

Análise mutagênica e genotóxica do hormônio 17 α -metiltestosterona por meio do sistema-teste *Allium cepa*

Daniella Ventura¹, Luciana Paula Grégio d'Arce², Cleber Antonio Lindino¹, Nyamien Yahaut Sebastien¹

¹ Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Programa de Pós-Graduação em Ciências Ambientais, Rua da Faculdade, 645, 85903-000, Toledo, PR.

² Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, Cascavel, PR.

E-mail autor correspondente: daniella.ventura@hotmail.com

Artigo enviado em 07/11/2019, aceito em 12/12/2019.

Resumo: o hormônio 17 α -metiltestosterona (MT) é utilizado na piscicultura para a masculinização de alevinos e seu excesso pode contaminar recursos naturais, causando alterações nos ecossistemas aquáticos. O objetivo do estudo foi avaliar a genotoxicidade e mutagenicidade deste hormônio por meio do sistema-teste de *Allium cepa* (cebola). Foram testadas duas concentrações de MT, 750 e 1500 $\mu\text{g L}^{-1}$, utilizando água destilada como controle negativo e metil-metanosulfonato como controle positivo. Foram avaliadas as frequências de aberrações cromossômicas (AC), de anormalidades nucleares (AN), de células binucleadas (CB) e de micronúcleos (MN) nas células em divisão da região meristemática das raízes de cebola. As comparações foram realizadas usando one-way ANOVA e, quando houve diferença ($p < 0,05$), o teste de Dunnett foi aplicado. Observou-se pequeno aumento na formação de AC, porém não foi estatisticamente significativo. A formação de MN e as AN na concentração de 750 $\mu\text{g L}^{-1}$ foram estatisticamente significativas, ficando o alerta para uma ação mutagênica do hormônio.

Palavras-chave: desregulador endócrino; esteroide; brotos nucleares.

Mutagenic and genotoxic analysis of 17 α -methyltestosterone hormone by *Allium cepa* test system

Abstract: 17 α -Methyltestosterone (MT) hormone is used in fish farming for the masculinization of fingerlings. The excess of MT can contaminate natural resources, causing changes in aquatic ecosystems. The aim of this study was to evaluate the genotoxicity and mutagenicity of the hormone MT by the *Allium cepa* (onion) test system. Two MT concentrations, 750 and 1500 $\mu\text{g L}^{-1}$, were tested. Negative control (distilled water) and positive control (methyl-methanesulfonate) were used. The frequency of chromosomal aberrations (CA), nuclear abnormalities (NA), binucleated cells (BC) and micronuclei (MN) in the dividing cells of the meristematic region of the onion was analyzed. Comparisons were performed using one-way ANOVA. When there was difference ($p < 0.05$), the Dunnett test was applied. There was a slight increase in CA formation, but it was not statistically significant. The formation of MN and NA at the concentration of 750 $\mu\text{g L}^{-1}$ was statistically significant, alerting to a mutagenic action of the hormone.

Keywords: endocrine disruptor; steroid; nuclear sprouts.

Introdução

O hormônio 17 α -metiltestosterona (MT) tem sido utilizado na piscicultura para a masculinização de alevinos de tilápias-do-Nilo (*Oreochromis niloticus*), para obtenção de população monossexo de machos. O macho apresenta um crescimento mais rápido, é maior e produz mais carne. Além dessas vantagens, a população monossexo evita a reprodução precoce e a consequente superpopulação, reduzindo a taxa de crescimento da população (VALENTIM-ZABOTT et al., 2008).

A administração de MT se dá por meio de banhos de imersão contendo o hormônio ou adicionando-o na ração que é fornecida aos peixes (MELLITO DA SILVEIRA et al., 2018).

Após seu uso, os efluentes dos tanques são lançados, sem tratamento, nos corpos hídricos, atingindo ecossistemas aquáticos e consequentemente o ser humano por meio da ingestão de água contaminada (AMORIM, 2013).

