismos complexos do

desenvolvimento e carece de novos estudos, sendo considerado precipitado o seu uso no controle de vetores de doenças tropicais, podendo até chegar a meios aquáticos. Vale salientar o estudo de Azevedo-Linhares et al. (2018), que demonstra a interação agonista que ocorre entre o piriproxifem e a microcistina - toxina produzida por cianobactérias, - a doses passíveis de serem encontradas no ambiente aquático em larvas de *Rhamdia quelen*, 48 horas após a eclosão. Os autores destacam o risco real de populações de peixes estarem expostas a combinação destes compostos no ambiente natural.

De modo geral, organismos adultos são resistentes a mudanças impostas pela exposição de uma substância química, mas alterações durante períodos sensíveis ou críticos de desenvolvimento, como no desenvolvimento embrionário, podem gerar alterações importantes, as quais podem se manifestar em fases tardias do ciclo de vida ou mesmo serem translocadas às gerações posteriores (Filho et al., 2007). Doses extremamente baixas de xenobióticos podem causar anomalias endócrinas ou reprodutivas que exercem maiores efeitos sobre a população do que doses maiores (Gilbert, 2010), podendo levar até a extinção de populações naturais (Azevedo-Linhares et al., 2018) .

CONCLUSÃO

Os resultados sobre a exposição ao piriproxifem de uma espécie neotropical de peixe, representada neste trabalho por *Megaleporinus macrocephalus*, podem caracterizar de forma mais fidedigna as condições reais, pois espécies neotropicais de peixes representam bioindicadores de qualidade do ambiente natural. Os resultados mostram que o piriproxifem pode apresentar efeitos sobre a formação do esqueleto axial e apendicular de peixes em doses passíveis de serem encontradas no ambiente e pelas suas características de análogo de hormônio juvenil sua interação pode ocorrer por mecanismo análogo à ação do ácido retinóico durante o período de ontogenia larval. Deste modo, este trabalho alerta para a necessidade de mais estudos sobre o modo de ação deste composto e seus metabólitos em organismos não alvos. Reforça ainda que deve haver cautela no uso de piriproxifem para controle da dispersão de *Aedes aegypti* até que mais estudos determinem a real segurança ambiental do piriproxifem,

visto que seus efeitos podem ser potencializados pela interação com outras substâncias presentes no ambiente, sejam elas naturais ou oriundas de atividades humanas.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem à Universidade Estadual do Oeste do Paraná (UNIOESTE) pelo apoio logístico. Este trabalho foi financiado pelo CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico) e pela Fundação Araucária (Fundação de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico do Paraná).

REFERÊNCIAS

- Ankley, G.T., Jensen, K.M., Durhan, E.J., Makynen, E.A., Butterworth, B.C., Kahl, M.D., Villeneuve, D.L., Linnum, A., Gray, L.E., Cardon, M., Wilson, V.S., 2005. Effects of two fungicides with multiple modes of action on reproductive endocrine function in the fathead minnow (*Pimephales promelas*). *Toxicol. Sci.* 86, 300–308. <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfi202>
- Arukwe, A., Myburgh, J., Langberg, H.A., Adeogun, A.O., Braa, I.G., Moeder, M., Schlenk, D., Crago, J.P., Regoli, F., Botha, C., 2016. Developmental alterations and endocrine-disruptive responses in farmed Nile crocodiles (*Crocodylus niloticus*) exposed to contaminants from the Crocodile River, South Africa. *Aquat. Toxicol.* <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2015.12.027>
- Azevedo-Linhares, M., Souza, A.T.C., Lenz, C.A., Leite, N.F., Brito, I.A., Folle, N.M.T., Garcia, J.E., Filipak Neto, F., Oliveira Ribeiro, C.A., 2018. Microcystin and pyriproxyfen are toxic to early stages of development in *Rhamdia quelen*: An experimental and modelling study. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 166, 311–319. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2018.09.064>
- Baroiller, J.F., D’Cotta, H., 2016. The Reversible Sex of Gonochoristic Fish: Insights and Consequences. *Sex. Dev.* 10, 242–266. <https://doi.org/10.1159/000452362>
- Baroiller, J.F., D’Cotta, H., 2001. Environment and sex determination in farmed

- fish, in: *Comparative Biochemistry and Physiology - C Toxicology and Pharmacology*. [https://doi.org/10.1016/S1532-0456\(01\)00267-8](https://doi.org/10.1016/S1532-0456(01)00267-8)
- Baumann, L., Knörr, S., Keiter, S., Nagel, T., Segner, H., Braunbeck, T., 2015. Prochloraz causes irreversible masculinization of zebrafish (*Danio rerio*). *Environ. Sci. Pollut. Res.* 22, 16417–16422. <https://doi.org/10.1007/s11356-014-3486-3>
- Bird, N.C., Mabee, P.M., 2003. Developmental Morphology of the Axial Skeleton of the Zebrafish, *Danio rerio* (Ostariophysi: Cyprinidae). *Dev. Dyn.* <https://doi.org/10.1002/dvdy.10387>
- Boglione, C., Gisbert, E., Gavaia, P., Witten, P.E., Moren, M., Fontagné, S., Koumoundouros, G., 2013. Skeletal anomalies in reared European fish larvae and juveniles. Part 2: Main typologies, occurrences and causative factors. *Rev. Aquac.* <https://doi.org/10.1111/raq.12016>
- Bolognesi, C., Cirillo, S., 2014. Genotoxicity biomarkers in aquatic bioindicators. *Curr. Zool.* 60, 273–284. <https://doi.org/10.1093/czoolo/60.2.273>
- Brasil. Ministério da Saúde, 2014. Orientações técnica para utilização do larvicida pyriproxyfen (0,5 G) no controle de *Aedes aegypti* 1–3.
- Britski, H.A., Birindelli, J.L.O., Garavello, J.C., 2012. A new species of *Leporinus* Agassiz, 1829 from the upper Rio Paraná basin (Characiformes, Anostomidae) with redescription of *L. elongatus* Valenciennes, 1850 and *L. obtusidens* (Valenciennes, 1837). *Pap. Avulsos Zool.* 52, 441–475. <https://doi.org/10.1590/S0031-10492012021700001>
- Cahu, C., Infante, J.Z., Takeuchi, T., 2003. Nutritional components affecting skeletal development in fish larvae, in: *Aquaculture*. [https://doi.org/10.1016/S0044-8486\(03\)00507-6](https://doi.org/10.1016/S0044-8486(03)00507-6)
- Caixeta, E.S., Silva, C.F., Santos, V.S.V., Olegário de Campos Júnior, E., Pereira, B.B., 2016. Ecotoxicological assessment of pyriproxyfen under environmentally realistic exposure conditions of integrated vector management for *Aedes aegypti* control in Brazil. *J. Toxicol. Environ. Heal. Part A* 79, 799–803. <https://doi.org/10.1080/15287394.2016.1191400>
- Cajaraville, M.P., Bebianno, M.J., Blasco, J., Porte, C., Sarasquete, C., Viarengo, A., 2000. The use of biomarkers to assess the impact of pollution in coastal environments of the Iberian Peninsula: a practical approach. *Sci. Total*

- Environ. 247, 295–311. [https://doi.org/10.1016/S0048-9697\(99\)00499-4](https://doi.org/10.1016/S0048-9697(99)00499-4)
- Charles, J.-P., Iwema, T., Epa, V.C., Takaki, K., Rynes, J., Jindra, M., 2011. Ligand-binding properties of a juvenile hormone receptor, Methoprene-tolerant. Proc. Natl. Acad. Sci. 108, 21128–21133. <https://doi.org/10.1073/pnas.1116123109>
- Christin, M.S., Ménard, L., Gendron, A.D., Ruby, S., Cyr, D., Marcogliese, D.J., Rollins-Smith, L., Fournier, M., 2004. Effects of agricultural pesticides on the immune system of *Xenopus laevis* and *Rana pipiens*. Aquat. Toxicol. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2003.11.007>
- Cunningham, T.J., Duester, G., 2015. Mechanisms of retinoic acid signalling and its roles in organ and limb development. Nat. Rev. Mol. Cell Biol. 16, 110–123. <https://doi.org/10.1038/nrm3932>
- De La Torre, F.R., Ferrari, L., Salibián, A., 2005. Biomarkers of a native fish species (*Cnesterodon decemmaculatus*) application to the water toxicity assessment of a peri-urban polluted river of Argentina. Chemosphere. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2004.12.039>
- Devlin, R.H., Nagahama, Y., 2002. Sex determination and sex differentiation in fish: an overview of genetic, physiological, and environmental influences. Aquaculture 208, 191–364. [https://doi.org/10.1016/S0044-8486\(02\)00057-1](https://doi.org/10.1016/S0044-8486(02)00057-1)
- Domingues, I., Oliveira, R., Musso, C., Cardoso, M., Soares, A.M., Loureiro, S., 2013. Prochloraz effects on biomarkers activity in zebrafish early life stages and adults. Environ. Toxicol. 28, 155–163. <https://doi.org/10.1002/tox.20710>
- Dzieciolowska, S., Larroque, A.-L., Kranjec, E.-A., Drapeau, P., Samarut, E., 2017. The larvicide pyriproxyfen blamed during the Zika virus outbreak does not cause microcephaly in zebrafish embryos. Sci. Rep. 7, 40067. <https://doi.org/10.1038/srep40067>
- Filho, R.W.R., Luvizotto-Santos, R., Vieira, E.M., 2007. Poluentes Emergentes como Desreguladores Endócrinos. J. Brazilian Soc. Ecotoxicol. 2, 283–288. <https://doi.org/10.5132/jbse.2007.03.012>
- Fourrier, J., Deschamps, M., Droin, L., Alaux, C., Fortini, D., Beslay, D., Le Conte, Y., Devillers, J., Aupinel, P., Decourtye, A., Rueppell, O., 2015. Larval exposure to the juvenile hormone analog pyriproxyfen disrupts acceptance of and social behavior performance in adult honeybees. PLoS One.

- <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0132985>
- Galetti, Jr., P.M., Foresti, F., 1986. Evolution of the ZZ/ZW system in *Leporinus* (Pisces, Anostomidae). *Cytogenet. Genome Res.* 43, 43–46.
- Gilbert, S.F., 2010. *Developmental Biology*, 9th ed, Developmental Biology. Sinauer Associates, Sunderland.
- Ginjupalli, G.K., Baldwin, W.S., 2013. The time- and age-dependent effects of the juvenile hormone analog pesticide, pyriproxyfen on *Daphnia magna* reproduction. *Chemosphere.*
<https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2013.04.061>
- Göppert, C., Harris, R.M., Theis, A., Boila, A., Hohl, S., Rüegg, A., Hofmann, H.A., Salzburger, W., Böhne, A., 2016. Inhibition of Aromatase Induces Partial Sex Change in a Cichlid Fish: Distinct Functions for Sex Steroids in Brains and Gonads. *Sex. Dev.* <https://doi.org/10.1159/000445463>
- Hallman, A., Bond, C., Buhl, K., Stone, D., 2015. Pyriproxyfen General Fact Sheet [WWW Document]. Natl. Pestic. Inf. Center, Oregon State Univ. Ext. Serv. URL <http://npic.orst.edu/factsheets/pyriprogen.html>
- Harmon, M.A., Boehm, M.F., Heyman, R.A., Mangelsdorf, D.J., 1995. Activation of mammalian retinoid X receptors by the insect growth regulator methoprene. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 92, 6157–6160.
<https://doi.org/10.1073/pnas.92.13.6157>
- Hayes, T.B., Falso, P., Gallipeau, S., Stice, M., 2010. The cause of global amphibian declines: a developmental endocrinologist's perspective. *J. Exp. Biol.* 213, 921–933. <https://doi.org/10.1242/jeb.040865>
- Henry, M.J., Sisler, H.D., 1984. Effects of sterol biosynthesis-inhibiting (SBI) fungicides on cytochrome P-450 oxygenations in fungi. *Pestic. Biochem. Physiol.* 262–275.
- IRAC, 2017. Insecticide Resistance Action Committee - Mode of Action Classification Scheme [WWW Document]. URL www.iraac-online.org
- Ishaaya, I., Horowitz, A.R., 1992. Novel Phenoxy Juvenile Hormone Analog (Pyriproxyfen) Suppresses Embryogenesis and Adult Emergence of Sweetpotato Whitefly (Homoptera: Aleyrodidae). *J. Econ. Entomol.* 85, 2113–2117. <https://doi.org/10.1093/jee/85.6.2113>
- Kegley, S.E., Hill, B.R., S., O., C.A.H., 2016. PAN Pesticide Database, Pesticide

- Action Network [WWW Document]. URL <http://pesticideinfo.org> (accessed 7.12.17).
- Kinnberg, K., Holbech, H., Petersen, G.I., Bjerregaard, P., 2007. Effects of the fungicide prochloraz on the sexual development of zebrafish (*Danio rerio*). *Comp. Biochem. Physiol. C. Toxicol. Pharmacol.* 145, 165–70. <https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2006.11.002>
- Kopinke, D., Sasine, J., Swift, J., Stephens, W.Z., Piotrowski, T., 2006. Retinoic acid is required for endodermal pouch morphogenesis and not for pharyngeal endoderm specification. *Dev. Dyn.* 235, 2695–2709. <https://doi.org/10.1002/dvdy.20905>
- Kumar, S., Duester, G., 2011. SnapShot: Retinoic acid signaling. *Cell.* <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.11.034>
- Lall, S.P., Lewis-mccrea, L.M., 2007. Role of nutrients in skeletal metabolism and pathology in fish — An overview 267, 3–19. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2007.02.053>
- Laue, K., Janicke, M., Plaster, N., Sonntag, C., Hammerschmidt, M., 2008. Restriction of retinoic acid activity by Cyp26b1 is required for proper timing and patterning of osteogenesis during zebrafish development. *Development* 135, 3775–3787. <https://doi.org/10.1242/dev.021238>
- Liu, H., Todd, E. V., Lokman, P.M., Lamm, M.S., Godwin, J.R., Gemmell, N.J., 2017. Sexual plasticity: A fishy tale. *Mol. Reprod. Dev.* 84, 171–194. <https://doi.org/10.1002/mrd.22691>
- Marimuthu, K., Muthu, N., Xavier, R., Arockiaraj, J., Rahman, M.A., Subramaniam, S., 2013. Toxicity of Buprofezin on the Survival of Embryo and Larvae of African Catfish, *Clarias gariepinus* (Bloch). *PLoS One* 8, 1–7. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0075545>
- McCoy, K.A., Bortnick, L.J., Campbell, C.M., Hamlin, H.J., Guillette, L.J., St. Mary, C.M., 2008. Agriculture alters gonadal form and function in the toad *Bufo marinus*. *Environ. Health Perspect.* <https://doi.org/10.1289/ehp.11536>
- Moresco, R.M., Margarido, V.P., de Oliveira, C., 2014. A persistent organic pollutant related with unusual high frequency of hermaphroditism in the neotropical anuran *Physalaemus cuvieri* Fitzinger, 1826. *Environ. Res.* 132, 6–11. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2014.03.028>

- Navarro-Martín, L., Oliveira, E., Casado, M., Barata, C., Piña, B., 2018. Dysregulatory effects of retinoic acid isomers in late zebrafish embryos. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 25, 3849–3859. <https://doi.org/10.1007/s11356-017-0732-5>
- Němec, V., Kodrík, D., Matolín, S., Laufer, H., 1993. Juvenile hormone-like effects of retinoic acid in insect metamorphosis, embryogenesis and reproduction. *J. Insect Physiol.* 39, 1083–1093. [https://doi.org/10.1016/0022-1910\(93\)90132-B](https://doi.org/10.1016/0022-1910(93)90132-B)
- Palli, S.R., Riddiford, L.M., Hiruma, K., 1991. Juvenile hormone and “retinoic acid” receptors in *Manduca* epidermis. *Insect Biochem.* 21, 7–15. [https://doi.org/10.1016/0020-1790\(91\)90059-N](https://doi.org/10.1016/0020-1790(91)90059-N)
- Palma, K.G., Meola, S.M., Meola, R.W., 1993. Mode of Action of Pyriproxyfen and Methoprene on Eggs of *Ctenocephalides felis* (Siphonaptera: Pulicidae). *J. Med. Entomol.* 30, 421–426. <https://doi.org/10.1093/jmedent/30.2.421>
- Pamanji, R., Yashwanth, B., Bethu, M.S., Leelavathi, S., Ravinder, K., Venkateswara Rao, J., 2015. Toxicity effects of profenofos on embryonic and larval development of Zebrafish (*Danio rerio*). *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 39, 887–897. <https://doi.org/10.1016/j.etap.2015.02.020>
- Pecenova, L., Farkas, R., 2016. Multiple functions and essential roles of nuclear receptor coactivators of bHLH-PAS family. *Endocr. Regul.* 50, 165–181. <https://doi.org/10.1515/enr-2016-0019>
- Piferrer, F., 2001. Endocrine sex control strategies for the feminization of teleost fish. *Aquaculture* 197, 229–281. [https://doi.org/10.1016/S0044-8486\(01\)00589-0](https://doi.org/10.1016/S0044-8486(01)00589-0)
- Pocar, P., Fischer, B., Klonisch, T., Hombach-Klonisch, S., 2005. Molecular interactions of the aryl hydrocarbon receptor and its biological and toxicological relevance for reproduction. *Reproduction* 129, 379–389. <https://doi.org/10.1530/rep.1.00294>
- Rashed, M.N., 2001. Monitoring of environmental heavy metals in fish from nasser lake. *Environ. Int.* 27, 27–33. [https://doi.org/10.1016/S0160-4120\(01\)00050-2](https://doi.org/10.1016/S0160-4120(01)00050-2)
- Raun Andersen, H., Vinggaard, A.M., Høj Rasmussen, T., Gjermansen, I.M., Cecilie Bonfeld-Jørgensen, E., 2002. Effects of currently used pesticides in assays for estrogenicity, androgenicity, and aromatase activity in vitro. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* <https://doi.org/10.1006/taap.2001.9347>

