



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO

CENTRO DE BIOCÊNCIAS

DEPARTAMENTO DE ZOOLOGIA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA ANIMAL

DRIELE VENTURA DE PAULO

**EFEITOS ECOTOXICOLÓGICOS DO TRIBUTILESTANHO, CLOROTALONIL E
DICLOFLUANIDA EM ESTÁGIOS INICIAIS DE VIDA EM PEIXES**

Recife

2018

DRIELE VENTURA DE PAULO

**EFEITOS ECOTOXICOLÓGICOS DO TRIBUTILESTANHO,
CLOROTALONIL E DICLOFLUANIDA EM ESTÁGIOS INICIAIS DE VIDA
EM PEIXES**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Animal da Universidade Federal de Pernambuco (PPGBA-UFPE), como um dos requisitos para a obtenção do título de Doutor em Biologia Animal.

Área de concentração:
Ecotoxicologia

Orientador: Prof. Dr. Paulo Sérgio Martins de Carvalho

Recife

2018

Catálogo na fonte:
Bibliotecária Claudina Queiroz, CRB4/1752

Paulo, Driele Ventura de

Efeitos ecotoxicológicos do tributestanho, clorotalonil e diclofluanida em estágios iniciais de vida de peixes / Driele Ventura de Paulo - 2018.

171 folhas: il., fig., tab.

Orientador: Paulo Sérgio Martins de Carvalho

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Biociências. Programa de Pós-Graduação em Biologia Animal. Recife, 2018.

Inclui referências e anexos

1. *Poecilia vivipara* 2. *Danio rerio* 3. Biocidas antiincrustantes
I. Carvalho, Paulo Sérgio Martins de (orient.) II. Título

597.667

CDD (22.ed.)

UFPE/CB-2019-086

DRIELE VENTURA DE PAULO

**EFEITOS ECOTOXICOLÓGICOS DO TRIBUTILESTANHO, CLOROTALONIL E
DICLOFLUANIDA EM ESTÁGIOS INICIAIS DE VIDA EM PEIXES**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Animal da Universidade Federal de Pernambuco (PPGBA-UFPE), como um dos requisitos para a obtenção do título de Doutor em Biologia Animal.

Área de concentração: Ecotoxicologia

Aprovada em: 30/11/2018

BANCA EXAMINADORA

Prof^o. Dr. Paulo Sérgio Martins de Carvalho (Orientador)
Universidade Federal de Pernambuco – Centro de Biociências (CB)

Prof^a. Dr^a. Mônica Lúcia Adam (Examinadora Interna)
Universidade Federal de Pernambuco – Centro Acadêmico de Vitória (CAV)

Prof^o. Dr. João Lucas Leão Feitosa (Examinador Interno)
Universidade Federal de Pernambuco – Centro de Biociências (CB)

Prof^o. Dr. Artur Campos Dália Maia (Examinador Interno)
Universidade Federal de Pernambuco – Centro de Biociências (CB)

Prof^a. Dr^a. Eliete Zanadi Lamardo (Examinadora Externa)
Universidade Federal de Pernambuco – Centro de Tecnologia e Geociências (CTG)

Prof^a. Dr^a. Lilia Pereira de Souza Santos (Examinadora Externa)
Universidade Federal de Pernambuco – Centro de Tecnologia e Geociências (CTG)

À Deus seja toda Honra e toda Glória!

AGRADECIMENTOS

Agradeço à Deus por ser o meu “EU SOU”, por ter me dado todas as diretrizes que eu precisava para trilhar essa jornada e me capacitado em cada etapa. Agradeço por ter sonhado com esse doutorado para mim, e por me presentear com a sua presença em cada fase, ensinando-me a manter sempre viva a minha fé nas fases mais difíceis. A Ti meu Deus, que foi o meu tudo durante esse período e que continuará sendo, eu te agradeço!

Agradeço à minha família amada por ser o meu suporte e incentivo para vencer os obstáculos da vida. Sou muito grata pelos investimentos destinados à mim e por toda compreensão com a minha ausência no seio familiar. Em especial, agradeço ao meu pai Domingos, um homem íntegro, batalhador e extremamente otimista, que muito me inspira. Agradeço por ter renunciado os anos de sua juventude para cuidar de minha irmã e de mim. O seu coração gigante e a sua força de guerreiro me orgulham e me inspiram todos os dias. O senhor meu pai, me ensinou a ser uma pessoa perseverante, a não subestimar os problemas e a não aceitar a possibilidade de derrota, encarando tudo na vida como um aprendizado. Agradeço a minha mãe Ana por também sonhar os meus sonhos, pelas orações realizadas, junto com painho, em meu quarto antes de dormir, pedindo ao nosso Deus que renovassem as minhas forças e a sabedoria e por todo apoio em tempo indeterminado. Agradeço também à minha mãe Edna (*in memoriam*) que me ensinou o caminho do conhecimento com prazer desde a infância. Essa conquista também é sua mainha!

A minha mana e minha grande amiga Dhâmara, obrigada por sua alegria, pelo seu amor e cuidado. As nossas longas horas de conversa ao telefone ajudaram a reduzir a saudade durante esses quatro anos. Obrigada mana por ser àquela que sempre compra os meus sonhos e me ajuda em cada etapa de sua concretização .

Ao meu orientador, o Prof. Dr. Paulo Carvalho, agradeço por sua orientação, paciência, confiança e compreensão, por transmitir um pouco dos seus conhecimentos a mim, e por ter me mostrado a excelência e a humanidade no meio acadêmico, o que me despertou um profundo respeito e admiração.

A minha extensa família por laços de sangue (Ventura e Paulo) em especial aos meus tios Manoel e Vane, e Conceição Ventura que nunca mediram esforços para me ajudar em meus sonhos e que tanto me apoiaram nesta fase, com orações, sábios conselhos e muito aconchego. Aos primos e grandes amigos (em especial Jeferson, Ueverson e Ariadinne) que

suportaram minha ausência nos momentos de confraternização e que sempre tentaram minimizar a distância entre a Bahia e o Recife com as demonstrações de afeto. Aos meus amigos baianos que compreenderam a renúncia de sua companhia durante esses 4 anos em favor dessa minha missão em terras Pernambucanas, e em especial à Mila, Claudinha e Tia Keu que sempre me receberam com muita alegria.

À grande família pernambucana que fiz (muitos...rs) Gabi e Pedro, Kel, Gildinha e família, Mara, Henrique e família, Mychelinne e família, Karen e família, Monique e família, Myrtes e família, Daisa e família, aos amigos da faculdade Maria, Célio, Rômulo, Daiana, Eduardo, ao meu pastor Gilberto e Marli e amigos da igreja, às minhas sábias senhorinhas, aos meus vizinhos, obrigada por tantos bons momentos. Recife se tornou mais linda com vocês. Aos meus amigos baianos-pernambucanos que também fizeram parte dessa história Aninha e João, Paty e Guido, Edi, Andressa e Mário, obrigada pela companhia.

Ao curso de Pós-Graduação Biologia Animal, em especial aos coordenadores durante o meu período de curso, o Porf. André Esteves, a Prof^a. Dr^a. Bruna e o Prof. Dr. Wlisses e ao funcionário da pós-graduação Manoel, o meu muito obrigada por todo apoio e prestreza no serviço acadêmico.

Aos Drs. avaliadores desta tese muito obrigada por todas as contribuições.

À Universidade Federal de Pernambuco e aos órgãos de Fomento FACEPE e FINEP-CNPq que disponibilizaram infraestrutura e recursos para o desenvolvimento desse projeto.

Aos peixes.

À vocês, eu Driele Ventura de Paulo ofereço os meus sinceros agradecimentos!

“Ouça o sábio e crescerás em conhecimento e o instruído adquirirá habilidades para aprender sobre a sabedoria, sobre o ensino e para entender as palavras de inteligência”.

“O temor do Senhor é o princípio do conhecimento”.

Provérbios de Salomão.

RESUMO

Os estágios iniciais do desenvolvimento de peixes correspondem a fases importantes para avaliar a toxicidade de produtos químicos devido à sua sensibilidade aos contaminantes. O desenvolvimento de alterações teciduais e anormalidades morfológicas e comportamentais nessas fases podem estar diretamente relacionados à presença de poluentes no ambiente. Biomarcadores histopatológicos, morfológicos e comportamentais foram quantificados para avaliar o risco ecológico da exposição de estágios iniciais de desenvolvimento de *Poecilia vivipara* e *Danio rerio* aos biocidas de tintas antiincrustantes tributilestanho – TBT, clorotalonil e diclofluanida. A análise histopatológica de *P. vivipara* exposta ao TBT indicou alterações na córnea, epitélio pigmentar da retina e no pigmento que participa dos movimentos retinomotores em peixes expostos ao TBT, além de um aumento dose dependente na hiperpigmentação de melanina da íris como provável indicativo do escurecimento externo dos olhos. Uma redução significativa na resistência natatória, velocidade natatória e na trajetória dos peixes provavelmente promoveu uma redução na eficiência da captura de presas desses indivíduos. A exposição dessa mesma espécie ao clorotalonil e diclofluanida mostrou que ambos os biocidas induzem severa toxicidade no fígado, pâncreas e intestino desses peixes. A maior potência de severidade das lesões nesses órgãos foi verificada para o clorotalonil. Em relação aos peixes da espécie *Danio rerio* exposto ao TBT, efeitos teratogênicos foram verificados em todos os tratamentos, relacionados ao retardo no desenvolvimento morfológico e anormalidades morfométricas das larvas. Alterações nos olhos relacionadas à opacidade na lente e microftalmia, bem como alterações histopatológicas retinianas foram mais frequentes em 20 e 30 $\mu\text{g L}^{-1}$ e podem estar associadas a uma hipoatividade natatória desses indivíduos. Todas essas mudanças morfológicas e comportamentais podem reduzir às chances de os peixes expostos recrutarem para a população adulta. Esse estudo demonstra a viabilidade da utilização de estágios iniciais de vida de *P. vivipara* e *D. rerio* para a avaliação de risco ecológico de poluição por biocidas antiincrustantes.

Palavras-chave: *Poecilia vivipara*. *Danio rerio*. Biocidas antiincrustantes. Toxicidade. Histologia. Comportamento.

ABSTRACT

The early stages of fish development correspond to important phases in assessing the toxicity of chemicals due to their sensitivity to contaminants. The development of tissue alterations, morphological abnormalities and behavioral in these phases may be directly related to the presence of pollutants in the environment. Histopathological, morphological and behavioral biomarkers were quantified to evaluate the ecological risk of exposure of initial stages of development of *Poecilia vivipara* and *Danio rerio* to the biocides of antifouling paints tributyltin - TBT, chlorothalonil and dichlofluanid. The histopathological analysis of *P. vivipara* exposed to TBT indicated alterations in the cornea, retinal pigment epithelium and pigment that participate in retinomotor movements in fish exposed to TBT, in addition to a dose-dependent increase in iris melanin hyperpigmentation as a probable indicative of the external darkening of the eyes. A significant reduction in swim resistance, swimming velocity and fish trajectory probably led to a reduction in prey capture of these individuals. Exposure of this same species to chlorothalonil and dichlofluanid showed that both biocides induce severe in liver, pancreas and intestine of these fish. The highest severity potency of the lesions in these organs was verified for chlorothalonil. Regarding the *Danio rerio* exposed to TBT teratogenic effects were verified in all treatments, related to the delay in morphological development and morphometric abnormalities of the larvae. Alterations in the eyes related to opacity in the lens and microphthalmia, as well as retinal histopathologic alterations were more frequent in 20 and 30 $\mu\text{g L}^{-1}$ and may be associated with a swimming hypoactivity of these individuals. All of these morphological and behavioral changes may reduce the chances of exposed fish recruiting into the adult population. This study demonstrates the feasibility of the use of the initial stages of life of *P. vivipara* and *D. rerio* for the ecological risk assessment of pollution by anti-fouling biocides.

Keywords: *Poecilia vivipara*. *Danio rerio*. Anti-fouling biocides. Toxicity. Histology. Behavior.

LISTA DE FIGURAS

Referencial Teórico

Figura 1 – Organismos de diferentes tamanhos que podem compor a comunidade bioincrustante.....	27
Figura 2 – Desenvolvimento de pênis em fêmeas de gastrópode <i>Ocenebra erinacea</i> em uma concentração acima de 1 ng TBT L ⁻¹ na água.	29
Figura 3 – Paradigmas da avaliação de risco.....	35
Figura 4 – Respostas dos organismos a um poluente em diferentes níveis de organização biológica.	37
Figura 5 – Fêmea de <i>guppy</i> : porção superior: indicando superfetação.	45
Figura 6 – Órgãos da cavidade abdominal (fígado, intestino, vesícula biliar, pâncreas e bexiga natatória) de <i>Poecilia vivipara</i> dias pós-nascimento.	47
Figura 7 – Estágios do desenvolvimento morfológico de <i>Danio rerio</i>	51

Artigo 1

Fig. 1 – Spontaneous swimming speed (median, percentiles and mean, n = 10) in newborns of <i>Poecilia vivipara</i> after seven days of waterborne TBT exposure	74
Fig. 2 – Swimming trajectories during 5 min of newborn <i>Poecilia vivipara</i> after seven 7 days of waterborne TBT exposure.	75
Fig. 3 – Swimming resistance index (mean ± standard deviation, n = 10) in newborns of <i>Poecilia vivipara</i> after seven days of waterborne TBT exposure.	76
Fig. 4 – Horizontal sections of the retina and histopathological alterations observed in newborns of <i>Poecilia vivipara</i> after waterborne TBT exposure..	77
Fig. 5 – Horizontal sections of the eye and histopathological alterations observed in the iris and cornea of <i>Poecilia vivipara</i> exposed to TBT. Hematoxylin and Eosin staining.....	78
Fig. 1 – Supplementary material- External darkening of the eyes of newborn <i>Poecilia vivipara</i> exposed to increasing concentrations of waterborne TBT.	79

Artigo 2

Fig. 1 – Cortes horizontais do fígado e alterações histopatológicas observadas em recém-nascidos de <i>P. vivipara</i> expostos ao clorotalonil e diclofluanida.....	115
Fig. 2 – Cortes horizontais do fígado e pâncreas e alterações histopatológicas observadas em recém-nascidos de <i>P. vivipara</i> expostos ao clorotalonil e diclofluanida.....	117
Fig. 3 – Cortes horizontais do fígado de recém-nascidos de <i>P. vivipara</i> com hemorragia	117

Fig. 4 – Índice de alterações histopatológicas hepáticas.	118
Fig. 5 – Cortes horizontais e alterações histopatológicas no intestino de recém-nascidos de <i>P. vivipara</i> expostos ao clorotalonil e diclofluanida.....	119
Fig. 6 – Cortes horizontais de tumor no intestino observadas em juvenis de <i>Poecilia vivipara</i> expostos ao clorotalonil e a diclofluanida.	121
Fig. 7 – Índice de lesões da mucosa intestinal (IMI: somatório dos IAH dos tecidos intestinais epitelial, conjuntivo e muscular) de juvenis recém-nascidos de <i>Poecilia vivipara</i>	122
Fig. 8 – Distância percorrida e exploração da arena de natação por recém-nascido de <i>P. vivipara</i> após 96 horas.....	123
Fig. 9 – Náuplios de <i>Artemia</i> capturados diariamente (mediana, percentis e média, n = 10) por recém-nascidos de <i>P. vivipara</i>	124
Fig. 10 – Incremento em biomassa e em comprimento (mediana, percentil e média, n = 10) de recém-nascidos de <i>P. vivipara</i> após 96 horas de exposição.....	125

Artigo 3

Fig. 1 – General morphology score of <i>Danio rerio</i> embryo-larval stages exposed to waterborne TBT during 96 h..	144
Fig. 2 – Eye diameter of <i>Danio rerio</i> larvae exposed to waterborne TBT during 96 h..	145
Fig. 3 – Horizontal sections of retinas from TBT exposed <i>Danio rerio</i> larvae at 168 hpf. ...	146
Fig. 4 – Swimming speeds of <i>Danio rerio</i> larvae exposed to waterborne TBT during 96 h..	147
Fig. 5 – Total length of <i>Danio rerio</i> larvae exposed to waterborne TBT during 96 h..	148

LISTA DE TABELAS

Referencial Teórico

Tabela 1 – Classificação dos estágios iniciais do desenvolvimento morfológico de <i>Poecilia vivipara</i> , segundo a caracterização de Rocha et al, (2010) e Arcanjo et al, (2014).	48
---	----

Artigo 1

Table 1 – Daily catch of <i>Artemia</i> nauplii and growth in weight and length of <i>Poecilia vivipara</i> newborns exposed to TBT.....	71
Table 2 – Frequency (% of individuals relative to total analysed) of histopathological changes observed in the eyes of <i>Poecilia vivipara</i> exposed to TBT	73

Artigo 2

Tabela1 – Frequência de alterações histopatológicas (% de indivíduos apresentando a patologia em relação ao total analisado) observadas no fígado de <i>Poecilia vivipara</i> expostos ao clorotalonil e diclofluanida.	111
Tabela 2 – Frequência de alterações histopatológicas (% de indivíduos apresentando a patologia em relação ao total analisado) observadas no pâncreas de <i>Poecilia vivipara</i> expostos ao clorotalonil e diclofluanida durante 96 horas.	111
Tabela 3 – Frequência de alterações histopatológicas (% de indivíduos apresentando a patologia em relação ao total analisado) observadas no intestino de <i>Poecilia vivipara</i> expostos ao clorotalonil e diclofluanida durante 96 horas.	113
Tabela 4 – Velocidade média de natação espontânea, percentual de tempo de repouso e tempo de movimento rápido na natação de recém-nascido <i>Poecilia vivipara</i> após 96 horas exposição ao clorotalonil e diclofluanida.	114

Artigo 3

Table 1 – Frequency (%) of recorded abnormalities in zebrafish larvae exposed to tributytin (TBT) at 96 hpf and 168 hpf.....	143
--	-----

LISTA DE ABREVIACÕES E SIGLAS

ABNT	Associação Brasileira de Normas Técnicas
AFS	Sistema antiincrustante (Antifouling Systems)
AMG	Agregado macrofágico
AOPs	Vias de resultados adversos (adverse outcome pathways)
ATPase	Adenosinatrifosfatases
ATP	Adenosina Trifosfato
ATFEP	Atrofia epitelial
ANOVA	Análise de variância
C	Controle (Controls)
CA	Células caliciformes
Ca ⁺²	Cálcio
CEO	Concentração de efeito observado
CETENE	Centro de Tecnologias Estratégicas do Nordeste
CETESB	Companhia Ambiental do Estado de São Paulo
CENO	Concentração de efeito não observado
CNS	Sistema nervoso central (Central Nervous System)
CO	Córnea
CO ₂	Dióxido de carbono
COE	Composto organoestânico
COES	Compostos Organoestânicos
CONAMA	Conselho Nacional do Meio Ambiente
CONG	Congestionamento
CP	Captura de presas
CS	Congestão dos capilares sinusóides

CuPT	Piritiona de cobre
DBT	Dibutilestanho
DDT	Diclorodifeniltricloroetano
DEGC	Degeneração citoplasmática
DESC	Descolamento da fina camada muscular
DMSA	N '-dimetil-N-fenil-sulfamida; metabólito da diclofluanida
DMSO	Dimetilsufóxido (Dimethylsulfoxide)
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DNIP	Direção Nacional de Identificação Pessoal (Dirección Nacional de Identificación de Personal)
DSV	Dilatação dos vasos sinusóides
DUCT	Ducto
EP	Células epiteliais colunares
EPA	Agência de Proteção Ambiental (Environmental Protection Agency)
EPR	Epitélio pigmentar da retina
EUA	Estados Unidos da América
FACEPE	Fundação de Amparo a Ciência e Tecnologia de Pernambuco
FET	Teste de Toxicidade em Embriões de Peixes
FIB	Fibrose
FIG	Fígado
FINEP	Financiadora de Inovação e Pesquisa
FIOCRUZ	Fundação Oswaldo Cruz
FIRC	Forma irregular das células
GST	Glutathione S-transferase
GAPDH	Gliceraldeído-3-fosfato-desidrogenase
GMS	Índice Morfológico Geral (General Morphology Score)
HE	Hematoxilina e Eosina (Hematoxylin and Eosin)

HE HPTLP	Hipertrofias em células da lâmina própria
HEP	Hepatócitos
HPANC EX	Hiperplasia no pâncreas exócrino
HPP	Hiperplasia
HPPC	Hiperplasias pancreáticas
HPPEP	Hiperplasias das células mucosas e epiteliais
HPPLP	Hiperplasias das células conjuntivas da lâmina própria
HPPM	Hiperplasias no músculo liso
HPTCA	Hipertrofia de células caliciformes
HPTEH	Hipertrofia de células epiteliais da mucosa
HPTM	Hipertrofias no músculo liso
IAH	Índice de alterações histopatológicas
IAHCI	Índice de alterações histopatológicas conjuntivas intestinais
IAHEI	Índice de alterações histopatológicas epiteliais intestinais
IAHH	Índice de alterações histopatológicas hepáticas
IAHI	Índice de alterações histopatológicas intestinais
IAHMI	Índice de alterações histopatológicas musculares intestinais
ILEUC	Infiltração leucocitária
IMG	Índice morfológico geral
IMI	Índice de lesão da mucosa intestinal
IMO	Organização Marítima Internacional (International Maritime Organization)
IPANC	Inflamação no pâncreas exócrino
INL	Camada de células nucleares interna (Inner Nuclear Cell Layer)
IPL	Camada plexiforme interna (Inner Plexiform Layer)
ISSO	Organização Internacional de Padronização (International Organization for Standardization)
JUNC LP	Junção das lâminas próprias

LOEL	Menor concentração com efeito observado (Lowest Observable Effect Level)
LP	Lâmina-própria
KOW	Coefficiente de partição octanol-água
KW	Kruskall-Wallis
M	Macrófago
MBT	Monobutilestanho
NECEP	Necrose epitelial
NECLP	Necrose da lâmina própria
NO	Náuplios ofertados (Nauplii Offered)
NOEL	Concentração de efeito não observado (No Observable Effect Level)
NR	Náuplios restantes
NP	Núcleo picnótico
OECD	Organização de Cooperação e Desenvolvimento Econômico (Organization for Economic Cooperation and Development)
ONL	Camada de células nucleares externas (Outer Nuclear Layer)
OPL	Camada plexiforme externa (Outer Plexiform Layer)
OT	Organoestânico (Organotin)
PAN EX	Pâncreas exócrino normal
POP	Poluente orgânico persistente
PVC	Cloreto de polivinila
RAR α	Alfa receptores de ácido retinóico
REs	Reguladores endócrinos
RPE	Epitélio pigmentar da retina (Retinal pigmentar epithelium)
SENO	Menor concentração com efeito observado significativamente
SC-DMSO	Controle de solvente usando dimetilsulfóxido (Solvent Controls)
TBT	Tributilestanho
TBTCl	Cloreto de Tributilestanho

TCIN	Clorotalonil
TH	Hormônio Tiroidiano
TPT	Trifenilestanho
TSK	Trimmed Spearman Karber
UFPE	Universidade Federal de Pernambuco
U.S.	Estados Unidos da América (United States)
USEPA	Agência de Proteção Ambiental Norte Americana
UV	Ultravioleta
V	Vaso sanguíneo
VAC	Vacúolos
VB	Vesícula biliar
VIL BIL	Vilosidades com borda irregular
VP	Veia porta
VS	Vasos sinusóides
Vtg	Vitelogenina
ZnPT	Piritiona de zinco

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	20
1.1 OBJETIVO	22
1.1.2 Objetivos específicos.....	22
2 REFERENCIAL TEÓRICO	25
2.1 A ECOTOXICOLOGIA.....	25
2.2 A BIOINCRUSTAÇÃO E OS ANTIINCRUSTANTES	26
2.2.1 Biocida antiincrustante de segunda geração Tributilestanho - TBT	28
2.2.2 Biocidas antiincrustantes de terceira geração Clorotalonil e Diclofluanida	30
2.2.3 Clorotalonil.....	31
2.2.4 Diclofluanida	33
2.3 AVALIAÇÃO DE RISCO ECOLÓGICO	34
2.4BIOMARCADORES COMO FERRAMENTAS PARA AVALIAÇÃO DE TOXICIDADE.....	36
2.4.1 Histologia.....	36
2.4.2 Comportamento	40
2.5 ESPÉCIES SENTINELAS	40
2.6 ESTÁGIOS INICIAIS DE VIDA DE PEIXES.....	42
2.6.1 Estágio inicial de vida de <i>Poecilia vivipara</i>	43
2.6.1.1 Gestação de <i>Poecilia vivipara</i>	43
2.6.1.2 Marcos morfológicos de <i>Poecilia vivipara</i>	46
2.6.2 Estágio inicial de vida de <i>Danio rerio</i>	50
3 ARTIGO 1 – HISTOLOGICAL AND BEHAVIORAL TOXICITY OF TRIBUTYLTIN IN THE TROPICAL GUPPY <i>Poecilia vivipara</i>.....	53
4 ARTIGO 2 – TOXICIDADE HISTOLÓGICA E COMPORTAMENTAL DOS ANTIINCRUSTANTES CLOROTALONIL E DICLOFLUANIDA EM RECÉM-NASCIDOS DO BARRIGUDINHO <i>Poecilia vivipara</i>	81

5 ARTIGO 3 – DEVELOPMENTAL AND BEHAVIORAL EFFECTS OF TRIBUTYILTIN TO <i>Danio rerio</i> EARLY LIFE STAGES.....	126
6 CONCLUSÕES FINAIS	149
REFERÊNCIAS.....	151
ANEXO A – CARTA DE APROVAÇÃO NO COMITÊ DE ÉTICA	171.

1 INTRODUÇÃO

Biocidas utilizados como princípio ativo de tintas antiincrustantes são compostos necessários para a indústria naval, em vista do aumento do atrito do casco de embarcações com a água e do significativo aumento do consumo de combustíveis fósseis, devido à incrustação (Konstantinou and Albanis, 2004).

Em 1961 foi desenvolvida a primeira tinta antiincrustante de segunda geração a base de um composto organoestânico (COE), o Tributilestanho (TBT), com custo baixo e de longa e eficiente ação antiincrustante. As tintas a base de COEs dominaram o mercado naval, revestindo a grande maioria dos navios construídos no mundo.

Entretanto, estudos realizados em diversas partes do mundo têm mostrado significativos efeitos tóxicos letais e subletais dos COEs como o TBT sobre organismos aquáticos não alvo, diminuindo a viabilidade de larvas de invertebrados e peixes, devido a sua ação como desreguladores endócrinos e afetando a reprodução de organismos marinhos, incluindo gastrópodes e peixes (Parks et al., 2010).

Na busca pelo antiincrustante de alto desempenho, a indústria naval tem procurado equilibrar a eficiência antiincrustante e a durabilidade dos novos produtos com níveis de toxicidade ambientalmente toleráveis, reduzindo os riscos ambientais produzidos por elas. Com isto, uma terceira geração de tintas antiincrustantes começou a ser utilizada. Esse novo grupo de tintas utiliza diferentes compostos biocidas, os quais se encontram atualmente em homologação para utilização em navios pela Organização Marítima Internacional - IMO. Estes compostos pertencem a diferentes grupos químicos e em alguns casos são utilizados até 4 deles no mesmo produto.

Entre os biocidas incorporados nos antiincrustantes de terceira geração encontram-se compostos não metálicos como os fungicidas Clorotalonil (TCIN) e Diclofluanida como princípios ativos (Castro, 2011).

Nesse contexto, alguns estudos relacionando a ocorrência ambiental desses biocidas em áreas onde há fluxo de embarcações, como portos e marinas, têm sido publicados na literatura especializada, sendo a maior parte destes estudos realizada em áreas portuárias da Europa, dos Estados Unidos e do Japão, com poucos estudos sistemáticos sobre o tema existindo até o momento para a costa brasileira. Estudos sobre antiincrustantes em áreas costeiras e portuárias do Brasil (Sant'Anna et al., 2016; Maciel et al., 2018) indicaram

presença de TBT, com concentrações capazes de induzir o fenômeno conhecido como imposex, que consiste na masculinização de fêmeas de gastrópodes e pode resultar na deficiência da função reprodutiva e declínio das populações (Martins and Vargas, 2013). Porém, existe pouco conhecimento sobre os efeitos dessas substâncias sobre peixes marinhos nativos no Brasil.

Devido a sua importância como indicadores de qualidade ambiental, peixes são utilizados como organismos teste em estudos ecotoxicológicos, sendo seus estágios iniciais de desenvolvimento especialmente sensíveis a contaminantes (Weis and Weis, 1989), o que pode levar a reduções na abundância ou mesmo na biodiversidade de espécies (Scott and Sloman, 2004).

Após a absorção, os efeitos tóxicos de antiincrustantes como o TBT em peixes podem se manifestar em diferentes níveis de organização biológica, por exemplo diminuindo níveis de neurotransmissores cerebrais a nível bioquímico, afetando tecidos nervosos e reprodutivos, e desregulando comportamentos de relevância ecológica como os relacionados a predação e a reprodução em concentrações de 10 a 100 ng L⁻¹ (Yu et al., 2013; Sun et al., 2011), que por sua vez podem afetar processos ecológicos a nível populacional.

Os fungicidas clorotalonil e diclofluanida estão entre os biocidas antiincrustantes de terceira geração mais utilizados atualmente (Guardiola et al., 2012). Clorotalonil apresenta toxicidade elevada para peixes, afetando a eclosão de larvas e o crescimento de *Fundulus heteroclitus* (Onduka et al., 2012), além de promover mudanças bioquímicas na atuação de enzimas antioxidantes no fígado e alterações comportamentais como letargia durante a natação em *Salmo gairdneri*, *Galaxias sp.* sob concentrações de 10 µg L⁻¹ (Daives and White, 1985). A informação sobre a toxicidade subletal da diclofluanida para peixes é escassa, e a CL50 (concentração letal a 50% dos organismos testados) para trutas *Oncorhynchus mykiss* é igual a 10 µg L⁻¹ (Hamwijk et al., 2005). A análise de parâmetros ecotoxicológicos do efeito tóxico de contaminantes ambientais em diferentes níveis de organização biológica em Ecotoxicologia é uma estratégia para a avaliação de efeitos de contaminantes de forma integrada (Scott and Sloman 2004), sendo os biocidas tributieltanho, clorotalonil e diclofluanida integrantes desse grupo.

O barrigudinho estuarino *Poecilia vivipara* (Block and Schneider, 1801) (fam. Poeciliidae) é um peixe teleósteo euriliano, nativo e com distribuição cosmopolita na costa brasileira, e que vem sendo utilizada no Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia de Toxicologia Aquática do CNPq para o desenvolvimento de metodologias de

biomonitoramento de ambientes aquáticos com base nos biomarcadores de contaminação. O uso desta espécie nativa como organismo modelo para avaliação de efeitos deletérios decorrentes da contaminação química por biocidas antiincrustantes torna-se, portanto justificado.

O paulistinha ou “zebrafish” *Danio rerio* é um pequeno teleósteo euritérmico de água doce (Engeszer and Rao, 2007; Ribas and Piferrer, 2013) da família Cyprinidae (Colwill, 2011; Ribas and Piferrer, 2013). Está entre os organismos testes mais utilizados em estudos ecotoxicológicos (Qiu et al., 2016; Liang et al., 2017; Liu et al., 2018) para diferentes finalidades, inclusive dentro dos ensaios de embriotoxicidade, devido a facilidade e baixo custo em cultivá-los em laboratório, a alta taxa de fecundidade e desenvolvimento embrionário ausente de condições uterinas maternas, o que possibilita a avaliação de toda a fase embrionária até a eclosão (Hermesen et al., 2011).

As informações obtidas neste estudo poderão ser utilizadas no aprimoramento da legislação nacional relacionada à qualidade das águas, uma vez que, nenhum biocida utilizado em tintas antiincrustantes de terceira geração encontra regulamentação na legislação brasileira para este fim.

1.1 OBJETIVO GERAL

O objetivo deste estudo é avaliar os efeitos ecotoxicológicos dos biocidas antiincrustantes tributilestano, clorotalonil e diclofluanida em estágios iniciais de vida destas espécies, quantificando de forma integrada biomarcadores histológicos a nível suborganísmico, biomarcadores comportamentais e efeitos no crescimento a nível organísmico, todos considerados indicadores relevantes de processos ecológicos fundamentais, que podem ser usados no monitoramento da poluição marinha.

1.1.1 Objetivos específicos

Artigo 1: Histological and behavioral toxicity of tributyltin in the tropical guppy *Poecilia vivipara*

Após realizar exposição em laboratório com *P. vivipara* ao TBT em diferentes concentrações, por 7 dias, avaliar:

- A concentração letal para 50% dos indivíduos após 96 horas de exposição (LC5096h);

- Efeitos subletais histopatológicos na retina;
- Efeitos subletais relacionados à velocidade, resistência e trajetória natatória;
- Efeitos subletais relacionados à alimentação (número de náuplios ingeridos);
- Efeitos subletais relacionados ao crescimento dos indivíduos;
- A relação das respostas histológicas e comportamentais observadas com as concentrações de exposição.

Artigo 2: Toxicidade histológica e comportamental dos antiincrustantes Clorotalonil e Diclofluanida em recém-nascidos do barrigudinho *Poecilia vivipara*

Após realizar exposição em laboratório com *P. vivipara* exposta por 96 horas à diferentes concentrações clorotalonil e diclofluanida, avaliar efeitos letais e subletais:

- A concentração letal para 50% dos indivíduos após 96 horas de exposição (LC5096h);
- Efeitos subletais histopatológicos no fígado, pâncreas, intestino dos peixes expostos em relação ao controle;
- Efeitos subletais relacionados à velocidade, distância percorrida e trajetória natatória dos peixes expostos em relação ao controle;
- Efeitos subletais relacionados à alimentação (número de náuplios ingeridos) dos peixes expostos em relação ao controle;
- Efeitos subletais relacionados ao crescimento dos indivíduos expostos em relação ao controle;
- A relação das respostas histológicas e comportamentais observadas com as concentrações de exposição.

Artigo 3: Developmental and behavioral effects of tributyltin to *Danio rerio* early life stages

Após realizar exposição em laboratório por 96 horas de *Danio rerio* ao TBT em diferentes concentrações, avaliar efeitos letais e subletais relevantes para o recrutamento de *D. rerio*:

- A concentração letal para 50% dos indivíduos após 96 horas de exposição (LC5096h);
- O desenvolvimento morfológico dos embriões e larvas segundo Índice de Desenvolvimento Morfológico;

- Anormalidades morfológicas e efeitos histopatológicos na retina dos indivíduos expostos em relação ao controle;
- A velocidade natatória dos indivíduos expostos em relação ao controle;
- O comprimento total dos indivíduos expostos em relação ao controle;
- A relação das respostas histológicas na retina, das anormalidades morfológicas, e das respostas comportamentais observadas com as concentrações de exposição.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 A ECOTOXICOLOGIA

Vários eventos de poluição ambiental foram identificados ao longo da história mundial promovendo graves consequências sobre os organismos. Um caso peculiar de contaminação, que ganhou notoriedade no meio acadêmico e mobilizou a comunidade científica, foi o causado pelo uso do diclorodifeniltricloroetano – DDT. O uso extensivo deste pesticida organoclorado no período da Segunda Guerra Mundial culminou em um declínio populacional de espécies de aves de rapina e piscívoras (Akito et al., 2014) e promoveu outros diversos efeitos tóxicos sobre o ecossistema, como os relatados por Carson, (2002) em uma publicação romancista e revolucionária, que muito contribuiu para a divulgação das ideias da Ecotoxicologia:

“... na primavera e no outono as pessoas para lá se moviam... se dirigiam para ali pescar nos rios cujas águas eram claras e frescas, fluindo das colinas e formando lagunas onde as trutas se criavam. Assim eram esses dias, quando os primeiros colonizadores ergueram suas casas, perfuraram seus poços e construíram seus celeiros. Depois uma doença estranha nas plantas se espalhou por toda área. Enfermidades misteriosas varreram bandos de galinhas, as vacas e os carneiros adoeciam e morriam. Os lavradores falavam de muitas doenças em seus familiares. Nas cidades os médicos se intrigavam com o aparecimento de novas doenças em seus pacientes. Registraram várias mortes súbitas e inexplicáveis. Havia ali um estranho silêncio. E os pássaros, por exemplo, para onde teriam ido?” Primavera Silenciosa, 1962. (Carson, 2002).

Primavera Silenciosa escrito por Rachael Carson (1962) gerou um alerta ao “Equilíbrio da natureza”(Zhou et al., 2019) e ao uso dos novos agroquímicos que estavam sendo liberados indiscriminadamente no ambiente, sem uma avaliação integrada das propriedades químicas e dos efeitos biológicos e mecanismos de toxicidade sobre os organismos expostos (Fent, 2003; Walker et al., 2012).

Nesse contexto, a Ecotoxicologia surgiu como uma ciência interdisciplinar, responsável por estudar efeitos nocivos dos produtos químicos (toxicologia) em associação com as condições ecológicas, concentrando-se em efeitos deletérios não intencionais causados por compostos químicos sobre o ecossistema e organismos constituintes (Walker et al., 2012). Esta ciência holística e integrativa é relativamente nova, pois ganhou notoriedade como ciência ambiental só a partir de 1969, (Truhaut, 1977), atuando diretamente no estudo da poluição e nos efeitos desencadeados pela exposição dos organismos a substâncias químicas

antrópicas, em diferentes âmbitos de pesquisa e sobre diferentes níveis de organização biológica (Walker et al., 2012).

A atuação da ecotoxicologia sobre os novos problemas de poluição ambiental continua em evidência, como os desencadeados pelos compostos biocidas com ação antiincrustantes, adotados pela indústria naval, para impedir o assentamento de organismos incrustantes recrutamentantes (esporos e larvas) sobre os revestimentos submersos. O uso desse compostos tem promovido efeitos deletérios sobre os organismos não alvo, incluindo àqueles que se encontram em estágios iniciais de vida, tornando-se desta forma um potencial risco para indivíduos aquáticos recrutantes.

2.2 A BIOINCRUSTAÇÃO E OS ANTIINCRUSTANTES

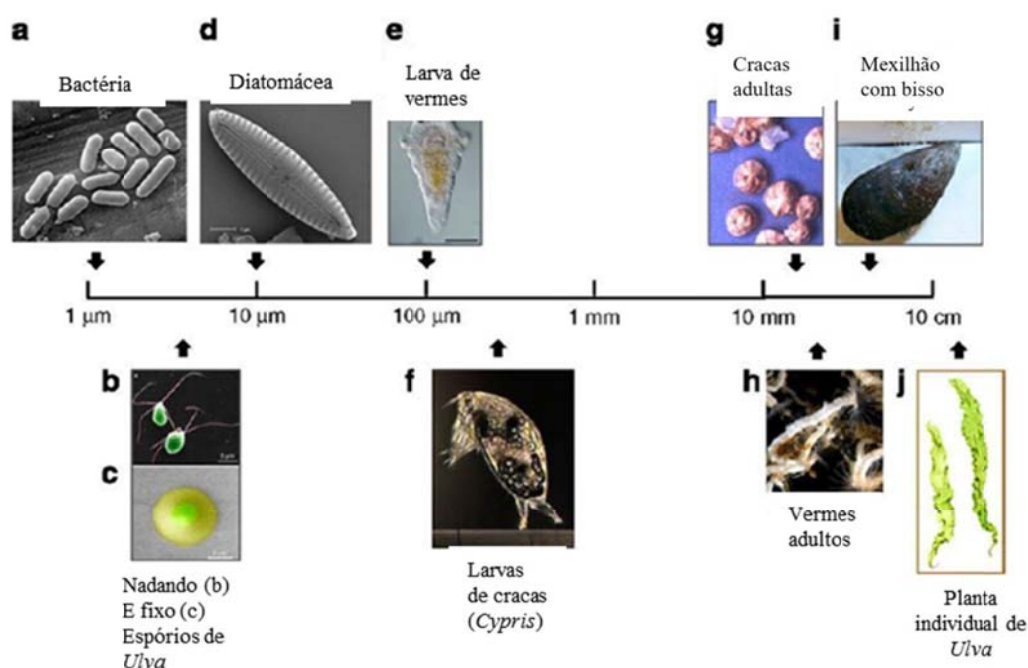
A incrustação biológica é um fenômeno natural que inclui a adesão e o crescimento de uma diversidade de organismos incrustantes (*fouling*) nas superfícies de materiais e estruturas submersas, podendo ser desde microorganismos como bactérias, diatomáceas e protozoários, a macroorganismos como algas marinhas, corais, esponjas, anêmonas, tunicados, cracas, mexilhões e poliquetas (Gu, 2018); (Callow and Callow, 2011) (Figura 1). É um processo dinâmico, e embora seja dependente de diversos fatores para ocorrer, como substrato, localização geográfica, estação do ano, competição e predação, esses organismos se dispersam rápido e têm sido considerados como um problema global para as indústrias marítimas, com consequências tanto econômicas quanto ambientais (Callow and Callow, 2011).

Dentre os efeitos econômicos prejudiciais decorrentes da bioincrustação estão: a redução da velocidade dos navios em função do aumento do peso e atrito da embarcação com água; o aumento do consumo de combustíveis, em torno de 6% a cada 100 mm de rugosidade por incrustação; o aumento da corrosão de turbinas, canos e sensores oceanográficos, além da diminuição da durabilidade da embarcação e aumento da manutenção das estruturas submersas (Menasha and Banta, 1952; Castro et al., 2011; Callow and Callow 2011; Peres et al., 2014). A ausência de medidas eficazes capazes para reduzir os custos causados pelo problema da bioincrustação conduziu a gastos exorbitantes para a frota da marinha dos Estados Unidos, por exemplo, promovendo despesas de até US\$ 56 milhões/ ano para manutenção com combustível, limpeza e pintura dos navios (Schultz, 2007).

Na tentativa de minimizar esses efeitos, muitos compostos foram utilizados para prevenir a adesão desses organismos. Na primeira geração de antiincrustantes, biocidas à base

de óxidos metálicos eram regularmente adicionados às tintas antiincrustantes, como chumbo com óleo de baleia, enxofre e arsênio, cobre e goma em pó, e mistura de arsênio com óxidos de cobre e de zinco. Entretanto, essas misturas possuíam pouca durabilidade (6 a 8 meses) devido à composição solúvel da resina e disponibilidade dos biocidas na superfície de sua matriz, o que favorecia a lixiviação desses compostos (Fent, 1996; Castro et al., 2011).

Figura 1 – Organismos de diferentes tamanhos que podem compor a comunidade bioincrustante.



Fonte: Callow and Callow, (2011).

Novas formulações de tintas antiincrustantes a base de compostos organoestânicos (COEs) com o tributilestanho (TBT) e trifenilestanho (TPT) surgem então na década de 1961 como principais princípios ativos. Essas tintas eram altamente eficazes, pois possuíam matriz insolúvel ou de autopolimento, que permitiam uma durabilidade dos biocidas nas tintas por até 24 meses, favorecia a redução efetiva da bioincrustação e a diminuição significativa nos custos de manutenção com as embarcações (Yebra et al., 2004; Castro et al., 2011). As tintas a base de COEs dominaram o mercado naval, revestindo a grande maioria dos navios construídos no mundo, chegando a revestir 90% dos cascos dos navios em operação na década de 1980. Entretanto, apesar de sua eficiência, estas tintas contendo COEs como biocidas têm sido apontada por muitos autores como as mais impactantes para o ambiente, devido à sua toxicidade sobre a biota "não alvo" (Fent, 1996; Castro et al., 2011). Os

compostos organoestânicos têm diminuído a viabilidade de larvas de invertebrados e peixes, afetando a reprodução de organismos marinhos e atuado como desreguladores endócrinos de gastrópodes e peixes em áreas portuárias ao redor do mundo (Dafforn et al., 2011), e sendo consequentemente categorizados como um dos poluentes mais perigosos nas últimas décadas para os ecossistemas aquáticos (Fent, 1996).

Dentre os COEs utilizados, o tributilestanho (TBT) apresenta uma maior relevância devido ao seu uso generalizado como princípio ativo de tintas antiincrustantes de autopolimento, como estabilizantes de PVC e como fungicida (Fent, 2004). O Trifenilestanho (TPT) também foi usado como biocida auxiliar, junto com o TBT, em algumas tintas antiincrustantes, embora sua principal aplicação estivesse relacionada à agricultura, onde é utilizado como fungicida para várias culturas, entrando nos ecossistemas aquáticos via escoamento e lixiviação de campos agrícolas (Fent, 1996; Fent et al., 1998).

2.2.1 Biocida antiincrustante de segunda geração tributilestanho - TBT

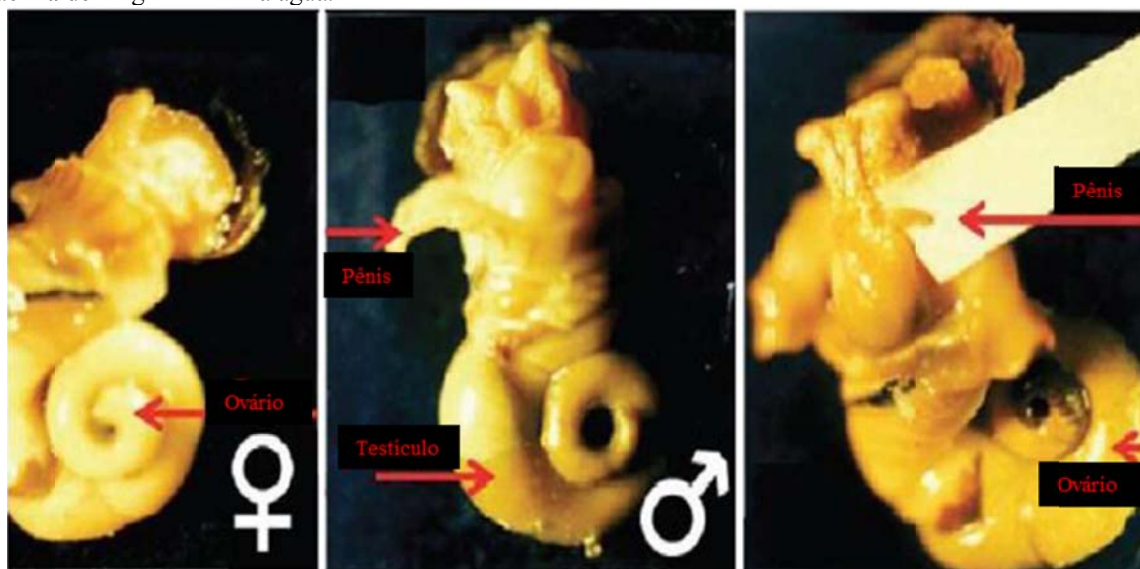
O organometálico Tributilestanho - TBT ($(n-C_4H_9)_3 Sn-X$) é um poluente orgânico persistente (POP), possui baixa taxa de degradação e se mantém em sedimentos anóxicos por anos, com meia vida variando de semanas a décadas, dependendo da composição do substrato bêntico (Fent, 1991; Langston et al., 2015). Na água do mar a degradação do TBT é variável (horas a meses) e é dependente da temperatura, turbidez, presença de microorganismos e luz (Fent, 1996).

Quando presente no ambiente aquático, o TBT pode se solubilizar parcialmente na coluna d'água, ou se particionar para outros compartimentos ambientais como sedimento, partículas suspensas na água, ou ser absorvido por organismos como bactérias e algas (Antizar-Ladislao, 2008). Essa característica se deve ao fato do TBT possuir baixa solubilidade em água ($<10 \text{ mg L}^{-1}$ a 20°C e pH 7,0) (Fent, 1996), e afinidade por moléculas orgânicas ($\log K_{ow}$ de TBT = TBTOH = 4,4; $\equiv$ 4,15 TBT em pH 8) (K_{ow} -coeficiente de partição octanol-água) (Meador, 2000), capacidade que lhe permite se bioacumular em organismos (Fent and Hunn, 1993), sendo sugerida inclusive uma biomagnificação na cadeia alimentar (De Carvalho and Santelli, 2010).

Nesse contexto, alguns estudos relacionando a ocorrência ambiental em áreas portuárias e aos efeitos desencadeados sobre os organismos não-alvo, têm sido publicados na literatura especializada, sendo a maior parte destes estudos realizada em portos e marinas da Europa (Alzieu, 2000), dos Estados Unidos (Strand et al., 2009) e do Japão (Horiguchi and

Morita 1994; Horiguchi et al., 2006), e recentemente na costa Latina, inclusive na brasileira (Sant'Anna et al., 2016; Maciel et al., 2018). Uma série de efeitos foram identificados sobre a biota não-alvo expostas ao TBT, sendo os pioneiros e extremamente relevantes o ocorrido na baía de Arcachon (França), com o desenvolvimento de anormalidades nas conchas de ostras denominada *balling* (Alzieu, 2000) e o efeito biológico mais conhecido do TBT, relacionado ao imposex, fenômeno caracterizado pelo surgimento de estruturas sexuais secundárias masculinas em fêmeas de gastrópodes. É um efeito extremamente específico e de fácil quantificação, que vem sendo amplamente utilizado como biomarcador de áreas contaminadas por TBT (Martins and Vargas, 2013) (Figura 2).

Figura 2 – Desenvolvimento de pênis em fêmeas de gastrópode *Ocenebra erinacea* em uma concentração acima de 1 ng TBT L⁻¹ na água.



Fonte: Amara et al., (2018).

Adicionalmente, estudos com peixes expostos a esse COE mostraram inibição da aromatase e o aumento de etiniltestosterona em fêmeas de *Danio rerio* (McCallister et al., 2003), bem como a indução de masculinização em fêmeas desta espécie, causando a reversão sexual de fêmeas e alterações no comportamento sexual e no sucesso reprodutivo desses peixes (Mochida and Fujii, 2009). Outros estudos também mostraram a toxicidade do TBT sobre peixes em estágios iniciais da vida, desenvolvendo efeitos deletérios sobre medaka (*Oryzias melastigma*) (Bao et al., 2011) e larvas de carpas (*Phoxinus phoxinus*), desencadeando degenerações teciduais na pele, músculo esquelético, retina e córnea, redução do crescimento e opacidade nos olhos das carpas (Fent, 1992), além de anormalidades

esqueléticas em larvas de dourado (*Coryphaena hippurus*) (Adema-Hannes and Shenker, 2008).

Devido à sua elevada toxicidade sobre os organismos aquáticos não-alvo foram implementadas na Convenção de Estocolmo-Roterdã e regulamentadas pela Organização Marítima Internacional (International Maritime Organization - IMO), restrições referentes ao uso (Antizar-Ladislao, 2008; Bao et al., 2011) e comercialização do TBT em tintas antiincrustantes em muitos países. Em 2008 o banimento passou a vigorar de forma integral, incluindo a remoção desses revestimentos de estruturas em operação e a interrupção do tráfego das embarcações ainda revestidas.

No Brasil, a resolução CONAMA 357/2005 estabelece regulamentação para o TBT nas concentrações limitante $0,01 \mu\text{g L}^{-1}$ para água salina e de $0,063$ e $2,0 \mu\text{g L}^{-1}$ para corpos hídricos receptores de água doce, nas classes 2 e 3 respectivamente, entretanto a única restrição regulamentada proibindo a aplicação de tintas antiincrustantes com TBT em sua formulação está no Decreto Legislativo nº 797/2010, e mesmo tendo sido proibida, há cerca de seis anos, ainda há indícios de contaminação por esse composto em áreas portuárias brasileiras (Sant'Anna et al., 2016). Provavelmente, essa contaminação ainda decorre da baixa degradação e de sua remobilização em sedimentos contaminados, bem como por seu uso ilegal (De Castro et al., 2012; Artifon et al., 2016), o que possibilitaria a contaminação de muitos organismos marinhos nativos, atualmente pouco estudados. Desta forma, todo conhecimento adquirido sobre os efeitos desse COE em peixes marinhos nativos no Brasil, torna-se relevante.

2.2.2 Biocidas antiincrustantes de terceira geração Clorotalonil e Diclofluanida

Em razão dos problemas ambientais associados ao uso de tintas à base de organoestânicos surge então uma terceira geração de tintas antiincrustante “*booster*” (Selim et al., 2017) com uma proposta de baixos riscos ambientais e baixo custo para manutenção das embarcações (Alzieu, 2000). Na composição dessas tintas são utilizados 16 diferentes compostos biocidas, com associação de até 4 deles no mesmo produto. Dentre os novos biocidas pertencentes a diferentes grupos químicos tem-se alguns fungicidas como Busan (TCMTB), Clorotalonil (2,4,5,6-tetracloroisofaltonitrila), Diclofluanida (N- [dicloro (fluoro) metil] sulfanil-N- (dimetilsulfamoil) anilina), DCOIT- Sea-Nine (4,5- dicloro-2- *n* -octil-4-isotiazolin-3-ona), Tiram (Tetramethylthiuram disulfide – TMTD), Ziram (zinco; N, N-dimetilcarbamoditioato), Maneb (2-(ditiocarboxiamino) etiliminometanodioliolato);

herbicidas como Diuron (3-(3,4-diclorofenil)-1,1-dimetilureia); e Irgarol 1051 (2-metiltio-4-terbutilamino-6-ciclopropilamino-s-triazina), e outros compostos como Trifenilbornano Piridina, Zinco Piritona, Cobre Piritona, Óxido Cuproso, Tiocianato de Cobre e Naftenato de Cobre (Sakkas et al., 2002; Yebra et al., 2004; Voulvoulis and Lester, 2006; Castro et al., 2011). O Irgarol 1051, o DCOIT – Sea-Nine, o Diuron, o Clorotalonil, a Diclofluanida e outros compostos metálicos, como a Piritona de zinco (ZnPT) e a Piritona de cobre (CuPT), são os biocidas de reforço mais utilizados (Konstantinou and Albanis, 2004).

Embora os *booster* demonstrassem menos agressividade ao ambiente aquático, o problema da toxicidade em várias espécies marinhas ainda permanece e os efeitos ambientais, como a toxicidade e a persistência desses biocidas, ainda são pouco compreendidos, uma vez que foram introduzidos como biocidas antivegetativos recentemente (Amara et al., 2018).

Existe uma preocupação crescente sobre o uso desses novos compostos biocidas de reforço no ambiente, uma vez que ainda não foram totalmente verificados como sendo menos prejudiciais para o ambiente do que o TBT (Yebra et al., 2004). O clorotalonil (TCIN) e diclofluanida têm sido comumente usados como agrotóxicos de amplo espectro em lavouras (fungicida, pesticida, moluscicida, herbicida) e, recentemente, também foi incorporado como biocidas em tintas antiincrustantes. A toxicidade desses compostos tem sido relatada em vários documentos, com maior enfoque para o clorotalonil devido sua alta toxicidade para peixes e outros invertebrados aquáticos (Caux et al., 1996).

2.2.3 Clorotalonil

O organoclorado clorotalonil (TCIN) ($C_8Cl_4N_2$ -2, 4, 5, 6-Tetrachloroisophthalonitrile) – é um fungicida pertencente ao grupo das isoftalonitrilas, possui baixa solubilidade em água (0,6 a 1,2 mg/L à 25°C) e baixa persistência no meio aquático, exibindo meia-vida entre 1 e 48 h, dependendo do tipo de água, da presença de luz e de microorganismos (Sakkas et al., 2002; Voulvoulis, 2006).

