

Anayra de Fátima Gonçalves Santiago

**Avaliação dos efeitos do  
dimetanossulfonato de etano (EDS) no  
eixo hipotálamo-hipófise-gônadas e na  
morfofisiologia do epitélio germinativo  
masculino de *zebrafish***

**Assessment of the effects of ethane  
dimethanesulfonate (EDS) on the  
hypothalamus-pituitary-gonads axis and  
the morphophysiology of the male  
germinal epithelium in zebrafish**

São Paulo

2024

Anayra de Fátima Gonçalves Santiago

**Avaliação dos efeitos do  
dimetanossulfonato de etano (EDS) no  
eixo hipotálamo-hipófise-gônadas e na  
morfofisiologia do epitélio germinativo  
masculino de *zebrafish***

**Assessment of the effects of ethane  
dimethanesulfonate (EDS) on the  
hypothalamus-pituitary-gonads axis and  
the morphophysiology of the male  
germinal epithelium in zebrafish**

Dissertação apresentada ao Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo, para a obtenção de Título de Mestre em Ciências, na Área de Fisiologia Geral.

Orientadora: Profa. Dra. Talita Sarah Mazzoni

São Paulo

2024

Gonçalves Santiago, Anayra de Fátima

Avaliação dos efeitos do dimetanossulfonato de etano (EDS) no eixo hipotálamo-hipófise-gônadas e na morfofisiologia do epitélio germinativo masculino de zebrafish / Gonçalves Santiago Anayra de Fátima; orientadora Mazzoni Talita Sarah -- São Paulo, 2024.

58 p.

Dissertação (Mestrado) -- Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo. Ciências Biológicas (Fisiologia).

1. Células de Leydig. 2. Hormônios sexuais. 3. Ecotoxicologia. 4. Espermatogênese. 5. Zebrafish. I. Mazzoni, Talita Sarah, orient. Título.

Bibliotecária responsável pela catalogação:  
Elisabete da Cruz Neves - CRB - 8/6228

Comissão Julgadora:

---

Prof(a). Dr(a).

---

Prof(a). Dr(a).

---

Profa. Dra. Talita Sarah Mazzoni  
Orientadora

# Dedicatória

---

A todos aqueles que, direta ou indiretamente, fizeram parte da minha vida durante esses anos de mestrado e influenciaram ou possibilitaram a realização deste trabalho, expresso minha sincera gratidão.

*“Se eu vi mais longe foi por estar sobre ombros de gigantes.”*

- Isaac Newton em carta para Robert Hooke

# Epígrafe

---

“Somos sublimes porque sonhamos para além da miséria que nos dão como destino.”

- Tamara de Oliveira Rodrigues em “Linhas de Luta: Cartas ao Presidente Lula”

“me levanto  
sobre o sacrifício  
de um milhão de mulheres que vieram antes  
e penso  
*o que é que eu faço  
para tornar essa montanha mais alta  
para que as mulheres que vierem depois de mim  
possam ver além*

- legado”

- Rupi Kaur em “o que o sol faz com as flores”

## Agradecimentos

---

*Minha história começa muito antes de mim. Não falo biologicamente pelo fato de ter “estado na barriga da minha avó” quando ela estava grávida da minha mãe, mas sim da força de vontade da primeira Ana da minha linhagem, a “de Almeida”. Aquela que se casou cedo, teve nove filhos e saiu da zona rural para morar em uma pequena cidade do interior de Minas Gerais e proporcionar mais oportunidades a eles. Eu falo da Ana Maria, minha mãe, que não pôde concluir os estudos por ter que trabalhar para ter condição de comprar seus materiais escolares. Essas “Anas” sonharam por mim. Hoje, eu vivo esses sonhos por elas.*

*Vivo o sonho do acesso à educação pública, gratuita e de qualidade. Vivo o sonho de estudar em uma das melhores universidades da América Latina. Vivo o sonho não apenas de ser a primeira pessoa da família a ter um diploma do Ensino Superior e de Pós-graduação, mas também de poder desfrutar das dores e das delícias que vêm com eles. Porque minha mãe e minha avó, mesmo não tendo as mesmas oportunidades que eu tive, me ensinaram uma lição que nem todo mundo consegue ensinar: podem te tirar tudo, mas o seu conhecimento, ninguém tira.*

*Hoje, agradeço não só às “minhas Anas”, mas a todas as mulheres que, à sua maneira, desafiaram tudo o que nos foi imposto. Àquelas que ocuparam os espaços que, por muito tempo, nos foram negados. Àquelas que deixaram seus filhos em outra cidade para fazer Pós-graduação. Àquelas que abdicaram de dias de descanso e noites de sono para serem referência em suas áreas de atuação. Àquelas que dedicaram e dedicam suas vidas à ciência, à pesquisa, ao ensino, a causas maiores que elas mesmas. Mesmo que não sejam reconhecidas pela sociedade e mesmo que eu nunca as conheça de verdade, eu as vejo. E só verdadeiramente enxergo o mundo por causa delas.*