- Red, R.T., Richards, S.M., Torres, C., Adair, C.D., 2011. Environmental Toxicant Exposure During Pregnancy. *Obstet. Gynecol. Surv.* 66, 159–169. <https://doi.org/10.1097/OGX.0b013e3182219014>
- Rhinn, M., Dolle, P., 2012. Retinoic acid signalling during development. *Development* 139, 843–858. <https://doi.org/10.1242/dev.065938>
- Riddiford, L.M., 1994. Cellular and Molecular Actions of Juvenile Hormone I. General Considerations and Premetamorphic Actions. pp. 213–274. [https://doi.org/10.1016/S0065-2806\(08\)60084-3](https://doi.org/10.1016/S0065-2806(08)60084-3)
- Rimoldi, F., Fogel, M.N., Ronco, A.E., Schneider, M.I., 2017. Comparative susceptibility of two Neotropical predators, *Eriopis connexa* and *Chrysoperla externa*, to acetamiprid and pyriproxyfen: Short and long-term effects after egg exposure. *Environ. Pollut.* 231, 1042–1050. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2017.08.097>
- Samarut, E., Fraher, D., Laudet, V., Gibert, Y., 2015. ZebRA: An overview of retinoic acid signaling during zebrafish development. *Biochim. Biophys. Acta - Gene Regul. Mech.* 1849, 73–83. <https://doi.org/10.1016/j.bbagr.2014.05.030>
- Sanderson, J.T., Boerma, J., Lansbergen, G.W.A., Van Den Berg, M., 2002. Induction and inhibition of aromatase (CYP19) activity by various classes of pesticides in H295R human adrenocortical carcinoma cells. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* <https://doi.org/10.1006/taap.2002.9420>
- Savory, J.G.A., Edey, C., Hess, B., Mears, A.J., Lohnes, D., 2014. Identification of novel retinoic acid target genes. *Dev. Biol.* 395, 199–208. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2014.09.013>
- Scott, G.R., Sloman, K.A., 2004. The effects of environmental pollutants on complex fish behaviour: Integrating behavioural and physiological indicators of toxicity. *Aquat. Toxicol.* 68, 369–392. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2004.03.016>
- Sihuincha, M., Zamora-perea, E., Orellana-rios, W., Stancil, J.D., López-sifuentes, V., Vidal-oré, C., Devine, G.J., 2005. Potential Use of Pyriproxyfen for Control of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) in Iquitos, Perú. *J. Med. Entomol.* 42, 620–630. <https://doi.org/10.1093/jmedent/42.4.620>
- Singh, S., Kumar, K., 2015. Effects of juvenoid Pyriproxyfen on reproduction and

- F1 progeny in myiasis causing flesh fly *Sarcophaga ruficornis* L. (Sarcophagidae: Diptera). *Parasitol. Res.* 114, 2325–2331. <https://doi.org/10.1007/s00436-015-4428-9>
- Solé, M., Raldua, D., Piferrer, F., Barceló, D., Porte, C., 2003. Feminization of wild carp, *Cyprinus carpio*, in a polluted environment: Plasma steroid hormones, gonadal morphology and xenobiotic metabolizing system. *Comp. Biochem. Physiol. - C Toxicol. Pharmacol.* 136, 145–156. [https://doi.org/10.1016/S1532-0456\(03\)00192-3](https://doi.org/10.1016/S1532-0456(03)00192-3)
- Sousa, E.Z., Jesus, L.W.O., Meireles, W.A., Borella, M.I., Bianchi, P.K.F.C., Salvadori, M.L.B., Júnior, J.R.K., 2014. O desenvolvimento embrionário da Piapara, *Leporinus elongatus* (Pisces, Anostomidae), utilizando técnicas de histologia, microscopia eletrônica de varredura e imunológicas empregando marcadores ósseos. *Pesqui. Vet. Bras.* 34, 92–98. <https://doi.org/10.1590/S0100-736X2014001300017>
- Sullivan, J.J., Goh, K.S., 2008. Environmental fate and properties of pyriproxyfen. *J. Pestic. Sci.* 33, 339–350. <https://doi.org/10.1584/jpestics.R08-02>
- Takatsu, K., Miyaoku, K., Roy, S.R., Muroto, Y., Sago, T., Itagaki, H., Nakamura, M., Tokumoto, T., 2013. Induction of Female-to-Male Sex Change in Adult Zebrafish by Aromatase Inhibitor 1–7. <https://doi.org/10.1038/srep03400>
- Tay, J.-W., Lee, C.-Y., 2014. Influences of Pyriproxyfen on Fecundity and Reproduction of the Pharaoh Ant (Hymenoptera: Formicidae). *J. Econ. Entomol.* 107, 1216–1223. <https://doi.org/10.1603/EC14030>
- Taylor, W.R., Van Dyke, G.C., 1985. Revised procedures for staining and clearing small fishes and other vertebrates for bone and cartilage study. *Cybiuim*.
- Truong, L., Gonnerman, G., Simonich, M.T., Tanguay, R.L., 2016. Assessment of the developmental and neurotoxicity of the mosquito control larvicide, pyriproxyfen, using embryonic zebrafish. *Environ. Pollut.* 218, 1089–1093. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2016.08.061>
- van der Oost, R., Beyer, J., Vermeulen, N.P.E., 2003. Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 13, 57–149. [https://doi.org/10.1016/S1382-6689\(02\)00126-6](https://doi.org/10.1016/S1382-6689(02)00126-6)
- Vinggaard, A.M., Hass, U., Dalgaard, M., Andersen, H.R., Bonefeld-Jørgensen, E., Christiansen, S., Laier, P., Poulsen, M.E., McLachlan, J., Main, K.M.,

- Søeborg, T., Foster, P., 2006. Prochloraz: An imidazole fungicide with multiple mechanisms of action, in: *International Journal of Andrology*. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2605.2005.00604.x>
- Watanabe, H., Oda, S., Abe, R., Tanaka, Y., Tatarazako, N., 2018. Comparison of the effects of constant and pulsed exposure with equivalent time-weighted average concentrations of the juvenile hormone analog pyriproxyfen on the reproduction of *Daphnia magna*. *Chemosphere*. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2017.12.124>
- WHO, 2018. Joint Fao / Who Meeting on Pesticide Residues Acceptable Daily Intakes , Acute Reference Doses , and Other Values Recorded 18–27.
- WHO, 2007. Pyriproxyfen in Drinking-water. Who/Sde/Wsh/07.01/10 13.
- Wilder-Smith, A., Gubler, D.J., 2008. Geographic Expansion of Dengue: The Impact of International Travel. *Med. Clin. North Am.* <https://doi.org/10.1016/j.mcna.2008.07.002>
- Xu, Q., Tang, B., Zou, Q., Zheng, H., Liu, X., Wang, S., 2015. Effects of Pyriproxyfen on Female Reproduction in the Common Cutworm, *Spodoptera litura* (F.) (Lepidoptera: Noctuidae). *PLoS One* 10, e0138171. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0138171>
- Yano, T., Tamura, K., 2013. The making of differences between fins and limbs. *J. Anat.* 222, 100–113. <https://doi.org/10.1111/j.1469-7580.2012.01491.x>
- Yasufumi, A.H., Kawamura, T., Hori-e, R., Yamashita, I., Hayashida, Y., Kawamura, T., Hori-e, R., Yamashita, I., 2004. Retionic Acid and Its Receptors Are Required for Expression of Aryl Hydrocarbon Receptor mRNA and Embryonic Development of Blood Vessel and Bone in the Medaka Fish , *Oryzias latipes* Retionic Acid and Its Receptors Are Required for Expression of Aryl Hydro. *Zool. Soc. Japan* 21, 541–551. <https://doi.org/10.2108/zsj.21.541>
- Zhang, X., Hecker, M., Jones, P.D., Newsted, J., Au, D., Kong, R., Wu, R.S.S., Giesy, J.P., 2008. Responses of the medaka HPG axis PCR array and reproduction to prochloraz and ketoconazole. *Environ. Sci. Technol.* <https://doi.org/10.1021/es800591t>

Frequência de malformações observada nos tratamentos

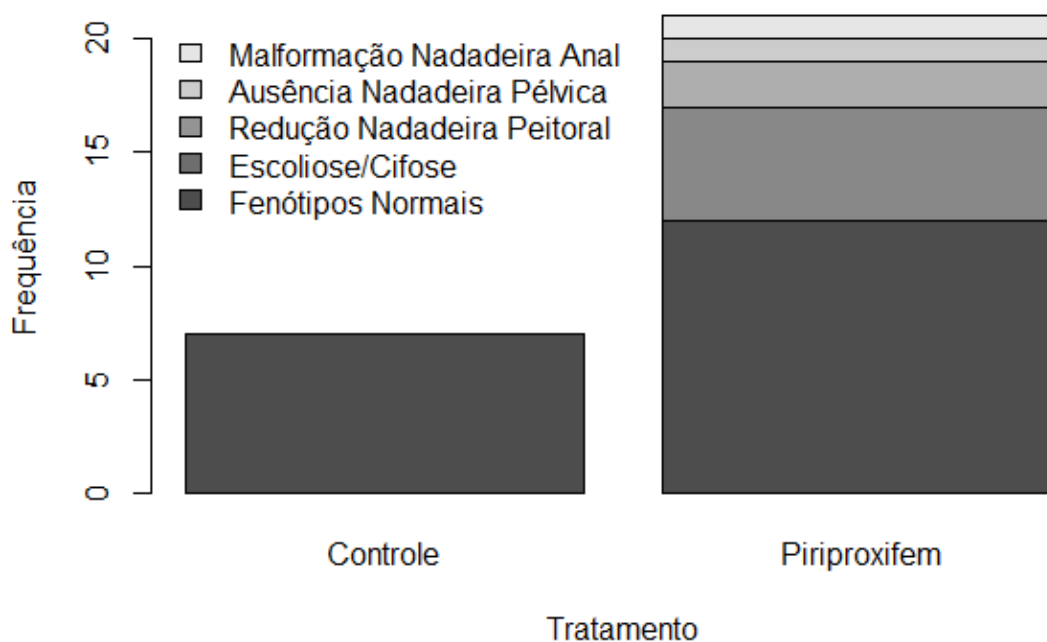


Gráfico 1. Frequência de malformações observadas em *Megaleporinus macrocephalus*.

Tabela 1 - Frequência de mal formações (%) em *Megaleporinus. macrocephalus* do grupo controle e expostos ao piriproxifem (200ug/l)

Tratamento	Fenótipos normais	Escoliose/ Cifose	Redução Nadadeira Peitora	Ausência Nadadeir a Pélvica	Malformaçã o Nadadeira Anal	Total de Indivíduos
Controle	100	0	0	0	0	7
Piriproxifem	57	24	9	5	5	15

FIGURAS

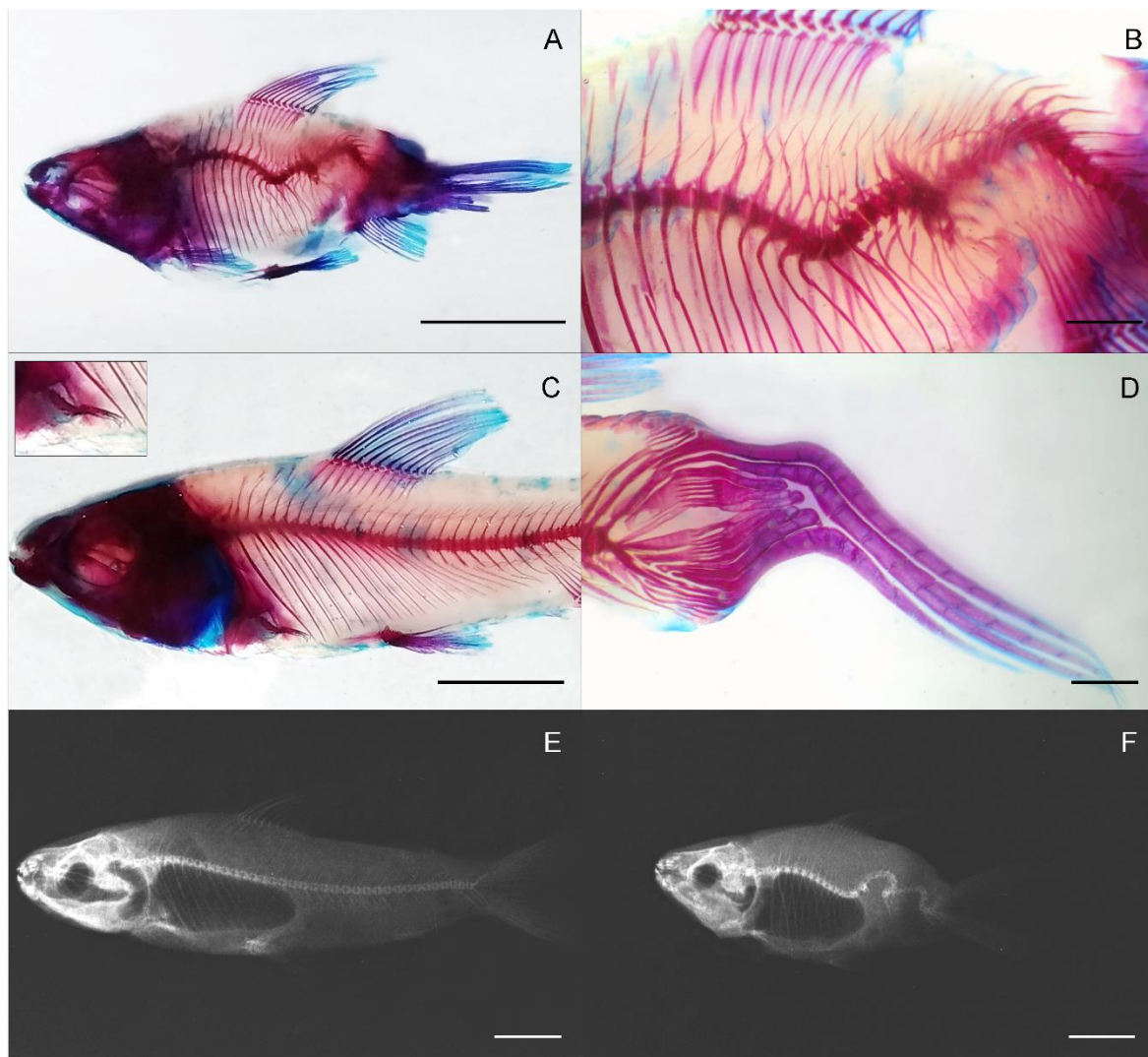


Figura 1. Imagem de estereoscopia e raio X de exemplares de *M. macrocephalus* com presença de malformações. Através de técnica de diafanização pode-se comprovar o registro de escoliose e cifose (A e B); desenvolvimento reduzido do membro anterior (C) e flexão anormal da nadadeira caudal (D). Através da técnica de raio X evidenciou-se as alterações na morfologia e organização das vértebras de exemplar com escoliose e cifose (F) em comparação com animal normal (E). Barra = 1cm.

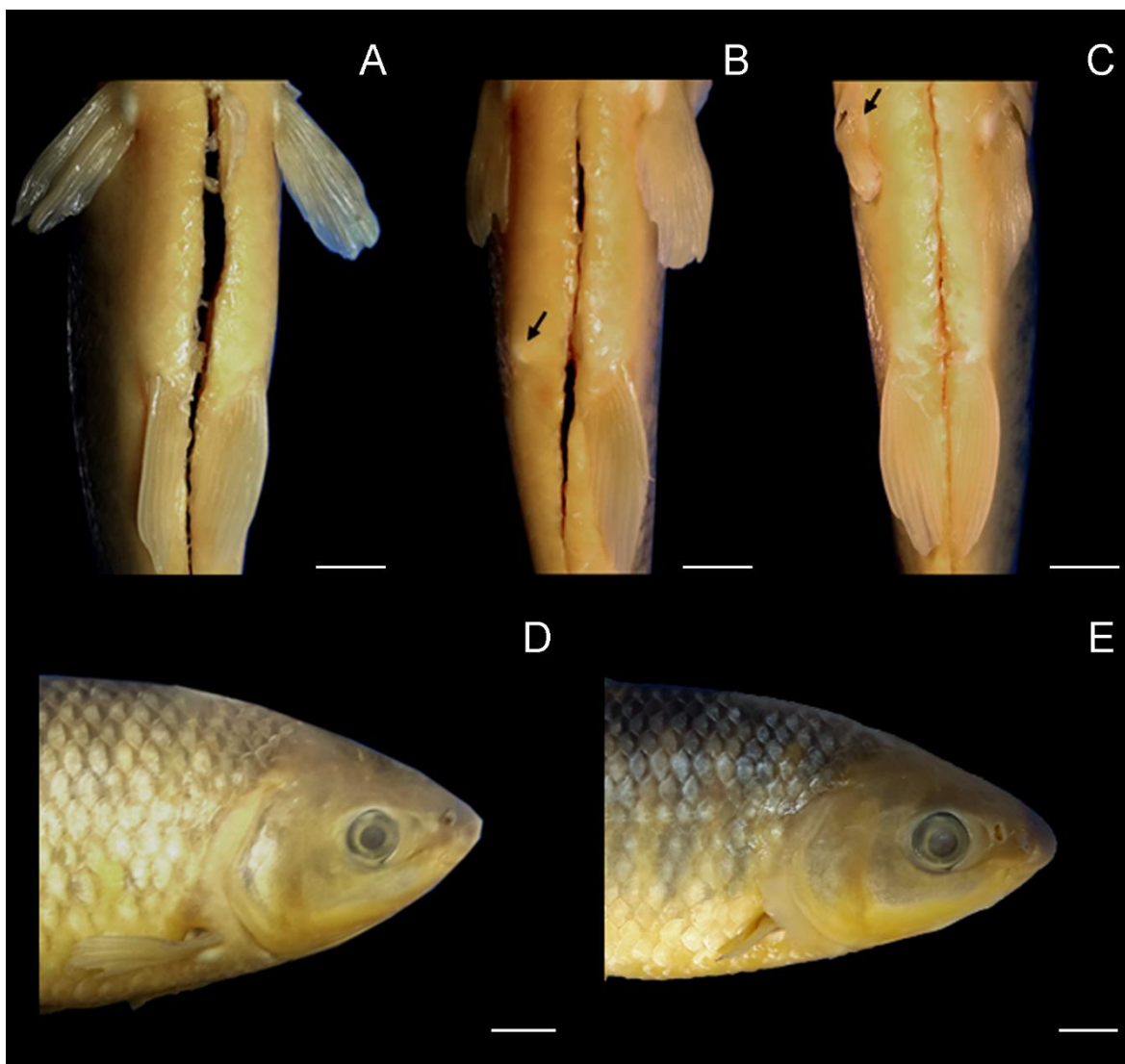


Figura 2. Fotografia de exemplares de *M. macrocephalus* evidenciando as nadadeiras. Em A, B e C vista ventral, em D e E vista lateral. Em A e D indivíduos do grupo controle; em B ausência da nadadeira pélvica; em C e E malformações da nadadeira peitoral. Barra = 1cm.