A exposição ao hormônio MT tem levado à: interferência na diferenciação sexual de crocodilos, inibição de fatores bioquímicos em embriões de peixe-zebra, diminuição na produção de ovos de *Pimephales promelas* (MURRAY et al., 2016; RIVERO-WENDT et al., 2016; ZERULLA et al., 2002), entre outras alterações. Conforme Rivero-Wendt et al. (2013), MT influenciou significativamente o desempenho reprodutivo de *Biomphalaria glabrata*, diminuindo o número de desovas especialmente na menor concentração testada de 0,01 mg L⁻¹.

Esses dados têm causado grande alerta, pois suas alterações ocorrem em concentrações muito baixas, sendo necessários estudos aprofundados para

estimar os efeitos tóxicos que o MT causa nos organismos.

A avaliação de alterações cromossômicas em raízes de *Allium cepa* (cebola) é um método toxicológico, sendo validado, pelo Programa Internacional de Segurança Química (IPCS, OMS) e o Programa Ambiental das Nações Unidas (UNEP), como um eficiente teste para análise e monitoramento in situ da genotoxicidade de substâncias ambientais (CABRERA; RODRIGUEZ, 1999).

De acordo com Grant (1982) e Caritá e Marin-Morales (2008), o sistema-teste com *A. cepa* é um eficiente método para analisar a genotoxicidade e mutagenicidade de ambientes aquáticos contaminados e o potencial genotóxico de substâncias químicas, por sua sensibilidade e boa correlação com sistemas teste de mamíferos. O sistema-teste de *A. cepa* é um teste de resposta rápida, de baixo custo e é favorável na avaliação de danos cromossômicos e alterações no ciclo mitótico por ter cromossomos grandes e reduzidos (2n=16), tornando assim um teste amplamente utilizado no monitoramento de contaminações ambientais (LEME e MARIN-MORALES, 2009).

O sistema-teste de *A. cepa* tem sido utilizado há mais de 40 anos para detectar agentes mutagênicos, contribuindo para a aplicação no monitoramento ambiental, além de ter baixo custo, fácil manuseio e curta duração. Esse teste apresenta resultados consistentes que podem servir de alerta para outros sistemas biológicos, pois o DNA é comum a todos os organismos, caracterizando uma ferramenta importante para estudos de

monitoramento ambiental (LEME e MARIN-MORALES, 2009).

O sistema-teste *A. cepa* é utilizado no mundo todo, com o objetivo de identificar agentes mutagênicos e genotóxicos no ambiente (DE CASTRO E SOUSA et al., 2017; DUARTE et al., 2017).

Testes biológicos de toxicidade e genotoxicidade são indispensáveis para a avaliação das reações de organismos vivos à poluição ambiental (ANDRADE, 2012). Com isso este estudo busca avaliar a genotoxicidade e mutagenicidade de MT, nas concentrações de 750 e 1500 µg L⁻¹ por meio do sistema-teste de *A. cepa*.

Material e Métodos

As sementes de cebola foram colocadas para germinar em placas de Petri contendo papel filtro e água destilada, colocadas em incubadora BOD com temperatura controlada de 25°C e fotoperíodo de 12 horas de luz e 12 horas de escuro. Após aproximadamente 3 dias, quando as raízes atingiram 1 cm de comprimento, a placa de Petri e o papel filtro foram trocados por novos e as sementes foram expostas às concentrações de 750 e 1500 µg L⁻¹ de MT, por mais 72 horas, juntamente com o controle negativo contendo somente água destilada e o controle positivo contendo metil-metanosulfonato (MMS) na concentração de 4x10⁻⁴ mol L⁻¹, sendo uma substância de referência que possui caráter mutagênico (SILVEIRA et al., 2018). As concentrações de MT foram determinadas por meio de estudos prévios.