*Que minha conquista possa ser porta de entrada e impulso para que outras “Anas” tenham as mesmas oportunidades que eu tive. De aprender e ensinar, de viver seus sonhos e defender seus ideais, de mudar suas vidas e as de suas famílias. De encontrarem em seus caminhos outras mulheres que trilharam os mesmos passos e que, assim como me ajudaram, as ajudem. Mas, acima de tudo, que elas tenham a oportunidade de não se desculparem por serem autenticamente elas mesmas e por poderem ser absolutamente qualquer coisa que elas quiserem.*

Primeiramente, agradeço à Universidade de São Paulo e ao Programa de Pós-graduação em Ciências – Fisiologia Geral do Departamento de Fisiologia do Instituto de Biociências da USP pela oportunidade de ingressar no programa de Mestrado, que me possibilitou crescer não só no âmbito acadêmico, mas também no pessoal. Agradeço aos professores que encontrei e pude aprender com durante esses dois anos. Vocês contribuíram com a formação não só das minhas habilidades, mas também das minhas crenças com relação à educação, principalmente ao Ensino Superior. Agradeço também aos funcionários da Secretaria de Pós-graduação e da Secretaria do Departamento de Fisiologia do IB-USP pela ajuda com os documentos e as burocracias.

À Universidade Federal de Alfenas – Unifal-MG, agradeço pela oportunidade de desenvolver minha pesquisa nas dependências do Departamento de Biologia Celular e do Desenvolvimento. A Unifal-MG sempre será minha primeira casa, a instituição que mudou minha vida e me deu esperança para o futuro. Agradeço também aos professores do Departamento e a todos os funcionários, desde os TAEs até os da limpeza e manutenção, em algum nível, todos vocês contribuíram nessa jornada. Aproveito para agradecer também à Profa. Dra. Wilma de Grava Kempinas da Unesp – Botucatu pela doação do EDS utilizado para a realização dos experimentos executados no presente trabalho.

Agradeço, mais uma vez, à minha mãe, Ana Maria, por todas as vezes que me acalentou em meu desespero e me incentivou a buscar nossos sonhos, mesmo quando isso significou passar meses sem nos ver e dias sem nos falar. Ainda sigo me levantando todos os dias para enfrentar o mundo e as dificuldades sabendo que não faço isso apenas por mim. Sei que se orgulha de ser minha mãe tanto quanto eu me orgulho de ser sua filha. A senhora não sabe o quanto é gigante. Em tempo, agradeço também ao meu padrasto, Francisco, e aos meus sogros, Rose e Di, por todo apoio e carinho, tanto comigo quanto com meus objetivos. E ao meu pai, Paulo Sérgio, pelos ideais compartilhados e todo o apoio que me deu nesse período.

Ao meu, agora, noivo, Régis, que entrou nessa empreitada comigo de cabeça. Nós compartilhamos das melhores conquistas e maiores desafios de todas as fases desse jogo da vida. Chegar aqui sem dividir o controle com você teria sido muito

mais difícil. Obrigada por aceitar enfrentar esse “*Souls like*” no “modo *hard*” do meu lado pelos últimos dez anos. Obrigada pelo incentivo para descobrir e ser exatamente quem eu sou e ir atrás de todas as “missões” que eu quiser fazer no mapa. Obrigada por me lembrar de me acolher e de que eu não preciso ser perfeita para merecer ser amada, respeitada e celebrar minhas conquistas (mesmo quando eu não “*platino*” o jogo). Você é minha melhor risada, meu abrigo na pior das tempestades e vai ser sempre meu *player 1*.

Aos meus amigos, que contribuíram para que a minha caminhada fosse mais leve, dividindo comigo tanto o estresse quanto as conquistas e não me deixando sentir só, mesmo quando a Pós-graduação faz o contrário. À Nathalia, por todas as experiências compartilhadas. Todas as vezes que você me ouviu e fez o possível para me ajudar também foram combustível para me trazer até aqui. Você sempre vai ser especial. Ao Tagurio, pelas risadas e memes, e por me lembrar quem eu sou quando eu teimo em esquecer. À Gabriela e ao Rafael, que dessa vez não deram só seu apoio, mas também a sua casa. O mundo pode até estar chato, mas vocês merecem todas as coisas boas dele. Aos meus cunhados, Pedro Hugo e João, por serem simplesmente vocês. Ao Lucas e Haru, os “Tcholas” mais queridos que o RPG poderia me dar. Ao Pedro Augusto, que mesmo quando ficamos meses sem conversar, parece que nunca paramos. Obrigada por todos os conselhos e por me ouvir (e por aguentar quando eu só reclamo). Ao Otoniel, um grande amigo que a USP me deu. Sua experiência compartilhada foi essencial em diversos aspectos da minha caminhada e eu nunca vou esquecer tudo o que fez por mim e os momentos que passamos no Fis-a-Bee. Ao Davi e Mateus Dino, pela companhia no laboratório, pela ajuda com os experimentos e pela amizade.