Capítulo 2: Efeito de procloraz e piriproxifem no desenvolvimento sexual de piapara (*Megaleporinus macrocephalus*)

Aline Nardelli^a, Anahiê Bortoncello Prestes^b, Rafaela Maria Moresco^a, Vladimir Pavan Margarido^{a,b*}

^a Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, Rua Universitária, 1619, Cascavel, Paraná, Brasil

^b Universidade Estadual de Maringá. Av. Colombo, 5790, Maringá, Paraná, Brasil

*Autor correspondente: Tel. +55 45 3220-3235

Email: vladimir.margarido@unioeste.br

Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Programa de Pós-Graduação em Conservação e Manejo de Recursos Naturais, Rua Universitária 2069, Jardim Universitário, 85819-110 Cascavel, PR, Brasil

RESUMO

A determinação sexual e a diferenciação sexual em peixes são eventos altamente complexos e plásticos. Podem ser determinados por fatores genéticos ou ambientais e são susceptíveis a alterações de moléculas presentes no ambiente que podem atuar como disruptores endócrinos. O procloraz é um composto amplamente estudado com efeitos sobre organismos não alvo com amplo espectro de ação, podendo afetar a reprodução, o desenvolvimento e a taxa de sobrevivência. O piriproxifem, por sua vez, apresenta poucos estudos, mas já tem demonstrado um amplo espectro de efeitos, mesmo a doses reduzidas, levando ao aumento da mortalidade, malformações, além de interagir com outros compostos potencializando sua ação. O objetivo deste trabalho, foi avaliar os efeitos do procloraz e do piriproxifem, de forma isolada ou combinada, sobre o desenvolvimento larval de *Megaleporinus macrocephalus*, uma espécie gonocórica, com sistema de cromossomos sexuais ZZ/ZW. Os indivíduos foram expostos a 200µg/l de procloraz e a 2,5µg/l de piriproxifem, isolado ou combinado. Ao final do experimento foram observados os dados citogenéticos e comparados aos dados histológicos. Nos indivíduos do grupo procloraz um macho apresentou folículos ovarianos testiculares. Nos indivíduos do grupo tratado com piriproxifem houve presença de indivíduos intersexo com reversão do sexo feminino para o masculino, o mesmo foi observado no grupo dos indivíduos expostos a mistura dos dois compostos. Estes dados demonstram a ação dos compostos como potenciais disruptores endócrinos, afetando organismos que necessitam do ambiente aquático e apresentam uma complexidade do processo de diferenciação sexual. Os efeitos da exposição ao piriproxifem, comparado ao procloraz, um composto potencialmente tóxico, alertam para a necessidade de novos estudos de modo a estabelecer a segurança do uso do ou a sua suspensão no controle de pragas e vetores.

PALAVRAS-CHAVES: disruptores endócrinos, intersexo, reversão sexual, doses reduzidas

Effects of the pesticide prochloraz and pyriproxyfen on the sexual development of piapara (*Megaleporinus macrocephalus*)

ABSTRACT

Sexual determination and sexual differentiation in fish are highly complex and plastic events. Genetic or environmental factors can determine sex and are susceptible to changes in molecules present in the environment that can act as endocrine disruptors. Prochloraz is a widely studied compound with effects on non-target organisms with a broad spectrum of action and may affect reproduction, development and survival rate. Pyriproxyfen, for its part, has few studies, but has already demonstrated a broad spectrum of effects, even at reduced doses, leading to increased mortality, malformations, and interacting with other compounds. The objective of this work was to evaluate the effects of prochloraz and pyriproxyfen, either alone or in combination, on the larval development of *Megaleporinus macrocephalus*, a gonochoric species with ZZ / ZW sexual system. The individuals were exposed to 200µg/L prochloraz and 2,5µg/L pyriproxyfen, alone or in combination. The cytogenetic data compared to the histological data allowed observing the presence of intersex. In the prochloraz group, one male had testicular ovarian follicles. The group treated with pyriproxyfen had the presence of intersex individuals with female to male reversion; coinciding with the group of individuals exposed to the combination of the two compounds. These data demonstrate the action of the compounds as potential endocrine disruptors, affecting organisms that need the aquatic environment and present a complexity of the process of sexual differentiation. These data point to the need for further studies in order to establish the safety of the use of the product or its suspension in the control of pests and vectors.

. Estes dados demonstram a ação dos compostos como potenciais disruptores endócrinos, afetando organismos que necessitam do ambiente aquático e apresentam uma complexidade do processo de diferenciação sexual. Os efeitos da exposição ao piriproxifem, comparado ao procloraz, um composto potencialmente tóxico, alertam para a necessidade de novos estudos de modo a estabelecer a segurança do uso do ou a sua suspensão no controle de pragas e vetores.

KEY WORDS: endocrine disruptors, intersex, sexual reversion, lower doses

Este trabalho teve o financiamento do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e Fundação de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico do Paraná (Fundação Araucária). A coleta dos animais teve a permissão do Instituto Chico Mendes de Conservação de Biodiversidade (ICMBio): Licença permanente do Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade (SISBIO) para coleta e transporte de peixes (10522-1). O experimento foi realizado no laboratório de Biologia de Anamniotas da Unioeste – *Campus* Cascavel, com aprovação do Comitê de Ética no uso de animais da Unioeste: 16-03-2017 – CEUA/Unioeste).

DESTAQUES

- Exemplares de *M. macrocephalus* foram expostos aos pesticidas procloraz e piriproxifem de forma isolada e combinada;
- Presença de indivíduos intersexo em procloraz, com efeitos feminilizantes, e em piriproxifem com efeitos masculinizantes;
- Doses extremamente reduzidas de piriproxifem foram suficientes para induzir o desenvolvimento de indivíduos com reversão do sexo;
- Deve-se ter cautela no uso do piriproxifem no controle do mosquito *Aedes aegypti*, vetor de doenças urbanas.

INTRODUÇÃO

A determinação e a diferenciação sexual em peixes é um evento altamente plástico e complexo (Baroiller and D’Cotta, 2001). O destino sexual não é restrito ao período embrionário, mas consiste em contínua manutenção da concentração de hormônios, suprimindo características do sexo oposto (revisado por Liu et al., 2017). A diferenciação fisiológica ou molecular das gônadas, caracterizada por padrões de expressão sexualmente dimórficos, começam muito antes do tempo de incubação, e a diferenciação gonadal histológica pode ser observada tardiamente (Baroiller and D’Cotta, 2016). Em *Megaleporinus macrocephalus*, espécie gonocórica, o processo de diferenciação gonadal inicia a partir de uma gônada indiferenciada que tem seu destino determinado durante a ontogênese pela presença de cromossomos sexuais ZZ/ZW (Galetti, Jr. and Foresti, 1986). Em teleósteos, os hormônios 17 β -Estradiol (E2) e 11 cetotestosterona (11-KT), estrógeno e andrógeno, respectivamente, controlam a diferenciação das gônadas e mantêm os fenótipos sexuais (Devlin and Nagahama, 2002).

A fase de diferenciação sexual é a mais sensível à ação de esteroides sexuais exógenos (Piferrer, 2001). Conforme Göppert et al. (2016), em peixes a plasticidade da diferenciação sexual pode levar à reversão sexual induzida por xenobióticos devido à poluição. Os pesticidas compõem um grupo de substâncias químicas muito diverso, o que faz com que diferentes compostos possam ter diferentes modos de ação como disruptores endócrinos (Vinggaard et al., 2006). Estudos no ambiente natural e em experimentos laboratoriais demonstraram diversos efeitos de pesticidas sobre a reprodução e diferenciação sexual em diferentes grupos. Em *Crocodylus niloticus* foi observada elevada taxa de ovos inférteis no ambiente natural, com correlação entre variáveis reprodutivas/endócrinas e a carga de contaminantes hepáticos (Arukwe et al., 2016). Na rã *Physalaemus cuvieri* foi observada uma taxa de 20% de indivíduos hermafroditas, associada a uma concentração relativamente baixa (0,05 μ g/L) do xenobiótico dieldrin, um agrotóxico persistente (Moresco et al., 2014). Em *Cyprinus carpio*, amostrados de um rio poluído por compostos estrogênicos, houve presença de peixes afetados possuindo gônadas com tecido masculino e

feminino ou atrofia testicular (Solé et al., 2003). Em indivíduos macho, de *Rhinella poeppigii* (citada como *Bufo marinus*), ao longo de um gradiente de aumento de terras agrícolas, foi observada correlação entre o aumento de terras agrícolas e a frequência de gônadas intersexo, traços sexuais secundários, presença de vitelogenina em órgãos de Bidder, presença de oócitos, e redução nos níveis de testosterona (McCoy et al., 2008). Em *Lithobates pipiens* expostos a combinação de pesticidas, representativos em termos de concentração e composição na natureza, houve um atraso de crescimento e desenvolvimento das larvas, com anomalias acentuadas quando os pesticidas foram combinados (Christin et al., 2004). Em *Xenopus laevis* a atrazina provocou feminização e redução nos níveis de testosterona, afetando diretamente a espermatogênese e reduzindo a fertilidade (Hayes et al., 2010).

Com efeito sobre o desenvolvimento, o procloraz é considerado um disruptor endócrino de amplo espectro. Trata-se de um fungicida pertencente ao grupo imidazolilcarboxamida, cujo mecanismo de ação envolve a inibição da síntese da enzima CYP51, que participa da biossíntese do ergosterol, um componente da membrana celular fúngica (Henry and Sisler, 1984; Kegley et al., 2016). No entanto, o procloraz atua também de modo não seletivo inibindo a aromatase (CYP19) (Sanderson et al., 2002), além de atuar como antagonista sobre a atividade do receptor androgênico (AR), e do receptor de estrógeno (ER) (Raun Andersen et al., 2002). Assim, estudos sobre o efeito do procloraz em *zebrafish* evidenciaram a maior proporção de machos e a incidência de indivíduos intersexo, além de alteração nas gônadas e redução da vitelogenina em machos e fêmeas (Kinnberg et al., 2007). Domingues et al. (2013) demonstraram que este composto possui ainda ação teratogênica, levando à malformações e, em baixas concentrações após a eclosão, à presença de edemas e absorção anormal do saco vitelino.

O piriproxifem, por sua vez, é um análogo de hormônio juvenil em insetos, que pertence ao grupo químico éter piridiloxipropílico, a base de piridina (IRAC, 2017; Sullivan and Goh, 2008). O composto age como supressor da embriogênese e da formação adulta (Ishaaya and Horowitz, 1992) e, embora estruturalmente não tenha relação com o hormônio juvenil, tem atividade biológica semelhante, pois compete pelos mesmos sítios de ligação dos receptores a este

hormônio (Palma et al., 1993; Riddiford, 1994). Não se sabe ao certo qual o modo de ação do piriproxifem, mas sabe-se que durante o desenvolvimento de vertebrados ele tem levado à malformações (Azevedo-Linhares et al., 2018), ao aumento de mortalidade quando em doses reduzidas (Azevedo-Linhares et al., 2018; Dzieciolowska et al., 2017) e ainda, associado a microcistina, teve seu efeito potencializado (Azevedo-Linhares et al., 2018).

Em peixes, a complexidade dos processos fisiológicos envolvidos na diferenciação e maturação gonadal permite a interferência de xenobióticos que, além do comprometimento geral da reprodução, podem levar a reversões do fenótipo sexual em nível bioquímico ou morfológico, por suas ações como disruptores endócrinos (Devlin and Nagahama, 2002). O objetivo deste trabalho foi avaliar, os efeitos na fase tardia de desenvolvimento de *Megaleporinus macrocephalus* quando expostos ainda no período larval ao procloraz e piriproxifem de forma combinada e de forma isolada.

MATERIAIS E MÉTODOS

2.1. Exposição aos agrotóxicos

As larvas de *M. macrocephalus* foram obtidas de uma piscicultura - a partir de progenitores selvagens, provenientes de riachos afluentes do Rio Paraná - 96 horas após a eclosão dos ovos (HPE). A coleta dos animais teve a permissão do Instituto Chico Mendes de Conservação de Biodiversidade (ICMBio): Licença permanente SISBIO para coleta/transporte de peixes (10522-1). O experimento foi realizado no laboratório de Biologia e Conservação de Anamniotas da Unioeste – *Campus* Cascavel, com aprovação do Comitê de Ética no uso de animais da Unioeste: 16-03-2017 – CEUA/Unioeste).

Foram separados quatro grupos: controle, piriproxifem, procloraz e mistura de procloraz e piriproxifem. O grupo 1 representa o grupo controle, o grupo 2 foi exposto ao fungicida procloraz (200 µg/L diluídos em 30µL de acetonitrila) (concentração 100%, peso molecular 376.67 g/mol, CAS-No.: 67747-09-5 Sigma-Aldrich (Deisenhofen, Germany)); o grupo 2 foi exposto ao inseticida piriproxifem (≥ 98.0 % de pureza, peso molecular: 321.37) Dr. Ehrenstorfer® (Augsburg, Germany) (2,5µg/L diluídos em 2,2µL de acetonitrila); o grupo 3 foi exposto a

combinação dos agrotóxicos procloraz (200 µg/L diluídos em 30µL de acetonitrila) e piriproxifem (2,5µg/L diluídos em 2,2µL de acetonitrila) e o grupo 4 representa o grupo controle. A dose experimental de piriproxifem foi escolhida a partir de um teste piloto com 5µg/L, o qual demonstrou elevada mortalidade, e a dose de procloraz se baseou em estudos de Kinnberg et al. (2007) que demonstraram aumento de machos a uma dose de 202µg/L. As larvas foram mantidas aclimatadas até o 8º dia em água limpa, antes do início da exposição, e alimentadas com artêmia salina duas vezes ao dia. Para o período experimental, quatro aquários foram utilizados com água desclorada, aeração constante e temperatura e fotoperíodo controlados (10 horas claro e 14 horas escuro). Os indivíduos foram alimentados com artêmia salina, duas vezes ao dia, até a idade suficiente para a alimentação através de ração. Cada aquário dos tratamentos recebeu uma única dose de contaminação e ficaram expostos durante 60 dias. Após este período ontogênico, os animais dos quatro grupos foram mantidos por 240 dias em aquários com água desclorada e todas as variáveis anteriormente citadas, controladas. Ao final do experimento os animais foram anestesiados e sacrificados com solução de Eugenol (Griffiths, 2000).

Para a identificação do sexo genotípico em *M. macrocephalus* foi retirado uma porção do rim anterior para a obtenção de metáfases mitóticas. A técnica utilizada foi a proposta por Bertollo *et al.* (1978) com modificações de Foresti *et al.* (1993), que consiste na extração, homogeneização e hipotonização do rim, seguido de sucessivas centrifugações e lavagens com fixador (metanol/ácido acético, 3:1), descartando-se o sobrenadante. O material fixado foi acondicionado em tubos de "Eppendorf" e armazenado em freezer, para posterior análise. Para determinar o número e morfologia dos cromossomos, foi utilizada a coloração convencional por Giemsa. As lâminas foram preparadas com 1-3 gotas de suspensão celular sobre uma lâmina limpa, levemente aquecida, deixando-a secar ao ar. As lâminas foram coradas com Giemsa 5%, diluída em tampão fosfato ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 12 \text{H}_2\text{O} + \text{KH}_2\text{PO}_4 \times 12\text{H}_2\text{O}$), pH=6,8, por 7 minutos. As imagens foram capturadas em fotomicroscópio Olympus BX60 com câmera digital DP71.

Para a caracterização histológica das gônadas, o tecido retirado foi imerso e fixado em Karnovsky modificado (tampão fosfato Sörensen 0.1M,

tampão fosfato pH 7.2 contendo paraformaldeído 5% e glutaraldeído 2.5%) por um período de 48 horas e encaminhado à rotina histológica (Ribeiro e Lima, 2000) para inclusão em historesina Leica.

Foram feitas secções de 5µm para cada gônada. Estas secções foram coradas com Hematoxilina-eosina. Posteriormente analisadas e fotografadas com objetiva de 20 e 40x usando microscópio de epifluorescência BX 61, acoplado com câmera digital Olympus DP 71, utilizando-se o *software* de captura de imagem DP Controller 3.2.1.276.

RESULTADOS

Caracterização citogenética de Megaleporinus macrocephalus

No grupo controle de *M. macrocephalus* foram observados 2 machos e 5 fêmeas (Gráfico 1), onde os machos apresentaram $2n=54$, ZZ cromossomos, e as fêmeas apresentaram $2n=54$, ZW cromossomos (Figura 1), e as análises histológicas das gônadas demonstraram que estas são correspondentes ao sexo genético. No grupo tratado com procloraz foram observados 3 fêmeas e 3 machos através da análise citogenética, um dos quais apresentou alguns folículos ovarianos testiculares imersos no tecido gonadal com predominância de células espermatogênicas (Figura 3A). No grupo tratado com piriproxifem foram observados 6 machos e 9 fêmeas determinados pelo sexo genético (Gráfico 1). A técnica histológica confirmou os dados citogenéticos, exceto para duas fêmeas do grupo tratado com piriproxifem, que apresentaram gônadas fenotipicamente masculinas, com predominâncias de células que se assemelham a espermatogônias (Figura 3C). O grupo tratado com a mistura de procloraz e piriproxifem apresentou 3 machos e 11 fêmeas determinados pelo sexo genético (Gráfico1). A técnica histológica confirmou os dados citogenéticos, exceto para duas fêmeas com gônadas fenotipicamente masculinas, com predominâncias de células que se assemelham a espermatogônias (Figura 3D).

Descrição morfológica das gônadas de Megaleporinus macrocephalus

Em todos os indivíduos machos os testículos são órgãos pares, alongados e cordonais, revestido externamente por uma cápsula de tecido conjuntivo frouxo,

muito celularizado, sendo um órgão ricamente vascularizado (Figura 2A, C, E, G). As gônadas destes indivíduos se apresentaram em estágio de desenvolvimento com espermatogônias diferenciadas, espermatócitos primários, espermatócitos secundários, e espermatídes iniciais e finais. Em alguns indivíduos foram observados espermatozoides presente no lúmen dos túbulos seminíferos. O tecido gonadal é sustentado por um estroma formado por células de Sertoli, além de tecido conjuntivo e células de Leydig, podendo as células espermatogênicas se encontrarem em cistos espermatogênicos (Figura 2A).

Nas fêmeas, os ovários são órgãos pares, saculares, altamente vascularizados e sustentados por tecido conjuntivo frouxo, altamente celularizado. As gônadas femininas se mostraram em desenvolvimento, com presença predominante de oogônias e ovócitos nucleolares e perinucleolares (Figura 2B, D, F, e H). Em uma das fêmeas foi observado invasão linfocitária em uma região, com elevada presença de hemácias que invadiram o tecido (Figura 3B).

Descrição morfológica das gônadas intersexo de Megaleporinus macrocephalus exposto ao procloraz

No grupo exposto ao procloraz foi observado um espécime com as gônadas intersexo contendo tecido masculino e feminino, no estágio de desenvolvimento intermediário com presença predominante das células espermatogênicas: espermatogônias, espermatócitos primário e secundário, espermatídes iniciais e finais, e poucos folículos ovarianos testiculares (Figura 3A).