É amplamente utilizado na agricultura em diferentes tipos de cultura e é comercializado como principal princípio ativo em várias marcas de fungicidas, incluindo Bravo, Clorotalonil, Daconil, Echo, Vanox (Cima et al., 2008). A presença do clorotalonil no ambiente aquático pode ser originária do escoamento do solo, ou resultante da liberação desse biocida nas tintas das embarcações, sendo essa última via a principal fonte de contaminação desse poluente para ecossistemas marinhos (Cima et al., 2008). Estudos mostram a ocorrência de contaminação por esse composto em diferentes áreas portuárias e estuarinas com intensa

atividade naval, indicando concentrações de clorotalonil de até $0,6 \mu\text{g L}^{-1}$ e $1,38 \mu\text{g L}^{-1}$ (Van Graft and Leeuwangh, 1977; Konstantinou and Albanis 2004). Concentrações de clorotalonil superiores a $270 \mu\text{g L}^{-1}$ foram detectadas em águas de escoamento superficial após aplicação em campos de golfe (Shuman et al., 2000). No Brasil, esse *booster* foi encontrado em córregos no município de Guaíra no estado de São Paulo, na concentração de $0,27 \mu\text{g L}^{-1}$ (Filizola et al., 2002), sendo esta a única literatura brasileira que encontramos abordando concentrações ambientais do composto.

Em decorrência da ampla utilização desse composto, os potenciais riscos ecológicos do clorotalonil sobre a biota aquática têm sido estudados, tanto em relação ao composto parental, quanto aos seus metabólitos. O clorotalonil possui uma elevada toxicidade sobre peixes e outros organismos aquáticos, inativando enzimas chave da cadeia respiratória no fígado ou brânquias, podendo também inibir a glicólise ao se ligar com a enzima gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase (GAPDH) (Caux et al., 1996, Sánchez Garayzar et al., 2016). A toxicidade letal do clorotalonil expressa pela CL50-96h (concentração letal a 50% dos organismos após 96h de exposição) em peixes varia de $8,6 \mu\text{g L}^{-1}$ na espécie mais sensível de congolli *Pseudaphritis urvillii*, a $110 \mu\text{g L}^{-1}$ na espécie menos sensível de medakas *Oryzias melastigma* (Amara et al., 2018).

A exposição ao TCIN também foi capaz de promover acúmulo de seus metabólitos na vesícula biliar de truta-arco-íris *S. gairdneri* na forma de conjugados de glutatona (Davies, 1985). Dependendo da espécie e das condições de exposição pode atuar como desregulador endócrino, através de efeitos agonistas e antagonistas de ligação desses compostos sobre receptores da aromatase e de hormônios tireoidianos (Zhang et al., 2016). A embriotoxicidade desse composto também tem sido relatada, promovendo retardamento na eclosão de ovos de invertebrados e peixes e anormalidades morfoestruturais em larvas de *C. marginalis* (Bellas, 2006).

Como consequência dos potenciais efeitos tóxicos desenvolvidos por esse organoclorado, medidas preventivas têm sido tomadas no âmbito internacional, regulamentando o seu uso (Cima et al., 2008). Atualmente, apenas a Suécia proibiu o uso do clorotalonil como pesticida e outros usos baseado em seu potencial carcinogênico (Circular X do PIC, Anexo V: Sinopse de Notificações de Ações de Controle do Programa das Nações Unidas para o Meio Ambiente, dezembro de 1999, em setembro de 2004). Outros países, como o Canadá, estabelece regulamentação específica para o clorotalonil em corpos d'água doce ($0,18 \mu\text{g L}^{-1}$) e água salgada ($0,36 \mu\text{g L}^{-1}$) (CCME, 1999) e, na Inglaterra, o uso de

clorotalonil foi regulamentado para a composição de tintas antiincrustantes (Thomas and Brooks, 2010), mas continua sendo permitido em lavouras agrícolas, sendo que em água doce está legislado em 0,035 e 1,2 $\mu\text{g L}^{-1}$ para aplicação em longo e curto período, respectivamente (DEFRA, 2014).

No Brasil, o Conselho Nacional do Meio Ambiente – CONAMA ainda não dispõe de regulamentação para a concentração limitante do clorotalonil como biocida em corpos d'água. A resolução vigente que estabelece as condições e padrões para corpos d'água superficiais (CONAMA357/ 2005) dispõe de outorga apenas para tributilestanho. Entretanto, na resolução 396 (CONAMA, 396/ 2008) há regulamentação desse biocida organoclorado em relação às diretrizes para águas subterrâneas, devido ao seu uso como agrotóxico, regulamentando o valor limitante de 0,1 $\mu\text{g L}^{-1}$ para este tipo de corpo d'água. Nesta resolução ainda pode ser encontrado valores máximos do biocida permitidos para consumo humano de 30 $\mu\text{g L}^{-1}$, para dessedentação de animais de 170 $\mu\text{g L}^{-1}$ e para irrigação de 5,8 $\mu\text{g L}^{-1}$.

2.2.4 Diclofluanida

Outro biocida organoclorado é a diclofluanida ($\text{C}_9\text{H}_{11}\text{Cl}_2\text{FN}_2\text{O}_2\text{S}_2$ –(dichlorofluoromethyl)thio)-N',N'-dimethyl-N-phenylsulfamide). Pertencente ao grupo das sulfidrilas, esse biocida é comercializado como principal princípio ativo da marca de fungicidas Bay 47531 e possui um amplo espectro de utilização na agricultura (Gordon, 2010; Guardiola et al., 2012).

Quando introduzido no ambiente aquático, a diclofluanida também pode se particionar para o sedimento, devido a forte adsorção em condições alcalinas ($\text{pH} < 8$) (Voulvoulis et al., 2002). Em função da sua baixa solubilidade em água (0,006 mg L^{-1}) e da afinidade por partículas orgânicas ($\text{Kow } 2,72 \text{ a } 3,70$) (Voulvoulis et al., 2002), alguns estudos têm mostrado que a diclofluanida possui a capacidade de se bioacumular e de desenvolver toxicidade (Dafforn et al., 2011) (fator de bioconcentração - BCF de 70), embora possua uma menor toxicidade em comparação aos outros compostos antiincrustantes como clorotalonil e DCOIT-Sea-Nine (Bellas, 2006; Guardiola et al., 2012).

Alguns estudos com Diclofluanida tem mostrado embriotoxicidade em ouriço-do-mar, *Glyptocidaris crenularis*, *Paracentrotus lividus* e em bivalve *Mytilus edulis*, (Bellás, 2006; Amara et al., 2018), citotoxicidade para peixes (Suzuk et al., 2004), e ausência de potencial efeito carcinogênico em camundongos (Gordon, 2010). Outros estudos têm sido realizados, investigando a toxicidade aguda deste biocida para outras espécies aquáticas como peixes,

mas infelizmente, faltam dados suficientes sobre sua toxicidade, que permitam avaliar o risco associado à ocorrência ambiental desse biocida antiincrustante oriundo de embarcações. Alguns casos de contaminação foram verificados por Voulvoulis et al, (2000) e Castro et al, (2011) quantificando a diclofluanida em amostras de água em áreas portuárias com concentrações inferiores aos limites de detecção nas técnicas empregadas. Para as áreas de porto e marina na Europa e na América do Norte a concentrações de diclofluanida atingiu até 214 ng L⁻¹.

Na legislação brasileira, o Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA) ainda não dispôs de nenhuma norma de regulamentação sobre a concentração limitante da diclofluanida como biocida em corpos d'água. Entretanto, há um Decreto-Lei 138/2008, vigente desde 2009, emitido pelo Ministério da Saúde, que estabelece a aprovação do uso desses compostos no sentido de incluí-los no mercado dos produtos biocidas.

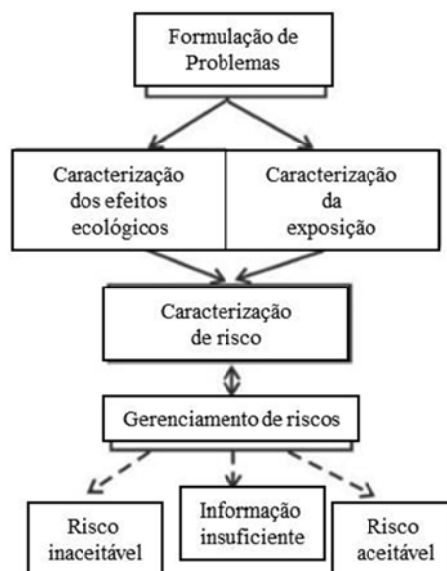
2.3 AVALIAÇÃO DE RISCO ECOLÓGICO

Nesse contexto, alguns estudos têm sido realizados para avaliar os prováveis impactos ecológicos gerados pela disponibilidade desses compostos no ecossistema aquático, verificando a toxicidade de biocidas antiincrustantes sobre os organismos não-alvo, uma vez que muitos dos efeitos tóxicos promovidos por esses contaminantes ainda são desconhecidos.

A avaliação de risco ecológico ou ambiental é definida como uma estimativa prévia da probabilidade e magnitude de ocorrência de um evento desconhecido ocorrer (Suter, 1993), como um acidente ou contaminação, por exemplo, e às consequências ambientais, sociais e econômicas ocasionadas por um possível impacto (Bitar and Ortega, 1998). Esse instrumento de prevenção ambiental, instituído pela Agência de Proteção Ambiental Americana (USEPA) desde 1992 é baseado no Princípio da Precaução, no que tange a sua capacidade de evitar que qualquer risco de dano ocorra sobre o meio ambiente, nos casos de incerteza científica acerca de uma potencial degradação. Inicialmente a análise incorpora informações técnicas e científicas na identificação do perigo, avaliação da toxicidade e caracterização de potenciais fontes de risco, que em uma etapa posterior de gerenciamento desse risco será utilizada como base científica para as ações de gestão (Fent 2003; van der Oost, 2003) (Figura 3), na elaboração de propostas alternativas de mitigação para as possíveis consequências da ação de estressores antrópicos sobre o ambiente (Bitar and Ortega, 1998). A análise de risco reduz assim, a possibilidade de ocorrência de possíveis acidentes e contaminações afetarem o ecossistema, a sociedade e a economia.

Situações de atividades antrópicas, que operam substâncias potencialmente poluidoras capazes de acarretar danos ao meio ambiente e que há incerteza científica acerca da sua potencial degradação são passíveis de análise de risco ambiental (Jesus and Carvalho, 2000) e, deste modo, os biocidas antiincrustantes lançados sobre o ambiente aquático estão inseridas nesse contexto, pois podem ser potenciais fontes poluidoras à biota aquática e gerar múltiplas alterações não apenas ao indivíduo, como em populações, comunidades e ecossistemas, a depender do grau de contaminação e do tempo de exposição. Desta forma, o uso da avaliação de risco possibilita identificar as concentrações capazes de gerar efeitos sobre os organismos e estimar os riscos causados por esses biocidas a partir das etapas deste estudo. No presente estudo, a avaliação preliminar de risco é baseada na etapa da análise de toxicidade do biocida antiincrustante de segunda geração, tributilestanho – TBT, e dos biocidas antivegetativos de terceira geração (fouling booster), clorotalonil e diclofluanida, sobre biomarcadores histopatológicos e comportamentais nas espécies sentinelas *Poecilia vivipara* e *Danio rerio*.

Figura 3 – Paradigmas da avaliação de risco.



Fonte: Zhou, (2019).

2.4 BIOMARCADORES COMO FERRAMENTAS PARA AVALIAÇÃO DE TOXICIDADE EM ANÁLISE DE RISCO

A incorporação de biomarcadores, ou medidas de toxicidade, em abordagens integradas, investigando exposição e efeito em múltiplos níveis de organização, tem sido sugerida em ensaios ecotoxicológicos com organismos aquáticos. O objetivo dessa análise é refletir a interação entre um contaminante com um sítio de ação biológico que pode ser tanto genes dentro de uma célula, como um conjunto de células ou tecido, por exemplo, ou ainda respostas fisiológicas e comportamentais (van der Oost et al., 2003; Souza and Carvalho, 2013). O termo “biomarcador” costuma ser usado em um sentido amplo para medidas de toxicidade em diferentes níveis de organização biológica e recebeu diversas definições ao longo do tempo, inclusive a de mudança em uma resposta biológica (moleculares, celulares, fisiológicas) que interage de forma sistêmica nos indivíduos e que, por diversas vezes, se estendem a populações e comunidades (van der Oost et al., 2003). Os biomarcadores podem ainda ser caracterizados como de exposição, efeito ou de suscetibilidade (Monserrat et al., 2007), sendo quantificáveis, sensíveis e específicos quanto ao tipo de análise e as reais condições de saúde do organismo, detectando precocemente os efeitos adversos, após uma exposição ao xenobiótico (van der Oost et al., 2003). Essa atribuição sintetiza o estudo das respostas biológicas aos contaminantes, e pressupõe o conceito de vigilância biológica, que tem a finalidade de sinalizar precocemente possíveis efeitos deletérios capazes de comprometer a manutenção de funções vitais desde o indivíduo até populações (Magalhães and Filho, 2008; Amiard-Triquet, 2013) (Figura 4).

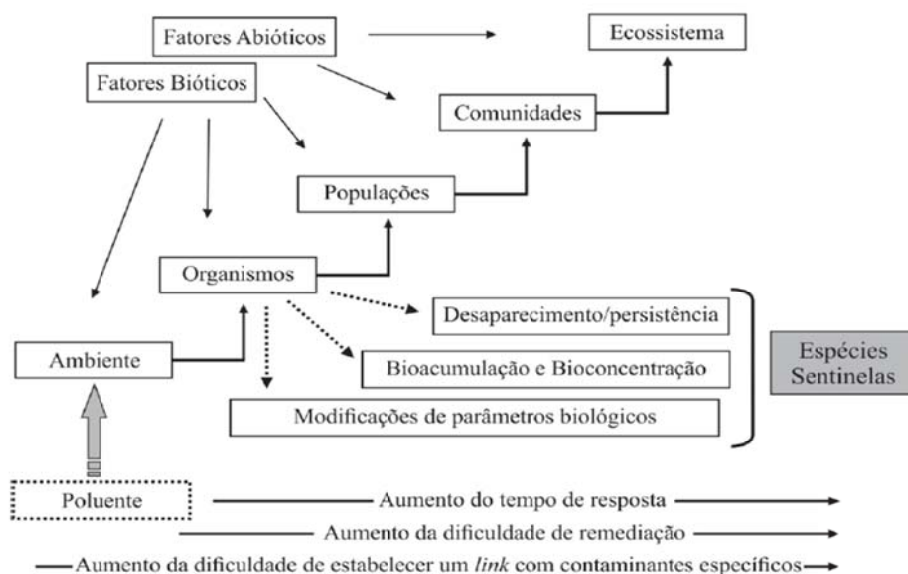
2.4.1 Histologia

O uso de análises histopatológicas de órgãos frequentemente alvo de contaminantes é reconhecido como um biomarcador eficaz em estudos e diagnósticos de doenças agudas e crônicas. É muito empregado para estabelecer uma correlação clínico-patológica entre as respostas morfológicas e a toxicidade de contaminantes (Wolf and Wolfe, 2005; Hübscher, 2015), uma vez que é sensível e possibilita a detecção de efeitos desencadeados pela exposição. É portanto, um método preditivo à poluição e pode ser utilizado na avaliação do potencial risco para a sobrevivência da espécie, bem como para a proteção ambiental (Gaber et al., 2014). Sua aplicação ajuda a elucidar a relação causa-efeito ou concentração-efeito na avaliação de risco à saúde dos organismos, incluindo àqueles relacionados a reguladores

endócrinos (REs), devido à sensibilidade aos poluentes e por poder expressar condições ambientais em relação ao tempo de exposição de cada organismo (toxicidade aguda/crônica) (Schmalz et al., 2002).

A especificidade da resposta histopatológica foi amplamente discutida em peixes por Costa et al, (2018) que sugere o caráter de especificidade desse biomarcador, relacionado ao conjunto de alterações que podem representar o efeito tóxico de um contaminante e não ao desenvolvimento de um tipo específico de lesão. Isto pode ser notado na lipotoxicidade hepática, esteatose, identificada em zebrafish *Danio rerio*, (Zhang et al., 2016a; Zhang., 2016; Ouadah-Boussof et al., 2016; Heindel, 2017) e em outros peixes após exposição ao TBT (Grun., 2014; Meador et al., 2011), e ao desenvolvimento de neoplasias, após exposição a Hidrocarbonetos aromáticos policíclicos – HPAs, Bifenilas policloradas (PCBs), Clordano, Dieldrin e DDT (Bernet., 1999; Wolf and Wolfe, 2005). Entretanto, o grande desafio desse tipo de análise é estabelecer escores de avaliação para cada tipo de órgão analisado que possibilitem uma avaliação comparativa quantitativa.

Figura 4 – Respostas dos organismos a um poluente em diferentes níveis de organização biológica.



Fonte: Berthet, (2012).

O fígado é um órgão com múltiplas funções. Nele ocorrem muitas reações como de biotransformação metabólica e armazenamento de energia, digestão de alimentos (via síntese de bile), síntese de proteínas como vitelogenina (VTG) e hormônios que incluem insulina entre outros (Wolf and Wheeler, 2018). A ocorrência e distribuição da lesão no fígado, após

exposição tóxica, tende a ser aleatória e sem um padrão definido, provavelmente devido à distribuição homogênea de enzimas de biotransformação no parênquima hepático de peixes (Wolf and Wolfe, 2005). Situações graves podem ocorrer, no entanto, conduzindo a uma maior severidade das lesões próximas a vasos e ductos (Wolf and Wolfe, 2005; Wolf and Wheeler, 2018), como por exemplo, fibrose hepática por reações ductulares (Clouston et al., 2005). Alterações ductulares foram encontradas em medaka como resposta à exposição a compostos tóxicos (Boorman et al., 1997). Outra resposta comumente identificada no fígado de peixes expostos a compostos tóxicos é a necrose dos hepatócitos, que pode ser de diferentes tipos (Hilton, 2001), e a redução de reservas energéticas nos hepatócito (Wolf and Wolfe, 2005) ou o acúmulo de lipídios em vacúolos conduzindo a esteatose (Hilton, 2001; Costa et al., 2018; Wolf and Wheeler, 2018).

O pâncreas também é um órgão com função mista (endócrina e exócrina), atuando tanto na secreção de hormônios (insulina e glucagon) que regulam os níveis de glicose, quanto na síntese de enzimas para o suco pancreático usado na digestão intestinal (Haschek, 2010). Em algumas espécies de peixes, as células do pâncreas estão localizadas em torno de ductos e vasos sanguíneos do tecido hepático como, por exemplo, nas tilápias (*Oreochromis niloticus*), linguados (*Paralichthys olivaceus*) e barrigudinhos (*Poecilia vivipara*). Em condições de exposição a poluentes essas células podem se multiplicar para regeneração do tecido (Haschek, 2010), ou desenvolver lesões de ordem inflamatórias e não inflamatórias que podem facilmente se estender ao parênquima hepático adjacente, promovendo alterações nesse tecido (Wolf and Wolfe, 2005).

Os peixes têm um mecanismo de ciclagem entero-hepática (Gingerich, 1982) para o processamento de substâncias que não foram metabolizadas durante a primeira passagem pelo fígado e esse mecanismo pode prolongar a remoção de certos compostos no fígado e no intestino (Wolf e Wolfe, 2005). Dessa forma o intestino também é um alvo direto da toxicidade de compostos químicos e, portanto, também deve ser estudado em exames histopatológicos sobre toxicidade de compostos tóxicos.

O intestino é um órgão onde ocorre reciclagem de enzimas e macronutrientes, absorção de sais biliares e excreção de resíduos metabólitos. As alterações desenvolvidas nesse órgão, após a exposição às substâncias químicas, não são apenas estruturais, mas também funcionais, podendo influenciar a viabilidade das células epiteliais da mucosa na absorção de nutrientes e afetar o estado nutricional do animal (Haschek., 2010; Palas et al., 2016). Como as células epiteliais intestinais são responsáveis pela reabsorção de carboidratos

simples, aminoácidos e de alguns xenobióticos, bem como a metabolização e transporte dos compostos absorvidas para os capilares da lâmina própria (Haschek., 2010), respostas tóxicas inflamatórias, necróticas e degenerativas nesses tecidos podem ser frequentemente encontradas, levando à redução da capacidade de retenção de nutrientes e à perda do órgão (Bernet et al., 1999; Costa et al., 2018). Estudos sobre poluição com peixes mostram necroses, inflamação e pequenas lacerações nas extremidades das vilosidades intestinais de trutas-arco-íris *Oncorhynchus mykiss* exposta ao antibiótico metronidazol (Gurcu et al., 2016), necrose e processo inflamatório em trutas *Salmo trutta* de ambiente poluído (Barišić., 2018), e hiperplasias de células caliciformes, com produção excessiva de muco e atrofia das vilosidades em paulistinha *D. rerio* exposto ao nitrato (Pereira et al., 2017).

Outro órgão alvo da toxicidade de compostos químicos no meio aquático são os olhos. A função sensorial desse órgão, na percepção de estímulos e formação das imagens, está diretamente relacionada às atividades vitais dos peixes, como identificação do ambiente, do alimento e de possíveis predadores (Scott and Sloman, 2004). A maioria dos peixes depende da visão para a percepção de alimentos e no estágio de transição de alimentação endógena para exógena durante os estágios iniciais da vida essa dependência torna-se ainda maior (Gerking, 1994), desta forma, o desenvolvimento adequado da estrutura do sistema visual e o estabelecimento da visão funcional são essenciais para a sobrevivência, o crescimento e o recrutamento bem-sucedido de populações de peixes (Carvalho and Tillitt, 2005). Em peixes expostos aos poluentes, respostas nos estímulos visuais podem ser interrompidas por efeito de toxicidade, interferindo, por exemplo, na captura de presas e na fuga aos predadores (Scott and Sloman, 2004). Nessas condições de exposição, uma grande área superficial dos olhos fica em contato com o poluente e passível de desenvolver alterações estruturais e fisiológicas, inclusive nas células fotorreceptoras da retina sensíveis à luz e aos estímulos visuais. Exposição de larvas de tainha *Chelon auratus* ao metilmercúrio MeHg, por exemplo, mostrou que esta forma de metal se acumula preferencialmente na camada externa da lente, podendo desenvolver, por exemplo, anormalidades oculares como catarata e opacidade. Alterações histopatológicas em olhos de *Phoxinus phoxinus* e do *guppies* *Poecilia reticulata* expostos ao antiicrustante TBT também mostraram uma opacidade na lente como provável causa de queratite e degenerações na retina (Wester and Canton, 1987; Fent, 1992).

2.4.2 Comportamento

Os biomarcadores comportamentais em peixes são medidas que, em geral refletem informações integradas de neurotoxicidade, reações bioquímicas e fisiológicas relacionadas à contaminação desses organismos (Souza and Carvalho, 2013; Carvalho et al., 2014). São medidas sensíveis, não invasivas e amplamente aplicáveis aos estudos sobre neurotoxicidade do comportamento locomotor em peixes (Little and Finger, 1990), revelando respostas específicas sobre o padrão de locomoção de organismos afetados por um contaminante ou a combinações destes (Weis and Candemlo, 2012). Alguns exemplos de alterações comportamentais em peixes, relacionadas à poluição, são conhecidos, dentre eles estão o movimento “C start”, identificado em indivíduos que desenvolvem uma hipersensibilização na linha lateral após exposição ao contaminante (Sloman and McNeil, 2012), como verificado em trutas após exposição ao DDT (Carvalho et al., 2013), e o comportamento tigmotático desencadeados por contaminantes que afetam o sistema nervoso central e conduz à ansiedade, como identificado em paulistinha *D. rerio*, exposto à atrazina (Schmidelet al., 2014).

Alterações no comportamento natatório podem comprometer diretamente outros comportamentos vitais, como a busca de recursos e as respostas de fuga e predação (Baatrup and Bayley, 1998). Estas alterações podem estar relacionadas a lesões nos órgãos sensoriais como olhos, olfato e linha lateral, que são utilizados no reconhecimento do ambiente (Sloman and McNeil, 2012). Dessa forma, as medidas comportamentais fornecem respostas que integram efeitos estruturais e mecanismos fisiológicos a alterações ecologicamente relevantes, mostrando como os organismos interpretam e respondem ao seu ambiente (Scott and Sloman, 2004).

2.5 ESPÉCIES SENTINELAS

Organismos bioindicadores capazes de revelar precocemente a presença de alterações ambientais, bem como a toxicidade de compostos químicos no ambiente podem ser considerados espécies sentinelas (Berthet et al., 2012). Após a introdução de um poluente em um ambiente aquático, estes organismos residentes revelam a toxicidade local desenvolvendo efeitos, que podem variar de uma bioacumulação em tecidos e órgãos específicos a alterações nos parâmetros biológicos em vários níveis de organização biológica (molecular, celular, fisiológica, comportamental, reprodutiva e sobrevivência). Uma vez identificados os efeitos

nesses organismos sensíveis torna-se necessário o diagnóstico ou remediação da poluição, para que outros níveis de organização biológica não sejam afetados e potenciais perturbações não se propaguem para outros níveis, como o populacional, o de comunidade, e em última análise, do ecossistema (Bayne et al., 1985; Berthet et al., 2012).

A escolha de uma espécie sentinela deve considerar aspectos como facilidade para coleta e manutenção em laboratório e, principalmente, aspectos relevantes em termos ecológicos (Berthet et al., 2012). Peixes têm sido considerados como bons organismos sentinelas para avaliação de toxicidade de diversos poluentes, pois são capazes de desenvolver efeitos em diversos níveis de organização biológica (Santos et al., 2011). São organismos abundantes no ambiente aquático e possuem plasticidade a variações ambientais, fatos que facilitam sua manutenção em sistemas de cativeiros e possibilitam o seu uso como modelos para avaliações de adaptação morfológica, comportamental, história de vida (Gomes Jr and Monteiro, 2008) e avaliação de toxicidade. Dentre as espécies que compõem este grupo de sentinelas estão os barrigudinhos, como a *Poecilia vivipara* e o paulistinha *Danio rerio*.

P. vivipara apresenta características favoráveis à sua utilização, pois possui sensibilidade reconhecida em laboratório a diversos contaminantes ambientais (Bila et al., 2005; Harayashiki et al., 2013; Machado et al., 2014; Torreiro-Melo et al., 2015), e em condições de exposição a poluentes desenvolvem anormalidades estruturais, morfológicas, comportamentais e reprodutivas. Alguns estudos demonstraram que os *guppies* são muito úteis em avaliações de carcinogenicidade (Hawkins et al., 1988). Em geral, essas características intrínsecas tornam o *guppy* propenso a diversos usos (inclusive em estudo dos órgãos), numa perspectiva ainda pouco avaliada na espécie. Esses fatos provavelmente favoreceram a sua viabilização para estudos de exposição *in situ* pelo Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia - Toxicologia Aquática em 2014, tornando-se um modelo eminente e promissor para ser usado em avaliações de risco em ecossistemas costeiros tropicais e subtropicais. Entretanto, poucos estudos exploram esse assunto através de avaliação histopatológica em estágios iniciais de vida. Este trabalho pretende ser mais uma contribuição para a identificação das alterações estruturais de órgãos dessa espécie em estágio inicial de vida, expostos aos biocidas abordados nesse estudo (TBT, clorotalonil e diclofluanida).

Danio rerio também é uma espécie que tem sido muito utilizada, pois possui sua sensibilidade reconhecida em diferentes estudos com múltiplos compostos. Além disso, esta espécie possui estágios iniciais de vida (ovo e larva) transparentes que favorecem o estudo de

embriões e larvas em ensaios ecotoxicológicos e toxicológicos. Essa espécie demonstrou ser um bom modelo para estudos de embriotoxicidade, pois são muito suscetíveis a compostos tóxicos nesses estágios de vida, apresenta uma fase larval relativamente curta, fato crucial em estudos de monitoramento, tem seu genoma todo mapeado e também já é muito utilizada como espécie modelo em estudos toxicológicos humanos devido a semelhanças na rede de genes desta espécie com os de mamíferos (Asnani and Peterson, 2014), e em estudos pré-clínico para avaliação de eficácia da toxicidade de uso de drogas (Hermsen and Piersma, 2014; Roper and Tanguay, 2018).

2.6 ESTÁGIOS INICIAIS DE VIDA DE PEIXES

Os estágios iniciais de vida dos peixes (embrião/larva/juvenil) correspondem aos menores vertebrados de vida livre no ambiente aquático e são extremamente sensíveis a variações ambientais (Osse and van den Boogaart, 1995; Ramos et al., 2012). Nessas fases ocorrem poucas variações nos caracteres intrínsecos do ovo e na morfologia do embrião e larva dentro de uma mesma espécie. O tempo de desenvolvimento dos estágios é específico para cada espécie e costuma ser altamente dependente da temperatura (Kendall et al 1954; Sale, 2002). De forma geral, a transição da fase embrionária para a larval é marcada pela eclosão do ovo e absorção vitelínica, e da fase larval para a juvenil pela completa formação da nadadeira caudal (Osse and van den Boogaart, 1995; Sale, 2002). A fase juvenil pode ser prolongada ou não, dependendo muito da espécie. A compreensão dessas fases é muito útil para caracterização ontogenética de uma espécie (Kendall et al 1954) e para estimativa da degradação de habitat (Courrat et al., 2009), como os causados pela poluição de derrames de petróleo por exemplo (Mora et al., 2015), uma vez que são muito sensíveis e suscetíveis às mudanças ambientais (Ramos et al., 2012).

Embora geralmente ocorra uma enorme desova ou liberação de ninhada (vivíparos) em ambientes aquáticos, nestas fases os indivíduos sofrem intensas pressões seletivas do próprio ambiente natural, que influenciam substancialmente o seu desenvolvimento e podem inclusive, reduzir discrepantemente o tamanho da população de peixes que atingirá a fase de recrutas (Osse and van den Boogaart, 1995). A mortalidade, por características individuais ou por densidade, ou a competição, a predação e às influências de temperatura sobre o crescimento larval são exemplos de fatores ambientais (Mora, 2015).

Desta forma, o desenvolvimento de efeitos teratogênicos causados pela exposição à poluentes, por exemplo, podem intensificar ainda mais a redução de indivíduos em estágios

iniciais de vida que atingiriam a fase de recrutamento. Estudos ecotoxicológicos com esses sensíveis organismos modelos podem desta forma, fornecer um alerta precoce de potenciais mudanças causadas por poluentes e contribuir para a identificação de possíveis alterações causadas por esses compostos potencialmente capazes de reduzir as chances de o peixe exposto recrutar para a população adulta.

2.6.1 Estágio inicial de vida de *Poecilia vivipara*

Vivíparos da família Poeciliidae são um dos quatro grupos desta família que possuem fertilização interna (Wourms, 1981) e dão à luz a filhotes completamente formados e “hápitos para desenvolver as atividades vitais” (Evans and Pilastro, 2011). *Poecilia vivipara* (Bloch and Schneider, 1801), popularmente conhecidos como *guppies*, “guarus” ou “barrigudinhos”, são peixes eurialinos, originários do continente americano, apresentam ampla distribuição geográfica e estão presentes em todo o litoral brasileiro, inclusive na região costeira de Pernambuco (Fisher, 2004). Podem ser encontrados em uma variedade de habitats aquáticos, desde lagoas e lagos a rios e estuários, devido a sua capacidade adaptativa a diferentes condições ambientais (Araújo et al., 2014) e de salinidade (0 a 20 de salinidade) (Rocha et al., 2010). Geralmente são pequenos e possuem uma média de tamanho de 4-5 cm de comprimento (Rocha et al., 2010), com presença de dimorfismo sexual e fertilização interna através do gonopódio (Thibault and Schultz, 1978).

Inicialmente, essa espécie foi classificada como vivípara devido à reprodução por fertilização interna e por possuírem desenvolvimento embrionário interno, ocorrendo dentro do sistema reprodutor da fêmea (Wourms et al., 1988). Este tipo de fertilização é possível porque os machos possuem uma nadadeira anal modificada em órgão copulador, o gonopódio, o qual os permitem introduzir espermatozoides no gonoduto das fêmeas (Evans and Pilastro, 2011). Entretanto, foi sugerida uma reclassificação na viviparidade desta espécie para ovoviviparidade, pois apesar de os embriões se desenvolverem dentro do corpo materno, o tipo de suporte nutricional não ocorre por origem exclusivamente materna, através de uma placenta, sendo nutridos principalmente pelas reservas de glicogênio, glicoconjugados e lipídios do seu próprio vitelo até o nascimento (Rocha et al., 2010).

2.6.1.1 Gestação de *Poecilia vivipara*

A gestação que ocorre em fêmeas de *P. vivipara* é do tipo folicular e consiste no desenvolvimento da ninhada dentro do folículo ovariano, em organização cordonal, até que as

larvas se formem completamente. Após essa fase, por contração dos músculos ventrais da mãe os indivíduos são expelidos do lúmen ovariano no momento do nascimento e atingem o estágio de natação livre em ambiente externo (Rocha et al., 2010; Arcanjo et al., 2014). Esse estágio pós-nascimento é descrito por alguns autores como recém-nascidos ou alevinos, pois os indivíduos já nascem completamente formados, inclusive as nadadeiras (Rocha et al., 2010; Arcanjo et al., 2014). Esse tipo de gestação é característico nas espécies de Poeciliidae, mas não é exclusivo desta família, podendo também ser verificado em Clinidae, Labrisomidae e Hemiramphidae (Schindler and Hamlett, 1993).

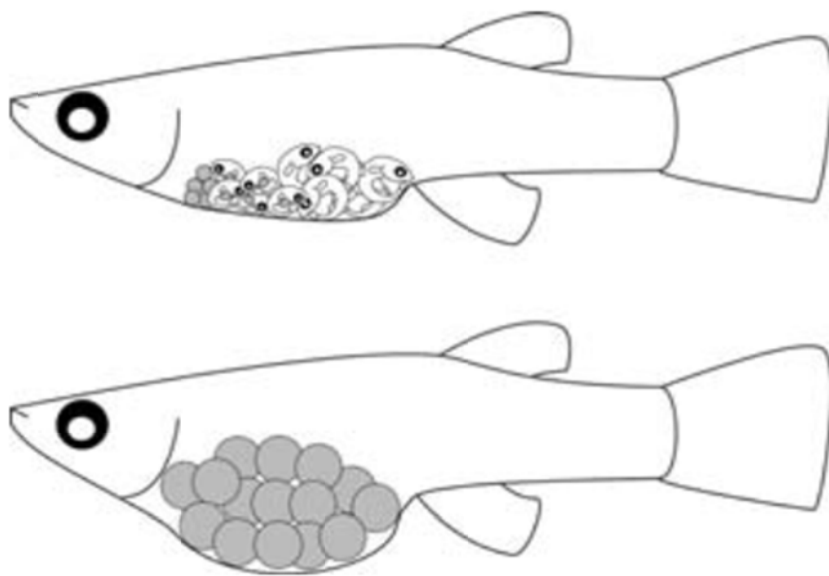
O período de incubação dos embriões no folículo ovariano de fêmeas grávidas de *guppies* tem uma duração média de 20 a 30 dias (Turner, 1937; Reznick et al., 1996; Evans and Pilastro, 2011), podendo variar de acordo com o tamanho e idade da progenitora (Wourms et al., 1988), da alimentação, temperatura da água, fotoperíodo e risco de predação (Evans et al., 2007; Evans and Pilastro, 2011). Uma vez que a fêmea atinge a maturidade sexual, ela pode produzir ninhadas em intervalos regulares de 25 a 30 dias. Esse intervalo é maior em condições ambientais, que em condições de cultivo em laboratório (Turner, 1937). Essa rápida fase gestacional pode estar relacionada ao armazenamento de espermatozoides viáveis nos ovidutos, por pelo menos 10 meses (Wourms et al., 1988; Evans and Pilastro, 2011), além disso, a fertilização assincrônica (Arcanjo et al., 2014) ou superfetação das fêmeas de *P. vivipara* pode contribuir para esse intervalo gestacional relativamente rápido (Figura 5). A condição de superfetação ainda não está bem estabelecida para essa espécie, mas sugerem que podem ocorrer em condições favoráveis de luminosidade e alimentação (Scrimshaw, 1944; Wourms et al., 1988). Essas vantagens possibilitam que fertilizações ocorram com frequência e que, constantemente, haja embriões em processo de desenvolvimento nos ovidutos.

Geralmente, cada fêmea grávida pode parir de 12 a 40 filhotes por gestação, havendo uma variação na taxa de fecundidade em relação ao tamanho e idade da mãe, e em condições laboratoriais (Laboratório de Ecotoxicologia Aquática da Universidade Federal de Pernambuco - UFPE) já foi verificado o nascimento de 82 filhotes originados de uma única fêmea (Comunicação pessoal de Driele Ventura de Paulo em maio de 2018, informações obtidas do Laboratório de Ecotoxicologia Aquática-UFPE/PE). Estudos reportam que o tamanho da ninhada de *guppies* é influenciado, em parte, pelas condições alimentares da

progenitora durante os períodos gestacionais, no qual uma alta disponibilidade alimentar pode vir a aumentar o número de descendentes na ninhada (Reznick et al., 1996).

Após a fertilização, os embriões de *P. vivipara* ficam imersos em uma substância amorfa rica em glicoproteínas dentro dos folículos ovarianos (Rocha et al., 2010; Arcanjo et al., 2014). Durante a fase embrio-larval os indivíduos usam as reservas de energia contidas no saco vitelínico como fonte nutricional e à medida que o desenvolvimento acontece, essas reservas são consumidas progressivamente. Antes do nascimento, ainda há um estoque remanescente desse vitelo no corpo das larvas próximo ao fígado e intestinos, que lhes permitirá sobreviver por um período de no máximo 24 horas, sem precisar encontrar comida imediatamente após o parto (Rocha et al., 2010).

Figura 5 – Fêmea de *guppy*: porção superior: indicando superfetação acoplada à placentotrofia com uma menor disponibilidade de recursos para os embriões e na porção inferior fêmea indicando lecitotrofia com alocação de recursos para a prole antes da fertilização.



Fonte: Evans and Pilastro, (2011).

2.6.1.2 Marcos morfológicos de *Poecilia vivipara*

Aspectos morfofuncionais estão intimamente relacionados aos processos ontogenéticos e permitem estudar as diferentes fases do desenvolvimento embrionário de peixes, seguindo-os até a fase adulta.

As avaliações do desenvolvimento morfológico de *P. vivipara* ainda não estão padronizadas e ainda há divergências quanto à classificação de estágios iniciais oócito ou embrião (Tabela 1), embora os estudos levem em consideração as características morfológicas que conduzem até a essa fase. As fases embrionária e larval de *P. vivipara* ocorrem em cavidade uterina, sendo necessária a eutanásia da progenitora para retirada de embriões para análise (Rocha et al., 2010; Arcanjo et al., 2014).

Aspectos morfofuncionais estão intimamente relacionados aos processos ontogenéticos e permitem estudar as diferentes fases do desenvolvimento embrionário de peixes, seguindo-os até a fase adulta. As avaliações do desenvolvimento morfológico de *P. vivipara* ainda não estão padronizadas e ainda há divergências quanto à numeração das categorias de classificação de estágios iniciais de desenvolvimento nas diferentes literaturas especializadas (Tabela 1) (Rocha et al., 2010; Arcanjo et al., 2014). Esses estudos levam em consideração as características morfológicas que conduzem a cada fase embrionária e larval de *P. vivipara* e, como ocorrem em cavidade uterina, é necessária a eutanásia da progenitora para retirada de embriões e análise dos marcos de desenvolvimento morfológico.

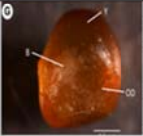
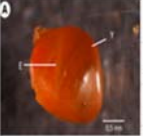
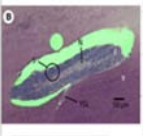
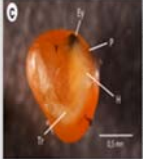
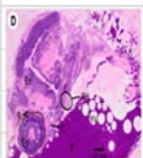
Os filhotes de *P. vivipara* já nascem formados, com os órgãos e sistemas funcionais (Figura 6), abertura da cavidade bucal, a absorção do saco vitelino e nadadeiras desenvolvidas, com habilidade para natação livre e forrageio logo após o nascimento (Tabela 1) (Rocha et al., 2010; Arcanjo et al., 2014). Essas características tornam-se favoráveis a utilização desses organismos em ensaios de toxicidade, pois viabilizam estudos exploratórios da sua sensibilidade a diferentes poluentes ou condições ambientais, além de possibilitar a avaliação de efeitos em órgãos específicos ou no comportamento exploratório no ambiente, já que todas as estruturas foram completamente formadas antes do nascimento, inclusive as nadadeiras, e possuem natação livre logo após o nascimento. Além disso, as altas taxas de natalidade de uma única fêmea a cada ninhada, também favorecem a sua utilização.

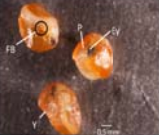
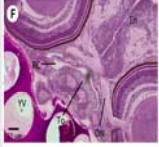
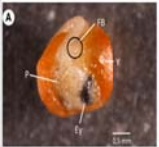
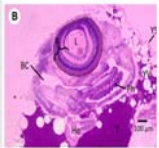
Figura 6 – Órgãos da cavidade abdominal (fígado, intestino, vesícula biliar, pâncreas e bexiga natatória) de *Poecilia vivipara* dias pós-nascimento.



Fonte: Driele Ventura de Paulo.

Tabela 1 – Classificação dos estágios iniciais do desenvolvimento morfológico de *Poecilia vivipara*, segundo a caracterização de Rocha et al, (2010) e Arcanjo et al, (2014). Fonte: Rocha et al., (2010) e Arcanjo et al., (2014).

Estágio de vida	Ilustração do Estágio segundo o autor	Descrição das características do estágio	Autor
IV Embrião		Ovo fertilizado	(Arcanjo et al., 2014)
		O embrião possui células binucleadas, indicando alta atividade mitótica e intensa segmentação	(Arcanjo et al., 2014)
		O epitélio folicular é escamoso e mais distante do ovo	(Arcanjo et al., 2014)
IV Larval sem natação		Corpo definido assumindo uma forma longa e cilíndrica	Rocha et al., 2010
		Olhos bem formados	Rocha et al., 2010
		Presença de raios branquiais e o epitélio da faringe	Rocha et al., 2010
		Presença de grande quantidade de pigmento na região craniana	Rocha et al., 2010
		Presença de um saco vitelino grande e posicionado externamente na região ventral	Rocha et al., 2010
		Sistema nervoso central visível com finas estruturas na região dorsal	Rocha et al., 2010
V Embrião	 	O embrião é visível como uma fina linha branca na periferia do óvulo	(Arcanjo et al., 2014)
		Redução na quantidade de gotículas de lipídios	(Arcanjo et al., 2014)
		O embrião é alongado e situado no pólo do ovo	(Arcanjo et al., 2014)
		Fomção dos sonitos na região da cauda a partir de células mesodérmicas	(Arcanjo et al., 2014)
		A formação de notocorda começa na porção mediana do embrião	(Arcanjo et al., 2014)
		O embrião está conectado ao saco vitelínico cheio de nutrientes	(Arcanjo et al., 2014)
V Larval sem natação		O epitélio folicular não foi observado	(Arcanjo et al., 2014)
		Corpo cilíndrico	Rocha et al., 2010
		Olhos bem desenvolvidos	Rocha et al., 2010
		Saco vitelino ainda externo contendo pouca quantidade de vitelo	Rocha et al., 2010
		Pigmentação das regiões craniana, lateral e dorsal evidentes	Rocha et al., 2010
VI Embrião	 	sistema nervoso central em região dorsal completos	Rocha et al., 2010
		Presença de cabeça e tronco ao redor do vitelo camada contínua entre as células embrionárias e o vitelo.	(Arcanjo et al., 2014)
		A cabeça é grande em comparação com o tronco e parece estar submersa em vitelo	(Arcanjo et al., 2014)
		O globo óptico está presente, mas não está completo, o olho rudimentar, sem lente e com as camadas da retina em processo de diferenciação	(Arcanjo et al., 2014)
		A pigmentação corporal aparece, principalmente no topo da cabeça	(Arcanjo et al., 2014)
		Presença de encéfalo, cartilagem, coração rudimentar	(Arcanjo et al., 2014)
		A notocorda é alongada até a cauda	(Arcanjo et al., 2014)
		Os mioblastos (precursores dos músculos) estão presentes na porção da cauda	(Arcanjo et al., 2014)
		Tubo neural inicial visível na porção da cauda em processo de ossificação e formação das vértebras	(Arcanjo et al., 2014)
		Intestino precoce é visível na região da cauda	(Arcanjo et al., 2014)
		Redução do vitelo	(Arcanjo et al., 2014)

VI larva pré-parto		Corpo com forma cilíndrica	Rocha et al., 2010
		Com boca aberta	Rocha et al., 2010
		Saco vitelino pouco visível	Rocha et al., 2010
		Pigmentação em todo o corpo	Rocha et al., 2010
VII Embrião		Ainda tem cabeça maior que tronco	(Arcanjo et al., 2014)
		A pigmentação é pronunciada na cabeça	(Arcanjo et al., 2014)
		Olhos com lentes e algumas camadas de retina, mas sem a formação da camada de pigmento da retina	(Arcanjo et al., 2014)
		O nervo óptico conecta a porção interna dos olhos ao encéfalo, formando o quiasma	(Arcanjo et al., 2014)
		Presença da cavidade bucal, da língua e da cartilagem das brânquial	(Arcanjo et al., 2014)
		Nadadeiras peitorais e caudal são observados	(Arcanjo et al., 2014)
		Redução de vitelo	(Arcanjo et al., 2014)
		A notocorda e o tubo neural evidentes	(Arcanjo et al., 2014)
VII Alevino ou pós-natal ou Recém-nascidos		Epitélio de cobertura é ainda indiferenciado e simples	(Arcanjo et al., 2014)
		Peixes que nadam livremente após o nascimento e são capazes de explorar o ambiente	Rocha et al., 2010
		Presença de um estoque de vitelo localizado próximo ao fígado e intestino que serão consumidos até 24 após o nascimento	Rocha et al., 2010
		Olhos e boca bem estruturados	Rocha et al., 2010
		Presença de estrutura branquial com arcos branquiais e lâminas formados, facilmente visíveis e funcionais.	Rocha et al., 2010
		As células de cloreto, células mucosas	Rocha et al., 2010
VIII Embrião		Vasos sanguíneos e células de tecido conjuntivo estão formados e são facilmente visíveis	Rocha et al., 2010
		Corpo maior e com tronco robusto	(Arcanjo et al., 2014)
		Pigmentação em todo o corpo - atinge a cauda	(Arcanjo et al., 2014)
		Olhos livres e mais desenvolvidos e a retina composta por várias camadas. Ausência da camada de pigmento retiniano	(Arcanjo et al., 2014)
		Presença de encéfalo, brânquias, faringe, intestino e fígado, com o tubo digestivo completo	(Arcanjo et al., 2014)
		Porção caudal com vértebras e notocorda circundadas pelos miômeros	(Arcanjo et al., 2014)
		Vitelo transferido para o embrião por vesículas	(Arcanjo et al., 2014)
VIII Pós-natal		Nadadeiras desenvolvidas	(Arcanjo et al., 2014)
		Nadam e procuram comida - começam a alimentação exógena	Rocha et al., 2010

IX Embrião		Corpo todo pigmentado	(Arcanjo et al., 2014)
		Possui nadadeiras caudal e dorsal, com a caudal flexionada sobre a cabeça	(Arcanjo et al., 2014)
		Presença da camada de pigmento da retina	(Arcanjo et al., 2014)
		Presença da porção da cauda, a medula espinhal e as vértebras entre os miômeros	(Arcanjo et al., 2014)
		Presença de brânquias, coração, faringe, intestino completo, fígado, pâncreas difuso, rim e bexiga urinária formados	(Arcanjo et al., 2014)
		Nadadeiras com raios ossificados	(Arcanjo et al., 2014)
		Vitelo reduzido e ligado à porção mediana do embrião	(Arcanjo et al., 2014)
X Embrião		A cauda ainda está flexionada sobre a cabeça	(Arcanjo et al., 2014)
		Todas as nadadeiras presentes, o opérculo, a gema quase totalmente absorvida	(Arcanjo et al., 2014)
		A pigmentação do corpo é intensa	(Arcanjo et al., 2014)
		O vitelo foi quase totalmente absorvido	(Arcanjo et al., 2014)
		O encéfalo e os olhos estão completos e ocupam dois terços da cabeça	(Arcanjo et al., 2014)
		Presença de notocorda e medula espinhal na porção da cauda, circundados por vértebras	(Arcanjo et al., 2014)
		Presença de Intestino, fígado, rim, brânquias, miômeros bem definido enadadeiras com raios	(Arcanjo et al., 2014)
		Presença de epitélio escamoso	(Arcanjo et al., 2014)
		Vitelo pequeno e irregular	(Arcanjo et al., 2014)

2.6.2 Estágios iniciais de vida de *Danio rerio*

Danio rerio (Hamilton, 1822), conhecido como paulistinha ou *zebrafish*, é um peixe teleosteo de água doce, pertencente à família Cyprinidae. São originários da Ásia, da região da Índia, Bangladesh e Nepal (Spence et al., 2008; Ribas and Piferrer, 2014), mas possuem ampla distribuição geográfica. É uma espécie ovípara e o desenvolvimento dos embriões ocorre externamente, não sendo necessária a eutanásia da progenitora para retirada de embriões (Lele and Krone 1996). Durante a fase embrião-larva desses peixes, as características do desenvolvimento morfológico são facilmente identificáveis e já possuem tempo de ocorrência muito bem estabelecido. Os ovos e embriões de *D. rerio* são transparentes, o que facilita a classificação e monitoramento de cada fase. Além disso, a facilidade para cultivo, a capacidade de gerar prole com grande número de descendentes (aproximadamente 200 ovos fêmea / dia⁻¹) (Lele and Krone, 1996) e a disponibilidade de seu genoma totalmente sequenciado (Howe et al., 2013) fizeram dos estágios iniciais do *Danio rerio* um modelo poderoso para avaliar a toxicidade de contaminantes na Ecotoxicologia (Scholz et al., 2008; Embry; et al., 2010). Ensaio de embriotoxicidade são alguns dos testes

ecotoxicológicos muito realizados em paulistinha (ZET) para avaliar parâmetros letais e subletais do desenvolvimento morfológico desses indivíduos, ao longo de uma série de marcos de desenvolvimento durante os estágios de embrião-larva, juntamente com outras medidas relevantes de teratogenicidade (Figura 7).

Abordagens que incluem avaliações do período de organogênese de *D. rerio* durante as 96 horas após fertilização (hpf) é bem caracterizado, iniciando entre 18 e 24 hpf e finalizando em 96 hpf (Roper and Tanguay 2018). Entretanto, neste intervalo os órgãos desses indivíduos ainda não estão completamente formados, sendo necessários mais estudos exploratórios.

Figura 7 – Estágios do desenvolvimento morfológico de *Danio rerio*.

Hpf	12	24	48	72
Detachment of tail	 0			
Somite formation	18hpf 1 No = 0	2 Yes = 1	3 Yes = 1	3 Yes = 1
Eye development	 1	 2	 2 + 1 for pigment	 2 + 1 for pigment
Movement	No = 0	Yes = 1	Yes = 1	Yes = 1
Heartbeat	No = 0	Yes = 1	Yes = 1	Yes = 1
Blood circulation	No = 0	No = 0	Yes = 1	Yes = 1
Pigmentation head-body	 0	 0	 1	 1
Pigmentation tail	 0	 0	 1	 1
Pectoral fin	 0	 0	 0	 1
Protruding mouth	 0	 0	 0	 1
Hatching	No = 0	No = 0	No = 0	Yes = 1
GMS	1	7	12	15

Fonte: Beekhuijzen et al., (2015).

Em decorrência da frequentemente contaminação do ambiente aquático por biocidas e sabendo-se que a legislação brasileira só apresenta regulamentação para o uso do TBT presente em tintas de segunda geração, e ainda não apresenta regulamentação para a utilização dos biocidas antiincrustantes Clorotalonil e Diclofluanida presentes em tintas de terceira geração, torna-se necessário o desenvolvimento de estudos mais aprofundados sobre os efeitos gerados por esses biocidas sobre os organismos não alvos, uma vez que a utilização de tintas antiincrustantes tem sido apontada como impactantes para o ambiente aquático, devido aos efeitos tóxicos causados em organismos aquáticos não-alvo. A exploração de informações referentes a eficiências destes biocidas, juntamente com a avaliação integrada de respostas histopatológicas e comportamentais em sensíveis estágios iniciais de vida peixes, e os riscos ambientais decorrentes de seu uso, forneceram dados inéditos e úteis, e que deverão ser levados em conta no momento da escolha do produto utilizado pelo estaleiro ou pelo proprietário da embarcação, garantindo assim economia, eficiência e proteção ambiental. Além disso, essas informações também são relevantes para as tomadas de decisões em relação ao risco, gerenciamento de risco do uso de tintas antiincrustantes. Neste contexto, a presente tese teve como objetivo avaliar a toxicidade de tintas antiincrustantes no nível histológico e comportamental em estágio inicial de vida de peixes das espécies *Poecilia vivipara* e *Danio rerio* a partir de estratégias de exposição em laboratório.

ARTIGO 1

HISTOLOGICAL AND BEHAVIORAL TOXICITY OF TRIBUTYLTIN IN THE TROPICAL GUPPY *Poecilia vivipara*

ABSTRACT

Poecilia vivipara was used to address tropical fish early life stage toxicity caused by the antifouling contaminant tributyltin (TBT). Newborn *Poecilia vivipara* at six days after birth were exposed for 96 h to control water and waterborne TBT at 0.01; 0.1; 1.0; 4.5; 7.0 and 9.0 $\mu\text{g TBT L}^{-1}$. After exposure, swimming speeds and trajectories of the fish, counter-current swimming resistance, ability to capture *Artemia* sp. nauplii, growth in weight and length, and histology of the eyes and retina were evaluated seven days. Histopathological analysis of the retinal pigmentar epithelium (RPE) indicated alterations in pigment retinomotor movements in TBT exposed fish at all concentrations. A dose dependent increase in photoreceptor layer disorganization was observed starting at 0.01 $\mu\text{g TBT L}^{-1}$, and high frequencies of RPE invaginations and iris epithelial cell atrophy were observed at the lowest exposure concentrations. A concentration dependent increase in iris melanin hyperpigmentation was found associated with an external darkening of the eyes, possibly due to this hyperpigmentation detected in the iris. The histopathological changes detected in the retina and iris at lower TBT concentrations were not associated with behavioral alterations. At 7.0 $\mu\text{g TBT L}^{-1}$ eye and retinal pathologies were associated with reductions in swimming speed, swimming resistance, daily capture of *Artemia* sp. nauplii and growth in weight by 85%, 60%, 33.6% and 56% relative to controls, respectively, suggesting that visual prey detection and capture was impaired. These changes can reduce the chances of exposed fish to recruit to the adult population.

Keywords: Antifouling. Fish early life stage. Retina. Behavior. Prey capture. Growth.