Ao meu irmão Mário Bruno e meu cunhado Geovani, por terem me recebido em sua casa para o Congresso do Meio Ambiente e por sempre torcerem por mim. À minha irmã, Monique, e ao meu cunhado, Matheus, pelas vezes que estiveram presentes mesmo estando distantes e pela companhia que faz bem ao coração. À Laura, minha sobrinha e amor da minha vida, por trazer a calma no caos, a felicidade nas coisas simples e o amor incondicional. Perdi as contas de quantas vezes você me ajudou sem nem saber. Você só tem três anos e uma força gigantesca, que o mundo tome cuidado quando você descobrir seu potencial.

À minha psicóloga, Elisângela, que veio em um momento caótico e me ajudou a desenhar o mapa do labirinto louco que é a minha cabeça. Se eu sei que eu posso ser uma adulta saudável é porque você me mostrou. A terapia foi essencial, não só para conseguir levar a Pós-graduação até o final, mas também em todos os outros aspectos da minha vida.

Por último, mas não menos importante, agradeço à minha orientadora, Profa. Dra. Talita Sarah Mazzoni, pela oportunidade, pela amizade e pelas lições. Desde a graduação, você me recebeu em seu laboratório e eu sou muito grata por todas as oportunidades que tive de trabalhar com você desde então. A Pós-graduação tem seus altos e baixos, assim como a vida, mas todos eles nos deixam uma lição. Você acreditou que eu passaria na USP, não desistiu de mim e não me deixou desistir, por mais difícil que a situação fosse. Seu amor à ciência continuará me inspirando durante minha caminhada nesse mundo. Essa vida que escolhemos não é fácil, ela exige diversas renúncias de tempo, de família, e muitas vezes de saúde. Mas é gratificante olhar para um trabalho fechado e ver que, apesar de tudo, valeu a pena. Mais uma vez, muito obrigada pela oportunidade de trabalhar e aprender com você.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001 e do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq – Processo 161599/2022-2.

Seria impossível agradecer nominalmente todos que contribuíram para a realização desse trabalho e para o engrandecimento da minha jornada acadêmica dentro da USP. Por isso, ficam aqui meus mais sinceros agradecimentos às pessoas que encontrei nessa jornada de dois anos no Mestrado e na USP.

*Nesse caminho, eu quase esqueci como ser feliz. Mas eu sempre soube que isso era algo que eu poderia ser. Agora, finalmente eu lembrei: EU FUI FEITA PARA ISSO!*

## Resumo

---

SANTIAGO, A. F. G. **Avaliação dos efeitos do dimetanossulfonato de etano (EDS) no eixo hipotálamo-hipófise-gônadas e na morfofisiologia do epitélio germinativo masculino de *zebrafish***. 2024. Dissertação (Mestrado em Ciências (Fisiologia Geral) – Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2024.

O dimetanossulfonato de etano (EDS) é um éster sulfônico alquilante, estruturalmente análogo ao quimioterápico busulfan, que apresenta efeito citotóxico seletivo nas células de Leydig de alguns animais, principalmente de roedores. A depleção dessas células ocorre por apoptose e, além de provocar alterações severas na morfologia do compartimento germinativo e intersticial, pode levar a uma diminuição significativa dos níveis de andrógenos plasmáticos e teciduais em um curto período após a exposição, bem como à inibição da espermatogênese. No entanto, apesar do desfecho ser o mesmo na maioria dos animais, os efeitos específicos do EDS podem variar mesmo em espécies da mesma família como camundongos e ratos. Até o presente momento, raros estudos avaliaram o efeito do EDS em outros vertebrados. Neste sentido, sabendo que o EDS pode ser utilizado como um futuro inibidor da espermatogênese para mamíferos, e considerando, como consequência de tal administração, possíveis contaminações ambientais do meio aquático, este trabalho propõe avaliar os efeitos do EDS em *zebrafish*, na tentativa de verificar possíveis alterações morfofisiológicas no epitélio germinativo masculino deste peixe, bem como nos níveis plasmáticos de hormônios esteroides sexuais que regem sua espermatogênese. Para tanto, machos adultos de *zebrafish* foram expostos ao EDS por 28 dias, a uma concentração de 6mg/L. Amostras das gônadas e de sangue foram coletadas no 4º, 7º, 14º, 21º e 28º dia pós-exposição (dpe) e processadas para análises histológicas e ensaios imunoenzimáticos. Os testículos de *zebrafish* do grupo controle apresentaram epitélio germinativo permanentemente ativo durante todo o período de 28 dias, com grande quantidade de espermatozoides nos túbulos testiculares, bem como nos ductos, indicando período reprodutivo ativo. Já os animais expostos aos EDS apresentaram desorganização gradual e contínua tanto do compartimento germinativo, quanto do

compartimento intersticial, dificultando a identificação das células germinativas, assim como das células de Leydig, as quais não foram observadas nos grupos tratados. Possivelmente, pela depleção das células de Leydig nos grupos tratados, houve alteração significativa dos níveis plasmáticos dos hormônios sexuais nos animais expostos ao EDS, especialmente no 7ºdpe. Os andrógenos masculinos de animais tratados apresentaram concentrações plasmáticas abaixo dos níveis observados no grupo controle. Já o estradiol apresentou uma queda significativa no 7ºdpe, seguida de um aumento da concentração no 14ºdpe, o que pode ter contribuído para o desenvolvimento de alguns oócitos pré-vitelogênicos nos testículos de animais tratados com 6mg/L de EDS. Intensa morte celular de células testiculares foi detectada durante o período de tratamento nos animais expostos. Ao final do 28ºdpe, a aromatase gonadal, característica de tecido gonadal feminino, também foi detectada nos animais tratados, possivelmente como consequência de mudanças fisiológicas causadas pela exposição ao EDS, já que no grupo controle, tal enzima não foi detectada nos machos.

