

**Alessandro Loureiro Paschoalini**

**POTENCIAL ESTROGÊNICO DE METAIS PESADOS, XENOESTRÓGENOS  
E ESTRÓGENOS NATURAIS EM PEIXES NEOTROPICAIS EM CONDIÇÕES  
NATURAIS E EXPERIMENTAIS.**

Instituto de Ciências Biológicas  
Universidade Federal de Minas Gerais  
**Março de 2019**

**Alessandro Loureiro Paschoalini**

**POTENCIAL ESTROGÊNICO DE METAIS PESADOS, XENOESTRÓGENOS  
E ESTRÓGENOS NATURAIS EM PEIXES NEOTROPICAIS EM CONDIÇÕES  
NATURAIS E EXPERIMENTAIS.**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biologia Celular da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito para a obtenção do título de doutor em ciências.

Área de concentração: Biologia Celular

Orientador: Dr. Nilo Bazzoli

Co-orientadora: Dra. Elizete Rizzo

Instituto de Ciências Biológicas

Universidade Federal de Minas Gerais

**Março de 2019**

*Dedico este trabalho à minha família, esposa, amigos e colegas de trabalho.*

*Imprescindíveis em minha caminhada até aqui!*

## **AGRADECIMENTOS**

A Deus, por me guiar e proporcionar muitas oportunidades durante toda minha vida;

Aos professores, orientadores, colegas e amigos, Dr. Nilo Bazzoli e Dra. Elizete Rizzo, por toda orientação e conselhos na minha criação como pesquisador e professor;

Aos meus pais José e Sandra e irmãos Eduardo e Gustavo. O amor e o apoio incondicional de vocês sempre serão minhas maiores motivações;

À minha esposa, grande amiga e maior incentivadora da minha carreira. Essa vitória também é sua;

A todos os integrantes do laboratório de Ictiohistologia, principalmente André, Lourenço, Davidson, Yves, Ana Paula, Camila e Guto;

Aos técnicos Rogério Matos e Mônica, que auxiliaram na execução das técnicas laboratoriais;

A todos os alunos de Iniciação Científica que sempre contribuem bastante para o sucesso de todos os projetos;

A todos os meus familiares, especialmente a meus sobrinhos Daniel e Francisco;

Às agências de fomento que viabilizaram e apoiaram a execução dos projetos;

À PUC Minas e UFMG pelo apoio na execução do projeto;

Aos professores, alunos e funcionários do Programa de Pós-graduação em Biologia Celular;

*“The science of today is the technology of tomorrow.”*

*Edward Teller*

## Sumário

LISTA DE FIGURAS .....	7
RESUMO .....	8
ABSTRACT .....	9
1. INTRODUÇÃO GERAL .....	10
2. OBJETIVOS .....	15
2.1 Objetivo geral.....	15
2.2 Objetivos específicos.....	15
2.2.1 Para avaliar o potencial estrogênico de metais pesados: .....	15
2.2.2 Para avaliar o potencial estrogênico de Estrona (E1) e Bisfenol-A (BPA): .....	16
3. CAPÍTULO I.....	18
Heavy metals accumulation and endocrine disruption in <i>Prochilodus argenteus</i> from a polluted neotropical river .....	18
4. CAPÍTULO II.....	31
Avaliação do potencial estrogênico de Estrona e Bisfenol-A em machos de <i>Astyanax bimaculatus</i> após exposição sub-aguda .....	31
5. CONCLUSÕES GERAIS.....	59
6. PRODUÇÃO CIENTÍFICA E ATIVIDADES ACADÊMICAS RELEVANTES.....	60
Publicações, co-autorias e potenciais publicações.....	60
Participação em eventos científicos .....	60
Participação em bancas de trabalhos de conclusão de curso .....	60
7. ATA DE DEFESA .....	62

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** - Esquema resumido das vias de alguns poluentes desde a sua fonte até a destinação final (Stuart et al., 2012)..... 10
- Figura 2** - Interação entre alguns desreguladores endócrinos (EDC) e ligantes naturais (NL) com receptores. (A) EDC competindo com o ligante pelo sítio de ativação; (B) EDC ligado ao receptor causando efeitos contrários ou alterando as respostas genéticas; (C) atuação sinérgica entre EDC e ligante natural causando aumento da expressão genética (Rogers et al., 2013). ..... 11
- Figura 3** - Esquema simplificado da regulação hormonal no eixo Hipotalâmico-Pituitário-Gonadal (HPG) em teleósteos. GnRH = Hormônio liberador de gonadotrofina; LH = Hormônio luteinizante; FSH = Hormônio folículo estimulante; Vtg = Vitelogenina; Zrp = Proteínas de zona radiata. .... 13
- Figura 4** - Esquema resumido dos principais hormônios atuantes na gametogênese de teleósteos e seus possíveis mecanismos de controle na espermatogênese e ovogênese. SPS- Substância de prevenção a espermatogênese; SSRF- Fator de renovação de espermatogônias tronco; E2- Estradiol; 11-KT- 11-Ketotestosterona; DHP- 17 $\alpha$ -20 $\beta$ -dihidroxi-4-pregnen-3-ona. (Miura e Miura, 2011)..... 14

## RESUMO

A reprodução de peixes, assim como em outros vertebrados, é controlada pelo eixo Hipotalâmico-hipofisário-gonadal (HPG). Condições ambientais propícias servem como “gatilho” cerebral, levando à liberação do hormônio liberador de gonadotrofinas (GnRH) que atuam nos ovários e testículos estimulando a maturação gonadal e a produção de estrógenos como: 17 $\beta$ -estradiol (E2), Testosterona (T) e 11-Ketotestosterona (11-KT). A entrada de componentes tóxicos em ambientes aquáticos é frequentemente relacionada com a geração e despejo de resíduos provenientes de atividades antrópicas. Muitos desses componentes, também conhecidos como Endocrine Disrupting Chemicals (EDCs), podem atuar no sistema endócrino de animais comprometendo a síntese hormonal e consequentemente o *status* reprodutivo de várias espécies de vertebrados. Com o intuito de comparar os efeitos estrogênicos de EDCs em peixes de água doce neotropicais, foram conduzidos dois tipos de estudos: (1) estudo conduzido em ambiente natural, onde foram analisados dados sobre a reprodução de *Prochilodus argenteus*, espécie comercialmente importante, proveniente de ambiente contaminado por metais pesados, e (2) estudo conduzido em condições experimentais, onde adultos de *Astyanax bimaculatus* foram expostos durante 15 dias à mesma dosagem (10 $\mu$ g/L) de estrona e Bisfenol-A, além da mistura deles, a fim de analisar comparativamente a capacidade estrogênica e na interação entre as substâncias. Nos dois estudos foram obtidas as variáveis morfométricas de todos os peixes analisados, tais como: comprimento total; peso corporal, peso do fígado, peso gonadal e sexo. Além disso, foram calculados os índices biológicos e analisadas as variações nos níveis hormonais e de biomarcadores de desregulação endócrina e contaminação por metais (Vitelogenina, Proteínas de zona radiata, Receptores de estrógeno  $\alpha$  e  $\beta$  e Metalotioneína). Os resultados mostraram que os animais expostos aos contaminantes podem apresentar níveis de estradiol alterados e variações na expressão de vitelogenina, proteína de zona radiata e metalotioneína, quando comparados aos animais controles. Além disso, diversas alterações morfológicas em baço, fígado e gônadas foram descritas para cada tratamento. Os dados do presente estudo mostram de forma pioneira a desregulação endócrina em *Prochilodus argenteus* na bacia do rio São Francisco, além de alertarem sobre o consumo de animais contaminados com compostos estrogênicos e metais pesados.

**Palavras-chave:** Xenoestrógenos, desregulação endócrina, gametogênese, biomarcadores

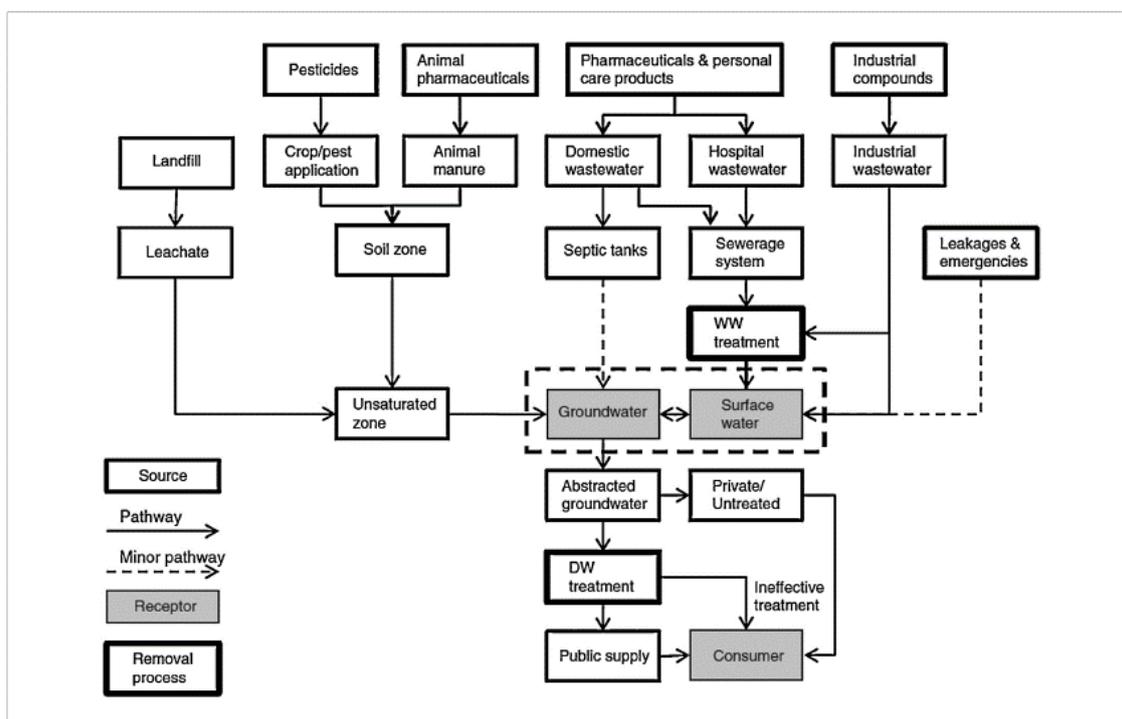
## ABSTRACT

Fish reproduction, as in other vertebrates, is controlled by the hypothalamic-pituitary-gonadal (HPG) axis. Adequate environmental conditions serve as a "trigger", leading to the release of gonadotrophin releasing hormone (GnRH) acting on the ovaries and testes and then stimulating gonadal maturation and estrogen production as: 17 $\beta$ -estradiol (E2), Testosterone (T), and 11-Ketotestosterone (11-KT). The entry of toxic components into aquatic environments is often related to the generation and disposal of waste from anthropogenic activities. Many of these components, also known as Endocrine Disrupting Chemicals (EDCs), can act in the endocrine system of animals compromising the hormonal synthesis and consequently the reproductive fitness of several species of vertebrates. In order to compare the estrogenic effects of EDCs on neotropical freshwater fish, two types of studies were conducted: (1) a study conducted in a natural environment, where data on the reproduction of commercially important species *Prochilodus argenteus*; (2) a study conducted under experimental conditions, where adults of *Astyanax bimaculatus* were exposed for 15 days at the same dosage (10 $\mu$ g/L) of two estrogenic compounds and the mixture of them, in order to comparatively analyze their estrogenic capacity. In both studies, we obtained the morphometric variables of all analyzed fish, such as: total length; body weight, liver weight, gonadal weight, and sex. In addition, the biological indices were calculated and the variations in the levels of estradiol and biomarkers of endocrine disruption and contamination by metals (Vitelogenina, Zona radiata proteins, Estrogen receptors  $\alpha$  and  $\beta$  and Metallothionein) were analyzed. The results showed that the animals exposed to contaminants may present altered estradiol levels and variations in the expression of vitellogenin, Zona radiata proteins and metallothionein, when compared to control animals. In addition, several morphological changes in spleen, liver and gonads were described for each treatment. The data of the present study show the endocrine disruption in *Prochilodus argenteus* in the São Francisco river basin in a pioneering way, and alerts on the consumption of animals contaminated with estrogenic compounds.

**Keywords:** Xenoestrogens, endocrine disruption, gametogenesis, biomarkers

## 1. INTRODUÇÃO GERAL

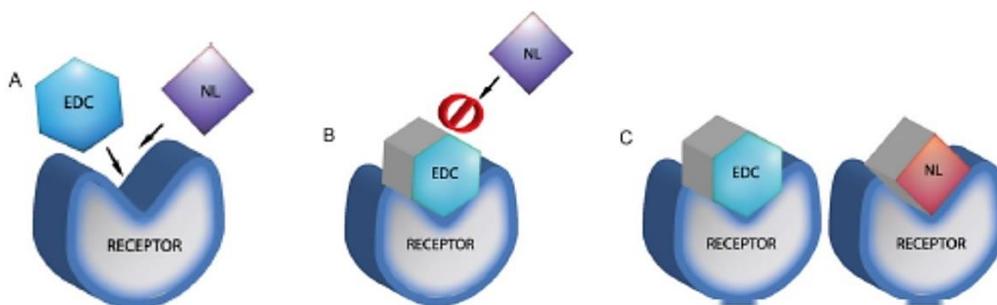
Nas últimas décadas a crescente demanda por recursos energéticos pela população mundial promoveu um aumento significativo nos efluentes gerados na produção e consumo desses recursos. A falta ou o tratamento indevido desses efluentes provenientes de processos industriais, atividades rurais e centros urbanos, têm carreado e mantido nos corpos d'água diversos componentes nocivos aos organismos vivos direta ou indiretamente (Figura 1) (Hachfi et al., 2012; Hu et al., 2005; Schwarzenbach et al., 2006). No Brasil, cerca de 45% dos municípios não possuem nenhuma forma de coleta e tratamento de seus efluentes (IBGE, 2010), os quais são despejados *in natura* no meio ambiente onde serão direcionados finalmente aos corpos d'água superficiais ou subterrâneos.