Após as 72 horas, houve a preparação das raízes que foram fixadas em Carnoy (3:1) por 24 horas. Em seguida, as raízes foram submetidas a

hidrólise com HCl 1 mol L⁻¹ em banho-maria por 8 minutos a 60°C. Posteriormente foram transferidas para um recipiente âmbar contendo Reativo de Schiff, no qual foram deixadas por 40 minutos para corar o material genético. Após, em uma lâmina a região meristemática foi cortada com auxílio de gilete e adicionada uma gota de solução de carmim acético a 2% m/v para evidenciar o citoplasma. A lamínula foi colocada sobre o material na lâmina, aquecida e macerada para espalhar as células e comprimida com o polegar. A montagem das lâminas seguiu o protocolo proposto por Grant (1982). Foram realizadas três repetições para cada tratamento. Foram contadas 5000 células por repetição. O material foi observado em microscópio óptico em aumento de 400x, sendo verificada a presença de aberrações cromossômicas (AC) e anormalidades nucleares (AN), que são indicativos de genotoxicidade, células binucleadas e células micronucleadas (MN), evidenciando mutagenicidade (RIBEIRO, 2003).

A distribuição dos dados e a normalidade foram verificadas pelo teste de Kolmogorov-Smirnov. Todas as comparações foram realizadas usando one-way ANOVA. Quando diferenças significativas foram observadas (p < 0,05) após a comparação com o controle negativo, o teste de Dunnett foi aplicado. O SigmaPlot 11.0 (Systat Software, Inc., Chicago, IL) foi usado para realizar as análises estatísticas.

Resultados e discussão

As fases que são consideradas normais e as alterações encontradas na divisão celular nos meristemas de *Allium cepa* podem ser localizadas na Figura 1.