Elsevier Editorial System(tm)

Aceito por Journal Environmental Toxicology and Chemistry

Title: Toxicity of tributyltin on the eyes, swimming, feeding and growth of the tropical estuarine guppy *Poecilia vivipara*

First Author: Driele V. de Paulo

Order of Authors: Driele V. de Paulo; Célio F. Mariz Jr.; Maria Karolaine M. Alves; Romulo N. Alves; Paulo Sérgio Martins Carvalho

1 INTRODUCTION

The biocide properties of tributyltin (TBT) used in antifouling paints systems (AFS) to paint boats and other metals structures has contaminated marine and freshwater environments worldwide (Fent, 1996), causing adverse effects in a wide diversity of non-target species, including invertebrates such as oysters and gastropods (Matthiessen and Gibbs, 1998), fish and mammals (Mochida and Fujii, 2009; Schilithz et al., 2013).

TBT is considered an endocrine disruptor, causing masculinization characterized by the development of male sex characteristics (imposex) in almost 200 species of female gastropods (Sternberg et al., 2010). TBT effects on fish reproduction related to sex differentiation, spermatogenesis, oogenesis and sexual behavior have also been described (Mochida and Fujii, 2009).

Recent estimates indicate declining organotin (OT) concentrations and amelioration of imposex endpoints in Europe (Cacciatore et al., 2018; Laranjeiro et al., 2018), although organotins still persist as relevant contaminants due to remobilization from contaminated sediments (Rüdel, 2003), and as a result of ongoing production and sales of OT based paints, especially for distribution in Caribbean and Central America (Turner and Glegg, 2014). In Latin America, there is evidence that leisure and fishing boats are current TBT sources leading to relatively high imposex incidence linked to the occurrence of TBT residues in surface sediments and gastropod tissues (Castro et al., 2018).

Illegal use of TBT in South America is also deemed important. TBT sediment concentrations along the Brazilian Atlantic Coast pointed out significant contamination by this compound with highest OT concentrations close to shipyards, harbors and marinas, correlated with a high incidence of imposex (Castro et al., 2012; Artifon et al., 2016; Maciel et al., 2018).

Historically, TBT concentrations in the range of 0.1 to 0.5 $\mu\text{g TBT L}^{-1}$ were found in pleasure boat harbors in the 1980s, significantly higher than in open surface waters, bays, and estuaries, where values ranging from 1 to 50 ng TBT L⁻¹ were commonly observed (Fent, 1996). However, a wider range of TBT water concentrations from 0.1 to 7.2 $\mu\text{g TBT L}^{-1}$ have been found in harbors and marinas in North America and Europe (Valkirs et al., 1986; Ritsema et al., 1991). Tributyltin concentrations in the South Atlantic Argentine Coastal waters ranged from 0.18 in coastal beaches to 8.0 $\mu\text{g L}^{-1}$ in harbors (Goldberg et al., 2004), and from 0.19 to 4.40 $\mu\text{g TBT L}^{-1}$ in samples collected on the coastal from 2001 to 2007 (De

Waisbaum et al., 2010). Additionally, along the Atlantic Brazilian Coast maximum water TBT concentrations of $0.70 \mu\text{g TBT L}^{-1}$ were detected in the most contaminated estuary of Paranagua Bay (Castro et al., 2012).

TBT accumulates in fish with bioconcentration factors between 500 and 1,000, and partitions to lipid rich tissues. Different modes of toxic action in molecular and biochemical processes can be triggered with a bioaccumulation of this compound, including perturbation of cellular calcium homeostasis, damage of plasma membranes and inhibition of ion pumps and effects on intracellular sulfhydryl-containing proteins, all of which can lead to cytotoxic and histopathological effects (Fent, 1998).

Fish at early stages of life have typically higher sensitivity to contaminants (McKim, 1977) and effects at this stage may compromise the recruitment of these individuals to adulthood and potentially affect their populations. Histopathological or behavioral effects of TBT have been investigated in studies with juvenile or adult fish, but rarely applied together to fish early life stages (Fent, 1998; Berto-Júnior et al., 2018). Adequate vision is essential for survival of early life stages of fishes (Carvalho et al., 2008), and histopathological effects of OTs on the eye and retina have been addressed in a few species. The freshwater minnow *Phoxinus phoxinus* larvae was exposed to 0.8 and $19.5 \mu\text{g TBT L}^{-1}$ and showed concentration-related degenerative changes in the corneal epithelium, lens, retina and pigment layer of the retina and choroid, associated with opacity in the eyes, and reduced mobility with uncoordinated swimming (Fent and Meier, 1992). TBT contamination has shown degenerative effects on different species, causing generic abnormal eye development in larvae of the freshwater medaka *Oryzias latipes* (Hano et al., 2007), reducing swimming speeds in zebrafish *Danio rerio* larvae (Liang et al., 2017), and causing skeletal malformations in larvae of the marine golden fish *Coryphaena hippurus* (Adema-Hannes and Shenker, 2008). Additionally, reductions in growth were detected in larvae of the freshwater fathead minnow *Pimephales promelas* exposed to triphenyltin (Jarvinen et al., 1988).

Integrated approaches based on histological and behavioral endpoints relevant to growth and recruitment are key to understand how toxic effects on important sensory organs and/or on locomotor skills can potentially lead to foraging deficits and reduced growth, or to reduced predator evasion skills, helping us better understand contaminant effects on fish early stages of development (Sloman and McNeil, 2012).

The teleost euryhaline guppy *Poecilia vivipara* is found along the Brazilian coast (Gomes Jr and Monteiro, 2007), and its juvenile and adult stages have become an important

model for tropical estuarine fish ecotoxicology. Endpoints encompassing molecular (Mattos et al., 2010), biochemical (Machado et al., 2014), histological (Paulo et al., 2012) and behavioral effects (Torreiro-Melo et al., 2015) have been measured after exposure to contaminants. There is a lack of standardized tests with early life stages of tropical estuarine fish, and *P. vivipara* reproduction by viviparity facilitates its cultivation in the laboratory, as well as the maintenance of the newborns that are in many aspects similar to juveniles (Arcanjo et al., 2014). Thus, the objective of the present study was to evaluate the lethal and sublethal effects of TBT to *P. vivipara* early stages of development, quantifying the degenerative effects through histological biomarkers in the eye and retina together with behavioral biomarkers related to swimming speed, resistance and trajectory, and also prey capture and growth.

2 MATERIAL AND METHODS

2.1 MAINTENANCE AND REPRODUCTION OF *Poecilia vivipara*

Newborn *Poecilia vivipara* were obtained from a breeding stock kept at the Laboratory of Aquatic Ecotoxicology from Federal University of Pernambuco. Adult *Poecilia vivipara* were kept in 100 L aquaria at salinity 25 and temperature 26 ± 1 °C (mean $\pm$ standard deviation), at a sex ratio of 1 male: 2 females. Breeding adults were fed twice a day with fish food with 40% protein content and live *Artemia* nauplii. Aquarium water was constantly recirculated through a mechanical and biological filtration system. The concentration of total ammonia remained below 0.02 mg L^{-1} . Mean pH was 8.2 ± 0.1 and mean dissolved oxygen was $5.8 \pm 0.4 \text{ mg L}^{-1}$, measured twice a week by a YSI Professional Plus multiparameter probe. Pregnant females, identified by with a dilated abdomen and a dark spot in the posterior region near the genital opening indicating birth proximity were separated in individual aquaria with a volume of 2 L until the birth of the newborns. After birth, the fish were separated and fed daily with an average of 500 nauplii of *Artemia* sp. until the beginning of the experiments, on the sixth day of life, with a total length of $8.9 \pm 0.4 \text{ mm}$ and a total weight of $11.0 \pm 1.9 \text{ mg}$ (mean $\pm$ standard deviation).

2.2 CHEMICALS

A primary stock solution was prepared from the dissolution of 0.1105 g of tributyltin (CAS number 1461-22-9, purity 96 %, Sigma-Aldrich, St Louis, USA) in 50 mL of

dimethylsulfoxide (DMSO) (CAS Number 67-68-5, purity 99 %), yielding a concentration of 2,210 mg TBT L⁻¹. Secondary and tertiary working solutions at the concentrations of 221 mg L⁻¹ and 4.42 mg L⁻¹ were prepared by diluting the primary stock solution and secondary solution, respectively. Different volumes of these solutions were pipetted with appropriate variable volume micropipettes to aquaria with a volume of 5 L of sea water at salinity 25. Treatment aquaria with nominal concentrations of 0.01; 0.1; 1.0; 4.5; 7.0 and 9.0 µg TBT L⁻¹, plus controls (C) and solvent controls (SC-DMSO) were prepared. The concentration of DMSO in the different treatment aquaria was not higher than 0.002 % (v/v).

2.3 EXPERIMENTAL DESIGN

Ten fish were used per treatment, totaling 80 individuals exposed to TBT during 7 days. Each fish was kept separately in a 300 mL beaker containing 200 mL total volume of the TBT test solution, and 100 % renewal of TBT solutions was performed daily on each beaker. Water quality parameters were kept identical to those reported for fish culture in previous topic concerning *P. vivipara* maintenance.

2.4 MORTALITY

To evaluate the mortality of fish exposed to TBT, the number of dead fish per day was recorded in each treatment. Dead or moribund fish were not used for any histological analyses.

2.5 SPONTANEOUS SWIMMING SPEED

After 7 days of exposure to TBT, the surviving fish from each treatment were transferred individually to 300 mL beakers (experimental arenas) with 200 mL of clean seawater at salinity 25. Each individual fish from different treatments was recorded on video during 30 min in superior view using video cameras (model VP600H, Intellbras, São Jose, Brazil) with 6-60 mm variable zoom lenses. Mean swimming speed (cm s⁻¹) during the monitored period was calculated, and trajectory maps of the fish were generated were generated using the tracking software Smart (PanLab Harvard Apparatus, USA).

2.6 SWIMMING RESISTANCE

Newborns fry were individually submitted to a swimming resistance test, determined by assessing the fish's ability to maintain position while swimming in a countercurrent flow of water (Torreiro-Melo et al., 2015). After the introduction of each fish individually into the system, it is exposed to a sequence of increases in water flow, controlled by a PVC valve. After an acclimatization period of 90 s, the test was started from a flow of 2 L min^{-1} , which was progressively increased in 1 min intervals through adjustments in the PVC valve to a maximum of 12 L min^{-1} . The total time spent by each individual in the swimming resistance test was timed. The end of the test occurred when the fish did not resist countercurrent swimming and was dragged out of the system. Swimming resistance was quantified by the Swimming Resistance Index (SRI), based on the equation: $\text{SRI} = \text{AF} + (\text{LFT}'/60) * \text{LF}'$.

where AF = accumulated flow: the sum of the flow rates against which the fish swam for 1 full min (L min^{-1}); LF' = largest flow rate tested at which the fish was carried out of the system (L min^{-1}); LFT' = time in seconds that fish was able to stay in the system at the highest flow rate tested.

2.7 DAILY CAPTURE OF ARTEMIA NAUPLII (DNIP)

During the seven days of exposure, each fish of the different treatments was fed daily with hatched *Artemia* sp. nauplii. Nauplii were concentrated with a $200 \mu\text{m}$ sieve, draining the water and excess humidity by blotting gently on a paper towel, and wet weight of the nauplii was measured in a balance with an accuracy of 0.01 g. Nauplii were quickly returned to 25 salinity water and a solution with 15 g wet weight *Artemia* sp. nauplii L^{-1} was prepared, which contains approximately 600 nauplii mL^{-1} . 1 mL from this nauplii solution was added daily to individual fish in each beaker. Every day three 1 mL samples this nauplii solution was preserved in formaldehyde to count the average number of prey offered each day. During the daily renewal of TBT solutions in each beaker, all remaining *Artemia* sp. nauplii were concentrated with a $200 \mu\text{m}$ sieve and preserved with formalin and Bengal Rose stain for later counting of nauplii consumed. The daily number of ingested prey (DNIP) was evaluated by the difference between the total number of nauplii offered (NO) per day and the number of nauplii remaining (NR) after 24 hours, where $\text{daily DNIP} = \text{NO} - \text{NR}$.

2.8 GROWTH

The fish were weighed and measured at the beginning and at the end of the exposure to evaluate growth increase in wet weight biomass at 0.0001 mg increments and increase in standard length at 0.1 mm increments. Each live fish was quickly blotted dry when placed in contact with a paper towel in a plastic sieve and introduced into a beaker with water already positioned inside the analytical balance to minimize the stress of staying out of the water. Standard length was quantified from photographs of each fish using a Zeiss Stemi 2000 stereomicroscope at magnification of 20x, later processed by Zeiss AxioVision imaging analysis software.

2.9 HISTOPATHOLOGY OF THE EYE AND RETINA

After exposure and behavioral tests, all fish were euthanized in ice water at 2 °C, according to protocol approved by the Animal Experimentation Ethics Committee of UFPE. Six newborn *P. vivipara* per treatment were used for the histopathological analysis. Fish were fixed in 10% buffered formaldehyde for 24 h and stored in 70% ethanol until histopathological analyzes. Traditional dehydration procedures were used in ethanol, diaphanization in xylol, followed by impregnation and paraffin inclusion of whole fish (Paulo et al., 2012). The blocks were cut in a Leica microtome with a thickness of 5 µm, and the tissues were stained with Hematoxylin and Eosin (HE). Histopathological alterations in the eyes and retina were recorded, and the frequency of fish at different treatments exhibiting alterations in the retinal pigment epithelium (RPE) layer, photoreceptor and outer nuclear layer, outer plexiform layer, ganglion cell layer, iris and corneal areas was calculated.

2.10 STATISTICAL ANALYSES

The lethal concentration to 50% of exposed individuals after 96 hours of exposure (LC50-96h) was calculated using the Trimmed-Spearman-Kärber (TSK) method (USEPA, 2002). Results of the parameters swimming speed and resistance, daily ingested prey and growth from the different treatments were analyzed by one-way ANOVA, followed by the Dunnett test to verify differences between control and treatments. When absence of normality (Kolmogorov-Smirnov test) or homoscedasticity (Levene median test) was observed, Kruskal-Wallis non-parametric test (KW) was applied, followed by the Dunn test to evaluate differences between control and treatments using SigmaPlot version 12 software (Jandel

Scientific, Erkrath, Germany). The LOEL (lowest observable effect level) and NOEL (no observable effect level) were estimated from Dunnett or Dunn tests, depending on the assumptions above. A statistical significance of $p < 0.05$ was used.

3 RESULTS

3.1 MORTALITY

P. vivipara TBT LC50-96h was equal to $7.6 \mu\text{g TBT L}^{-1}$ (95% confidence limits of 7.1 and 8.1). Treatment individuals 9.1 only participated in the mortality and histopathological assessments due to the occurrence of high mortality rates.

3.2 SPONTANEOUS SWIMMING SPEED

A significant reduction of 85 % on median spontaneous swimming velocity was only observed in the fish exposed to $7.0 \mu\text{g TBT L}^{-1}$ compared to the controls (Fig. 1: KW $H_5 = 14.9$, $p < 0.001$, Dunn, $p < 0.05$). Median values of spontaneous swimming speeds were 2.0; 2.3; 1.4; 2.7; 2.6 and 0.3 cm s^{-1} for *P. vivipara* from treatments C, SC, 0.01, 1.0, 4.5 and $7.0 \mu\text{g TBT L}^{-1}$, respectively. The swimming trajectory of fish exposed to TBT from treatments 4.5 and $7.0 \mu\text{g TBT L}^{-1}$ showed a reduction in the exploration of the swimming arena (Fig. 2).

3.3 SWIMMING RESISTANCE INDEX

A significant reduction of 60 % on the mean SRI was observed in the fish exposed to $7.0 \mu\text{g TBT L}^{-1}$ compared to the controls (Fig. 3: Anova $F_{47.5} = 8.4$, $p = < 0.001$ Dunnett, $p < 0.005$). Mean values of SRI were 9.6, 12.5, 7.2, 7.3, 7.4 and 3.8 L s^{-1} for *P. vivipara* from treatments C, SC, 0.01, 0.1, 1.0, 4.5 and $7.0 \mu\text{g TBT L}^{-1}$, respectively (Fig. 3).

3.4 DAILY NUMBER OF INGESTED PREY (DNIP)

The exposure of *Poecilia vivipara* to $7.0 \mu\text{g TBT L}^{-1}$ caused a statistically significant reduction in the mean daily number of ingested nauplii of 33.6% relative to the controls (Table 1: KW- $H_6 = 78.7$, $p = 0.001$, Dunn, $p < 0.05$). The median values of DNIP were 598, 597, 483, 598, 598, 597, 381 for *P. vivipara* from treatments C, SC, 0.01, 0.1, 1.0, 4.5 and $7.0 \mu\text{g TBT L}^{-1}$, respectively (Table 1).

3.5 GROWTH

A significant growth rate reduction in terms of wet weight biomass or standard length relative to the controls of 56 % and 64 %, respectively, was detected in *P. vivipara* after seven days of exposure to 7.0 $\mu\text{g TBT L}^{-1}$ (Table 1: Anova $F_{49,5} = 4.0$, $p = 0.004$; Dunnett, $p < 0.05$). Mean growth rates of *P. vivipara* from treatments C, SC, 0.1, 1.0, 4.5 and 7.0 $\mu\text{g TBT L}^{-1}$ were 7.6, 8.6, 10.9, 9.6, 8.8, 5.8 and 3.3 mg (biomass increase - IB) and 2.2, 2.7, 1.7, 2.5, 2.1, 1.9 and 0.8 mm (standard length increase - IL), respectively (Table 1).

3.6 HISTOPATHOLOGY OF EYE

In control fish retinas, the retinal pigment epithelium (RPE) layer is formed by a melanin pigmented monolayer composed of cuboid cells. The RPE layer in the light adapted control fish exhibited pigmentation both on its apical and basal side (aps and bas in Fig. 4A), as expected. The outer nuclear layer (ONL) and inner nuclear cell layer (INL) also exhibited normal characteristics (Fig. 4A). The outer plexiform layer (OPL) and inner plexiform layers (IPL), derived from the contact of axons of the bipolar neurons with nuclear cells, presented normal cellular arrangement (Fig. 4A).

The cornea (co) and the corneal stroma also presented a normal configuration, with a squamous epithelium rich in collagen fibers (Fig. 5A1 and 5A2). In control fish, the pigmented iris (PI in Fig. 5A1 and 5A2), derived from RPE cells, presented a thin layer of melanin pigmentation in its cuboid cells (Impcc in Fig. 5A2). Histopathological changes were observed in eyes of fish exposed to all treatment groups. Alterations found in the retinal pigment epithelium included RPE depigmentation and migration of pigment to apical region of RPE cells (dpmi-ap in Fig. 4B, C and D), which was verified in 67 % of the exposed individuals to 0.01 $\mu\text{g TBT L}^{-1}$, 50 % in 1 $\mu\text{g TBT L}^{-1}$, 40 % in 4.5 $\mu\text{g TBT L}^{-1}$ and 33 % in 7.0 $\mu\text{g TBT L}^{-1}$ exposed fish (Table 2).

A different pattern characterized by RPE pigment migration to the basal region of RPE cells, with no pigment in the RPE microvilli communicating with the photoreceptor extensions (pmba in Fig. 4E and F) was detected in 66.7 % of the fish exposed to 7.0 $\mu\text{g TBT L}^{-1}$ and in 100 % of the fish exposed to 9.0 $\mu\text{g TBT L}^{-1}$ (Table 2). Associated with these alterations in RPE pigment distribution at lower and higher TBT concentrations, a dose-dependent increase in photoreceptor layer disorganization (dphl in Fig. 4) was observed. 33 %

of exposed fish exhibited dphl at $0.01 \mu\text{g TBT L}^{-1}$, increasing to 67 % and 83 % of fishes exposed to 7.0 and $9.0 \mu\text{g TBT L}^{-1}$, respectively (Table 2). 50 % and 100 % of fish exposed to 7.0 and $9.0 \mu\text{g TBT L}^{-1}$, respectively, also indicated signs of photoreceptor degeneration. This photoreceptor layer disorganization occurred along the entire retina, but mostly in the retinal equatorial region. Other alterations such as RPE invagination towards the photoreceptors were also verified in frequencies ranging from 0 % to 50 % (rpin in Fig. 4E, F) of individuals exposed both to lower and higher TBT concentrations (Table 2). Areas with hyperplasia were found in the RPE (hyrpe in Fig. 4F) in 50 % and 67% of fish exposed to 7.0 and $9.0 \mu\text{g TBT L}^{-1}$, respectively, and hyperplasia was also detected in outer nuclear and ganglion cell layers. Vacuolization in the inner plexiform layer was detected both in lower and higher TBT concentrations, frequencies ranging from 33% of fish exposed to $0.01 \mu\text{g TBT L}^{-1}$ and 50 % of $9.0 \mu\text{g TBT L}^{-1}$ exposed fish (vipl in Fig. 4E, F). A concentration dependent increase in iris melanin hyperpigmentation (imhy in Fig. 5) was observed. 17% of exposed fish exhibited imhy at $0.01 \mu\text{g TBT L}^{-1}$, increasing to 50 % and 100% of fishes exposed to 7.0 and $9.0 \mu\text{g TBT L}^{-1}$, respectively (Table 2). Iris epithelial cell atrophy (ieca in Fig. 5) was detected in fish exposed to $0.01 \mu\text{g TBT L}^{-1}$ (33.3%), 4.5 (20%), 7.0 (33.3%) and $9.0 \mu\text{g TBT L}^{-1}$ (83.3%) (Table 2). An increasing external darkening of the eyes was visible in TBT exposed fish (Supplementary material, Fig. 6). The cornea was thickened (co-tn in Fig. 5) in 50% and 33% of fish exposed to 1.0 and $4.5 \mu\text{g TBT L}^{-1}$, respectively. None of the histological alterations described above were detected in control fish.

4 DISCUSSION

Early stage of development of *Poecilia vivipara* exposed to tributyltin exhibited lower survival rates and developed histopathologies in the eye in association with a decrease of swimming speed and resistance, as well as a decrease in prey capture skills and growth. In this study, the LC50-96h calculated for *P. vivipara* newborns was $7.6 \mu\text{g TBT L}^{-1}$. LC50-96h for early stages of development of other fishes was $3.0 \mu\text{g TBT L}^{-1}$ for the most sensitive *Menidia beryllina* larvae (Bushong et al., 1988), and $3.9 \mu\text{g TBT L}^{-1}$ for the Chinese rare minnow larvae *Gobiocypris rarus* (Li and Li, 2015). Less TBT sensitive species include *Fundulus heteroclitus* larvae (LC50-96h = $23.4 \mu\text{g TBT L}^{-1}$) (Bushong et al., 1988) and medaka larvae (*Oryzias melastigma*) (LC50-96h = $25 \mu\text{g TBT L}^{-1}$) (Bao et al., 2011). Therefore, our data indicate that early life stages of *P. vivipara* are relatively sensitive to the lethal effects TBT.

Although LC50s provide important information that allow interspecific comparisons of sensitivity in terms of lethality, they are insufficient to clarify the ecological viability of the surviving individuals that can be better investigated by the application of sublethal toxicity parameters. Early life stages of fishes are mostly sight feeders, and proper development and functioning of the eye is essential for survival (Douglas and Djamgoz, 2012). Within the retina, photoreceptors and pigment granules inside retinal pigment epithelium (RPE) cells undergo positional changes, called retinomotor movements, in response to changes in ambient light conditions, preparing the eye for daytime or nighttime vision (Burnside and King-Smith, 2011), and potentially affecting visually based predator prey interactions of fishes. A disruption of retinomotor movements in TBT exposed *P. vivipara* newborns was detected at all concentrations tested. The RPE layer in the light adapted control fish used in this study was pigmented both on its apical and basal side (aps and bas in Fig. 4A). In this situation pigment granules migrate into the long, interdigitating apical projections (microvilli) of the RPE cells that contact the external segments of photoreceptor cells, protecting the rods from excessive bleaching in daytime light levels (Hodel et al., 2006; Burnside and King Smith, 2011).

An alteration in the RPE structure and retinomotor movements was detected, characterized by RPE depigmentation and migration of pigment granules to the apical region of RPE cells (dpmi-ap in Fig. 4B, C and D), which was observed in 67 % of exposed fish at the lowest concentration of $0.01 \mu\text{g TBT L}^{-1}$. This alteration was also observed in the other tested concentrations at significant frequencies (Table 2). A different pattern of alteration in retinomotor movements was detected at higher TBT exposure concentrations. High frequencies of fish with RPE pigment migration to the basal region of RPE cells were detected in 7.0 and $9.0 \mu\text{g TBT L}^{-1}$ exposed individuals (Table 2 and Fig. 4E, F), resembling the dark condition that occurs when pigments are retracted to the basal region to expose rod photoreceptors during retinomotor movements towards a dark adapted state (Hodel et al., 2006). However, all controls and TBT exposed fish used in this study were light adapted before euthanization and analysis, and a clear dysfunction in retinomotor movements was characterized.

Alterations in retinomotor movements were also verified in light adapted juveniles of *Terapon jarbua* exposed to high sublethal waterborne TBT concentrations of $100 \mu\text{g TBT L}^{-1}$ (Wang and Huang, 1999), and our study demonstrates that these effects can occur at much lower and more environmentally relevant waterborne TBT concentrations. The dose

dependent increase in photoreceptor layer disorganization and high frequencies of photoreceptor degeneration foci detected at higher TBT concentrations of 7.0 and 9.0 $\mu\text{g TBT L}^{-1}$ (Fig. 4E, F and Table 2) suggest that the migration of pigment to the basal region of the RPE could be causing an increase of rod photoreceptors light exposure in the photopic conditions. Exposure of rod photoreceptors to day light is known to cause photoreceptor degeneration (Hodel et al., 2006). Retinal depigmentation was also described in TBT exposed minnow *Phoxinus phoxinus* (Fent and Meier, 1992). Some of the pathologies found in the retina of TBT exposed *P. vivipara* such as areas with disorganized photoreceptor layer, photoreceptor degeneration and retinal pigment epithelium invaginations (Fig. 4E, F) as well as drusen formation in RPE are typical of macular degeneration in humans (degeneration of photoreceptors near the optic nerve) that over time leads to eventual blindness (Nommiste et al., 2017). TBT induces necrosis and opacity in the cornea epithelium, as seen in guppies *P. reticulata* exposed to 10 $\mu\text{g TBTO L}^{-1}$ ($\equiv 9.47\mu\text{g TBT L}^{-1}$) (Wester and Canton, 1987) and in medaka *Oryzias latipes* exposed to 1,0; 3,2 and 10,0 $\mu\text{g TBTO L}^{-1}$ ($\equiv 0.95, 3.03$ and $9.47\mu\text{g TBT L}^{-1}$) (Wester et al., 1990). Larvae of minnow *Phoxinus phoxinus* exposed to 4.3; 8.0 and 19.5 $\mu\text{g TBT L}^{-1}$ developed thin and opaque corneas (Fent and Meier, 1992). In this study a thickening of the cornea was observed only in fish exposed to 1.0 or 4.5 $\mu\text{g TBT L}^{-1}$ (co-tn in Fig. 5C1 and 5D1). Iris epithelial or cuboid cells are a continuation of RPE cells (Bharti et al., 2006), and the detected dose dependent increase in iris melanin hyperpigmentation (imhy in Fig. 5) together with atrophy of the iris cells (ieca in Fig. 5B2, 5D2 and 5E2) were associated with the macroscopic external darkening of the eyes (Fig.1 suppl. material), possibly due to this hyperpigmentation detected in the iris.

Decreased swimming speed and resistance were verified in *P. vivipara* exposed to 7.0 $\mu\text{g TBT L}^{-1}$ together with a disrupted swimming trajectory, characterizing a state of lethargy and less space exploration by the fish, essential for possible detection and capture of prey. A slight tendency to decline in the swim resistance index was also observed in fish exposed from 0.01, probably in favor of the effects on the eyes. *Danio rerio* larvae exposed to a concentration of $1 \times 10^8 \mu\text{g TBT L}^{-1}$ for 96 hours also showed significant inhibition of swimming speed (Liang et al., 2017), and our results are also in agreement with descriptions of TBT exposed fish presenting disturbances in equilibrium and swimming coordination such as minnows *Phoxinus phoxinus* (Fent and Meier, 1992), and rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* (Triebkorn et al., 1994a). These authors also verified ultrastructural alterations in the optic tectum and optic nerve correlated with alterations in swimming behavior (Triebkorn et

al., 1994b), and speculated whether this neurotoxicity in the brain optic pathways would be a significant factor leading to swimming effects. Studies with *Sebastiscus marmoratus* showed that TBT induced a state of lethargy and depression in exposed fish, through the neurotoxic effect of this contaminant on central nervous system (CNS), inhibiting the neurotransmitters 5-hydroxytryptophan, noradrenaline and dopamine receptors (Yu et al., 2013). Fent and Meier, (1992) observed that hydropic vacuolations and pyknosis in nuclei of ganglion cells and spinal cord caused a reduction in the locomotion of *Phoxinus phoxinus* embryos and larvae exposed to 4.4; 9.9; 8.0 and 19.5 $\mu\text{g TBT L}^{-1}$.

Our results indicate that retinal and iris alterations in TBT exposed *P. vivipara* at higher TBT concentrations are also associated with swimming disturbances, corroborating the possibility that overall effects in the visual system pathway might be leading to a damage of swimming skills. Alterations in the morphology of larvae exposed to TBT have also been reported influencing swimming behavior, such as skeletal and neuromuscular malformation, tail curling or shortening, and scoliosis or lordosis, as observed in *Oryzias latipes* (Bentivegna and Piatkowski, 1998; Hano et al., 2007). Fent and Meier, (1992) observed that hydropic vacuolations and pyknosis in nuclei of ganglion cells and spinal cord caused a reduction in the locomotion of *Phoxinus phoxinus* embryos and larvae exposed to 4.4; 9.9; 8.0 and 19.5 $\mu\text{g TBT L}^{-1}$. However, these skeletal changes were not observed in this study. The reduced intake of nauplii by *P. vivipara* exposed to 7.0 $\mu\text{g TBT L}^{-1}$ lead to a significant reduction in energy intake, and to a statistically significant decrease in growth, also verified in TBT exposed *Cyprinus carpio* (Schmidt et al., 2004) and *Oncorhynchus mykiss* (Triebkorn et al., 1994b). It is possible that the reduced prey capture by 7.0 $\mu\text{g TBT L}^{-1}$ exposed *P. vivipara* may be explained by the detected reduced swimming abilities together with limitations in the fish visual ability to detect prey, considering all the retinal and iris alterations discussed in detail above. It is also important to mention that the significant alterations in retinomotor movements, photoreceptor layer organization and iris pigmentation that were also detected in *P. vivipara* exposed to lower TBT concentrations apparently did not affect visually dependent *Artemia* capture skills.

However, it is possible that the prey capture experimental procedures used in this study did not involve a significant challenge that would be affected by more subtle visual function effects at the lower TBT concentrations, as each fish was offered a reasonably large amount of *Artemia* nauplii as prey in a small volume of 200 mL.

5 CONCLUSION

Poecilia vivipara early life stage exposure to waterborne TBT at environmentally relevant concentrations lead to significant alterations in retinomotor movements, retinal organization and iris pigmentation. These effects on eye retinal structure were associated with reduced swimming speed and resistance, reduced prey capture and growth only at higher waterborne TBT concentrations. *P. vivipara* was confirmed as a sensitive model for tropical fish ecotoxicology, contributing to a better understanding of the harmful effects TBT can produce to the eye and to critical swimming and prey capture behavioral skills relevant to recruitment.

ACKNOWLEDGEMENTS

This work was supported by FINEP (CT-Hidro 1111/13 - AIBRASIL2), CNPq (CT Aquaviário grant 456372/2013-0). Driele V. de Paulo was granted by a PhD fellowship from “Fundação de Amparo a Ciência e Tecnologia de Pernambuco - FACEPE”. Paulo SM Carvalho is a research fellow from the Brazilian CNPq (Grant 312308/2016-7). Authors are very grateful to Dr. Christina Alves Peixoto (Ultrastructure Laboratory, Aggeu Magalhães Institute) and to Centro de Tecnologias Estratégicas do Nordeste (CETENE) for providing infrastructure and equipment for histological analysis, and to all students who contributed during experimental exposures and testing, and to unknown reviewers who helped to increase the quality of this publication.

6 REFERENCES

- Adema-Hannes, R., Shenker, J., 2008. Acute lethal and teratogenic effects of tributyltin chloride and copper chloride on mahi mahi (*Coryphaena hippurus*) eggs and larvae. *Environmental Toxicology and Chemistry* 27, 2131-2135.
- Arcanjo, R.B., de Souza, L.P., Rezende, C.F., Silva, J.R.F., 2014. Embryonic development and nourishment in the viviparous fish *Poecilia vivipara* (Cyprinodontiformes: Poeciliidae). *Acta Zoologica* 95, 493-500.
- Artifon, V., Castro, Í.B., Fillmann, G., 2016. Spatiotemporal appraisal of TBT contamination and imposex along a tropical bay (Todos os Santos Bay, Brazil). *Environmental Science and Pollution Research* 23, 16047-16055.

- Bao, V.W.W., Leung, K.M.Y., Qiu, J.W., Lam, M.H.W., 2011. Acute toxicities of five commonly used antifouling booster biocides to selected subtropical and cosmopolitan marine species. *Marine Pollution Bulletin* 62, 1147-1151.
- Bentivegna, C.S., Piatkowski, T., 1998. Effects of tributyltin on medaka (*Oryzias latipes*) embryos at different stages of development. *Aquatic Toxicology* 44, 117-128.
- Berto-Júnior, C., de Carvalho, D.P., Soares, P., Miranda-Alves, L., 2018. Tributyltin and Zebrafish: Swimming in Dangerous Water. *Frontiers in Endocrinology* 9, 1-7.
- Bharti, K., Nguyen, M.T.T., Skuntz, S., Bertuzzi, S., Arnheiter, H., 2006. The other pigment cell: Specification and development of the pigmented epithelium of the vertebrate eye. *Pigment Cell Research* 19, 380-394.
- Burnside, B., King-Smith, C., 2011. Fish Retinomotor Movements. in: Besharse, J., Bok, D. (Eds.). *The Retina and its Disorders*. Academic Press, 219-227.
- Bushong, S.J., Hall Jr, L.W., Scott Hall, W., Edward Johnson, W., Herman, R.L., 1988. Acute toxicity of tributyltin to selected Chesapeake Bay fish and invertebrates. *Water Research* 22, 1027-1032.
- Cacciatore, F., Boscolo Brusà, R., Noventa, S., Antonini, C., Moschino, V., Formalewicz, M., Gion, C., Berto, D., Gabellini, M., Marin, M.G., 2018. Imposex levels and butyltin compounds (BTs) in *Hexaplex trunculus* (Linnaeus, 1758) from the northern Adriatic Sea (Italy): Ecological risk assessment before and after the ban. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 147, 688-698.
- Carvalho, P.S.M., Kalil, D.D., Novelli, G.A., Bainsy, A.C., Fraga, A.P., 2008. Effects of naphthalene and phenanthrene on visual and prey capture endpoints during early stages of the dourado *Salminus Brasiliensis*. *Mar Environ Res* 66, 205-207.
- Castro, Í.B., Iannaccone, J., Santos, S., Fillmann, G., 2018. TBT is still a matter of concern in Peru. *Chemosphere* 205, 253-259.
- Castro, I.B., Perina, F.C., Fillmann, G., 2012. Organotin contamination in South American coastal areas. *Environmental Monitoring and Assessment* 184, 1781- 1799.
- De Waisbaum, R.G., Rodriguez, C., Nudelman, N.S., 2010. Determination of TBT in water and sediment samples along the Argentine Atlantic coast. *Environ. Technol.* 31, 1335-1342.
- Douglas, R., Djamgoz, M., 2012. *The Visual System of Fish*. Springer Science.
- Fent, K., 1996. Ecotoxicology of organotin compounds. *Critical Reviews in Toxicology* 26, 1-117.
- Fent, K., 1998. Effects of organotin compounds in fish: from the molecular to the population level. *Fish Ecotoxicology*, 259-302.
- Fent, K., Meier, W., 1992. Tributyltin-induced effects on early life stages of minnows *Phoxinus phoxinus*. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 22, 428-438.

- Goldberg, R.N., Averbuj, A., Cledón, M., Luzzatto, D., Nudelman, N.S., 2004. Search for triorganotin along the Mar del Plata (Argentina) marine coast: Finding of tributyltin in egg capsules of a snail *Adelomelon brasiliana* (Lamarck, 1822) population showing imposex effects. *Applied Organometallic Chemistry* 18, 117- 123.
- Gomes Jr, J.L., Monteiro, L.R., 2007. Size and fecundity variation in populations of *Poecilia vivipara* Block & Schneider (Teleostei; Poeciliidae) inhabiting an environmental gradient. *Journal of Fish Biology* 71, 1799-1809.
- Hano, T., Oshima, Y., Kim, S.G., Satone, H., Oba, Y., Kitano, T., Inoue, S., Shimasaki, Y., Honjo, T., 2007. Tributyltin causes abnormal development in embryos of medaka, *Oryzias latipes*. *Chemosphere* 69, 927-933.
- Hodel, C., Neuhauss, S.C.F., Biehlmaier, O., 2006. Time course and development of light adaptation processes in the outer zebrafish retina. *Anatomical Record - Part A Discoveries in Molecular, Cellular, and Evolutionary Biology* 288, 653-662.
- Jarvinen, A.W., Tanner, D.K., Kline, E.R., Knuth, M.L., 1988. Acute and chronic toxicity of triphenyltin hydroxide to fathead minnows (*Pimephales promelas*) following brief or continuous exposure. *Environmental Pollution* 52, 289-301.
- Laranjeiro, F., Sánchez-Marín, P., Oliveira, I.B., Galante-Oliveira, S., Barroso, C., 2018. Fifteen years of imposex and tributyltin pollution monitoring along the Portuguese coast. *Environmental Pollution* 232, 411-421.
- Li, Z.-H., Li, P., 2015. Evaluation of tributyltin toxicity in Chinese rare minnow larvae by abnormal behavior, energy metabolism and endoplasmic reticulum stress. *Chemico-Biological Interactions* 227, 32-36.
- Liang, X., Souders, C.L., Zhang, J., Martyniuk, C.J., 2017. Tributyltin induces premature hatching and reduces locomotor activity in zebrafish (*Danio rerio*) embryos/larvae at environmentally relevant levels. *Chemosphere* 189, 498-506.
- Machado, A.A.S., Hoff, M.L.M., Klein, R.D., Cordeiro, G.J., Lencina Avila, J.M., Costa, P.G., Bianchini, A., 2014. Oxidative stress and DNA damage responses to phenanthrene exposure in the estuarine guppy *Poecilia vivipara*. *Marine Environmental Research* 98, 96-105.
- Matthiessen, P., Gibbs, P.E., 1998. Critical appraisal of the evidence for tributyltin mediated endocrine disruption in mollusks. *Environmental Toxicology and Chemistry* 17, 37-43.
- Mattos, J.J., Siebert, M.N., Luchmann, K.H., Granucci, N., Dorrington, T., Stoco, P.H., Grisard, E.C., Bainy, A.C.D., 2010. Differential gene expression in *Poecilia vivipara* exposed to diesel oil water accommodated fraction. *Marine Environmental Research* 69, S31-S33.
- McKim, J.M., 1977. Evaluation of Tests with Early Life Stages of Fish for Predicting Long-Term Toxicity. *Journal of the Fisheries Research Board of Canada* 34, 1148- 1154.
- Mochida, K., Fujii, K., 2009. Toxicity for Aquatic Organisms. in: T, A., Harino, H., Ohji, M., Langston, W.J. *Ecotoxicology of Antifouling Biocides* Springer, Japan, 149- 160.

Nommiste, B., Fynes, K., Tovell, V.E., Ramsden, C., da Cruz, L., Coffey, P., 2017. Chapter 9 - Stem cell-derived retinal pigment epithelium transplantation for treatment of retinal disease. in: Dunnett, S.B., Björklund, A. (Eds.). Progress in Brain Research. Elsevier, pp. 225-244.

Paulo, D.V., Fontes, F.M., Flores-Lopes, F., 2012. Histopathological alterations observed in the liver of *Poecilia vivipara* (Cyprinodontiformes: Poeciliidae) as a tool for the environmental quality assessment of the Cachoeira River, BA. Brazilian Journal of Biology 72, 131-140.

Ritsema, R., Laane, R.W.P.M., Donard, O.F.X., 1991. Butyltins in marine waters of The Netherlands in 1988 and 1989; Concentrations and effects. Marine Environmental Research 32, 243-260.

Rüdel, H., 2003. Case study: bioavailability of tin and tin compounds. Ecotoxicology and Environmental Safety 56, 180-189.

Schilithz, P.F., Dorneles, P.R., Lailson-Brito, J., 2013. Cetacean exposure to butyltin compounds: A review. Oecologia Australis 17, 411-423.

Schmidt, K., Steinberg, C.E.W., Pflugmacher, S., Staaks, G.B.O., 2004. Xenobiotic substances such as PCB mixtures (aroclor 1254) and TBT can influence swimming behavior and biotransformation activity (GST) of carp (*Cyprinus carpio*). Environmental Toxicology 19, 460-470.

Sloman, K.A., McNeil, P.L., 2012. Using physiology and behaviour to understand the responses of fish early life stages to toxicants. Journal of Fish Biology 81, 2175- 2198.

Sternberg, R.M., Gooding, M.P., Hotchkiss, A.K., LeBlanc, G.A., 2010. Environmental endocrine control of reproductive maturation in gastropods: Implications for the mechanism of tributyltin-induced imposex in prosobranchs. Ecotoxicology 19, 4- 23.

Torreiro-Melo, A.G.A.G., Silva, J.S., Bianchini, A., Zanardi-Lamardo, E., de Carvalho, P.S.M., 2015. Bioconcentration of phenanthrene and metabolites in bile and behavioral alterations in the tropical estuarine guppy *Poecilia vivipara*. Chemosphere 132, 17-23.

Triebkorn, R., Koehler, H.R., Koertje, K.H., Negele, R.D., Rahmann, H., Braunbeck, T., 1994a. Evaluation of bis(tri-n-butyltin) oxide (TBTO) neurotoxicity in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). II. Ultrastructural diagnosis and tin localization by energy filtering transmission electron microscopy (EFTEM). Aquat. Toxicol. 30, 199-213.

Triebkorn, R., Köhler, H.-R., Flemming, J., Braunbeck, T., Negele, R.-D., Rahmann, H., 1994b. Evaluation of bis(tri-n-butyltin)oxide (TBTO) neurotoxicity in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). I. Behaviour, weight increase, and tin content. Aquatic Toxicology 30, 189-197.

Turner, A., Glegg, G., 2014. TBT-based antifouling paints remain on sale. Marine Pollution Bulletin 88, 398-400.

USEPA, 2002. Methods for Measuring the Acute Toxicity of Effluents and Receiving Waters to Freshwater and Marine Organisms. United States Environmental Protection Agency, 821-R-802-012.

Valkirs, A.O., Seligman, P.F., Stang, P.M., Homer, V., Lieberman, S.H., Vafa, G., Dooley, C.A., 1986. Measurement of butyltin compounds in San Diego Bay. *Marine Pollution Bulletin* 17, 319-324.

Wang, D.Y., Huang, B.Q., 1999. TBT (tributyltin) toxicity to the visual and olfactory functions of tigerperch (*Terapon jarbua Forsskal*). *Zoological Studies* 38, 189-195.

Wester, P.W., Canton, J.H., 1987. Histopathological study of *Poecilia reticulata* (guppy) after long-term exposure to bis(tri-n-butyltin)oxide (TBTO) and di-n butyltindichloride (DBTC). *Aquatic Toxicology* 10, 143-165.

Wester, P.W., Canton, J.H., Van Iersel, A.A.J., Krajnc, E.I., Vaessen, H.A.M.G., 1990. The toxicity of bis(tri-n-butyltin)oxide (TBTO) and di-n-butyltindichloride (DBTC) in the small fish species *Oryzias latipes* (medaka) and *Poecilia reticulata* (guppy). *Aquatic Toxicology* 16, 53-72.

Yu, A., Wang, X., Zuo, Z., Cai, J., Wang, C., 2013. Tributyltin exposure influences predatory behavior, neurotransmitter content and receptor expression in *Sebastiscus marmoratus*. *Aquatic Toxicology* 128-129, 158-162.

Table 1 – Daily catch of *Artemia* nauplii and growth in weight and length of *Poecilia vivipara* newborns exposed to clean water control (C), solvent control (SC) and concentrations of 0.01, 1, 4.5, 7 $\mu\text{g TBT L}^{-1}$ after seven days of exposure.

	C	SC	0.01	0.1	1.0	4.5	7.0
IW (mg)	11.4 $\pm$ 2.0	10.9 $\pm$ 1,6	10.8 $\pm$ 1.9	5.8 $\pm$ 0.7	11.3 $\pm$ 2.2	10.7 $\pm$ 2.3	11.5 $\pm$ 1.7
FW (mg)	19.0 $\pm$ 2.5	19.5 $\pm$ 3.2	21.7 $\pm$ 3.0	28.1 $\pm$ 4.3	20.1 $\pm$ 4.4	16.5 $\pm$ 3.0	12.2 $\pm$ 2.3
IB (mg)	7.6 $\pm$ 3.1 ^a	8.6 $\pm$ 2.7 ^a	10.9 $\pm$ 4.2 ^a	9.6 $\pm$ 4.3 ^a	8.8 $\pm$ 4.0 ^a	5.8 $\pm$ 2.4 ^a	3.3 $\pm$ 5.4 ^b
ISL (mm)	8.8 $\pm$ 0.5	8.7 $\pm$ 0.3	9.0 $\pm$ 0.6	8.2 $\pm$ 0.4	9.0 $\pm$ 0.5	8.8 $\pm$ 0.6	9.1 $\pm$ 0.3
FSL (mm)	9.9 $\pm$ 3.6	11.4 $\pm$ 0.9	10.7 $\pm$ 0.8	10.7 $\pm$ 1.1	11.1 $\pm$ 0.8	9.6 $\pm$ 3.4	9.8 $\pm$ 0.4
IL (mm)	2.2 $\pm$ 0.8 ^a	2.7 $\pm$ 1.0 ^a	1.7 $\pm$ 0.9 ^a	2.5 $\pm$ 1.1 ^a	2.1 $\pm$ 0.9 ^a	1.9 $\pm$ 0.5 ^a	0.8 $\pm$ 0.6 ^b
DNIP median	598 ^a	597 ^a	483 ^a	598.4 ^a	598 ^a	597 ^a	381 ^b
DNIP percentile 25%	473	357	17	542	483	483	16
DNIP percentile 75%	618	618	599	618	617	618	562

IW - Initial weight, FW - Final weight, IB - Increase in biomass, ISL - Initial standard length, FSL - Final standard length, IL - Increase in length, DNIP – Daily number of ingested prey (*Artemia* nauplii). Equal letters: no statistical difference; different letters: statistically significant difference (Anova followed by Dunnett, $p < 0.05$).

Table 2 – Frequency (% of individuals relative to total analysed) of histopathological changes observed in the eyes of *Poecilia vivipara* exposed to clean water control (C), and to 0.01, 1.0, 4.5, 7.0 and 9.0 $\mu\text{g TBT L}^{-1}$ during seven days.

Alterations / TBT waterborne concentrations	C	0.01	1	4.5	7	9
Depigmentation and migration of pigment to apical region of RPE cells (dpmi-ac in Fig. 4)	0.0	66.7	50.0	40.0	33.3	0.0
Pigment migration to the basal region of RPE cells (pmba in Fig. 4)	0.0	0.0	0.0	0.0	66.7	100.0
Disorganized photoreceptor layer (dphl in Fig. 4)	0.0	33.3	16.7	40.0	66.7	83.3
Degeneration of Retinal Pigment Epithelium cells	0.0	0.0	0.0	0.0	50.0	100.0
Retinal pigment epithelium invagination (rpin in Fig. 4)	0.0	33.3	16.7	0.0	33.3	50.0
Hyperplasia in Retinal pigment epithelium (hyrpe in Fig. 4)	0.0	0.0	0.00	0.0	50.0	66.7
Vacuolization of the inner plexiform layer (vipl in Fig. 4)	0.0	33.3	0.0	20	33.3	50.0
Hyperpigmented layer of melanin in iris (imhy in Fig. 5)	0.0	33.3	33.3	20.0	50.0	100.0
Iris epithelial cells atrophy (ieca in Fig. 5)	0.0	33.3	0.0	20.0	33.3	83.3
Thickening of corneal epithelium (co-tkn in Fig. 5)	0.0	0.0	50.0	33.3	0.0	0.0

Figure 1

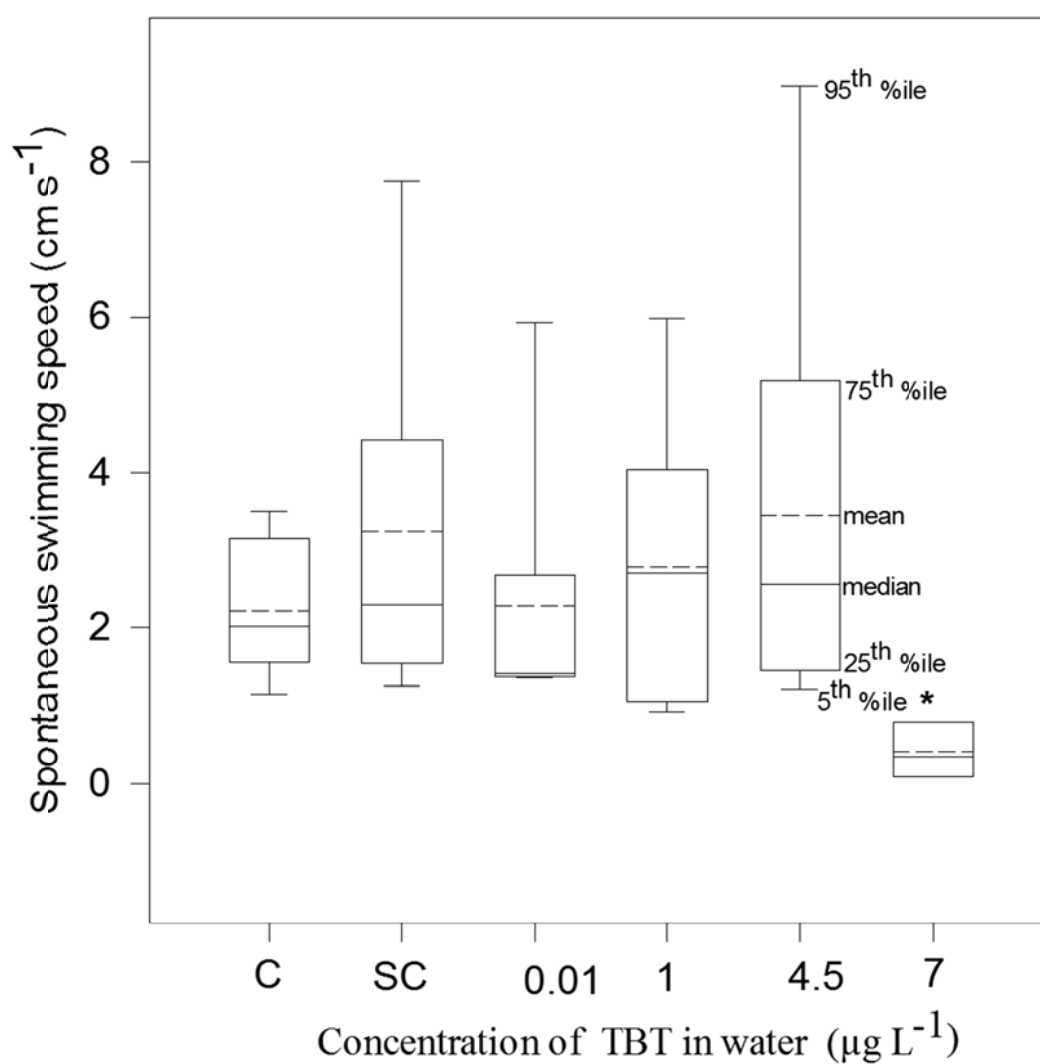


Fig. 1 – Spontaneous swimming speed (median, percentiles and mean, $n = 10$) in newborns of *Poecilia vivipara* after seven days of waterborne TBT exposure (Kruskal Wallis $H_5 = 14.9$, $p < 0.001$) (Teste de Dunn, $p < 0.05$). (C): control; (SC) solvent control (DMSO); (*): statistically different relative to control based on Dunn's test.

Figure 2

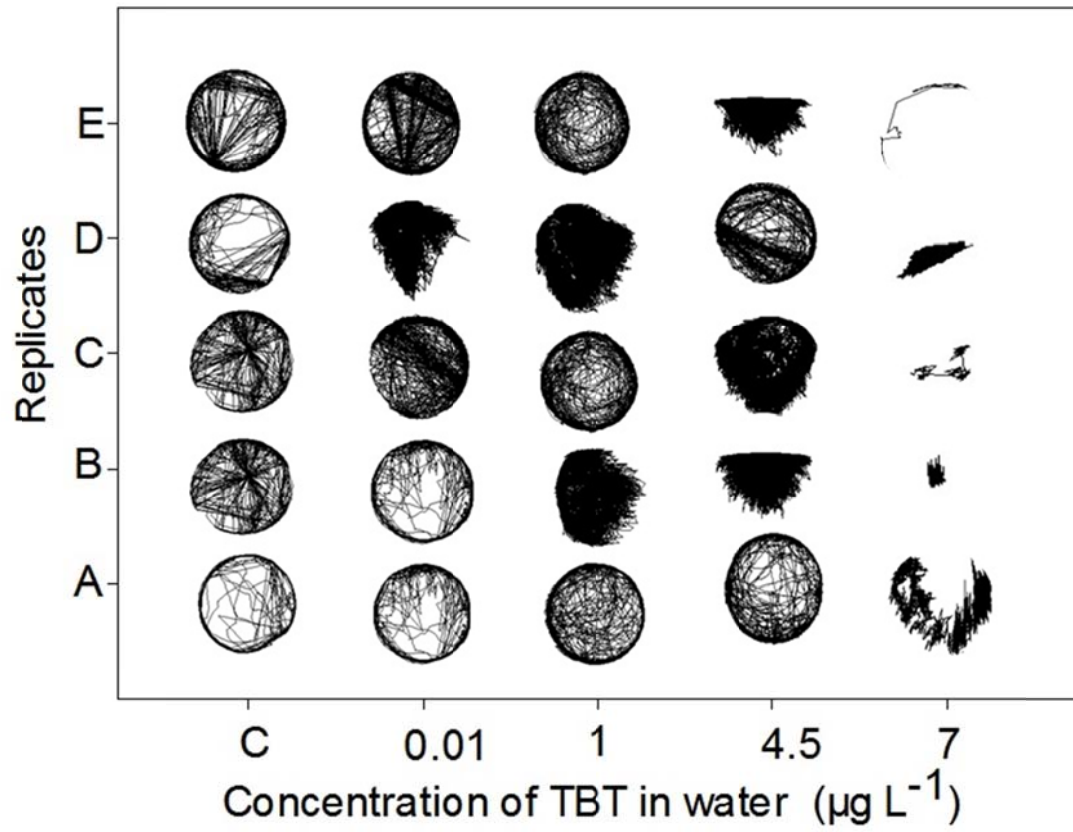


Fig. 2 – Swimming trajectories during 5 min of newborn *Poecilia vivipara* after seven 7 days of waterborne TBT exposure. (C): control.