**Palavras-chave:** célula de Leydig, hormônios sexuais, espermatogênese, ecotoxicologia, zebrafish.

## Abstract

---

SANTIAGO, A. F. G. **Assessment of the effects of ethane dimethanesulfonate (EDS) on the hypothalamus-pituitary-gonads axis and the morphophysiology of the male germinal epithelium in zebrafish.** 2024. Dissertação (Mestrado em Ciências (Fisiologia Geral) – Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2024.

Ethane dimethanesulfonate (EDS) is an alkylating sulfonic ester, structurally analogous to the chemotherapeutic drug busulfan, which exerts a selective cytotoxic effect on the Leydig cells of some animals, mainly rodents. The depletion of these cells occurs through apoptosis and, in addition to causing severe changes in the morphology of the germinal and interstitial compartments, it can lead to a significant decrease in plasma and tissue androgen levels in a short period after exposure, as well as the inhibition of spermatogenesis. However, although the outcome is the same in most animals, the specific effects of EDS can vary even in species from the same family, such as mice and rats. To date, few studies have evaluated the effect of EDS on other vertebrates. Recognizing that EDS could be used as a future spermatogenesis inhibitor for mammals and considering the potential environmental contamination of the aquatic environment as a consequence of such administration, this study aims to evaluate the effects of EDS on zebrafish. To verify possible morphophysiological changes in the male germinal epithelium of this fish, as well as in the plasma levels of the sex steroid hormones that control its spermatogenesis. To achieve this, adult male zebrafish were exposed to EDS for 28 days at a concentration of 6mg/L. Samples of the gonads and blood were collected on the 4<sup>th</sup>, 7<sup>th</sup>, 14<sup>th</sup>, 21<sup>st</sup>, and 28<sup>th</sup> days post-exposure (dpe) and processed for histological analysis and enzyme-linked immunosorbent assays. The testicles of zebrafish from the control group showed a permanently active germinal epithelium throughout the 28-day period, with large numbers of sperm present in the testicular tubules and ducts, indicating an active reproductive period. On the other hand, the animals exposed to EDS showed gradual and continuous disorganization of both the germinal compartment and the interstitial compartment, making it difficult to identify the germ cells, as well as the Leydig cells, which were not observed in the treated

groups. Possibly due to the depletion of the Leydig cells in the treated groups, there was a significant change in plasma levels of sex hormones in the animals exposed to EDS, especially on the 7<sup>th</sup>dpe. The male androgens measurements of treated animals showed plasma concentrations below the levels observed in the control group. On the other hand, estradiol showed a significant drop on the 7<sup>th</sup>dpe, followed by an increase in concentration on the 14<sup>th</sup>dpe, which may have contributed to the development of some pre-vitellogenic oocytes in the testes of animals treated with 6mg/L of EDS. Intense cell death of testicular cells was detected during the treatment period in the exposed animals. At the end of 28<sup>th</sup>dpe, gonadal aromatase, a characteristic of female gonadal tissue, was also detected in the treated animals, possibly due to the physiological changes caused by exposure to EDS, since this enzyme was not detected in the males from the control group.

**Key words:** Leydig cells, sex hormones, spermatogenesis, ecotoxicology, zebrafish.

# Índice

---

<b>1. Introdução</b> .....	<b>16</b>
<b>2. Revisão da Literatura</b> .....	<b>18</b>
2.1 Dimetanossulfonato de etano (EDS) .....	18
2.2 Biologia reprodutiva dos teleostei .....	20
2.2.1 Estrutura testicular, espermatogênese e fisiologia reprodutiva de peixes	20
2.3 Modelo experimental.....	21
2.3.1 <i>Danio rerio</i> .....	21
<b>3. Objetivos</b> .....	<b>23</b>
3.1 Objetivo geral.....	23
3.2 Objetivos específicos .....	23
<b>4. Materiais e Métodos</b> .....	<b>24</b>
4.1 Dimetanossulfonato de etano e preparação da solução experimental .....	24
4.1.1 Dimetanossulfonato de etano (EDS).....	24
4.1.2 Escolha da concentração .....	24
4.1.3 Solução experimental .....	26
4.1.4 Descarte da água dos aquários .....	26
4.2 Os animais.....	27
4.2.1 Obtenção.....	27
4.2.2 Manutenção dos animais .....	27
4.3 Delineamento experimental .....	27
4.4 Análises biológicas .....	28
4.4.1 Análises histológicas.....	28
4.4.2 Quantificação dos esteroides plasmáticos .....	29
4.4.3 Detecção de proteínas por imunohistoquímica .....	29
4.4.4 Imunofluorescência para morte celular por apoptose - Marcação Terminal de Deoxinucleotidil Transferase Nick End Labelling (TUNEL) .....	30
4.4.5 Análises estatísticas.....	31
<b>5. Resultados</b> .....	<b>32</b>
5.1 Histologia dos testículos .....	32
5.1.1 Grupo controle .....	32
5.1.2 Grupo tratado - 6MG/L .....	32