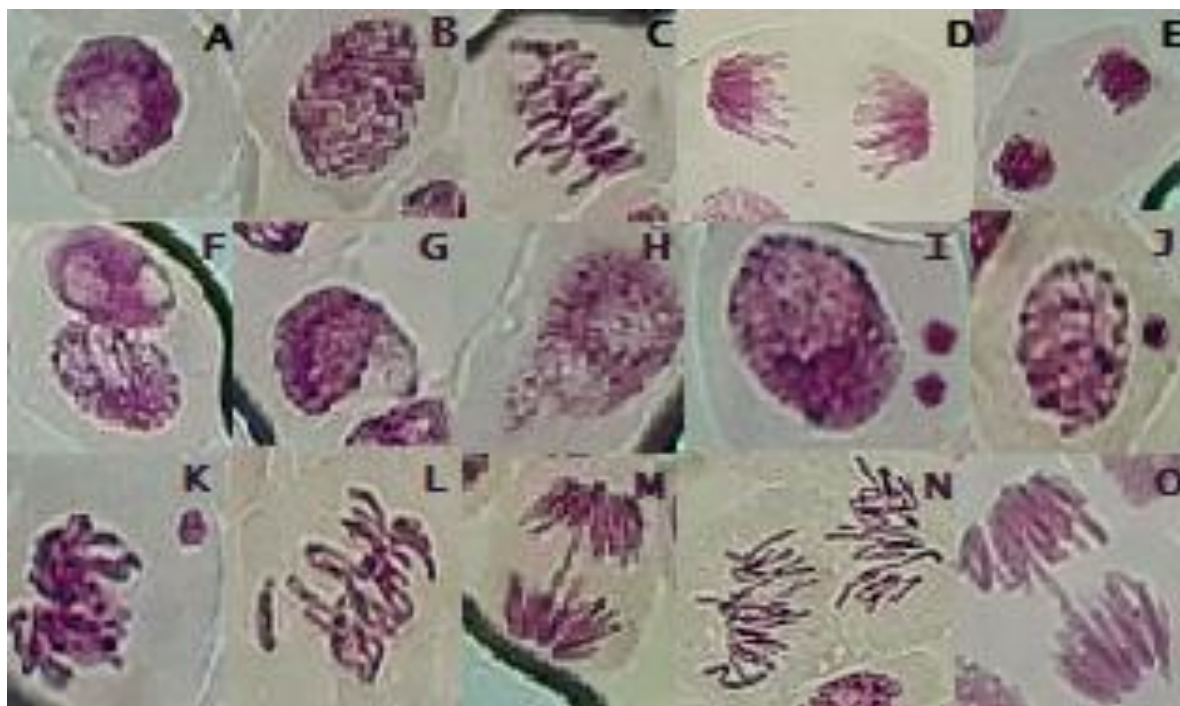


Figura 1. Células meristemáticas de *Allium cepa* em divisão celular. Imagens do controle negativo e dos dois tratamentos com 17 α -metiltestosterona. Ampliação de 400 \times . A) Intérfase. B) Prófase normal. C) Metáfase normal. D) Anáfase normal. E) Telófase normal. F) Célula binucleada. G) Núcleo lobulado. H) Broto nuclear. I) Células com dois micronúcleos. J) Célula com micronúcleo. K) Prófase com micronúcleo. L) Metáfase com perda cromossômica. M) Anáfase com ponte. N) Anáfase com perda e multipolaridade. O) Anáfase com ponte e perda. Fonte: a autora.

As aberrações cromossômicas (Figura 1. L, M, N e O) podem ocorrer espontaneamente ou pela exposição a agentes físicos ou químicos, sendo caracterizadas por mudanças estruturais de um cromossomo ou no número total de cromossomos (RUSSEL, 2002). De acordo com Leme e Marin-Morales (2009), existem agentes clastogênicos que induzem quebras cromossômicas, e agentes aneugênicos que resultam em perdas cromossômicas, atrasos, multipolaridade, pontes, c-metáfases e aderências.

Os micronúcleos (Figura 1. I, J e K) são menores que o núcleo principal, contêm material cromatínico, e são provenientes de quebras (fragmentos de cromossomos) ou perdas cromossômicas (cromossomos inteiros), não sendo incluídos no núcleo principal

durante a mitose (FENECH et al., 1999; MANELLI-OLIVEIRA et al., 2003; BONOMO, 2014). Além das perdas e quebras alguns autores citam também a formação de micronúcleos por meio de distúrbios do fuso mitótico (MANELLI-OLIVEIRA et al., 2003) e consequência de danos nas células parentais, não reparados ou reparados de forma errada (BONOMO, 2014).

Para Caritá e Marin-Morales (2008) aberrações cromossômicas podem levar também a anormalidades nucleares (Figura 1, G e H). Os núcleos lobulados são decorrentes de anáfases multipolares com pontes cromossômicas. No momento da reestruturação nuclear, o envoltório acompanha a distribuição irregular do material genético. Os brotos nucleares têm relação com a reorganização do

envoltório nuclear, no qual o broto se desprende do núcleo formando um micronúcleo, podendo ser expulso da célula sob a forma de minicélula (CARITÁ E MARIN-MORALES, 2008).

As células binucleadas (Figura 1. F) podem ser formadas por meio da divisão mitótica a partir de uma célula binucleada pré-existente ou por um

processo incompleto da divisão celular (MANELLI-OLIVEIRA et al., 2003).

Os resultados dos testes com MT mostraram que as duas concentrações testadas, 750 e 1500 $\mu\text{g L}^{-1}$, induziram alterações nas células meristemáticas de *A. cepa* expostas por 72 horas, em relação ao controle negativo (Tabela 1).

Tabela 1. Média de anormalidades encontradas em células meristemáticas de *Allium cepa* expostas ao 17 α -metiltestosterona por 72 horas.

TRATAMENTOS	MN	AN	CB	AC
CN	11,33	19,33	2,66	13,66
CP	79,66*	56,33*	10,66	29,00
750 $\mu\text{g L}^{-1}$	25,33*	41,66**	6,66	29,66
1500 $\mu\text{g L}^{-1}$	14,66	22,66	6,66	26,00

Fonte: a autora. CN: Controle Negativo; CP: Controle Positivo; MN: Micronúcleos; AN: Anormalidades Nucleares; CB: Célula Binucleada; AC: Aberrações Cromossômicas; *Diferenças estatisticamente significativas em relação ao controle negativo pelo teste de Dunnett. ** Diferenças estatisticamente significativas em relação ao controle negativo pela ANOVA.