Figure 3

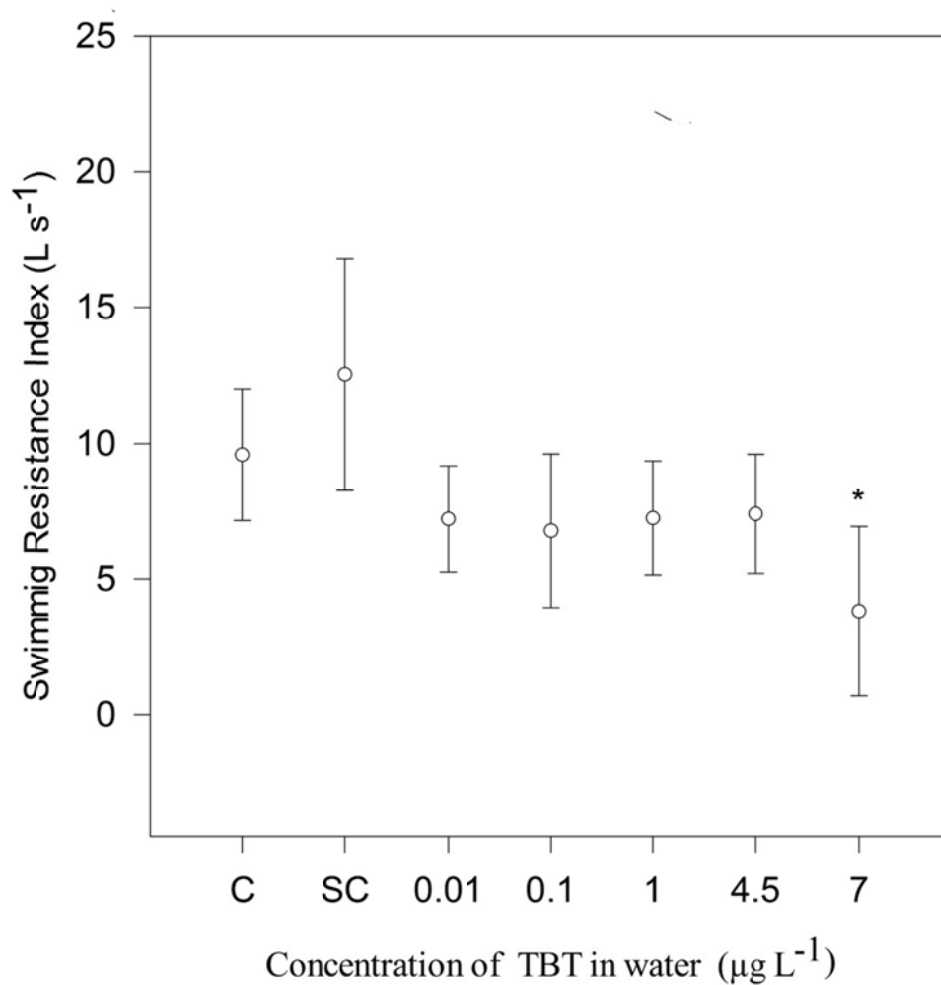


Fig. 3 – Swimming resistance index (mean $\pm$ standard deviation, $n = 10$) in newborns of *Poecilia vivipara* after seven days of waterborne TBT exposure (Anova $F_{47,5} = 8.4$, $p = 0.01$) (Dunnett, $p < 0.05$). (C): control; (SC) solvent control (DMSO); (*): statistically different relative to control based on Dunnett's test.

Figure 4

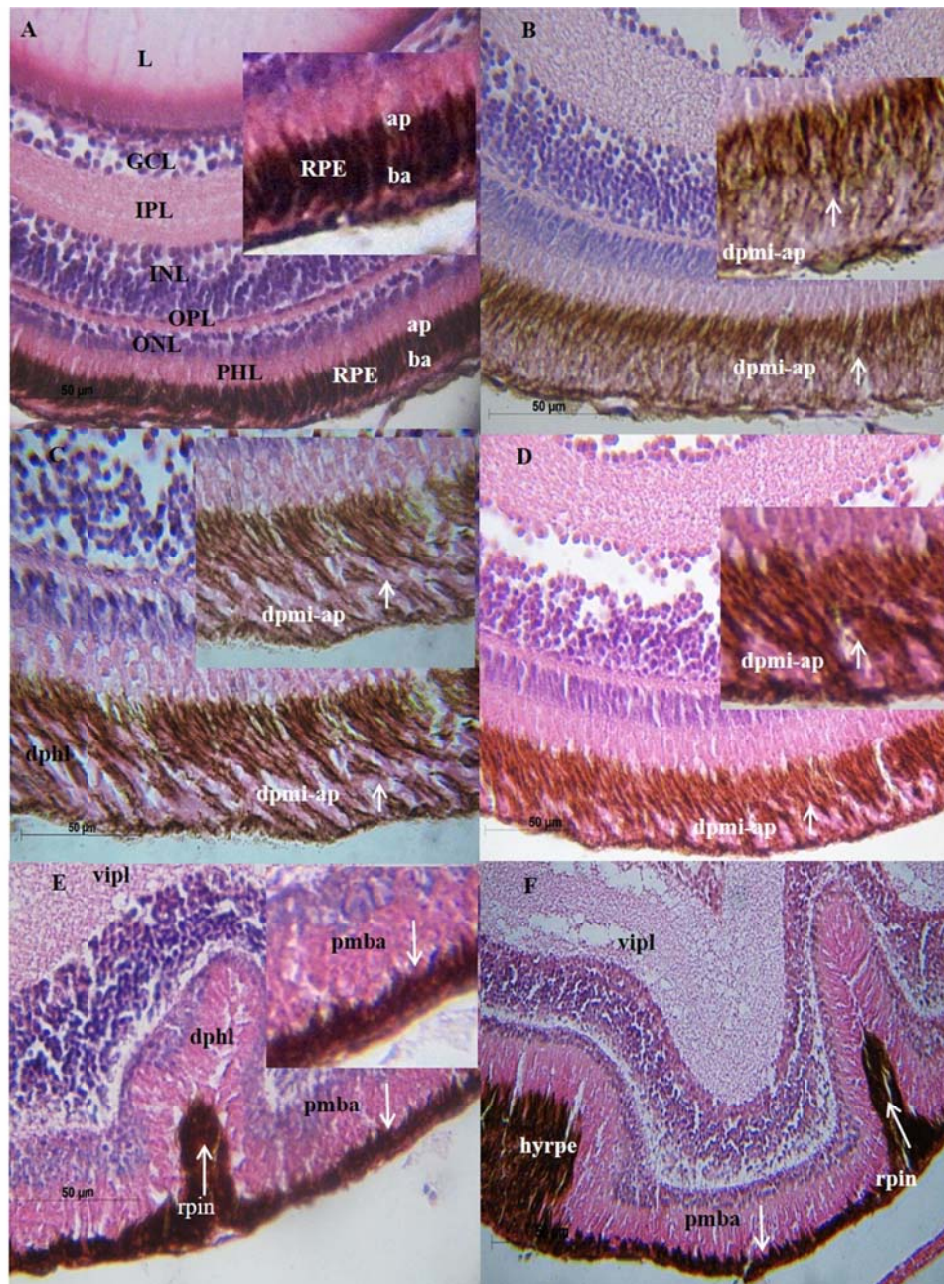


Fig. 4 – Horizontal sections of the retina and histopathological alterations observed in newborns of *Poecilia vivipara* after waterborne TBT exposure, Hematoxylin and Eosin, 400X. A: control, RPE: retinal pigment epithelium, aps: apical side, bas: basal side, PHL: photoreceptor layer, ONL: outer nuclear layer, OPL: outer plexiform layer, INL: inner nuclear layer, IPL: inner plexiform layer, GCL: ganglion cell layer, L: lens; B: $0.01 \mu\text{g TBT L}^{-1}$; C: $1.0 \mu\text{g TBT L}^{-1}$; D: $4.5 \mu\text{g TBT L}^{-1}$; E: $7.0 \mu\text{g TBT L}^{-1}$; F: $9.0 \mu\text{g TBT L}^{-1}$. dpml-ac: depigmentation and migration of pigment to apical region of RPE cells (B, C and D); pm-ba: pigment migration to basal region of RPE cells (E and F); rpin: RPE invagination; dphl: disorganized photoreceptor layer (C, E and F); vipl: vacuolization in the inner plexiform layer; hyrpe: hyperplasia of RPE. Insets in A, B, C, D and E show controls and dpml-ac and pm-ba alterations in more detail.

Figure 5

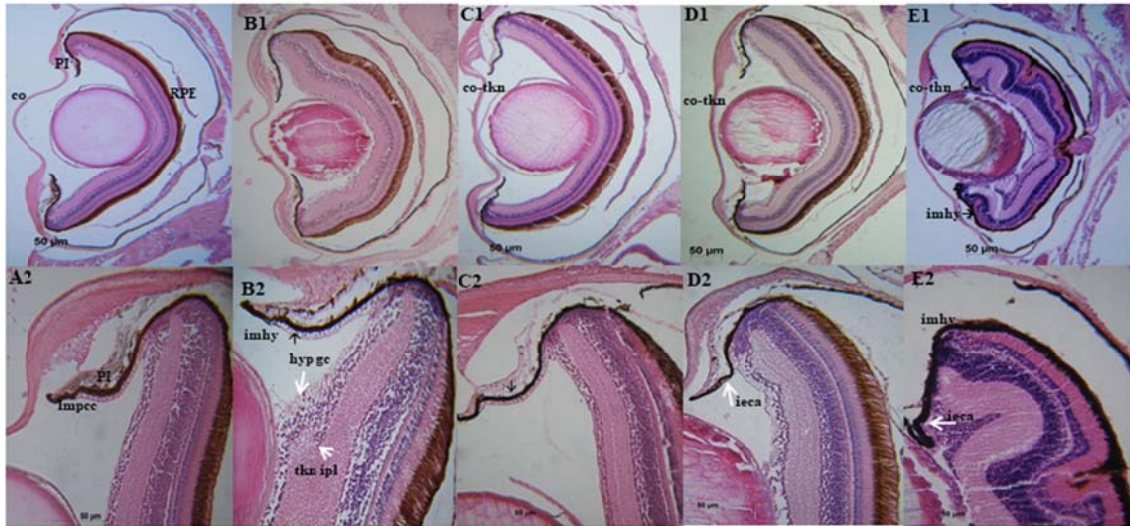


Fig. 5 – Horizontal sections of the eye and histopathological alterations observed in the iris and cornea of *Poecilia vivipara* exposed to TBT. Hematoxylin and Eosin staining. Panels 1 (100X) and 2 (400X). A1 and A2: treatment control eyes with normal pigmentation of the iris and retinal pigment epithelium (RPE), PI: iris normal pigmentation, Impcc: thin layer of melanin pigmentation along iris cuboid cells in controls; B1 and B2: 0.01 $\mu\text{g TBT L}^{-1}$; C1 and C2: 1.0 $\mu\text{g TBT L}^{-1}$; D1 and D2: 4.5 $\mu\text{g TBT L}^{-1}$; E1 and E2: 7.0 $\mu\text{g TBT L}^{-1}$. Alterations: iris melanin hyperpigmentation (imhy); iris epithelium cells atrophy (ieca); thickened cornea (co-tkn).

SUPPLEMENTARY MATERIAL

Figure 1

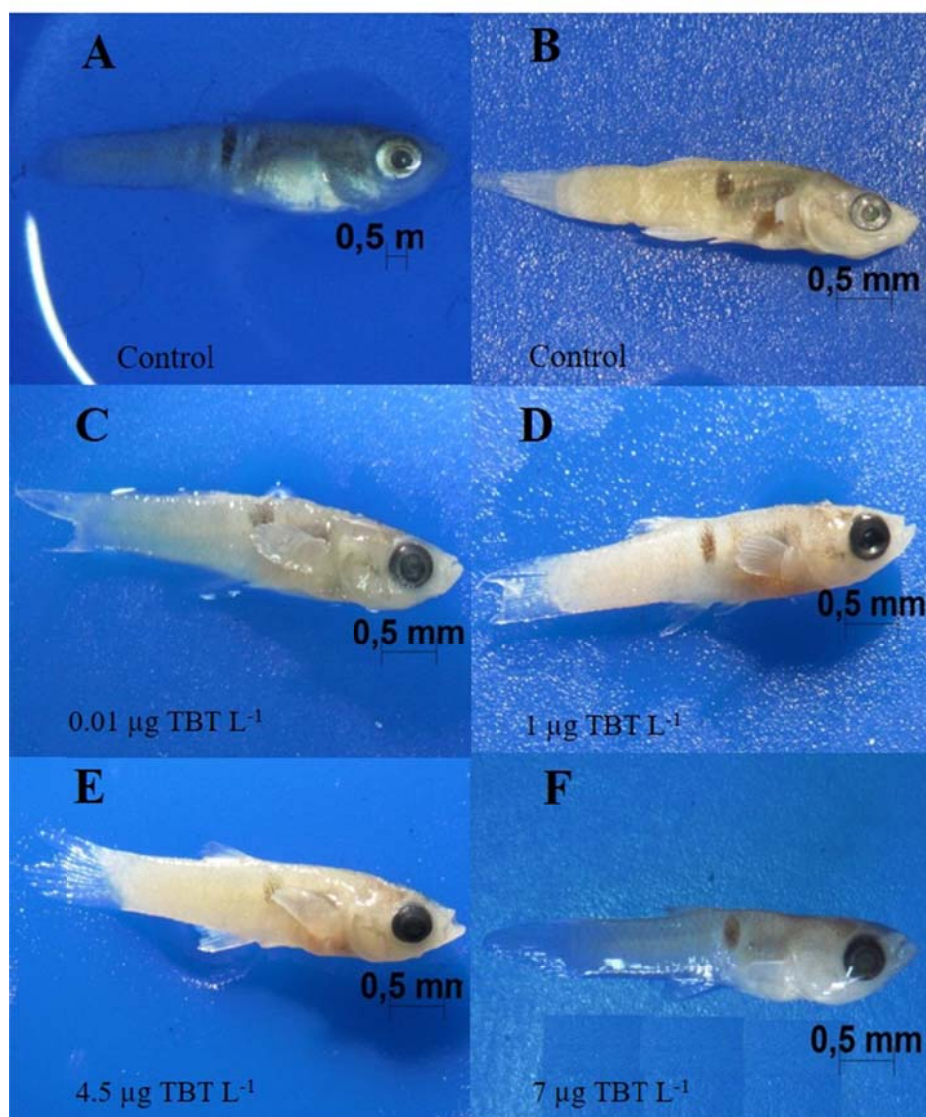


Fig. 1 – Supplementary material- External darkening of the eyes of newborn *Poecilia vivipara* exposed to increasing concentrations of waterborne TBT.

FIGURE CAPTIONS

Fig. 1: Spontaneous swimming speed (median, percentiles and mean, $n = 10$) in newborns of *Poecilia vivipara* after seven days of waterborne TBT exposure (Kruskal Wallis $H_5 = 14.9$, $p < 0.001$) (Teste de Dunn, $p < 0.05$). (C): control; (SC) solvent control (DMSO); (*): statistically different relative to control based on Dunn's test.

Fig. 2: Swimming trajectories during 5 min of newborn *Poecilia vivipara* after seven 7 days of waterborne TBT exposure. (C): control; (SC) solvent control (DMSO).

Fig. 3: Swimming resistance index (mean $\pm$ standard deviation, $n = 10$) in newborns of *Poecilia vivipara* after seven days of waterborne TBT exposure (Anova $F_{47.5} = 8.4$, $p = 0.01$) (Dunnett, $p < 0.05$). (C): control; (SC) solvent control (DMSO); (*): statistically different relative to control based on Dunnett's test.

Fig. 4: Horizontal sections of the retina and histopathological alterations observed in newborns of *Poecilia vivipara* after waterborne TBT exposure, Hematoxylin and Eosin, 400X. A: control, RPE: retinal pigment epithelium, aps: apical side, bas: basal side, PHL: photoreceptor layer, ONL: outer nuclear layer, OPL: outer plexiform layer, INL: inner nuclear layer, IPL: inner plexiform layer, GCL: ganglion cell layer, L: lens; B: $0.01 \mu\text{g TBT L}^{-1}$, C: $1.0 \mu\text{g TBT L}^{-1}$; D: $4.5 \mu\text{g TBT L}^{-1}$; E: $7.0 \mu\text{g TBT L}^{-1}$; F: $9.0 \mu\text{g TBT L}^{-1}$. dpmi-ac: depigmentation and migration of pigment to apical region of RPE cells (B, C and D); pm-ba: pigment migration to basal region of RPE cells (E and F); rpin: RPE invagination; dphl: disorganized photoreceptor layer (C, E and F); vipl: vacuolization in the inner plexiform layer; hyrpe: hyperplasia of RPE. Insets in A, B, C, D and E show controls and dpmi-ac and pm-ba alterations in more detail.

Fig. 5: Horizontal sections of the eye and histopathological alterations observed in the iris and cornea of *Poecilia vivipara* exposed to TBT. Hematoxylin and Eosin staining. Panels 1 (100X) and 2 (400X). A1 and A2: control eyes with normal pigmentation of the iris and retinal pigment epithelium (RPE), PI: iris normal pigmentation, Impcc: thin layer of melanin pigmentation along iris cuboid cells in controls; B1 and B2: $0.01 \mu\text{g TBT L}^{-1}$; C1 and C2: $1.0 \mu\text{g TBT L}^{-1}$; D1 and D2: $4.5 \mu\text{g TBT L}^{-1}$; E1 and E2: $7.0 \mu\text{g TBT L}^{-1}$. Alterations: iris melanin hyperpigmentation (imhy); iris epithelium cells atrophy (ieca); thickened cornea (co-tnk).

ARTIGO 2

TOXICIDADE HISTOLÓGICA E COMPORTAMENTAL DOS ANTIINCRUSTANTES CLOROTALONIL E DICLOFLUANIDA EM RECÉM-NASCIDOS DO BARRIGUDINHO *Poecilia vivipara*

RESUMO

O barrigudinho *Poecilia vivipara* tem se revelado um modelo biológico promissor em ecotoxicologia. Neste estudo, foi avaliada a toxicidade dos organoclorados clorotalonil e diclofluanida, muito utilizados na indústria naval como antiincrustantes, sobre o estágio inicial de vida de *P. vivipara*. Após 3 dias de nascimento grupos de 10 recém-nascidos foram expostos durante 96 h a concentrações de clorotalonil e diclofluanida de 10, 25, 50 e 75 $\mu\text{g L}^{-1}$, mais controle (água limpa), e controle de solvente (acetona). Cada peixe foi mantido isoladamente num béquer contendo a solução teste de clorotalonil ou de diclofluanida, com 100% de renovação diária. A concentração letal a 50% dos organismos testados após 96 h de exposição (CL50-96h) do clorotalonil foi igual a 56,9 $\mu\text{g L}^{-1}$, e a diclofluanida apresentou máxima taxa de mortalidade de 30% na concentração 25 $\mu\text{g L}^{-1}$. Os resultados do índice de alterações histopatológicas hepáticas (IAHH) e das frequências de intensidade de alterações no fígado refletiram uma tendência concentração dependente de aumento dos danos hepáticos em indivíduos expostos ao clorotalonil e diclofluanida, com desenvolvimento de hemorragia e hiperplasias em áreas ductulares. No pâncreas foi identificada maior frequência de processos inflamatórios e hiperplasias principalmente em 75 $\mu\text{g L}^{-1}$ para ambos os biocidas. O índice de alterações histopatológicas intestinais (IAHI) também mostrou uma tendência concentração dependente no desenvolvimento de lesões na mucosa epitelial dos peixes expostos ao clorotalonil. Foram verificadas hiperplasias com indícios de tumores em indivíduos expostos a 50 e 75 $\mu\text{g L}^{-1}$ do clorotalonil e a 75 $\mu\text{g L}^{-1}$ de diclofluanida. Em relação aos parâmetros comportamentais a diclofluanida promoveu uma hiperatividade natatória dos peixes expostos a 50 $\mu\text{g L}^{-1}$, relativo ao controle e o clorotalonil promoveu alterações na alimentação e crescimento, com redução significativa (80%) no número de náuplios de *Artemia* sp ingeridos em 75 $\mu\text{g L}^{-1}$ e de (42% e 53%) no comprimento dos peixes expostos a 25 e 50 $\mu\text{g L}^{-1}$. Este conjunto de resultados auxiliará na compreensão dos efeitos tóxicos entero hepático e comportamental que estes compostos podem causar em peixes em estágio inicial de vida.

Palavras-chave: Biocidas antivegetativos. Histopatologia. Fígado. Pâncreas. Intestino. Comportamento.

1 INTRODUÇÃO

O uso de tintas contendo compostos biocidas antiincrustantes tem sido a melhor estratégia para prevenir a bioincrustação de organismos aquáticos aos cascos de navios e estruturas submersas em portos e marinas. Para evitar os prejuízos causados por essa adesão de organismos os atuais biocidas de reforço (“*booster biocides*”), ou antivegetativos, da terceira geração são frequentemente utilizados em conjunto com formulações a base de cobre (Castro et al., 2011).

O clorotalonil e a diclofluanida são organoclorados muito utilizados como fungicidas na agricultura (Voulvoulis et al., 2000) e estão incluídos entre os biocidas de reforço mais utilizados em tintas antiincrustantes atualmente (Konstantinou and Albanis 2004, Guardiola et al., 2012). Estudos em diferentes áreas portuárias e estuarinas com intensa atividade naval indicaram concentrações de clorotalonil e diclofluanida de até $0,6 \mu\text{g L}^{-1}$ e $1,38 \mu\text{g L}^{-1}$, respectivamente (Van Graft and Leeuwangh 1977; Konstantinou and Albanis 2004). Na América do Sul existem poucos estudos informando sobre a ocorrência, disponibilidade e toxicidade do clorotalonil, por exemplo, (Castro et al., 2011; Batista-Andrade et al., 2016). Essa dificuldade de informações pode estar relacionada ao fato de que estes contaminantes são pouco persistentes no ambiente aquático, com elevada taxa de degradação hidrolítica e fácil fotodegradação (Thomas, 2009). O clorotalonil possui meia vida curta, 4 a 12 semanas na coluna d’água e no sedimento respectivamente, mas ainda assim pode causar um estrago considerável sobre a fauna, além disso, esse composto exibe efeitos antagonistas em misturas binárias de biocidas (Koutsaftis and Aoyama, 2007).

A diclofluanida por sua vez, apresenta uma rápida degradação hidrolítica (Sánchez-Rodríguez et al., 2011). É instável no sedimento e, portanto, determinada por seu metabólito N'-dimetil-N-fenil-sulfamida (DMSA), que tem sido considerado mais tóxico que seu precursor (van Wezel and van Vlaardingen, 2004). A ocorrência de diclofluanida e seu metabólito DMSA foram monitorados em água salgada e sedimentos marinhos de três marinas gregas. Como esperado, dada a sua elevada taxa de degradação hidrolítica conhecida, concentrações detectáveis de diclofluanida não foram medidas em nenhuma das amostras de água do mar. Entretanto, este contaminante foi repetidamente identificado nas amostras provenientes de pesca do porto de Arguineguín e das marinas de Porto Rico (Sánchez-Rodríguez et al., 2011).

Pouco se conhece sobre os efeitos nocivos dos biocidas de reforço disponíveis no mercado sobre os organismos aquáticos, podendo, portanto, ser até mais nocivos que o TBT (Konstantinou and Albanis, 2004). Com isso, torna-se necessária uma avaliação da toxicidade desses contaminantes em peixes e em outros organismos aquáticos. Em relação a toxicidade do Clorotalonil sobre peixes possui uma elevada toxicidade, podendo inativar enzimas chave da cadeia respiratória no fígado ou brânquias, inibir a glicólise ao se ligar com a enzima gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase (GAPDH) (Caux et al., 1996; Sánchez Garayzar et al., 2016) e desencadear outros efeitos subletais. As informações sobre a toxicidade da diclofluanida para peixes são escassas, principalmente no que se refere aos efeitos subletais. Em geral é considerada menos potente que outros biocidas antiincrustantes (Amara et al., 2018) e apresenta CL50-96h de $11 \mu\text{g L}^{-1}$ para trutas *Oncorhynchus mykiss*, a $120 \mu\text{g L}^{-1}$ para *Leuciscus idus melanotus* (van Wezel and van Vlaardingen, 2004).

Exames histopatológicos têm sido empregados para estabelecer possíveis correlações clínico-patológicas entre as respostas morfológicas e a toxicidade de contaminantes (Wolf and Wolfe 2005; Hübscher 2015). Através destes estudos, mudanças morfológicas relacionadas a lesões teciduais são frequentemente identificadas em peixes contaminados (Bernet et al., 1999), antes que danos irreversíveis sejam produzidos sobre os indivíduos.

Os biomarcadores histopatológicos em órgãos frequentemente alvo de contaminantes como o fígado, o pâncreas e o intestino têm sido utilizados para avaliar os efeitos de poluentes. O fígado é um dos principais órgãos investigados em estudos histopatológicos de peixes (Hinton et al., 2001; Wolf and Wolfe, 2005), por ser um local onde ocorrem muitas reações de biotransformação, e consequentemente, ser mais propenso a citotoxicidade e gênese de tumores (Wolf and Wheeler, 2018). Respostas hepatotóxicas comumente identificadas em peixes, relacionadas ao acúmulo ou a perda de reservas energéticas (glicogênio e/ou lipídio), ocorrem como efeito direto de intoxicação (Wolf and Wolfe, 2005). Estas alterações foram verificadas no medaka *Oryzias latipes* (Wester et al., 1990) e nos barrigudinhos *Poecilia reticulata* (Wester and Canton, 1987) expostos ao TBT, e em *Oreochromis niloticus* exposto a $80 \mu\text{g L}^{-1}$ de clorotalonil (Mahgoub and Maher., 2017).

As alterações pancreáticas exócrinas podem ser de ordem inflamatória e não inflamatória, sendo que elas podem facilmente se estender ao parênquima hepático adjacente, e promover alterações nesse tecido (Wolf e Wolfe, 2005), como o desenvolvimento de tumor identificado em adultos de *Poecilia vivipara* de um ambiente poluído (Paulo et al., 2012).

O intestino é um órgão onde ocorre reciclagem de enzimas e macronutrientes e excreção de resíduos metabólitos, e as alterações desenvolvidas nesse órgão, após a exposição à xenobióticos, não são apenas estruturais, mas também funcionais (Saraiva et al., 2015; Palas et al., 2016). Respostas necróticas e degenerativas nesse tecido podem estar relacionadas à toxicidade de contaminantes sobre a mucosa intestinal, levando à redução da capacidade de retenção de nutrientes e à redução funcional ou perda do órgão (Bernet et al., 1999). Necroses na mucosa epitelial do intestino de bagres *Ictalurus punctatus* foram identificadas em 57% dos indivíduos após exposição a $42 \mu\text{g L}^{-1}$ de clorotalonil (Gallagher et al., 1992). A interação de alterações em diferentes órgãos pode ser claramente diferente da soma de seus efeitos individuais, e desta forma, uma avaliação conjunta refletindo um efeito geral da situação entero-hepática é desejável.

Peixes em estágios iniciais de vida têm tipicamente maior sensibilidade a contaminantes (McKim, 1977). Respostas comportamentais de estágios iniciais de desenvolvimento de peixes expostos a contaminantes são importantes para a compreensão de efeitos ecológicos relevantes para o recrutamento (Sloman and McNeil, 2012). Em recém-nascidos de *Poecilia vivipara* é possível identificar efeitos a nível comportamental logo após o nascimento, pois são capazes de nadar imediatamente na coluna d'água e ir à busca de alimento, e já possuem os principais órgãos e sistemas completamente formados (Rocha et al., 2010). O teleósteo eurialino barrigudinho *Poecilia vivipara* pode ser encontrado ao longo da costa brasileira (Gomes Jr and Monteiro, 2008), apresenta reprodução por ovoviviparidade e lecitotrofia, com nutrição dos embriões ocorrendo exclusivamente pelo vitelo (Arcanjo et al., 2014). Estágios iniciais de desenvolvimento representados por recém-nascidos de *P. vivipara* ainda não foram utilizados em ecotoxicologia, embora adultos tenham sido usados como espécie modelo em bioensaios laboratoriais focados em contaminantes como óleo diesel (Mattos et al., 2010), fenantreno (Torreiro-Melo et al., 2015), cobre (Machado et al., 2013).

Desta forma, o objetivo do presente estudo foi avaliar efeitos letais e subletais da exposição de estágio inicial de desenvolvimento de *P. vivipara* ao clorotalonil e a diclofluanida, quantificando efeitos histopatológicos no fígado, pâncreas e intestino, em conjunto com biomarcadores comportamentais relacionados à natação e alimentação, e o crescimento, contribuindo assim para um melhor entendimento dos efeitos destes biocidas em parâmetros relevantes para o recrutamento da espécie.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 CULTIVO E REPRODUÇÃO DOS PEIXES

Fêmeas grávidas e machos adultos de *Poecilia vivipara* foram coletados com rede de arrasto em tanques de cultivo de camarão, localizados em área de manguezal (8.22S, 34.94W) do sistema estuarino de Barra de Jangada, próximo ao rio Jaboatão, em Jaboatão dos Guararapes, Pernambuco, Brasil. Os peixes foram transportados em tanques de 50 L com aeração, para aquários do plantel de reprodutores no Laboratório de Ecotoxicologia Aquática da Universidade Federal de Pernambuco. Machos foram mantidos em conjunto com as fêmeas na proporção (1 macho: 2 fêmeas) em aquários de 100 L, em salinidade 25 e temperatura de 26 ± 1 °C (média $\pm$ desvio padrão). A alimentação dos reprodutores foi baseada em náuplios de *Artemia* sp. e ração para peixes com teor de proteína superior a 40%. A água dos aquários foi constantemente recirculada por um sistema de filtragem mecânica e biológica. A concentração de amônia total se manteve abaixo de $0,02 \text{ mg L}^{-1}$. O pH ($8,2 \pm 0,1$) e oxigênio dissolvido ($5,8 \pm 0,4 \text{ mg L}^{-1}$) foi mensurado diariamente por sonda multiparamétrica YSI Professional Plus. Grupos de fêmeas grávidas foram separados em um aquário com volume de 2 L até o nascimento dos peixes. Essas fêmeas possuíam o abdômen dilatado e com um ponto escuro na região posterior, próximo da abertura genital, como indicativo de proximidade de nascimento dos filhotes. Após o nascimento, os peixes recém-nascidos foram separados e alimentados diariamente com náuplios de *Artemia* até o início da exposição, no terceiro dia de vida.

2.2 PREPARO DAS SOLUÇÕES DE CLOROTALONIL E DICLOFLUANIDA

Para o preparo da solução de trabalho do clorotalonil (2,4,5,6-tetracloroisophthalonitrile), uma solução estoque primária foi preparada a partir da dissolução de 100,0 mg de clorotalonil pureza 99,3% (Sigma-Aldrich, St Louis, USA) em acetona, obtendo uma concentração de $2,000.000 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$. Soluções de trabalho secundária e terciária nas concentrações $1,000.000 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$ e $500.000 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$ de clorotalonil foram preparadas por diluição da solução estoque primária. O preparo da solução estoque de diclofluanida (dichlorofluoromethyl)thio)-N',N'-dimethyl-N-phenylsulfamide) (pureza 99,8%, Sigma-Aldrich, St Louis, USA) seguiu o mesmo procedimento usado para o clorotalonil, utilizando 100,0 mg de diclofluanida pureza 99,5% (Sigma-Aldrich, St Louis, USA) dissolvidos em

acetona, obtendo uma concentração de $2.000.000 \mu\text{g L}^{-1}$. Diferentes volumes destas soluções foram pipetados com micropipetas de precisão para aquários com um volume de 10 L de água do mar na salinidade 25, de forma a gerar soluções para os tratamentos nas concentrações nominais de 10, 25, 50 e $75 \mu\text{g L}^{-1}$ de clorotalonil e diclofluanida, além do controle e controle de solvente, acetona 0,002 % (v/v).

2.3 DESENHO EXPERIMENTAL DAS EXPOSIÇÕES

As exposições foram realizadas simultaneamente aos diferentes tratamentos com clorotalonil e diclofluanida. Dez peixes foram usados para cada tratamento de clorotalonil e diclofluanida isoladamente (com os adicionais controle; controle de solvente em acetona 0,002% v/v); nas concentrações 10; 25; 50 e $75 \mu\text{g L}^{-1}$, totalizando assim, 100 indivíduos nos 10 diferentes tratamentos. O experimento seguiu o mesmo delineamento amostral para ambos os contaminantes, onde cada peixe foi mantido isoladamente num béquer de 300 mL, contendo volume total de 200 mL da solução teste de clorotalonil ou de diclofluanida. Diariamente, em cada béquer, 100% das soluções teste foram renovadas e os parâmetros de qualidade da água foram mantidos semelhantes aos relatados para o cultivo dos peixes. O tempo de exposição aos contaminantes foi igual a 96 horas.

2.4 MORTALIDADE

Ao longo do período de exposição, todos os peixes foram devidamente alimentados e o número de peixes mortos por dia em cada tratamento foi devidamente registrado. Ao final do bioensaio a concentração letal a 50 % dos indivíduos expostos após 96 horas de exposição (CL50-96h) foi calculada.

2.5 VELOCIDADE NATATÓRIA ESPONTÂNEA, DISTÂNCIA PERCORRIDA E MAPAS DE TRAJETÓRIA

As avaliações da velocidade e distância percorrida foram realizadas após as 96 horas de exposição ao clorotalonil e diclofluanida. Os peixes sobreviventes de cada tratamento, que já possuíam 7 dias de vida, foram transferidos individualmente para pequenos aquários (arenas experimentais para a filmagem) com 200 mL de água limpa. Os indivíduos foram mantidos por 5 minutos em aclimação, e posteriormente, monitorados por um período de 10 minutos, em vista superior através de câmeras de vídeo (modelo VP600H, Intellbras, Brasil)

com lentes 6-60 mm de distância focal. Vídeos de cada indivíduo foram gravados num computador utilizando-se uma placa de captura (GeoVision modelo GV-900, Irvine, CA), sendo, posteriormente, analisados pelo software Smart (PanLab Harvard Apparatus, EUA). Foi calculada a velocidade média (cm s^{-1}), a porcentagem de tempo nadando em velocidade rápida ($> 0,2 \text{ cm s}^{-1}$), lenta ($< 0,2 \text{ cm s}^{-1}$) e parado (0 cm s^{-1}), a distância percorrida (cm) durante o período monitorado (s), e foram elaborados mapas de trajetórias dos peixes durante o período monitorado.

2.6 NÚMERO DE NÁUPLIOS CAPTURADOS DIARIAMENTE (NNCD)

Durante as 96 horas de exposição, cada peixe dos diferentes tratamentos foi alimentado diariamente com náuplios de *Artemia* sp. Náuplios recém-eclodidos de *Artemia* sp. foram separados em peneira de 200 μm , drenando a água e determinando o peso úmido total dos náuplios em balança com precisão de 0,01 g. A partir deste peso úmido foi acrescentada água para obter uma concentração de 15 g L^{-1} de náuplios, que contém aproximadamente 700 náuplios mL^{-1} . Três amostras de 1 mL foram preservadas diariamente em formol para contagem da média de náuplios ofertados em cada dia (NO). Um mL desta solução foi adicionado diariamente em cada béquer com os peixes isolados, e no dia seguinte, os náuplios restantes não consumidos (NR) foram separados e preservados em formol para contagem. O número de náuplios capturados diariamente (NNCD) foi avaliado pela diferença entre o número total de náuplios ofertados (NO) por dia e o número de náuplios restantes (NR) após 24 horas, onde: $\text{NNCD} = \text{NO} - \text{NR}$.

2.7 CRESCIMENTO

Após os testes comportamentais, os peixes foram pesados e medidos no início e ao final da exposição, após os testes comportamentais, para avaliar o crescimento através do incremento em biomassa (precisão de 0,0001 g) e comprimento total (precisão de 0,1 mm). O comprimento padrão foi quantificado a partir de fotografias de cada indivíduo dentro da água por vista superior usando um estereomicroscópio Zeiss Stemi 2000 com aumento de 20X, e o programa AxioVision (Zeiss).

2.8 HISTOPATOLOGIA

Após todos os procedimentos de exposição e avaliação comportamental, os peixes foram eutanasiados pela submersão em água a 2°C por 10 minutos, de acordo com protocolo aprovado pelo Comitê de Ética em experimentação animal da UFPE 23076-008924/2018-11. Os peixes inteiros (n= 6 por tratamento) foram fixados em formol tamponado 10% por 48 h e conservados em álcool a 70% até as análises histopatológicas. Foram utilizados procedimentos tradicionais de rotina histológica e inclusão em parafina dos peixes inteiros. Os blocos foram cortados em micrótomo Leica com espessura de 3 a 5 µm, e os tecidos foram corados por Hematoxilina e Eosina (HE). Os cortes foram analisados e imagens das secções foram obtidas usando microscópio LEICA DM 2500 com software Leica Application Suite LAS 4.12.0. Todos os tecidos foram avaliados por uma visão geral do tecido e posteriormente os órgãos foram analisados em 5 campos aleatórios em cada uma das 4 lâminas com 4 cortes para cada peixe, com amplificação de 40X e 100X.

As análises histopatológicas do fígado e intestino foram avaliadas por dois métodos semiquantitativos: a frequência de alterações e índices de alterações histológicas. A frequência de alterações histopatológicas foi avaliada em todos os órgãos (fígado, pâncreas e intestino) pela porcentagem (%) de indivíduos que apresentaram a lesão em relação ao total analisado por tratamento. Para avaliar a gravidade das alterações no fígado o índice de alterações histológicas hepáticas (IAHH) foi calculado de acordo com Poleksic and Mitrovic-Tutundzic, (1994). Cada alteração foi classificada em graus progressivos quanto ao comprometimento das funções teciduais: estágio I, mudanças que não comprometem o funcionamento do órgão; estágio II, alterações graves que comprometem o funcionamento do órgão, mas são reversíveis; e estágio III, mudanças sérias que comprometem o funcionamento do órgão, e são irreversíveis. O valor de IAHH foi calculado para cada indivíduo de acordo com a seguinte fórmula: $IAHH = (1 \times \Sigma I) + (10 \times \Sigma II) + (100 \times \Sigma III)$, onde ΣI , ΣII e ΣIII correspondem ao somatório das alterações nos estágios I (leve), II (moderado) e III (severo), respectivamente. Os valores de IAHH entre 0 e 10 indicam funcionamento normal do tecido; entre 11 e 20 indicam dano leve ao órgão; entre 21 e 50 indicam dano moderado; de 51 a 100 indicam dano severo; e maior que 100 indicam dano tecidual irreversível, seguindo uma adaptação de Poleksic and Mitrovic-Tutundzic, (1994).

Alterações histopatológicas no intestino também foram avaliadas quanto à gravidade das alterações utilizando o índice de alterações histopatológicas intestinais (IAHI), e o índice

de lesão da mucosa intestinal (IMI) de Barišić et al., (2018). Para manter a correlação dos graus progressivos de severidade das alterações em leve, moderado e severo, com os estágios de severidade das alterações I, II, III respectivamente, foi realizada uma adaptação do índice proposto por Barišić et al., (2018) para a classificação do estágio I, que caracterizaria o intestino em uma condição de normalidade e sem alteração. Neste trabalho o estágio I foi atribuído a seções de intestino caracterizadas como apresentando alterações regressivas nível 1 de Bernet et al. (1999), baseadas em mudanças estruturais pontuais, ou na arquitetura do tecido que reduz o funcionamento do órgão. O estágio II foi atribuído a seções com alterações moderadas e progressivas, que aumentam a atividade da célula ou tecido, e estágio III foi atribuído a seções de intestino com alterações severas e regressivas, ou inflamatórias que mantêm um padrão inflamatório. Como o intestino é formado por três camadas de tecidos, o epitelial, o conjuntivo ou lâmina própria, e o muscular, foi calculado um IAHI para cada tecido intestinal, por indivíduo segundo a fórmula $IAHI = (1 \times \Sigma I) + (2 \times \Sigma II) + (4 \times \Sigma III)$. A média aritmética do IAHI em cada camada em particular do intestino representa o grau de danos nesta camada, para cada tratamento. O somatório dos IAHI das múltiplas alterações encontradas nas três camadas do intestino para cada indivíduo analisado foi chamado de índice de lesões da mucosa intestinal (IMI), que representa uma avaliação integrada e diretamente proporcional à severidade das lesões histológicas em todas as camadas do intestino. A avaliação do pâncreas foi realizada exclusivamente com base na frequência de alterações histopatológicas observadas.

2.9 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

A concentração letal para 50 % dos indivíduos após 96h de exposição (LC50-96h) foi estimada usando o teste não paramétrico "Trimmed-Spearman-Karber (TSK)" (USEPA 2002). Para os parâmetros histopatológicos hepáticos (IAHH), intestinais (IAHI), e parâmetros comportamentais, os valores obtidos nos diferentes tratamentos foram comparados usando análise de variância de 1 fator, seguido pelo teste de Dunnett para verificar diferenças entre o controle e os tratamentos. Quando não foi observada normalidade (teste de Kolmogorov-Smirnov) ou homoscedasticidade (teste de medianas Levene), foi aplicado o teste não paramétrico de Kruskal-Wallis (KW), seguido do teste de Dunn para avaliar diferenças entre o controle e os tratamentos. Para os cálculos, foi utilizado o software SigmaPlot version 12 (Jandel Scientific, Erkrath, Germany), com alfa de 5%. A CENO

(concentração de efeito não observado) e a CEO (concentração de efeito observado) foram estimadas quando possível.

3 RESULTADOS

3.1 MORTALIDADE

A CL50-96h do clorotalonil para juvenis de *P. vivipara* na fase inicial de vida foi igual a 56,9 $\mu\text{g L}^{-1}$ (limites de confiança de 95% inferior e superior iguais a 42,1 e 77,1 $\mu\text{g L}^{-1}$, respectivamente). Para os peixes expostos à diclofluanida não foi possível estimar a CL50-96h, e a maior taxa de mortalidade foi de 30% na concentração 25 $\mu\text{g L}^{-1}$.

3.2 HISTOPATOLOGIA DO FÍGADO, PÂNCREAS E INTESTINO

3.2.1 Fígado, pâncreas e intestino controle

Nos juvenis de *P. vivipara* com 7 dias de vida analisados neste estudo, a estrutura geral do parênquima hepático apresentou semelhança com a de adultos dessa mesma espécie. Em peixes controle, os hepatócitos apresentaram forma poligonal, núcleos arredondados e estavam distribuídos por entre os vasos sanguíneos. No citoplasma destas células foram identificados vacúolos com reserva energética, semelhante ao descrito para *P. vivipara* em estágio larval antes do nascimento (Arcanjo et al., 2014), e para juvenis de truta arco-íris (Yasutake and Wales, 1981) (Fig 1A, Fig 2A).

Em relação ao pâncreas exócrino em peixes controle, as células estavam agregadas ao longo de vasos sanguíneos e localizadas apenas na porção inferior do fígado, próximo ao ducto principal, a bexiga natatória, ao timo e ao intestino (Genten, 2009) (Fig 2D). A organização estrutural desse órgão nessa fase de vida é bem diferente do que ocorre em fígado de *P. vivipara* adultos, que incorporam quantidades variáveis de tecido pancreático em torno dos vasos sanguíneos (Paulo et al., 2012), o que também é verificado em adultos de outros peixes que possuem pâncreas exócrino (Wolf and Wolfe, 2005). As células pancreáticas possuem forma poligonal, um núcleo central proeminente, com presença de grânulos de secreção (zimogênio) nos citoplasmas e basofilia quando coradas com hematoxilina/eosina (Fig 2D).

A arquitetura geral do intestino dos peixes controle mostrou vilosidades normais, células epiteliais colunares (ep) (enterócitos), com núcleos ovais e basais, bordas definidas e

uma leve produção de muco na extremidade das células, em direção ao lúmen do intestino. Algumas células caliciformes (ca) produtoras de muco também foram identificadas associadas às epiteliais. Abaixo desta camada encontrou-se uma fina camada de tecido conjuntivo (lâmina-própria) (lp) e posteriormente uma fina camada de tecido muscular liso (Fig. 5A), que em indivíduos adultos essa camada muscular costuma ser espessa.

Os exemplares controles apresentaram predominantemente alterações leves (I) e moderadas (II) no fígado como vacúolos citoplasmáticos (vac), e vasos sinusóides congestionados (cong) (Fig1A, Fig 2A) (Tabela 1). Os pâncreas controles não apresentaram alterações teciduais (Fig 2D) (Tabela 2). Nos intestinos controles foram detectadas hipertrofias em células mucosas e epiteliais (hppep), da lâmina própria (hpplp) e em fibras do músculo liso (hppm). A presença destas alterações (estágio II) foi verificada apenas em 33 % dos indivíduos analisados (Tabela 3).

3.2.2 Alterações no fígado causadas pelo clorotalonil

O fígado dos peixes expostos apresentaram alterações leves, moderadas e severas. Dentre as alterações leves verificadas nos peixes expostos ao clorotalonil o formato irregular dos hepatócitos e a presença de pequenos vacúolos foram as mais frequentes em todos os tratamentos (Tabela 1). Nas concentrações de 10 e 25 $\mu\text{g L}^{-1}$ de clorotalonil, a frequência de vacuolização foi maior (100%, 100%) relativo ao controle (33%) e às concentrações 50 e 75 $\mu\text{g L}^{-1}$ (66,7%; 50%) (Tabela 1). Nas concentrações 10 e 25 $\mu\text{g L}^{-1}$ os indivíduos que apresentaram vacuolização nos hepatócitos (vac), semelhante à esteatose (Fig 1B e C).

As alterações moderadas (estágio II) ocorreram com maior frequência em 75 $\mu\text{g L}^{-1}$, onde as degenerações citoplasmáticas (degc), infiltração leucocitária (ileuc) com agregados macrofágicos, e macrófagos circulantes ocorreram principalmente em torno de ductos biliares semelhantes a um processo inflamatório (Fig 1D). Nessas áreas inflamatórias a presença de hiperplasias ductulares (hpp) e hepatócitos com organização cordonal e aparência espessada também foram identificadas, além de infiltração de células fibroblásticas e multiplicação de pequenos vasos sanguíneos. Alterações endoteliais como congestionamento de capilares sinusóides (cs) e hemorragia (h) (Fig 2B) foram mais frequentes (100%) em peixes expostos a 25 e 75 $\mu\text{g L}^{-1}$ (Tabela 1) e pode indicar uma hiperemia em áreas do fígado (Fig 3A) (Tabela 1).

Como alteração severa (estágio III), pequenos focos de necrose (nec) foram identificadas entre hepatócitos vacuolados em 10 e 25 $\mu\text{g L}^{-1}$, e em áreas inflamatórias nos fígados expostos a 50 e 75 $\mu\text{g L}^{-1}$. Um provável indício de fibrose hepática também foi identificado em indivíduos expostos 75 $\mu\text{g L}^{-1}$ (Fig 1D).

Em relação ao IAHH foram verificados aumentos de 3, 4 e 5 vezes maior relativo ao controle em 25, 50 e 75 $\mu\text{g L}^{-1}$ (ANOVA $F_{19,5} = 3,8$, $p = 0,015$, Dunnett $p < 0,05$). O IAHH de 110 em 75 $\mu\text{g L}^{-1}$ de clorotalonil ultrapassou o limite da capacidade regenerativa do órgão, enquadrando os fígados em uma condição de danos potencialmente irreversíveis nesta concentração (Fig. 4A).

3.2.3. Alterações no fígado causadas pelo diclofluanida

No fígado dos peixes expostos à diclofluanida, das alterações leves (estágio I), a vacuolização citoplasmática (100%, 75%, 100%, 100%) também foi elevada em todas as concentrações relativo ao controle (33%) (Fig 2C, Fig 3B). Embora houvesse a presença de vacúolos em fígados de todos os tratamentos, a condição de esteatose ou hiper vacuolização esteve frequente em indivíduos das concentrações 10 e 25 $\mu\text{g L}^{-1}$ (Fig 1B e 1C) (Tabela 1).

Em relação às alterações moderadas (estágio II) com maiores frequências incluem a degeneração citoplasmática (degc) em 10 e 25 $\mu\text{g L}^{-1}$ e a congestão dos sinusóides (cs) nas concentrações 50 e 75 $\mu\text{g L}^{-1}$ (Tabela 1) (Fig 2C). A frequência de indivíduos com hemorragias em áreas com extensa dilatação dos sinusóides foi igual a 40% em 50 e 75 $\mu\text{g L}^{-1}$ (Fig 3A).

Na alteração severa (estágio III) as maiores frequências de indivíduos com necrose hepática foram verificadas nos tratamentos 25 e 75 $\mu\text{g L}^{-1}$ (Tabela 1). A histopatologia foi identificada principalmente em áreas vacuoladas ou que exibiam uma arquitetura hepática cordonal e espessadas ao lado do pâncreas exócrino.

No IAHH hepático dos peixes expostos a diclofluanida não foram detectadas diferenças significativas entre os tratamentos (ANOVA $F_{20,5} = 1,8$, $p = 0,151$). O IAHH atingiu valores médios inferiores a 100 em todos os tratamentos, indicando uma condição de danos potencialmente reversíveis. Entretanto, houve grande variabilidade nos tratamentos 25, 50 e 75 $\mu\text{g L}^{-1}$, e em alguns indivíduos este valor do índice ultrapassou 100, que indica danos irreversíveis (Fig. 4B).

3.2.4 Alterações no pâncreas causadas pelo clorotalonil e diclofluanida

A inflamação no pâncreas foi verificada em torno dos vasos, onde foi verificado formato irregular das células (firc), infiltração leucocitária, região vascular fibrótica e células endoteliais hipertrofiadas (Fig 2F). As hiperplasias pancreáticas (hppc), com multiplicação de células semelhantes às originais (característica de tumor benigno), foram identificadas em 50 e 75 $\mu\text{g L}^{-1}$ de clorotalonil (Fig 2E) e em 10, 25 e 75 $\mu\text{g L}^{-1}$ de diclofluanida, sendo as maiores frequências detectadas na maior concentração de ambos os biocidas, 100% em clorotalonil 75 $\mu\text{g L}^{-1}$ e 40% em diclofluanida 75 $\mu\text{g L}^{-1}$ (Tabela 2).

3.2.5. Alterações no intestino causadas pelo clorotalonil

O intestino dos peixes expostos ao clorotalonil 10 $\mu\text{g L}^{-1}$ assemelhou-se aos dos controles, com ausência de alterações na maioria dos peixes. Frequências significativas de indivíduos com alterações moderadas e severas foram detectadas a partir de 25 $\mu\text{g L}^{-1}$ e o desenvolvimento de tumores a partir de 50 $\mu\text{g L}^{-1}$. A predominância da alteração leve (estágio I), relacionada ao formato irregular das células epiteliais e caliciformes (firc) mostrou uma tendência a ausência da integridade celular (Fig. 5D, 5G e 5H) (Tabela 3). Das alterações moderadas (estágio II) as hiperplasias epiteliais (hppep) (Fig. 5E) e conjuntivas (lâmina própria) (hpplp) (Fig. 5F) foram as mais frequentes nos peixes expostos a 25, 50 e 75 $\mu\text{g L}^{-1}$. As células caliciformes também se apresentaram bastantes hipertróficas nessas concentrações (Fig. 5B, 5H). Em relação às maiores frequências de alterações severas (estágio III) a necrose epitelial intestinal (necep) (Fig. 5E) e a infiltração leucocitária (leuc) com agregados macrofágicos (Fig. 5G) foram detectadas a partir de 80% dos indivíduos nos tratamentos 25, 50 e 75 $\mu\text{g L}^{-1}$, sendo que a maior frequência, relativo ao controle, foi verificada nos peixes expostos a 75 $\mu\text{g L}^{-1}$. Em todas as camadas do intestino as alterações severas mostraram maior severidade em 75 $\mu\text{g L}^{-1}$ (Tabela 3) (Fig. 5). Uma resposta inflamatória progressiva e hiperplásica foi identificada entre as camadas epitelial, conjuntiva e muscular, que conferiu uma condição crônica no intestino, semelhante a um tumor, em indivíduos de 50 e 75 $\mu\text{g L}^{-1}$ (Fig. 6A, 6B) (Tabela 3). Foram identificadas várias inclusões de agregados macrofágicos e outras infiltrações leucocitárias sobre a camada epitelial e conjuntiva, juntamente com a perda da aparência colunar das células epiteliais, e substituição dessas células por outras distintas das originais, compondo assim um tecido hiperplásico disforme e inflamatório. Além disso,

áreas próximas ao tumor apresentaram necrose com perda das vilosidades e um muco distinto sobre os tecidos (Fig. 6A).

Com base na análise do índice de alterações histopatológicas intestinais, o IAHEI epitelial mostrou uma tendência de aumento concentração dependente nas lesões teciduais epiteliais, sendo 30, 49 e 64 vezes maior em 25, 50 e 75 $\mu\text{g L}^{-1}$ em relação ao controle, ANOVA $F_{19,5} = 15,9$, $p \leq 0,001$, Dunnett, $p < 0,05$). O IAHCI e o IAHMI foram significativos em 50 e 75 $\mu\text{g L}^{-1}$ em relação ao controle com ANOVA_{IAHCI} $F_{17,5} = 4,4$, $p = 0,009$, Dunnett, $p < 0,05$ e ANOVA_{IAHMI} $F_{20,5} = 3,6$, $p = 0,01$, Dunnett, $p < 0,05$, respectivamente. O índice integrado de lesões da mucosa intestinal (IMI) mostrou um aumento significativo de lesões intestinais nos juvenis expostos a 25, 50 e 75 $\mu\text{g L}^{-1}$ (IMI, ANOVA $F = 51,7$, $p \leq 0,001$. Dunnett' $p < 0,05$) (Fig.7A).

3.2.6 Alterações no intestino causadas pela diclofluanida

Para as alterações intestinais dos peixes expostos à diclofluanida foi verificado um aumento concentração dependente nas frequências de alterações leves (estágio I) relacionadas à dilatação da camada da lâmina própria (dilp) (Fig. 5C) (Tabela 3). Dentre as alterações moderadas (estágio II), incluem as hipertrofias (hptm) e hiperplasias (hppm) na camada muscular que conferiram uma aparência espessa ao tecido desde 10 $\mu\text{g L}^{-1}$. A hipertrofia da lâmina própria (hptlp) também foi frequente em todas as concentrações, atingindo 100% em 25 $\mu\text{g L}^{-1}$ (Tabela 3). Alterações severas (estágio III) também foram detectadas, incluindo áreas epiteliais necróticas semelhantes às encontradas em clorotalonil, porém com um grau de extensão menor. A área inflamatória e hiperplásica indentificada como tumor (Figura 6C) também apresentava desconfiguração das células epiteliais colunares e a proliferação de células distintas das originais entre a camada da lâmina própria e epitelial.

Com base na análise dos três índices de alterações histopatológicas intestinais, foi verificado um aumento concentração dependente dos três índices, IAHEI, IAHCI e IAHMI, e um aumento significativo na concentração de 75 $\mu\text{g L}^{-1}$ em relação ao controle. O índice integrado de lesões da mucosa intestinal IMI apresentou um aumento significativo na severidade de lesões intestinais, em relação ao controle, nos juvenis expostos a todas as concentrações, 10, 25, 50 e 75 $\mu\text{g L}^{-1}$ de diclofluanida (Fig. 7B, ANOVA $F_{73,5} = 14,1$, $p < 0,001$. Dunnett' $p < 0,05$).