Descrição morfológica das gônadas intersexo de Megaleporinus macrocephalus exposto ao piriproxifem

No grupo exposto ao piriproxifem foi observado a presença de indivíduos com gônadas intersexo provenientes do sexo genético feminino, com fenótipo predominantemente masculino. Estes indivíduos apresentaram predominância de células do tipo espermatogônias, poucos espermatócitos (alguns em cistos espermatogênicos, em divisão celular), espermatídes e espermatozoides, características típicas de gônadas em reestruturação (Figura 3C). O núcleo das

espermatogônias se apresentaram pouco basófilo. Também foi observado neste grupo, dentre as fêmeas normais, a presença de linfócitos no tecido (Figura 3B).

Descrição morfológica das gônadas intersexo de Megaleporinus macrocephalus exposto à combinação de procloraz e piriproxifem

No grupo exposto a mistura foi observado indivíduos com gônadas intersexo provenientes do sexo genético feminino, com fenótipo predominantemente masculino, nas quais foram observadas apenas células espermatogênicas: predomínio de espermatogônias, e presença de espermatócitos, espermátides e espermatozoides, características típicas de gônadas em reestruturação. Além disso, um indivíduo apresentou folículos ovarianos testiculares (Figura 3D). Em fêmeas normais houve ainda a observação de gônadas com presença de oócitos em degeneração, com núcleo e citoplasma mais acidófilos (Figura 2H).

DISCUSSÃO

A presença de indivíduos machos apresentando células femininas no grupo procloraz, expressa a associação do mesmo durante o período de ontogenia precoce larval. O procloraz interage na produção dos hormônios femininos, seja através da interferência na expressão da aromatase ou interação com receptor de estrogênio (Raun Andersen et al., 2002; Sanderson et al., 2002). A aromatase está presente nas gônadas femininas e masculinas e é capaz de converter androstenediona e testosterona em estrona e 17β -estradiol (E2), respectivamente, e fatores que controlam esta enzima podem ser importantes na determinação morfológica gonadal (Liu et al., 2017). No presente trabalho, possivelmente no momento da exposição, em machos, o procloraz foi capaz de influenciar na concentração de hormônios por sua atividade sobre o metabolismo dos hormônios femininos, permitindo o desenvolvimento de folículos ovarianos testiculares.

Nesta fase do desenvolvimento, o ambiente necessita de hormônios em concentrações restritas para permitir o desenvolvimento correto das gônadas e manter as características sexuais primárias e secundárias do indivíduo, e

alterações durante períodos sensíveis ou críticos de desenvolvimento, podem gerar alterações que permanecem em fases tardias do ciclo de vida (Filho et al., 2007).

Em *Danio rerio*, a exposição ao procloraz levou a uma maior proporção de machos e incidência de indivíduos intersexo de forma dose-dependente durante o desenvolvimento, com ação sobre o nível de expressão de vitelogenina (VTG1 e VTG2), receptores de estrogênio (ERA, ERB1, ERB2) e aromatase (CYP19a1a e CYP19a1b, a última tendo a expressão induzida significativamente) (Baumann et al., 2015; Kinnberg et al., 2007). Em *Oryzias latipes*, promoveu efeito sobre a fecundidade e redução na expressão do receptor de estrogênio (ER- α) e vitelogenina, enquanto aumentou a expressão de 17 α -hydroxylase (cyp17) e aromatase (cyp19) no ovário (Zhang et al., 2008). Em *Pimephales promelas* expostos ao procloraz houve inibição da atividade da CYP19, redução na produção de E2 gonadal, além dos níveis de VTG ficarem deprimidos no plasma e a fecundidade ter sido reduzida (Ankley et al., 2005). Tais ocorrências confirmam ações não específicas do procloraz no sistema endócrino em geral, as quais variaram de acordo com o organismo, sua fisiologia e o momento da exposição; e demonstram a complexidade e a plasticidade do mecanismo de diferenciação sexual em peixes, de forma espacial e temporal, mesmo em *M. macrocephalus*, uma espécie gonocórica que tem o destino sexual definido durante a fertilização pela presença de sistema de cromossomos sexuais.

O piperproxifem, por sua vez, levou a reversão para o sexo masculino, com presença predominante de células que se assemelham a espermatogônias. Em vertebrados estas são as primeiras observações de reversão sexual, fator associado aos poucos estudos sobre o desenvolvimento sexual. Apesar disso, já é possível estimar um amplo espectro de ação baseado na exposição ao mesmo durante a ontogênese e em adultos com doses reduzidas. Em estudos em *zebrafish* realizados por Truong et al. (2016), observou-se aumento da mortalidade e efeitos morfológicos adversos, incluindo defeitos craniofaciais a doses mais elevadas. Estudos de Azevedo-Linhares et al. (2018), no estágio de gástrula em *Rhamdia quelen*, revelaram a alta toxicidade do composto, com presença de malformações e redução na taxa de sobrevivência mesmo a doses muito pequenas. De maneira similar, Dzieciolowska et al. (2017) demonstraram

elevada mortalidade em embriões de *zebrafish* expostos, enquanto Caixeta et al. (2016) observaram movimentos natatórios inadequados em *Xiphophorus maculatus* adultos expostos a apenas 5 µg/l de piriproxifem.

De maneira similar aos efeitos observados com o piriproxifem em *M. macrocephalus* agem os inibidores de aromatase, como a 17α-methyltestosterona (17MT) e a 11 cetotestosterona (11KT). Em *zebrafish* adultos, o tratamento de inibição da aromatase promoveu retração dos ovários e o aparecimento de órgãos testiculares e estruturas císticas preenchidas com espermatozoides (Takatsu et al., 2013), porém em nosso estudo os indivíduos foram expostos em estágios iniciais ao piriproxifem, e mesmo em estágios mais avançados do desenvolvimento houve a manutenção do fenótipo masculinizado.

Apesar de o piriproxifem agir como análogo de hormônio juvenil, sua estrutura química não é semelhante. Em insetos, o piriproxifem se ancora dentro do domínio Per-Arnt-Sim (PAS) do receptor metopreno tolerante (Met), com maior afinidade que o hormônio juvenil, conforme demonstrado em modelos estruturais (Charles et al., 2011). Estes domínios do tipo PAS são encontrados em um grande número de organismos metazoários, em um grande número de família de coativadores de receptores, incluindo o receptor de hidrocarboneto de dioxina/arila (AhR) (Pecenova and Farkas, 2016) e o receptor de ácido retinoico. O ácido retinoico apresenta papel fundamental no desenvolvimento, e indicações sugerem que o AhR também possui grande importância, inclusive na formação dos ossos (Yasufumi et al., 2004), e na fisiologia da reprodução. A ativação de AhR por ligantes exógenos pode reduzir os níveis de proteína ER por degradação proteica (Pocar et al., 2005), que deixa de inibir a expressão de genes do sexo oposto e pode permitir o desenvolvimento do fenótipo masculinizado, equivalente ao observado em indivíduos expostos ao piriproxifem, pois conforme Liu et al. (2017) é preciso que ocorra a manutenção da concentração de hormônios, para supressão das características do sexo oposto.

Em vertebrados, o receptor de hidrocarboneto de dioxina/arila (AhR) é um fator de transcrição ativado por ligante, responsivo a compostos ambientais naturais e também artificiais, conforme observado com o uso de bifenóis policlorados (PCBs), 2,3,7,8-tetraclorodibenzo-p-dioxina (TCDD) e o dibenzoantroceno (Pocar et al., 2005), e poderia representar um mecanismo pela

qual o piriproxifem atua permitindo os efeitos observados nos estudos de desenvolvimento realizados até então.

A exposição isolada ao procloraz e ao piriproxifem em *M. macrocephalus* levou a efeitos feminilizantes e masculinizantes, respectivamente, com eventos de reversão total do sexo associado ao piriproxifem, e a presença de apenas alguns folículos ovarianos testiculares relacionados aos efeitos do procloraz. Na mistura dos dois pesticidas houve apenas a observação do efeito masculinizante, sem que se pudesse inferir interação entre os compostos. Estudos com compostos em mistura em *zebrafish* revelaram efeito antagonista entre a malationa (um organofosforado) e o procloraz (um imidazol) (Guo et al., 2017). Por outro lado, Azevedo-Linhares et al. (2018) demonstraram uma interação agonista em larvas de *Rhamdia quelen* 48 horas após a eclosão expostas à piriproxifem e microcistina - toxina produzida por cianobactérias - a doses passíveis de serem encontradas no ambiente aquático, revelando efeitos sobre a taxa de sobrevivência e a incidência de malformações. O que demonstra que estes compostos podem interagir no ambiente e ter sua toxicidade aumentada.

Embora não se tenha o conhecimento sobre como o piriproxifem possa afetar organismos não alvo, ele tem sido utilizado como estratégia no controle de vetores de doenças tropicais, como o mosquito *Aedes aegypti* (Sihuincha et al., 2005) o que traz uma preocupação em relação aos efeitos causados em ambientes naturais. No presente trabalho a exposição única a 2,5ug/L de piriproxifem durante os primeiros 60 dias foi capaz de reverter o sexo e manter esta característica em uma escala temporal maior (240 dias) mesmo quando associado a um outro composto que agiu como um feminilizante, quando utilizado isoladamente, o que preocupa ainda mais em relação a toxicidade do composto. A plasticidade no evento de diferenciação sexual torna os peixes susceptíveis a xenobióticos encontrados no seu habitat, mediados pela ação humana. Assim como o procloraz, o piriproxifem tem demonstrado um amplo espectro de ação, a doses reduzidas, o que alerta para a necessidade de revisão sobre a concentração de utilização permitida, e até a proibição do uso do produto para controle de vetores de doenças tropicais em meio urbano e o uso na agricultura contra as denominadas pragas agrícolas.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem à Universidade Estadual do Oeste do Paraná (UNIOESTE) pelo apoio logístico. Este trabalho foi financiado pelo CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico) e pela Fundação Araucária (Fundação de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico do Paraná).

REFERÊNCIAS

- Ankley, G.T., Jensen, K.M., Durhan, E.J., Makynen, E.A., Butterworth, B.C., Kahl, M.D., Villeneuve, D.L., Linnum, A., Gray, L.E., Cardon, M., Wilson, V.S., 2005. Effects of two fungicides with multiple modes of action on reproductive endocrine function in the fathead minnow (*Pimephales promelas*). *Toxicol. Sci.* 86, 300–308. <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfi202>
- Arukwe, A., Myburgh, J., Langberg, H.A., Adeogun, A.O., Braa, I.G., Moeder, M., Schlenk, D., Crago, J.P., Regoli, F., Botha, C., 2016. Developmental alterations and endocrine-disruptive responses in farmed Nile crocodiles (*Crocodylus niloticus*) exposed to contaminants from the Crocodile River, South Africa. *Aquat. Toxicol.* <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2015.12.027>
- Azevedo-Linhares, M., Souza, A.T.C., Lenz, C.A., Leite, N.F., Brito, I.A., Folle, N.M.T., Garcia, J.E., Filipak Neto, F., Oliveira Ribeiro, C.A., 2018. Microcystin and pyriproxyfen are toxic to early stages of development in *Rhamdia quelen*: An experimental and modelling study. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 166, 311–319. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2018.09.064>
- Baroiller, J.F., D’Cotta, H., 2016. The Reversible Sex of Gonochoristic Fish: Insights and Consequences. *Sex. Dev.* 10, 242–266. <https://doi.org/10.1159/000452362>
- Baroiller, J.F., D’Cotta, H., 2001. Environment and sex determination in farmed fish, in: *Comparative Biochemistry and Physiology - C Toxicology and Pharmacology*. [https://doi.org/10.1016/S1532-0456\(01\)00267-8](https://doi.org/10.1016/S1532-0456(01)00267-8)
- Baumann, L., Knörr, S., Keiter, S., Nagel, T., Segner, H., Braunbeck, T., 2015. Prochloraz causes irreversible masculinization of zebrafish (*Danio rerio*). *Environ. Sci. Pollut. Res.* 22, 16417–16422. <https://doi.org/10.1007/s11356-014-3486-3>
- Bird, N.C., Mabee, P.M., 2003. Developmental Morphology of the Axial Skeleton of the Zebrafish, *Danio rerio* (Ostariophysi: Cyprinidae). *Dev. Dyn.* <https://doi.org/10.1002/dvdy.10387>
- Boglione, C., Gisbert, E., Gavaia, P., Witten, P.E., Moren, M., Fontagné, S., Koumoundouros, G., 2013. Skeletal anomalies in reared European fish larvae and juveniles. Part 2: Main typologies, occurrences and causative factors. *Rev. Aquac.* <https://doi.org/10.1111/raq.12016>
- Bolognesi, C., Cirillo, S., 2014. Genotoxicity biomarkers in aquatic bioindicators. *Curr. Zool.* 60, 273–284. <https://doi.org/10.1093/czoolo/60.2.273>
- Brasil. Ministério da Saúde, 2014. Orientações técnica para utilização do larvicida pyriproxyfen (0,5 G) no controle de *Aedes aegypti* 1–3.
- Britski, H.A., Birindelli, J.L.O., Garavello, J.C., 2012. A new species of *Leporinus*

- Agassiz, 1829 from the upper Rio Paraná basin (Characiformes, Anostomidae) with redescription of *L. elongatus* Valenciennes, 1850 and *L. obtusidens* (Valenciennes, 1837). *Pap. Avulsos Zool.* 52, 441–475. <https://doi.org/10.1590/S0031-10492012021700001>
- Cahu, C., Infante, J.Z., Takeuchi, T., 2003. Nutritional components affecting skeletal development in fish larvae, in: *Aquaculture*. [https://doi.org/10.1016/S0044-8486\(03\)00507-6](https://doi.org/10.1016/S0044-8486(03)00507-6)
- Caixeta, E.S., Silva, C.F., Santos, V.S.V., Olegário de Campos Júnior, E., Pereira, B.B., 2016. Ecotoxicological assessment of pyriproxyfen under environmentally realistic exposure conditions of integrated vector management for *Aedes aegypti* control in Brazil. *J. Toxicol. Environ. Heal. Part A* 79, 799–803. <https://doi.org/10.1080/15287394.2016.1191400>
- Cajaraville, M.P., Bebianno, M.J., Blasco, J., Porte, C., Sarasquete, C., Viarengo, A., 2000. The use of biomarkers to assess the impact of pollution in coastal environments of the Iberian Peninsula: a practical approach. *Sci. Total Environ.* 247, 295–311. [https://doi.org/10.1016/S0048-9697\(99\)00499-4](https://doi.org/10.1016/S0048-9697(99)00499-4)
- Charles, J.-P., Iwema, T., Epa, V.C., Takaki, K., Rynes, J., Jindra, M., 2011. Ligand-binding properties of a juvenile hormone receptor, Methoprene-tolerant. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 108, 21128–21133. <https://doi.org/10.1073/pnas.1116123109>
- Christin, M.S., Ménard, L., Gendron, A.D., Ruby, S., Cyr, D., Marcogliese, D.J., Rollins-Smith, L., Fournier, M., 2004. Effects of agricultural pesticides on the immune system of *Xenopus laevis* and *Rana pipiens*. *Aquat. Toxicol.* <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2003.11.007>
- Cunningham, T.J., Duester, G., 2015. Mechanisms of retinoic acid signalling and its roles in organ and limb development. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 16, 110–123. <https://doi.org/10.1038/nrm3932>
- De La Torre, F.R., Ferrari, L., Salibián, A., 2005. Biomarkers of a native fish species (*Cnesterodon decemmaculatus*) application to the water toxicity assessment of a peri-urban polluted river of Argentina. *Chemosphere.* <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2004.12.039>
- Devlin, R.H., Nagahama, Y., 2002. Sex determination and sex differentiation in fish: an overview of genetic, physiological, and environmental influences. *Aquaculture* 208, 191–364. [https://doi.org/10.1016/S0044-8486\(02\)00057-1](https://doi.org/10.1016/S0044-8486(02)00057-1)
- Domingues, I., Oliveira, R., Musso, C., Cardoso, M., Soares, A.M., Loureiro, S., 2013. Prochloraz effects on biomarkers activity in zebrafish early life stages and adults. *Environ. Toxicol.* 28, 155–163. <https://doi.org/10.1002/tox.20710>
- Dzieciolowska, S., Larroque, A.-L., Kranjec, E.-A., Drapeau, P., Samarut, E., 2017. The larvicide pyriproxyfen blamed during the Zika virus outbreak does not cause microcephaly in zebrafish embryos. *Sci. Rep.* 7, 40067. <https://doi.org/10.1038/srep40067>
- Filho, R.W.R., Luvizotto-Santos, R., Vieira, E.M., 2007. Poluentes Emergentes como Desreguladores Endócrinos. *J. Brazilian Soc. Ecotoxicol.* 2, 283–288. <https://doi.org/10.5132/jbse.2007.03.012>
- Fourrier, J., Deschamps, M., Droin, L., Alaux, C., Fortini, D., Beslay, D., Le Conte, Y., Devillers, J., Aupinel, P., Decourtye, A., Rueppell, O., 2015. Larval exposure to the juvenile hormone analog pyriproxyfen disrupts acceptance of and social behavior performance in adult honeybees. *PLoS One.* <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0132985>

- Galetti, Jr., P.M., Foresti, F., 1986. Evolution of the ZZ/ZW system in Leporinus (Pisces, Anostomidae). *Cytogenet. Genome Res.* 43, 43–46.
- Gilbert, S.F., 2010. *Developmental Biology*, 9th ed, Developmental Biology. Sinauer Associates, Sunderland.
- Ginjupalli, G.K., Baldwin, W.S., 2013. The time- and age-dependent effects of the juvenile hormone analog pesticide, pyriproxyfen on *Daphnia magna* reproduction. *Chemosphere*.
<https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2013.04.061>
- Göppert, C., Harris, R.M., Theis, A., Boila, A., Hohl, S., Rüegg, A., Hofmann, H.A., Salzburger, W., Böhne, A., 2016. Inhibition of Aromatase Induces Partial Sex Change in a Cichlid Fish: Distinct Functions for Sex Steroids in Brains and Gonads. *Sex. Dev.* <https://doi.org/10.1159/000445463>
- Hallman, A., Bond, C., Buhl, K., Stone, D., 2015. Pyriproxyfen General Fact Sheet [WWW Document]. Natl. Pestic. Inf. Center, Oregon State Univ. Ext. Serv. URL <http://npic.orst.edu/factsheets/pyriprogen.html>
- Harmon, M.A., Boehm, M.F., Heyman, R.A., Mangelsdorf, D.J., 1995. Activation of mammalian retinoid X receptors by the insect growth regulator methoprene. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 92, 6157–6160.
<https://doi.org/10.1073/pnas.92.13.6157>
- Hayes, T.B., Falso, P., Gallipeau, S., Stice, M., 2010. The cause of global amphibian declines: a developmental endocrinologist's perspective. *J. Exp. Biol.* 213, 921–933. <https://doi.org/10.1242/jeb.040865>
- Henry, M.J., Sisler, H.D., 1984. Effects of sterol biosynthesis-inhibiting (SBI) fungicides on cytochrome P-450 oxygenations in fungi. *Pestic. Biochem. Physiol.* 262–275.
- IRAC, 2017. Insecticide Resistance Action Committee - Mode of Action Classification Scheme [WWW Document]. URL www.irac-online.org
- Ishaaya, I., Horowitz, A.R., 1992. Novel Phenoxy Juvenile Hormone Analog (Pyriproxyfen) Suppresses Embryogenesis and Adult Emergence of Sweetpotato Whitefly (Homoptera: Aleyrodidae). *J. Econ. Entomol.* 85, 2113–2117. <https://doi.org/10.1093/jee/85.6.2113>
- Kegley, S.E., Hill, B.R., S., O., C.A.H., 2016. PAN Pesticide Database, Pesticide Action Network [WWW Document]. URL <http://pesticideinfo.org> (accessed 7.12.17).
- Kinnberg, K., Holbech, H., Petersen, G.I., Bjerregaard, P., 2007. Effects of the fungicide prochloraz on the sexual development of zebrafish (*Danio rerio*). *Comp. Biochem. Physiol. C. Toxicol. Pharmacol.* 145, 165–70.
<https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2006.11.002>
- Kopinke, D., Sasine, J., Swift, J., Stephens, W.Z., Piotrowski, T., 2006. Retinoic acid is required for endodermal pouch morphogenesis and not for pharyngeal endoderm specification. *Dev. Dyn.* 235, 2695–2709.
<https://doi.org/10.1002/dvdy.20905>
- Kumar, S., Duester, G., 2011. SnapShot: Retinoic acid signaling. *Cell*.
<https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.11.034>
- Lall, S.P., Lewis-mccrea, L.M., 2007. Role of nutrients in skeletal metabolism and pathology in fish — An overview 267, 3–19.
<https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2007.02.053>
- Laue, K., Janicke, M., Plaster, N., Sonntag, C., Hammerschmidt, M., 2008. Restriction of retinoic acid activity by Cyp26b1 is required for proper timing