5.2 Níveis plasmáticos de esteroides sexuais .....	40
5.3 Detecção da enzima 3 $\beta$ -HSD e CYP19A1A (aromatase gonadal) por imunohistoquímica.....	42
5.4 Detecção de morte celular (TUNEL) por imunofluorescência .....	43
5.5 Considerações sobre a mortalidade dos peixes nos experimentos .....	46
<b>6. Discussão .....</b>	<b>47</b>
6.1 Histologia dos testículos .....	47
6.2 Efeito do EDS nos esteroides sexuais de machos de Danio rerio .....	49
6.3 Considerações finais.....	52
<b>7. Conclusões .....</b>	<b>54</b>
<b>8. Referências Bibliográficas .....</b>	<b>55</b>

# 1. Introdução

---

O composto químico dimetanossulfonato de etano (EDS) é reconhecido por ser especificamente tóxico para as células de Leydig (TEERDS & RIJNTJES, 2007). Essas células, localizadas no interstício dos testículos masculinos, desempenham um papel crucial na produção dos esteroides sexuais, fundamentais para a manutenção da espermatogênese e do epitélio germinativo (ENGEL & CALLARD, 2007; ZIRKIN & PAPADOPOULOS, 2018). A depleção dessas células resulta na destruição do interstício e do epitélio germinativo, resultando em uma diminuição nos níveis plasmáticos e teciduais dos hormônios e interrompendo a espermatogênese (KLINEFELTER *et al.*, 1991, KIM *et al.*, 2000; TARKA-LEEDS *et al.*, 2003). Esses efeitos podem afetar as células de Leydig de diversos vertebrados; no entanto, são predominantemente observados em ratos (CHEN *et al.*, 1996; TEERDS & RIJNTJES, 2007).

Em alguns outros animais, o EDS causa efeitos específicos (JONES *et al.*, 1972; KERR *et al.*, 1987; MINUCCI *et al.*, 1990, 1995, 2000; ONYANGO *et al.*, 2001). Tais efeitos estão associados à ausência de alterações morfológicas nas células de Leydig (KERR *et al.*, 1987), à falta de espermatozoides maduros no epitélio germinativo (JONES *et al.*, 1972) e à inalteração do nível de testosterona circulante (ONYANGO *et al.*, 2001). Contudo, a consequência comum, na maioria dos animais, é a suspensão da espermatogênese e a indução de infertilidade temporária (KIM *et al.*, 2000; TARKA-LEEDS *et al.*, 2003). Uma exceção notável é observada no peixe *Gobius paganellus*, uma espécie de Perciformes, na qual o EDS estimula a atividade do compartimento intersticial e da espermatogênese, além de aumentar a vascularização tecidual e os níveis hormonais (MINUCCI *et al.*, 1992).

A divergência nos resultados encontrados no Perciformes *Gobius paganellus* (MINUCCI *et al.*, 1992), quando contrastada com os efeitos do composto em outros vertebrados (JONES *et al.*, 1972; KERR *et al.*, 1987; MINUCCI *et al.*, 1990, 1995, 2000; ONYANGO *et al.*, 2001), destaca a necessidade de esclarecimento desses dados. Além disso, dada a escassez de informações na literatura que demonstrem a consistência desses efeitos do EDS entre diferentes espécies de peixe, surgem incertezas quanto à generalização desses resultados para outras espécies.

Nesse sentido, o foco desta pesquisa é esclarecer se o EDS atua como estimulante ou exerce efeito citotóxico nas células de Leydig do Cipriniformes *Danio rerio*, por meio da quantificação dos níveis plasmáticos de hormônios esteroides e da realização de análises histológicas nos testículos de machos dessa espécie expostos ao EDS. Os resultados dessas análises proporcionarão uma compreensão mais aprofundada dos efeitos do EDS em peixes, demonstrando se há ou não variação interespecífica na resposta desses animais ao composto, além de contribuir para evidenciar a importância de precauções no seu uso.

## 7. Conclusões

---

Com base nos resultados obtidos, a hipótese inicial de que a exposição ao EDS estimularia a proliferação das células de Leydig e de outras células do epitélio germinativo, além do aumento dos níveis plasmáticos dos esteroides sexuais, foi refutada. Diferente do observado para *Gobius paganellus*, em *Danio rerio*, o EDS depletou as células de Leydig, levando à desorganização do epitélio germinativo e à diminuição dos níveis plasmáticos de T e 11-KT. Dessa maneira, destaca-se as seguintes conclusões:

- A concentração de 10mg/L de EDS é altamente tóxica para *Danio rerio*;
- A exposição ao EDS depletou as células de Leydig dos testículos de *Danio rerio*;
- A depleção das células de Leydig, causadas pela exposição ao EDS, levou à completa desorganização do epitélio germinativo dos machos de *zebrafish*;
- A exposição ao EDS e a depleção das células de Leydig causaram a redução dos níveis plasmáticos de testosterona e 11-cetotestosterona em machos de *Danio rerio*;
- A redução dos níveis plasmáticos de T e 11-KT levou ao aumento dos níveis plasmáticos de estradiol.