Na Tabela 2 pode-se observar que na concentração de 750 $\mu\text{g L}^{-1}$ os resultados de MN e AN foram estatisticamente significativos em relação ao controle negativo.

Diferença estatística na frequência de MN foi detectada ($p < 0,05$) por meio do teste de Dunnett e para AN a diferença estatística ($p < 0,05$) foi detectada pela ANOVA.

Tabela 2. Média e desvio-padrão das frequências de MN, AN, CB e AC, por 5000 células, em raízes de *Allium cepa* expostas aos tratamentos com 17 α -metiltestosterona e controles negativo e positivo.

	MN	AN	CB	AC
CN	0,0016 \pm 0,0008	0,00387 \pm 0,0018	0,000533 \pm 0,0005	0,00407 \pm 0,002
CP	0,0159 \pm 0,00075*	0,0113 \pm 0,00349*	0,00213 \pm 0,00101	0,00633 \pm 0,00284
750 $\mu\text{g L}^{-1}$	0,00507 \pm 0,00237*	0,00833 \pm 0,0014**	0,00133 \pm 0,0005	0,0064 \pm 0,00072
1500 $\mu\text{g L}^{-1}$	0,00293 \pm 0,00080	0,00453 \pm 0,0016	0,00133 \pm 0,00075	0,00627 \pm 0,0029

Fonte: a autora. CN: Controle Negativo; CP: Controle Positivo; MN: Micronúcleos AN: Anormalidades Nucleares; CB: Célula Binucleada; AC: Aberrações Cromossômicas; *Diferenças estatisticamente significativas em relação ao controle negativo pelo teste de Dunnett. ** Diferenças estatisticamente significativas em relação ao controle negativo pela ANOVA.

Micronúcleos e anormalidades nucleares são produtos de aberrações cromossômicas. Apesar da concentração de 1500 $\mu\text{g L}^{-1}$ de MT não ter apresentado dados estatisticamente significativos, pode-se observar na Tabela 1 que houve aumento de aberrações cromossômicas em relação ao controle negativo, não descartando a hipótese de que tais alterações acarretariam em produtos como anormalidades nucleares e micronúcleos, como encontrados na concentração de 750 $\mu\text{g L}^{-1}$.

Em estudos feitos por Rivero-Wendt et al. (2013), na concentração de 0,01 mg L^{-1} de MT, verificou-se alterações na frequência de MN e AN em *Astyanax bimaculatus*, evidenciando-se que o MT tem ação genotóxica moderada e causa alterações no sistema reprodutivo de espécies nativas, demonstrando risco ambiental.

A baixa frequência de alterações encontradas nas concentrações testadas de MT pode ser explicada por Cavalieri et al. (2000). De acordo com o autor, os ensaios de mutagenicidade detectam frequência de alta mutação de substâncias carcinogênicas potentes, e estrogênios podem ser fracamente mutagênicos. Nesse sentido os autores citam que as condições do ensaio de mutagenicidade podem ter que ser redesenhadas para detectar baixas frequências de mutação em múltiplos loci gênicos com alta exatidão e precisão.

Duas possíveis explicações para a diminuição na frequência de anormalidades na concentração mais alta do hormônio envolvem a possível adsorção nas fibras celulósicas, por interação química com os grupos hidroxila, diminuindo a disponibilidade para as células e a possibilidade de formação de aglomerados ou a dimerização (união de dois monômeros) da molécula que altera suas

propriedades químicas e pode afetar sua interação com as células da *A. cepa* (DELLAGRECA et al., 2002).