- and patterning of osteogenesis during zebrafish development. *Development* 135, 3775–3787. <https://doi.org/10.1242/dev.021238>
- Liu, H., Todd, E. V., Lokman, P.M., Lamm, M.S., Godwin, J.R., Gemmell, N.J., 2017. Sexual plasticity: A fishy tale. *Mol. Reprod. Dev.* 84, 171–194. <https://doi.org/10.1002/mrd.22691>
- Marimuthu, K., Muthu, N., Xavier, R., Arockiaraj, J., Rahman, M.A., Subramaniam, S., 2013. Toxicity of Buprofezin on the Survival of Embryo and Larvae of African Catfish, *Clarias gariepinus* (Bloch). *PLoS One* 8, 1–7. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0075545>
- McCoy, K.A., Bortnick, L.J., Campbell, C.M., Hamlin, H.J., Guillette, L.J., St. Mary, C.M., 2008. Agriculture alters gonadal form and function in the toad *Bufo marinus*. *Environ. Health Perspect.* <https://doi.org/10.1289/ehp.11536>
- Moresco, R.M., Margarido, V.P., de Oliveira, C., 2014. A persistent organic pollutant related with unusual high frequency of hermaphroditism in the neotropical anuran *Physalaemus cuvieri* Fitzinger, 1826. *Environ. Res.* 132, 6–11. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2014.03.028>
- Navarro-Martín, L., Oliveira, E., Casado, M., Barata, C., Piña, B., 2018. Dysregulatory effects of retinoic acid isomers in late zebrafish embryos. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 25, 3849–3859. <https://doi.org/10.1007/s11356-017-0732-5>
- Němec, V., Kodrík, D., Matolín, S., Laufer, H., 1993. Juvenile hormone-like effects of retinoic acid in insect metamorphosis, embryogenesis and reproduction. *J. Insect Physiol.* 39, 1083–1093. [https://doi.org/10.1016/0022-1910\(93\)90132-B](https://doi.org/10.1016/0022-1910(93)90132-B)
- Palli, S.R., Riddiford, L.M., Hiruma, K., 1991. Juvenile hormone and “retinoic acid” receptors in *Manduca* epidermis. *Insect Biochem.* 21, 7–15. [https://doi.org/10.1016/0020-1790\(91\)90059-N](https://doi.org/10.1016/0020-1790(91)90059-N)
- Palma, K.G., Meola, S.M., Meola, R.W., 1993. Mode of Action of Pyriproxyfen and Methoprene on Eggs of *Ctenocephalides felis* (Siphonaptera: Pulicidae). *J. Med. Entomol.* 30, 421–426. <https://doi.org/10.1093/jmedent/30.2.421>
- Pamanji, R., Yashwanth, B., Bethu, M.S., Leelavathi, S., Ravinder, K., Venkateswara Rao, J., 2015. Toxicity effects of profenofos on embryonic and larval development of Zebrafish (*Danio rerio*). *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 39, 887–897. <https://doi.org/10.1016/j.etap.2015.02.020>
- Pecenova, L., Farkas, R., 2016. Multiple functions and essential roles of nuclear receptor coactivators of bHLH-PAS family. *Endocr. Regul.* 50, 165–181. <https://doi.org/10.1515/enr-2016-0019>
- Piferrer, F., 2001. Endocrine sex control strategies for the feminization of teleost fish. *Aquaculture* 197, 229–281. [https://doi.org/10.1016/S0044-8486\(01\)00589-0](https://doi.org/10.1016/S0044-8486(01)00589-0)
- Pocar, P., Fischer, B., Klonisch, T., Hombach-Klonisch, S., 2005. Molecular interactions of the aryl hydrocarbon receptor and its biological and toxicological relevance for reproduction. *Reproduction* 129, 379–389. <https://doi.org/10.1530/rep.1.00294>
- Rashed, M.N., 2001. Monitoring of environmental heavy metals in fish from nasser lake. *Environ. Int.* 27, 27–33. [https://doi.org/10.1016/S0160-4120\(01\)00050-2](https://doi.org/10.1016/S0160-4120(01)00050-2)
- Raun Andersen, H., Vinggaard, A.M., Høj Rasmussen, T., Gjermansen, I.M., Cecilie Bonfeld-Jørgensen, E., 2002. Effects of currently used pesticides in assays for estrogenicity, androgenicity, and aromatase activity in vitro. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* <https://doi.org/10.1006/taap.2001.9347>

- Red, R.T., Richards, S.M., Torres, C., Adair, C.D., 2011. Environmental Toxicant Exposure During Pregnancy. *Obstet. Gynecol. Surv.* 66, 159–169. <https://doi.org/10.1097/OGX.0b013e3182219014>
- Rhinn, M., Dolle, P., 2012. Retinoic acid signalling during development. *Development* 139, 843–858. <https://doi.org/10.1242/dev.065938>
- Riddiford, L.M., 1994. Cellular and Molecular Actions of Juvenile Hormone I. General Considerations and Premetamorphic Actions. pp. 213–274. [https://doi.org/10.1016/S0065-2806\(08\)60084-3](https://doi.org/10.1016/S0065-2806(08)60084-3)
- Rimoldi, F., Fogel, M.N., Ronco, A.E., Schneider, M.I., 2017. Comparative susceptibility of two Neotropical predators, *Eriopis connexa* and *Chrysoperla externa*, to acetamiprid and pyriproxyfen: Short and long-term effects after egg exposure. *Environ. Pollut.* 231, 1042–1050. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2017.08.097>
- Samarut, E., Fraher, D., Laudet, V., Gibert, Y., 2015. ZebRA: An overview of retinoic acid signaling during zebrafish development. *Biochim. Biophys. Acta - Gene Regul. Mech.* 1849, 73–83. <https://doi.org/10.1016/j.bbagr.2014.05.030>
- Sanderson, J.T., Boerma, J., Lansbergen, G.W.A., Van Den Berg, M., 2002. Induction and inhibition of aromatase (CYP19) activity by various classes of pesticides in H295R human adrenocortical carcinoma cells. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* <https://doi.org/10.1006/taap.2002.9420>
- Savory, J.G.A., Edey, C., Hess, B., Mears, A.J., Lohnes, D., 2014. Identification of novel retinoic acid target genes. *Dev. Biol.* 395, 199–208. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2014.09.013>
- Scott, G.R., Sloman, K.A., 2004. The effects of environmental pollutants on complex fish behaviour: Integrating behavioural and physiological indicators of toxicity. *Aquat. Toxicol.* 68, 369–392. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2004.03.016>
- Sihuincha, M., Zamora-perea, E., Orellana-rios, W., Stancil, J.D., López-sifuentes, V., Vidal-oré, C., Devine, G.J., 2005. Potential Use of Pyriproxyfen for Control of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) in Iquitos, Perú. *J. Med. Entomol.* 42, 620–630. <https://doi.org/10.1093/jmedent/42.4.620>
- Singh, S., Kumar, K., 2015. Effects of juvenoid Pyriproxyfen on reproduction and F1 progeny in myiasis causing flesh fly *Sarcophaga ruficornis* L. (Sarcophagidae: Diptera). *Parasitol. Res.* 114, 2325–2331. <https://doi.org/10.1007/s00436-015-4428-9>
- Solé, M., Raldua, D., Piferrer, F., Barceló, D., Porte, C., 2003. Feminization of wild carp, *Cyprinus carpio*, in a polluted environment: Plasma steroid hormones, gonadal morphology and xenobiotic metabolizing system. *Comp. Biochem. Physiol. - C Toxicol. Pharmacol.* 136, 145–156. [https://doi.org/10.1016/S1532-0456\(03\)00192-3](https://doi.org/10.1016/S1532-0456(03)00192-3)
- Sousa, E.Z., Jesus, L.W.O., Meireles, W.A., Borella, M.I., Bianchi, P.K.F.C., Salvadori, M.L.B., Júnior, J.R.K., 2014. O desenvolvimento embrionário da Piapara, *Leporinus elongatus* (Pisces, Anostomidae), utilizando técnicas de histologia, microscopia eletrônica de varredura e imunológicas empregando marcadores ósseos. *Pesqui. Vet. Bras.* 34, 92–98. <https://doi.org/10.1590/S0100-736X2014001300017>
- Sullivan, J.J., Goh, K.S., 2008. Environmental fate and properties of pyriproxyfen. *J. Pestic. Sci.* 33, 339–350. <https://doi.org/10.1584/jpestics.R08-02>

- Takatsu, K., Miyaoku, K., Roy, S.R., Muroho, Y., Sago, T., Itagaki, H., Nakamura, M., Tokumoto, T., 2013. Induction of Female-to-Male Sex Change in Adult Zebrafish by Aromatase Inhibitor 1–7. <https://doi.org/10.1038/srep03400>
- Tay, J.-W., Lee, C.-Y., 2014. Influences of Pyriproxyfen on Fecundity and Reproduction of the Pharaoh Ant (Hymenoptera: Formicidae). *J. Econ. Entomol.* 107, 1216–1223. <https://doi.org/10.1603/EC14030>
- Taylor, W.R., Van Dyke, G.C., 1985. Revised procedures for staining and clearing small fishes and other vertebrates for bone and cartilage study. *Cybiuim*.
- Truong, L., Gonnerman, G., Simonich, M.T., Tanguay, R.L., 2016. Assessment of the developmental and neurotoxicity of the mosquito control larvicide, pyriproxyfen, using embryonic zebrafish. *Environ. Pollut.* 218, 1089–1093. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2016.08.061>
- van der Oost, R., Beyer, J., Vermeulen, N.P.E., 2003. Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 13, 57–149. [https://doi.org/10.1016/S1382-6689\(02\)00126-6](https://doi.org/10.1016/S1382-6689(02)00126-6)
- Vinggaard, A.M., Hass, U., Dalgaard, M., Andersen, H.R., Bonefeld-Jørgensen, E., Christiansen, S., Laier, P., Poulsen, M.E., McLachlan, J., Main, K.M., Søbørg, T., Foster, P., 2006. Prochloraz: An imidazole fungicide with multiple mechanisms of action, in: *International Journal of Andrology*. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2605.2005.00604.x>
- Watanabe, H., Oda, S., Abe, R., Tanaka, Y., Tatarazako, N., 2018. Comparison of the effects of constant and pulsed exposure with equivalent time-weighted average concentrations of the juvenile hormone analog pyriproxyfen on the reproduction of *Daphnia magna*. *Chemosphere*. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2017.12.124>
- WHO, 2018. Joint Fao / Who Meeting on Pesticide Residues Acceptable Daily Intakes , Acute Reference Doses , and Other Values Recorded 18–27.
- WHO, 2007. Pyriproxyfen in Drinking-water. *Who/Sde/Wsh/07.01/10* 13.
- Wilder-Smith, A., Gubler, D.J., 2008. Geographic Expansion of Dengue: The Impact of International Travel. *Med. Clin. North Am.* <https://doi.org/10.1016/j.mcna.2008.07.002>
- Xu, Q., Tang, B., Zou, Q., Zheng, H., Liu, X., Wang, S., 2015. Effects of Pyriproxyfen on Female Reproduction in the Common Cutworm, *Spodoptera litura* (F.) (Lepidoptera: Noctuidae). *PLoS One* 10, e0138171. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0138171>
- Yano, T., Tamura, K., 2013. The making of differences between fins and limbs. *J. Anat.* 222, 100–113. <https://doi.org/10.1111/j.1469-7580.2012.01491.x>
- Yasufumi, A.H., Kawamura, T., Hori-e, R., Yamashita, I., Hayashida, Y., Kawamura, T., Hori-e, R., Yamashita, I., 2004. Retionic Acid and Its Receptors Are Required for Expression of Aryl Hydrocarbon Receptor mRNA and Embryonic Development of Blood Vessel and Bone in the Medaka Fish , *Oryzias latipes* Retionic Acid and Its Receptors Are Required for Expression of Aryl Hydro. *Zool. Soc. Japan* 21, 541–551. <https://doi.org/10.2108/zsj.21.541>
- Zhang, X., Hecker, M., Jones, P.D., Newsted, J., Au, D., Kong, R., Wu, R.S.S., Giesy, J.P., 2008. Responses of the medaka HPG axis PCR array and reproduction to prochloraz and ketoconazole. *Environ. Sci. Technol.* <https://doi.org/10.1021/es800591t>

FIGURAS

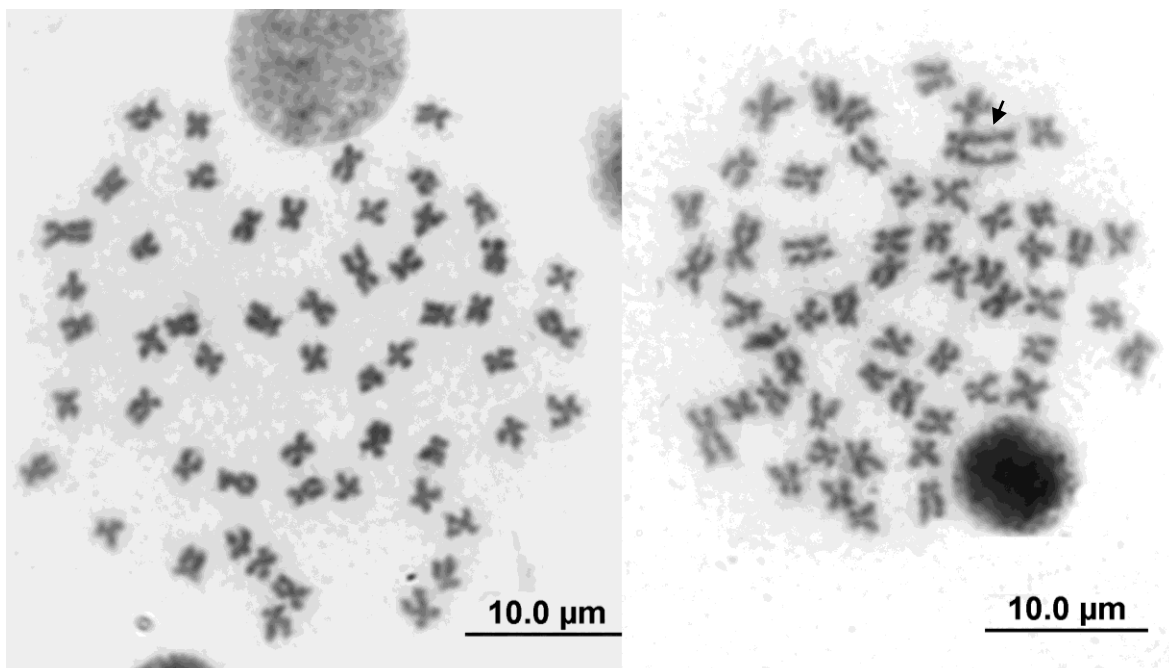


FIGURA 1 - Cromossomos metafásicos de *M. macrocephalus* corados por Giemsa. (a) Cromossomos metafásicos de machos (b) Cromossomos metafásicos de fêmeas. Em (b) a seta evidencia o cromossomo W. Barra=10µm.