## 8. Referências Bibliográficas

---

- BARTLETT, J. M.S. *et al.* The effect of selective destruction and regeneration of rat Leydig cells on the intratesticular distribution of testosterone and morphology of the seminiferous epithelium. **Journal of Andrology**, v. 7, n. 4, p. 240-253, 1986.
- BORELLA, M. I. *et al.* The brain-pituitary-gonad axis and the gametogenesis. **Biology and physiology of freshwater neotropical fish**. Academic Press, 2020. p. 315-341.
- BRIGGS, J. P. The *zebrafish*: a new model organism for integrative physiology. **American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, v. 282, n. 1, p. R3-R9, 2002.
- CHEN, H. *et al.* Depletion and repopulation of Leydig cells in the testes of aging brown Norway rats. **Endocrinology**, v. 137, n. 8, p. 3447-3452, 1996.
- CHEN, B. *et al.* Effects of estradiol and methoxychlor on Leydig cell regeneration in the adult rat testis. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 15, n. 5, p. 7812-7826, 2014.
- DE BARROS, J.W.F. *et al.* Ethylene dimethanesulfonate effects on gene promoter activities related to the endocrine function of immortalized Leydig cell lines R2C and MA-10. **Current Research in Toxicology**, v. 6, p. 100147, 2024.
- DOMÍNGUEZ-CASTANEDO, O.; URIBE, M. C. Reproductive biology in males of the annual killifish *Millerichthys robustus* (Cyprinodontiformes: Cynolebiidae). **Environmental Biology of Fishes**, v. 102, n. 11, p. 1365-1375, 2019.
- EDWARDS, K. *et al.* Studies with alkylating esters—I: The fate of ethylene dimethanesulphonate. **Biochemical Pharmacology**, v. 18, n. 7, p. 1693-1700, 1969.
- ENGEL, K. B.; CALLARD, G. V. Endocrinology of Leydig cells in nonmammalian vertebrates. **The Leydig cell in health and disease**. Humana Press, 2007. p. 207-224.
- FIOCRUZ, Fundação Oswaldo Cruz. Ficha Química de Metanossulfonato de Metila - C<sub>2</sub>H<sub>6</sub>O<sub>3</sub>S. Núcleo de Biossegurança. [https://biosseguranca.ensp.fiocruz.br/documentos\\_fichaquimica/Metanossulfonato\\_d\\_e\\_Metila.pdf](https://biosseguranca.ensp.fiocruz.br/documentos_fichaquimica/Metanossulfonato_d_e_Metila.pdf). Acesso em 05 de Março, 2024.
- FRANÇA, L. R. *et al.* Sertoli cell structure and function in anamniote vertebrates. **Sertoli cell biology**. Academic Press, 2015. p. 385-407.
- GOLSHAN, M.; ALAVI, S. M. H. Androgen signaling in male fishes: Examples of anti-androgenic chemicals that cause reproductive disorders. **Theriogenology**, v. 139, p. 58-71, 2019.

GRIER, H. J.; URIBE-ARANZÁBAL, M. C. The testis and spermatogenesis in teleosts. **Reproductive biology and phylogeny of fishes (agnathans and bony fishes)**, v. 8, p. 119-142, 2009.

GUO, J. *et al.* Comparison of cell types in the rat Leydig cell lineage after ethane dimethanesulfonate treatment. **Reproduction**, v. 145, n. 4, p. 371-380, 2013.

HILL, A. J. *et al.* Zebrafish as a model vertebrate for investigating chemical toxicity. **Toxicological Sciences**, v. 86, n. 1, p. 6-19, 2005.

HORZMANN, K. A.; FREEMAN, J. L. Making waves: New developments in toxicology with the *zebrafish*. **Toxicological Sciences**, v. 163, n. 1, p. 5-12, 2018.

HOWE, K. *et al.* The zebrafish reference genome sequence and its relationship to the human genome. **Nature**, v. 496, n. 7446, p. 498-503, 2013.

HUSZNO, J.; KLAG, J. The reproductive cycle in the male gonads of *Danio rerio* (Teleostei, Cyprinidae). **Stereological analysis. Micron**, v. 43, n. 5, p. 666-672, 2012.

ING, N. H. *et al.* Anatomy and physiology of the male reproductive system and potential targets of toxicants. **Comprehensive toxicology**, v. 4, p. 2-63, 2018.

JACKSON, C. M.; JACKSON, H. Comparative protective actions of gonadotrophins and testosterone against the antispermatogenic action of ethane dimethanesulphonate. **Reproduction**, v. 71, n. 2, p. 393-401, 1984.