3.3 VELOCIDADE DE NATAÇÃO ESPONTÂNEA

A velocidade média de natação espontânea (ANOVA $F_{40,5} = 0.54$, $p = 0.74$), o percentual de tempo parado (ANOVA $F_{40,5} = 1.08$, $p = 0.38$), e o tempo de natação rápida (ANOVA $F_{40,5} = 1.06$, $p = 0.40$), não apresentaram diferenças significativas para os peixes expostos ao clorotalonil em comparação ao controle (Tabela 4). A análise da natação dos peixes expostos a diclofluanida indicou um aumento significativo de 48% na velocidade média de natação espontânea nos peixes expostos a $50 \mu\text{g L}^{-1}$ de diclofluanida em relação aos controles (ANOVA $F_{48,5} = 3.02$, $p = 0.019$, Dunnett, $p < 0.05$) (ANOVA $F_{47,5} = 30.09$, $p < 0.001$, Dunnett's $p < 0.05$). O percentual de tempo em movimentação rápida também mostrou um aumento significativo (3 vezes maior) nos peixes expostos a $50 \mu\text{g L}^{-1}$ e $75 \mu\text{g L}^{-1}$ de diclofluanida, respectivamente, com uma redução significativa no percentual de tempo de repouso nesses peixes (ANOVA $F_{50,5} = 49.9$, $p < 0.001$, Dunnett's $p < 0.05$) (Tabela 4).

3.4 DISTÂNCIAS PERCORRIDAS E EXPLORAÇÃO DA ARENA DE NATAÇÃO

A distância percorrida na trajetória de natação dos peixes expostos ao clorotalonil também não apresentou diferenças significativas em relação ao controle (Fig.8A, ANOVA $F_{40,5} = 0.35$, $p = 0.88$). A trajetória dos peixes expostos aos tratamentos de clorotalonil apresentou um padrão de exploração em toda área da arena, semelhante ao controle (Fig.8C). Para diclofluanida, a distância percorrida mostrou um aumento significativo de 48% nos peixes expostos a $50 \mu\text{g L}^{-1}$ em relação ao controle (Fig. 8B, ANOVA $F_{47,5} = 30.09$, $p < 0.001$, Dunnett, $p < 0.05$). A trajetória dos peixes expostos a $50 \mu\text{g L}^{-1}$ indicou uma maior exploração de toda a arena quando comparada ao controle (Fig.8D).

3.5 NÚMEROS DE PRESAS CAPTURADOS DIARIAMENTE

A exposição diária de juvenis de *P. vivipara* a $75 \mu\text{g L}^{-1}$ de clorotalonil promoveu redução significativa de 79,9% na captura diária de náuplios em relação ao controle (Kruskal-Wallis $H_5 = 22,0$, $p = 0,001$; Dunn's, $p < 0,05$) (Fig. 9A). Quanto aos indivíduos expostos às concentrações de diclofluanida, não foi observada diferença estatisticamente significativa no número de náuplios capturados (Kruskal-Wallis $H_5 = 5,18$, $p = 0,393$) (Fig.9B).

3.6 CRESCIMENTO

No início da exposição ao clorotalonil e diclofluanida, o peso inicial dos peixes foi igual a $6,5 \pm 0,001$ mg, e o comprimento total foi igual a $9,5 \pm 0,002$ mm (média $\pm$ desvio padrão). Foi verificada uma redução de 71,4% no incremento em biomassa de *P. vivipara* expostos ao clorotalonil em $75 \mu\text{g L}^{-1}$ em relação ao controle (Kruskal-Wallis $H_5 = 10,78$; $p = 0,056$) (Fig.10A). Não foi detectada diferença significativa no incremento da biomassa para diclofluanida (Kruskal-Wallis $H_5 = 4,3$, $p = 0,503$) (Fig.10B). Por outro lado, foram encontradas reduções significativas de 42,1% e 52,6% no incremento em comprimento de *P. vivipara* expostos a 25 e $50 \mu\text{g L}^{-1}$ de clorotalonil em relação ao controle (ANOVA $F_{39,5} = 2,6$, $p = 0,038$; Dunnett's $p < 0,05$) (Fig.10C). No incremento em comprimento de *P. vivipara* expostos a diclofluanida não foi detectada diferença estatisticamente significativa em relação ao controle (ANOVA $F_{48,5} = 0,75$, $p = 0,58$) (Fig.10D).

4 DISCUSSÃO

A sensibilidade de peixes expostos ao clorotalonil expressa pela CL50-96h varia de $8,2 \mu\text{g L}^{-1}$ na espécie mais sensível *Pseudaphritis urvillii* até $110 \mu\text{g L}^{-1}$ na mais resistente *Oryzias melastigma* (Caux et al., 1996; Amara et al., 2018). Juvenis de *P. vivipara*, com 7 dias de vida após a exposição, apresentaram uma CL50-96h estimada em $56,9 \mu\text{g L}^{-1}$ para o clorotalonil, o que sugere uma sensibilidade intermediária do estágio de vida testado neste trabalho. Não foi possível estimar a CL50-96h para a diclofluanida neste estudo, e foi detectada uma taxa de mortalidade de 30% na concentração $25 \mu\text{g L}^{-1}$, que não apresentou tendência dose dependente, uma vez que não foi verificada mortalidade nas concentrações de 50 e $75 \mu\text{g L}^{-1}$. Os resultados deste estudo indicam uma menor toxicidade letal da diclofluanida comparado ao clorotalonil para juvenis de *Poecilia vivipara*. Revisões comparativas analisando a toxicidade letal de diferentes compostos antiincrustantes têm indicado que a diclofluanida apresenta menor potência tóxica para letalidade quando comparada a outros agentes antiincrustantes (Amara et al., 2018). Em peixes a CL50-96h para diclofluanida varia de $11 \mu\text{g L}^{-1}$ na espécie mais sensível *Oncorhynchus mykiss* a $120 \mu\text{g L}^{-1}$ para a espécie mais resistente *Leuciscus idus melanotus* (van Wezel and van Vlaardingen 2004). Embora seja relevante a caracterização do potencial tóxico letal de contaminantes para o fornecimento de medidas de sensibilidade da espécie, efeitos subletais em indivíduos que

sobrevivem a exposições agudas ou crônicas é que fornecem informações importantes sobre possíveis mecanismos de toxicidade em situações realistas de exposição ambiental.

Os resultados histopatológicos do fígado de *P. vivipara* evidenciaram que clorotalonil e diclofluanida podem induzir severa toxicidade hepática a partir das lesões observadas (inflamação hemato-hepática, esteatose e de depleção de fontes energéticas no fígado, agregados macrofágicos e indícios de fibrose). O índice IAHH mostrou uma tendência concentração dependente no agravamento das lesões hepáticas nos indivíduos expostos ao clorotalonil (Fig. 4A) e à diclofluanida (Fig. 4B), sendo que é evidente a maior potência hepatotóxica do clorotalonil e indução de alterações mais severas comparadas à diclofluanida. O valor médio do índice IAHH em $75 \mu\text{g L}^{-1}$ de clorotalonil mostrou que as lesões estão acima da capacidade regenerativa do órgão (≥ 100), embora lesões significativas também tenham sido evidenciadas em 25 e $50 \mu\text{g L}^{-1}$. No caso da diclofluanida, os valores médios do IAHH (≤ 100) sugerem que as lesões presentes nos fígados ainda são potencialmente reversíveis em caso de depuração e eliminação do contaminante.

As respostas hemato-hepáticas no fígado dos indivíduos expostos mostraram o desenvolvimento de reação inflamatória no órgão em diferentes concentrações de ambos os biocidas, com indícios de hiperemia nos tratamentos com clorotalonil, e o efeito da extensa dilatação sinusoidal identificada principalmente em 50 e $75 \mu\text{g L}^{-1}$ de diclofluanida. A presença de agregados macrofágicos tem sido muito bem estabelecida quanto a processos inflamatórios por poluentes e como biomarcador de ambientes impactados como relatam alguns autores (Agius and Roberts, 2003; Fishelson, 2006; Fournie et al., 2001; Troncoso et al., 2012) e adicionalmente a ocorrência de outras infiltrações leucocitárias em locais afetados e o desenvolvimento de alterações vasculares hepáticas e hemorragias (Fig. 2B, 3A e 3B) evidenciam esse processo (Wolf and Wolfe 2005; Wolf and Wheeler 2018).

Em peixes, os hepatócitos tendem a possuir glicogênio ou vacúolos lipídicos como fonte secundária de energia (Wolf and Wolfe 2005; Yarpuzlu et al., 2014), sendo que, em peixes em estágio inicial de vida à presença de reserva energética de glicogênio nos hepatócitos pode ser considerada uma condição normal (Yasutake and Wales, 1981; Yang et al., 2015). Entretanto, distúrbios no armazenamento ou consumo de glicogênio ou lipídio nos hepatócitos podem conduzir a uma condição patológica, como verificada nos peixes expostos (Fig. 1). As altas frequências (100%) de indivíduos com hepatócitos vacuolados nas concentrações 10 e $25 \mu\text{g L}^{-1}$ de clorotalonil (Fig. 1B) sugerem a ocorrência de armazenamento energético no fígado desses peixes, enquanto que, a redução dessa frequência

em indivíduos de $75 \mu\text{g L}^{-1}$ seria provavelmente resultante do consumo dessas reservas energéticas. É provável que o aumento da concentração e da biotransformação hepática do clorotalonil possa ter contribuído para a redução de vacúolos no interior dos hepatócitos. Na exposição à diclofluanida, a maior severidade na extensão da vacuolização hepática também foi verificada em peixes expostos às concentrações de 10 e $25 \mu\text{g L}^{-1}$, semelhante ao observado nessas mesmas concentrações do clorotalonil, porém não foi verificada redução da frequência de indivíduos com essa histopatologia nas concentrações 50 e $75 \mu\text{g L}^{-1}$ como verificado nos peixes expostos ao clorotalonil (Fig. 2C, 3B). O acúmulo e /ou consumo de reservas energéticas no fígado dos peixes expostos ao clorotalonil e diclofluanida demonstra o diferente padrão de atuação destes biocidas.

Revisões comparativas mostram que o acúmulo dessas reservas energéticas no fígado, na forma de vacúolos, também foi verificado em tilápias *Oreochromis niloticus* exposto ao clorotalonil, em concentrações variando de 20 a $80 \mu\text{g L}^{-1}$ (Mahgoub and Maher, 2017), semelhantemente ao observado em *guppies* *P. vivipara* expostos as menores concentrações de 10 e $25 \mu\text{g L}^{-1}$ de clorotalonil neste trabalho. Estudos mostram ainda que essa dicotomia (acúmulo/depleção) de reservas energéticas pode estar associada à demanda metabólica do órgão no processo de detoxificação, como relatado por Wolf and Wolfe, (2005). Efeitos metabólicos do clorotalonil sobre as células pancreáticas inibem a insulina e conduzem inicialmente a hiperglicemia e a hiperlipidemia hepática em humanos contaminados (Fernández-García et al., 2014). Posteriormente conduz a uma condição de hipoglicemia e hipolipidemia hepática, se os níveis de glicose não forem restaurados (Palmer et al., 2016; Kreider, 2018), caracterizando uma condição crônica de diabetes cetoacidosa. Em diclofluanida o constante acúmulo de reservas energéticas em hiper vacúolos no fígado podem está relacionado a uma condição de estatose hepática (Hübscher, 2015).

O clorotalonil é conhecido por inibir a enzima gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GAPDH) do ciclo da glicólise e gliconeugênese, afetando diretamente a síntese de glicose e o armazenamento do glicogênio nas células (Caux et al., 1996; Sánchez Garayzar et al., 2016). Estes efeitos bioquímicos no metabolismo podem levar a lesões nas células hepáticas e pancreáticas, possivelmente relacionados à resposta ao acúmulo e depleção de reservas energéticas verificadas no fígado dos juvenis de *P. vivipara* deste estudo. O efeito apenas de acúmulo de reservas energéticas em hepatócitos também foi verificado como condição patológica em estudos com o antiicrustante tributilestanho (TBT) em *Poecilia reticulata* (Wester and Canton, 1987), em paulistinha *Danio rerio* (Zhang et al., 2016) e em *Rhamdia*

quelen (Oliveira et al., 2015), bem como desordem metabólica na gênese de lipídios em larvas de *D. rerio* (Ouadah-Boussouf and Babin 2016; Heindel et al., 2017).

Outras respostas hepatotóxicas desses compostos estão relacionadas ao desenvolvimento de inflamações e organização cordonal das células em um provável processo de fibrose nos peixes expostos a 50 e 75 $\mu\text{g L}^{-1}$, tanto de clorotalonil quanto de diclofluanida (Fig. 1D), com multiplicação de pequenos vasos e infiltração de leucócitos em áreas com um parênquima fibroso. Alterações ductulares e no trato biliar-vascular podem ter origem inflamatória ou tóxica (Clouston et al., 2005; Hübscher, 2015), e sabendo que essa região de vasos e ductos corresponde a canais de entrada e saída do contaminante, com liberação dos resíduos tóxicos do metabolismo celular, essa área torna-se muito suscetível a contaminantes tóxico hepático (Sousa et al., 2018). As alterações ductulares identificadas podem estar associadas a um processo regenerativo-fibrótico na área lesionada, evidenciando a toxicidade do clorotalonil e diclofluanida, ou dos resíduos metabólicos desses compostos sobre a área hepática ductular (Fig. 1D e Fig. 2B1) Foi verificado em estudo com *Salmo gairdneri* que a vesícula biliar e fígado são alguns dos órgãos que mais bioacumulam o clorotalonil (Davies and White, 1985), sendo razoável supor que estas patologias estejam relacionadas com a bile tóxica.

Adicionalmente, o clorotalonil e diclofluanida também induziram inflamações pancreáticas, e alterações hiperplásicas no pâncreas dos peixes expostos às concentrações 50 e 75 $\mu\text{g L}^{-1}$ de clorotalonil e em 75 $\mu\text{g L}^{-1}$ de diclofluanida (Fig. 2F). As hiperplasias são conhecidas por conduzir possíveis alterações carcinogênicas nos órgãos e a presença de áreas fibrosas e infiltração leucocitária em volta dos vasos mostram condições inflamatórias severas e indícios de desenvolvimento tumoral nesses órgãos (Fig. 2F). Estudos mostram que muitos dos tumores no pâncreas exócrino originam-se de células ductulares alteradas e que a estimulação persistente desse órgão por contaminantes podem conduzir a condições neoplásicas, com crescimento desordenado de células e desenvolvimento de neoplasias (Haschek et al., 2010).

A avaliação histológica do intestino também mostrou que esta região entérica foi muito lesionada, apresentando várias áreas com elevadas frequências de alterações em grau moderado e severo. Os índices IAHEI, IAHCI e IAHMI evidenciaram uma tendência de aumento concentração dependente na gravidade das lesões intestinais sobre a mucosa epitelial de peixes expostos ao clorotalonil desde a concentração 25 $\mu\text{g L}^{-1}$. Em relação aos mesmos índices para diclofluanida, as lesões desenvolvidas em todos os tecidos do intestino

mostraram maior gravidade principalmente em $75 \mu\text{g L}^{-1}$. A análise integrada das alterações intestinais com base no IMI evidenciou uma maior potência na severidade das lesões intestinais nos indivíduos expostos ao clorotalonil comparado a diclofluanida, baseado nos maiores valores do índice. Entretanto, os peixes foram mais sensíveis para o desenvolvimento de alterações intestinais na exposição à diclofluanida, na qual foram detectadas alterações severas significativas no IMI já a partir de $10 \mu\text{g L}^{-1}$, enquanto que no clorotalonil só apareceram em $25 \mu\text{g L}^{-1}$ (Fig. 7A e 7B).

De modo semelhante ao ocorrido nas áreas do fígado e pâncreas que têm contato direto com esses biocidas por via vascular ou ductular, o intestino dos peixes expostos ao clorotalonil e diclofluanida desenvolveram mudanças regressivas relacionadas à diminuição de seu bom funcionamento e a perda de áreas do órgão, bem como alterações progressivas relacionadas ao aumento de atividade celular e tecidual (Bernet et al., 1999). As frequências de 100 % de lesões estruturais regressivas (forma irregular dos enterócitos) identificadas no intestino dos peixes expostos a 25, 50 e $75 \mu\text{g L}^{-1}$ de clorotalonil estiveram associadas a processos de degeneração e necrose celular, hiperplasia epitelial, dilatação de vasos e a união das vilosidades como provável reação de irritação a este poluente (Fig 6) (Tabela 3). Essas alterações estruturais nas células epiteliais também foram identificadas com maior frequência em indivíduos expostos a $75 \mu\text{g L}^{-1}$ diclofluanida.

O desenvolvimento de alterações intestinais como as verificadas nesse estudo também foram observadas em trabalhos desenvolvidos com organoclorados, inclusive com a diclofluanida em ratos, onde a hiperplasia, a necrose das vilosidades, e a redução na altura das vilosidades foram muito frequentes e consideradas como irritação da mucosa pela toxicidade (Gordon, 2010). Outras alterações como a hipetrofia de células caliciformes, e a presença de muco no lúmen intestinal também podem evidenciar essa irritação entérica (Fig. 6), sendo respostas adaptativas teciduais induzidas por contaminantes (Bernet et al., 1999; Barišić et al., 2018).

O desenvolvimento de tumores e necroses epiteliais e da lâmina-própria identificadas neste estudo, principalmente nas concentrações 50 e $75 \mu\text{g L}^{-1}$ de clorotalonil (Fig. 6A e 6B), e em $75 \mu\text{g L}^{-1}$ de diclofluanida (Fig. 6C), provavelmente são consequências de inflamações induzidas pelo clorotalonil e diclofluanida (Fig 5G, 5H, 6A, 6C). É sabido que áreas inflamatórias podem conduzir o desenvolvimento de hiperplasias com mutiplicação de células e formação de tumores (Costa, 2018), e que áreas com infiltração leucocitária representam a primeira fase de resposta imunológica em situações de morte celular e recuperação do tecido

(Barišić et al., 2018). Estudos com o clorotalonil mostram que lesões necróticas agudas sobre o epitélio intestinal de bagres *Ictalurus punctatus* foram verificadas em mais da metade dos indivíduos expostos a $42 \mu\text{g L}^{-1}$ (Gallagher et al., 1992), e entre os efeitos carcinogênicos do clorotalonil incluem indução de tumores gástricos em ratos, e desenvolvimento de neoplasias nos rins e no estômago em humanos (Caux et al., 1996), evidenciando assim, seu potencial de toxicidade sobre esse tecido neste trabalho. Para a diclofluanida há estudos mostrando sua citotoxicidade (Suzuki et al., 2004), e ausência de potencial efeito carcinogênico para camundongos (Gordon, 2010).

O desenvolvimento dessas alterações intestinais e dos prováveis tumores pode estar relacionado à exposição ao contaminante na bile, uma vez que a bile, resultante de processos de biotransformação no fígado, auxilia na degradação de lipídios no intestino e tem contato direto com tecido, além disso, neoplasias podem ser induzidas pela exposição a compostos tóxicos carcinogênicos. Adicionalmente, estudos também mostram que a bioacumulação do clorotalonil em *Salmo gairdneri* na bile atingiu concentração 114 vezes maior que no fígado e intestino, com fator de concentração em 96 horas de 437×10^3 na bile, de $3,9 \times 10^3$ no fígado e de $4,3 \times 10^3$ no intestino, sendo provável uma reciclagem via sistema digestivo para explicar a taxa de liberação constante de metabólitos nesse órgão (Davies and White, 1985). A biotransformação de ambos compostos biocidas deste estudo produzem metabólitos que podem ser mais potentes que os seus precursores (van Wezel and van Vlaardingen 2004; Zhang et al., 2016), corroborando a possibilidade de estes tumores terem se desenvolvido pela exposição a estes compostos presentes nos ductos biliares.

O comportamento natatório de peixes também pode ser facilmente modificado pela presença de contaminantes na água (Goundadkar and Katti, 2017), afetando consequentemente comportamentos que são centrais para processos vitais, como o de busca de recursos e as respostas de fuga e predação (Baatrup and Bayley, 1998). Neste estudo, alterações no padrão de natação dos peixes expostos a $50 \mu\text{g L}^{-1}$ de diclofluanida (48%) mostraram uma condição de ansiedade, provavelmente induzida por esse contaminante. Embora houvesse o comportamento ativo nesses indivíduos, não tenha sido verificada tigmotaxia, ou preferência pelas bordas da arena, que geralmente é evidenciado em peixes com picos de ansiedade (Ji et al., 2017). Um padrão comportamental bem distinto, caracterizado por letargia foi verificado em recém-nascidos de *P. vivipara* exposta ao antiicrustante tributilestanho (capítulo 1 desta tese). Existem evidências de que altos níveis de dopamina estejam relacionados à hiperatividade (Ji et al., 2017), e é necessário avaliar em

estudos futuros se a hiperatividade verificada nos peixes expostos a $50 \mu\text{g L}^{-1}$ de diclofluanida tem relação com os níveis de dopamina.

Embora não tenham sido detectadas alterações comportamentais neste estudo após exposição de *P. vivipara* ao clorotalonil, estudos comportamentais com *D. rerio* expostos a esse biocida mostraram indução de hiperatividade dos indivíduos logo após a exposição, com redução da atividade em 96h de exposição (Sánchez-Garayzar et al., 2016). Como a avaliação da natação de *P. vivipara* aos biocidas estudados só foi realizada após 96 horas de exposição é possível que o comportamento natatório dos peixes já estivesse atingido uma adaptação, semelhante ao ocorrido em *D. rerio* após 96 horas.

Com relação ao comportamento alimentar dos indivíduos expostos ao clorotalonil, à redução significativa de 79% na taxa de ingestão diária de náuplios verificada em indivíduos expostos a $75 \mu\text{g L}^{-1}$ pode estar relacionada a pouca exploração do ambiente para o forrageamento, como mostra o mapa de trajetória de natação, ou outros fatores como a falta de apetite ou inabilidade para capturar as presas (Carvalho, 2014). Outro aspecto pode estar relacionado ao efeito enterohepatotóxico (inflamações hepáticas, pancreáticas e tumor intestinal) observadas nos indivíduos desse estudo. A redução gradual de captura de náuplios ocorrida nos tratamentos com clorotalonil podem ser uma resposta de inapetência devido às graves lesões no fígado, pâncreas e intestino. Alterações na eficiência para captura de presas são ecologicamente relevantes, pois podem comprometer a conversão de energia para o desenvolvimento corpóreo dos peixes, e com isso aumentar a susceptibilidade à predação por piscívoros (Weis et al., 2003). Os indivíduos expostos a diclofluanida não apresentaram diferenças no comportamento alimentar em relação ao controle.

Alterações no crescimento também foram identificadas nesse estudo, e têm sido consideradas como indicadores relevantes de saúde de peixes (Du Gas et al., 2017). O efeito reducional não monotônico verificado no tamanho dos indivíduos expostos à 25 e $50 \mu\text{g L}^{-1}$ de clorotalonil pode estar relacionado ao efeito inibitório do clorotalonil sobre os canais de cálcio e nervos como reportado por Croft, (2013). Em estudos com larvas de *Xenopus laevis* expostos ao clorotalonil também foi relatado uma redução no tamanho da cauda, e má formação da nadadeira caudal (Yu et al., 2013). Efeito reducional no crescimento de recém-nascidos desta mesma espécie, relacionando a hipoatividade natatória e a redução na ingestão de náuplios de *Artemias*, também foi verificado em peixes expostos a $7 \mu\text{g L}^{-1}$ do antiincrustante TBT (capítulo 1 desta tese). Esses resultados podem ajudar a explicar como alterações estruturais no nível histológico e alterações em habilidades comportamentais

podem afetar a sobrevivência e recrutamento de peixes expostos a esses contaminantes no ambiente aquático.

Este estudo mostrou a toxicidade do clorotalonil e diclofluanida sobre o tecido hepático (vacuolização, inflamação e fibrose), pancreático (inflamação, hiperplasia/tumor) e entérico (necrose, atrofia das vilosidades e tumor) de *P. vivipara*. Baseado nos índices usados (IAHH, IAHI e IMI) fica evidente um maior desenvolvimento de lesões potencialmente irreversíveis em peixes expostos ao clorotalonil a partir de $50 \mu\text{g L}^{-1}$ e a partir $75 \mu\text{g L}^{-1}$ para diclofluanida, embora o índice geral de lesões intestinais IMI tenha mostrado maior sensibilidade para desenvolvimento de lesões intestinais nos indivíduos expostos à diclofluanida. Dos órgãos avaliados o intestino mostrou-se mais sensível para o desenvolvimento de alterações graves como necrose e tumores, seguido do pâncreas e fígado na exposição ao clorotalonil e diclofluanida, sendo o biocida clorotalonil mais potente para indução de severidade nas lesões. As alterações no comportamento alimentar corroboram com a toxicidade do clorotalonil em $75 \mu\text{g L}^{-1}$. Esses resultados podem ajudar a explicar como alterações estruturais e comportamentais podem afetar a sobrevivência e desenvolvimento de peixes juvenis expostos a esses contaminantes no ambiente aquático.

5 CONCLUSÃO

O estágio inicial de vida de *Poecilia vivipara* mostrou-se como um modelo sensível para a ecotoxicologia de peixes tropicais, uma vez que foi possível verificar efeito enterohepatotóxico observado através da severidade de alterações histopatológicas moderadas e severas no fígado, pâncreas e intestino dos peixes expostos aos antiincrustantes clorotalonil e diclofluanida. O clorotalonil mostrou-se consideravelmente mais tóxico que a diclofluanida, contribuindo para o desenvolvimento de lesões crônicas e tumores que alteram o funcionamento normal desses órgãos. Para os parâmetros comportamentais (natação e captura de presas) e crescimento dos indivíduos expostos, o clorotalonil também se mostrou mais tóxico, embora a diclofluanida também tenha desempenhado toxicidade sobre a natação dos peixes, promovendo hiperatividade nos indivíduos. Desta forma, os diferentes compostos antiincrustantes podem induzir diferentes respostas tóxicas nos organismos contaminados. Este conjunto de resultados auxiliará na compreensão dos potenciais efeitos deletérios a nível letal e subletal que estes compostos podem causar em peixes em estágio inicial de vida. Estudos complementares de acompanhamento do desenvolvimento desses peixes expostos a

esses organoclorados em intervalo mais prolongado de tempo tornam-se interessante para acessar efeitos crônicos na presença dessas substâncias no ambiente.

AGRADECIMENTOS

Este trabalho foi apoiado pela FINEP (CT-Hidro 1111/13 - AIBRASIL2), CNPq (concessão CT Aquaviário 456372 / 2013-0). Driele V. Paulo foi patrocinada por uma bolsa de doutorado da Fundação de Amparo a Ciência e Tecnologia de Pernambuco - FACEPE. Paulo SM Carvalho é bolsista de pesquisa do CNPq do Brasil (Bolsa 312308 / 2016-7). Os autores agradecem ao Dr. Fábio Flores Lopes (Laboratório de Histologia da Universidade Estadual de Santa Cruz-BA), ao Centro de Tecnologias Estratégicas do Nordeste (CETENE) e ao Laboratório de Histologia da UFPE pelo fornecimento de infraestrutura e equipamentos para análise histológica e a todos os alunos que contribuíram durante exposições experimentais e testes em especial a Maria Karolaine Alves, Célio Mariz, Rômulo Nepomuceno e Daiana Aquino e para revisores desconhecidos que ajudaram a aumentar a qualidade desta publicação.

6 REFERÊNCIAS

- Amara, I., Miled, W., Slama, R.B., Ladhari, N., 2018. Antifouling processes and toxicity effects of antifouling paints on marine environment. A review. *Environmental Toxicology and Pharmacology* 57, 115-130.
- Agius, C., Roberts, R.J., 2003. Melano-macrophage centres and their role in fish pathology. *J. Fish Dis.* 26, 499–509.
- Arcanjo, R.B., de Souza, L.P., Rezende, C.F., Silva, J.R.F., 2014. Embryonic development and nourishment in the viviparous fish *Poecilia vivipara* (Cyprinodontiformes: Poeciliidae). *Acta Zoologica* 95, 493-500.
- Baatrup, E., Bayley, M., 1998. Animal locomotor behaviour as a health biomarker of chemical stress. *Archives of Toxicology Supplement*, Vol. 20, 163-178.
- Barišić, J., Filipović Marijić, V., Mijošek, T., Čož-Rakovac, R., Dragun, Z., Krasnići, N., Ivanković, D., Kružlicová, D., Erk, M., 2018. Evaluation of architectural and histopathological biomarkers in the intestine of brown trout (*Salmo trutta* Linnaeus, 1758) challenged with environmental pollution. *Science of The Total Environment* 642, 656-664.

- Batista-Andrade, J.A., Caldas, S.S., de Oliveira Arias, J.L., Castro, I.B., Fillmann, G., Primel, E.G., 2016. Antifouling booster biocides in coastal waters of Panama: First appraisal in one of the busiest shipping zones. *Marine Pollution Bulletin* 112, 415-419.
- Bernet, D., Schmidt, H., Meier, W., Burkhardt-Holm, P., Wahli, T., 1999. Histopathology in fish: proposal for a protocol to assess aquatic pollution *Journal of Fish Diseases* 22, 25-34.
- Carvalho, S.M.P., 2014. Behavioral Biomarkers and Pollution Risks to Fish Health and Biodiversity. in: Azeiteiro, E.A., Ribeiro, C.A.O. (Eds.). *Pollution and Fish Health in Tropical Ecosystems*, pp. 350-377.
- Castro, Í.B., Westphal, E., Fillmann, G., 2011. Tintas anti-incrustantes de terceira geração: novos biocidas no ambiente aquático. *Química Nova* 34, 1021-1031.
- Caux, P.Y., Kent, R.A., Fan, G.T., Stephenson, G.L., 1996. Environmental fate and effects of chlorothalonil: A Canadian perspective. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology* 26, 45-93.
- Clouston, A.D., Powell, E.E., Walsh, M.J., Richardson, M.M., Demetris, A.J., Jonsson, J.R., 2005. Fibrosis correlates with a ductular reaction in hepatitis C: Roles of impaired replication, progenitor cells and steatosis. *Hepatology* 41, 809-818.
- Costa, P.M., 2018. Chapter 6 - Identification of Major Histopathological Traits. in: Costa, P.M. (Ed.). *The Handbook of Histopathological Practices in Aquatic Environments*. Academic Press, pp. 135-190.
- Croft, W., 2013. Let the truth be known in: Operation Synapse. in: House, A. (Ed.). *Operation Synapse*.
- Davies, P.E., 1987. Physiological, anatomic and behavioural changes in the respiratory system of *Salmo gairdneri* Rich. On acute and chronic exposure to chlorothalonil. *Comparative Biochemistry and Physiology - C Pharmacology Toxicology and Endocrinology* 88, 113-119.
- Davies, P.E., White, R.W.G., 1985. The toxicology and metabolism of chlorothalonil in fish. I. Lethal levels for *Salmo gairdneri*, *Galaxias maculatus*, *G. truttaceus* and *G. auratus* and the fate of ¹⁴C-TCIN in *S. gairdneri*. *Aquatic Toxicology* 7, 93-105.
- Du Gas, L.M., Ross, P.S., Walker, J., Marlatt, V.L., Kennedy, C.J., 2017. Effects of atrazine and chlorothalonil on the reproductive success, development, and growth of early life stage sockeye salmon (*Oncorhynchus nerka*). *Environmental Toxicology and Chemistry* 36, 1354-1364.
- Fernández-García, J.C., Arrebola, J.P., González-Romero, S., Soriguer, F., Olea, N., Tinahones, F.J., 2014. Diabetic ketoacidosis following chlorothalonil poisoning. *Occupational and Environmental Medicine* 71, 382.
- Fishelson, L., 2006. Cytomorphological alterations of the thymus, spleen, head-kidney, and liver in cardinal fish (Apogonidae, Teleostei) as bioindicators of stress. *Journal Morphology* 267, 57-69.

- Fournie, J.W., Summers, J.K., Courtney, L.A., Engle, V.D., Blazer, V.S., 2001. Utility of splenic macrophage aggregates as an indicator of fish exposure to degraded environments. *Journal Aquatic Animal Health* 13, 105–116.
- Gallagher, E.P., Cattley, R.C., Di Giulio, R.T., 1992. The acute toxicity and sublethal effects of chlorothalonil in channel catfish (*Ictalurus punctatus*). *Chemosphere* 24, 3-10.
- Genten, F., 2009. *Atlas of Fish Histology*. , Boca Raton: CRC Press.
- Gomes Jr, J.L., Monteiro, L.R., 2008. Morphological divergence patterns among populations of *Poecilia vivipara* (Teleostei Poeciliidae): Test of an ecomorphological paradigm. *Biological Journal of the Linnean Society* 93, 799-812.
- Gordon, E.B., 2010. Chapter 90 - Captan and Folpet A2 - Krieger, Robert. *Hayes' Handbook of Pesticide Toxicology* (Third Edition). Academic Press, New York, pp. 1915-1949.
- Goundadkar, B.B., Katti, P., 2017. Environmental estrogen(s) induced swimming behavioural alterations in adult zebrafish (*Danio rerio*). *Environmental Toxicology and Pharmacology* 54, 146-154.
- Guardiola, F.A., Cuesta, A., Meseguer, J., Esteban, M.A., 2012. Risks of using antifouling biocides in aquaculture. *International Journal of Molecular Sciences* 13, 1541-1560.
- Haschek, W.M., Rousseaux, C.G., Wallig, M.A., 2010. Chapter 10 - Pancreas. in: Haschek, W.M., Rousseaux, C.G., Wallig, M.A. (Eds.). *Fundamentals of Toxicologic Pathology* (Second Edition). Academic Press, San Diego, pp. 237-260.
- Heindel, J.J., Blumberg, B., Cave, M., Machtinger, R., Mantovani, A., Mendez, M.A., Nadal, A., Palanza, P., Panzica, G., Sargis, R., Vandenberg, L.N., vom Saal, F., 2017. Metabolism disrupting chemicals and metabolic disorders. *Reproductive Toxicology* 68, 3-33.
- Hinton, D.E., Segner, H., Braunbeck, T., Schlenk, D., Benson, W.H., 2001. Toxic responses of the liver
in: Francis, T. (Ed.). *Target Organ Toxicity in Marine and Freshwater Teleosts*, London, p. 395.
- Hübscher, S.G., 2015. Histological assessment of the liver. *Medicine* 43, 568-572.
- Ji, Y., Lin, J., Peng, X., Liu, X., Li, F., Zhang, Y., Guo, N., Li, Q., 2017. Behavioural responses of zebrafish larvae to acute ethosuximide exposure. *Behavioural Pharmacology* 28, 428-440.
- Konstantinou, I.K., Albanis, T.A., 2004. Worldwide occurrence and effects of antifouling paint booster biocides in the aquatic environment: a review. *Environment International* 30, 235-248.
- Koutsafitis, A., Aoyama, I., 2007. Toxicity of four antifouling biocides and their mixtures on the brine shrimp *Artemia salina*. *Science of The Total Environment* 387, 166-174.

Kreider, K.E., 2018. Updates in the Management of Diabetic Ketoacidosis. *The Journal for Nurse Practitioners* 14, 591-597.

Machado, A.A.S., Hoff, M.L.M., Klein, R.D., Cardozo, J.G., Giacomini, M.M., Pinho, G.L.L., Bianchini, A., 2013. Biomarkers of waterborne copper exposure in the guppy *Poecilia vivipara* acclimated to salt water. *Aquatic Toxicology* 138-139, 60-69.

Mahgoub, H., Maher El-adl, M.A., 2017. Histopathological alterations and oxidative stress damage caused by short-term chlorothalonil administration in Nile Tilapia. *Egyptian Journal of comparative pathology and clinical pathology* 30, 25-38.

Mattos, J.J., Siebert, M.N., Luchmann, K.H., Granucci, N., Dorrington, T., Stoco, P.H., Grisard, E.C., Bainy, A.C.D., 2010. Differential gene expression in *Poecilia vivipara* exposed to diesel oil water accommodated fraction. *Marine Environmental Research* 69, S31-S33.

McKim, J.M., 1977. Evaluation of Tests with Early Life Stages of Fish for Predicting Long-Term Toxicity. *Journal of the Fisheries Research Board of Canada* 34, 1148-1154.

Oliveira, H.H.P., Liebel, S., Rossi, S.C., Azevedo, A.C.B., Barrera, E.A.L., Garcia, J.R.E., Grötzner, S.R., Neto, Francisco F., Randi, M.A.F., Ribeiro, C.A.O., 2015. Mixtures of benzo(a)pyrene, dichlorodiphenyltrichloroethane and tributyltin are more toxic to neotropical fish *Rhamdia quelen* than isolated exposures. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 122, 106-115.

Onduka, T., Kakuno, A., Kono, K., Ito, K., Mochida, K., Fujii, K., 2012. Toxicity of chlorothalonil to marine organisms. *Fisheries Science* 78, 1301-1308.

Palas, S., Sandipan, P., Aloke Kumar, M., Tarakeshwar, S., Debraj, K., Apurba, R.G., 2016. Gastrointestinal Pathology in Freshwater Fish, *Oreochromis niloticus* (Linnaeus) Under Almix Exposure. *Journal of Environmental & Analytical Toxicology* 6, 399.

Palmer, B.F., Clegg, D.J., Taylor, S.I., Weir, M.R., 2016. Diabetic ketoacidosis, sodium glucose transporter-2 inhibitors and the kidney. *Journal of Diabetes and its Complications* 30, 1162-1166.

Paulo, D.V., Fontes, F.M., Flores-Lopes, F., 2012. Histopathological alterations observed in the liver of *Poecilia vivipara* (Cyprinodontiformes: Poeciliidae) as a tool for the environmental quality assessment of the Cachoeira River, BA. *Brazilian Journal of Biology* 72, 131-140.

Poleksic, V., Mitrovic-Tutundzic, V., 1994. Fish gills as a monitor of sublethal chronic effects of pollution. in: Lloyd, R.M.R. (Ed.). *Sublethal Chronic effects of Pollutants on Freshwater Fish*. Cambridge. Cambridge University Press. UK, Cambridge, pp. 339 -352.

Rocha, T.L., Carvalho, R., Yamada, A.T., Sabóia-Morais, S.M.T., 2010. Morphologic analysis of developmental phases and gill ontogenesis in neotropical species *Poecilia vivipara* (cyprinodontiformes: Poeciliidae) exposed to different salinities. *Zoologia* 27, 554-562.

Sánchez-Garayzar, A.B., Betancourt, M., Martyniuk, C.J., Munkittrick, K.R., Almazan, P., Mejia-Ruiz, H., Garcia-Gasca, A., Soto, S., 2016. Molecular, biochemical and behavioral

effects of the pesticide chlorothalonil in the zebrafish (*D. rerio*). *Toxicology Letters* 259, Supplement, S224.

Sánchez-Rodríguez, Á., Sosa-Ferrera, Z., Santana-del Pino, Á., Santana-Rodríguez, J.J., 2011a. Probabilistic risk assessment of common booster biocides in surface waters of the harbours of Gran Canaria (Spain). *Marine Pollution Bulletin* 62, 985-991.

Sánchez-Rodríguez, Á., Sosa-Ferrera, Z., Santana-Rodríguez, J.J., 2011b. Applicability of microwave-assisted extraction combined with LC-MS/MS in the evaluation of booster biocide levels in harbour sediments. *Chemosphere* 82, 96-102.

Sánchez Garayzar, A.B., Bahamonde, P.A., Martyniuk, C.J., Betancourt, M., Munkittrick, K.R., 2016. Hepatic gene expression profiling in zebrafish (*Danio rerio*) exposed to the fungicide chlorothalonil. *Comparative Biochemistry and Physiology Part D: Genomics and Proteomics* 19, 102-111.

Saraiva, A., Costa, J., Serrão, J., Cruz, C., Eiras, J.C., 2015. A histology-based fish health assessment of farmed seabass (*Dicentrarchus labrax* L.). *Aquaculture* 448, 375-381.

Shuman, L.M., Smith, A.E., Bridges, D.C., 2000., 2000. Potential Movement of Nutrients and Pesticides following Application to Golf Courses. *Fate and Management of Turfgrass. Chemicals* American Chemical Society, 78-93.

Sloman, K.A., McNeil, P.L., 2012. Using physiology and behaviour to understand the responses of fish early life stages to toxicants. *Journal of Fish Biology* 81, 2175-2198.

Sousa, S., Rocha, M.J., Rocha, E., 2018. Characterization and spatial relationships of the hepatic vascular-biliary tracts, and their associated pancreocytes and macrophages, in the model fish guppy (*Poecilia reticulata*): A study of serial sections by light microscopy. *Tissue and Cell* 50, 104-113.

Suzuki, T., Nojiri, H., Isono, H., Ochi, T., 2004. Oxidative damages in isolated rat hepatocytes treated with the organochlorine fungicides captan, dichlofluanid and chlorothalonil. *Toxicology* 204, 97-107.

Thomas, K., 2009. 20 - The use of broad-spectrum organic biocides in marine antifouling paints A2 - Hellio, Claire. in: Yebra, D. (Ed.). *Advances in Marine Antifouling Coatings and Technologies*. Woodhead Publishing, pp. 522-553.

Torreiro-Melo, A.G.A.G., Silva, J.S., Bianchini, A., Zanardi-Lamardo, E., de Carvalho, P.S.M., 2015. Bioconcentration of phenanthrene and metabolites in bile and behavioral alterations in the tropical estuarine guppy *Poecilia vivipara*. *Chemosphere* 132, 17-23.

Troncoso, I.C., Cazenave, J., Bacchetta, C., Bistoni, M., de los, Á., 2012. Histopathological changes in the gills and liver of *Prochilodus lineatus* from the Salado River basin (Santa Fe, Argentina). *Fish Physiol. Biochem.* 38, 693-702.

Van Graft, M., Leeuwangh, P., 1977. The action of the fungicide triphenyltinchloride on respiration in fish liver mitochondria. *MEDED. FAK. LANDBOUWWET. R. U. GENT* 42, 1705-1714.

- van Wezel, A.P., van Vlaardingen, P., 2004. Environmental risk limits for antifouling substances. *Aquatic Toxicology* 66, 427-444.
- Voulvoulis, N., Lester, J.N., 2006. Fate of organotins in sewage sludge during anaerobic digestion. *Science of The Total Environment* 371, 373-382.
- Voulvoulis, N., Scrimshaw, M.D., Lester, J.N., 2000. Occurrence of Four Biocides Utilized in Antifouling Paints, as Alternatives to Organotin Compounds, in Waters and Sediments of a Commercial Estuary in the UK. *Marine Pollution Bulletin* 40, 938-946.
- Wester, P.W., Canton, J.H., 1987a. Histopathological study of *Poecilia reticulata* (guppy) after long-term exposure to bis(tri-n-butyltin)oxide (TBTO) and di-n-butyltindichloride (DBTC). *Aquatic Toxicology* 10, 143-165.
- Wester, P.W., Canton, J.H., 1987b. Histopathological study of *Poecilia reticulata* (guppy) after long-term exposure to bis(tri-n-butyltin)oxide (TBTO) and di-n-butyltindichloride (DBTC). *Aquatic Toxicology* 10, 143-165.
- Wester, P.W., Canton, J.H., Van Iersel, A.A.J., Krajnc, E.I., Vaessen, H.A.M.G., 1990. The toxicity of bis(tri-n-butyltin)oxide (TBTO) and di-n-butyltindichloride (DBTC) in the small fish species *Oryzias latipes* (medaka) and *Poecilia reticulata* (guppy). *Aquatic Toxicology* 16, 53-72.
- Wibe, Å.E., Nordtug, T., Jenssen, B.M., 2001. Effects of bis(tributyltin)oxide on antipredator behavior in threespine stickleback *Gasterosteus aculeatus* L. *Chemosphere* 44, 475-481.
- Wolf, J.C., Wheeler, J.R., 2018. A critical review of histopathological findings associated with endocrine and non-endocrine hepatic toxicity in fish models. *Aquatic Toxicology* 197, 60-78.
- Wolf, J.C., Wolfe, M.J., 2005. A Brief Overview of Nonneoplastic Hepatic Toxicity in Fish. *Toxicologic Pathology* 33, 75-85.
- Yang, Y., Cao, Z.-D., Fu, S.-J., 2015. Variations in temperature acclimation effects on glycogen storage, hypoxia tolerance and swimming performance with seasonal acclimatization in juvenile *Chinese crucian* carp. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology* 185, 16-23.
- Yarpuzlu, B., Ayyildiz, M., Tok, O.E., Aktas, R.G., Basdogan, C., 2014. Correlation between the mechanical and histological properties of liver tissue. *Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials* 29, 403-416.
- Yasutake, W.T., Wales, J.H. (Eds.), 1981. *Microscopic Anatomy of Salmonids: An Atlas*. Fish and Wildlife Service, Washington, D.C.
- Yebra, D.M., Kiil, S., Dam-Johansen, K., 2004. Antifouling technology-past, present and future steps towards efficient and environmentally friendly antifouling coatings. *Progress in Organic Coatings* 50, 75-104.

Yu, S., Wages, M.R., Cobb, G.P., Maul, J.D., 2013. Effects of chlorothalonil on development and growth of amphibian embryos and larvae. *Environmental Pollution* 181, 329-334.

Zhang, J., Sun, P., Kong, T., Yang, F., Guan, W., 2016a. Tributyltin promoted hepatic steatosis in zebrafish (*Danio rerio*) and the molecular pathogenesis involved. *Aquatic Toxicology* 170, 208-215.

Zhang, Q., Ji, C., Yan, L., Lu, M., Lu, C., Zhao, M., 2016b. The identification of the metabolites of chlorothalonil in zebrafish (*Danio rerio*) and their embryo toxicity and endocrine effects at environmentally relevant levels. *Environmental Pollution* 218, 8-15.

Tabela1 – Frequência de alterações histopatológicas (% de indivíduos apresentando a patologia em relação ao total analisado) observadas no fígado de *Poecilia vivipara* expostos às concentrações 10; 25; 50; 75 $\mu\text{g L}^{-1}$ de clorotalonil e diclofluanida durante 96 horas. C: controle, CS: controle de solvente (acetona 0,002% v/v).

Estágio	Alterações no fígado			Clorotalonil ($\mu\text{g L}^{-1}$)				Diclofluanida ($\mu\text{g L}^{-1}$)			
		C	CS	10	25	50	75	10	25	50	75
I	Hipertrofia celular (hpt)	0,0	50,0	80,0	83,3	33,3	50,0	100,0	75,0	40,0	100,0
	Hiperplasia (hpp)	0,0	0,0	20,0	16,7	33,3	100,0	33,3	50,0	20,0	40,0
	Vacuolização citoplasmática (vac)	33,3	50,0	100,0	100,0	66,7	50,0	100,0	75,0	100,0	100,0
	Atrofia celular (atf)	0,0	0,0	60,0	100,0	33,3	100,0	0,0	25,0	0,0	20,0
	Forma irregular das células (firc)	0,0	0,0	40,0	66,7	33,3	100,0	33,3	50,0	60,0	100,0
II	Degeneração citoplasmática (degc)	0,0	50,0	100,0	66,7	100,0	100,0	100,0	75,0	60,0	80,0
	Núcleo picnótico (pn)	0,0	0,0	40,0	66,7	33,3	50,0	33,3	25,0	20,0	20,0
	Congestão dos sinusóides (cs)	33,3	0,0	60,0	100,0	66,7	100,0	66,7	50,0	100,0	100,0
	Dilatação dos sinusóides (dsv)	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	50,0	0,0	0,0	40,0	40,0
	Infiltração de leucócitos (ileuc)	33,3	50,0	80,0	83,3	100,0	100,0	33,3	25,0	80,0	100,0
	Hemorragia (h)	0,0	0,0	0,0	16,7	0,0	50,0	0,0	0,0	40,0	40,0
III	Necrose focal (nec)	0,0	0,0	40,0	16,7	33,3	50,0	0,0	50,0	20,0	60,0

Tabela 2 – Frequência de alterações histopatológicas (% de indivíduos apresentando a patologia em relação ao total analisado) observadas no pâncreas de *Poecilia vivipara* expostos às concentrações 10; 25; 50; 75 $\mu\text{g L}^{-1}$ de clorotalonil e diclofluanida durante 96 horas. C: controle, SC: controle de solvente (acetona 0,002% v/v).

Alterações no pâncreas	C	SC	Clorotalonil				Diclofluanida			
			10	25	50	75	10	25	50	75
Formato irregular das células (firc)	0,0	0,0	0,0	0,0	33,3	100,0	33,3	25,0	20,0	40,0
Fibrosidade nos vasos										
Inflamação no pâncreas (ipanc)	0,0	0,0	0,0	0,0	33,3	50,0	0,0	0,0	0,0	50,0
Infiltração de leucócitos/ Inflamação no pâncreas (ipanc)	0,0	0,0	0,0	0,0	33,3	50,0	0,0	0,0	0,0	50,0
Hiperplasia /Tumor (hpanc ex)	0,0	0,0	0,0	0,0	33,3	100,0	33,0	25,0	0,0	40,0

Tabela 3 – Frequência de alterações histopatológicas (% de indivíduos apresentando a patologia em relação ao total analisado) observadas no intestino de *Poecilia vivipara* expostos às concentrações 10; 25; 50; 75 µg L⁻¹ de clorotalonil e diclofluanida durante 96 horas. C:controle, CS: controle de solvente (acetona 0,002% v/v).

Estágio	Tecidos do intestino analisados	Alterações			Clorotalonil				Diclofluanida			
			C	CS	10	25	50	75	10	25	50	75
I	Epitelial	Forma irregular da célula (firc)	0,0	0,0	20,0	100,0	100,0	100,0	0,0	0,0	25,0	100,0
	Conjuntivo (Lâmina própria)	Camada da lâmina própria dilatada (dilp)	0,0	0,0	80,0	60,0	100,0	100,0	33,3	60,0	75,0	75,0
II	Epitelial	Hiperplasia de células epiteliais (hppep) e caliciformes (hppca)	0,0	0,0	20,0	40,0	60,0	50,0	0,0	60,0	50,0	50,0
		Hipertrofia de células epiteliais (hptep) e caliciformes (hptca)	33,3	40,0	20,0	40,0	60,0	50,0	33,3	33,3	50,0	50,0
	Conjuntivo (Lâmina própria)	Hiperplasia da lâmina própria (hpplp)	0,0	0,0	0,0	80,0	60,0	100,0	66,7	0,0	50,0	100,0
		Hipertrofia da lâmina própria (hptlp)	33,3	0,0	0,0	20,0	40,0	100,0	66,7	100,0	75,0	50,0
	Muscular liso	Hiperplasia em fibras do músculo liso (hppm)	0,0	0,0	0,0	40,0	20,0	50,0	33,3	60,0	50,0	50,0
		Hipertrofia em fibras do músculo liso (hptm)	33,3	0,0	0,0	0,0	0,0	50,0	33,3	20,0	0,0	25,0
III	Epitelial	Infiltração de leucócitos (ileuc)	0,0	0,0	0,0	20,0	40,0	100,0	33,3	0,0	25,0	100,0
		Atrofia (atfep)	0,0	20,0	20,0	0,0	20,0	100,0	66,7	40,0	25,0	100,0
		Necrose epitelial (necep)	0,0	0,0	20,0	80,0	80,0	100,0	33,3	0,0	25,0	50,0
		Tumor	0,0	0,0	0,0	0,0	20,0	50,0	0,0	0,0	0,0	50,0
	Conjuntivo (Lâmina própria)	Junção da lâmina própria (juncplp)	0,0	0,0	0,0	0,0	20,0	100,0	0,0	0,0	0,0	100,0
		Infiltração de leucócitos (ileuc)	0,0	0,0	0,0	100,0	80,0	100,0	66,7	0,0	0,0	100,0
		Atrofia (atflp)	0,0	0,0	0,0	20,0	20,0	50,0	0,0	0,0	25,0	0,0
		Necrose da lâmina própria (neclp)	0,0	0,0	0,0	20,0	0,0	50,0	66,7	20,0	25,0	75,0
		Tumor	0,0	0,0	0,0	0,0	20,0	50,0	0,0	0,0	0,0	50,0
	Muscular liso	Descolamento da fibra (desc)	0,0	0,0	0,0	20,0	40,0	100,0	0,0	0,0	25,0	100,0
		Tumor	0,0	0,0	0,0	0,0	20,0	50,0	0,0	0,0	0,0	50,0

Tabela 4 – Velocidade média de natação espontânea, percentual de tempo de repouso e tempo de movimento rápido na natação de recém-nascido *Poecilia vivipara* após 96 horas exposição ao clorotalonil e diclofluanida.

Alteração comportamental			Clorotalonil ($\mu\text{g L}^{-1}$)				Diclofluanida ($\mu\text{g L}^{-1}$)			
	C	CS	10	25	50	75	10	25	50	75
Velocidade média	1.5 ± 0.7^a	1.0 ± 0.7^a	1.2 ± 0.7^a	1.5 ± 0.6^a	1.3 ± 0.8^a	1.1 ± 1.3^a	1.4 ± 0.6^a	1.9 ± 0.7^a	2.2 ± 0.7^b	1.4 ± 0.6^a
(%) Tempo parado	74.1 ± 3.3^a	66.0 ± 21.2^a	67.3 ± 10.1^a	62.6 ± 13.7^a	60.3 ± 17.2^a	76.8 ± 8.8^a	67.2 ± 12.7^a	59.8 ± 9.5^a	12.7 ± 6.4^b	2.1 ± 8.2^b
(%) Tempo em movimento rápido	25.9 ± 3.3^a	31.7 ± 21.0^a	32.7 ± 10.1^a	37.4 ± 13.7^a	39.7 ± 17.2^a	23.3 ± 8.8^a	32.8 ± 12.7^a	40.2 ± 9.5^a	86.3 ± 7.3^b	75.7 ± 14.4^b

Média $\pm$ desvio padrão, (n = 10), letra b indica diferença estatisticamente significativa em relação ao controle.