Diante do exposto é indispensável que tenham estudos mais aprofundados desta substância, obtendo assim um valor máximo de lançamento nos corpos hídricos, para que o hormônio seja inserido na Resolução nº 357/2005 do CONAMA, para que haja tratamento dos efluentes das pisciculturas para posterior lançamento nos corpos hídricos, minimizando assim possíveis danos aos ecossistemas aquáticos.

Conclusão

A formação de micronúcleos e anormalidades nucleares observadas na concentração de 750 $\mu\text{g L}^{-1}$ de 17 α -metiltestosterona foi estatisticamente significativa, ficando o alerta para ação mutagênica deste hormônio. Isto implica também em estabelecer controles para evitar a contaminação de recursos naturais.

Referências

- AMORIM, F. S. **Determinação de 17 α -metiltestosterona em amostras de sedimentos de tanques de piscicultura de peixes tilápia do nilo.** Dissertação (mestrado) – Instituto de Química da Universidade de Brasília, UNB, Brasília, 2013.
- ANDRADE, B. R. G. **Estudo do potencial citotóxico, genotóxico e mutagênico em células de *Allium cepa* da parationa metilica antes e após aplicação dos processos UV e UV/H₂O₂.** Rio de Janeiro, RJ. Tese (doutorado) - Universidade Federal do Rio de Janeiro - UFRJ, 2012.

- BONOMO, M. M. **Efeitos citogenéticos, bioquímicos, morfológicos e anatômicos da aplicação de lodo de esgoto higienizado em *Carica papaya*** L. Vitória, ES. Dissertação (mestrado) - Curso de Biologia Vegetal, Biologia Vegetal, Universidade Federal do Espírito Santo, 2014.
- CABRERA G. L.; RODRIGUEZ D. M. G. Genotoxicity of soil from farmland irrigated with wastewater using three plant bioassays. **Mutation Research**, v. 426, ed. 2, p. 211-214, 1999.
- CARITÁ, R.; MARIN-MORALES, M. A. Induction of chromosome aberrations in the *Allium cepa* test system caused by the exposure of seeds to industrial effluents contaminated with azo dyes. **Chemosphere**, v. 72, ed. 5, p. 722-725, 2008.
- CAVALIERI, E.; FRENKEL, K.; LIEHR, J. G.; ROGAN, E.; ROY, D. Chapter 4: Estrogens as endogenous genotoxic agents – DNA adducts and mutations. **Journal of the National Cancer Institute Monographs**, v. 2000, ed. 27, p. 75-94, 2000.
- DE CASTRO E SOUSA, J. M.; PERON, A. P.; DA SILVA E SOUSA, L.; DE MOURA, M. H.; DE MACEDO, A. V. L.; DE OLIVEIRA, V. A.; DA SILVA, F. C. C.; DE MORAIS LIMA, L. H. G.; MATOS, L. A.; DE MOURA DANTAS, S. M. M.; DE AGUIAR, R. P. S.; ISLAM, M. T.; DE CARVALHO MELO-CAVALCANTE, A. A.; BONECKER, C. C.; JUNIOR, H. F. J. Cytotoxicity and genotoxicity of Guaribas river water (Piauí, Brazil), influenced by anthropogenic action. **Environm Monit Assess**, v. 189, ed. 6, pg. 301, 2017.
- DUARTE, I. D.; SILVA, N. H. V. F.; SOUZA, I. C.; OLIVEIRA, L. B.; ROCHA, L. D.; MOROZESK, M.; BONOMO, M. M.; DE ALMEIDA PEREIRA, T.; DIAS, M. C.; DE OLIVEIRA FERNANDES, V.; MATSUMOTO, S. T. Water quality of a coastal lagoon (ES, Brazil): abiotic aspects, cytogenetic damage, and phytoplankton dynamics. **Environ Sci Pollut Res**, v. 24, ed. 11, pg. 10855–10868, 2017.
- FENECH, M.; HOLLAND, N.; CHANG, W. P.; ZEIGER E.; BONASSI, S. The Human MicroNucleus Project-an international collaborative study on the use of micronucleus technique for measuring DNA damages in humans. **Mutation Research**, v. 428, ed. 1-2, p. 271-283, 1999.
- GRANT, W.F. Chromosome aberration assays in *Allium cepa*, A report of the U.S. Environmental Protection Agency Gene-Tox Program. **Mutation Research**, v. 99, ed. 3, p. 273-291, 1982.
- LEME, D. M., MARIN-MORALES, M. A. *Allium cepa* test in environmental monitoring: A review on its application. **Mutation Research**, v. 682, ed. 1, p. 71–81, 2009.
- MANELLI-OLIVEIRA, R.; MACHADO-SANTELLI, G. M.; DIAS, V. M. Micronúcleos centrômero-positivos em células tumorais tratadas com afidicolina. **Anais**. 2003. São Paulo: Comissão de Pesquisa do ICB/USP.
- MELLITO DA SILVEIRA, M. P.; TABATA, Y. A.; RIGOLINO, M. G. Morphological and functional characterization of the sterilized or masculinized *Oncorhynchus mykiss* adenohipophysis, by 17 α -methyltestosterone. **Boletim do Instituto de Pesca**, v. 22, n. 1, p. 85-92, 2018.
- MURRAY, C. M.; EASTER, M.; MERCHANT, M.; RHEUBERT, J. L.; WILSON, K. A.; COOPER, A.; MENDONÇA, M.; WIBBELS, T.; MARIN, M. S.; GUYER,