JACKSON, C. M.; MORRIS, I. D. Gonadotrophin levels in male rats following impairment of Leydig cell function by ethylene dimethanesulphonate. **Andrologia**, v. 9, n. 1, p. 29-35, 1977.

JONES, P. *et al.* Effects of antifertility substances on male Japanese quail. **Reproduction**, v. 29, n. 1, p. 71-78, 1972.

KERR, J. B. *et al.* Selective destruction and regeneration of rat Leydig cells in vivo: a new method for the study of seminiferous tubular-interstitial tissue interaction. **Cell and tissue research**, v. 242, p. 145-156, 1985.

KERR, J. *et al.* Acute response of testicular interstitial tissue in rats to the cytotoxic drug ethane dimethanesulphonate: An ultrastructural and hormonal assay study. **Cell and tissue research**, v. 243, p. 405-414, 1986.

KERR, J. B. *et al.* Ultrastructural analysis of the effect of ethane dimethanesulphonate on the testis of the rat, guinea pig, hamster and mouse. **Cell and tissue research**, v. 249, n. 2, p. 451-457, 1987.

KIM, J. M. *et al.* Caspase-3 activation is required for Leydig cell apoptosis induced by ethane dimethanesulfonate. **Endocrinology**, v. 141, n. 5, p. 1846-1853, 2000.

- KOULISH, S. *et al.* Organization of the male gonad in a protogynous fish, *Thalassoma bifasciatum* (Teleostei: Labridae). **Journal of Morphology**, v. 254, n. 3, p. 292-311, 2002.
- KLINEFELTER, G. R. *et al.* Multiple effects of ethane dimethanesulfonate on the epididymis of adult rats. **Toxicology and applied pharmacology**, v. 105, n. 2, p. 271-287, 1990.
- KLINEFELTER, G. R. *et al.* *In vitro/in vivo* effects of ethane dimethanesulfonate on Leydig cells of adult rats. **Toxicology and applied pharmacology**, v. 107, n. 3, p. 460-471, 1991.
- LEAL, M. C. *et al.* Histological and stereological evaluation of zebrafish (*Danio rerio*) spermatogenesis with an emphasis on spermatogonial generations. **Biology of reproduction**, v. 81, n. 1, p. 177-187, 2009.
- LEE, E. H. *et al.* Gene expression analysis of toxicological pathways in TM3 leydig cell lines treated with Ethane dimethanesulfonate. **Journal of Biochemical and Molecular Toxicology**, v. 26, n. 6, p. 213-223, 2012.
- LU, H. *et al.* Effects of perfluorooctanoic acid on stem Leydig cell functions in the rat. **Environmental pollution**, v. 250, p. 206-215, 2019.
- MAZZONI, T. S. *et al.* Action of the metalloproteinases in gonadal remodeling during sex reversal in the sequential hermaphroditism of the teleostei fish *Synbranchus marmoratus* (Synbranchiformes: Synbranchidae). **Cells**, v. 7, n. 5, p. 34, 2018.
- MELO, M. C. *et al.* Androgens directly stimulate spermatogonial differentiation in juvenile Atlantic salmon (*Salmo salar*). **General and Comparative Endocrinology**, v. 211, p. 52-61, 2015.
- MEYERS, J. R. Zebrafish: development of a vertebrate model organism. **Current Protocols Essential Laboratory Techniques**, v. 16, n. 1, p. e19, 2018.
- MINUCCI, S. *et al.* Morphological and hormonal changes in the frog, *Rana esculenta*, testis after administration of ethane dimethane sulfonate. **General and comparative endocrinology**, v. 79, n. 3, p. 335-345, 1990.
- MINUCCI, S. *et al.* Resumption of testicular activity in *Gobius paganellus* after administration of ethane 1, 2-dimethane sulfonate (EDS). **Comparative Biochemistry and physiology. C, Comparative Pharmacology and Toxicology**, v. 102, n. 2, p. 319-323, 1992.
- MINUCCI, S. *et al.* Ethane 1, 2-dimethane sulfonate effects on the testis of the lizard, *Podarcis s. sicula* Raf: morphological and hormonal changes. **General and comparative endocrinology**, v. 97, n. 3, p. 273-282, 1995.
- MINUCCI, S. *et al.* Effects of multiple injections of ethane 1, 2-dimethane sulphonate (EDS) on the frog, *Rana esculenta*, testicular activity. **Journal of Experimental Zoology**, v. 287, n. 5, p. 384-393, 2000.

MOLENAAR, R. *et al.* Specific destruction of Leydig cells in mature rats after in vivo administration of ethane dimethyl sulfonate. **Biology of Reproduction**, v. 33, n. 5, p. 1213-1222, 1985.

MORRIS, I. D.; MCCLUCKIE, J. A. Temporal changes in serum androgen after temporary impairment of Leydig cell function by ethane-1, 2,-dimethane sulphonate. **Journal of steroid biochemistry**, v. 10, n. 4, p. 467-469, 1979.