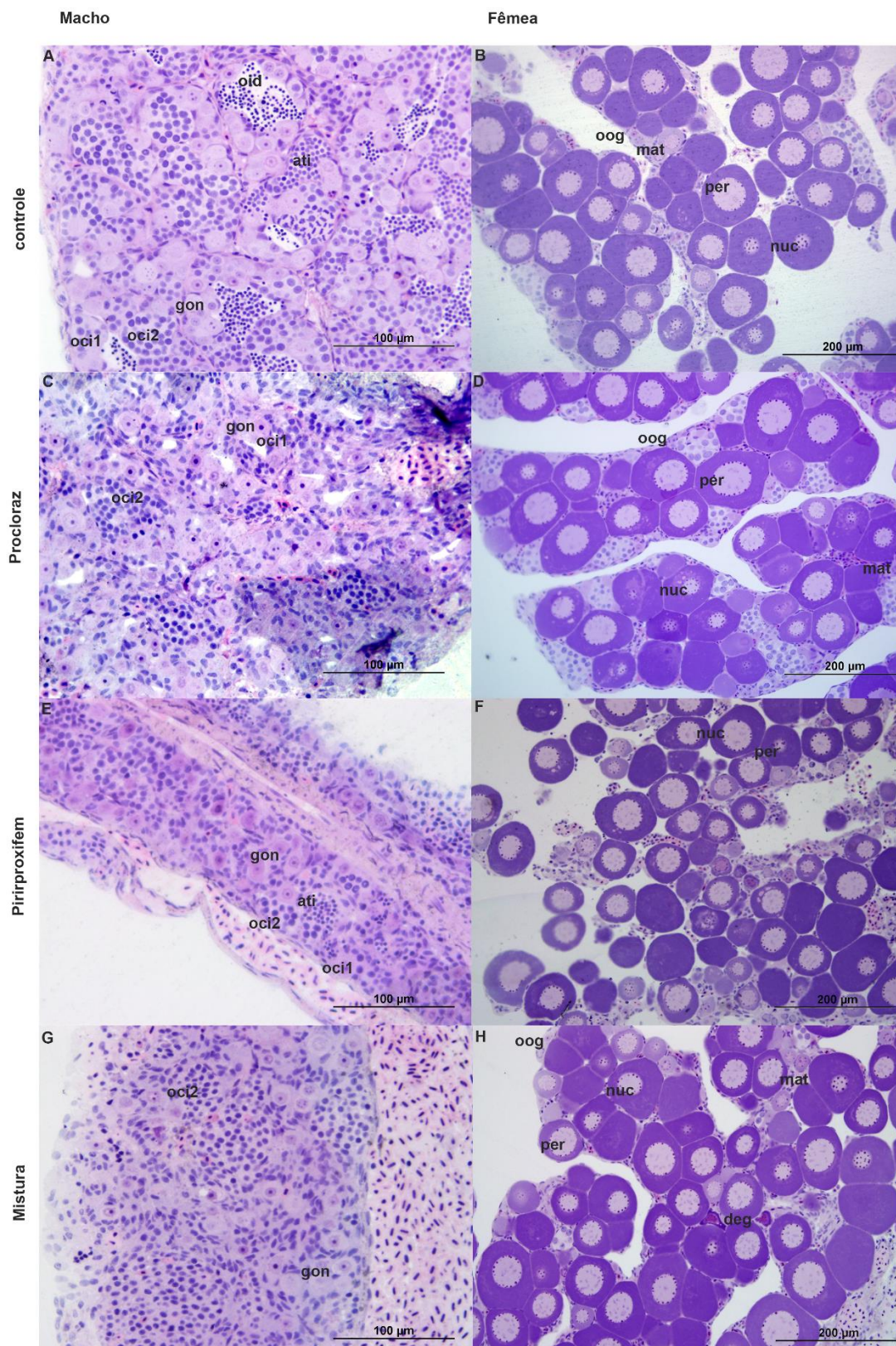


FIGURA 2 – Cortes histológicas de gônadas de *M. macrocephalus* aos 240 dias após a eclosão. (A) Testículo do macho do grupo controle (B) Ovário de fêmea do grupo controle (C) Testículo do macho do grupo tratado com procloraz (D) Ovário de fêmea do grupo tratado com procloraz (E) Testículo do macho do grupo tratado com piriproxifem (F) Ovário de fêmea do grupo tratado com piriproxifem (G) Testículo do macho do grupo tratado com a mistura (H) Ovário de fêmea do grupo tratado com a mistura. **gon**-espermatogônia, **oci1**-espermatócito primário, **oci2**-espermatócito

secundário, **ati**-espermátide, **oid**-espermatozoide, **oog**-oogônia, **mat**-ovócito em maturação, **per**-ovócito perinucleolar, **nuc**-ovócito nucleolar, **deg**-ovócito em degeneração. Coloração hematoxilina-eosina.

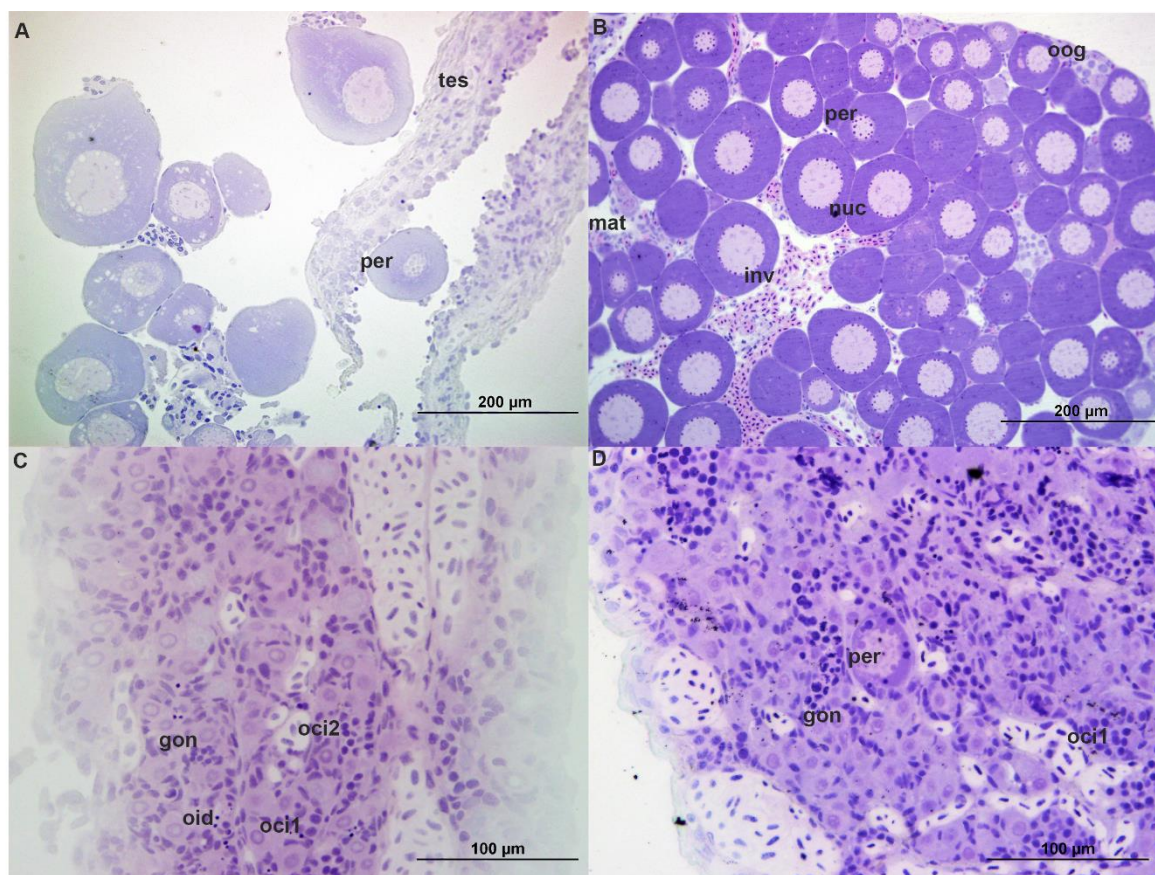


FIGURA 3 – Cortes histológicos de gônada de *M. macrocephalus* aos 240 dias após a eclosão. (A) Testículo do macho do grupo procloraz com presença de folículos ovarianos testiculares (B) Ovário de fêmea com invasão linfocitária (C) Testículo de indivíduo ZW, sexo genético feminino, tratado com piriproxifem (D) Testículo de indivíduo ZW, sexo genético feminino, tratado com a mistura. **gon**-espermatogônia, **oci1**-espermatócito primário, **oci2**-espermatócito secundário, **oid**-espermatozoide, **oog**-oogônia, **mat**-ovócito em maturação, **per**-ovócito perinucleolar, **nuc**-ovócito nucleolar, **deg**-ovócito em degeneração. Coloração hematoxilina-eosina.

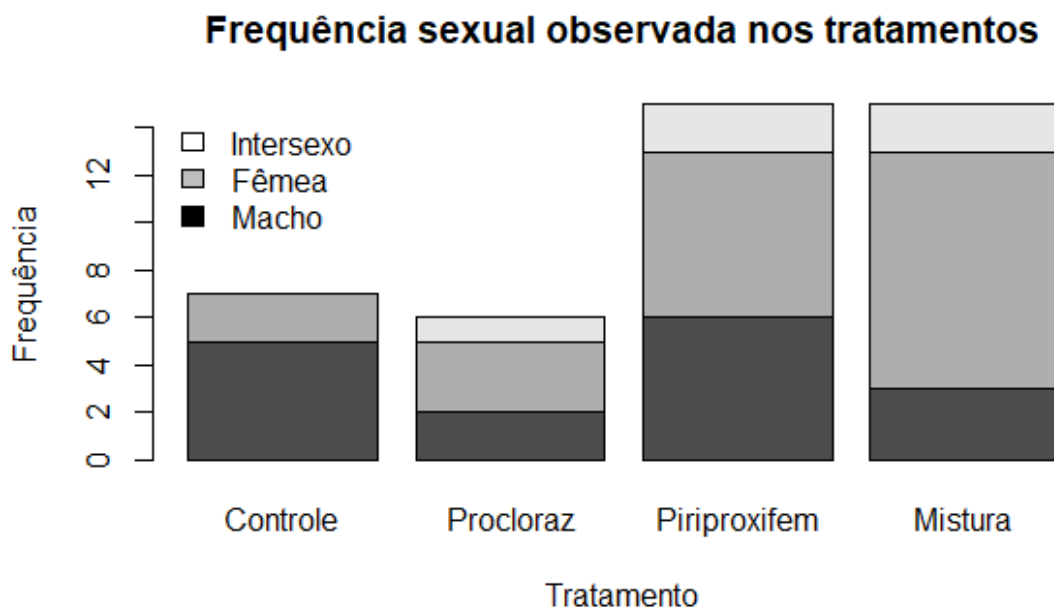


Gráfico 1 – Frequência de indivíduos macho, fêmea e intersexo por grupo.

Tabela 1 - Razão sexual (%) de *M. macrocephalus* expostos ao procloraz e piriproxifem, isolado ou combinado, machos, fêmeas e intersexo representados em porcentagem

Tratamento	Macho	Fêmea	Intersexo	n
Controle	71	29	0	6
Procloraz	50	50	17	7
Piriproxifem	53	47	13	15
Mistura	33	67	13	15

ENVIRONMENTAL RESEARCH

A Multidisciplinary Journal of Environmental Sciences, Ecology, and Public Health

AUTHOR INFORMATION PACK

TABLE OF CONTENTS

- Description
- Impact Factor
- Abstracting and Indexing
- Editorial Board
- Guide for Authors

p.1

p.1

p.1

p.2

p.4

ISSN: 0013-9351

DESCRIPTION

Environmental Research publishes original reports describing studies of the adverse effects of environmental agents on humans and animals. The principal aim of the journal is to assess the impact of chemicals and microbiological pollutants on human health. Both in vivo and in vitro studies, focused on defining the etiology of environmentally induced illness and to increase understanding of the mechanisms by which environmental agents cause disease, are especially welcome. Investigations on the effects of global warming/climate change on the environment and public health, as well as those focused on the effects of anthropogenic activities on climate change are also of particular interest. Although Environmental Research is opened to all subjects directly related with this field, areas of special interest include:

- Air, soil, and water pollutants and health
- Biomonitoring and adverse human health effects
- Environmental and occupational medicine
- Environmental epidemiology
- Environmental microbiology
- Environmental toxicology
- Environmental transport and fate of pollutants
- Global warming/climate change
- Nanomaterials in the environment and nanotoxicology
- Risk analysis, risk assessment and risk management, and public health
- Waste treatment and disposal
- Water and wastewater management, and sewage

IMPACT FACTOR

2017: 4.732 © Clarivate Analytics Journal Citation Reports 2018

ABSTRACTING AND INDEXING

EDITORIAL BOARD

Editor-in-Chief:

José L. Domingo, Universitat Rovira i Virgili, Reus, Catalonia, Spain

Associate Editors:

José G. Dórea, University of Brasilia, Brasilia, DF, Brazil

Athanasios Katsogiannis, European Commission, Ispra (VA), Italy

Development and optimisation of analytical chemistry techniques and sampling methodologies to the source understanding; Occurrence and fate of organic contaminants in all environmental compartments, including indoor air, atmospheric air, soil, water and/or wastewater

Sung Kyun Park, University of Michigan School of Public Health, Ann Arbor, Michigan, USA

Epidemiology, air pollution, heavy metals, endocrine disrupting chemicals, biomarkers, statistical approaches for pollutant mixtures

Nancy Bixian Mai, Chinese Academy of Sciences (CAS), Guangzhou, China

Ana Navas-Acien, Columbia University, New York, New York, USA

Editorial Board Members:

Michael Bloom, University at Albany, SUNY, Rensselaer, New York, USA
 Environmental Epidemiology; Reproductive Epidemiology; Endocrine Disruptors

Joanna Burger, Rutgers University, Piscataway, New Jersey, USA
 Eco-toxicology; Behaviour; Monitoring and assessment; Birds and reptiles

Paco Bustamante, Université de La Rochelle, La Rochelle, France

Mariano E. Cebrián, Cinvestav, Mexico D.F., Mexico
 Arsenic metabolism; Effects of metals and pesticides on the heme synthesis pathway; Effects of metals and pesticides on male reproductive health (hormones and semen quality)

Kristie Ebi, ClimAdapt, Seattle, Washington, USA
 "health risks of climate change, including from extreme events, thermal stress, foodborne and waterborne safety and security, vector borne diseases, undernutrition, and migration adaptation to the risks of climate change, particularly the health risks. health co-benefits. impacts of extreme weather and climate events. resilience, vulnerability, scenarios, international assessments"

Stephanie Engel, University of North Carolina, Chapel Hill, North Carolina, USA

Swaran Jeet Singh Flora, National Institute of Pharmaceutical Education and Research, Raebareli, India
 Heavy Metals Toxicity and Chelation Therapy

Francesco Forastiere, Lazio Regional Health Service, Rome, Italy

Marianne Hatzopoulou, University of Toronto, Toronto, Ontario, Canada

Gerard Hoek, Universiteit Utrecht, Utrecht, Netherlands
 Exposure assessment; Air pollution modelling; Environmental epidemiology

Milena Horvat, Jožef Stefan Institute, Ljubljana, Slovenia
 Environment and health: exposure and effects of chemicals in the environment; Human exposure; Human biomonitoring; Environmental sciences (e.g. biological and geochemical cycling of chemicals);
 Environmental analytical chemistry; Quality systems in chemical laboratories; Metrology in environmental and health studies

Michael Jerrett, University of California at Berkeley, Berkeley, California, USA

Kurunthachalam Kannan, University at Albany, SUNY, Albany, New York, USA
 Human exposure assessment and biomonitoring

Ki-Hyun Kim, Hanyang University, Seoul, The Republic of Korea
 VOC; Odor; Air quality; MOF; Sensing; Removal; Synthesis

Demetrios Kouretas, University of Thessaly, Larissa, Greece
 Molecular mechanisms of antioxidant activity of antioxidants, oxidative stress and exercise, markers of redox status in human, biofunctional food development

Duk-Hee Lee, Kyungpook National University, Daegu, The Republic of Korea
 Epidemiology, Cohort study, Case-control study, Persistent Organic Pollutants, Organochlorine pesticides, Polychlorinated biphenyls, Endocrine disrupting chemicals, Chemical mixtures, Methodological issues in human studies, Obesity, Diabetes, Cardiovascular diseases, Cancer, Dementia

Lena Ma, University of Florida, Gainesville, Florida, USA
 Soil pollutants and health, environmental transport and fate of pollutants, risk assessment and public health, waste treatment and disposal

Jacek Namieśnik, Technical University of Gdansk, Gdansk, Poland
 Environmental analytics and monitoring; Food analysis; QA/QC systems; Green analytical chemistry;

Envirometrics Xavier Querol, Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC), Barcelona, Spain
 Environmental geochemistry; Air quality; Atmospheric aerosols; Tropospheric ozone; Black carbon;
 Ultrafine particles; Metals; Organic pollutants; Inorganic gaseous pollutants, NO₂, NO, NO_x, SO₂, SO₃, CO, NH₃; Source apportionment; Urban and regional pollution; Atmosphere and climate change; Air quality policy; Mobile, industrial, domestic and agricultural emissions of air pollutants; Leaching of industrial wastes; Impact of mining on environment; Recycling of industrial wastes; Coal use related pollution

Mineshi Sakamoto, National Institute for Minamata Disease, Kumamoto, Japan

Christian Sonne, Aarhus University, Roskilde, Denmark
 Biological effects, environmental chemicals, infectious diseases, climate change, veterinary science, wildlife medicine, predatory mammals, raptorial birds, sea birds, fish, internal organs, reproductive organs, histopathology, morphology, skeletal system, bone density, immune system,

endocrinology, PBPK modelling, blood biochemistry, implantation of PTT satellite transmitters, immobilization.

Jordi Sunyer, CREAL, Barcelona, Spain

Leisa-Maree Toms, Queensland University of Technology, Kelvin Grove, Queensland, Australia

Shilu Tong, Shanghai Jiao Tong University, Shanghai, China

Environmental epidemiology, climate change, planetary health, sustainable development, quantitative risk assessment, spatiotemporal modelling

Paul Villeneuve, Carleton University, Ottawa, Ontario, Canada

Mary Wolff, Mount Sinai School of Medicine, New York, New York, USA

Kai Zhang, University of Texas Health Science Center at Houston (UTHealth), Houston, Texas, USA

Air quality; Built Environment; Climate Change and Health; Environmental and Occupational Epidemiology; Exposure assessment; Exposome; GIS; Urban Health; Statistics

GUIDE FOR AUTHORS

.

Your Paper Your Way

We now differentiate between the requirements for new and revised submissions. You may choose to submit your manuscript as a single Word or PDF file to be used in the refereeing process. Only when your paper is at the revision stage, will you be requested to put your paper in to a 'correct format' for acceptance and provide the items required for the publication of your article. To find out more, please visit the Preparation section below.

INTRODUCTION

A Multidisciplinary Journal of Environmental Sciences, Ecology, and Public Health
Environmental Research: A Multidisciplinary Journal of Environmental Sciences, Ecology, and Public Health publishes original reports describing studies of the toxic effects of environmental agents and conditions in humans and animals, including both experimental subjects and ecosystems.

The principal aims of the journal are to increase understanding of the etiology of preventable disease and environmental impairments, and to increase understanding of the mechanisms by which environmental agents cause disease and ecological effects. Human impact on the biosphere is considerable and, thus, an additional aim of the journal is to explore the means by which the adverse effects of anthropocentric activities can be minimized through new initiatives or changes in policy, at the local, regional, national, and international scales.

The study of environmental health is inherently multidisciplinary and international. Therefore, the journal welcomes relevant articles in epidemiology, risk analysis and policy, environmental medicine, exposure assessment, geosciences and environmental chemistry, and wildlife biology and ecotoxicology, and ecology. Reports that bridge one or more of these disciplines are particularly encouraged, as are studies employing biological markers of exposure and/or effect.

The focus of the journal generally excludes papers that report results of toxicology studies or industrial exposures, unless these papers have clear relevance to environmental topics. The journal does not generally consider reports of a specific site or source (such as an assessment of releases or environmental contamination) unless these reports present novel or generalizable information.

However, short papers can be submitted to the Journal as a "Case Report" (see below). Papers reporting on studies of human subjects must provide written assurance that the research was reviewed and approved by an appropriate institutional review board (or ethics committee) for the protection of human subjects. Environmental Research, in common with international practice in science, requires that all authors must, in denoting measures, utilize the metric system and SI derived units (e.g., degrees Centigrade rather than Fahrenheit; [Click here](#)).