- C. Methyltestosterone alters sex determination in the American alligator (*Alligator mississippiensis*). **General and Comparative Endocrinology**, v. 236, p. 63-69, 2016.
- RIBEIRO, L. R. Teste de micronúcleo em medula óssea de roedores in vivo. In: Ribeiro, L.R., Salvadori, D.M.F., Marques, E.K., **Mutagênese Ambiental**, first ed., Canoas, pp. 174, 2003.
- RIVERO-WENDT, C. L. G.; OLIVEIRA, R.; MONTEIRO, M. S.; Inês Domingues, I.; SOARES, A. M. V. M.; GRISOLIA, C. K. Steroid androgen 17 α -methyltestosterone induces malformations and biochemical alterations in zebrafish embryos. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 44, p. 107-113, 2016.
- RIVERO-WENDT, C. L.; MIRANDA-VILELA A. L.; FERREIRA M. F.; BORGES A. M.; GRISOLIA C. K. Cytogenetic toxicity and gonadal effects of 17 α -methyltestosterone in *Astyanax bimaculatus* (Characidae) and *Oreochromis niloticus* (Cichlidae). **Genet Mol Res.**, v. 12, ed. 3, p. 3862-70, 2013.
- RUSSEL, P. J. **Chromosomal mutation**. In: CUMMINGS, B. (Ed.). Genetics. San Francisco: Pearson Education Inc, 2002. p. 595-621.
- SILVEIRA, M. A. D.; RIBEIRO, D. L.; SANTOS, T. A. dos; DEMARCO, N. R. D'ARCE, L. P. G. DNA Damage and apoptotic effects in water samples of a Brazilian river protected by the help program of UNESCO. **Exposure and Health**, 2018.
- VALENTIM-ZABOTT, M.; VARGAS, L.; RIBEIRO, R. P. R.; PIAU, R. J.; TORRES, M. B. A.; RÖNNAU, M.; SOUZA, J. C. Effects of a homeopathic complex in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus* L.) on performance, sexual proportion and histology. **Homeopathy**, v. 97, p. 190-195, 2008.
- ZERULLA, M.; LÄNGE, R.; STEGER-HARTMANN, T.; PANTER, G., HUTCHINSON, T.; DIETRICH, D. R. Morphological sex reversal upon short-term exposure to endocrine modulators in juvenile fathead minnow (*Pimephales promelas*). **Toxicology Lett**, v. 131, ed. 1-2, p. 51-63, 2002.