**Figura 1** - Esquema resumido das vias de alguns poluentes desde a sua fonte até a destinação final (adaptado de Stuart et al., 2012)

Dentre os principais poluentes registrados em ambientes aquáticos, incluem-se pesticidas, metais pesados, hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (PAHs), bifenila

policlorada (PCB), produtos de cuidados pessoais (PCPs), produtos farmacêuticos e industriais (Almeida & Ribeiro, 2014; Overturf et al., 2015). Muitos desses compostos podem causar efeitos neurotóxicos, genotóxicos e até mesmo mutagênicos, porém uma característica comum entre eles é que também podem ser classificados como desreguladores endócrinos ou “Endocrine Disrupting Chemicals” (EDCs). Esses poluentes possuem a capacidade de causar distúrbios hormonais e consequentemente alterações em diversos processos fisiológicos que possuem mecanismos influenciados por hormônios (Hutchinson et al., 2006; Schlumpf et al., 2004). Os EDCs atuam nos organismos em geral comprometendo a síntese e o metabolismo, mimetizando ou antagonizando os efeitos de hormônios endógenos (Figura 2). Além disso, influenciam também na síntese de receptores hormonais. De uma maneira geral, os EDCs podem atuar desde o nível molecular até um nível sistêmico (Silva et al. 2012a; Yan et al. 2012; Dzieweczynski & Hebert 2013).

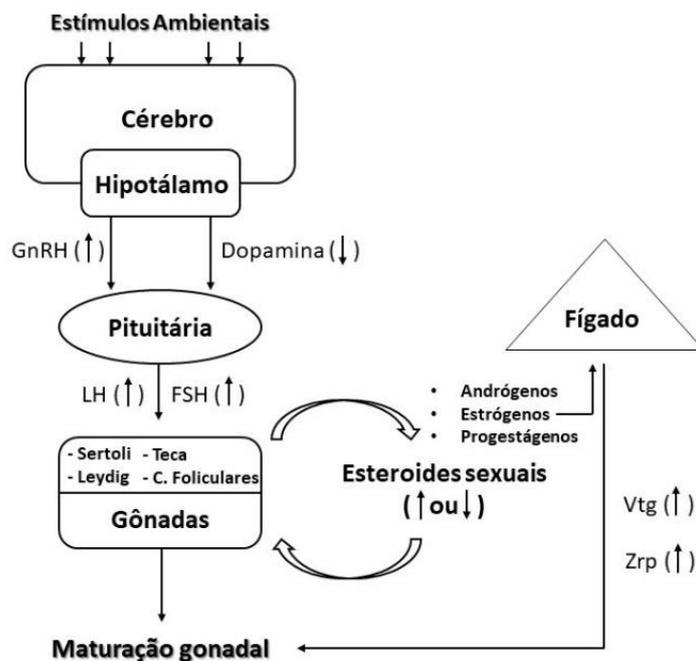


**Figura 2** - Interação entre alguns desreguladores endócrinos (EDC) e ligantes naturais (NL) com receptores. (A) EDC competindo com o ligante pelo sítio de ativação; (B) EDC ligado ao receptor causando efeitos contrários ou alterando as respostas genéticas; (C) atuação sinérgica entre EDC e ligante natural causando aumento da expressão genética (Rogers et al., 2013).

Os peixes representam a classe de vertebrados com maior diversidade, e o efeito de poluentes sobre as espécies desse grupo pode variar substancialmente, tanto de forma inter quanto de forma intraespecífica (Gray, 2002; Lewis et al., 2011). Fatores como

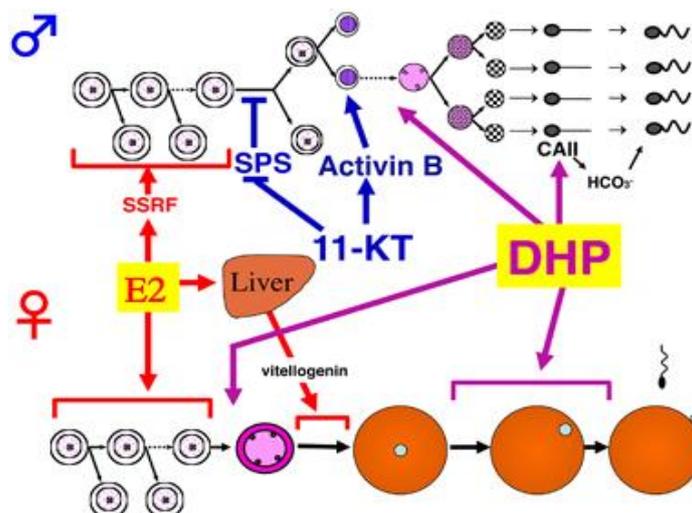
idade, sexo, tamanho corporal e status fisiológico, bem como as variáveis físico-químicas da água, podem modular a toxicidade de um mesmo composto. A ictiofauna é afetada por desreguladores endócrinos, não somente por estarem diretamente imersos em vários xenobióticos de forma crônica, mas também porque a reprodução e a diferenciação sexual podem ser afetadas por esses compostos (Francis, 1992; Kime, 1999; Leet et al., 2011). Diversos estudos conduzidos em laboratório e na natureza mostram que a exposição aos EDCs pode influenciar negativamente no desenvolvimento, reprodução e no comportamento de peixes (Fenske et al., 2005; Scholz and Klüver, 2009; Weber et al., 2017). Níveis plasmáticos elevados de vitelogenina, alterações no desenvolvimento gonadal, intersexo e redução nos índices de fecundidade e fertilidade, estão entre os efeitos mais comuns relatados na literatura (Brian et al., 2007; Luzio et al., 2016; Prado et al., 2011).

A reprodução de peixes, assim como a de outros vertebrados, é controlada intrinsecamente pelo eixo Hipotalâmico-hipofisário(pituitário)-gonadal (HPG), porém fatores extrínsecos são importantes nesse grupo. Condições ambientais propícias (Ex: temperatura, pH, pluviosidade, turbidez, dentre outros) servem como “gatilhos” cerebrais, estimulando o hipotálamo a liberar o hormônio liberador de gonadotrofinas (GnRH) na adenohipófise (pituitária) estimulando a produção e secreção dos hormônios luteinizante (LH) e folículo-estimulante (FSH). Essas gonadotrofinas atuam nos ovários e testículos estimulando a maturação gonadal e a produção de esteroides importantes no processo reprodutivo, como: 17 $\beta$ -estradiol (E2), Testosterona (T), 11-Ketotestosterona (11-KT) e esteroides indutores da maturação (MIS) (Figuras 3 e 4) (Arantes et al., 2010; Nagahama & Yamashita, 2008; Okuzawa et al., 2003; Paschoalini et al., 2013; Themmen & Huhtaniemi, 2000).



**Figura 3** - Esquema simplificado da regulação hormonal no eixo Hipotalâmico-Pituitário-Gonadal (HPG) em teleósteos. GnRH = Hormônio liberador de gonadotrofina; LH = Hormônio luteinizante; FSH = Hormônio folículo estimulante; Vtg = Vitelogenina; Zrp = Proteínas de zona radiata.

Para que os esteroides sexuais atuem nas células da linhagem germinativa de teleósteos, é necessário a ativação dos receptores de esteroides, que podem estar localizados no núcleo, citoplasma ou na membrana plasmática. Esses receptores são divididos em três classes: receptores de estrógeno (ERs), receptores de andrógeno (ARs) e receptores de progesterona (PgRs), e o mecanismo de ação dos hormônios sexuais dependem da ativação desses receptores. Essa ativação pode ocorrer pela via clássica (genômica) alterando a transcrição dos genes alvo ou através da ativação de receptores de membrana acoplados à proteína G (ativação de mensageiros secundários - cAMP) (Beato et al., 1996; Thomas, 2012; Wendler et al., 2012). Os desreguladores endócrinos podem atuar em diversas etapas deste eixo de produção e sinalização hormonal, alterando o padrão reprodutivo de espécies e podendo levar ao colapso de populações inteiras de peixes (Kidd et al., 2007).



**Figura 4** - Esquema resumido dos principais esteroides atuantes na gametogênese de teleostes e seus possíveis mecanismos de controle na espermatogênese e ovogênese. SPS- Substância de prevenção a espermatogênese; SSRF- Fator de renovação de espermatogônias tronco; E2- Estradiol; 11-KT- 11-Ketotestosterona; DHP- 17 $\alpha$ -20 $\beta$ -dihidroxi-4-pregnen-3-ona. (Miura e Miura, 2011)

Nas últimas décadas foram observados diversos avanços no conhecimento sobre a desregulação endócrina em peixes de água doce, porém a maioria dos estudos utilizando espécies modelos como *Danio rerio*, *Pimephales promelas* e *Oryzias latipes*. Apesar de grande diversidade de peixes encontrada na região neotropical, a utilização de espécies nativas desta região em abordagens toxicológicas foi negligenciada durante muitos anos (Martins and Bianchini, 2011).

Os Characiformes representam a ordem de peixes mais dominante em toda região Neotropical, e espécies dos gêneros *Prochilodus* e *Astyanax* estão amplamente distribuídas nas bacias hidrográficas da América do Sul (Reis et al., 2003). Representantes desses gêneros possuem grande importância econômica para a região onde ocorrem, uma vez que são apreciados para o consumo, pesca esportiva e aquicultura (Baldisserotto and Gomes, 2005; Franco de Camargo and Petrere Jr, 2001). Algumas espécies de *Prochilodus* e *Astyanax* já foram caracterizadas como bioindicadoras de ambientes poluídos e apropriadas para estudos ecotoxicológicos,

porém abordagens relacionadas a desreguladores endócrinos utilizando essas espécies ainda são raras (Prado et al., 2014, 2011; Schulz and Martins-Junior, 2001; Troncoso et al., 2012).

Estudos com abordagens morfofisiológicas são reconhecidos como importante ferramenta em diversas aplicações, e têm contribuído para o desenvolvimento das pesquisas relacionadas à influência de EDCs sobre a reprodução de peixes (Hutchinson et al. 2006; USEPA *et al.*, 2007). Além disso, a descrição dos mecanismos de ação dos diferentes compostos xenobióticos em diferentes espécies nativas, bem como a comparação do potencial estrogênico entre as substâncias mais comuns encontradas em efluentes, podem fornecer informações importantes às autoridades regulatórias, permitindo assim o estabelecimento preciso dos limites legais de cada xenobiótico e para cada região especificamente. Portanto, diante da ampla distribuição territorial, além da relevância econômica e ambiental das espécies, o presente estudo visa caracterizar a influência de diferentes xenoestrógenos em duas espécies neotropicais, através da avaliação de parâmetros morfométricos, histopatológicos e moleculares.

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1 Objetivo geral**

Analisar a desregulação endócrina e avaliar o potencial estrogênico de metais pesados, estrona (E1) e Bisfenol-A (BPA), por meio de biomarcadores e parâmetros morfofisiológicas em gônadas, fígado e baço de *Prochilodus argenteus* e *Astyanax bimaculatus* em condições naturais e de cultivo.

### **2.2 Objetivos específicos**

*2.2.1 Para avaliar o potencial estrogênico de metais pesados:*

- Detectar e quantificar as principais alterações histopatológicas em gônadas, fígado e baço;
- Calcular os índices gonodassomático (IGS), hepatossomático (IHS) e o fator de condição de Fulton (K) para machos e fêmeas;
- Comparar os valores de IGS, IHS e K entre os rios;
- Avaliar as alterações na expressão de Vitelogenina (*Vtg*), proteínas de zona radiata (*Zrp*) e Metalotioneína (MTs) em fígado de fêmeas e machos;
- Dosar a concentração de metais pesados (Alumínio, Chumbo, Cobre, Cromo, Cádmio, Ferro e Zinco) em fígado e músculo dos peixes;
- Quantificar a porcentagem de folículos vitelogênicos e atrésicos em fêmeas, espermatogônias, espermatócitos, espermatídes e espermatozoides em machos;
- Relacionar alterações reprodutivas e condições de saúde dos peixes com as concentrações de metais pesados.