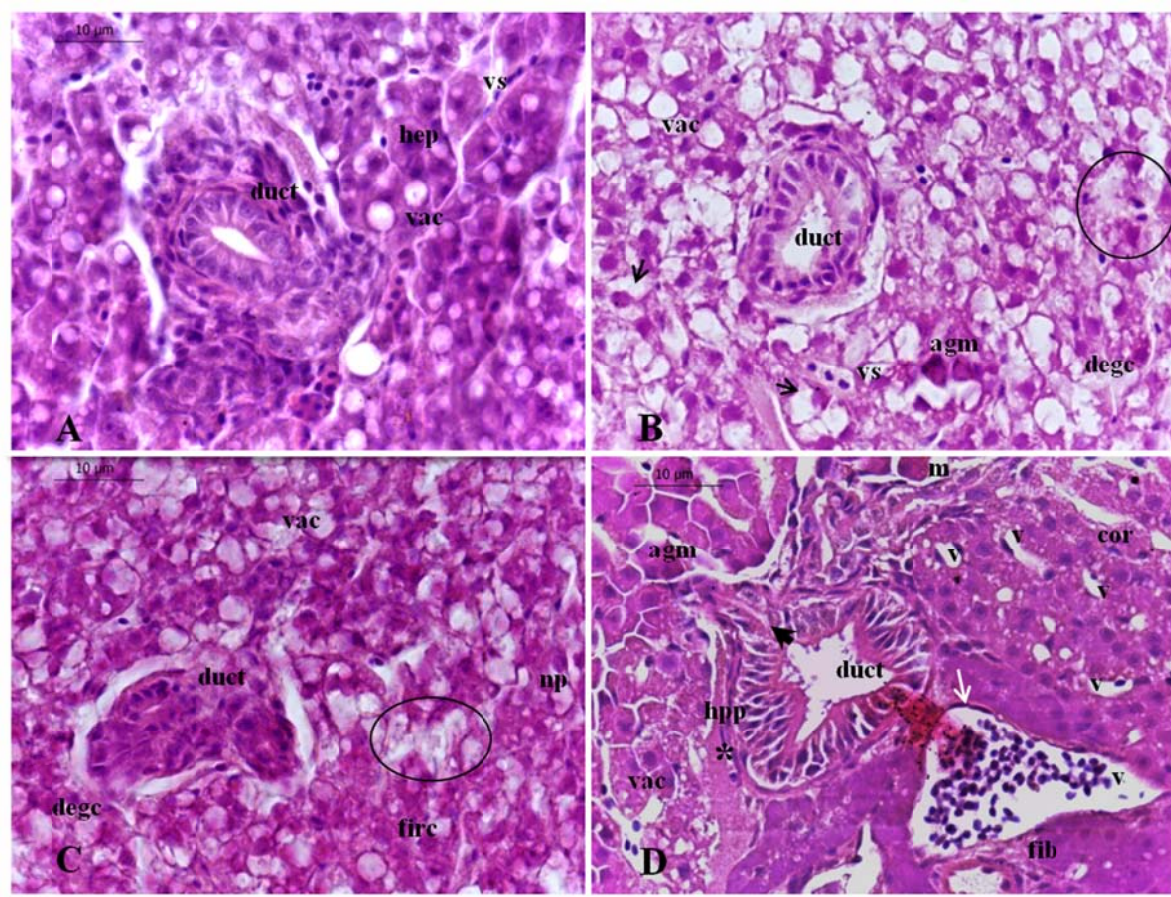


Fig. 1 – Cortes horizontais do fígado e alterações histopatológicas observadas em recém-nascidos de *P. vivipara* expostos ao clorotalonil e diclofluanida, Hematoxilina e Eosina, 400X. A- controle. B, C, D - expostos. B: acúmulo de reservas energéticas em vacúolos de hepatócitos e degeneração. C: congestão sanguínea e ruptura da parede do ducto. D: ruptura da parede do ducto e processo inflamatório (presença de macrófagos), regeneração do parênquima hepático (presença de tecido conjuntivo e arquitetura de parênquima fibroso) ao redor do ducto biliar.

hep: hepatócitos, vac: vacúolos, vs: vasos sinusoidais, seta preta: hepatócitos hipertrofiados, duct: ducto, np: núcleo picnótico, degc: degeneração citoplasmática, firc: forma irregular dos hepatócitos, m: macrófago, cor: hepatócitos em cordões, fib: fibrose, v: vaso sanguíneo, círculo: necrose, seta larga: ruptura do ducto, seta branca: hipertrofia das células endoteliais, amg: agregado macrofágico, hpp: hiperplasia, asterisco: células do tecido conjuntivo: fibroblasto.

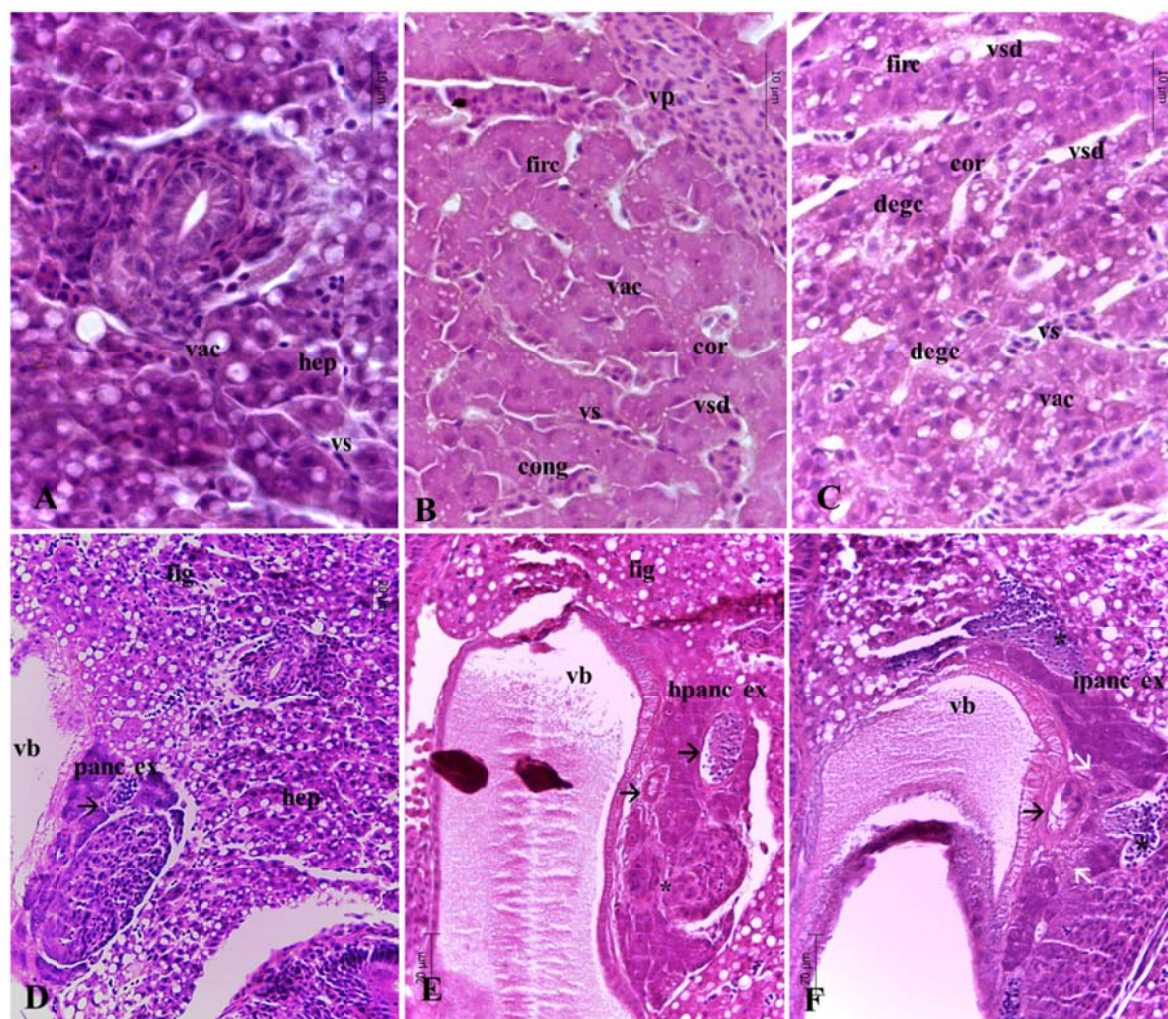


Fig. 2 – Cortes horizontais do fígado e pâncreas e alterações histopatológicas observadas em recém-nascidos de *P. vivipara* expostos ao clorotalonil e diclofluanida, Hematoxilina e Eosina, 400X. A e D - controle. B e E - expostos a $50 \mu\text{g L}^{-1}$ de clorotalonil; C e F - expostos a 50 e $75 \mu\text{g L}^{-1}$ a diclofluanida. A: tecido controle vacuolado, B e C: tecido com células em cordões e com formato descaracterizado, vasos sinusóides dilatados e depleção de reservas energéticas (glicogênio e lipídios) nos hepatócitos, D: pâncreas exócrino normal, E: pâncreas exócrino com hiperplasia (tumor), com poucos grânulos citoplasmáticos e com os vasos sanguíneos que o compõe com hipertrofia endotelial e aparência fibrosa, *: processo inflamatório, F: pâncreas exócrino com processo inflamatório, sem distinção de limite celular e com ausência de grânulos citoplasmáticos. hep: hepatócitos, vac: vacúolos, cong: congestionamento, vs: vasos sinusoidais, vp: veia, firc: forma irregular das células, degc: degeneração citoplasmática, vsd: dilatação dos vasos sinusóides, cor: tecido com células em cordões, panc ex: pâncreas exócrino normal, seta preta: vasos sanguíneos do pâncreas, fig: fígado e vb: vesícula biliar, hpanc ex: hiperplasia no pâncreas exócrino (tumor), ipanc: inflamação no pâncreas exócrino, seta branca: fibrose pancreática.

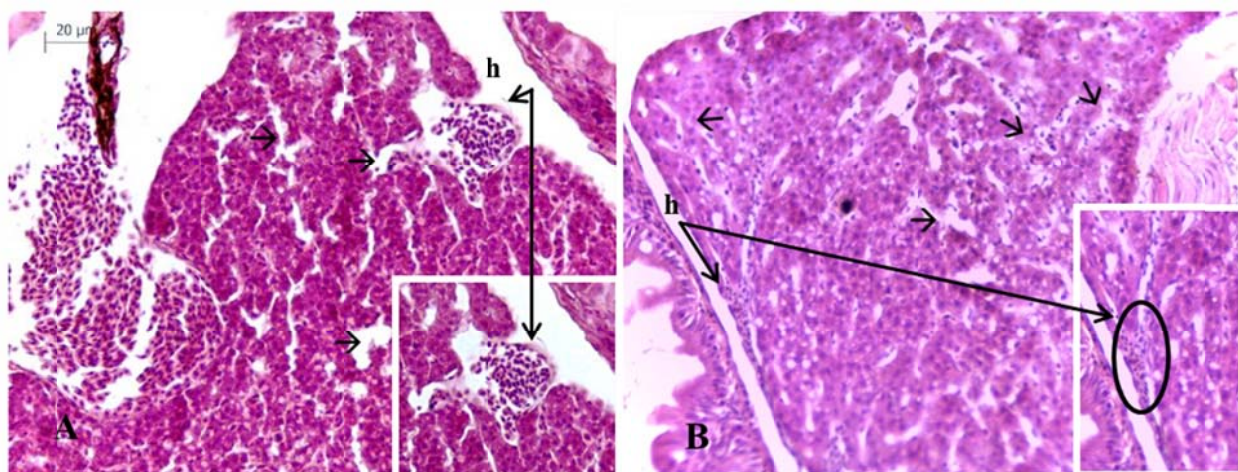


Fig. 3 – Cortes horizontais do fígado de recém-nascidos de *P. vivipara* com hemorragia. Hematoxilina e Eosina, 400X. A – exposto a $75 \mu\text{g L}^{-1}$ de clorotalonil. B – exposto a $75 \mu\text{g L}^{-1}$ de diclofluanida. h e a seta preta-hemorragia. A ampliação mostra o local da hemorragia, com lesão da parede venosa, liberando células sanguíneas para fora do parênquima hepático.

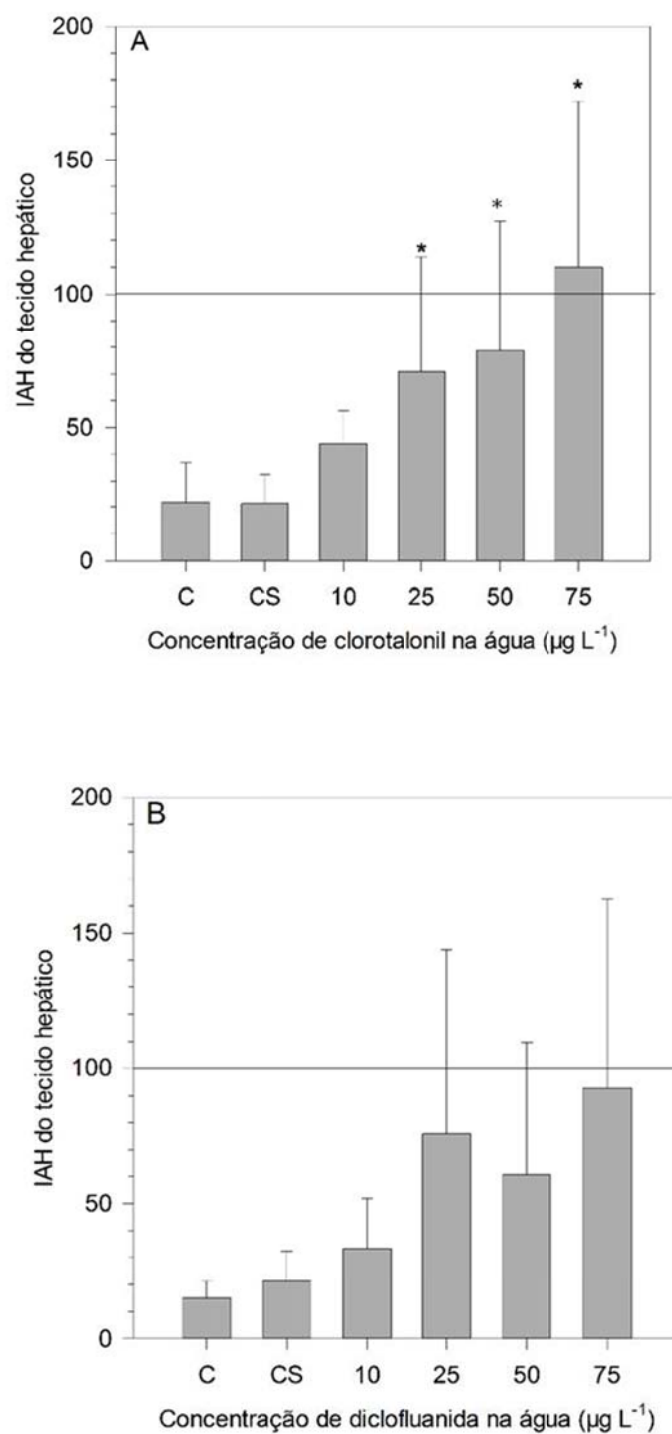


Fig. 4 – Índice de alterações histopatológicas hepáticas (IAHH) (média e desvio padrão, $n = 6$) do fígado de *Poecilia vivipara* C: controle; CS: controle de solvente (acetona); (*): estatisticamente diferente em relação ao controle; Barras de erro: desvio padrão A: clorotalonil, ANOVA $F_{19,5} = 3,8$, $p = 0,015$, Dunnett $p < 0,05$. B: diclofluanida, Anova $F_{20,5} = 1,8$, $p = 0,15$.

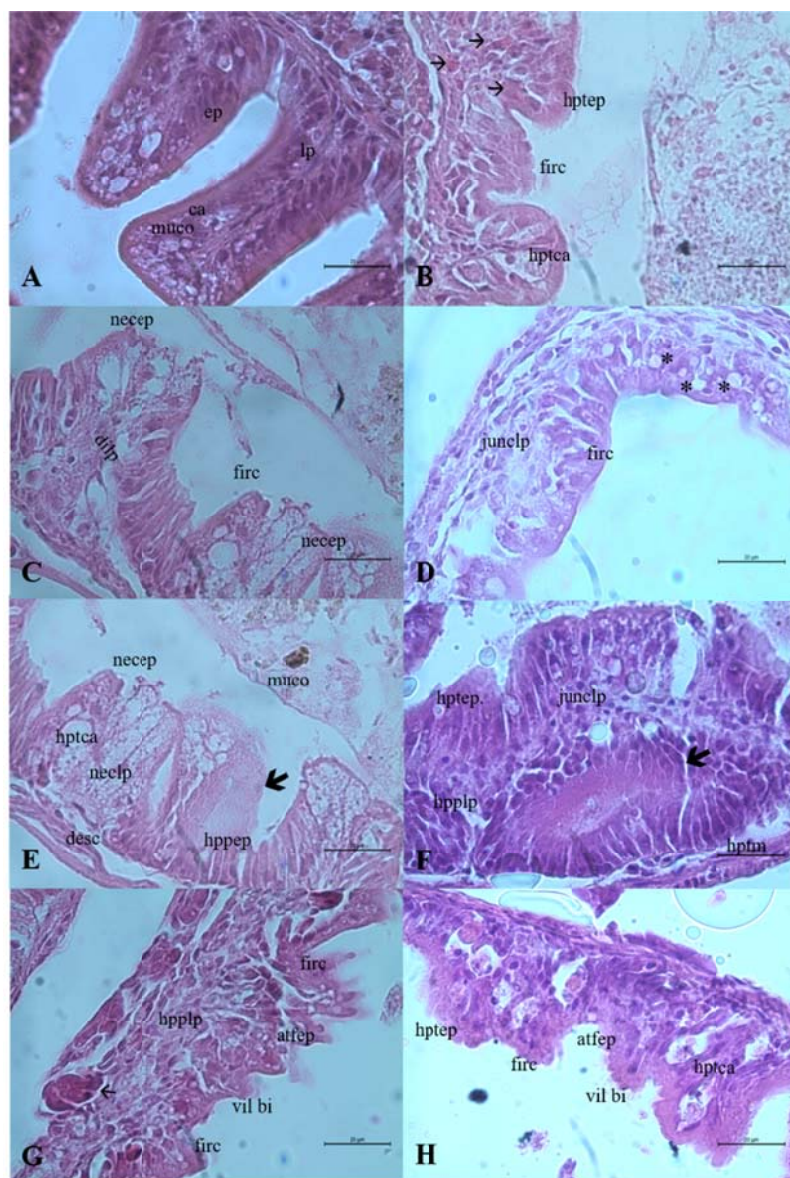


Fig. 5 – Cortes horizontais e alterações histopatológicas no intestino de recém-nascidos de *P. vivipara* expostos ao clorotalonil e diclofluanida, Hematoxilina e Eosina, 400X. A: controle com vilosidades normais e produção de muco; ca: célula caliciforme; ep: célula epitelial da mucosa; lp: lâmina própria; muco: mucosidade. B, C, D, E, F, G e H – expostos a ambos os biocidas.

Alterações identificadas em B = 25 $\mu\text{g L}^{-1}$; C – E = 50 $\mu\text{g L}^{-1}$; D – F – G – H = 75 $\mu\text{g L}^{-1}$). B: alterações progressivas e inflamatórias como hipertrofia das células epiteliais e caliciformes e infiltração leucocitária identificadas em 25 $\mu\text{g L}^{-1}$ de ambos os biocidas; C: alteração degenerativas na vilosidade, com necrose epitelial e dilatação do vaso central na camada da lâmina própria, identificadas em 50 $\mu\text{g L}^{-1}$ de ambos os biocidas; D: alterações degenerativas com atrofia ou compactação das vilosidades e junção da lâmina própria, identificadas em 75 $\mu\text{g L}^{-1}$ de ambos os biocidas; E: alterações degenerativas e inflamatórias com necrose epitelial e hiperplasias e formação de células diferentes das de origem, identificadas em 50 $\mu\text{g L}^{-1}$ de ambos os biocidas; F, G e H: alterações severas com hiperplasia das células epiteliais, vilosidades com borda irregular e em processo inflamatório, identificadas em 75 $\mu\text{g L}^{-1}$ de clorotalonil e diclofluanida. atfep: atrofia epitelial; ca: célula caliciforme; desc: descolamento da fibra muscular; ep: célula epitelial (enterócito); firc: formato irregular das células epiteliais; hptep: hipertrofia de células epiteliais da mucosa;

hptca: hipertrofia de células caliciformes; hppep: hiperplasia das células epiteliais da mucosa; hpplp: hiperplasia das células conjuntivas da lâmina própria; junc lp: junção da lâmina própria; lp: lâmina própria; muco: muco; necep: necrose epitelial; neclp: necrose da lâmina própria; vil bi: vilosidades com borda irregular; *: vesículas; seta estreita: infiltração leucocitária; seta larga: proliferação de células distintas.

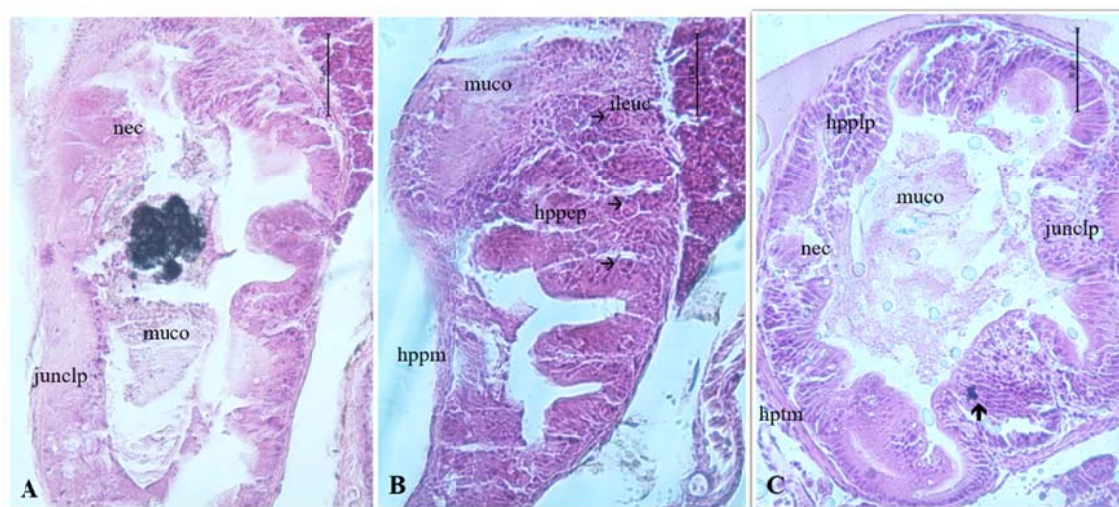


Fig. 6 – Cortes horizontais de tumor no intestino observadas em juvenis de *Poecilia vivipara* expostos ao clorotalonil e a diclofluanida, Hematoxilina e Eosina, 400X. A: 50 $\mu\text{g L}^{-1}$ de clorotalonil, tecido com perda das vilosidades e em processo de degeneração. nec: necrose; junc: junção da lâmina própria e das vilosidades sem distinção das camadas epitelial e lâmina própria, muco: muco. B: 50 $\mu\text{g L}^{-1}$ de clorotalonil, neoplasia com crescimento anormal das camadas epitelial e da lâmina própria e produção de muco escuro sobre as células neoplásicas, diferente do padrão normal. C: 75 $\mu\text{g L}^{-1}$ de diclofluanida, tecido com vários focos de neoplasias (hipertofias e hiperplasias) e junção da lâmina própria. hppe: hiperplasia das células epiteliais da mucosa; hppm: hiperplasia das células musculares; hpplp: hiperplasia de células da lâmina própria; hptm: hipertrofia das células musculares; ileuc e seta fina: infiltrado de leucócitos; juncpl: junção da lâmina própria; muco: muco; nec: necrose focal; seta larga: proliferação de células neoplásicas.

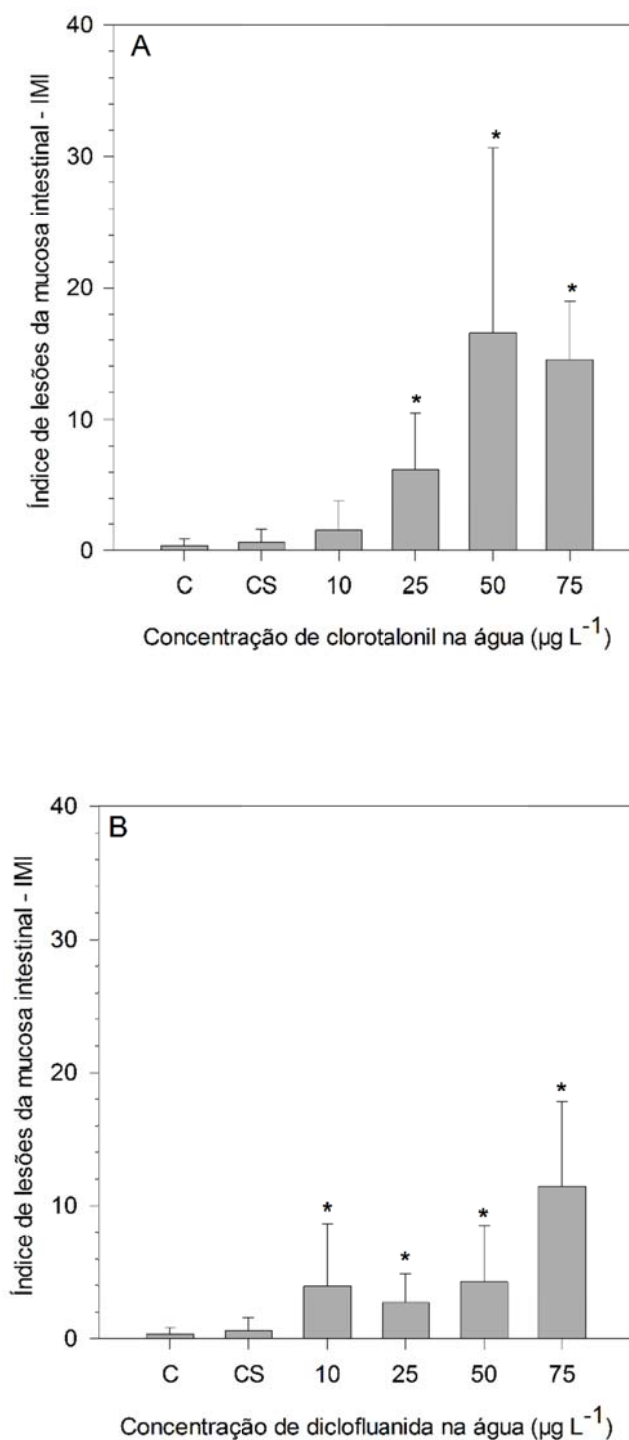


Fig. 7 – Índice de lesões da mucosa intestinal (IMI: somatório dos IAH dos tecidos intestinais epitelial, conjuntivo e muscular) de juvenis recém-nascidos de *Poecilia vivipara*. A: clorotalonil, ANOVA $F = 51,7$, $p \leq 0,001$. Dunnett' $p < 0,05$. B: diclofluanida, Anova $73,5 = 14,1$, $p < 0,001$, Dunnett, $p < 0,05$. (C): controle; (CS): controle de solvente (acetona); (*): estatisticamente diferente em relação ao controle.

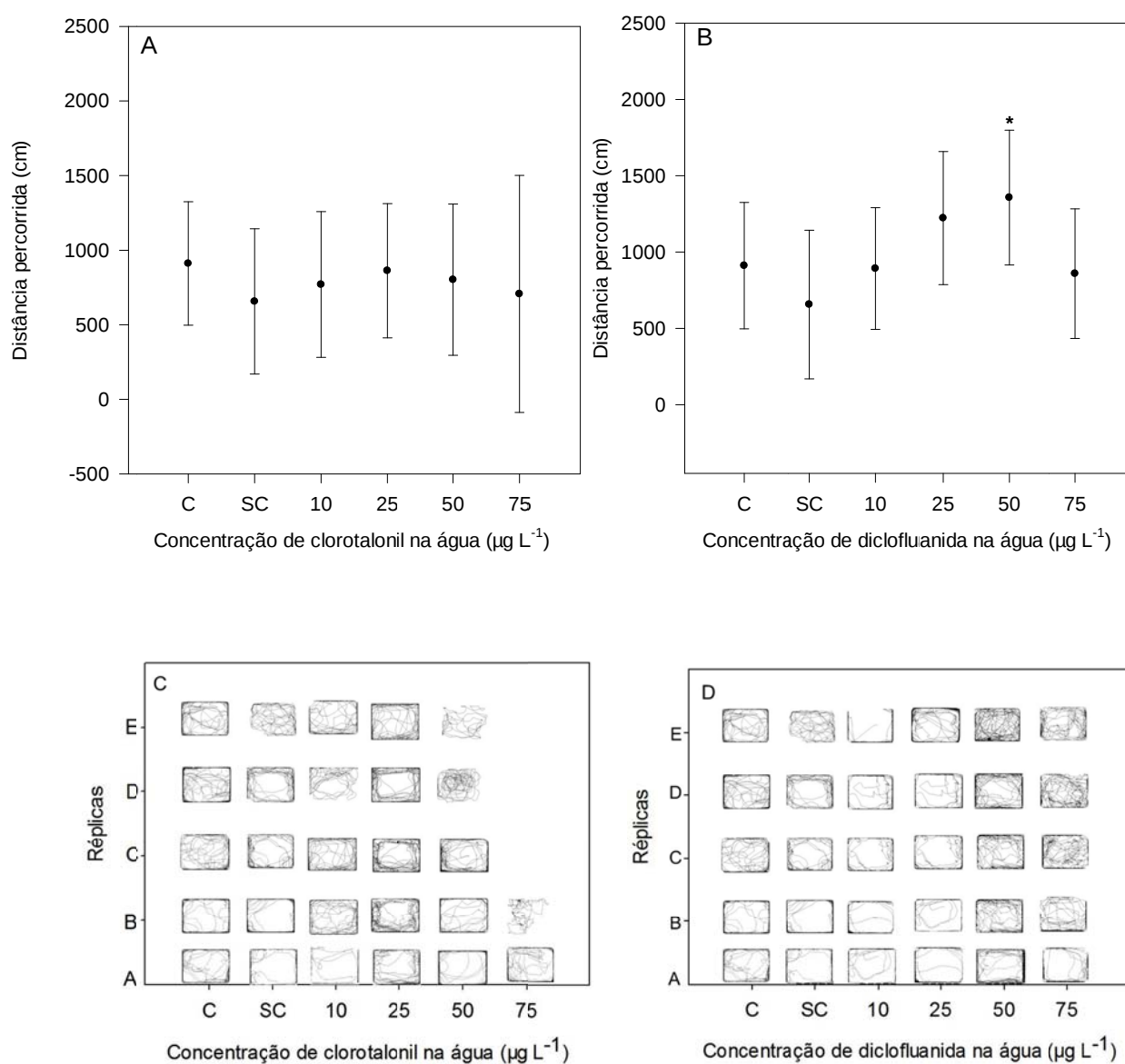


Fig. 8 – Distância percorrida e exploração da arena de natação por recém-nascido de *P. vivipara* após 96 horas (média e desvio padrão, $n = 10$) na arena de natação. A e C- expostos ao clorotalonil (ANOVA $F_{40,5} = 0,35$, $p = 0,88$). B e D- expostos a diclofluanida (ANOVA $F_{47,5} = 30,09$, $p < 0,001$, Dunnett $p < 0,05$). (C): controle; (SC) controle de solvente (acetona); (*): estatisticamente diferente em relação ao controle.

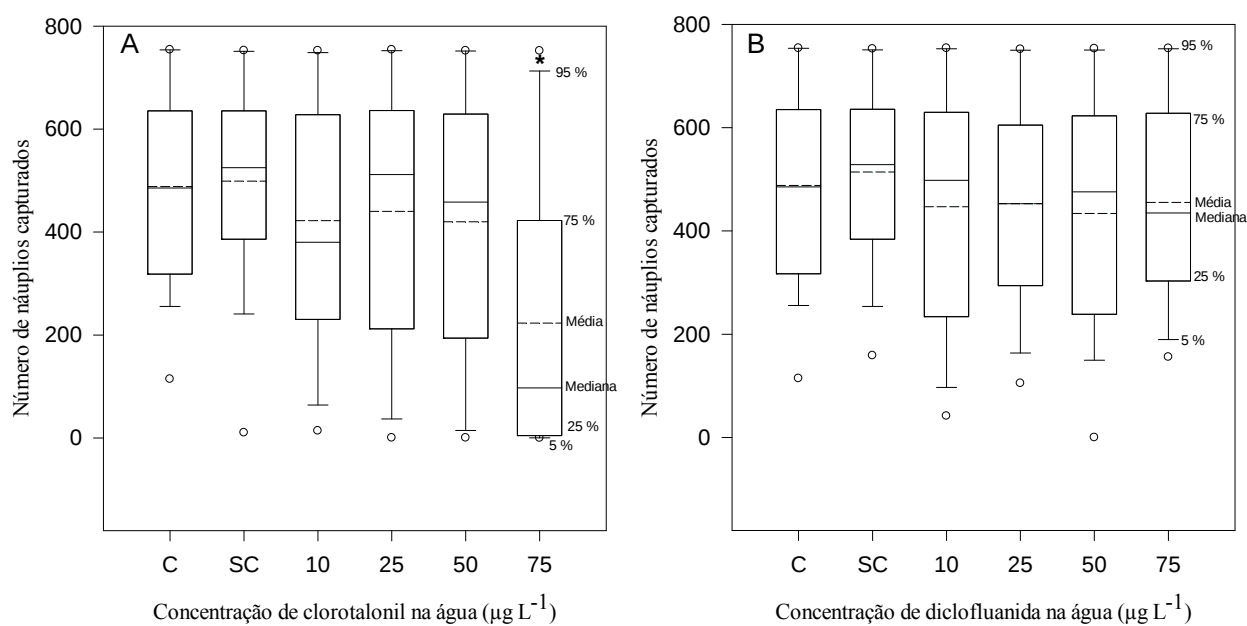


Fig. 9 – Náuplios de *Artemia* capturados diariamente (mediana, percentis e média, $n = 10$) por recém-nascidos de *P. vivipara*. A: clorotalonil (Kruskal-Wallis $H_5 = 22,0$; $p = 0,001$, teste de Dunn, $p < 0,05$). B: diclofluanida (Kruskal-Wallis $H_5 = 5,18$, $p = 0,393$). (C): controle; (SC) controle de solventes (acetona). (*): estatisticamente diferente em relação ao controle, (°) outlier.

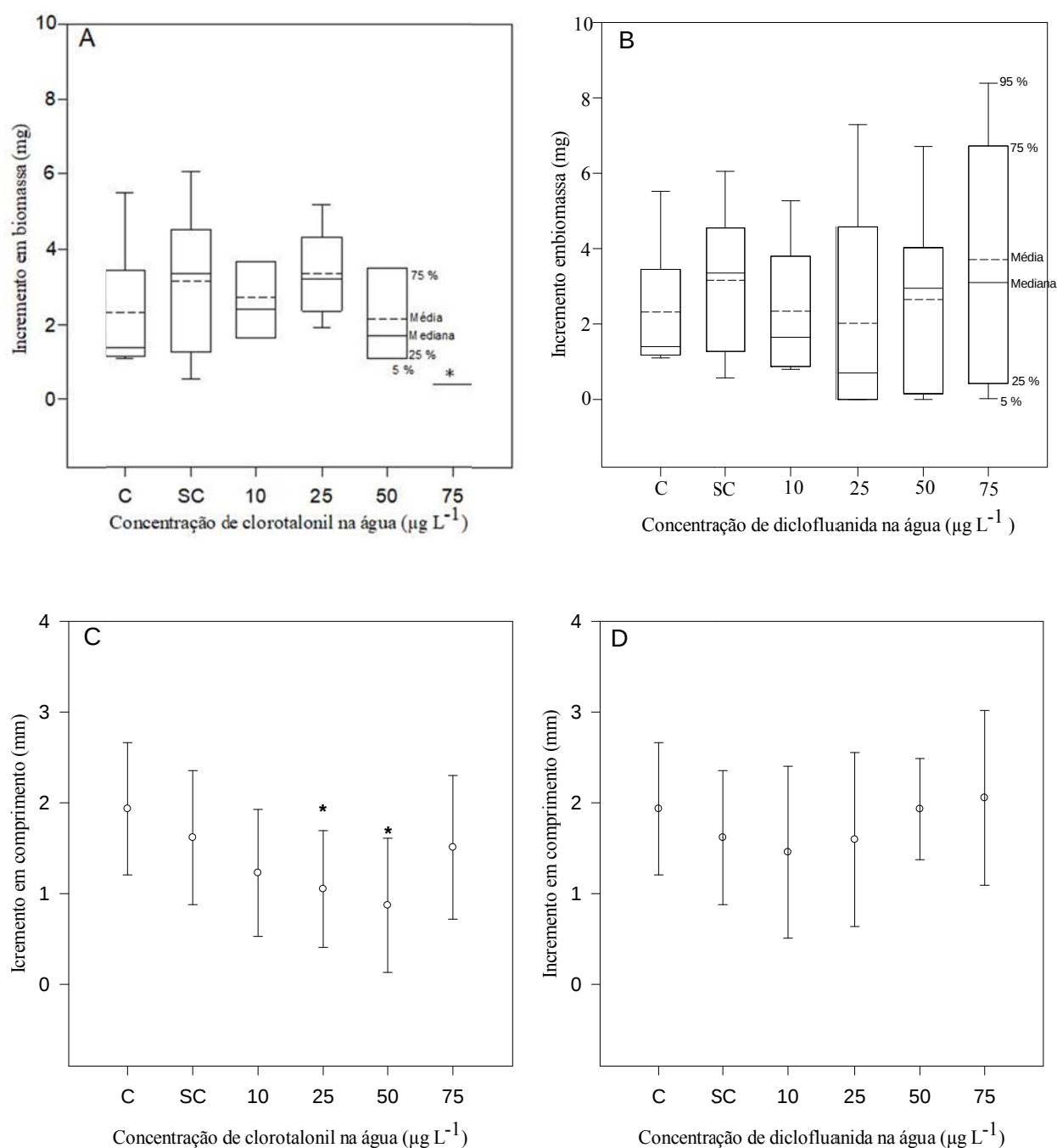


Fig. 10 – Incremento em biomassa e em comprimento (mediana, percentil e média, $n = 10$) de recém-nascidos de *P. vivipara* após 96 horas de exposição. A e C: clorotalonil (A, Kruskal-Wallis $H_5 = 10,78$, $p < 0,05$, Dunn, $p < 0,05$), (C, ANOVA $F_{39, 5} = 2,6$, $p = 0,038$, Dunnett, $p < 0,05$). B e D: diclofluanida, (B, Kruskal-Wallis $H_5 = 4,3$, $p = 0,503$), (D, ANOVA $F_{48, 5} = 0,75$, $p = 0,58$). (C): controle; (SC) controle de solvente (acetona); (*): estatisticamente diferente em relação ao controle.

ARTIGO 3

DEVELOPMENTAL AND BEHAVIORAL EFFECTS OF TRIBUTYLTIN TO *Danio rerio* EARLY LIFE STAGES

ABSTRACT

Tributyltin (TBT) is a potent antifouling chemical that can affect a wide diversity of aquatic animals, including fishes. Eggs of the zebrafish *Danio rerio* were exposed to waterborne TBT at 0.01, 0.1, 1.0, 5.0, 10, 20, 30 and 50 $\mu\text{g L}^{-1}$ for 96 h, and effects of TBT exposure during the embryo-larval phase was evaluated until 168 hpf. Endpoints included the global morphology score (GMS), an index of embryo-larval development based on morphological hallmarks expected to develop, frequencies of abnormalities, swimming behavior and growth in length. Lethal concentration to 50% of tested fish (LC50-96h) was equal to 36.4 $\mu\text{g TBT L}^{-1}$. The detected sublethal effects of TBT on zebrafish early development included a general developmental delay based on the GMS index at the lowest tested concentration, reduced hatch rates, lack of proper mouth and jaw development, no inflation of swimbladder, reduced swimming speeds and reduced total length of larvae at 168 hpf, all of which can lead to a lower viability of exposed larvae.

Keywords: Developmental delay. Teratogenesis. Swimbladder inflation. Swimming. Ggrowth.

Manuscrito a ser submetido para a revista:

Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology

ISSN: 0007-4861 (Print) 1432-0800 (Online)

Descrição: The Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology provides rapid publication of peer-reviewed articles describing significant advances and discoveries in the fields of air, soil, water, and food contamination and pollution as well as articles on methodology and other disciplines concerned with the introduction, presence and effects of toxicants in the total environment.

1 INTRODUCTION

An environmental dilemma is established between the use of effective antifouling paints to optimize fuel use in ships and the undesirable toxic effects of these paints on nontarget species (Lindgren et al., 2016). Tributyltin (TBT) self-polishing copolymer paints (TBT-SPC paints) have been at the center of this dilemma since TBT became the most successful compound against biofouling, but also a major contaminant affecting a wide variety of nontarget species (Amara et al., 2018). TBT is considered an endocrine disruptor, causing masculinization characterized by the development of male sex characteristics (imposex) in more than 200 species of female gastropods (Sternberg et al., 2010). TBT effects on fish reproduction related to sex differentiation, spermatogenesis, oogenesis and sexual behavior have also been described (Mochida and Fujii, 2009).

These undesirable effects on non-target organisms have led to the prohibition of TBT use and marketing for the purpose of coatings on large vessels by the International Convention on the Control of Harmful Anti-fouling Systems on Ships in 2008 (AFS convention) (Lindgren et al., 2016). Although these restrictions have occurred since 2008, the contamination still persists due to the remobilization of TBT from contaminated sediments (Rüdel, 2003). Also, there are still traces of this contaminant in port areas by illegal use (Laranjeiro et al., 2018), and by sales from companies such as Seahawk, with products advertised as ideal for tropical Caribbean environments, still available today, as mentioned by Turner and Glegg, (2014) in 2014.

The illegal use of TBT in South America has also been considered important, where leisure and fishing boats are considered important current TBT sources, and high imposex incidence has been linked to the occurrence of TBT residues in surface sediments and gastropod tissues (De Castro et al., 2012; Artifon et al., 2016; Castro et al., 2018). Concentrations of TBT in water and sediments are decreasing in the vicinity of international harbors, while fresh sources of TBT are still detected in marinas and fishing harbors along Latin American coastal areas (Castro et al., 2018). Significant concentrations of TBT have been reported in marine and freshwater systems, reaching $0.03 \mu\text{g L}^{-1}$ in coastal areas of Croatia (Furdek et al., 2012) and South Korea (Kim et al., 2014), $0.34 \mu\text{g L}^{-1}$ in ports in India (Garg et al., 2011), $0.70 \mu\text{g L}^{-1}$ in Paranaguá Bay estuary in Brazil (De Castro et al., 2012) and $0.97 \mu\text{g L}^{-1}$ in continental China (Cao et al., 2009).

Early life stages of fishes have a typically higher sensitivity to contaminants (McKim, 1977), and Sloman and McNeil, (2012) emphasized the importance of understanding physiological mechanisms that underlie toxicant effects on ecologically relevant behaviors during fish early life stages. Studies developed with embryo-larval stages of fishes have evaluated TBT sensitivity in terms of lethality (Bushong et al., 1988) and sublethal effects during early development. Decreased hatchability and abnormal embryonic development, including eye and tail deformities, were detected in TBT exposed medaka *Oryzias latipes* (Hano et al., 2007). TBT also significantly increased apoptosis within the retinas of *Danio rerio* embryos (Dong et al., 2006). Larvae of *Phoxinus phoxinus* exposed to 19.5 µg L⁻¹ TBT developed eye opacity, alterations in the nervous and muscular tissues, and reduced mobility, with uncoordinated swimming (Fent and Meier, 1992). *Sebastiscus marmoratus* embryos exposed to TBT developed twisted tails associated with apoptosis (Zhang et al., 2011), and craniofacial skeletal deformities in association with a reduction of Ca⁺² ATPase activity and expression of retinoic acid receptors (RARα) that act on skelettogenesis (Zhang et al., 2012). TBT waterborne exposure led to a decrease in swimming activity in fry of carp *Cyprinus carpio* (Schmidt et al., 2004), and chinese rare minnows *Gobiocypris rarus* larvae exposed to TBT developed a state of oxidative stress, inhibition of acetylcholinesterase and disturbance in expression of genes involved in ion regulation and growth (Li and Li, 2015).

The easy reproduction of the zebrafish *Danio rerio* in the laboratory allows the production of a high number of easily observable transparent eggs optimal for observations of during embryonic and larval development. In addition, the availability of its fully sequenced genome (Howe et al., 2013), and a broad knowledge base on the biology of its development have made the initial stages of *Danio rerio* a powerful model for assessing the toxicity of contaminants in ecotoxicology (Scholz et al., 2008; Embry et al., 2010). Additionally, the early life stages of *D. rerio* have been used to identify and describe potential adverse outcome pathways (AOPs) relevant to fish early life stage toxicity, and that can support ecological risk assessments. Approaches that include assessments of morphological development along a series of developmental and morphological landmarks during the embryo-larval stage, coupled with measures relevant to recruitment including behavior and endpoints such as growth are needed in fish studies in the early stages of development (Villeneuve et al., 2014). Thus, the aim of the present study was to evaluate lethal and sublethal effects of the exposure of *D. rerio* embryos to TBT, quantifying morphological alterations or delays in key stages of embryo-larval development, together with swimming behavioral measures and growth, thus

contributing to a better understanding of the effects of TBT relevant to the ecological viability of its larvae.

2 MATERIALS AND METHODS

2.1 *Danio rerio* REPRODUCTION

Male and female adult *Danio rerio* (1 male: 2 females) were kept in 100 L aquaria, with a photoperiod of 12 h Light: 12 h Dark. Water pH was 8.2 ± 0.1 (mean $\pm$ standard deviation), dissolved oxygen 5.8 ± 0.4 mg L⁻¹, and temperature $26 \pm 1^\circ\text{C}$, measured daily with a YSI Professional Plus multiparameter probe. Fish were fed twice daily with nauplii of *Artemia* sp. and commercial 45% protein pelletized fish food. The aquarium water was constantly recirculated by a mechanical and biological filtration system. Amonia-NH₃ remained below 0.002 mg L⁻¹. A group of 3 males and 6 females were separated the previous afternoon in a 15 L aquarium, and after early morning spawning and fertilization, selection of fertilized and viable eggs was made by direct observation in a stereomicroscope at 50x magnification. Eggs that showed coagulation or opacity were discarded. Fertilization rate was higher than 90%. Animal handling and embryo exposures were performed in accordance with protocol approved by the Ethics Committee for Animal Experiments from Federal University of Pernambuco (UFPE).

2.2 CHEMICALS

A primary stock solution was prepared from the dissolution of tributyltin chloride (CAS number 1461-22-9, purity 96 %, Sigma-Aldrich, St Louis, USA) in 50 mL of acetone (purity 99 %), yielding a concentration of 2,066 mg TBT L⁻¹. Secondary solutions of 689 mg L⁻¹, 206.7 mg L⁻¹ and 103.3 mg L⁻¹ TBT were prepared by diluting the primary stock solution. The exposure solutions where zebrafish embryos were kept at each tested waterborne TBT concentration (treatments) were prepared by pipetting appropriate volumes of the secondary stock solutions above with variable volume micropipettes. These precise volumes of TBT secondary solutions were pipetted to a volumetric 0.5 L flask and filled with sterile zebrafish culture water. These exposure solutions and respective treatment nominal concentrations of 0.01, 0.1, 1.0, 5.0, 10.0, 20.0, 30.0 and 50.0 μg TBT L⁻¹, plus controls (C, sterile culture water) and solvent controls (SC, acetone 0.005% v/v) were prepared and transferred to dark

flasks that were kept in the refrigerator during testing. Exposure solutions were transferred to individual wells of 24 well plates during testing, as described below.

2.3 EXPERIMENTAL DESIGN

Exposure during the embryo-larval stages followed (OECD, 2013) procedures. For each treatment 20 viable fertilized eggs less than 3 hours post fertilization (hpf) are held individually in wells of 24 well plates with respective treatment concentration, and 4 wells were used as internal controls with zebrafish culture water at 26 °C. Each embryo or larva was kept in a well with a total solution treatment volume of 2.5 mL, renewed by 80% every 24 h.

2.4 MORTALITY

Death was assigned to any of the exposed embryos or larvae through stereomicroscopic inspection and detection of egg coagulation, absence of somite formation at 24 hpf, or absence of heart beat or circulation after 48 hpf, according to OECD, (2013). The use of concentration 50 µg TBT L⁻¹ was limited only to mortality assessment because of the need to estimate the concentration capable of generating lethality by 50 percent LC50 of the fish population in 96 hours.

2.5 GLOBAL MORPHOLOGY SCORE

Sublethal effects or delays in embryonic and larval development were evaluated using the General Morphology Score (GMS), as proposed by Beekhuijzen et al., (2015). The GMS is based on the computation of partial scores for each embryo or larvae as they develop basic morphological structures considered developmental hallmarks. Every 24 h up to 12 types of developmental hallmarks were evaluated and alterations recorded as sublethal indicators of effects on embryos or larvae, during the 96 h exposure period. Thus, embryos exposed to TBT were compared with a reference clean water embryo (control). Both controls and treated embryos receive points for each morphological or developmental hallmark achieved. These hallmarks and respective time points include: detachment of the tail during early embryo development (24 h); somite formation (24 to 48 h); eye development and pigmentation (24 to 96 h); presence of movement of the embryo or larva (24 to 96 h); presence of blood circulation (24 to 96 h); presence of heartbeat (48 to 96 h); pigmentation of the head and body (48 to 96 h); pigmentation of the tail (48 to 96 h); presence of a nearly empty yolk sac

extension, related to an almost completely resorbed yolk sac (96 h), allowing for a space where the swimming bladder will be situated; presence of pectoral fins (72 to 96 h), presence of protruding mouth (72 to 96 h), hatching (72 to 96 h).

2.6 FREQUENCY OF ABNORMALITIES AFTER THE 96 H EXPOSURE

Abnormality endpoints assessed for presence or absence in each larva included: lack of larval eclosion (live larva inside the egg); pericardial edema; cranial or cardiac hemorrhage; total absence of pigmentaton in head and body; absence of tail pigmentation; lack of both pectoral fins; lack of protrusible mouth; yolk sac thickness exceeding the heart; swim bladder not inflated. Frequencies of these endpoints were calculated, dividing the total number of larvae presenting these abnormalities by the total number of live larvae in the respective group.

2.7 SWIMMING SPEED AT 168 HPF

For swimming speed measurements, larvae at 168 hpf from the different treatments were individually transferred after exposures to the wells of 12 cell well plates containing 3 mL of water (1 cm water column), and these arenas were monitored for 10 min by video cameras with 6–60 mm zoom lenses connected to a video grabber board (GeoVision model GV-900, Irvine, CA) for digital video recordings. Digitized videos were processed for the calculation of the average swimming speed and trajectory maps using Smart software (Panlab Harvard Apparatus, USA).

2.8 MORPHOMETRIC MEASUREMENTS

After exposure and swimming behavioral tests, all larvae were euthanized in ice water at 2 °C, according to protocol 23076-008924/2018-11 approved by the Animal Experimentation Ethics Committee of Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), based on procedures recommended for studies with fish by the Canadian Council on Animal Care (2005 and 1998), American Fisheries Society and American Veterinary Medical Association. Each larva survivor from controls and different treatments were photographed individually, using a Stereomicroscope Zeiss model 2000C and a Canon G10 camera coupled to it. The images of the photographed larvae were subsequently analysed to measure its total length and the diameter of the eyes with the use of Axiovision software (Zeiss).

2.9 HISTOPATHOLOGY

Fish were fixed in 10% buffered formaldehyde for 24 h and stored in 70% ethanol until histopathological analyzes. Traditional dehydration procedures were used in ethanol, diaphanization in xylol, followed by impregnation and paraffin inclusion of whole fish (Paulo et al., 2012). The blocks were cut in a Leica microtome with a thickness of 5 μm , and the tissues were stained with Hematoxylin and Eosin (HE). Histopathological alterations in the eyes and retina were analyzed and described.

2.10 STATISTICAL ANALYSIS

Lethal effects and LC50-96h were calculated using the Trimmed Spearman- Karber method (USEPA, 2002). Mean GMS indexes obtained from embryos at different TBT exposure concentrations were analyzed by one-way ANOVA at a significance level of 0.05, and Dunnett a posteriori tests to detect significant differences compared to control. When normality (Kolmogorov Smirnov test) or homoscedasticity (Levene median test) was not accepted, the nonparametric Kruskal-Wallis test (KW) followed by Dunn's multiple comparison test was applied. Sigmaplot software version 12 (Jandel Scientific, Erkrath, Germany) was used for ANOVA and KW. MedCalc for Windows, version 17.2 (MedCalc Software, Ostend, Belgium) was used for probit analysis of dose responses between TBT concentrations and frequency of swimbladder effects.

Data was checked for normality (Kolmogorov–Smirnov test) and homoscedasticity (Levene median test). When normality and homoscedasticity was confirmed, different treatments were compared using one-way ANOVA followed by the Dunnett's test. When normality or homoscedasticity was not accepted, the nonparametric Kruskal–Wallis test (K–W) followed by Dunn's test was applied to assess differences between control and exposure treatments. The LOEL (lowest observable effect level) and NOEL (no observable effect level) were estimated from Dunnett or Dunn tests, depending on the assumptions above. Sigmaplot software version 12 (Jandel Scientific, Erkrath, Germany) was used for all statistical analyzes.

3 RESULTS AND DISCUSSION

The estimated LC50-96h was 36.4 $\mu\text{g TBT L}^{-1}$ (lower and upper confidence limits 34.0 and 38.9, respectively). Another study also exposing *Danio rerio* embryos to TBT during a 24 h longer exposure reported LC50-120h between 30 and 50 $\mu\text{g TBT L}^{-1}$ (Dong et

al., 2006), similar to our results. The estimated LC50-96h for embryos and larvae of other fishes include: 46.1 $\mu\text{g TBT L}^{-1}$ for the medaka *Oryzias latipes* (Bentivegna and Piatkowski, 1998), 25 $\mu\text{g TBT L}^{-1}$ for medaka *Oryzias melastigma* (Bao et al., 2011), 23.4 $\mu\text{g TBT L}^{-1}$ for *Fundulus heteroclitus* (Bushong et al., 1988), 16.7 $\mu\text{g TBT L}^{-1}$ (LC50-48h) for gold fish *Coryphaena hippurus* (Adema-Hannes and Shenker, 2008), and 3 $\mu\text{g TBT L}^{-1}$ for *Menidia beryllina* (Bushong et al., 1988). Therefore, embryo-larval stages of zebrafish *Danio rerio* are relatively resistant to the lethal effects of TBT, and the fact that the first 48h of exposure involve protection of the embryo by the chorion, it is possible that this higher resistance compared to other species might involve limitations of TBT transport through the chorion, as suggested by Fent and Meier, (1992), where incorporation of TBT in *Phoxinus phoxinus* larvae increased significantly after hatching.

Sublethal effects of TBT to fish larvae are usually found at smaller and more environmentally relevant concentrations (Fent, 1998). Our study detected a significant and concentration dependent delay on embryo-larval development of TBT exposed *Danio rerio*, with was detected since the lowest concentration of 0.01 $\mu\text{g TBT L}^{-1}$ tested, based on the global morphology scores calculated (Fig. 1). The GMS approach integrates into a useful index potential delays in development of a series of fundamental developmental hallmarks during zebrafish early life. However, it is also important to analyze which of these hallmarks are being delayed, as well as which developmental anomalies are being generated after TBT exposure. Our results indicated that hatching delays, lack of expected yolk sac absorption, and associated lack of an empty cavity where the swimbladder will be located, as well as a lack of development of a protrusible mouth were significant contributors to the lower GMS scores. The frequency of larvae with incomplete yolk sac absorption increased from 20% at 1 $\mu\text{g TBT L}^{-1}$ to 60 % at 30 $\mu\text{g TBT L}^{-1}$. Frequency of complete lack of mouth development at 96 hpf varied from 15% at 1 $\mu\text{g TBT L}^{-1}$ to 30 % at 30 $\mu\text{g TBT L}^{-1}$. The frequency of a less dramatic effect is related to the development of the mouth and jaw, which do not reach the stage where it becomes protrusive at 96 hpf (a delay in the development of the mouth and jaw), and this was detected in all treatments. Summed together, any effects on the development of protrusible mouths varied from 35% at 0.01 $\mu\text{g TBT L}^{-1}$ to 50 % at 30 $\mu\text{g TBT L}^{-1}$ (Table 1). In a detailed study focused on *Sebastiscus marmoratus* larvae, TBT exposure during embryo-larval development induced craniofacial skeletal deformities and a shorter lower jaw, possibly

through disruption of proliferation and differentiation of chondrocytes, and by inhibition of Ca^{+2} -ATPase, disrupting calcium homeostasis (Zhang et al., 2012).