Reports from the Field

The Journal welcomes short articles on topics of interest to environmental researchers and practitioners. Appropriate "Reports from the Field" include articles on environmental conditions, new methods for detection or analysis, updates, and case reports of human or ecosystem exposures and effects. Articles from around the world are particularly encouraged.

"Reports from the Field" should not exceed 2000 words and need not be divided into sections, although subheadings may help the reader and are encouraged. Authors must provide a short abstract (less than 75 words) and no more than two figures or illustrations, no more than 2 tables, and no more than 15 references. These papers will be peer-reviewed.

Contact Details for Submission

Authors should submit their article via EES, at <https://ees.elsevier.com/ER>. You will be guided stepwise through the creation and uploading of the various files. Use the following guidelines to prepare your article. For any further information please visit our Support Center.

Submission checklist

You can use this list to carry out a final check of your submission before you send it to the journal for review. Please check the relevant section in this Guide for Authors for more details.

Ensure that the following items are present:

One author has been designated as the corresponding author with contact details:

- E-mail address
- Full postal address

All necessary files have been uploaded:

Manuscript:

- Include keywords
- All figures (include relevant captions)
- All tables (including titles, description, footnotes)
- Ensure all figure and table citations in the text match the files provided
- Indicate clearly if color should be used for any figures in print

Graphical Abstracts / Highlights files (where applicable)

Supplemental files (where applicable)

Further considerations

- Manuscript has been 'spell checked' and 'grammar checked'
- All references mentioned in the Reference List are cited in the text, and vice versa
- Permission has been obtained for use of copyrighted material from other sources (including the Internet)
- A competing interests statement is provided, even if the authors have no competing interests to declare
- Journal policies detailed in this guide have been reviewed
- Referee suggestions and contact details provided, based on journal requirements

For further information, visit our Support Center.

BEFORE YOU BEGIN

Article Content

We are expecting articles of the highest scientific quality. Editorials on what the Journal is expecting in manuscripts are described in: "On multiple comparisons and on the design and interpretation of epidemiological studies of many associations" [Click here](#). Authors are also referred to the STROBE Statement [Click here](#).

Ethics in publishing

Please see our information pages on Ethics in publishing and Ethical guidelines for journal publication.

Policy and ethics

You are requested to provide information on funding sources supporting the work described in the manuscript. For all papers dealing with research or studies on human subjects or experimental animals, evidence must be provided of review and approval by an appropriately constituted committee for human subjects or animal research.

The work described in your article must have been carried out in accordance with The Code of Ethics of the World Medical Association (Declaration of Helsinki) for experiments involving humans <http://www.wma.net/e/policy/b3.htm>; EC Directive 86/609/EEC for animal experiments <http://europa.eu.int/scadplus/leg/en/s23000.htm>; Uniform Requirements for manuscripts submitted to Biomedical journals <http://www.nejm.org/general/text/requirements/1.htm>. This must be stated at an appropriate point in the article.

If this information is not provided upon submission, the paper will be returned without review.

Declaration of interest

All authors must disclose any financial and personal relationships with other people or organizations that could inappropriately influence (bias) their work. Examples of potential competing interests include employment, consultancies, stock ownership, honoraria, paid expert

testimony, patent applications/registrations, and grants or other funding. Authors must disclose any interests in two places: 1. A summary declaration of interest statement in the title page file (if double-blind) or the manuscript file (if single-blind). If there are no interests to declare then please state this: 'Declarations of interest: none'. This summary statement will be ultimately published if the article is accepted.

2. Detailed disclosures as part of a separate Declaration of Interest form, which forms part of the journal's official records. It is important for potential interests to be declared in both places and that the information matches. More information.

Submission declaration and verification

Submission of an article implies that the work described has not been published previously (except in the form of an abstract, a published lecture or academic thesis, see 'Multiple, redundant or concurrent publication' for more information), that it is not under consideration for publication elsewhere, that its publication is approved by all authors and tacitly or explicitly by the responsible authorities where the work was carried out, and that, if accepted, it will not be published elsewhere in the same form, in English or in any other language, including electronically without the written consent of the copyright holder. To verify originality, your article may be checked by the originality detection service Crossref

Similarity Check.

Preprints

Please note that preprints can be shared anywhere at any time, in line with Elsevier's sharing policy. Sharing your preprints e.g. on a preprint server will not count as prior publication (see 'Multiple, redundant or concurrent publication' for more information).

Use of inclusive language

Inclusive language acknowledges diversity, conveys respect to all people, is sensitive to differences, and promotes equal opportunities. Articles should make no assumptions about the beliefs or commitments of any reader, should contain nothing which might imply that one individual is superior to another on the grounds of race, sex, culture or any other characteristic, and should use inclusive language throughout. Authors should ensure that writing is free from bias, for instance by using 'he or she', 'his/her' instead of 'he' or 'his', and by making use of job titles that are free of stereotyping (e.g. 'chairperson' instead of 'chairman' and 'flight attendant' instead of 'stewardess').

Suggestion for Reviewers

Authors must suggest a minimum of 5 names of potential reviewers who should have no conflict of interests with their work or that of their co-authors, including not working at their institution. For each suggested reviewer, authors must include: Full name and title, professional affiliation, and professional email address (avoiding yahoo, hotmail, gmail, etc. addresses). Please make sure that the email addresses you provide us with are valid and up-to-date. Give also at least one reason why the author is recommending her/his name as possible reviewer.

Please note that the journal may not use your suggestions. However, your help is appreciated and may speed up the selection of appropriate reviewers.

Author contributions

For transparency, we encourage authors to submit an author statement file outlining their individual contributions to the paper using the relevant CRediT roles: Conceptualization; Data curation; Formal analysis; Funding acquisition; Investigation; Methodology; Project administration; Resources; Software; Supervision; Validation; Visualization; Roles/Writing - original draft; Writing - review & editing. Authorship statements should be formatted with the names of authors first and CRediT role(s) following. More details and an example

Changes to authorship

Authors are expected to consider carefully the list and order of authors before submitting their manuscript and provide the definitive list of authors at the time of the original submission. Any addition, deletion or rearrangement of author names in the authorship list should be made only before the manuscript has been accepted and only if approved by the journal Editor. To request such a change, the Editor must receive the following from the corresponding author: (a) the reason for the change in author list and (b) written confirmation (e-mail, letter) from all authors that they

agree with the addition, removal or rearrangement. In the case of addition or removal of authors, this includes confirmation from the author being added or removed.

Only in exceptional circumstances will the Editor consider the addition, deletion or rearrangement of authors after the manuscript has been accepted. While the Editor considers the request, publication of the manuscript will be suspended. If the manuscript has already been published in an online issue, any requests approved by the Editor will result in a corrigendum.

Article transfer service

This journal is part of our Article Transfer Service. This means that if the Editor feels your article is more suitable in one of our other participating journals, then you may be asked to consider transferring the article to one of those. If you agree, your article will be transferred automatically on your behalf with no need to reformat. Please note that your article will be reviewed again by the new journal. More information.

Copyright

Upon acceptance of an article, authors will be asked to complete a 'Journal Publishing Agreement' (see more information on this). An e-mail will be sent to the corresponding author confirming receipt of the manuscript together with a 'Journal Publishing Agreement' form or a link to the online version of this agreement.

Subscribers may reproduce tables of contents or prepare lists of articles including abstracts for internal circulation within their institutions. Permission of the Publisher is required for resale or distribution outside the institution and for all other derivative works, including compilations and translations. If excerpts from other copyrighted works are included, the author(s) must obtain written permission from the copyright owners and credit the source(s) in the article. Elsevier has preprinted forms for use by authors in these cases.

For gold open access articles: Upon acceptance of an article, authors will be asked to complete an 'Exclusive License Agreement' (more information). Permitted third party reuse of gold open access articles is determined by the author's choice of user license.

Author rights

As an author you (or your employer or institution) have certain rights to reuse your work. More information.

Elsevier supports responsible sharing

Find out how you can share your research published in Elsevier journals.

Role of the funding source

You are requested to identify who provided financial support for the conduct of the research and/or preparation of the article and to briefly describe the role of the sponsor(s), if any, in study design; in the collection, analysis and interpretation of data; in the writing of the report; and in the decision to submit the article for publication. If the funding source(s) had no such involvement then this should be stated. Funding body agreements and policies Elsevier has established a number of agreements with funding bodies which allow authors to comply with their funder's open access policies. Some funding bodies will reimburse the author for the gold open access publication fee. Details of existing agreements are available online.

Open access

This journal offers authors a choice in publishing their research:

Subscription

- Articles are made available to subscribers as well as developing countries and patient groups through our universal access programs.
- No open access publication fee payable by authors.
- The Author is entitled to post the accepted manuscript in their institution's repository and make this public after an embargo period (known as green Open Access). The published journal article cannot be shared publicly, for example on ResearchGate or Academia.edu, to ensure the sustainability of peerreviewed research in journal publications. The embargo period for this journal can be found below.

Gold open access

- Articles are freely available to both subscribers and the wider public with permitted reuse.

- A gold open access publication fee is payable by authors or on their behalf, e.g. by their research funder or institution.

Regardless of how you choose to publish your article, the journal will apply the same peer review criteria and acceptance standards or gold open access articles, permitted third party (re)use is defined by the following Creative Commons user licenses:

Creative Commons Attribution (CC BY)

Lets others distribute and copy the article, create extracts, abstracts, and other revised versions, adaptations or derivative works of or from an article (such as a translation), include in a collective work (such as an anthology), text or data mine the article, even for commercial purposes, as long as they credit the author(s), do not represent the author as endorsing their adaptation of the article, and do not modify the article in such a way as to damage the author's honor or reputation.

Creative Commons Attribution-NonCommercial-NoDerivs (CC BY-NC-ND)

For non-commercial purposes, lets others distribute and copy the article, and to include in a collective work (such as an anthology), as long as they credit the author(s) and provided they do not alter or modify the article.

The gold open access publication fee for this journal is USD 3400, excluding taxes. Learn more about Elsevier's pricing policy: <https://www.elsevier.com/openaccesspricing>.

Green open access

Authors can share their research in a variety of different ways and Elsevier has a number of green open access options available. We recommend authors see our green open access page for further information. Authors can also self-archive their manuscripts immediately and enable public access from their institution's repository after an embargo period. This is the version that has been accepted for publication and which typically includes author-incorporated changes suggested during submission, peer review and in editor-author communications. Embargo period: For subscription articles, an appropriate amount of time is needed for journals to deliver value to subscribing customers before an article becomes freely available to the public. This is the embargo period and it begins from the date the article is formally published online in its final and fully citable form. Find out more. This journal has an embargo period of 24 months.

Elsevier Researcher Academy

Researcher Academy is a free e-learning platform designed to support early and mid-career researchers throughout their research journey. The "Learn" environment at Researcher Academy offers several interactive modules, webinars, downloadable guides and resources to guide you through the process of writing for research and going through peer review. Feel free to use these free resources to improve your submission and navigate the publication process with ease.

Language (usage and editing services)

Please write your text in good English (American or British usage is accepted, but not a mixture of these). Authors who feel their English language manuscript may require editing to eliminate possible grammatical or spelling errors and to conform to correct scientific English may wish to use the English Language Editing service available from Elsevier's WebShop.

Submission of Manuscripts

Authors are requested to submit their papers electronically by using online manuscript submission available at <https://ees.elsevier.com/ER>. This site will guide authors stepwise through the submission process. Authors can upload their articles as Microsoft (MS) Word, WordPerfect, or LaTeX files. It is also possible to submit an article in PostScript or Adobe Acrobat PDF format, but if the article is accepted, the original source files will be needed. Zipped files containing individual files (letter to editor, manuscript, tables, figures) can also be downloaded and the online system will extract the files and allow them to be viewed and labeled. If you submit a word processing file, the system generates an Adobe Acrobat PDF version of the article for the reviewing process. Authors, reviewers, and editors send and receive all correspondence by e-mail and no paper correspondence is necessary.

The manuscript will be edited according to the style of the journal, and authors must read the proofs carefully.

Online submissions require:

Cover Letter: Document (Word, WordPerfect, RTF, PDF, LaTeX) containing your cover letter to the Editors. The following statement should be included in the letter to the editor: " All of the authors

have read and approved the paper and it has not been published previously nor is it being considered by any other peer-reviewed journal."

Response to Reviews (Resubmissions Only): Document (Word, WordPerfect, RTF, PDF, LaTeX) detailing your response to the reviewers' and editor's comments of a previously rejected manuscript that you are re-submitting.

Manuscript: Single word processing (Word, WordPerfect, RTF) or LaTeX file consisting of the title page, abstract, manuscript text, and any figure/table legends.

Manuscript file should include page numbers. Please do not include line numbering as this is automatically imposed by the editorial system. Tables: Tables should be separate from the manuscript text, and can be uploaded individually or consolidated into a single file. The file description you input below when uploading your table must include the table number or range (e.g. Table 1, Tables 2-4).

Manuscripts must be written in English. There are no submission fees or page charges. Manuscripts are accepted for review with the understanding that no substantial portion of the study has been published or is under consideration for publication elsewhere and that its submission for publication has been approved by all of the authors and by the institution where the work was carried out; further, that any person cited as a source of personal communication has approved such a citation. Written authorization may be required at the Editor's discretion. All papers reporting on studies involving human subjects must include documentation that the study was reviewed and approved, prior to its conduct, by an appropriate institutional review board for human subjects research. No exceptions will be made to this requirement. Manuscripts that do not meet the general criteria or standards for publication in Environmental Research will be immediately returned to the authors without detailed review.

Environmental Research does not publish proceedings or abstracts from scientific meetings. However, the journal welcomes submissions of papers from a specific meeting under the following conditions:

1) all papers must be peer-reviewed by the journal; 2) the decision of the editors for publishing papers is final; 3) proposals for publishing such papers must be submitted in advance of the meeting; 4) the proposers must undertake preliminary review and selection of papers for submission to the Journal; and 5) these papers must be submitted as a group or within a period of three months to ensure timely and coordinated publication.

Letters to the Editor

Letters to the Editor (LTEs) are only published extraordinarily and in relation with very special topics. They are passed to external review only after a previous contact with the Editor-in-Chief, who will decide rapidly on the potential interest of the LTE for the readers of the Journal.

PREPARATION

NEW SUBMISSIONS

Submission to this journal proceeds totally online and you will be guided stepwise through the creation and uploading of your files. The system automatically converts your files to a single PDF file, which is used in the peer-review process. As part of the Your Paper Your Way service, you may choose to submit your manuscript as a single file to be used in the refereeing process. This can be a PDF file or a Word document, in any format or layout that can be used by referees to evaluate your manuscript. It should contain high enough quality figures for refereeing. If you prefer to do so, you may still provide all or some of the source files at the initial submission. Please note that individual figure files larger than 10 MB must be uploaded separately.

References

There are no strict requirements on reference formatting at submission. References can be in any style or format as long as the style is consistent. Where applicable, author(s) name(s), journal title/book title, chapter title/article title, year of publication, volume number/book chapter and the article number or pagination must be present. Use of DOI is highly encouraged. The reference style used by the journal will be applied to the accepted article by Elsevier at the proof stage. Note that missing data will be highlighted at proof stage for the author to correct.

Formatting requirements

There are no strict formatting requirements but all manuscripts must contain the essential elements needed to convey your manuscript, for example Abstract, Keywords, Introduction, Materials and Methods, Results, Conclusions, Artwork and Tables with Captions.

If your article includes any Videos and/or other Supplementary material, this should be included in your initial submission for peer review purposes.

Divide the article into clearly defined sections. Figures and tables embedded in text. Please ensure the figures and the tables included in the single file are placed next to the relevant text in the manuscript, rather than at the bottom or the top of the file. The corresponding caption should be placed directly below the figure or table.

Peer review

This journal operates a single blind review process. All contributions will be initially assessed by the editor for suitability for the journal. Papers deemed suitable are then typically sent to a minimum of two independent expert reviewers to assess the scientific quality of the paper. The Editor is responsible for the final decision regarding acceptance or rejection of articles. The Editor's decision is final. More information on types of peer review.

REVISED SUBMISSIONS

Use of word processing software

Regardless of the file format of the original submission, at revision you must provide us with an editable file of the entire article. Keep the layout of the text as simple as possible. Most formatting codes will be removed and replaced on processing the article. The electronic text should be prepared in a way very similar to that of conventional manuscripts (see also the Guide to Publishing with Elsevier). See also the section on Electronic artwork.

To avoid unnecessary errors you are strongly advised to use the 'spell-check' and 'grammar-check' functions of your word processor.

LaTeX

You are recommended to use the Elsevier article class `elsarticle.cls` to prepare your manuscript and BibTeX to generate your bibliography.

Our LaTeX site has detailed submission instructions, templates and other information.

Article structure

For original full-length and short communications:

Introduction should be as concise as possible, without subheadings.

Materials and methods should be sufficiently detailed to enable the experiments to be reproduced.

Results and Discussion may be combined and may be organized into subheadings.

For commentaries and articles related to environmental policy, alternate formats will be accepted but should include an Introduction describing the problem in terms that a general reader will understand.

All statements of fact need to be referenced and papers that make use of newly acquired data must include a Materials and methods section as well as a Results and Discussion section.

Subdivision - numbered sections Divide your article into clearly defined and numbered sections.

Subsections should be numbered

1.1 (then 1.1.1, 1.1.2, ...), 1.2, etc. (the abstract is not included in section numbering). Use this numbering also for internal cross-referencing: do not just refer to 'the text'. Any subsection may be given a brief heading. Each heading should appear on its own separate line.

Introduction

State the objectives of the work and provide an adequate background, avoiding a detailed literature survey or a summary of the results.

Material and methods

Provide sufficient details to allow the work to be reproduced by an independent researcher. Methods that are already published should be summarized, and indicated by a reference. If quoting directly from a previously published method, use quotation marks and also cite the source. Any modifications to existing methods should also be described

Results should be clear and concise.

Discussion

This should explore the significance of the results of the work, not repeat them. A combined Results and Discussion section is often appropriate. Avoid extensive citations and discussion of published literature.

Conclusions

The main conclusions of the study may be presented in a short Conclusions section, which may stand alone or form a subsection of a Discussion or Results and Discussion section.

Appendices

If there is more than one appendix, they should be identified as A, B, etc. Formulae and equations in appendices should be given separate numbering: Eq. (A.1), Eq. (A.2), etc.; in a subsequent appendix, Eq. (B.1) and so on. Similarly for tables and figures: Table A.1; Fig. A.1, etc.

Essential title page information

- Title. Concise and informative. Titles are often used in information-retrieval systems. Avoid abbreviations and formulae where possible.

- Author names and affiliations. Please clearly indicate the given name(s) and family name(s) of each author and check that all names are accurately spelled. You can add your name between parentheses in your own script behind the English transliteration. Present the authors' affiliation addresses (where the actual work was done) below the names. Indicate all affiliations with a lowercase superscript letter immediately after the author's name and in front of the appropriate address.