### *2.2.2 Para avaliar o potencial estrogênico de Estrona (E1) e Bisfenol-A (BPA):*

- Detectar e quantificar as principais alterações morfofisiológicas em gônadas e fígado nos diferentes tratamentos;
- Calcular e comparar os índices gonadossomático (IGS), hepatossomático (IHS) e o fator de condição de Fulton (K);
- Determinar a concentração hepática de  $17\beta$ -estradiol (E2) nos machos;
- Localizar e quantificar a expressão de Vitelogenina (*Vtg*), Proteínas de zona radiata (*Zrp*) e receptores de estrógenos ( $ER\alpha$  e  $ER\beta$ ) em fígado de machos;
- Quantificar a porcentagem de células da linhagem espermatogênica e compará-las entre os diferentes tratamentos;

- Relacionar alterações reprodutivas e condições de saúde dos peixes com as concentrações dos xenoestrógenos analisados;

### **3. CAPÍTULO I**

**Heavy metals accumulation and endocrine disruption in *Prochilodus argenteus*  
from a polluted neotropical river**

**(publicado em 2019 - Ecotoxicology and environmental safety)**



## Heavy metals accumulation and endocrine disruption in *Prochilodus argenteus* from a polluted neotropical river



A.L. Paschoalini<sup>a</sup>, L.A. Savassi<sup>a</sup>, F.P. Arantes<sup>b</sup>, E. Rizzo<sup>a</sup>, N. Bazzoli<sup>b,\*</sup>

<sup>a</sup> Morphology department, Biological Sciences Institute, Federal University of Minas Gerais, UFMG, Belo Horizonte 30161-970, Minas Gerais, Brazil

<sup>b</sup> Post-Graduate Program in Vertebrate Biology, Pontifical Catholic University of Minas Gerais, PUC Minas, Belo Horizonte 30535-610, Minas Gerais, Brazil

### ARTICLE INFO

#### Keywords:

Endocrine disrupters  
Histopathology  
Gametogenesis  
Biomarkers  
Fish reproduction

### ABSTRACT

Heavy metals are considered major pollutants of aquatic environments due to the difficulty of metabolization and the bioaccumulative potential in tissues of aquatic organisms, especially fish muscle that is often used as food worldwide. In addition to causing cell damage, some metals such as aluminium (Al), cadmium (Cd), copper (Cu), and lead (Pb) can act as endocrine disrupting chemicals in fish. The Paraopeba and Abaete Rivers are important tributaries of the upper São Francisco River basin, but the Paraopeba River receives, along its course, the discharge of many types of effluents that affect fish species, including widely consumed species such as *Prochilodus argenteus*. This study evaluated histological and molecular changes caused by chronic exposure to heavy metals in *P. argenteus* from the Paraopeba River and compared this to fish from the non-impacted Abaete River. Sampled fish from both rivers were used in histological analyses and immunohistochemical assays. The results showed increased incidence of histopathologies and changes in number and morphology of germine cells in both sexes. In addition, up-regulated expression of oestrogens-induced proteins in the liver of males were detected in polluted environment. All the alterations were related to the concentration of metals in water and fish. The high concentration of various metals observed in water and fish from Paraopeba River serves as an alert to the environmental and public health regulatory authorities.

### 1. Introduction

Aquatic environments are often exposed to many types of pollutants through inappropriate release of urban, industrial, or agricultural effluents. Toxic substances present in these residues may directly affect aquatic organisms and/or indirectly affect other organisms, such as humans, through the process of bioaccumulation (Fernandes et al., 2008; Subotić et al., 2013). Heavy metals are considered major pollutants of aquatic environments due to the difficulty of metabolization and the bioaccumulative potential in tissues of aquatic organisms (Ashraf, 2005; Fatima et al., 2015; Yohannes et al., 2013), especially in fish muscle that is often used as a food resource around the world (Bosch et al., 2016; Savassi et al., 2016). The accumulation of heavy metals can influence enzymatic and metabolic activity, causing biochemical and morphological alterations (Brraich and Jangu, 2015). Chronic exposure to metals increases the production of reactive oxygen species (ROS) such as hydrogen peroxide (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), superoxide radical (O<sub>2</sub><sup>-</sup>), and hydroxyl radical (OH<sup>-</sup>), leading to oxidative stress and finally cell death (Atli and Canli, 2010; Mittler, 2002).

In addition to causing cell damage, metals such as aluminium (Al),

cadmium (Cd), copper (Cu), and lead (Pb), are classified as metalloestrogens due to their ability to interfere in the action of oestrogenic hormones (Safe, 2003). In general, endocrine disrupting chemicals (EDCs) are components that can act in the endocrine system of organisms leading to three types of disturbance: (1) compromising the synthesis and metabolism of endogenous hormones, (2) mimicking or antagonising hormonal effects, and (3) influencing the synthesis and action of their receptors (Chang et al., 2011; Le Guével et al., 2000; Sloman, 2007; Zheng et al., 2010). The action mechanism of oestrogens in cells is based on the interaction of oestrogen receptors (ERs) and natural ligand. When activated, ERs dimerize and bind to specific DNA sequences called oestrogen response elements (ERE) and start the transcription of target genes. Molecular interactions between oestrogens, ERs, and DNA have in common the important participation of zinc-fingers motifs in processes such as ER dimerization and binding with DNA. These motifs have cysteine and histidine with high affinity for metals, and studies have shown that metals are capable of binding at these motifs and disturbing the binding capacity of some transcription factors with DNA (e.g. Sp-1, Egr-1, and TFIIA) (Razmiafshari et al., 2001; Reddy and Zawia, 2000; Zawia et al., 1998). Metalloestrogens are

\* Corresponding author.

E-mail address: [bazzoli@pucminas.br](mailto:bazzoli@pucminas.br) (N. Bazzoli).

<https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2018.11.047>

Received 14 June 2018; Received in revised form 21 September 2018; Accepted 11 November 2018  
0147-6513/ © 2018 Elsevier Inc. All rights reserved.

also capable of blocking or decreasing the binding of endogenous oestrogens to their receptors and acting as agonists through interaction at ligand bind domains in ERs. (Darbre, 2006). Furthermore, Martin et al. (2003) showed that metals such as chromium, cobalt, copper, lead, mercury, and nickel can dissociate 17 $\beta$ -oestradiol from an oestrogen receptor (ER $\alpha$ ).

Another molecular influence of heavy metals is in the synthesis of metallothioneins (MTs) (Chan, 1995; Dong et al., 2015). Metallothioneins are low molecular weight proteins (6–8 kDa), rich in cysteine and important in homeostasis of essential metals for cellular machinery, as well as in detoxification of non-essential metals (Carpenè et al., 2007; Viarengo et al., 2000). For example, MTs are responsible for maintaining the zinc balance, an important metal for gametogenesis in fish (Dong et al., 2015; Kime, 1999). Due to their high affinity to metal ions, metallothioneins are widely used as biomarkers for aquatic environments contaminated by heavy metals (Le et al., 2016; Wang and Rainbow, 2010).

Many biomarkers are used in studies on the influence of EDCs in fish, and among them, vitellogenin (Vtg) is one of the most common in studies with xenoestrogens (Jones et al., 2000; Marin and Matozzo, 2004; Matozzo et al., 2008). Vitellogenin is the main protein in yolk formation of oviparous vertebrates, and is synthesised through the interaction between 17 $\beta$ -oestradiol and oestrogen receptors (ERs) in hepatocytes (Murphy et al., 2005; Nagler et al., 2010; Wallace, 1985). Like Vtg, zona radiata protein (Zrp) is also influenced by the action of oestrogens in the liver. In fish, the zona radiata is responsible for the protection of oocyte contents and assists in blocking of polyspermy after fertilisation (Arukwe et al., 2002). Normally, expression of Vtg and Zrp are up-regulated only in adult females during gonadal maturation, but the high expression of these proteins in males is considered an indicator of contamination by oestrogenic substances (Goksøyr, 2006; Goksøyr and Male, 2006; Truman and van den Hurk, 2012). Tilton et al. (2003), studying adult medaka, *Oryzias latipes*, exposed to cadmium (Cd) showed disturbances to several reproductive aspects such as alterations in the expression of vitellogenin (Vtg) and oestrogen receptors (ERs) in the liver and changes to the gonadosomatic index (GSI). In *Heteropneustes fossilis*, lead (Pb) stimulated or inhibited the production of sex steroids, depending on its concentration in water (Chaube et al., 2010).

Emission regulation of toxic substances in Brazil is the responsibility of the National Council of Environment (Conama, 2005) and state environmental agencies. However, the criteria used to define the maximum values for each pollutant in the aquatic environment are based on legislation of agencies from temperate climate countries, such as United States Environmental Protection Agency (EPA) and European Environment Agency (EEA). Consequently, maximum permissible values of various contaminants may be underestimated or overestimated for tropical fish species (Martins and Bianchini, 2011). Differences in the physicochemical parameters of water can modulate the toxicity of some pollutants, especially heavy metals. Camargo et al. (2009) showed that the toxicity of aluminium in fish can be altered according to pH variation. Furthermore, the influence of temperature on metal toxicity was observed by Siscar et al. (2014), who showed that an elevation of 5 °C in the water temperature was responsible for an increase in concentration of metals in the kidneys and livers of fish.

The São Francisco River basin is one of the most important in Brazil, draining areas in five states that cover 645,000 km<sup>2</sup>. The Paraopeba and Abaete Rivers are important tributaries of the upper São Francisco River and are responsible for the maintenance of fish stocks of several species (Arantes et al., 2010, 2011; Domingos et al., 2013). Although the Paraopeba River is considered a priority area for conservation due to its high richness and diversity of fish (Drummond et al., 2005), this river receives along its course the discharge of effluents from mining, tanneries, power plants, and urban/rural wastewater, affecting commercial species especially (Arantes et al., 2016; Savassi et al., 2016). In contrast, recent studies have shown that the Abaete River has a low toxic status, contributing positively to the reproductive success of fish in the São

Francisco River basin (Arantes et al., 2010; Procópio et al., 2014; Sato et al., 2005).

The *Prochilodus* fish have detritivorous/iliophagous habits and feed on residues in the substrate of rivers. In addition to exposure through the gills, these species are also exposed to heavy metals through their feeding habits, since sediments may show high concentrations of heavy metals (Islam et al., 2015). For this reason, these species are considered suitable bioindicators for the simultaneous evaluation of contamination in the water column and the sediments (Almeida et al., 2005; Camargo et al., 2009; Camargo and Martinez, 2006; Santos et al., 2005). *Prochilodus argenteus* is an endemic, large, and very important commercial fish in the whole São Francisco River basin, and 50% of all captured fish in this basin are this species (Sato and Godinho, 2003). Due to the ecological importance of the rivers and the lack of studies related to the influence of heavy metals in endocrine disruption of *Prochilodus argenteus*, we evaluated for the first time the molecular changes caused by chronic exposure to heavy metals in an important commercial fish from the Paraopeba River and compared it to fish from the non-impacted Abaete River.

## 2. Methods

### 2.1. Sampling

Fish sampling was performed during the reproductive season of *P. argenteus* in November and December of 2010 and 2011 in two rivers of the São Francisco River basin, south-eastern Brazil: (1) Abaeté River (ABR) – reference site, near to its confluence with the São Francisco River (18°30.00'S, 45°12'57.18"W) and (2) Paraopeba River (PBR) – polluted site, near to its confluence with the Betim River (19°57'50.24"S, 44°16'52.42"W). A total of 34 adult *Prochilodus argenteus* were collected, 9 females and 8 males from the ABR and 10 females and 7 males from the PBR, totalling 17 specimens from each sampling site. The fish were caught with gill nets and cast nets and were euthanized using a lethal concentration of Eugenol (200 mg/l). For all fish, we recorded biometric data, such as total length (TL), body weight (BW), liver weight (LW), gonad weight (GW), sex, and gonadal maturation stages. All the procedures were executed following the ethical principles established by the Brazilian College of Animal Experimentation (COBEA) and the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA). The study was approved by the Ethics Committee on Animal Use of Pontifical Catholic University of Minas Gerais, Brazil (CEUA - PUC Minas, Protocol 021/2015).

### 2.2. Water parameters

The water quality data of the sampling sites were obtained from MG Institute of Water management (IGAM, 2011, 2012), which has monitoring points coincident with those of the fish sampling locations in the present study. The raw data obtained from IGAM are available for public consultation and were used in the present study as parameters of water quality for the two rivers (Supplementary material 1).

### 2.3. Biological indices

To detect differences in the weight of gonads and liver related to body weight, the gonadosomatic index (GSI = (GW/BW) x 100) and the hepatosomatic index (HSI = (LW/BW) x 100) were calculated. Only ripe males and females were selected for calculating the gonadosomatic index due to the great change of gonadal weight during maturation. The Fulton's condition factor ( $K = 100 \text{ BW}/\text{TL}^3$ ) was also calculated to compare the health status of the males and females between rivers.

### 2.4. Heavy metals quantification

Fragments of liver and muscle were extracted and stored at – 20 °C.

For determination of aluminium (Al), cadmium (Cd), zinc (Zn), lead (Pb), chromium (Cr), copper (Cu), and iron (Fe) concentrations, fragments of liver and muscle were submitted to acid digestion in StartD microwave (Milestone) with controlled temperature heating. Approximately 1.5 g in triplicate were weighed and placed in PTFE-TFM pumps with 20 ml of nitric acid (65% HNO<sub>3</sub>) and digested for 25 min at a temperature of 220 °C. After digestion, samples and blank solutions were determined by an AA-680 Shimadzu (Kyoto, Japan) flame atomic absorption spectrometer (FAAS) in an air-acetylene flame, according to the user's manual, provided by the manufacturer. Pyrolytic graphite tubes were used, and signals were measured at a peak height. To assure the analytical quality of the results and validation of the method, the certified standard fish protein DORM 2 (fish protein certified reference material for trace metals, Canada) was analysed along with the samples and the recovery percentage was 95–105%.

### 2.5. Histology, histochemistry and immunohistochemistry

Samples of livers, spleens, and gonads were fixed in Bouin's fluid, embedded in paraffin, sectioned at 5 µm thickness, and stained with haematoxylin-eosin (HE) and Gomori trichrome (GT) for histology. Some sections passed through Perls' histochemical reaction (Luna, 1960). This technique enables the identification of melano-macrophage centres (MMCs) pigment granules, such as melanin (black), hemosiderin (blue), and lipofuscin (yellow-brown) (Blazer, 2002).