In this study, at 72 hpf, 100% of control larvae had hatched as expected, but in TBT exposed groups a delay in hatching time was detected. 35% of larvae from $0.01 \mu\text{g TBT L}^{-1}$ hatched at 96 hpf or later, percentages that increased non monotonically to 75% of larvae from $30 \mu\text{g TBT L}^{-1}$ presenting a hatch delay (Table 1). Several metals such as mercury, copper, nickel, lead, and cobalt affect hatching rates of zebrafish, and hatching delays can occur primarily as a result of effects on chorionase hatching enzyme, or secondarily as a result of effects on developmental rate of the embryo or early larval stages (Dave and Xiu, 1991; Nabinger et al., 2018). Studies with other species verified reductions in hatching rates with embryo-larval stages, such as *Sebastiscus marmoratus* (Zhang et al., 2011) and *Phoxinus phoxinus* (Fent and Meier, 1992), where larvae exposed to 4.4 and $9.9 \mu\text{g TBT L}^{-1}$ presented weak tail movements which affected hatching. Curiously, Liang et al., (2017) detected accelerated hatching in TBT exposed zebrafish embryos. Hatching delays might affect survival of early fish larvae by increased predation vulnerability (Nabinger et al., 2018), especially if a postponed hatch is associated with other developmental effects, such as retarded yolk sac resorption, edema, bent body axis, and opaque eyes which were observed in TBT exposed *Phoxinus phoxinus* larvae after hatch (Fent and Meier, 1992).

Other abnormalities detected in this study included the frequency of hemorrhages which increased from 2.5% at $0.01 \mu\text{g TBT L}^{-1}$ to 35 % at $30 \mu\text{g TBT L}^{-1}$. Pericardial edema was detected in 2.5% of larvae at $0.1 \mu\text{g TBT L}^{-1}$ and 50 % at $30 \mu\text{g TBT L}^{-1}$. Eye lens opacity were detected in 20 % of larvae from 20 and $30 \mu\text{g TBT L}^{-1}$ (Table 1). Opaque eyes were also reported in larvae of *Phoxinus phoxinus*, due to alterations in the cornea, the lenses and the pigment layer of the retina (Fent and Meier, 1992). The exposure of embryo-larval stages of *D. rerio* to TBT concentrations from 1 to $30 \mu\text{g TBT L}^{-1}$ caused increasing apoptosis of retinal neurons possibly by induced oxidative stress (Dong et al., 2006). Our results detected reductions of 13.9% and 11.1% in the eye diameters of larvae exposed to the higher concentrations of 20 and $30 \mu\text{g TBT L}^{-1}$, respectively (Fig. 2). Microphtalmia was also detected in *Fundulus heteroclitus* embryos exposed to $30 \mu\text{g TBT L}^{-1}$ (Weis et al., 1987), and in medaka *Oryzias latipes* exposed to TBT through the diet (Nakayama et al., 2005). Eye lesions or missing eyes were also detected in *Zoarcetes viviparus* embryos after females were fed TBT a contaminated diet fed (Brande-Lavridsen et al., 2013). In this study pathologies were verified in the photoreceptor layer of larvae from 20 and $30 \mu\text{g TBT L}^{-1}$, as hypertrophic

photoreceptors and a hyperpigmented retinal pigment epithelium, and cell degeneration, and an increase in the distance between photoreceptor and nuclear cells (Fig. 3). Another study also reported hypertrophic rods and cones in TBT exposed *Poecilia reticulata* (Wester and Canton, 1987). Recent studies detected several retinal pathologies and altered pigment distribution patterns in the retinal pigment epithelium and iris in early life stages of the tropical guppy *Poecilia vivipara* exposed to 7 $\mu\text{g TBT L}^{-1}$ (Paulo et al., 2018, chapter 1 of this thesis).

In larval fishes the transition from endogenous to exogenous feeding is critical, and adequate initial inflation of the swim bladder is essential, as it will allow the fish to become neutrally buoyant, and spend less energy swimming in search of prey or avoiding predators (Czesny et al., 2005). Initially, zebrafish larvae have to swim to the surface and gulp air, which is then passed through the gut and is transferred via a pneumatic duct to the swim bladder lumen, filling it (Lindsey et al., 2010). Our results showed that the frequency of larvae lacking inflated swimbladders at 168 hpf, when they would have to start feeding to avoid starvation, increased from 12.5% at 0.01 $\mu\text{g TBT L}^{-1}$ to 97.5 % at 30 $\mu\text{g TBT L}^{-1}$ (Table 1). This lack of swimbladder inflation might be related to inability of the TBT exposed larvae to reach the surface of the water, or also because part of them are lacking properly developed protrusible mouths, as mentioned previously (Table 1). At the highest tested concentrations of 20 and 30 $\mu\text{g TBT L}^{-1}$ a dramatic hypoactivity was detected, as larvae were almost motionless, possibly because of the lack of swimbladder inflation (Fig. 4). Non inflated swimbladders were also detected at lower concentrations, but the lower median swimming speeds for the lower concentrations tested were not statistically different when compared to controls, as variability was high, no statistically significant reductions in swimming speeds were detected (Fig. 4). Another study which exposed zebrafish larvae for 96 h to 0.29 $\mu\text{g TBT L}^{-1}$, although not analyzing the rates of swimbladder inflation, detected hypoactive *Danio rerio* larvae with reduced swimming speeds, and also showed that this behavioral effect was not related to possible TBT effects on the expression of genes related to myogenesis or dopamine signaling (Liang et al., 2017). The swimming speed of zebrafish larvae tends to be reduced when larvae show different types of malformation, including hemorrhages, jaw defects, microphthalmia (Padilla et al., 2011), which were detected in this study in significant frequencies. Tin is also neurotoxic (Cima, 2018), and it significantly accumulates in the brain regions receiving sensory nerves from lateral line, as well as in the retina, optic nerve and diencephalon – optic tectum in *Oncorhynchus mykiss* (Rouleau et al., 2003). Additionally,

TBT can alter concentrations of neurotransmitter dopamine and lead to decreased predatory activity in *Sebasticus marmoratus* (Yu et al., 2013).

Growth is an important apical endpoint of regulatory interest in ecotoxicological studies with fishes (Villeneuve et al., 2014), and our results indicated significant reductions on the total length of zebrafish larvae exposed to 5 and 10 $\mu\text{g TBT L}^{-1}$ at 168 hpf (Fig. 5). Several alterations could induce decrease in growth during early fish larval stages, including improper absorption of yolk sac reserves, use of energy to biotransform contaminants, or accelerated consumption of energy reserves when larval fishes do not properly inflate their swimbladders and achieve neutral buoyancy, all of which could be involved in the detected reduction in total length. Other studies detected effects that could affect growth in fish larvae such as reduction of somite numbers in medaka *Oryzias latipes* exposed to 20.5 $\mu\text{g TBT L}^{-1}$ (Bentivegna and Piatkowski, 1998) and notochord length in *Morone saxatilis* exposed to 0.514 $\mu\text{g TBT L}^{-1}$ (Pinkney et al., 1990).

TBT lowest observed effect concentration was 0.01 $\mu\text{g TBT L}^{-1}$ for the GMS index, but several other relevant effects such as hatching delay, lack of proper mouth and jaw development, and no inflation of swimbladder were also detected at this lowest tested concentration tested, which is lower than the current most restrictive legal Brazilian limit for freshwaters that should protect aquatic life of 0.063 $\mu\text{g TBT L}^{-1}$ (CONAMA357/2005). Although the zebrafish *Danio rerio* is not a native Brazilian species, the results presented here demonstrate that it cannot be considered a sensitive species to TBT toxicity, and it would be advisable to further evaluate TBT toxicity to other native species for a possible change of the legal limit to a lower concentration.

4 CONCLUSIONS

TBT toxicity to embryos and larvae of *Danio rerio* was evaluated, and evidence of lethal and sublethal morphological effects was detected at the lowest concentrations. The detected sublethal effects of TBT on zebrafish early development included a general developmental delay, reduced hatch rates, lack of proper mouth and jaw development, no inflation of swimbladder, which can be contributing to reduced swimming speeds and length of larvae at 168 hpf, all of which can lead to a lower viability of exposed larvae.

ACKNOWLEDGEMENTS

This work was supported by FINEP (CT-Hidro 1111/13 - AIBRASIL2), CNPq (CT Aquaviário grant 456372/2013-0). Driele V. Paulo was sponsored by a PhD fellowship from “Fundação de Amparo a Ciência e Tecnologia de Pernambuco - FACEPE”. Paulo SM Carvalho is a research fellow from the Brazilian CNPq (Grant 312308/2016-7). Authors are very grateful to Dr. Christina Alves Peixoto (Ultrastructure Laboratory, Aggeu Magalhães Institute) and to Centro de Tecnologias Estratégicas do Nordeste (CETENE) for providing infrastructure and equipment for histological analysis, and to all students who contributed during experimental exposures and testing, and to unknown reviewers who helped to increase the quality of this publication.

All applicable international, national, and/or institutional guidelines for the care and use of animals were followed. All procedures performed in these studies were in accordance with the ethical standards. Animal handling and exposures were performed in accordance with protocol approved by the Ethics Committee for Animal Experiments from Federal University of Pernambuco, the institution at which the studies were conducted.

5 REFERENCES

- Adema-Hannes, R., Shenker, J., 2008. Acute lethal and teratogenic effects of tributyltin chloride and copper chloride on mahi mahi (*Coryphaena hippurus*) eggs and larvae. *Environmental Toxicology and Chemistry* 27, 2131-2135.
- Amara, I., Miled, W., Slama, R.B., Ladhari, N., 2018. Antifouling processes and toxicity effects of antifouling paints on marine environment. A review. *Environmental Toxicology and Pharmacology* 57, 115-130.
- Artifon, V., Castro, Í.B., Fillmann, G., 2016. Spatiotemporal appraisal of TBT contamination and imposex along a tropical bay (Todos os Santos Bay, Brazil). *Environmental Science and Pollution Research* 23, 16047-16055.
- Bao, V.W.W., Leung, K.M.Y., Qiu, J.W., Lam, M.H.W., 2011. Acute toxicities of five commonly used antifouling booster biocides to selected subtropical and cosmopolitan marine species. *Marine Pollution Bulletin* 62, 1147-1151.
- Beekhuijzen, M., de Koning, C., Flores-Guillén, M.E., de Vries-Buitenweg, S., Tobor-Kaplon, M., van de Waart, B., Emmen, H., 2015. From cutting edge to guideline: A first step in harmonization of the zebrafish embryotoxicity test (ZET) by describing the most optimal test conditions and morphology scoring system. *Reproductive Toxicology* 56, 64-76.

Bentivegna, C.S., Piatkowski, T., 1998. Effects of tributyltin on medaka (*Oryzias latipes*) embryos at different stages of development. *Aquatic Toxicology* 44, 117-128.

Brande-Lavridsen, N., Korsgaard, B., Dahllöf, I., Strand, J., Tairova, Z., Bjerregaard, P., 2013. Abnormalities in eelpout *Zoarces viviparus* upon chemical exposure. *Marine Environmental Research* 92, 87-94.

CONAMA 357/2005. Conselho Nacional do Meio Ambiente. Brasil, 2005. Resolução. 357, de 17 de março de 2005. Ministério do Meio Ambiente, - Brasília, p. 23.

Bushong, S.J., Hall Jr, L.W., Scott Hall, W., Edward Johnson, W., Herman, R.L., 1988. Acute toxicity of tributyltin to selected Chesapeake Bay fish and invertebrates. *Water Research* 22, 1027-1032.

Cao, D., Jiang, G., Zhou, Q., Yang, R., 2009. Organotin pollution in China: An overview of the current state and potential health risk. *Journal of Environmental Management* 90, S16-S24.

Castro, Í.B., Iannacone, J., Santos, S., Fillmann, G., 2018. TBT is still a matter of concern in Peru. *Chemosphere* 205, 253-259.

Cima, F., 2018. Tin: Environmental Pollution and Health Effects.

Czesny, S.J., Graeb, B.D.S., Dettmers, J.M., 2005. Ecological Consequences of Swim Bladder Noninflation for Larval Yellow Perch. *Transactions of the American Fisheries Society* 134, 1011-1020.

Dave, G., Xiu, R., 1991. Toxicity of mercury, copper, nickel, lead, and cobalt to embryos and larvae of zebrafish, *Brachydanio rerio*. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 21, 126-134.

De Castro, I.B., Perina, F.C., Fillmann, G., 2012. Organotin contamination in South American coastal areas. *Environmental Monitoring and Assessment* 184, 1781-1799.

Dong, W., Muramoto, W., Nagai, Y., Takehana, K., Stegeman, J.J., Teraoka, H., Hiraga, T., 2006. Retinal neuronal cell is a toxicological target of tributyltin in developing zebrafish. *Journal of Veterinary Medical Science* 68, 573-579.

Embry, M.R., Belanger, S.E., Braunbeck, T.A., Galay-Burgos, M., Halder, M., Hinton, D.E., Léonard, M.A., Lillicrap, A., Norberg-King, T., Whale, G., 2010. The fish embryo toxicity test as an animal alternative method in hazard and risk assessment and scientific research. *Aquatic Toxicology* 97, 79-87.

Fent, K., 1998. Effects of organotin compounds in fish: from the molecular to the population level. in: Braunbeck, T., Hinton, D.E., Streit, B. (Eds.). *Fish Ecotoxicology*. Birkhäuser Basel, Basel, pp. 259-302.

Fent, K., Meier, W., 1992. Tributyltin-induced effects on early life stages of minnows *Phoxinus phoxinus*. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 22, 428-438.

Furdek, M., Vahčić, M., Ščančar, J., Milačić, R., Kniewald, G., Mikac, N., 2012. Organotin compounds in seawater and *Mytilus galloprovincialis* mussels along the Croatian Adriatic Coast. *Marine Pollution Bulletin* 64, 189-199.

Garg, A., Meena, R.M., Jadhav, S., Bhosle, N.B., 2011. Distribution of butyltins in the waters and sediments along the coast of India. *Marine Pollution Bulletin* 62, 423-431.

Hano, T., Oshima, Y., Kim, S.G., Satone, H., Oba, Y., Kitano, T., Inoue, S., Shimasaki, Y., Honjo, T., 2007. Tributyltin causes abnormal development in embryos of medaka, *Oryzias latipes*. *Chemosphere* 69, 927-933.

Howe, K., Clark, M.D., Torroja, C.F., Torrance, J., Berthelot, C., Muffato, M., Collins, J.E., Humphray, S., McLaren, K., Matthews, L., McLaren, S., Sealy, I., Caccamo, M., Churcher, C., Scott, C., Barrett, J.C., Koch, R., Rauch, G.-J., White, S., Chow, W., Kilian, B., Quintais, L.T., Guerra-Assunção, J.A., Zhou, Y., Gu, Y., Yen, J., Vogel, J.-H., Eyre, T., Redmond, S., Banerjee, R., Chi, J., Fu, B., Langley, E., Maguire, S.F., Laird, G.K., Lloyd, D., Kenyon, E., Donaldson, S., Sehra, H., Almeida-King, J., Loveland, J., Trevanion, S., Jones, M., Quail, M., Willey, D., Hunt, A., Burton, J., Sims, S., McLay, K., Plumb, B., Davis, J., Clee, C., Oliver, K., Clark, R., Riddle, C., Elliott, D., Threadgold, G., Harden, G., Ware, D., Begum, S., Mortimore, B., Kerry, G., Heath, P., Phillimore, B., Tracey, A., Corby, N., Dunn, M., Johnson, C., Wood, J., Clark, S., Pelan, S., Griffiths, G., Smith, M., Glithero, R., Howden, P., Barker, N., Lloyd, C., Stevens, C., Harley, J., Holt, K., Panagiotidis, G., Lovell, J., Beasley, H., Henderson, C., Gordon, D., Auger, K., Wright, D., Collins, J., Raisen, C., Dyer, L., Leung, K., Robertson, L., Ambridge, K., Leongamornlert, D., McGuire, S., Gilderthorp, R., Griffiths, C., Manthravadi, D., Nichol, S., Barker, G., Whitehead, S., Kay, M., Brown, J., Murnane, C., Gray, E., Humphries, M., Sycamore, N., Barker, D., Saunders, D., Wallis, J., Babbage, A., Hammond, S., Mashreghi-Mohammadi, M., Barr, L., Martin, S., Wray, P., Ellington, A., Matthews, N., Ellwood, M., Woodmansey, R., Clark, G., Cooper, J.D., Tromans, A., Grafham, D., Skuce, C., Pandian, R., Andrews, R., Harrison, E., Kimberley, A., Garnett, J., Fosker, N., Hall, R., Garner, P., Kelly, D., Bird, C., Palmer, S., Gehring, I., Berger, A., Dooley, C.M., Ersan-Ürün, Z., Eser, C., Geiger, H., Geisler, M., Karotki, L., Kirn, A., Konantz, J., Konantz, M., Oberländer, M., Rudolph-Geiger, S., Teucke, M., Lanz, C., Raddatz, G., Osoegawa, K., Zhu, B., Rapp, A., Widaa, S., Langford, C., Yang, F., Schuster, S.C., Carter, N.P., Harrow, J., Ning, Z., Herrero, J., Searle, S.M.J., Enright, A., Geisler, R., Plasterk, R.H.A., Lee, C., Westerfield, M., de Jong, P.J., Zon, L.I., Postlethwait, J.H., Nüsslein-Volhard, C., Hubbard, T.J.P., Crollius, H.R., Rogers, J., Stemple, D.L., 2013. The zebrafish reference genome sequence and its relationship to the human genome. *Nature* 496, 498.

Kim, N.S., Shim, W.J., Yim, U.H., Hong, S.H., Ha, S.Y., Han, G.M., Shin, K.-H., 2014. Assessment of TBT and organic booster biocide contamination in seawater from coastal areas of South Korea. *Marine Pollution Bulletin* 78, 201-208.

Laranjeiro, F., Sánchez-Marín, P., Oliveira, I.B., Galante-Oliveira, S., Barroso, C., 2018. Fifteen years of imposex and tributyltin pollution monitoring along the Portuguese coast. *Environmental Pollution* 232, 411-421.

Li, P.G., Li, Z., 2015. Physiological Responses in Chinese Rare Minnow Larvae Following Exposure to Low-Dose Tributyltin. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 95, 588-592.

Liang, X., Souders, C.L., Zhang, J., Martyniuk, C.J., 2017. Tributyltin induces premature hatching and reduces locomotor activity in zebrafish (*Danio rerio*) embryos/larvae at environmentally relevant levels. *Chemosphere* 189, 498-506.

Lindgren, J.F., Wilewska-Bien, M., Granhag, L., Andersson, K., Eriksson, K.M., 2016. Discharges to the Sea. in: Andersson, K., Brynolf, S., Lindgren, J.F., Wilewska-Bien, M. (Eds.). *Shipping and the Environment : Improving Environmental Performance in Marine Transportation*. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, pp. 125-168.

Lindsey, B.W., Smith, F.M., Croll, R.P., 2010. From Inflation to Flotation: Contribution of the Swimbladder to Whole-Body Density and Swimming Depth During Development of the Zebrafish (*Danio rerio*). *Zebrafish* 7, 85-96.

McKim, J.M., 1977. Evaluation of Tests with Early Life Stages of Fish for Predicting Long-Term Toxicity. *Journal of the Fisheries Research Board of Canada* 34, 1148-1154.

Mochida, K., Fujii, K., 2009. Toxicity for Aquatic Organisms. in: T, A., Harino, H., Ohji, M., Langston, W.J. *Ecotoxicology of Antifouling Biocides* Springer, Japan, 149-160.

Nabinger, D.D., Altenhofen, S., Bitencourt, P.E.R., Nery, L.R., Leite, C.E., Vianna, M.R.M.R., Bonan, C.D., 2018. Nickel exposure alters behavioral parameters in larval and adult zebrafish. *Science of the Total Environment* 624, 1623-1633.

Nakayama, K., Oshima, Y., Nagafuchi, K., Hano, T., Shimasaki, Y., Honjo, T., 2005. Early-life-stage toxicity in offspring from exposed parent medaka, *Oryzias latipes*, to mixtures of tributyltin and polychlorinated biphenyls. *Environmental Toxicology and Chemistry* 24, 591-596.

OECD, 2013. Test No. 236: Fish Embryo Acute Toxicity (FET) Test. OECD Publishing, Paris.

Padilla, S., Hunter, D.L., Padnos, B., Frady, S., MacPhail, R.C., 2011. Assessing locomotor activity in larval zebrafish: Influence of extrinsic and intrinsic variables. *Neurotoxicology and Teratology* 33, 624-630.

Paulo, D.V., Fontes, F.M., Flores-Lopes, F., 2012. Histopathological alterations observed in the liver of *Poecilia vivipara* (Cyprinodontiformes: Poeciliidae) as a tool for the environmental quality assessment of the Cachoeira River, BA. *Brazilian Journal of Biology* 72, 131-140.

Pinkney, A.E., Matteson, L.L., Wright, D.A., 1990. Effects of tributyltin on survival, growth, morphometry, and RNA-DNA ratio of larval striped bass, *Morone saxatilis*. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 19, 235-240.

Rouleau, C., Xiong, Z.H., Pacepavicius, G., Huang, G.L., 2003. Uptake of waterborne tributyltin in the brain of fish: axonal transport as a proposed mechanism. *Environ Sci Technol* 37, 3298-3302.

Rüdel, H., 2003. Case study: bioavailability of tin and tin compounds. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 56, 180-189.

- Schmidt, K., Steinberg, C.E.W., Pflugmacher, S., Staaks, G.B.O., 2004. Xenobiotic substances such as PCB mixtures (aroclor 1254) and TBT can influence swimming behavior and biotransformation activity (GST) of carp (*Cyprinus carpio*). *Environmental Toxicology* 19, 460-470.
- Scholz, S., Fischer, S., Gündel, U., Küster, E., Luckenbach, T., Voelker, D., 2008. The zebrafish embryo model in environmental risk assessment - Applications beyond acute toxicity testing. *Environmental Science and Pollution Research* 15, 394-404.
- Sloman, K.A., McNeil, P.L., 2012. Using physiology and behaviour to understand the responses of fish early life stages to toxicants. *Journal of Fish Biology* 81, 2175-2198.
- Sternberg, R.M., Gooding, M.P., Hotchkiss, A.K., LeBlanc, G.A., 2010. Environmental-endocrine control of reproductive maturation in gastropods: Implications for the mechanism of tributyltin-induced imposex in prosobranchs. *Ecotoxicology* 19, 4-23.
- Turner, A., Glegg, G., 2014. TBT-based antifouling paints remain on sale. *Marine Pollution Bulletin* 88, 398-400.
- Villeneuve, D., Volz, D.C., Embry, M.R., Ankley, G.T., Belanger, S.E., Léonard, M., Schirmer, K., Tanguay, R., Truong, L., Wehmas, L., 2014. Investigating Alternatives to the fish early-life stage test: A strategy for discovering and annotating adverse outcome pathways for early fish development. *Environmental Toxicology and Chemistry* 33, 158-169.
- Weis, J.S., Weis, P., Wang, F., 1987. Developmental effects of tributyltin on the fiddler crab, *Uca pugilator*, and the killifish, *Fundulus heteroclitus*. *Oceans Conference Record (IEEE)*, pp. 1456-1460.
- Wester, P.W., Canton, J.H., 1987. Histopathological study of *Poecilia reticulata* (guppy) after long-term exposure to bis(tri-n-butyltin)oxide (TBTO) and di-n-butyltin dichloride (DBTC). *Aquatic Toxicology* 10, 143-165.
- Yu, A., Wang, X., Zuo, Z., Cai, J., Wang, C., 2013. Tributyltin exposure influences predatory behavior, neurotransmitter content and receptor expression in *Sebastiscus marmoratus*. *Aquatic Toxicology* 128-129, 158-162.
- Zhang, J., Zuo, Z., Sun, P., Wang, H., Yu, A., Wang, C., 2012. Tributyltin exposure results in craniofacial cartilage defects in rockfish (*Sebastiscus marmoratus*) embryos. *Marine Environmental Research* 77, 6-11.
- Zhang, J., Zuo, Z., Wang, Y., Yu, A., Chen, Y., Wang, C., 2011. Tributyltin chloride results in dorsal curvature in embryo development of *Sebastiscus marmoratus* via apoptosis pathway. *Chemosphere* 82, 437-442.

Table 1 – Frequency (%) of recorded abnormalities in zebrafish larvae exposed to tributyltin (TBT) at 96 hpf and 168 hpf. * abnormalities absorbed at 168 hpf; C: control; SC: solvent control (acetone 0,005 % v/v).

Treatments ($\mu\text{g TBT L}^{-1}$)	Hatched at 96 hpf or later	Yolk sac extension not empty	Complete lack of mouth development	Lack of protrusible mouth	Any effect on mouth development	Hemorrhages	Lack of inflated simbladder *	Pericardial edema *	Opake eyes *
C	0	0	0	0	0	0	2.5	0	0
SC	0	0	0	0	0	0	0	0	0
0.01	35	0	0	35	35	2.5	12.5	0	0
0	20	0	0	40	40	5	5	2.5	0
1	5	20	15	35	50	5	40	5	0
5	--	15	10	35	45	5	0	0	0
0	--	20	15	40	55	5	32.5	0	0
20	35	45	15	35	50	10	72.5	45	20
30	75	60	30	20	50	35	97.5	50	20

Figure 1

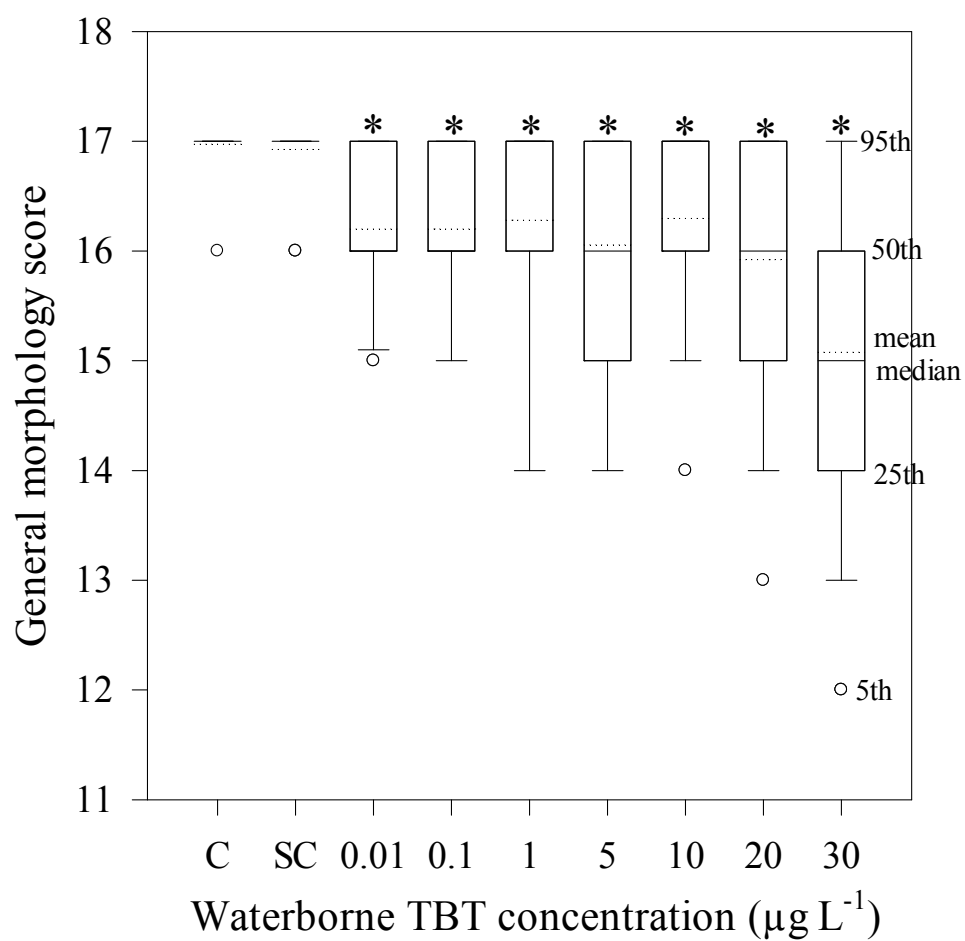


Fig. 1 – General morphology score of *Danio rerio* embryo-larval stages exposed to waterborne TBT during 96 h. (Kruskal-Wallis $H_8 = 87$, $p < 0.001$; Dunn's test, $p < 0.05$). (C: control; SC: solvent control, acetone 0.005%). *: statistically different from control (Dunn's test).

Figure 2

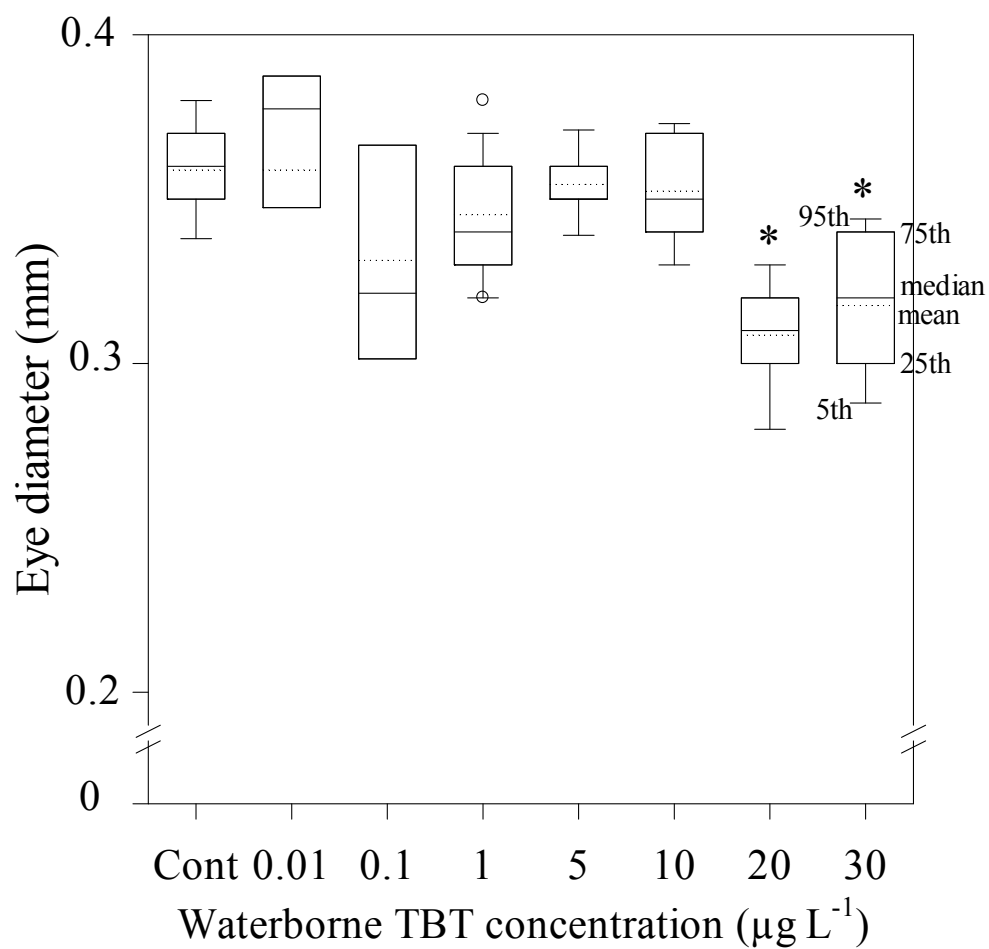


Fig. 2 – Eye diameter of *Danio rerio* larvae exposed to waterborne TBT during 96 h. (Kruskal-Wallis $H_8 = 54$, $p < 0.001$; Dunn's test, $p < 0.05$). (Cont: control). *: statistically different from control (Dunn's test).

Figure 3

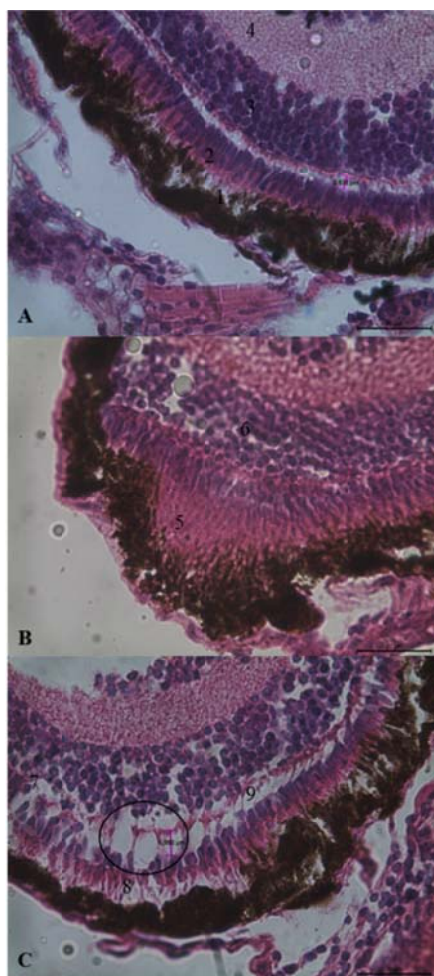


Fig. 3 – Horizontal sections of retinas from TBT exposed *Danio rerio* larvae at 168 hpf, Hematoxylin and Eosin, 400X. A: control; B and C: exposed to 30 $\mu\text{g TBT L}^{-1}$. A: Normal retinal layers in control fish. B: Hypertrophic Photoreceptors. C: Alteration in area between photoreceptor and nuclear cells' synapses. 1: Choroid and retinal epithelial cells; 2: Photoreceptors; 3: Nuclear cells; 4 Plexiform layer; 5: Hypertrophic photoreceptors and hyperpigmented retinal pigmented epithelium; 6: Photoreceptor synapses joined with adjacent nuclear layer; 7: Degeneration; 8: Disorganized photoreceptors; 9 and circle in C: increased distance between photoreceptors and nuclear cells.

Figure 4

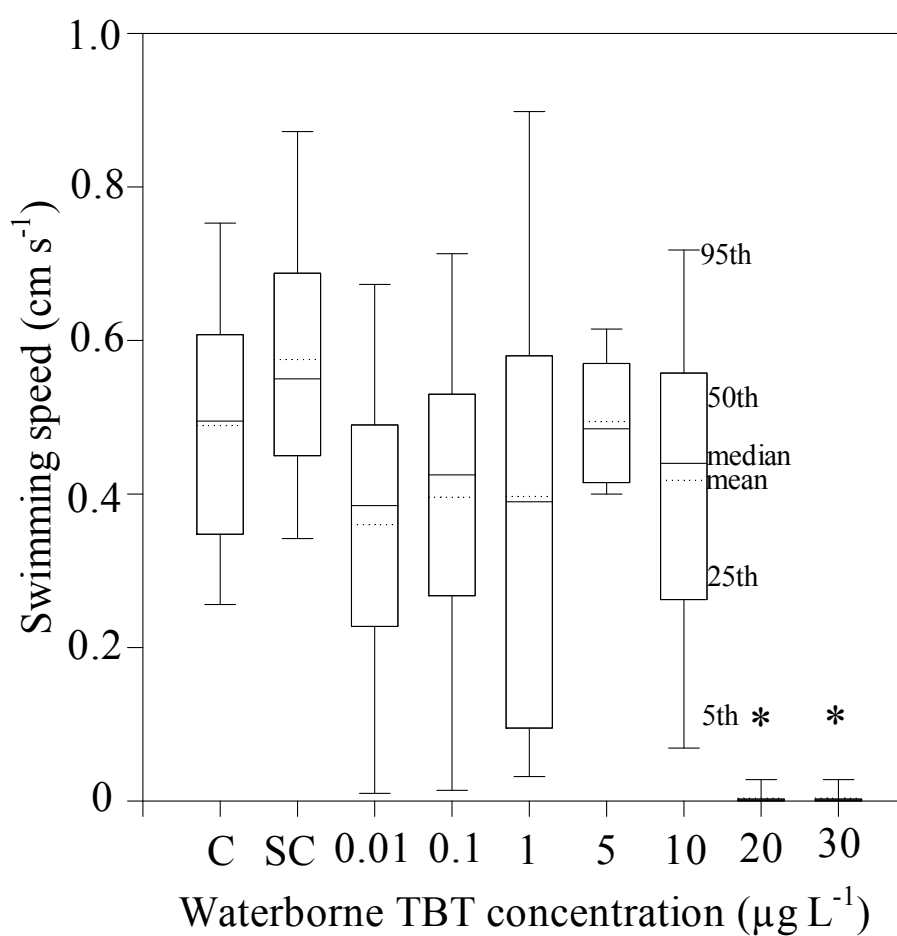


Fig. 4 – Swimming speeds of *Danio rerio* larvae exposed to waterborne TBT during 96 h. (Kruskal-Wallis $H=54$, $p < 0.001$; Dunn's test, $p < 0.05$). (Cont: control). *: statistically different from control (Dunn's test).

Figure 5

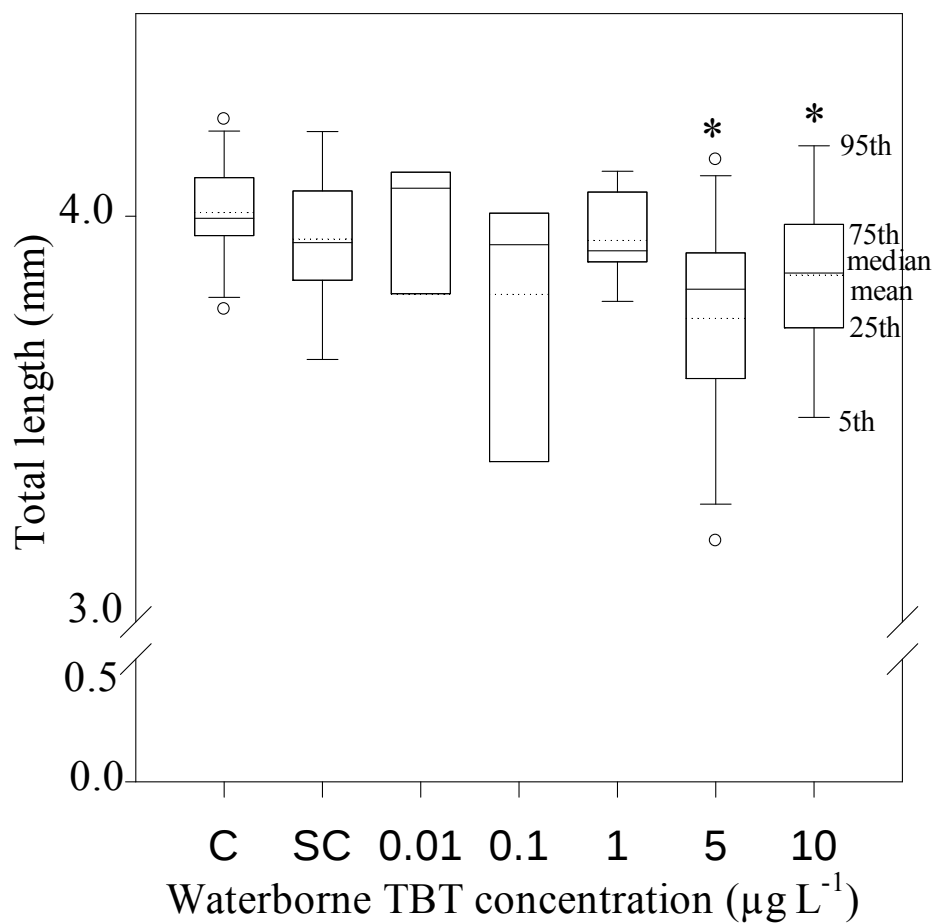


Fig. 5 – Total length of *Danio rerio* larvae exposed to waterborne TBT during 96 h. (Kruskal-Wallis $H_{6=17}$, $p < 0.001$; Dunn's test, $p < 0.05$). (C: control, SC: solvent control, acetone 0.005%). *: statistically different from control (Dunn's test).

CONCLUSÕES FINAIS

A partir dos dados gerados neste trabalho, concluímos que o estágio inicial de vida de *Poecilia vivipara* e *Danio rerio* mostrou-se um modelo sensível para avaliação ecotoxicológica de antiincrustantes e reforçando assim o seu uso como modelo sensível à contaminação ambiental.

Os recém-nascidos de *P. vivipara* foram mais sensíveis ao biocida tributiestanho TBT que aos biocidas antivegetativos de terceira geração, clorotalonil e diclofluanida, uma vez que o TBT mostrou uma maior potência de letalidade, estimada através da CL50-96h, sobre os peixes expostos. Uma avaliação comparativa da sensibilidade de *P. vivipara* e *Danio rerio* mostrou que ambas as espécies foram afetadas desde a menor concentração de exposição $0,01\mu\text{g L}^{-1}$ no desenvolvimento dessa fase dos peixes. Em relação às análises histopatológicas e comportamentais o TBT foi considerado tóxico para os olhos desses peixes, podendo promover alterações retinianas em *P. vivipara* e *D. rerio*, bem como no movimento retinomotor de *P. vivipara* que provavelmente conduziram a mudanças na natação, alimentação e crescimento capazes de reduzir as chances de recrutamento desses peixes. Estabelecendo uma relação comparativa, as alterações histopatológicas nos olhos os recém-nascidos de *P. vivipara* foram mais sensíveis ao TBT que estágios iniciais de vida do *D. rerio*, o que provavelmente pode estar relacionada a com a presença do córion nos embriões de paulistina agindo como barreira protetora à entrada de contaminantes, como vem sendo bastante relatado em estudos de embriotoxicidade.

O tributiestanho também mostrou elevado potencial teratogênico para larvas de *D. rerio* reforçando, assim, a necessidade de estratégias com múltiplas medidas biológicas para compreender diferentes mecanismos de resposta à contaminação, em diferentes magnitudes.

O clorotalonil tem efeito sistêmico e pode atacar diferentes órgãos alvos em um organismo. Esse composto mostrou-se consideravelmente mais potente que a diclofluanida para o desenvolvimento de toxicidade enterohepáticas, contribuindo para o desenvolvimento de lesões crônicas que alteram o funcionamento normal desses órgãos e de tumores pancreáticos e intestinais, comprometendo, consequentemente, o comportamento alimentar e o crescimento desses peixes.

Esses resultados poderão ajudar a explicar como alterações estruturais e comportamentais poderão afetar a sobrevivência e desenvolvimento de peixes em estágio inicial de vida expostos a esses contaminantes no ambiente aquático. As análises feitas aqui

trazem respostas sensíveis e úteis para avaliação de risco ambiental dos biocidas estudados e também podem servir como subsídio para regulamentação dos biocidas de terceira geração Clorotalonil e Diclofluanida na legislação nacional, orientando sobre as concentrações mais adequadas para uso desses biocidas nas tintas incrustantes.

REFERÊNCIAS

- ADEMA-HANNES, R., SHENKER, J. **Acute lethal and teratogenic effects of tributyltin chloride and copper chloride on mahi mahi (*Coryphaena hippurus*) eggs and larvae.** Environmental Toxicology and Chemistry , 2008. 27, p 2131-2135.
- AGIUS, C., ROBERTS, R.J., **Melano-macrophage centres and their role in fish pathology.** Journal Fish Disease, 2003. 26, p 499–509.
- ALZIEU, C., **Environmental impact of TBT: the French experience.** Science of The Total Environment, 2000. 258, 99-102.
- AKITO, M. SHINICHIRO, Y., AKIHIRO, H., MICHIAKI, K., IKUKO, S., AKIHIDE, T., HIROKATSU, A. **Reevaluation of Minamata Bay, 25 years after the dredging of mercury-polluted sediments.** Marine Pollution Bulletin , 2014. 89, 112-120.
- ALMEIDA E., DIAMANTINO T.C., DE SOUSA O. **Marine Paints: The particular case of antifouling paints.** Progress in Organic Coatings, 2007. 59, 2-20.
- AMARA, I., MILED, W., SLAMA, R.B., LADHARI, N. **Antifouling processes and toxicity effects of antifouling paints on marine environment.** A review. Environmental Toxicology and Pharmacology , 2018. 57, p 115-130.
- AMIARD-TRIQUET, C., RAINBOW, P.S. Introduction. in: Amiard-Triquet, C., Rainbow, P.S. (Ed.). **Environmental assessment of estuarine ecosystems: a case study.** CRC Press, Boca Raton, Florida , 2009. p 1-18.
- AMIARD-TRIQUET, C., AMIARD, J.C., RAINBOW, P.S. **Ecological Biomarkers Indicators of Ecotoxicological Effects: History of Biomarkers.** CRC Press, Boca Raton, London New York , 2013. p 15-44.
- ANTIZAR-LADISLAO, B. **Environmental levels, toxicity and human exposure to tributyltin (TBT)-contaminated marine environment. A review.** Environment International, 2008. 34, p 292-308.
- ARAÚJO, M.S., PEREZ, S.I., MAGAZONI, M.J.C., PETRY, A.C. **Body size and allometric shape variation in the molly *Poecilia vivipara* along a gradient of salinity and predation.** BMC Evolutionary Biology, 2014. p 14.
- ARCANJO, R.B., DE SOUZA, L.P., REZENDE, C.F., SILVA, J.R.F. **Embryonic development and nourishment in the viviparous fish *Poecilia vivipara* (Cyprinodontiformes: Poeciliidae).** Acta Zoologica, 2014. 95, p 493-500.
- ARTIFON, V., CASTRO, Í.B., FILLMANN, G.. **Spatiotemporal appraisal of TBT contamination and imposex along a tropical bay (Todos os Santos Bay, Brazil).** Environmental Science and Pollution Research, 2016. 23, p 16047-16055.
- ASNANI, A., PETERSON, R.T. **The zebrafish as a tool to identify novel therapies for humancardiovascular disease.** The Company of Biologists, 2014. p 763-767.

BAATRUP, E., BAYLEY, M. **Animal locomotor behaviour as a health biomarker of chemical stress.** Archives of Toxicology Supplement, 1998. 20, p 163-178.

BAO, V.W.W., LEUNG, K.M.Y., QIU, J.W., LAM, M.H.W. **Acute toxicities of five commonly used antifouling booster biocides to selected subtropical and cosmopolitan marine species.** Marine Pollution Bulletin, 2011. 62, p 1147-1151.

BARIŠIĆ, J., FILIPOVIĆ MARIJIĆ, V., MIJOŠEK, T., ČOŽ-RAKOVAC, R., DRAGUN, Z., KRASNIĆI, N., IVANKOVIĆ, D., KRUŽLICOVÁ, D., ERK, M. **Evaluation of architectural and histopathological biomarkers in the intestine of brown trout (*Salmo trutta* Linnaeus, 1758) challenged with environmental pollution.** Science of The Total Environment, 2018. 642, p 656-664.

BATISTA-ANDRADE, J.A., CALDAS, S.S., DE OLIVEIRA ARIAS, J.L., CASTRO, I.B., FILLMANN, G., PRIMEL, E.G. **Antifouling booster biocides in coastal waters of Panama: First appraisal in one of the busiest shipping zones.** Marine Pollution Bulletin, 2016. 112, p 415-419.

BAYNE, B.L.; BROWN, D.A.; BURNS, K.; DIXON, D.R.; IVANOVICI, A.; LOWE, D.M.; MOORE, M.N.; STEBBING, A.R.D., WIDDOWS, J. **The Effects of Stress and Pollution on Marine Animals.** New York: Praeger Scientific, 1985. p 65-89.

BEEKHUIJZEN, M., DE KONING, C., FLORES-GUILLÉN, M.E., DE VRIES-BUITENWEG, S., TOBOR-KAPLON, M., VAN DE WAART, B., EMMEN, H. **From cutting edge to guideline: A first step in harmonization of the zebrafish embryotoxicity test (ZET) by describing the most optimal test conditions and morphology scoring system.** Reproductive Toxicology, 2015. 56, p 64-76.

BELLAS, J. **Comparative toxicity of alternative antifouling biocides on embryos and larvae of marine invertebrates.** Science of The Total Environment, 2006. 367, p 573-585.

BENTIVEGNA, C.S., PIATKOWSKI, T. **Effects of tributyltin on medaka (*Oryzias latipes*) embryos at different stages of development.** Aquatic Toxicology, 1998. 44, p 117-128.

BERNET, D., SCHMIDT, H., MEIER, W., BURKHARDT-HOLM, P., WAHLI, T. **Histopathology in fish: proposal for a protocol to assess aquatic pollution.** Journal of Fish Diseases, 1999. 22, p 25-34.

BERTHET, A., BOUCHARD, M., VERNEZ, D. **Toxicokinetics de biomarcadores captan e folpet em voluntários dermatologicamente expostos.** Journal of Applied Toxicology. , 2012. 32, p 202-209.

BERTO-JÚNIOR, C., DE CARVALHO, D.P., SOARES, P., MIRANDA-ALVES, L. **Tributyltin and zebrafish: swimming in dangerous water.** Frontiers in Endocrinology, 2018. 9, p 1-7.

BHARTI, K., NGUYEN, M.T.T., SKUNTZ, S., BERTUZZI, S., ARNHEITER, H. **The other pigment cell: Specification and development of the pigmented epithelium of the vertebrate eye.** Pigment Cell Research, 2006. 19, p 380-394.

BILA, D.M., FILIPE MONTALVÃO, A., SILVA, A.C., DEZOTTI, M. **Ozonation of a landfill leachate: Evaluation of toxicity removal and biodegradability improvement.** Journal of Hazardous Materials, 2005. 117, p 235-242.

BITAR, O.Y., ORTEGA, R.D. **Gestão Ambiental.** In: Oliveira, A.M.S., Brito, S.N.A. (Eds.). *Geologia de Engenharia*. São Paulo: Associação Brasileira de Geologia de Engenharia (ABGE), 1998, cap 32, p 499-508.

BRANDE-LAVRIDSEN, N., KORSGAARD, B., DAHLÖF, I., STRAND, J., TAIROVA, Z., BJERREGAARD, P. **Abnormalities in eelpout *Zoarces viviparus* upon chemical exposure.** Marine Environmental Research, 2013. 92, p 87-94.

BOORMAN, G., BOTTS, S., E. BUNTON, T., FOURNIE, J., C. HARSHBARGER, J., HAWKINS, W., HINTON, D., P. JOKINEN, M., OKIHIRO, M., J. WOLFE, M. **Diagnostic Criteria for Degenerative, Inflammatory, Proliferative Nonneoplastic and Neoplastic Liver Lesions in Medaka (*Oryzias latipes*).** Consensus of a National Toxicology Program Pathology Working Group, 1997. 25, p 202-210.

BOWEN, R.E., REPLEDGE, M.H. **Rapid assessment of marine pollution (ramp).** Marine Pollution Bulletin, 2006. 53, p 631-639.

BURNSIDE, B., KING-SMITH, C.. **Fish Retinomotor Movements.** in: Besharse, J., Bok, D. (Eds.). *The Retina and its Disorders*. Academic Press, 2011. p 219-227.

BUSHONG, S.J., HALL JR, L.W., SCOTT HALL, W., EDWARD JOHNSON, W., HERMAN, R.L. **Acute toxicity of tributyltin to selected Chesapeake Bay fish and invertebrates.** Water Research, 1988. 22, p 1027-1032.

CACCIATORE, F., BOSCOLO BRUSÀ, R., NOVENTA, S., ANTONINI, C., MOSCHINO, V., FORMALEWICZ, M., GION, C., BERTO, D., GABELLINI, M., MARIN, M.G. **Imposex levels and butyltin compounds (BTs) in *Hexaplex trunculus* (Linnaeus, 1758) from the northern Adriatic Sea (Italy): Ecological risk assessment before and after the ban.** Ecotoxicology and Environmental Safety, 2018. 147, p 688-698.

CALIENNI, M.N., CAGEL, M., MONTANARI, J., MORETTON, M.A., PRIETO, M.J., CHIAPPETTA, D.A., ALONSO, S.D.V. **Zebrafish (*Danio rerio*) model as an early stage screening tool to study the biodistribution and toxicity profile of doxorubicin-loaded mixed micelles.** Toxicology and Applied Pharmacology, 2018. 357, p 106-114.

CAO, D., JIANG, G., ZHOU, Q., YANG, R. **Organotin pollution in China: An overview of the current state and potential health risk.** Journal of Environmental Management, 2009. 90, p S16-S24.

CALLOW, J.A., CALLOW, M.E. **Trends in the development of environmentally friendly fouling-resistant marine coatings.** Nature Communications, 2011. 2, p 244.

CARSON, R., R. **Silent spring.** Houghton Mifflin Harcourt, 2002. p 368.

CARVALHO, P. AND D. E TILLITT. **2,3,7,8-TCDD Effects on Visual Structure and Function in Swim-Up Rainbow Trout.** Environmental Science and Technology, 2005. 38, p 6300-63006.

CARVALHO, P.S.M., KALIL, D.D., NOVELLI, G.A., BAINY, A.C., FRAGA, A.P. **Effects of naphthalene and phenanthrene on visual and prey capture endpoints during early stages of the dourado *Salminus brasiliensis***. Marine Environmental Research, 2008. 66, p 205–207.

CARVALHO, P.S.M. **Behavioral Biomarkers and Pollution Risks to Fish Health and Biodiversity**. in: Almeida, E.A., Ribeiro, C.A.O. (Eds.). Pollution and Fish Health in Tropical Ecosystems, 2014. p 350-377.

CASTRO, Í.B., WESTPHAL, E., FILLMANN, G. **Tintas anti-incrustantes de terceira geração: novos biocidas no ambiente aquático**. Química Nova, 2011. 34, p 1021-1031.

CASTRO, Í.B., IANNAcone, J., SANTOS, S., FILLMANN, G. **TBT is still a matter of concern in Peru**. Chemosphere, 2018. 205, p 253-259.

CASTRO, I.B., PERINA, F.C., FILLMANN, G. **Organotin contamination in South American coastal areas**. Environmental Monitoring and Assessment, 2012. 184, p 1781-1799.

CAUX, P.Y., KENT, R.A., FAN, G.T., STEPHENSON, G.L. **Environmental fate and effects of chlorothalonil: A Canadian perspective**. Critical Reviews in Environmental Science and Technology, 1996. 26, p 45-93.

CCME. Appendix XVII, **Canadian water quality guidelines: Updates Chlorothalonil**, 1994. In: Canadian water quality guidelines, Canadian Council of Resource and Environment Ministers.

CIMA, F. **Tin: Environmental Pollution and Health Effects**, 2018. p 351-359.

CIMA, F., BRAGADIN, M., BALLARIN, L. **Toxic effects of new antifouling compounds on tunicate haemocytes: I. Sea-Nine 211™ and chlorothalonil**. Aquatic Toxicology, 2008. 86, p 299-312.