NCBI, National Center for Biotechnology Information. PubChem Compound Summary for CID 2478, Busulfan. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/2478>. Acesso em 05 de Março, 2024.

OECD, Organisation for Economic Co-Operation and Development, Detailed review paper on fish screening assays for the detection of endocrine active substances. **OECD Series on Testing and Assessment**, n. 47, 2004.

OECD, Organisation For Economic Co-Operation And Development, Test. 230: 21-day Fish Assay: A Short-Term Screening for Oestrogenic and Androgenic Activity, and Aromatase Inhibition. **OECD Guidelines for the Testing of Chemicals**, v. 2, 2009

OECD, Organisation For Economic Co-Operation And Development, OECD Environment, Health and Safety Publications Series on Testing and Assessment: FISH TOXICITY TESTING FRAMEWORK. **OECD Guidelines for the Testing of Chemicals**, n. 171, 2012a

OECD, Organisation For Economic Co-Operation And Development, Test. 229: Fish short term reproduction assay. **OECD Guidelines for the Testing of Chemicals**, v. 2, 2012b

ONYANGO, D. W. *et al.* Early testicular response to intraperitoneal administration of ethane dimethanesulphonate (EDS) in the goat (*Capra hircus*). **Journal of Submicroscopic Cytology and Pathology**, v. 33, n. 1-2, p. 117-124, 2001.

PALMIERO, C. *et al.* Ethane 1, 2-dimethane sulphonate is a useful tool for studying cell-to-cell interactions in the testis of the frog, *Rana esculenta*. **General and comparative endocrinology**, v. 131, n. 1, p. 38-47, 2002.

QUINTERO-HUNTER, I. *et al.* Enhancement of histological detail using metanil yellow as counterstain in periodic acid Schiff's hematoxylin staining of glycol methacrylate tissue sections. **Biotechnic & Histochemistry**, v. 66, n. 4, p. 169-172, 1991.

SCHULZ, R. W.; MIURA, T. Spermatogenesis and its endocrine regulation. **Fish physiology and biochemistry**, v. 26, n. 1, p. 43-56, 2002.

SCHULZ, R. W. *et al.* Gonadotropins, their receptors, and the regulation of testicular functions in fish. Comparative Biochemistry and Physiology Part B: **Biochemistry and Molecular Biology**, v. 129, n. 2-3, p. 407-417, 2001.

SCHULZ, R. W. *et al.* Spermatogenesis in fish. **General and comparative endocrinology**, v. 165, n. 3, p. 390-411, 2010.

SPRANDO, R. L. *et al.* Does ethane 1, 2-dimethanesulphonate (EDS) have a direct cytotoxic effect on the seminiferous epithelium of the rat testis?. **Journal of andrology**, v. 11, n. 4, p. 344-352, 1990.

STANLEY, E. *et al.* Identification, proliferation, and differentiation of adult Leydig stem cells. **Endocrinology**, v. 153, n. 10, p. 5002-5010, 2012.

TARKA-LEEDS, D. K. *et al.* Effects of gestational exposure to ethane dimethanesulfonate in CD-1 mice: Microtia and preliminary hearing tests. Birth Defects Research Part B: **Developmental and Reproductive Toxicology**, v. 68, n. 4, p. 383-390, 2003.

TEERDS, K.; RIJNTJES, E. Dynamics of Leydig cell regeneration after EDS: a model for postnatal Leydig cell development. **The Leydig cell in health and disease**, p. 91-116, 2007.

TAYLOR, M. F. *et al.* Leydig cell apoptosis after the administration of ethane dimethanesulfonate to the adult male rat is a Fas-mediated process. **Endocrinology**, v. 140, n. 8, p. 3797-3804, 1999.

YANG, Z. W. *et al.* Histological changes of the testis and epididymis in adult rats as a result of Leydig cell destruction after ethane dimethane sulfonate treatment: a morphometric study. **Asian journal of andrology**, v. 8, n. 3, p. 289-299, 2006.

ZHANG, C. *et al.* Zebrafish: an animal model for toxicological studies. **Current Protocols in Toxicology**, v. 17, n. 1, p. 1.7. 1-1.7. 18, 2003.

ZHANG, Y.F. *et al.* Alterations of gene profiles in Leydig-cell-regenerating adult rat testis after ethane dimethane sulfonate-treatment. **Asian Journal of Andrology**, v. 17, n. 2, p. 253, 2015.

ZIRKIN, B. R.; PAPADOPOULOS, V. Leydig cells: formation, function, and regulation. **Biology of reproduction**, v. 99, n. 1, p. 101-111, 2018.

ZOHAR, Y. *et al.* Neuroendocrinology of reproduction in teleost fish. **General and comparative endocrinology**, v. 165, n. 3, p. 438-455, 2010.

ZHOU, R. *et al.* The roles and mechanisms of Leydig cells and myoid cells in regulating spermatogenesis. **Cellular and molecular life sciences**, v. 76, p. 2681-2695, 2019.

ZHU, Q. *et al.* Toxicological effects of cadmium on mammalian testis. **Frontiers in genetics**, v. 11, p. 527, 2020.