For the immunohistochemistry reactions for Vitellogenin (Vtg) (polyclonal rabbit anti-salmon VTG, 1:200, Biosense), zona radiata proteins (Zrp) (polyclonal rabbit anti-salmon ZRP, 1:200, Biosense), and metallothionein (MT) (polyclonal rabbit anti-cod MT, 1:50, Biosense), liver sections were washed in water for 60 min followed by antigen retrieval in citrate buffer (pH 6.0) for 30 min in a water bath at 60 °C. Next, the sections were incubated with 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> to inactivate endogenous peroxidase. For permeabilization and to block unspecific staining, blocking buffer was used (2% bovine serum albumin + 0.05% Triton X-100 + 0.01% Tween 20). Primary antibodies (Vtg, Zrp, and MT) were applied to the sections overnight in a humidified chamber at 4 °C. For immunoperoxidase, the sections were labelled with 3'3'-diaminobenzidine (DAB) and counterstained with haematoxylin. For immunofluorescence, the sections were incubated with secondary antibody ALEXA 488 (goat anti-rabbit IgG, 1:200, A11034, Life Technologies, Carlsbad, CA, USA). For the negative control, the treatments with primary antibody were omitted. Fluorescence images were obtained using a 510 META Laser Scanning Confocal Microscope (Zeiss, Oberkochen, Germany) and processed with Image J software.

### 2.6. Quantification of histopathology, volumetric proportion of germ cells, and follicular diameter

To compare the incidence of liver and spleen histopathology between the sampled rivers, 13 slides of fish from each river were selected. For each slide, 5 fields were randomly chosen at 10X magnification and quantification was performed using a 494-intersite grid (26 × 19-point grid) in Image J software, which gave a total of 260 fields analysed considering both organs and both sites (65 of the livers and 65 spleens from each sampling sites). The following parameters were quantified: parenchyma area, melano-macrophage centres (MMCs), blood vessels, and fibrosis.

In the same way, 5 slides per river (and 5 fields per slide) of males in advanced maturation stage from each river were selected to assess the proportion (%) of germ cells. To assess the follicular diameter in ripe females, 5 slides per river (and 5 fields per slide) were selected and the measurement was performed using a light microscope coupled to Axiovision 4.8 software.

The follicular atresia index (FAI) was determined by the proportion of atretic vitellogenic follicles (AO) in relation to the total number of vitellogenic follicles (VO) (FAI = VO/AOx100). The parameters used to

define a follicular atresia were: the fragmentation of the zona pellucida, yolk liquefaction, and hypertrophied follicular cells.

### 2.7. Quantification of immunohistochemistry reactions

Metallothionein, vitellogenin and zona radiata proteins labelled with peroxidase were quantified using the plugin "IHC toolbox" for Image J software (NIH) (Gupta et al., 2007). In summary, the colour-picker function was used to manually identify the most darkly-brown (DAB) stained region of interest (positive reactions). The selected regions were feathered and adjusted in threshold tool to remove background and isolate only labelled regions. Finally, the images were transformed into binary images and subsequently analysed in Image J. The results are expressed as percentage of area marked (positive reactions) in relation to the total field. For each biomarker, 5 slides per river and 5 fields per slide were randomly chosen at 100X magnification, giving a total of 50 (25 from ABR and 25 from PBR) fields analysed.

### 2.8. Statistical analysis

Statistical analyses were performed using GraphPad Prism software version 5.0 for Windows (GraphPad Software, San Diego, California, USA, [www.graphpad.com](http://www.graphpad.com)). Values are expressed as means ± standard error (SE), and the results were considered significant at a 95% confidence interval (p < 0.05). As the biological data and metals concentrations did not show a normal distribution, they were analysed using the nonparametric Kruskal-Wallis (followed by Dunn's post-test) and Mann-Whitney (Wilcoxon Rank-sum test) tests.

## 3. Results

### 3.1. Biometric data of fish samples

The TL and BW values ranged between 38 and 56 cm (41.5 ± 1.5 cm in ABR and 47.1 ± 3.1 cm in PBR) and 800–2600 g (992.2 ± 136.0 g in ABR and 1535.8 ± 323.76 g in PBR), respectively, but no statistical difference between them was observed. Additionally, analysis of the HSI showed higher values in the Abaete River, but without significance. GSI comparison between ABR and PBR revealed a significant difference only among males, where a significant reduction was observed in testes of *P. argenteus* from the Paraopeba River. In addition, the Fulton's condition factor (K) did not show a significant difference among females, but PBR males exhibited statistically higher values (Supplementary Material 2).

### 3.2. Heavy metals concentration in water and tissues

The concentrations of heavy metals measured in the livers and muscles of the fish sampled in present study agree the water quality data provided by IGAM. At the reference site, ABR, metals such as Al, Cd, Pb, Cu, and Zn had concentrations within safe limits, only Cr showed high concentration in the livers and muscles. However, in the Paraopeba River all metal concentrations were above the limits in at least one of the tissues. Average concentrations of Pb, Cr, Cu, and Fe presented values more than 10-fold greater than safe limits, especially cadmium that showed an average concentration 27-fold higher. Aluminium does not have a maximum permitted value for tissues defined by the reference agencies; however, our data show that in PBR this metal also presented higher concentrations compared to ABR (Table 1).

### 3.3. Histological assessment

#### 3.3.1. Liver and spleen histology

Histologically, the liver sections from fish sampled in ABR exhibited a normal appearance, with the hepatocytes presenting a uniform

**Table 1**  
Metals concentration in ABR and PBR water, liver and muscle of *P. argenteus*, and the permissible limits from the different water and food safety guidelines. Results presented as mean  $\pm$  standard error (SE) and different letters show statistical difference between sites ( $P < 0.05$ ).

	Metals										References	
	Al	Cd	Pb	Cu	Cr	Fe	Zn					
<b>Abaete river - ABR</b>												
Water	0.01 $\pm$ 0.005	ND	ND	ND	ND	0.1 $\pm$ 0.05	0.005 $\pm$ 0.001				IGAM (2011, 2012)	
Liver	36.36 $\pm$ 19.22	0.04 $\pm$ 0.02	0.29 $\pm$ 0.17	28.74 $\pm$ 20.8	1.83 $\pm$ 0.65	135.34 $\pm$ 126.99	10.98 $\pm$ 4.69				Present study	
Muscle	3.39 $\pm$ 0.87	0.0014 $\pm$ 0.001	0.26 $\pm$ 0.19	8.16 $\pm$ 1.58	1.88 $\pm$ 0.83	18.88 $\pm$ 5.12	10.96 $\pm$ 2.51				Present study	
<b>Paraopeba river - PBR</b>												
Water	0.2 $\pm$ 0.05	ND	0.002 $\pm$ 0.001	ND	0.04 $\pm$ 0.01	1.32 $\pm$ 0.05	0.07 $\pm$ 0.01				IGAM (2011, 2012)	
Liver	60.10 $\pm$ 17.45	1.38 $\pm$ 0.47	3.25 $\pm$ 1.26	440.14 $\pm$ 119.24	4.01 $\pm$ 1.19	3411.32 $\pm$ 2891.5	63.57 $\pm$ 21.27				Present study	
Muscle	22.65 $\pm$ 12.57	0.19 $\pm$ 0.27	1.24 $\pm$ 0.49	84.75 $\pm$ 72.9	2.93 $\pm$ 0.86	318.43 $\pm$ 116.73	19.4 $\pm$ 7.3				Present study	
<b>Water limits (mg/ml)</b>	0.1	0.001	0.01	0.009	0.05	0.3	0.18				Conama (2005)	
<b>Tissue limits (mg/Kg)</b>	0.087	0.00009	0.001	0.002	0.001	0.3	0.03				Candian Council Of Ministers Of The Environment (2011)	
		0.00072	0.002		0.011	1.0	0.12				US Environmental Protection Agency USEPA (2017)	
		0.05	0.3								Agência Nacional de Vigilância Sanitária ANVISA (2013)	
		0.05	0.2	30							FAO/WHO FAO/World Health Organisation (2002)	
		1.00		30	0.1	109	50				Decreto 55871 (1965)	

ND = Not detected

cytoplasm, vesicular, and spherical nucleus. Hepatocytes of *P. argenteus* in ABR were arranged in cords between conspicuous sinusoidal capillaries (Fig. 1-A). Livers from PBR showed circulatory changes, such as dilatation and congestion of sinusoids and a massive presence of melano-macrophage centres of different sizes that were associated with blood vessels (Fig. 1-B). Liver samples from the two rivers stained by PERL's reaction showed melano-macrophagic centres with the same lipofuscin and hemosiderin granule-content (Figs. 1-C and 1-D).

Spleen analysis showed the same pattern as observed in the livers. Samples from ABR had a normal splenic appearance with a well-defined red and white pulp, few small MMCs, and inconspicuous sinusoidal and ellipsoidal capillaries (Fig. 1-E). In PBR, the spleen sections showed a higher number of MMCs, sinusoidal dilatation, and fibrosis (Fig. 1-F). Unlike the livers, the content and format of the MMCs in spleen samples varied between rivers. In ABR, the melano-macrophagic centres presented rounded forms and contained lipofuscin and hemosiderin; however, in PBR, the MMCs presented polymorphic shapes containing lipofuscin and melanin granules (Figs. 1-G and 1-H).

In a quantitative analysis, some differences were observed in the morphological and histopathological parameters between ABR and PBR. Among the quantified parameters, it was observed that the livers from PBR exhibited a significant increase only in the number of melano-macrophagic centres (MMCs). In the spleen, significant variations were observed in all parameters compared between rivers, with the occurrence of fibrosis, number of blood vessels, and melano-macrophagic centres showing significant elevation. In addition, a reduction of 6% in parenchyma area was also observed in spleens from PBR (Supplementary Material 3).

### 3.3.2. Reproductive parameters

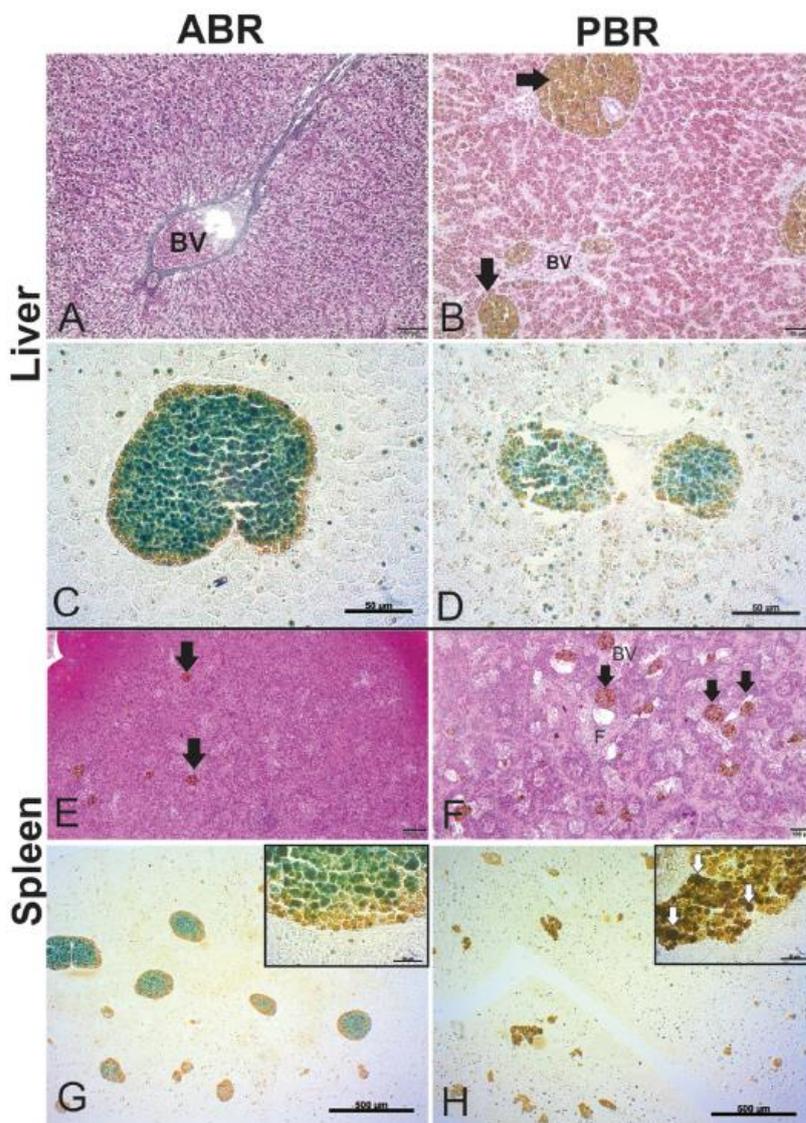
Testes from ABR showed a normal organisation of spermatocysts on the wall of seminiferous tubules and spermatozoa in the lumen (Fig. 2-A). In PBR, disorganised and degenerating spermatocysts as well as macrophagic aggregates were detected (Figs. 2-B to 2-E). Females from ABR also presented normal ovary morphology in the reproductive season, which is characterised by the predominance of vitellogenic oocytes containing acidophilic yolk granules, thick zona radiata, and squamous follicular cells (Fig. 2-F), and additionally, the presence of post-ovulatory follicles, indicating the release of vitellogenic oocytes was observed in females (Fig. 2-I). In the Paraopeba River, a higher incidence of atretic follicles was detected at different stages of development. Atresia is characterised by the fragmentation of the zona radiata, yolk liquefaction, and follicular cell hypertrophy (Fig. 2-G). In PBR, we also observed follicles with a disturbance in the yolk deposition and overripe oocytes (Figs. 2-H and 2-J).