CLOUSTON, A.D., POWELL, E.E., WALSH, M.J., RICHARDSON, M.M., DEMETRIS, A.J., JONSSON, J.R. **Fibrosis correlates with a ductular reaction in hepatitis C: Roles of impaired replication, progenitor cells and steatosis**. Hepatology, 2005. 41, p 809-818.

COLWILL, R. M., CRETON, R. **Locomotor behaviors in zebrafish (*Danio rerio*) larvae**. Behavioural Processes, 2011. 86, p 222–229.

CONAMA. 357/2005. Resolução número 357, de 17 de março de 2005. Ministério do Meio Ambiente, Conselho Nacional do Meio Ambiente – CONAMA, Brasília. **Classificação dos corpos de água e diretrizes ambientais para o seu enquadramento**. Publicada no Diário Oficial da União nº 053. Disponível em: <http://www.mma.gov.br/port/conama/res/res05/res35705.pdf>. Acesso em: 10/2017.

CONAMA. 396/2008 Resolução número 396, de 03 de abril de 2008. Ministério do Meio Ambiente, Conselho Nacional do Meio Ambiente – CONAMA, Brasília. **Classificação e diretrizes ambientais para o enquadramento das águas subterrâneas**. Publicada no Diário Oficial da União nº 66. Disponível em: <http://www.mma.gov.br/port/conama/legiabre.cfm?codlegi=562>. Acesso em: 10/2017.

COSTA, C.R., OLIVI, P., BOTTA, C.M.R., ESPINDOLA, E.L.G. **A toxicidade em ambientes aquáticos: discussão e métodos de avaliação.** Química Nova, 2008. 31, p 1820-1830.

COSTA, P.M. **Chapter 6 - Identification of major histopathological traits.** In: Costa, P.M. (Ed.). The Handbook of Histopathological Practices in Aquatic Environments. Academic Press, 2018. p 135-190.

COURRAT, A., LOBRY, J., NICOLAS, D., LAFFARGUE, P., AMARA, R., LEPAGE, M., GIRARDIN, M., LE PAPE, O. **Anthropogenic disturbance on nursery function of estuarine areas for marine species.** Estuarine, Coastal and Shelf Science, 2009 81, 179–190.

CROFT, W. **Let the truth be known in: Operation Synapse.** in: House, A. (Ed.). Operation Synapse, 2013. p 392.

CZESNY, S. J., GRAEB, B. D. S., DETTMERS, J. M. **Ecological Consequences of Swim Bladder Noninflation for Larval Yellow Perch.** Transactions of the American Fisheries Society, 2005. 134, p 1011-1020.

DAFFORN, K. A., LEWIS, J. A., JOHNSTON, E.L. **Antifouling strategies: History and regulation, ecological impacts and mitigation.** Marine Pollution Bulletin, 2011. 62, 453-465.

DAVIES, P.E. **Physiological, anatomic and behavioural changes in the respiratory system of *Salmo gairdneri* rich on acute and chronic exposure to chlorothalonil.** Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Comparative Pharmacology, 1987. 88, p 113-119.

DAVIES, P.E., WHITE, R.W.G. **The toxicology and metabolism of chlorothalonil in fish. I. Lethal levels for *Salmo gairdneri*, *Galaxias maculatus*, *G. truttaceus* and *G. auratus* and the fate of 14C-TCIN in *S. gairdneri*.** Aquatic Toxicology, 1985. 7, p 93-105.

DAVE, G., XIU, R. **Toxicity of mercury, copper, nickel, lead, and cobalt to embryos and larvae of zebrafish, *Brachydanio rerio*.** Archives of Environmental Contamination and Toxicology, 1991. 21, p 126-134.

DE CARVALHO OLIVEIRA, R., SANTELLI, R.E. **Occurrence and chemical speciation analysis of organotin compounds in the environment: A review.** Talanta, 2010. 82, p 9-24.

DE CASTRO, I.B., PERINA, F.C., FILLMANN, G. **Organotin contamination in South American coastal areas.** Environmental Monitoring and Assessment, 2012. 184, p 1781-1799.

DECRETO-LEI n.º 138 /2008. <https://dre.pt/pesquisa/-/search/456792/details/maximized>

DEFRA - Department For Environment Food And Rural Affairs Water. United Kingdom - UK. **Framework directive implementation in England and wales: new and updated standards to protect the water environment** 41, 2014.

DE WAISBAUM, R.G., RODRIGUEZ, C., NUDELMAN, N.S. **Determination of TBT in water and sediment samples along the Argentine Atlantic coast.** Environmental Technology, 2010. 31, p 1335-1342.

DONG, W., MURAMOTO, W., NAGAI, Y., TAKEHANA, K., STEGEMAN, J.J., TERAOKA, H., HIRAGA, T. **Retinal neuronal cell is a toxicological target of tributyltin in developing zebrafish.** Journal of Veterinary Medical Science, 2006. 68, p 573-579.

DOUGLAS, R., DJAMGOZ, M. **The Visual System of Fish.** Springer Science, 1990. p 525.

DU GAS, L.M., ROSS, P.S., WALKER, J., MARLATT, V.L., KENNEDY, C.J. **Effects of atrazine and chlorothalonil on the reproductive success, development, and growth of early life stage sockeye salmon (*Oncorhynchus nerka*).** Environmental Toxicology and Chemistry, 2017. 36, p 354-1364.

EMBRY, M.R., BELANGER, S.E., BRAUNBECK, T.A., GALAY-BURGOS, M., HALDER, M., HINTON, D.E., LÉONARD, M.A., LILLICRAP, A., NORBERG-KING, T., WHALE, G. **The fish embryo toxicity test as an animal alternative method in hazard and risk assessment and scientific research.** Aquatic Toxicology, 2010. 97, p 79-87.

ENGESZER, R. E., PATTERSON, L. B., RAO, A. A., PARICHY, D. M. **Zebrafish in the Wild: A Review of Natural History and New Notes from the Field.** Zebrafish, 2007. 4, p 21-40.

EVANS, J., GASPARINI, C., PILASTRO, A. **Female guppies shorten brood retention in response to predator cues,** 2007. 61, p 719–727.

EVANS, J.P., PILASTRO, A. **Ecology and evolution of poeciliid fishes.** The University of Chicago Press, Chicago, 2011. p 425.

FENT, K. **Bioconcentration and elimination of tributyltin chloride by embryos and larvae of minnows *Phoxinus phoxinus*.** Aquatic Toxicology, 1991. 20, p 147-158.

FENT, K. **Embryotoxic effects of tributyltin on the minnow *Phoxinus phoxinus*.** Environmental Pollution, 1992. 76, p 187-194.

FENT, K., MEIER, W. **Tributyltin-induced effects on early life stages of minnows *Phoxinus phoxinus*.** Archives of Environmental Contamination and Toxicology, 1992. 22, p 428-438.

FENT, K., HUNN, J. **Uptake and elimination of tributyltin in fish-yolk-sac larvae.** Marine Environmental Research, 1993. 35, p 65-71.

FENT, K. **Ecotoxicology of organotin compounds.** Critical Reviews in Toxicology, 1996. 26, p 1-117.

FENT, K. **Effects of organotin compounds in fish: from the molecular to the population level.** Fish Ecotoxicology, 1998. p 259-302.

FENT, K. **Ecotoxicological problems associated with contaminated sites.** Toxicology Letters, 2003. 140–141, p 353-365.

FENT, K. **Ecotoxicological effects at contaminated sites.** Toxicology, 2004. 205, p 223-240.

FILIZOLA, H. F., FERRACINI, V. L., AGUIAR SANS, L. M., GOMES, M. A. F., FERREIRA, A. J. C. **Monitoring and evaluation of the risk of contamination by pesticide in surface water and groundwater in the Guaíra region, São Paulo, Brazil.** Pesquisa Agropecuária Brasileira, 2002. 37, p 659-667.

FISHELSON, L. **Cytomorphological alterations of the thymus, spleen, head-kidney, and liver in cardinal fish (Apogonidae, Teleostei) as bioindicators of stress.** Journal Morphology, 2006. 267, p 57-69.

FISHER, L.G., PEREIRA, L. E. D., VIEIRA, J. P. **Peixes estuarinos e costeiros. Série Biodiversidade do Atlântico sudoeste,** 2004. p 126.

FERNÁNDEZ-GARCÍA, J.C., ARREBOLA, J.P., GONZÁLEZ-ROMERO, S., SORIGUER, F., OLEA, N., TINAHONES, F.J. **Diabetic ketoacidosis following chlorothalonil poisoning.** Occupational and Environmental Medicine, 2014. 71, p 382.

FOURNIE, J.W., SUMMERS, J.K., COURTNEY, L.A., ENGLE, V.D., BLAZER, V.S. **Utility of splenic macrophage aggregates as an indicator of fish exposure to degraded environments.** Journal Aquatic Animal Health, 2001. 13, p 105-116.

FURDEK, M., VAHČIČ, M., ŠČANČAR, J., MILAČIČ, R., KNIEWALD, G., MIKAC, N. **Organotin compounds in seawater and *Mytilus galloprovincialis* mussels along the Croatian Adriatic Coast.** Marine Pollution Bulletin, 2012. 64, p 189-199.

GABER, H.S., ABBAS, W.T., AUTHMAN, M.M.N., GABER, S.A. **Histological and biochemical studies on some organs of two fish species in bardawil lagoon, North Sinai, Egypt.** Global Veterinaria, 2014. 11, p 01-11.

GALLAGHER, E.P., CATTLEY, R.C., DI GIULIO, R.T. **The acute toxicity and sublethal effects of chlorothalonil in channel catfish (*Ictalurus punctatus*).** Chemosphere, 1992. 24, p 3-10.

GARG, A., MEENA, R.M., JADHAV, S., BHOSLE, N.B. **Distribution of butyltins in the waters and sediments along the coast of India.** Marine Pollution Bulletin, 2011. 62, p 423-431.

GENTEN, F. **Atlas of Fish Histology.** Boca Raton: CRC Press, 2009. p 224.

Gerking, S.D., 1994. Feeding ecology of fish. Ed. 1 ed. San Diego, Academic Press, 416.

GOLDBERG, R.N., AVERBUJ, A., CLEDÓN, M., LUZZATTO, D., NUDELMAN, N.S. **Search for triorganotins along the Mar del Plata (Argentina) marine coast: Finding of tributyltin in egg capsules of a snail *Adelomelon brasiliense* (Lamarck, 1822) population showing imposex effects.** Applied Organometallic Chemistry, 2004. 18, p 117- 123.

GOMES JR, J.L., MONTEIRO, L.R. **Size and fecundity variation in populations of *Poecilia vivipara* Block & Schneider (Teleostei; Poeciliidae) inhabiting an environmental gradient.** Journal of Fish Biology, 2007. 71, p 1799-1809.

GOMES JR, J.L., MONTEIRO, L.R. **Morphological divergence patterns among populations of *Poecilia vivipara* (Teleostei Poeciliidae): Test of an ecomorphological paradigm.** Biological Journal of the Linnean Society, 2008. 93, p 799-812.

GORDON, E.B. Chapter 90 - **Captan and Folpet.** in: Krieger, R. (Ed.). Hayes' Handbook of Pesticide Toxicology (Third Edition). Academic Press, New York, 2010. p 1915-1949.

GUARDIOLA, F.A., CUESTA, A., MESEGUER, J., ESTEBAN, M.A. **Risks of using antifouling biocides in aquaculture.** International Journal of Molecular Sciences, 2012. 13, p 1541-1560.

GOUNDADKAR, B.B., KATTI, P. **Environmental estrogen(s) induced swimming behavioural alterations in adult zebrafish (*Danio rerio*).** Environmental Toxicology and Pharmacology, 2017. 54, p 146-154.

GU, J.-D. Chapter 14 - **Microbial Biofilms, Fouling, Corrosion, and Biodeterioration of Materials.** in: Kutz, M. (Ed.). Handbook of Environmental Degradation of Materials (Third Edition). William Andrew Publishing, 2018. p 273-298.

GÜRCÜ, B., KOCAB, Y. B., TUĞLU, M. I. **Alterações na matriz devido aos efeitos tóxicos do metronidazol no tecido intestinal do peixe (*Onchorhynchus mykiss*).** Chemosphere 144, p 1605-1610.

GRÜN, F. Chapter Eleven: **The Obesogen Tributyltin. Vitamins and Hormones**, 2014. 94, p 277-325.

HARAYASHIKI, C.A.Y., JUNIOR, A.S.V., MACHADO, A.A.D.S., CABRERA, L.D.C., PRIMEL, E.G., BIANCHINI, A., CORCINI, C.D. **Toxic effects of the herbicide Roundup in the guppy *Poecilia vivipara* acclimated to fresh water.** Aquatic Toxicology, 2013. 142-143, p 176-184.

HASCHEK, W.M., ROUSSEAU, C.G., WALLIG, M.A. CHAPTER 10 - PANCREAS. IN: HASCHEK, W.M., ROUSSEAU, C.G., WALLIG, M.A. (Eds.). **Fundamentals of Toxicologic Pathology (Second Edition).** Academic Press, San Diego, , 2010. p 237-260.

HAYNES, J., L. **Standardized Classification of Poeciliid Development for Life-History Studies Copeia American Society of Ichthyologists and Herpetologists (ASIH),** 1995. p 147-154.

HANO, T., OSHIMA, Y., KIM, S.G., SATONE, H., OBA, Y., KITANO, T., INOUE, S., SHIMASAKI, Y., HONJO, T. **Tributyltin causes abnormal development in embryos of medaka, *Oryzias latipes*.** Chemosphere, 2007. 69, p 927-933.

HAWKINS, W.E., OVERSTREET, R.M., WALKER, W.W. **Testes de carcinogenicidade com espécies pequenas de peixes.** Aquatic Toxicology, 1988. 11, p 1-2.

HAMWIJK, C., SCHOUTEN, A., FOEKEMA, E.M., RAVENSBERG, J.C., COLLOMBON, M.T., SCHMIDT, K., KUGLER, M. **Monitoring of the booster biocide dichlofluanid in water and marine sediment of Greek marinas.** Chemosphere, 2005. 60, p 1316-1324.

HEINDEL, J.J., BLUMBERG, B., CAVE, M., MACHTINGER, R., MANTOVANI, A., MENDEZ, M.A., NADAL, A., PALANZA, P., PANZICA, G., SARGIS, R., VANDENBERG, L.N., VOM SAAL, F. **Metabolism disrupting chemicals and metabolic disorders**. Reproductive TOXICOLOGY, 2017. 68, p 3-33.

HERMSEN, S.A.B., VAN DEN BRANDHOF, E.-J., VAN DER VEN, L.T.M., PIERSMA, A.H. **Relative embryotoxicity of two classes of chemicals in a modified zebrafish embryotoxicity test and comparison with their in vivo potencies**. Toxicology in Vitro, 2011. 25, p 745-753.

HERMSEN, S.A.B., PIERSMA, A.H. Chapter 4.1 - **Implementation of Transcriptomics in the Zebrafish Embryotoxicity Test**. in: Kleinjans, J. (Ed.). Toxicogenomics-Based Cellular Models. Academic Press, 2014. San Diego p 127-141.

HINTON, D.E., SEGNER, H., BRAUNBECK, T., SCHLENK, D., BENSON, W.H. **Toxic responses of the liver in:** Francis, T. (Ed.). Target Organ Toxicity in Marine and Freshwater Teleosts, London, 2001. p 395.

HODEL, C., NEUHAUSS, S.C.F., BIEHLMAIER, O. **Time course and development of light adaptation processes in the outer zebrafish retina**. Anatomical Record - Part A Discoveries in Molecular, Cellular, and Evolutionary Biology, 2006. 288, p 653-662.

HORIGUCHI, F., NAKATA, K., ITO, N., OKAWA, K. **Risk assessment of TBT in the Japanese short-neck clam (*Ruditapes philippinarum*) of Tokyo Bay using a chemical fate model**. Estuarine, Coastal and Shelf Science, 2006. 70, p 589-598.

HORIGUCHI, T., MORITA, M. **Imposex and organotin compounds in thais clavigera and t. bronni in japan**. Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom, 1994. 74, p 651-669.

HOWE, K., CLARK, M.D., TORROJA, C.F., TORRANCE, J., BERTHELOT, C., MUFFATO, M., COLLINS, J.E., HUMPHRAY, S., MCLAREN, K., MATTHEWS, L., MCLAREN, S., SEALY, I., CACCAMO, M., CHURCHER, C., SCOTT, C., BARRETT, J.C., KOCH, R., RAUCH, G.-J., WHITE, S., CHOW, W., KILIAN, B., QUINTAIS, L.T., GUERRA-ASSUNÇÃO, J.A., ZHOU, Y., GU, Y., YEN, J., VOGEL, J.-H., EYRE, T., REDMOND, S., BANERJEE, R., CHI, J., FU, B., LANGLEY, E., MAGUIRE, S.F., LAIRD, G.K., LLOYD, D., KENYON, E., DONALDSON, S., SEHRA, H., ALMEIDA-KING, J., LOVELAND, J., TREVANION, S., JONES, M., QUAIL, M., WILLEY, D., HUNT, A., BURTON, J., SIMS, S., MCLAY, K., PLUMB, B., DAVIS, J., CLEE, C., OLIVER, K., CLARK, R., RIDDLE, C., ELLIOTT, D., THREADGOLD, G., HARDEN, G., WARE, D., BEGUM, S., MORTIMORE, B., KERRY, G., HEATH, P., PHILLIMORE, B., TRACEY, A., CORBY, N., DUNN, M., JOHNSON, C., WOOD, J., CLARK, S., PELAN, S., GRIFFITHS, G., SMITH, M., GLITHERO, R., HOWDEN, P., BARKER, N., LLOYD, C., STEVENS, C., HARLEY, J., HOLT, K., PANAGIOTIDIS, G., LOVELL, J., BEASLEY, H., HENDERSON, C., GORDON, D., AUGER, K., WRIGHT, D., COLLINS, J., RAISEN, C., DYER, L., LEUNG, K., ROBERTSON, L., AMBRIDGE, K., LEONGAMORNERT, D., MCGUIRE, S., GILDERTHORP, R., GRIFFITHS, C., MANTHRAVADI, D., NICHOL, S., BARKER, G., WHITEHEAD, S., KAY, M., BROWN, J., MURNANE, C., GRAY, E., HUMPHRIES, M., SYCAMORE, N., BARKER, D., SAUNDERS, D., WALLIS, J., BABBAGE, A., HAMMOND, S., MASHREGHI-MOHAMMADI, M., BARR, L., MARTIN, S., WRAY, P.,

ELLINGTON, A., MATTHEWS, N., ELLWOOD, M., WOODMANSEY, R., CLARK, G., COOPER, J.D., TROMANS, A., GRAFHAM, D., SKUCE, C., PANDIAN, R., ANDREWS, R., HARRISON, E., KIMBERLEY, A., GARNETT, J., FOSKER, N., HALL, R., GARNER, P., KELLY, D., BIRD, C., PALMER, S., GEHRING, I., BERGER, A., DOOLEY, C.M., ERSAN-ÜRÜN, Z., ESER, C., GEIGER, H., GEISLER, M., KAROTKI, L., KIRN, A., KONANTZ, J., KONANTZ, M., OBERLÄNDER, M., RUDOLPH-GEIGER, S., TEUCKE, M., LANZ, C., RADDATZ, G., OSOEGAWA, K., ZHU, B., RAPP, A., WIDAA, S., LANGFORD, C., YANG, F., SCHUSTER, S.C., CARTER, N.P., HARROW, J., NING, Z., HERRERO, J., SEARLE, S.M.J., ENRIGHT, A., GEISLER, R., PLASTERK, R.H.A., LEE, C., WESTERFIELD, M., DE JONG, P.J., ZON, L.I., POSTLETHWAIT, J.H., NÜSSLEIN-VOLHARD, C., HUBBARD, T.J.P., CROLLIUS, H.R., ROGERS, J., STEMPEL, D.L., 2013. **The zebrafish reference genome sequence and its relationship to the human genome.** Nature 496, p 498.

HÜBSCHER, S.G. **Histological assessment of the liver.** Medicine, 2015. 43, p 568-572.

IMO, Organização Marítima Internacional - **Antifouling Systems, International Convention on the Control of Harmful Anti-fouling Systems on Ships, International Maritime Organization:** London. Acessado em 26/06/2014.

INCT-TA-Cnpq. Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia – **Toxicologia Aquática**, 2014. <http://www.inct-ta.furg.br/>. Acessado em 26/06/2014.

JARVINEN, A.W., TANNER, D.K., KLINE, E.R., KNUTH, M.L. **Acute and chronic toxicity of triphenyltin hydroxide to fathead minnows (*Pimephales promelas*) following brief or continuous exposure.** Environmental Pollution, 1988. 52, p 289-301.

JESUS, T.B., CARVALHO, C.E.V. **Using biomarkers in fish to detect environmental contamination by Mercury.** Oecologia Brasiliensis, 2008. 12, p 680-693.

JI, Y., LIN, J., PENG, X., LIU, X., LI, F., ZHANG, Y., GUO, N., LI, Q. **Behavioural responses of zebrafish larvae to acute ethosuximide exposure.** Behavioural Pharmacology, 2017. 28, p 428-440.

KENDALL, A. W., AHLSTROM, J.R., E. H., MOSER H. G., COHEN. **Early life history stages of fishes and their characters.** Ontogeny, Systematics. Phylogeny, 1954. p 11-22.

KIM, N.S., SHIM, W.J., YIM, U.H., HONG, S.H., HA, S.Y., HAN, G.M., SHIN, K.-H. **Assessment of TBT and organic booster biocide contamination in seawater from coastal areas of South Korea.** Marine Pollution Bulletin, 2014. 78, p 201-208.

KONSTANTINO, I.K., ALBANIS, T.A. **Worldwide occurrence and effects of antifouling paint booster biocides in the aquatic environment: a review.** Environment International, 2004. 30, p 235-248.

KOUTSAFTIS, A., AOYAMA, I. **Toxicity of four antifouling biocides and their mixtures on the brine shrimp *Artemia salina*.** Science of The Total Environment, 2007. 387, p 166-174.

KREIDER, K.E. **Updates in the Management of Diabetic Ketoacidosis.** The Journal for Nurse Practitioners, 2018. 14, p 591-597.

LANGSTON, W.J., POPE, N.D., DAVEY, M., LANGSTON, K.M., O' HARA, S.C.M., GIBBS, P.E., PASCOE, P.L. **Recovery from TBT pollution in English Channel environments: A problem solved?** Marine Pollution Bulletin, 2015. 95, p 551-564.

LARANJEIRO, F., SÁNCHEZ-MARÍN, P., OLIVEIRA, I.B., GALANTE-OLIVEIRA, S., BARROSO, C. **Fifteen years of imposex and tributyltin pollution monitoring along the Portuguese coast.** Environmental Pollution, 2018. 232, p 411-421.

LI, Z.-H., LI, P. **Evaluation of tributyltin toxicity in Chinese rare minnow larvae by abnormal behavior, energy metabolism and endoplasmic reticulum stress.** Chemico-Biological Interactions, 2015. 227, p 32-36.

LI, P.G., LI, Z. **Physiological Responses in Chinese Rare Minnow Larvae Following Exposure to Low-Dose Tributyltin.** Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology, 2015. 95, p 588-592.

LIANG, X., SOUDERS, C.L., ZHANG, J., MARTYNIUK, C.J. **Tributyltin induces premature hatching and reduces locomotor activity in zebrafish (*Danio rerio*) embryos/larvae at environmentally relevant levels.** Chemosphere, 2017. 189, p 498-506.

LINDGREN, J.F., WILEWSKA-BIEN, M., GRANHAG, L., ANDERSSON, K., ERIKSSON, K.M. Discharges to the Sea. in: Andersson, K., Brynolf, S., Lindgren, J.F., Wilewska-Bien, M. (Eds.). **Shipping and the Environment : Improving Environmental Performance in Marine Transportation.** Springer Berlin Heidelberg, 2016. p 125-168.

LINDSEY, B.W., SMITH, F.M., CROLL, R.P. **From Inflation to Flotation: Contribution of the Swimbladder to Whole-Body Density and Swimming Depth During Development of the Zebrafish (*Danio rerio*).** Zebrafish, 2010. 7, p 85-96.

LITTLE, E.E., FINGER, S.E. **Swimming behavior as an indicator of sublethal toxicity in fish.** Environmental Toxicology Chemical, 1990. 9, p 13-19.

LIU, X., ZHANG, Q., LI, S., MI, P., CHEN, D., ZHAO, X., FENG, X. **Developmental toxicity and neurotoxicity of synthetic organic insecticides in zebrafish (*Danio rerio*): A comparative study of deltamethrin, acephate, and thiamethoxam.** Chemosphere, 2018. 199, p 16-25.

MACHADO, A.A.S., HOFF, M.L.M., KLEIN, R.D., CARDOZO, J.G., GIACOMIN, M.M., PINHO, G.L.L., BIANCHINI, A. **Biomarkers of waterborne copper exposure in the guppy *Poecilia vivipara* acclimated to salt water.** Aquatic Toxicology, 2013. 138-139, p 60-69.

MACHADO, A.A.S., HOFF, M.L.M., KLEIN, R.D., CORDEIRO, G.J., LENCINA AVILA, J.M., COSTA, P.G., BIANCHINI, A. **Oxidative stress and DNA damage responses to phenanthrene exposure in the estuarine guppy *Poecilia vivipara*.** Marine Environmental Research, 2014. 98, p 96-105.

MACIEL, D.C., CASTRO, Í.B., DE SOUZA, J.R.B., YOGUI, G.T., FILLMANN, G., ZANARDI-LAMARDO, E. **Assessment of organotins and imposex in two estuaries of the northeastern Brazilian coast.** Marine Pollution Bulletin, 2018. 126, p 473-478.

MAGALHÃES, D.P., FERRÃO FILHO, A.S. **A Ecotoxicologia como ferramenta no biomonitoramento de ecossistemas aquáticos.** Oecologia Brasiliensis, 2008. 12, p 355-381.

MAHGOUB, H., MAHER EL-ADL, M.A. **Histopathological alterations and oxidative stress damage caused by short-term chlorothalonil administration in Nile Tilapia.** Egyptain Journal of Comparative Pathology and Clinical Pathology, 2017. 30, p 25-38.

MARTINS, T. L., VARGAS, V.M.F. **Riscos à biota aquática pelo uso de tintas anti-incrustantes nos cascos de embarcações.** Ecotoxicology and Environmental Contamination, 2013. 8, p 01-11.

MATTHIESSEN, P., GIBBS, P.E. **Critical appraisal of the evidence for tributyltin mediated endocrine disruption in mollusks.** Environmental Toxicology and Chemistry, 1998. 17, p 37-43.

MATTOS, J.J., SIEBERT, M.N., LUCHMANN, K.H., GRANUCCI, N., DORRINGTON, T., STOCO, P.H., GRISARD, E.C., BAINY, A.C.D. **Differential gene expression in *Poecilia vivipara* exposed to diesel oil water accommodated fraction.** Marine Environmental Research, 2010. 69, p S31-S33.

MCKIM, J.M. **Evaluation of Tests with Early Life Stages of Fish for Predicting Long-Term Toxicity.** Journal of the Fisheries Research Board of Canada, 1977. 34, p 1148- 1154.

MEADOR, J.P. **Predicting the fate and effects of tributyltin in marine systems.** Reviews of environmental contamination and toxicology, 2000. 166, p 1-48.

MEADOR, J.P., SOMMERS, F.C., COOPER, K. A., YANAGIDA, G., 2011. **Tributyltin and the obesogen metabolic syndrome in a salmonid.** Environmental Research 111, 50-56.

MENASHA, W., BANTA, G. **The Effects of Fouling.** Marine fouling and its prevention, Woods Hole Oceanographic Institution, Massachusetts, 1952. p 388.

MOCHIDA, K., FUJII, K. **Toxicity for Aquatic Organisms.** in: T, A., Harino, H., Ohji, M., Langston, W.J. Ecotoxicology of Antifouling Biocides Springer, Japan, 2009. p 149-160.

MONSERRAT, J.M., MARTÍNEZ, P.E., GERACITANO, L.A., AMADO, L.L., MARTINS, C.M.G., PINHO, G.L.L., CHAVES, I.S., FERREIRA-CRAVO, M., VENTURA-LIMA, J., BIANCHINI, A. **Pollution biomarkers in estuarine animals: Critical review and new perspectives.** Comparative Biochemistry and Physiology, Part C, 2007. 146, p 221-234.

MORA, C. **Recruitment of coral reef fishes: linkages across stages, in: Ecology of Fishes on Coral Reefs.** Published by Cambridge University Press. University Press, 2015. p 28-33.

NABINGER, D.D., ALTENHOFEN, S., BITENCOURT, P.E.R., NERY, L.R., LEITE, C.E., VIANNA, M.R.M.R., BONAN, C.D. **Nickel exposure alters behavioral parameters in larval and adult zebrafish.** Science of the Total Environment, 2018. 624, p 1623-1633.

NAKAYAMA, K., OSHIMA, Y., NAGAFUCHI, K., HANO, T., SHIMASAKI, Y., HONJO, T. **Early-life-stage toxicity in offspring from exposed parent medaka, *Oryzias latipes*, to**

mixtures of tributyltin and polychlorinated biphenyls. Environmental Toxicology and Chemistry, 2005. 24, p 591-596.

NOMMISTE, B., FYNES, K., TOVELL, V.E., RAMSDEN, C., DA CRUZ, L., COFFEY, P. Chapter 9 - **Stem cell-derived retinal pigment epithelium transplantation for treatment of retinal disease.** in: Dunnett, S.B., Björklund, A. (Eds.). Progress in Brain Research. Elsevier, 2017. p 225-244.

OECD- 236 **Fish Embryo Acute Toxicity (FET) Test.** Test No. 236. OECD Publishing, Paris, 2013.

OKORO, H.K., FATOKI, O.S., ADEKOLA, F.A., XIMBA, B.J., SNYMAN, R.G. **Organotin Compounds.** in: Wexler, P. (Ed.). Encyclopedia of Toxicology (Third Edition). Academic Press, Oxford, 2014. p 720-725.

OLIVEIRA, H.H.P., LIEBEL, S., ROSSI, S.C., AZEVEDO, A.C.B., BARRERA, E.A.L., GARCIA, J.R.E., GRÖTZNER, S.R., NETO, FRANCISCO F., RANDI, M.A.F., RIBEIRO, C.A.O. **Mixtures of benzo(a)pyrene, dichlorodiphenyltrichloroethane and tributyltin are more toxic to neotropical fish *Rhamdia quelen* than isolated exposures.** Ecotoxicology and Environmental Safety, 2015. 122, p 106-115.

ONDUKA, T., KAKUNO, A., KONO, K., ITO, K., MOCHIDA, K., FUJII, K. **Toxicity of chlorothalonil to marine organisms.** Fisheries Science, 2012. 78, p 1301-1308.

OSSE, J. W. M., VAN DEN BOOGAART, J. G. M. **Fish larvae, development, allometric growth, and the aquatic environment.** ICES Marine Science Symposia, 1995. 201, p 21-34.

OUADAH-BOUSSOUF, N. BABIN, P.J. **Pharmacological evaluation of the mechanisms involved in the increase of adiposity in zebrafish triggered by the environmental contaminant tributyltin.** Toxicology and Applied Pharmacology, 2016. 294, p 32 - 42 .

PADILLA, S., HUNTER, D.L., PADNOS, B., FRADY, S., MACPHAIL, R.C. **Assessing locomotor activity in larval zebrafish: Influence of extrinsic and intrinsic variables.** Neurotoxicology and Teratology, 2011. 33, p 624-630.

PALAS, S., SANDIPAN, P., ALOKE KUMAR, M., TARAKESHWAR, S., DEBRAJ, K., APURBA, R.G. **Gastrointestinal Pathology in Freshwater Fish, *Oreochromis niloticus* (Linnaeus) Under Almix Exposure.** Journal of Environmental & Analytical Toxicology, 2016. 6, p 399.

PALMER, B.F., CLEGG, D.J., TAYLOR, S.I., WEIR, M.R. **Diabetic ketoacidosis, sodium glucose transporter-2 inhibitors and the kidney.** Journal of Diabetes and its Complications, 2016. 30, p 1162-1166.

PARKS, R., DONNIER-MARECHAL, M., FRICKERS, P.E., TURNER, A., READMAN, J.W. **Antifouling biocides in discarded marine paint particles.** Marine Pollution Bulletin, 2010. 60, p 1226-1230.

PAULO, D.V., FONTES, F.M., FLORES-LOPES, F. **Histopathological alterations observed in the liver of *Poecilia vivipara* (Cyprinodontiformes: Poeciliidae) as a tool for**

the environmental quality assessment of the Cachoeira River, BA. Brazilian Journal of Biology, 2012. 72, p 131-140.

PERES, R.S., BALDISSERA, A.F., ARMELIN, E., ALEMÁN, C., FERREIRA, C.A. **Marine-friendly antifouling coating based on the use of a fatty acid derivative as a pigment.** Materials Research, 2014. 17, p 720-727.

PEREIRA, A., CARVALHO, AP., CRUZ, C., SARAIVA, A. **Alterações histopatológicas e desempenho zootécnico em zebrafish juvenil (*Danio rerio*) sob exposição crônica ao nitrato.** Aquicultura, 2017. 473, p 197-205.

PINKNEY, A.E., MATTESON, L.L., WRIGHT, D.A. **Effects of tributyltin on survival, growth, morphometry, and RNA-DNA ratio of larval striped bass, *Morone saxatilis*.** Archives of Environmental Contamination and Toxicology, 1990. 19, p 235-240.

POLEKSIC, V., MITROVIC-TUTUNDZIC, V. **Fish gills as a monitor of sublethal chronic effects of pollution.** in: Lloyd, R.M.R. (Ed.). Sublethal Chronic effects of Pollutants on Freshwater Fish. Cambridge. Cambridge University Press. UK, Cambridge, 1994. p 339 -352.

QIU, W., ZHAO, Y., MING, Y., FARAJZADEH, M., PAN CHENYUAN, N., WAYNE, L. **Actions of Bisphenol A and Bisphenol S on the Reproductive Neuroendocrine System During Early Development in Zebrafish.** Endocrinology, 2016. 157, p 636-47.

RAMOS, S., AMORIM, E., ELLIOTT, M., CABRAL, H., BORDALO, A. A. **Early life stages of fishes as indicators of estuarine ecosystem health.** Ecological Indicators, 2012. 19, p 172–183.

REZNICK, D., CALLAHAN, H., LLAUREDO, R. **Maternal Effects on Offspring Quality in Poeciliid Fishes.** American Zoologist, 1996. 36, p 147-156.

RIBAS, L., PIFERRER, F. **The zebrafish (*Danio rerio*) as a model organism, with emphasis on applications for finfish aquaculture research.** Reviews in Aquaculture, 2014. 6, p 209-240.

RIBAS, L.; PIFERRER, F. **The zebrafish (*Danio rerio*) as a model organism, with emphasis on applications for finfish aquaculture research.** Reviews in Aquaculture, 2013. 6, p 209-240.

RITSEMA, R., LAANE, R.W.P.M., DONARD, O.F.X. **Butyltins in marine waters of The Netherlands in 1988 and 1989; Concentrations and effects.** Marine Environmental Research, 1991. 32, p 243-260.

ROCHA, T.L., CARVALHO, R., YAMADA, A.T., SABÓIA-MORAIS, S.M.T. **Morphologic analysis of developmental phases and gill ontogenesis in neotropical species *Poecilia vivipara* (cyprinodontiformes: Poeciliidae) exposed to different salinities.** Zoologia, 2010. 27, p 554-562.

ROPER, C., TANGUAY, R.L. Chapter 12 - **Zebrafish as a Model for Developmental Biology and Toxicology.** Handbook of Developmental Neurotoxicology. Academic Press, 2018. p 143-151.

ROSSATO, M., COSTA, M.B., DE CASTRO, Í.B., PINHO, G.L.L. **Size, season and origin of gastropods matter in imposex assessments.** *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 2018. 159, p 324-331.

ROULEAU, C., XIONG, Z.H., PACEPAVICIUS, G., HUANG, G.L. **Uptake of waterborne tributyltin in the brain of fish: axonal transport as a proposed mechanism.** *Environmental Science Technology*, 2003. 37, p 3298-3302.

RÜDEL, H. **Case study: bioavailability of tin and tin compounds.** *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 2003. 56, p 180-189.

SAKKAS, V. A., KONSTANTINOY, I. K., LAMBROPOULOU, D. A., ALBANIS, T. A. **Survey for the occurrence of antifouling paint booster biocides in the aquatic environment of Greece.** *Environmental Science and Pollution Research*, 2002. 9, p 327-332.

SALE, P.F. **Coral Reef Fishes. The biology, behavior, and ecology of the pelagic, larval stage of coral reef fishes**academic. Press, San Diego, 2002. p 171-199.

SANT'ANNA, B.S., SANTOS, D.M., MARCHI, M.R.R., ZARA, F.J., TURRA, A. **Surface-sediment and hermit-crab contamination by butyltins in southeastern Atlantic estuaries after ban of TBT-based antifouling paints.** *Environmental Science and Pollution Research*, 2014. 21, p 6516-6524.

SANTOS, E.G.N., CUNHA, R.A., SANTOS, C.P. **Behavioral responses of *Poecilia vivipara* (Osteichthyes: Cyprinodontiformes) to experimental infections of *Acanthocollaritrema umbilicatum* (Digenea: Cryptogonimidae).** *Experimental Parasitology*, 2011. 127, p 522-526.

SÁNCHEZ-GARAYZAR, A.B., BETANCOURT, M., MARTYNIUK, C.J., MUNKITTRICK, K.R., ALMAZAN, P., MEJIA-RUIZ, H., GARCIA-GASCA, A., SOTO, S. **Molecular, biochemical and behavioral effects of the pesticide chlorothalonil in the zebrafish (*Danio rerio*).** *Toxicology Letters*, 2016. 259, Supplement, p S224.

SÁNCHEZ GARAYZAR, A.B., BAHAMONDE, P.A., MARTYNIUK, C.J., BETANCOURT, M., MUNKITTRICK, K.R. **Hepatic gene expression profiling in zebrafish (*Danio rerio*) exposed to the fungicide chlorothalonil.** *Comparative Biochemistry and Physiology Part D: Genomics and Proteomics*, 2016. 19, p 102-111.

SÁNCHEZ-RODRÍGUEZ, Á., SOSA-FERRERA, Z., SANTANA-DEL PINO, Á., SANTANA-RODRÍGUEZ, J.J. **Probabilistic risk assessment of common booster biocides in surface waters of the harbours of Gran Canaria (Spain).** *Marine Pollution Bulletin*, 2011a. 62, p 985-991.

SÁNCHEZ-RODRÍGUEZ, Á., SOSA-FERRERA, Z., SANTANA-RODRÍGUEZ, J.J. **Applicability of microwave-assisted extraction combined with LC-MS/MS in the evaluation of booster biocide levels in harbour sediments.** *Chemosphere*, 2011b. 82, p 96-102.

- SARAIVA, A., COSTA, J., SERRÃO, J., CRUZ, C., EIRAS, J.C. **A histology-based fish health assessment of farmed seabass (*Dicentrarchus labrax* L.)**. Aquaculture, 2015. 448, p 375-381.
- SCHILITZ, P. F., DORNELES, P. R., LAILSON-BRITO, J. **Cetacean exposure to butyltin compounds: A review**. Oecologia Australis, 2013. 17, p 411-423.
- SCHINDLER, J.F., HAMLETT, W.C. **Maternal-embryonic relations in viviparous teleosts**. Journal of Experimental Zoology, 1993. 266, p 378-393.
- SCHMALZ, J. W. F., HERNANDEZ, A. D., WEIS, P. **Hepatic histopathology in two populations of the mummichog, *Fundulus heteroclitus***. Marine Environmental Research, 2002. 54, p 539-542.
- SCHMIDT, K., STEINBERG, C.E.W., PFLUGMACHER, S., STAAKS, G.B.O. **Xenobiotic substances such as PCB mixtures (aroclor 1254) and TBT can influence swimming behavior and biotransformation activity (GST) of carp (*Cyprinus carpio*)**. Environmental Toxicology, 2004. 19, p 460-470.
- SCHOLZ, S., FISCHER, S., GÜNDEL, U., KÜSTER, E., LUCKENBACH, T., VOELKER, D. **The zebrafish embryo model in environmental risk assessment - Applications beyond acute toxicity testing**. Environmental Science and Pollution Research, 2008. 15, p 394-404.
- SCHULTZ, M.P. **Effects of coating roughness and biofouling on ship resistance and powering**. Biofouling, 2007. 23, p 331-341.
- SCRIMSHAW, N.S. **Superfetation in poeciliid fishes**. Copeia, 1944. p 180-183.
- SCOTT, G. R., SLOMAN, K. A. **The effects of environmental pollutants on complex fish behaviour: Integrating behavioural and physiological indicators of toxicity**. Aquatic Toxicology, 2004. 4, p 369-392.
- SELIM, M.S., SHENASHEN, M.A., EL-SAFTY, S.A., HIGAZY, S.A., SELIM, M.M., ISAGO, H., ELMARAKBI, A. **Recent progress in marine foul-release polymeric nanocomposite coatings**. Progress in Materials Science, 2017. 87, p 1-32.
- SHUMAN, L.M., SMITH, A.E., BRIDGES, D.C. **Potential Movement of Nutrients and Pesticides following Application to Golf Courses**. Fate and Management of Turfgrass. Chemicals American Chemical Society, 2000. p 78-93.
- SPENCE, R., GERLACH, G., LAWRENCE, C., SMITH, C. **The behaviour and ecology of the zebrafish, *Danio rerio***. Biological Reviews, 2008. 83, p 13-34.
- SLOMAN, K.A., MCNEIL, P.L. **Using physiology and behaviour to understand the responses of fish early life stages to toxicants**. Journal of Fish Biology, 2012. 81, p 2175-2198.
- SOUZA, J.R. B., CARVALHO, P.S.M. **Bioindicadores e biomarcadores no sistema bêntico**. Bioindicadores de Qualidade Ambiental, 2013. p 163-174.

SOUSA, S., ROCHA, M.J., ROCHA, E. **Characterization and spatial relationships of the hepatic vascular–biliary tracts, and their associated pancreocytes and macrophages, in the model fish guppy (*Poecilia reticulata*): A study of serial sections by light microscopy.** Tissue and Cell, 2018. 50, p 104-113.

STERNBERG, R.M., GOODING, M.P., HOTCHKISS, A.K., LEBLANC, G.A. **Environmental endocrine control of reproductive maturation in gastropods: Implications for the mechanism of tributyltin-induced imposex in prosobranchs.** Ecotoxicology, 2010. 19, p 4-23.

STRAND, J., JØRGENSEN, A., TAIROVA, Z. **TBT pollution and effects in molluscs at US Virgin Islands, Caribbean Sea.** Environment International, 2009. 35, p 707-711.

SUN, L., ZHANG, J., ZUO, Z., CHEN, Y., WANG, X., HUANG, X., WANG, C. **Influence of triphenyltin exposure on the hypothalamus-pituitary-gonad axis in male *Sebastiscus marmoratus*.** Aquatic Toxicology, 2011. 104, p 263-269.

SUZUKI, T., NOJIRI, H., ISONO, H., OCHI, T. **Oxidative damages in isolated rat hepatocytes treated with the organochlorine fungicides captan, dichlofluanid and chlorothalonil.** Toxicology, 2004. 204, p 97-107.

THIBAULT, R.E., SCHULTZ, J.R. **Reproductive adaptations among viviparous fishes (Cyprinodontiformes: Poeciliidae).** Evolution, 1978. 32, p 320-333.

THOMAS, K., 2009. **The use of broad-spectrum organic biocides in marine antifouling paints** A2 - Hellio, Claire. in: Yebra, D. (Ed.). Advances in Marine Antifouling Coatings and Technologies. Woodhead Publishing, 2009, p 522-553.

THOMAS, K. V., BROOKS, S. **The environmental fate and effects of antifouling paint biocides.** Biofouling, 2010. 26, p 73-88.

TORREIRO-MELO, A.G.A.G., SILVA, J.S., BIANCHINI, A., ZANARDI-LAMARDO, E., DE CARVALHO, P.S.M. **Bioconcentration of phenanthrene and metabolites in bile and behavioral alterations in the tropical estuarine guppy *Poecilia vivipara*.** Chemosphere, 2015. 132, 17-23.

TRIEBSKORN, R., KOEHLER, H.R., KOERTJE, K.H., NEGELE, R.D., RAHMANN, H., BRAUNBECK, T. **Evaluation of bis(tri-n-butyltin) oxide (TBTO) neurotoxicity in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). II. Ultrastructural diagnosis and tin localization by energy filtering transmission electron microscopy (EFTEM).** Aquatic Toxicology, 1994a. 30, p 199-213.

TRIEBSKORN, R., KÖHLER, H.-R., FLEMMING, J., BRAUNBECK, T., NEGELE, R.-D., RAHMANN, H. **Evaluation of bis(tri-n-butyltin) oxide (TBTO) neurotoxicity in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). I. Behaviour, weight increase, and tin content.** Aquatic Toxicology, 1994b. 30, p 189-197.

TRONCOSO, I.C., CAZENAVE, J., BACCHETTA, C., BISTONI, M., DE LOS, Á. **Histopathological changes in the gills and liver of *Prochilodus lineatus* from the Salado River basin (Santa Fe, Argentina).** Fish Physiology Biochemical 2012. 38, p 693–702.

TRUHAUT, R., 1977. **Ecotoxicology: Objectives, principles and perspectives.** Ecotoxicology and Environmental Safety, 2012. 1, p 151-173.

TURNER, C.L. **Reproductive cycles and superfetation in Poeciliid fishes.** The Biological Bulletin, 1937. 72, p 145-164.

TURNER, A., GLEGG, G. **TBT-based antifouling paints remain on sale.** Marine Pollution Bulletin, 2014. 88, p 398-400.

USEPA, 2002. **Methods for Measuring the Acute Toxicity of Effluents and Receiving Waters to Freshwater and Marine Organisms.** United States Environmental Protection Agency, 821-R-802-012.

USEPA, 1999. **Reregistration eligibility decision (red), Chlorothalonil.** US Environmental Protection Agency. <https://archive.epa.gov/pesticides/reregistration/web/pdf/0097red.pdf>.

VALKIRS, A.O., SELIGMAN, P.F., STANG, P.M., HOMER, V., LIEBERMAN, S.H., VAFA, G., DOOLEY, C.A. **Measurement of butyltin compounds in San Diego Bay.** Marine Pollution Bulletin, 1986. 17, p 319-324.

VAN DER OOST, R., BEYER, J., VERMEULEN, N.P.E. **Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review.** Environmental Toxicology and Pharmacology, 2003. 13, 57-149.

VAN GRAFT, M., LEEUWANGH, P. **The action of the fungicide triphenyltinchloride on respiration in fish liver mitochondria.** Meded. Fak. Landbouwwet. R. U. Gent, 1977. 42, p 1705-1714.

VAN WEZEL, A.P., VAN VLAARDINGEN, P. **Environmental risk limits for antifouling substances.** Aquatic Toxicology, 2004. 66, p 427-444.

VILLENEUVE, D., VOLZ, D.C., EMBRY, M.R., ANKLEY, G.T., BELANGER, S.E., LÉONARD, M., SCHIRMER, K., TANGUAY, R., TRUONG, L., WEHMAS, L., 2014. **Investigating Alternatives to the fish early-life stage test: A strategy for discovering and annotating adverse outcome pathways for early fish development.** Environmental Toxicology and Chemistry, 2004. 33, p 158-169.

VOULVOULIS, N., LESTER, J.N. **Fate of organotins in sewage sludge during anaerobic digestion.** Science of The Total Environment, 2006. 371, p 373-382.

VOULVOULIS, N., SCRIMSHAW, M.D., LESTER, J.N. **Partitioning of selected antifouling biocides in the aquatic environment.** Marine Environmental Research, 2002. 53, p 1-16.

VOULVOULIS, N., SCRIMSHAW, M.D., LESTER, J.N. **Occurrence of Four Biocides Utilized in Antifouling Paints, as Alternatives to Organotin Compounds, in Waters and Sediments of a Commercial Estuary in the UK.** Marine Pollution Bulletin, 2000. 40, p 938-946.

WALKER, C.H., SIBLY, R.M., HOPKIN, S.P., PEAKALL, D.B. **Principles of Ecotoxicology**. Taylor and Francis, London, 2012.

WANG, D.Y., HUANG, B.Q. **TBT (tributyltin) toxicity to the visual and olfactory functions of tigerperch (*Terapon jarbua* Forsskål)**. Zoological Studies, 1999. 38, p 189-195.

WEIS, J.S., WEIS, P., WANG, F. **Developmental effects of tributyltin on the fiddler crab, *Uca pugnator*, and the killifish, *Fundulus heteroclitus***. Oceans Conference Record (IEEE) , 1987. p 1456-1460.

WEIS, JS; WEIS, P. **Effects of environmental pollutants on early fish development**. Reviews In. Aquatic. Science, 1989. 1, p 45–73.

WEIS, J.S., CANDELMO, A. **Pollutants and fish predator/prey behavior: review of laboratory and field approaches**. Current Zoology, 2012. 58, p 9-20.

WESTER, P.W., CANTON, J.H. **Histopathological study of *Poecilia reticulata* (guppy) after long-term exposure to bis(tri-n-butyltin)oxide (TBTO) and di-n-butyltin dichloride (DBTC)**. Aquatic Toxicology, 1987a. 10, p 143-165.

WESTER, P.W., CANTON, J.H., VAN IERSEL, A.A.J., KRAJNC, E.I., VAESSEN, H.A.M.G. **The toxicity of bis(tri-n-butyltin)oxide (TBTO) and di-n-butyltin dichloride (DBTC) in the small fish species *Oryzias latipes* (medaka) and *Poecilia reticulata* (guppy)**. Aquatic Toxicology, 1990. 16, p 53-72.

WOLF, J.C., WHEELER, J.R. **A critical review of histopathological findings associated with endocrine and non-endocrine hepatic toxicity in fish models**. Aquatic Toxicology, 2018. 197, p 60-78.

WOLFE F, CLAUW DJ, FITZCHARLES MA, GOLDENBERG DL, HÄUSER W, KATZ RL, MEASE PJ, RUSSEL AS, RUSSELL IJ, WALITT B. **Revisions to the 2010/2011 fibromyalgia diagnostic criteria**. Semin Arthritis Rheum, 2016. 46, p 319-329.

WOLF, J.C., WOLFE, M.J. **A Brief Overview of Nonneoplastic Hepatic Toxicity in Fish**. **Toxicologic Pathology**, 2005. 33, p 75-85.

WOURMS, J.P. **Viviparity: The Maternal-Fetal Relationship in Fishes**. American Zoologist, 1981. 21, p 473-515.

WOURMS, J.P., GROVE, B.D., LOMBARDI, J. **The Maternal-Embryonic Relationship in Viviparous Fishes**. in: Hoar, W.S., Randall, D.J. (Eds.). **Fish Physiology**. Academic Press, 1988. p 1-134.

YAMAMOTO, J., YONEZAWA, Y., NAKATA, K., HORIGUCHI, F. **Ecological risk assessment of TBT in Ise Bay**. Journal of Environmental Management, 2009. 90, p S41-S50.

YANG, Y., CAO, Z.-D., FU, S.-J. **Variations in temperature acclimation effects on glycogen storage, hypoxia tolerance and swimming performance with seasonal acclimatization in juvenile *Chinese crucian carp***. Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology, 2015. 185, p 16-23.

YARPUZLU, B., AYYILDIZ, M., TOK, O.E., AKTAS, R.G., BASDOGAN, C. **Correlation between the mechanical and histological properties of liver tissue.** *Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials*, 2014. 29, p 403-416.

YASUTAKE, W.T., WALES, J.H. (Eds.) **Microscopic Anatomy of Salmonids: An Atlas.** *Fish and Wildlife Service*, Washington, 1983. p 150.

YEBRA, D.M., KIIL, S., DAM-JOHANSEN, K. **Antifouling technology-past, present and future steps towards efficient and environmentally friendly antifouling coatings.** *Progress in Organic Coatings*, 2004. 50, p 75-104.

YU, A., WANG, X., ZUO, Z., CAI, J., WANG, C. **Tributyltin exposure influences predatory behavior, neurotransmitter content and receptor expression in *Sebastiscus marmoratus*.** *Aquatic Toxicology*, 2013. 128-129, p 158-162.

YU, S., WAGES, M.R., COBB, G.P., MAUL, J.D. **Effects of chlorothalonil on development and growth of amphibian embryos and larvae.** *Environmental Pollution*, 2013. 181, p 329-334.

ZHANG, Q., JI, C., YAN, L., LU, M., LU, C., ZHAO, M. **The identification of the metabolites of chlorothalonil in zebrafish (*Danio rerio*) and their embryo toxicity and endocrine effects at environmentally relevant levels.** *Environmental Pollution*, 2016. 218, p 8-15.

ZHANG, J., ZUO, Z., SUN, P., WANG, C. **Tributyltin exposure results in craniofacial hmggtcartilage defects in rockfish (*Sebastiscus marmoratus*) embryos.** *Marine Environmental Research*, 2012. 77, p 6-11.

ZHANG, J., ZUO, Z., WANG, Y., YU, A., CHEN, Y., WANG, C. **Tributyltin chloride results in dorsal curvature in embryo development of *Sebastiscus marmoratus* via apoptosis pathway.** *Chemosphere*, 2011. 82, p 437-442.

ZHOU, H., XIANG, N., XIE, J., DIAO, X. **Ecotoxicology: The History and Present Direction.** in: Fath, B. (Ed.). *Encyclopedia of Ecology* (Second Edition). Elsevier, Oxford, 2019. p 415-423.

ANEXO A – CARTA DE APROVAÇÃO NO COMITÊ DE ÉTICA



Universidade Federal de Pernambuco
Centro de Biociências

Av. Prof. Nelson Chaves, s/n
50670-420 / Recife - PE - Brasil
Fones 2126 8840 | 2126 8351
www.ccb.ufpe.br

Recife, 18 de abril de 2018

Ofício nº 21/18

Da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UFPE

Para: Prof.º Paulo Sérgio Martins de Carvalho

Departamento de Zoologia

Centro de Biociências

Universidade Federal de Pernambuco

Processo nº 23076.008924/2018-11

Certificamos que a proposta intitulada **“Avaliação ecotoxicológica e risco ambientais de tintas anti-incrustantes em peixes marinho.”** registrada com o nº **23076.008924/2018-11** sob a responsabilidade de **Prof.º Paulo Sérgio Martins de Carvalho** que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo CONSELHO NACIONAL DE CONTROLE DE EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL (CONCEA), e foi aprovada pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO (UFPE), em reunião de 04/04/2018.

Finalidade	☐ Ensino ☒ Pesquisa Científica
Vigência da autorização	02/05/2018 a 30/05/2018
Espécie/ linhagem/raça	Peixe
Nº de animais	150 larvas
Peso/Idade	0,007g/ 03 dias
Sexo	Macho e femea
Origem	Biotério de Ecotoxicologia Aquática (Labetocox) da UFPE.

Atenciosamente,

Prof. Sebastião R. F. Silva



Vice-Presidente CEUA/UFPE
SIAPE 2345691