Provide the full postal address of each affiliation, including the country name and, if available, the e-mail address of each author.

- Corresponding author. Clearly indicate who will handle correspondence at all stages of refereeing and publication, also post-publication. This responsibility includes answering any future queries about

Methodology and Materials. Ensure that the e-mail address is given and that contact details are kept up to date by the corresponding author.

- Present/permanent address. If an author has moved since the work described in the article was done, or was visiting at the time, a 'Present address' (or 'Permanent address') may be indicated as a footnote to that author's name. The address at which the author actually did the work must be retained as the main, affiliation address. Superscript Arabic numerals are used for such footnotes. Please note that the Journal's online editorial system (EES) now offers automatic line numbering.

Page 1 should contain the article title, the names and affiliations of all authors, and the name, telephone and fax numbers, e-mail address, and complete mailing address of the person to whom all correspondence should be sent.

Page 2 should contain an abstract and five descriptive keywords.

Page 3 provides information on funding sources supporting the work described in the manuscript. For all papers dealing with research or studies on human subjects or experimental animals, evidence must be provided of review and approval by an appropriately constituted committee for human subjects or animal research. If this information is not provided upon submission, the paper will be returned without review.

For original full-length and short communications:

Introduction should be as concise as possible, without subheadings.

Materials and methods should be sufficiently detailed to enable the experiments to be reproduced or the study design to be understood fully.

Results and Discussion may be combined and may be organized into subheadings.

For commentaries and articles related to environmental policy, alternate formats will be accepted but should include an Introduction describing the problem in terms that a general reader will understand.

All statements of fact need to be referenced and papers that make use of newly acquired data must include a Materials and methods section as well as a Results and Discussion section.

Abstract

A concise and factual abstract is required. The abstract should state briefly the purpose of the research, the principal results and major conclusions. An abstract is often presented separately from the article, so it must be able to stand alone. For this reason, References should be avoided, but if essential, then cite the author(s) and year(s). Also, non-standard or uncommon abbreviations should be avoided, but if essential they must be defined at their first mention in the abstract itself.

Graphical abstract

Although a graphical abstract is optional, its use is encouraged as it draws more attention to the online article. The graphical abstract should summarize the contents of the article in a concise, pictorial form designed to capture the attention of a wide readership. Graphical abstracts should be submitted as a separate file in the online submission system. Image size: Please provide an image with a minimum of 531 × 1328 pixels (h × w) or proportionally more. The image should be readable at a size of 5 × 13 cm using a regular screen resolution of 96 dpi. Preferred file types: TIFF, EPS, PDF or MS Office files. You can view Example Graphical Abstracts on our information site.

Authors can make use of Elsevier's Illustration Services to ensure the best presentation of their images and in accordance with all technical requirements.

Highlights

Highlights are mandatory for this journal. They consist of a short collection of bullet points that convey the core findings of the article and should be submitted in a separate editable file in the online submission system. Please use 'Highlights' in the file name and include 3 to 5 bullet points

(maximum 85 characters, including spaces, per bullet point). You can view example Highlights on our information site.

Keywords

Immediately after the abstract, provide a maximum of 5 keywords, using American spelling and avoiding general and plural terms and multiple concepts (avoid, for example, "and", "of"). Be sparing with abbreviations: only abbreviations firmly established in the field may be eligible. These keywords will be used for indexing purposes.

Abbreviations

Define abbreviations that are not standard in this field in a footnote to be placed on the first page of the article. Such abbreviations that are unavoidable in the abstract must be defined at their first mention there, as well as in the footnote. Ensure consistency of abbreviations throughout the article.

Abbreviations should follow the usage established by Chemical Abstracts. Please restrict the use of acronyms, especially non-standard ones, as much as possible.

Acknowledgements

Collate acknowledgements in a separate section at the end of the article before the references and do not, therefore, include them on the title page, as a footnote to the title or otherwise. List here those individuals who provided help during the research (e.g., providing language help, writing assistance or proof reading the article, etc.).

Acknowledgments should be brief and should precede the references. In agreement with the Commission on Publication Ethics, authors must submit full information on sources of funding and other support for their work that is presented in their paper.

Formatting of funding sources

List funding sources in this standard way to facilitate compliance to funder's requirements:

Funding: This work was supported by the National Institutes of Health [grant numbers xxxx, yyyy]; the Bill & Melinda Gates Foundation, Seattle, WA [grant number zzzz]; and the United States Institutes of Peace [grant number aaaa].

It is not necessary to include detailed descriptions on the program or type of grants and awards. When funding is from a block grant or other resources available to a university, college, or other research institution, submit the name of the institute or organization that provided the funding.

If no funding has been provided for the research, please include the following sentence:

This research did not receive any specific grant from funding agencies in the public, commercial, or not-for-profit sectors

Math formulae

Please submit math equations as editable text and not as images. Present simple formulae in line with normal text where possible and use the solidus (/) instead of a horizontal line for small fractional terms, e.g., X/Y. In principle, variables are to be presented in italics. Powers of e are often more conveniently denoted by exp. Number consecutively any equations that have to be displayed separately from the text (if referred to explicitly in the text).

Footnotes

Footnotes should be used sparingly. Number them consecutively throughout the article. Many word processors build footnotes into the text, and this feature may be used. Should this not be the case, indicate the position of footnotes in the text and present the footnotes themselves separately at the end of the article.

Artwork

Electronic artwork

General points

- Make sure you use uniform lettering and sizing of your original artwork.
- Preferred fonts: Arial (or Helvetica), Times New Roman (or Times), Symbol, Courier.
- Number the illustrations according to their sequence in the text.
- Use a logical naming convention for your artwork files.
- Indicate per figure if it is a single, 1.5 or 2-column fitting image.
- For Word submissions only, you may still provide figures and their captions, and tables within a single file at the revision stage.
- Please note that individual figure files larger than 10 MB must be provided in separate source files.

A detailed guide on electronic artwork is available.

You are urged to visit this site; some excerpts from the detailed information are given here.

Formats

Regardless of the application used, when your electronic artwork is finalized, please 'save as' or convert the images to one of the following formats (note the resolution requirements for line drawings, halftones, and line/halftone combinations given below):

EPS (or PDF): Vector drawings. Embed the font or save the text as 'graphics'.

TIFF (or JPG): Color or grayscale photographs (halftones): always use a minimum of 300 dpi.

TIFF (or JPG): Bitmapped line drawings: use a minimum of 1000 dpi.

TIFF (or JPG): Combinations bitmapped line/half-tone (color or grayscale): a minimum of 500 dpi is required.

Please do not:

- Supply files that are optimized for screen use (e.g., GIF, BMP, PICT, WPG); the resolution is too low.
- Supply files that are too low in resolution.
- Submit graphics that are disproportionately large for the content.

Color artwork

Please make sure that artwork files are in an acceptable format (TIFF (or JPEG), EPS (or PDF), or MS Office files) and with the correct resolution. If, together with your accepted article, you submit usable color figures then Elsevier will ensure, at no additional charge, that these figures will appear in color online (e.g., ScienceDirect and other sites) regardless of whether or not these illustrations are reproduced in color in the printed version. For color reproduction in print, you will receive information regarding the costs from Elsevier after receipt of your accepted article. Please indicate your preference for color: in print or online only. Further information on the preparation of electronic artwork.

Figure captions

Ensure that each illustration has a caption. A caption should comprise a brief title (not on the figure itself) and a description of the illustration. Keep text in the illustrations themselves to a minimum but explain all symbols and abbreviations used.

Tables

Please submit tables as editable text and not as images. Tables can be placed either next to the relevant text in the article, or on separate page(s) at the end. Number tables consecutively in accordance with their appearance in the text and place any table notes below the table body. Be sparing in the use of tables and ensure that the data presented in them do not duplicate results described elsewhere in the article. Please avoid using vertical rules and shading in table cells.

References

Citation in text

Please ensure that every reference cited in the text is also present in the reference list (and vice versa). Any references cited in the abstract must be given in full. Unpublished results and personal communications are not recommended in the reference list, but may be mentioned in the text. If these references are included in the reference list they should follow the standard reference style of the journal and should include a substitution of the publication date with either 'Unpublished results' or 'Personal communication'. Citation of a reference as 'in press' implies that the item has been accepted for publication.

Reference links

Increased discoverability of research and high quality peer review are ensured by online links to the sources cited. In order to allow us to create links to abstracting and indexing services, such as Scopus, CrossRef and PubMed, please ensure that data provided in the references are correct. Please note that incorrect surnames, journal/book titles, publication year and pagination may prevent link creation. When copying references, please be careful as they may already contain errors. Use of the DOI is highly encouraged.

A DOI is guaranteed never to change, so you can use it as a permanent link to any electronic article. An example of a citation using DOI for an article not yet in an issue is: VanDecar J.C., Russo R.M., James D.E., Ambeh W.B., Franke M. (2003). Aseismic continuation of the Lesser Antilles slab beneath northeastern Venezuela. *Journal of Geophysical Research*, <https://doi.org/10.1029/2001JB000884>.

Please note the format of such citations should be in the same style as all other references in the paper.

Web references

As a minimum, the full URL should be given and the date when the reference was last accessed. Any further information, if known (DOI, author names, dates, reference to a source publication,

etc.), should also be given. Web references can be listed separately (e.g., after the reference list) under a different heading if desired, or can be included in the reference list.

Data references

This journal encourages you to cite underlying or relevant datasets in your manuscript by citing them in your text and including a data reference in your Reference List. Data references should include the following elements: author name(s), dataset title, data repository, version (where available), year, and global persistent identifier. Add [dataset] immediately before the reference so we can properly identify it as a data reference. The [dataset] identifier will not appear in your published article.

References in a special issue

Please ensure that the words 'this issue' are added to any references in the list (and any citations in the text) to other articles in the same Special Issue.

Reference management software

Most Elsevier journals have their reference template available in many of the most popular reference management software products. These include all products that support Citation Style Language styles, such as Mendeley and Zotero, as well as EndNote. Using the word processor plug-ins from these products, authors only need to select the appropriate journal template when preparing their article, after which citations and bibliographies will be automatically formatted in the journal's style. If no template is yet available for this journal, please follow the format of the sample references and citations as shown in this Guide. If you use reference management software, please ensure that you remove all field codes before submitting the electronic manuscript. More information on how to remove field codes.

Users of Mendeley Desktop can easily install the reference style for this journal by clicking the following link:

<http://open.mendeley.com/use-citation-style/environmental-research>

When preparing your manuscript, you will then be able to select this style using the Mendeley plugins for Microsoft Word or LibreOffice.

Reference formatting

There are no strict requirements on reference formatting at submission. References can be in any style or format as long as the style is consistent. Where applicable, author(s) name(s), journal title/book title, chapter title/article title, year of publication, volume number/book chapter and the article number or pagination must be present. Use of DOI is highly encouraged. The reference style used by the journal will be applied to the accepted article by Elsevier at the proof stage. Note that missing data will be highlighted at proof stage for the author to correct. If you do wish to format the references yourself they should be arranged according to the following examples:

Reference style

References should be cited in the text by the author's name and year of publication. References should be listed alphabetically in an unnumbered list at the end of the paper in the following style: Baecklund, M., Pedersen, N.L., Bjorkman, L., Vahter, M., 1999. Variation in blood concentrations of cadmium and lead in the elderly. *Environ. Res.* 80, 222-230.

Oguro, M., Imahiro, S., Saito, S., Nakashizuka, T., 2015. Mortality data for Japanese oak wilt disease and surrounding forest compositions. *Mendeley Data*, v1. <http://dx.doi.org/10.17632/xwj98nb39r.1>. Letourneau, D.K., 1997. Plant-arthropod interactions in agroecosystems. In: Jackson, L.E.(Ed.), *Ecology in Agriculture*. Academic Press, San Diego, pp. 239-290.

Morgan, W.K.C., Seaton, A. (Eds.), 1995. *Occupational Lung Diseases*, 3rd ed. Saunders, Philadelphia, pp. 308-373.

References drawn from the worldwide web must include the date in which the material was accessed. The names of journals should be abbreviated according to the latest available edition of Index Medicus or Chemical Abstracts Service Source Index. Only articles that have been published or are in press should be included in the references. "Manuscript in preparation," "personal communication," and "unpublished observation" should be cited as such in the text.

Journal abbreviations source

Journal names should be abbreviated according to the List of Title Word Abbreviations.

Only articles that have been published or are in press should be included in the references. "Manuscript in preparation," "personal communication," and "unpublished observation" should be cited as such in the text.

Video

Elsevier accepts video material and animation sequences to support and enhance your scientific research. Authors who have video or animation files that they wish to submit with their article are strongly encouraged to include links to these within the body of the article. This can be done in the same way as a figure or table by referring to the video or animation content and noting in the body text where it should be placed. All submitted files should be properly labeled so that they directly relate to the video file's content. . In order to ensure that your video or animation material is directly usable, please provide the file in one of our recommended file formats with a preferred maximum size of 150 MB per file, 1 GB in total. Video and animation files supplied will be published online in the electronic version of your article in Elsevier Web products, including ScienceDirect. Please supply 'stills' with your files: you can choose any frame from the video or animation or make a separate image. These will be used instead of standard icons and will personalize the link to your video data. For more detailed instructions please visit our video instruction pages. Note: since video and animation cannot be embedded in the print version of the journal, please provide text for both the electronic and the print version for the portions of the article that refer to this content.

Data visualization

Include interactive data visualizations in your publication and let your readers interact and engage more closely with your research. Follow the instructions here to find out about available data visualization options and how to include them with your article.

Supplementary material

Supplementary material such as applications, images and sound clips, can be published with your article to enhance it. Submitted supplementary items are published exactly as they are received (Excel or PowerPoint files will appear as such online). Please submit your material together with the article and supply a concise, descriptive caption for each supplementary file. If you wish to make changes to supplementary material during any stage of the process, please make sure to provide an updated file.

Do not annotate any corrections on a previous version. Please switch off the 'Track Changes' option in Microsoft Office files as these will appear in the published version

Research data

This journal encourages and enables you to share data that supports your research publication where appropriate, and enables you to interlink the data with your published articles. Research data refers to the results of observations or experimentation that validate research findings. To facilitate reproducibility and data reuse, this journal also encourages you to share your software, code, models, algorithms, protocols, methods and other useful materials related to the project. Below are a number of ways in which you can associate data with your article or make a statement about the availability of your data when submitting your manuscript. If you are sharing data in one of these ways, you are encouraged to cite the data in your manuscript and reference list. Please refer to the "References" section for more information about data citation. For more information on depositing, sharing and using research data and other relevant research materials, visit the research data page.

Data linking

If you have made your research data available in a data repository, you can link your article directly to the dataset. Elsevier collaborates with a number of repositories to link articles on ScienceDirect with relevant repositories, giving readers access to underlying data that gives them a better understanding of the research described.

There are different ways to link your datasets to your article. When available, you can directly link your dataset to your article by providing the relevant information in the submission system. For more information, visit the database linking page.

For supported data repositories a repository banner will automatically appear next to your published article on ScienceDirect.

In addition, you can link to relevant data or entities through identifiers within the text of your manuscript, using the following format: Database: xxxx (e.g., TAIR: AT1G01020; CCDC: 734053; PDB: 1XFN).

Mendeley Data

This journal supports Mendeley Data, enabling you to deposit any research data (including raw and processed data, video, code, software, algorithms, protocols, and methods) associated with your manuscript in a free-to-use, open access repository. During the submission process, after uploading your manuscript, you will have the opportunity to upload your relevant datasets directly

to Mendeley Data. The datasets will be listed and directly accessible to readers next to your published article online.

For more information, visit the Mendeley Data for journals page.

Data in Brief

You have the option of converting any or all parts of your supplementary or additional raw data into one or multiple data articles, a new kind of article that houses and describes your data. Data articles ensure that your data is actively reviewed, curated, formatted, indexed, given a DOI and publicly available to all upon publication. You are encouraged to submit your article for Data in Brief as an additional item directly alongside the revised version of your manuscript. If your research article is accepted, your data article will automatically be transferred over to Data in Brief where it will be editorially reviewed and published in the open access data journal, Data in Brief. Please note an open access fee of 500 USD is payable for publication in Data in Brief. Full details can be found on the Data in Brief website. Please use this template to write your Data in Brief.

MethodsX

You have the option of converting relevant protocols and methods into one or multiple MethodsX articles, a new kind of article that describes the details of customized research methods. Many researchers spend a significant amount of time on developing methods to fit their specific needs or setting, but often without getting credit for this part of their work. MethodsX, an open access journal, now publishes this information in order to make it searchable, peer reviewed, citable and reproducible.

Authors are encouraged to submit their MethodsX article as an additional item directly alongside the revised version of their manuscript. If your research article is accepted, your methods article will automatically be transferred over to MethodsX where it will be editorially reviewed. Please note an open access fee is payable for publication in MethodsX. Full details can be found on the MethodsX website. Please use this template to prepare your MethodsX article.

Data statement

To foster transparency, we encourage you to state the availability of your data in your submission. This may be a requirement of your funding body or institution. If your data is unavailable to access or unsuitable to post, you will have the opportunity to indicate why during the submission process, for example by stating that the research data is confidential. The statement will appear with your published article on ScienceDirect. For more information, visit the Data Statement page.

AFTER ACCEPTANCE

Online proof correction

Corresponding authors will receive an e-mail with a link to our online proofing system, allowing annotation and correction of proofs online. The environment is similar to MS Word: in addition to editing text, you can also comment on figures/tables and answer questions from the Copy Editor.

Web-based proofing provides a faster and less error-prone process by allowing you to directly type your corrections, eliminating the potential introduction of errors.

If preferred, you can still choose to annotate and upload your edits on the PDF version. All instructions for proofing will be given in the e-mail we send to authors, including alternative methods to the online version and PDF.

We will do everything possible to get your article published quickly and accurately. Please use this proof only for checking the typesetting, editing, completeness and correctness of the text, tables and figures. Significant changes to the article as accepted for publication will only be considered at this

stage with permission from the Editor. It is important to ensure that all corrections are sent back to us in one communication. Please check carefully before replying, as inclusion of any subsequent corrections cannot be guaranteed. Proofreading is solely your responsibility.

Offprints

The corresponding author will, at no cost, receive a customized Share Link providing 50 days free access to the final published version of the article on ScienceDirect. The Share Link can be used for sharing the article via any communication channel, including email and social media. For an extra charge, paper offprints can be ordered via the offprint order form which is sent once the article is accepted for publication. Both corresponding and co-authors may order offprints at any time via Elsevier's Webshop. Corresponding authors who have published their article gold open access do not receive a Share Link as their final published version of the article is available open access on ScienceDirect and can be shared through the article DOI link.

AUTHOR INQUIRIES

Visit the Elsevier Support Center to find the answers you need. Here you will find everything from Frequently Asked Questions to ways to get in touch. You can also check the status of your submitted article or find out when your accepted article will be published.