### 3.3.3. Quantification of reproductive parameters

The quantified reproductive parameters in males and females of *P. argenteus* showed remarkable differences between the rivers. Ripe females from PBR presented smaller follicular diameters and higher follicular atresia index when compared to females from ABR ( $P < 0.05$ ). The mean FAI observed in PBR females was 27.5%, approximately 15-fold higher than that observed at the reference site-ABR, where the mean FAI was 1.8%. Regarding males, changes in the number of germline cells in the testes were observed in fish from PBR. The volumetric proportion of spermatogonia and spermatocytes increased, while spermatids and spermatozoa decreased significantly (Table 2).

### 3.4. Molecular alterations

Changes in expression of metallothionein, vitellogenin, and zona radiata proteins were detected and quantified by immunohistochemical assays. Metallothionein, a biomarker of environments contaminated with heavy metals, showed a higher expression in liver samples from PBR when compared to ABR. Positive reactions for MT were frequently seen associated with hepatocytes presenting vacuolization and/or



**Fig. 1.** Histopathology assessment of the livers and spleens of *P. lineatus* from the Abaeté (ABR) and Paraopeba (PBR) Rivers. (A) Liver from ABR showing a central blood vessel (BV) and cords of hepatocytes (HE, 10 ×); (B) Liver showing systemic dilated sinusoids and high incidence of melano-macrophage centres (black arrows) (HE, 10 ×); (C and D) Livers from ABR and PBR stained with PERL'S histochemical technique. In both, the composition of the MMCs was lipofuscin (brown) and hemosiderin (blue/green) (40 ×); (E) Spleen from ABR presenting few MMCs (black arrows); (F) Spleen from PBR with high incidence of MMCs (black arrows), dilated sinusoids, and fibrotic process (F) (HE, 4 ×); (G) Spleen from ABR stained with PERL'S histochemical technique showing lipofuscin and hemosiderin content (4 ×; insert = 100 ×); (H) PERL'S histochemical technique in the spleen of a fish from PBR showing lipofuscin and melanin (insert: white arrows) (5 ×; insert = 100 ×).

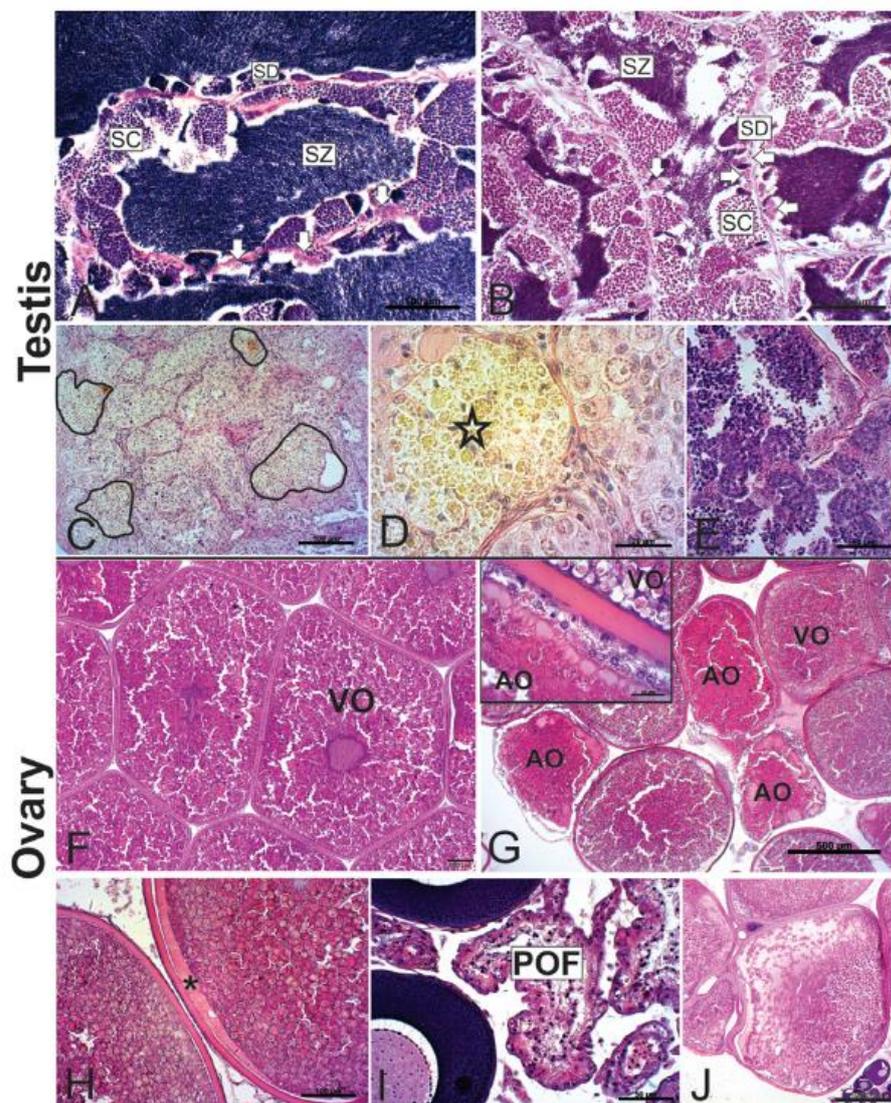
steatosis. The mean area with positive reactions/per field in ABR was  $0.55 \pm 0.08\%$  while in PBR, it was  $1.90 \pm 0.22\%$  ( $p < 0.05$ ) (Figs. 3 and 5).

Regarding the biomarkers for oestrogenic contamination, no expression of vitellogenin and zona radiata proteins were detected in ABR males, only in females. However, *P. argenteus* from the Paraopeba River presented marked variations in the expression of these biomarkers. PBR females showed higher means of *Vtg* and *Zrp* than in ABR, although they did not have statistical differences. In males from PBR, hepatic expression of *Vtg* and *Zrp* was similar to the expression detected in females and significantly higher than ABR males. Immunofluorescent localisation showed similar results to those observed for peroxidase, confirming the increased expression of these biomarkers in PBR males (Figs. 4 and 5).

#### 4. Discussion

The release of urban, industrial, and rural effluents into aquatic environments is an inherent challenge to human activity worldwide. In Brazil, most sewage produced in municipalities and from agricultural activities are often released *in natura* into aquatic environments, which

represents a threat to wildlife and humans (Brasil. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística - IBGE, 2010; Yanda and Madulu, 2005). The Paraopeba River, an important river in south-eastern Brazil, has a history of heavy metals contamination from tannery, pesticide, urban, and mining wastewaters (Veado et al., 2006). High concentrations of heavy metals in commercial fish from the Paraopeba River have been reported recently by Savassi et al. (2016) and Arantes et al. (2016), in which they showed histological alterations in several organs. In the same way, the results found in the present study indicate that the high levels of heavy metals observed in water and fish from PBR could affect the gonadal development of *P. argenteus*. According to IGAM and (, 2011, 2012), during the reproductive season of *P. argenteus*, the concentration of heavy metals in the water of the reference site, the Abaete River (ABR), remained within safe limits. These low metal concentrations were also observed in other studies performed in the same river, such as Procópio et al. (2014). In contrast, the Paraopeba River presented metal concentrations (Al, Pb, Cr, Fe, and Zn) in the water above the limits established by Brazilian laws (Conama, 2005) and by other regulatory agencies, such as the US Environmental Protection Agency (USEPA, 2017) and Canadian Council of Ministers of Environment (Canadian Council Of Ministers Of The Environment, 2011). This difference in the



**Fig. 2.** Histology analysis of gonads of *P. argenteus* from the Abaete and Paraopeba Rivers. (A and B) Testes from ABR and PBR, respectively, in same stage of maturation presenting variations in number of: spermatogonia (white arrows), spermatocytes (SC), spermatids (SD), and spermatozoa (SZ) in tubules (HE, 20 ×); (C and D) Testes from PBR presenting tubules in the process of degeneration (inside black lines and star)(HE, 20X and 100 ×); (E) Disorganisation in seminiferous tubules in fish from PBR (HE, 40 ×); (F) Ripe ovary from ABR with predominance of vitellogenic follicles (VO) (HE, 5 ×); (G) Ripe ovary of a female from PBR with high incidence of atretic follicles (AO) at different stages (HE, 5 ×). *Insert:* Vitellogenic follicle bordering atretic follicle. Note the fragmentation of zona radiata and follicular cell hypertrophy in AO (HE, 100 ×); (H) Overripe oocyte in PBR (\*) (HE, 20 ×); (I) Post-ovulatory follicle detected in females from ABR (HE, 40 ×) (J) Disturbance in the yolk deposition detected in PBR (HE, 5 ×).

toxic status was also noted in quantification of heavy metals in liver and fish muscle, where most of the metals measured were above the safe limits for fish from PBR. It is important to note that metals like Cd and Cu were not detected in the water samples, but in the liver and muscle these metals were far above the safe limits. This fact shows that measuring the concentrations of some pollutants only in water (i.e. heavy

metals) may reflect erroneous environmental diagnoses by public agents.

The biometric data of *P. argenteus* sampled in both rivers presented similar values, without statistical differences between body weight, total length, GSI of females, and hepatosomatic index. In addition, the values of physicochemical parameters of the water also did not

**Table 2**

Reproductive parameters of *P. argenteus* from the Abaeté (ABR) and Paraopeba (PBR) Rivers. Data is presented as mean and standard error (SE) and different letters mean statistical difference between sites ( $P < 0.05$ ).

	Abaete river (ABR)		Paraopeba river (PBR)	
	Mean ± SE	Range	Mean ± SE	Range
<i>Females</i>				
Follicular atresia Index (%)	1.8 ± 1.2 <sup>a</sup>	0.0–10.5	27.5 ± 8.5 <sup>b</sup>	0.0–73.0
Follicle diameter (µm)	980.3 ± 14.4 <sup>a</sup>	780.7–1132	848.8 ± 10.59 <sup>b</sup>	688.5–979.3
<i>Males</i>				
Spermatogonia (%)	1.82 ± 0.22 <sup>a</sup>	0.6–4.5	3.93 ± 0.64 <sup>b</sup>	2.3–10.5
Spermatocytes (%)	17.05 ± 1.14 <sup>a</sup>	6.3–30.4	22.88 ± 2.04 <sup>b</sup>	13.4–31.0
Spermatids (%)	6.11 ± 0.71 <sup>a</sup>	0.9–11.6	2.73 ± 0.49 <sup>b</sup>	0.0–6.0
Spermatozoa (%)	32.90 ± 1.83 <sup>a</sup>	23.0–47.7	19.96 ± 4.24 <sup>b</sup>	0.0–36.9

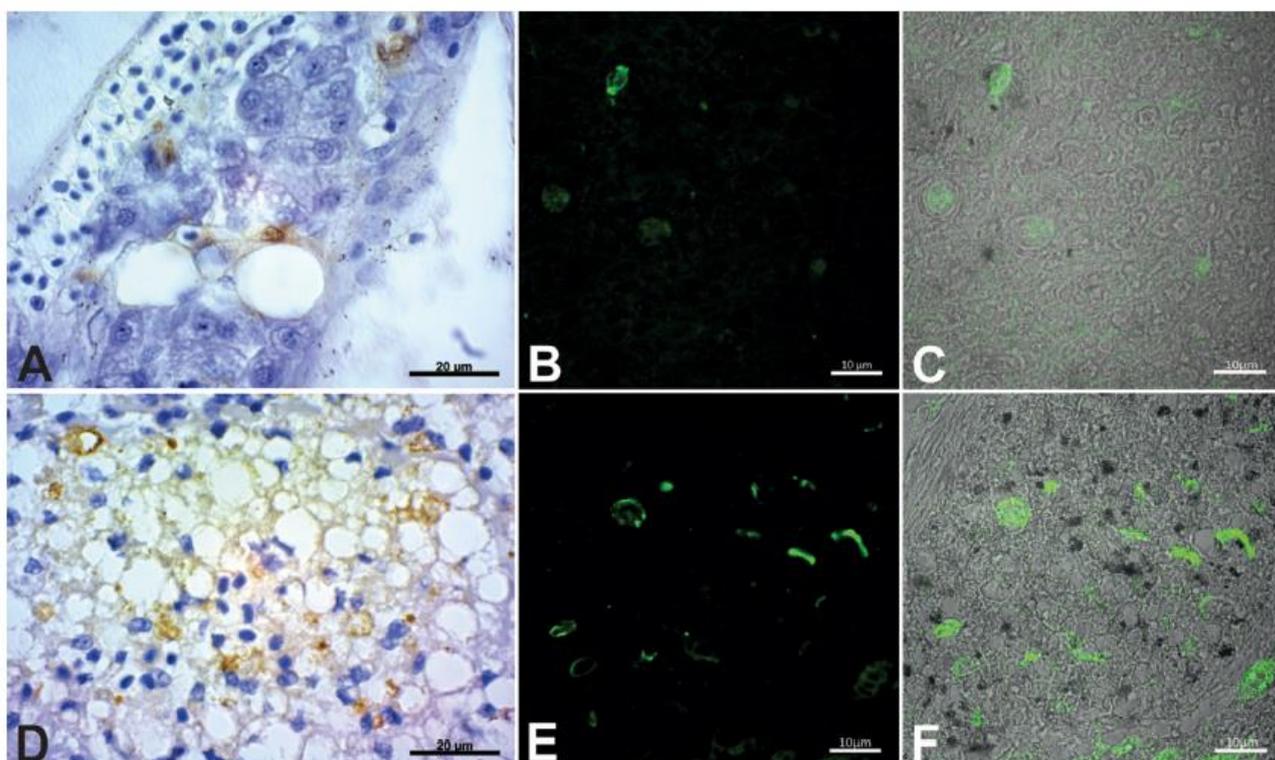


Fig. 3. Immunohistochemistry for metallothionein in livers of *P. argenteus*. (A) Few peroxidase positive reactions in a sample from ABR (100 ×); (B and C) immunofluorescence localisation of MT in a liver from ABR (B = dark field; C = merged layers – bright field/dark field) (63 ×); (D) = Immunoperoxidase localisation of MT in a liver from PBR with high incidence of positive reaction associated with hepatocytes in the process of steatosis (100 ×); (E and F) immunofluorescence localisation of MT in a sample from PBR (E = dark field; F = merged layers – bright field/dark field) (63 ×).

significantly vary the between rivers (IGAM, 2011, 2012). The standardisation of abiotic and morphological parameters in comparative toxicological studies results in more reliable data, since the capacity to metabolise toxins, and the occurrence of histopathologies in fish may be modulated by water temperature, pH, season, age, and body size (Al-Yousuf et al., 2000; Brown and George, 1985; Canli and Atli, 2003; Nakata et al., 1995; Polat et al., 2015; Sassi et al., 2010). Among the biological indices, only a significant reduction in GSI and an increase in Fulton's condition factor (K) in PBR males were observed. According to Hachfi et al. (2012), GSI is a simple way to evaluate testicular dysfunction, and decreased GSI is typically related to exposure to oestrogenic or anti-androgenic substances. The condition factor considers the weight-length relationship and in normal conditions, fishes present an increase in the K value during gonadal maturation and after reproduction this value decreases (Froese, 2006; Carvalho et al., 2009). Indeed, any substance that can alter the reproductive process, such as EDCs, can lead to biometric changes and consequently change the value of K, and our initial hypothesis was that fish would present lower values in a polluted environment, i.e. PBR; however, K values obtained for males in PBR were statistically higher than the reference site, ABR, a result also observed by other authors studying xenoestrogens such as Wolf and Wolfe (2005); Knäpen et al. (2009); Weber et al. (2017). In the same way, Adams et al. (1996), working on redbreast sunfish (*Lepomis auritus*), found an increase of condition factor in contaminated sites and a decrease of the visceral-somatic index, relating these effects to an increase in tissue fat storage. Despite the studies cited above, the influence of oestrogenic compounds on the K value is still controversial and future studies may elucidate this issue.

Environmental assessment through histopathological analyses is an important tool in the detection of physiological changes and determination of the health status of fish exposed to pollutants in a chronic or

acute way (Ayas et al., 2007; Camargo and Martinez, 2007; Costa et al., 2011). Considering the microscopic analyses, the comparison between the Paraopeba and Abaete Rivers showed that in the polluted environment there was a significant increase of macrophagic aggregates in the liver and spleen, reinforcing the reports of several authors about the effective use of MMCs as a biomarker of impacted environments (Agius and Roberts, 2003; Fishelson, 2006; Fournie et al., 2001; Troncoso et al., 2012). In teleosts, MMCs are generally found in hematopoietic tissues, mainly in the stromal region of the spleen and periportal hepatic region (Macchi et al., 1992), similar to that found in the present study.

Despite the importance of evaluating cellular alterations in polluted environments, alone it may be insufficient to diagnose the type of contaminant present in the environment. In this sense, an association with biochemical and molecular methods is necessary; however, this type of approach in neotropical fish is still scarce (Arantes et al., 2016; Martins and Bianchini, 2011; Rabitto et al., 2005). The results of histopathological analyses and the concentrations of heavy metals in water and tissues agreed with the results of the immunohistochemical assays. The significant increase in the expression of hepatic metallothioneins, about 3-fold higher in PBR than ABR, confirms a greater exposure of *P. argenteus* to metals in this river. It is known that MT exchange ability depends upon the metal species present, and the majority of MTs exist in zinc form. However, some metals such as Cd, Pb and Cu can displace  $Zn^{2+}$  from MT molecule, thus stimulating the production of more metallothioneins (Coyle et al., 2002). Coincidentally, the hepatic concentration of these three metals were very high in PBR samples, which explains the increase in the production of MTs in the liver. This fact has also been demonstrated in other studies, confirming the efficacy of this biomarker in detection of metallic pollutants in aquatic vertebrates (Banni et al., 2005; Lange et al., 2002; Le et al., 2016).

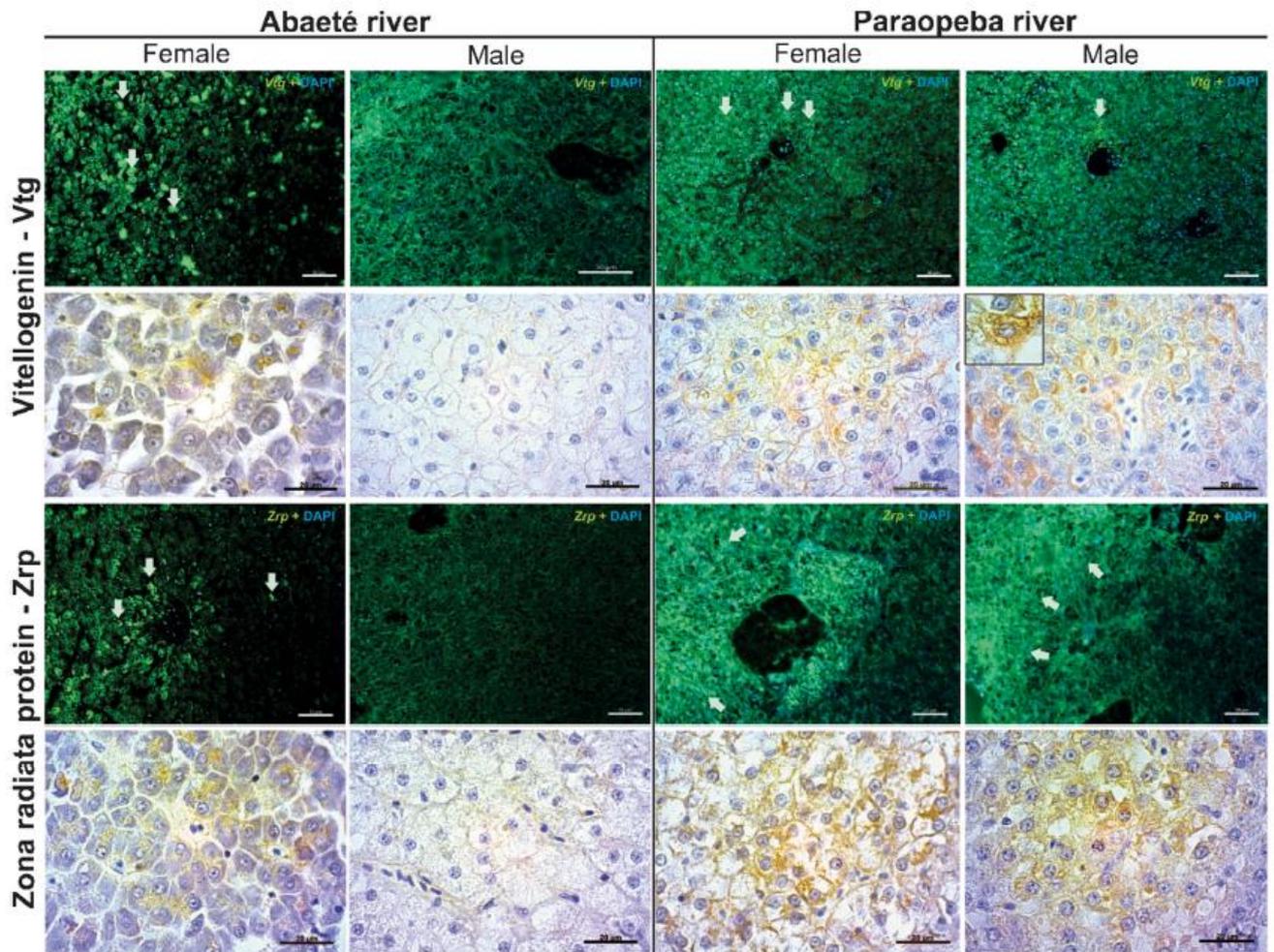


Fig. 4. Immunoperoxidase and immunofluorescence localisation of Vtg and Zrp in livers of *P. argenteus* from the Abaeté River (ABR) and Paraopeba River (PBR). White arrows = positive reactions to vitellogenin and zona radiata proteins in samples.

In the Paraopeba River, some morphophysiological changes were also observed for the gonadal maturation process. The expression of vitellogenin and zona radiata proteins in the liver in males presented similar values to those found in females from both rivers. Increased expression of these proteins in males is considered strong evidence of oestrogenic activity in fish, since the production of them is dependent on the influence of oestrone (E1) and  $17\beta$ -oestradiol (E2) in hepatocytes (Adeogun et al., 2016; Nadzialek et al., 2011; Prado et al., 2014; Silva et al., 2012; Weber et al., 2017). Moreover, chronic exposure to

xenoestrogens seemed to alter the volumetric proportion of germline cells in testes from PBR. According to Schulz et al. (2010) spermatogonial proliferation is regulated by  $17\beta$ -oestradiol, but the abnormal elevation in number of spermatogonia may be related to the constant exposure to metals that display the ability to mimic E2 action, such as Cd, Pb, Cu, and Al (Correia et al., 2010; Georgescu et al., 2011). Despite the higher number of spermatogonia and spermatocytes, the significant reduction in spermatids and spermatozoa may be related to disturbances in the production and signalling of androgens and progestins

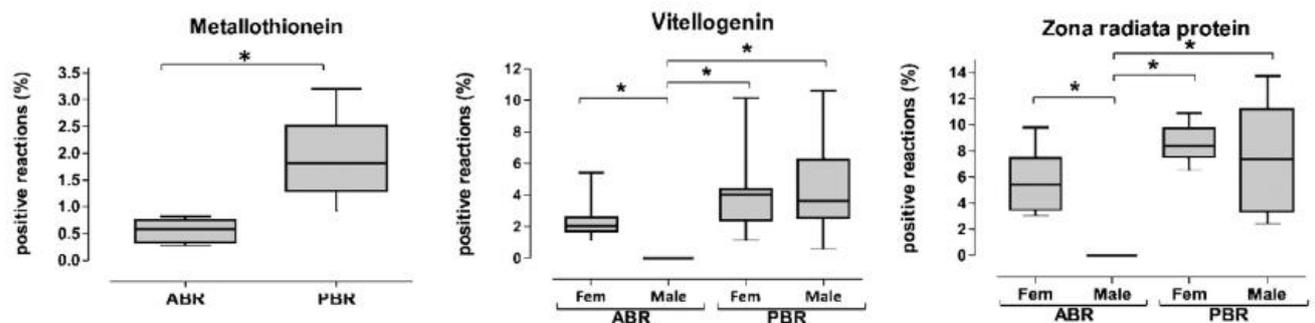


Fig. 5. Quantification of immunoperoxidase positive reactions to metallothionein, vitellogenin, and zona radiata protein in livers of *P. argenteus* from ABR and PBR. (\*) = Statistical difference ( $p < 0.05$ ).

caused by heavy metals, especially DHP (17 $\alpha$ ,20 $\beta$ -dihydroxy-4-pregnen-3-one) and 11-ketotestosterone (Noaksson et al., 2005). In fact, heavy metals can bind to androgen and progesterin receptors altering their action (Chaube et al., 2010; Georgescu et al., 2011), and the decrease in spermiogenesis (spermatids and spermatozoa) observed in the Paraopeba River also suggests that heavy metals affect the final steps of spermatogenesis. Chaube et al. (2010) showed that lead, a metal found in high concentrations in PBR, deregulates the expression of various sex hormones, including progesterins. This reduction in reproductive “fitness” of males in environments chronically contaminated with oestrogenic compounds has also been observed in other studies with freshwater fish (Huang et al., 2015; Kinnberg and Toft, 2003; Silva et al., 2012; Weber et al., 2017). Pollution in PBR also negatively influenced the gonadal development of *P. argenteus* females. Ovarian alterations such as over-ripened oocytes, decreased follicular diameter, increased atretic follicles, and absence of post ovulatory follicles may also be related to the accumulation of metals. For example, interference in hormones such as DHP in females causes a “delay” in ovulation, leading to reproductive changes such as over-ripening and atresia of vitellogenic follicles (Flett et al., 1996; OECD, 2009; Scholz et al., 2008), as observed in the present study and by other authors in similar studies (Prado et al., 2011; Van Der Ven et al., 2007; Weber et al., 2017). Despite the signs of endocrine disruption presented here, further studies measuring the plasma steroid concentrations can elucidate the real influence of xenoestrogens, i.e. heavy metals, on the gametogenesis of *P. argenteus* from the Paraopeba River.

Experimental studies usually evaluate isolated substances and provide different results from studies conducted under natural conditions, where fish are often exposed to a pool of pollutants (heavy metals) which may present (anti) oestrogenic and / or (anti) androgenic effects (Petrovic et al., 2004; Thomas et al., 2002). The interaction of these metals can occur in a synergistic or antagonistic way, causing an increase or decrease of the general toxicological response (Daka and Hawkins, 2006). According to Yin et al. (2017), oestrogenic and anti-androgenic compounds administered together had more severe deregulatory effects on zebrafish reproduction than when given alone. Similarly, Driessnack et al. (2016) also observed that when Cu and Cd are present in the mixture, they cause more severe effects on chronically exposed fish. Regardless of some recent studies, little is known about the chronic effects of metal mixtures on neotropical fish in nature.

Investigating the effects and the risks of exposure of aquatic organisms and humans to EDCs is a challenge in ecotoxicology. Other water bodies around the world also suffer from the constant discharge of various toxic substances through the lack or ineffective treatment of wastewaters, a situation that can lead to the collapse of entire populations of fish (Kidd et al., 2007). In vertebrates, sexual differentiation, development, and gonadal maturation are regulated by a complex hormonal axis between brain-pituitary-liver-gonads. Interference at any stage of this axis may reflect in a cascade effect, and recent studies show that some metals can act at many stages of this process in fish (Driessnack et al., 2016; Scholz and Klüver, 2009; Yamaguchi et al., 2007).

In teleosts, the effects of EDCs can be long and transferred to the offspring, affecting up to more than one generation ( $F_n \geq 2$ ) (Brown et al., 2005; Nash et al., 2004; Patyna et al., 1999). In addition, consumption of contaminated fish may indirectly affect other organisms, including humans. A study published by Aravindakshan et al. (2004) showed that rats fed with fish exposed to xenoestrogens transferred these contaminants to their offspring through lactation. In fact, the bioaccumulation and biomagnification capacity of heavy metals are characteristics that make this type of contaminant even more dangerous. These pollutants are frequently incorporated into the food chain via water, micro-organisms, plants, and fish, finally being consumed by humans through drinking water and/or eating fish (Sfakianakis et al., 2015). In the present study, the high concentration of various metals observed in PBR water and fish serves as an alert to the environmental

and public health regulatory authorities. Moreover, our data suggests a close environmental monitoring of the Paraopeba River is needed due to its ecological relevance for fish fauna (Drummond et al., 2005) and the high consumption of *P. argenteus* in this river and whole São Francisco River basin (Sato and Godinho, 2003).

## 5. Conclusion

The data presented in this study indicates that the high concentration of heavy metals observed in the water and fish from the Paraopeba River negatively affects the reproductive process of *Prochilodus argenteus* when compared to fish from the reference site, the Abaete River. An increased incidence of histopathologies, changes in number and morphology of germline cells, and the up-regulated expression of vitellogenin and zona radiata proteins in males, suggest that heavy metals in addition to causing tissue damage can act oestrogenically in female and male fish from PBR. The daily discharge of several pollutants into the Paraopeba River makes it difficult to diagnose all the substances that may be influencing the endocrine disruption of *P. argenteus*, but the data shown in the present study indicate that the high concentrations of heavy metals certainly contributed to the alterations observed.

## Acknowledgements

The authors would like to thank Rogério Matos for preparing the histological slides and Hidrocepe for helping with the metals analyses of the tissues. The study was supported by Brazilian funding agencies: Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq-306946/2016-5 and 407719/2016-4), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES - Finance Code 001) and Fundação de Amparo à Pesquisa no Estado de Minas Gerais (FAPEMIG-CVZ-APQ-03232-15).

## Appendix A. Supporting information

Supplementary data associated with this article can be found in the online version at doi:10.1016/j.ecoenv.2018.11.047.

## References

- Adams, S.M., Ham, K.D., Greeley, M.S., Lehw, R.F., Hinton, D.E., Saylor, C.F., 1996. Down-stream gradients in bioindicator response: point source contaminant effects on fish health. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 53, 2177–2187.
- Adegun, A.O., Onibonjo, K., Ibor, O.R., Omiwole, R.A., Chukwuka, A.V., Ugwumba, A.O., Ugwumba, A.A.A., Arukwe, A., 2016. Endocrine-disruptor molecular responses, occurrence of intersex and gonado-histopathological changes in tilapia species from a tropical freshwater dam (Awba Dam) in Ibadan, Nigeria. *Aquat. Toxicol.* 174, 10–21. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2016.02.002>.
- Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). 2013. RDC no 42 de 29 de Agosto de 2013 - Dispõe sobre o Regulamento Técnico MERCOSUL sobre Limites Máximos de Contaminantes Inorgânicos em Alimentos. DOU N168, p. 33.
- Agius, C., Roberts, R.J., 2003. Melano-macrophage centres and their role in fish pathology. *J. Fish Dis.* 26, 499–509. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2761.2003.00485.x>.
- Al-Yousuf, M.H., El-Shahawi, M.S., Al-Ghais, S.M., 2000. Trace metals in liver, skin and muscle of *Lethrinus lentjan* fish species in relation to body length and sex. *Sci. Total Environ.* 256, 87–94. [https://doi.org/10.1016/S0048-9697\(99\)00363-0](https://doi.org/10.1016/S0048-9697(99)00363-0).
- Almeida, J., Meletti, P., Martinez, C., 2005. Acute effects of sediments taken from an urban stream on physiological and biochemical parameters of .... *Comp. Biochem. Physiol.*
- Arantes, F.P., Santos, H.B., Rizzo, E., Sato, Y., Bazzoli, N., 2010. Profiles of sex steroids, fecundity, and spawning of the curimatã-pacu *Prochilodus argenteus* in the São Francisco River, downstream from the Três Marias Dam, Southeastern Brazil. *Anim. Reprod. Sci.* 118, 330–336. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2009.07.004>.
- Arantes, F.P., Savassi, L.A., Santos, H.B., Gomes, M.V.T., Bazzoli, N., 2016. Bioaccumulation of mercury, cadmium, zinc, chromium, and lead in muscle, liver, and spleen tissues of a large commercially valuable catfish species from Brazil. *An. Acad. Bras. Cienc.* 88, 137–147. <https://doi.org/10.1590/0001-3765201620140434>.
- Aravindakshan, J., Gregory, M., Marcogliese, D.J., Fournier, M., Cyr, D.G., 2004. Consumption of xenoestrogen-contaminated fish during lactation alters adult male reproductive function. *Toxicol. Sci.* 81, 179–189. <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfh174>.
- Arukwe, A., Kullman, S.W., Berg, K., Goksoyr, A., Hinton, D.E., 2002. Molecular cloning

- of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) eggshell zona radiata protein complementary DNA: mRNA expression in 17 $\beta$ -estradiol- and nonylphenol-treated fish. *Comp. Biochem. Physiol. - B Biochem. Mol. Biol.* 132, 315–326. [https://doi.org/10.1016/S1096-4959\(02\)00009-X](https://doi.org/10.1016/S1096-4959(02)00009-X).
- Ashraf, W., 2005. Accumulation of heavy metals in kidney and heart tissues of *Epinephelus Microdon* fish from the Arabian Gulf. *Environ. Monit. Assess.* 101, 311–316. <https://doi.org/10.1007/s10661-005-0298-4>.
- Atli, G., Canli, M., 2010. Response of antioxidant system of freshwater fish *Oreochromis niloticus* to acute and chronic metal (Cd, Cu, Cr, Zn, Fe) exposures. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 73, 1884–1889. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2010.09.005>.
- Ayas, Z., Ekmekci, G., Ozmen, M., Yeri, S.V., 2007. Histopathological changes in the livers and kidneys of fish in Sariyar Reservoir, Turkey. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 23, 242–249. <https://doi.org/10.1016/j.etap.2006.11.003>.
- Banni, M., Jebali, J., Daubeze, M., Clerandau, C., Guerbej, H., Narbonne, J.F., Boussetta, H., 2005. Monitoring pollution in Tunisian coasts: application of a classification scale based on biochemical markers. *Biomarkers* 10, 105–116. <https://doi.org/10.1080/13547500500107497>.
- Blazer, V.S., 2002. Histopathological assessment of gonadal tissue in wild fishes. *Fish. Physiol. Biochem.* 26, 85–101. <https://doi.org/10.1023/A:1023332216713>.
- Bosch, A.C., O'Neill, B., Sigge, G.O., Kerwath, S.E., Hoffman, L.C., 2016. Heavy metals in marine fish meat and consumer health: a review. *J. Sci. Food Agric.* 96, 32–48. <https://doi.org/10.1002/jsfa.7360>.
- Brasil. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística - IBGE, 2010. Pesquisa Nacional de Saneamento Básico 2008. Ministério das Cidades. (doi: 978-85-240-4135-8).
- Brown, A.R., Riddle, A.M., Winfield, L.J., Fletcher, J.M., James, J.B., 2005. Predicting the effects of endocrine disrupting chemicals on healthy and disease impacted populations of perch (*Perca fluviatilis*). *Ecol. Modell.* 189, 377–395. <https://doi.org/10.1016/j.ecolmod.2005.03.009>.
- Brown, C.L., George, C.J., 1985. Age-dependent accumulation of macrophage aggregates in the yellow perch, *Perca flavescens* (Mitchell). *J. Fish Dis.* 8, 135–138. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2761.1985.tb01195.x>.
- Braich, O.S., Jangu, S., 2015. Some aspects of reproductive biology on effect of heavy metal pollution on the histopathological structure of gonads in *Labeo rohita* (Hamilton-Buchanan) from Harikie wetland, India. *Int. J. Fish. Aquacult.* 7, 9–14. <https://doi.org/10.5897/IJFA15.0469>.
- Camargo, M.M.P., Fernandes, M.N., Martinez, C.B.R., 2009. How aluminium exposure promotes osmoregulatory disturbances in the neotropical freshwater fish *Prochilodus lineatus*. *Aquat. Toxicol.* 94, 40–46. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2009.05.017>.
- Camargo, M.M.P., Martinez, C.B.R., 2007. Histopathology of gills, kidney and liver of a Neotropical fish caged in an urban stream. *Neotrop. Ichthyol.* 5, 327–336. <https://doi.org/10.1590/S1679-62252007000300013>.
- Camargo, M.M.P., Martinez, C.B.R., 2006. Biochemical and physiological biomarkers in *Prochilodus lineatus* submitted to in situ tests in an urban stream in southern Brazil. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 21, 61–69. <https://doi.org/10.1016/j.etap.2005.07.016>.
- Canadian Council Of Ministers Of The Environment, 2011. Canadian Water Quality Guidelines for the Protection of Aquatic Life: CCME Water Quality Index 1.0, User's Manual. Canadian environmental quality guidelines. CCME, Winnipeg.
- Canli, M., Atli, G., 2003. The relationships between heavy metal (Cd, Cr, Cu, Fe, Pb, Zn) levels and the size of six Mediterranean fish species. *Environ. Pollut.* 121, 129–136. [https://doi.org/10.1016/S0269-7491\(02\)00194-X](https://doi.org/10.1016/S0269-7491(02)00194-X).
- Carpenè, E., Andreani, G., Isani, G., 2007. Metallothionein functions and structural characteristics. *J. Trace Elem. Med. Biol.* 21, 35–39. <https://doi.org/10.1016/j.jtemb.2007.09.011>.
- Carvalho, P.A., Paschoalini, A.L., Santos, G.B., Rizzo, E., Bazzoli, N., 2009. Reproductive biology of *Astyanax fasciatus* (Pisces: Characiformes) in a reservoir in Southeastern Brazil. *J. Appl. Ichthyol.* 25, 306–313.
- Chan, K.M., 1995. Metallothionein: potential biomarker for monitoring heavy metal pollution in fish around Hong Kong. *Mar. Pollut. Bull.* 31, 411–415. [https://doi.org/10.1016/0025-326X\(95\)00125-7](https://doi.org/10.1016/0025-326X(95)00125-7).
- Chang, Z., Lu, M., Lee, K.W., Oh, B.S., Bae, M.J., Park, J.S., 2011. Influence of divalent metal ions on E2-induced ER pathway in goldfish (*Carassius auratus*) hepatocytes. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 74, 2233–2239. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2011.07.024>.
- Chaube, R., Mishra, S., Singh, R.K., 2010. In vitro effects of lead nitrate on steroid profiles in the post-vitellogenic ovary of the catfish *Heteropneustes fossilis*. *Toxicol. Vitro.* 24, 1899–1904. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2010.07.021>.
- Conama, 2005. Resolução n 357, 18 de março de 2005. *Diário Of.* pp. 58–63.
- Correia, T.G., Narcizo, A.M., Bianchini, A., Moreira, R.G., 2010. Aluminum as an endocrine disruptor in female Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Comp. Biochem. Physiol. - C Toxicol. Pharmacol.* 151, 461–466. <https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2010.02.002>.
- Costa, P.M., Caeiro, S., Lobo, J., Martins, M., Ferreira, A.M., Caetano, M., Vale, C., DelValls, T.Á., Costa, M.H., 2011. Estuarine ecological risk based on hepatic histopathological indices from laboratory and in situ tested fish. *Mar. Pollut. Bull.* 62, 55–65. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2010.09.009>.
- Coyte, P., Philcox, J.C., Carey, L.C., Rofe, A.M., 2002. Metallothionein: the multipurpose protein. *Cell Mol. Life Sci.* 59, 627–647.
- Daka, E.R., Hawkins, S.J., 2006. Interactive effects of copper, cadmium and lead on zinc accumulation in the gastropod mollusc *Littorina saxatilis*. *Water Air Soil Pollut.* 171, 19–28. <https://doi.org/10.1007/s11270-005-9009-6>.
- Darbre, P.D., 2006. Metalloestrogens: an emerging class of inorganic xenoestrogens with potential to add to the oestrogenic burden of the human breast. *J. Appl. Toxicol.* 26, 191–197. <https://doi.org/10.1002/jat.1135>.
- Decreto no 55.871, de 26 de março de 1965. In: Ministério da Saúde. Legislação federal do setor da saúde. 2.a ed. Brasília, Consultoria Jurídica, 1977, 2, pp. 498–545.
- Domingos, F.F.T., Thomé, R.G., Martinelli, P.M., Sato, Y., Bazzoli, N., Rizzo, E., 2013. Role of HSP70 in the regulation of the testicular apoptosis in a seasonal breeding teleost *Prochilodus argenteus* from the São Francisco river, Brazil. *Microsc. Res. Tech.* 76, 350–356. <https://doi.org/10.1002/jemt.22173>.
- Dong, G., Chen, H., Qi, M., Dou, Y., Wang, Q., 2015. Balance between metallothionein and metal response element binding transcription factor 1 is mediated by zinc ions (Review). *Mol. Med. Rep.* 11, 1582–1586. <https://doi.org/10.3892/mmr.2014.2969>.
- Driessnack, M.K., Matthews, A.L., Raine, J.C., Niyogi, S., 2016. Interactive effects of chronic waterborne copper and cadmium exposure on tissue-specific metal accumulation and reproduction in fathead minnow (*Pimephales promelas*). *Comp. Biochem. Physiol. Part C Toxicol. Pharmacol.* 179, 165–173. <https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2015.10.009>.
- Drummond, G.M., Martins, C.S., Machado, A.B.M., Sebaio, F.A., Antonini, Y., 2005. Biodiversidade em Minas Gerais: um atlas para sua conservação, Biodiversidade em Minas Gerais: um atlas para sua conservação, Biodiversidade em Minas Gerais: um atlas para sua conservação. FAO/WHO (FAO/World Health Organization), 2002. Codex alimentarius—general standards for contaminants and toxins in food. schedule 1 maximum and guideline levels for contaminants and toxins in food. Reference CX/FAC 02/16. Joint FAO/WHO Food Standards Programme. Codex Committee, Rotterdam, The Netherlands.
- Fatima, M., Usmani, N., Firdaus, F., Zafeer, M.F., Ahmad, S., Akhtar, K., Dawar Husain, S.M., Ahmad, M.H., Anis, E., Mobarak Hossain, M., 2015. In vivo induction of antioxidant response and oxidative stress associated with genotoxicity and histopathological alteration in two commercial fish species due to heavy metals exposure in northern India (Kali) river. *Comp. Biochem. Physiol. Part - C Toxicol. Pharmacol.* 176–177, 17–30. <https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2015.07.004>.
- Fernandes, D., Zanuy, S., Bebianno, M.J., Porte, C., 2008. Chemical and biochemical tools to assess pollution exposure in cultured fish. *Environ. Pollut.* 152, 138–146. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2007.05.012>.
- Fishelson, L., 2006. Cytomorphological alterations of the thymus, spleen, head-kidney, and liver in cardinal fish (Aponogonidae, Teleostei) as byproducts of stress. *J. Morphol.* 267, 57–69. <https://doi.org/10.1002/jmor.10385>.
- Flett, P.A., Van Der Kraak, G., Munkittrick, K.R., Leatherland, J.F., 1996. Overripening as the cause of low survival to hatch in Lake Erie coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*) embryos. *Can. J. Zool.* 74, 851–857. <https://doi.org/10.1139/z96-099>.
- 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. *J. Aquat. Anim. Health* 13, 105–116. [https://doi.org/10.1577/1548-8667\(2001\)013<0105:UOSMAA>2.0.CO;2](https://doi.org/10.1577/1548-8667(2001)013<0105:UOSMAA>2.0.CO;2).
- Proese, R., 2006. Cube law, condition factor and weight-length relationships: history, meta-analysis and recommendations. *J. Appl. Ichthyol.* 22, 241–253.
- Georgescu, B., Georgescu, C., Dărăban, S., Bouaru, A., Pașcalău, S., 2011. Heavy metals acting as endocrine Disruptors. *Sci. Pap. Anim. Sci. Biotechnol.* 44, 89–93.
- Goksøyr, A., 2006. Endocrine disruptors in the marine environment: mechanisms of toxicity and their influence on reproductive processes in fish. *J. Toxicol. Environ. Health A* 69, 175–184. <https://doi.org/10.1080/15287390500259483>.
- Goksøyr, A., Male, R., 2006. Endocrine disruptors and the aquatic environment: studies on mechanisms of toxicity and influence on nuclear receptor signalling pathways in fish, pp. 57–68.
- Gupta, G.P., Nguyen, D.X., Chiang, A.C., Bos, P.D., Kim, J.Y., Nadal, C., Gomis, R.R., Manova-Todorova, K., Massague, J., 2007. Mediators of vascular remodeling co-opted for sequential steps in lung metastasis. *Nature* 446, 765–770. <https://doi.org/10.1038/nature05760>.
- Hachfi, L., Couvray, S., Simide, R., Tarnowska, K., Pierre, S., Gaillard, S., Richard, S., Coupe, S., Grillasca, J.-P., Prevot-D'Alvise, N., 2012. Impact of endocrine disrupting chemicals [EDCs] on hypothalamic-pituitary-gonad-liver [HPGL] axis in fish. *World J. Fish. Mar. Sci.* 4, 14–30. <https://doi.org/10.5829/idosi.wjfm.2012.04.01.6138>.
- Huang, X., Chen, L., Liu, W., Qiao, Q., Wu, K., Wen, J., Huang, C., Tang, R., Zhang, X., 2015. Involvement of oxidative stress and cytoskeletal disruption in microcystin-induced apoptosis in CIK cells. *Aquat. Toxicol.* 165, 41–50. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2015.05.009>.
- IGAM, 2011. Qualidade Das Águas Superficiais em Minas Gerais em 2010. MG Institute of Water management, pp. 1–19. <http://www.igam.mg.gov.br/>.
- IGAM, 2012. Qual. Das. Águas Superf. em Minas Gerais em 2011 - MG Inst. Water Manag. MG Institute of Water management, pp. 1–22. <http://www.igam.mg.gov.br/>.
- Islam, M.S., Ahmed, M.K., Habibullah-Al-Mamun, M., Hoque, M.F., 2015. Preliminary assessment of heavy metal contamination in surface sediments from a river in Bangladesh. *Environ. Earth Sci.* 73, 1837–1848. <https://doi.org/10.1007/s12665-014-3538-5>.
- Jones, P.D., De Coen, W.M., Tremblay, L., Giesy, J.P., 2000. Vitellogenin as a biomarker for environmental estrogens. *Water Sci. Technol.* 42, 1–14.
- Kidd, K.A., Blanchfield, P.J., Mills, K.H., Palace, V.P., Evans, R.E., Lazorchak, J.M., Flick, R.W., 2007. Collapse of a fish population after exposure to a synthetic estrogen. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 104, 8897–8901. <https://doi.org/10.1073/pnas.0609568104>.
- Kime, D.E., 1999. A strategy for assessing the effects of xenobiotics on fish reproduction. *Sci. Total Environ.* [https://doi.org/10.1016/S0048-9697\(98\)00328-3](https://doi.org/10.1016/S0048-9697(98)00328-3).
- Kimberg, K., Toft, G., 2003. Effects of estrogenic and antiandrogenic compounds on the testis structure of the adult guppy (*Poecilia reticulata*). *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 54, 16–24. [https://doi.org/10.1016/S0147-6513\(02\)00010-6](https://doi.org/10.1016/S0147-6513(02)00010-6).
- Knapen, D., De Wolf, H., Knaepkens, G., Bervoets, L., Ens, M., Blust, R., Verheyen, E., 2009. Historical metal pollution in natural gudgeon populations: inferences from allozyme, microsatellite and condition factor analysis. *Aquat. Toxicol.* 95, 17–26. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2009.07.022>.
- Lange, A., Ausseil, O., Segner, H., 2002. Alterations of tissue glutathione levels and metallothionein mRNA in rainbow trout during single and combined exposure to cadmium and zinc. *Comp. Biochem. Physiol. - C Toxicol. Pharmacol.* 131, 231–243. [https://doi.org/10.1016/S1532-0456\(02\)00010-8](https://doi.org/10.1016/S1532-0456(02)00010-8).
- Le, T.T.Y., Zimmermann, S., Sures, B., 2016. How does the metallothionein induction in

- bivalves meet the criteria for biomarkers of metal exposure? *Environ. Pollut.* 212, 257–268. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2016.01.070>.
- Le Guével, R., Petit, F.G., Goff, P.L., Métivier, R., Valotaire, Y., Pakdel, F., 2000. Inhibition of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) estrogen receptor activity by cadmium. *Biol. Reprod.* 63, 259–266.
- Luna, Lee G, H., 1960. *Manual of Histologic Staining Methods of the Armed Forces Institute of Pathology*. McGraw Hill Publ, New York. [https://doi.org/10.1016/S0031-3025\(16\)39410-7](https://doi.org/10.1016/S0031-3025(16)39410-7).
- Macchi, G.J., Romano, L.A., Christiansen, H.E., 1992. Melano-macrophage centres in whitemouth croaker, *Micropogonias furnieri*, as biological indicators of environmental changes. *J. Fish Biol.* 40, 971–973.
- Marin, M.G., Matozzo, V., 2004. Vitellogenin induction as a biomarker of exposure to estrogenic compounds in aquatic environments. *Mar. Pollut. Bull.* 48, 835–839. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2004.02.037>.
- Martin, M.B., Reiter, R., Pham, T., Avellanet, Y.R., Camara, J., Lahm, M., Pentecost, E., Pratap, K., Gilmore, B.A., Divekar, S., Dagata, R.S., Bull, J.L., Stoica, A., 2003. Estrogen-like activity of metals in MCF-7 breast cancer cells. *Endocrinology* 2425–2436. <https://doi.org/10.1210/en.2002-221054>.
- Martins, S.E., Bianchini, A., 2011. Toxicity tests aiming to protect Brazilian aquatic systems: current status and implications for management. *J. Environ. Monit.* 13, 1866–1875. <https://doi.org/10.1039/c0em00787k>.
- Matozzo, V., Gagn?, F., Marin, M.G., Ricciardi, F., Blaise, C., 2008. Vitellogenin as a biomarker of exposure to estrogenic compounds in aquatic invertebrates: a review. *Environ. Int.* <https://doi.org/10.1016/j.envint.2007.09.008>.
- Mittler, R., 2002. Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. *Trends Plant Sci.* [https://doi.org/10.1016/S1360-1385\(02\)02312-9](https://doi.org/10.1016/S1360-1385(02)02312-9).
- Murphy, C.A., Rose, K.A., Thomas, P., 2005. Modeling vitellogenesis in female fish exposed to environmental stressors: predicting the effects of endocrine disturbance due to exposure to a PCB mixture and cadmium. *Reprod. Toxicol.* 19, 395–409. <https://doi.org/10.1016/j.reprotox.2004.09.006>.
- Nadzialek, S., Depiereux, S., Mandiki, S.N.M., Kestemont, P., 2011. In vivo biomarkers of estrogenicity: limitation of interpretation in wild environment. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 60, 471–478. <https://doi.org/10.1007/s00244-010-9548-8>.
- Nagler, J.J., Davis, T.L., Modi, N., Vijayan, M.M., Schultz, L., 2010. Intracellular, not membrane, estrogen receptors control vitellogenin synthesis in the rainbow trout. *Gen. Comp. Endocrinol.* 167, 326–330. <https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2010.03.022>.
- Nakata, H., Tanabe, S., Tatsukawa, R., Amano, M., Miyazaki, N., Petrov, E.A., 1995. Persistent organochlorine residues and their accumulation kinetics in Baikal seal (*Phoca sibirica*) from Lake Baikal, Russia. *Environ. Sci. Technol.* 29, 2877–2885. <https://doi.org/10.1021/es00011a026>.
- Nash, J.P., Kime, D.E., Van der Ven, L.T.M., Wester, P.W., Brion, F., Maack, G., Stahlschmidt-Allner, P., Tyler, C.R., 2004. Long-term exposure to environmental concentrations of the pharmaceutical ethinylestradiol causes reproductive failure in fish. *Environ. Health Perspect.* 112, 1725–1733. <https://doi.org/10.1289/ehp.7209>.
- Noaksson, E., Linderöth, M., Gustavsson, B., Zebühr, Y., Balk, L., 2005. Reproductive status in female perch (*Perca fluviatilis*) outside a sewage treatment plant processing leachate from a refuse dump. *Sci. Total Environ.* 340, 97–112. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2004.08.010>.
- OECD, 2009. OECD guidance document for the diagnosis of endocrine-related histopathology of fish gonads. OECD Environ. Heal. Saf. Publ. Ser. Test. Assess. 1–42.
- Patyna, P.J., Davi, R.A., Parkerton, T.F., Brown, R.P., Cooper, K.R., 1999. A proposed multigeneration protocol for Japanese medaka (*Oryzias latipes*) to evaluate effects of endocrine disruptors. *Sci. Total Environ.* 233, 211–220. [https://doi.org/10.1016/S0048-9697\(99\)00227-2](https://doi.org/10.1016/S0048-9697(99)00227-2).
- Pereira Arantes, F., dos Santos, Batista, Rizzo, H., Sato, E., Bazzoli, N. Y., 2011. Collapse of the reproductive process of two migratory fish (*Prochilodus argenteus* and *Prochilodus costatus*) in the Três Marias Reservoir, São Francisco River, Brazil. *J. Appl. Ichthyol.* 27, 847–853. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0426.2010.01583.x>.
- Petrovic, M., Eljarrat, E., Lopez De Alda, M.J., Barceló, D., 2004. Endocrine disrupting compounds and other emerging contaminants in the environment: a survey on new monitoring strategies and occurrence data. *Anal. Bioanal. Chem.* <https://doi.org/10.1007/s00216-003-2184-7>.
- Polat, F., Akan, Ş., Yildirim, A., Dal, T., 2015. The effects of point pollutants-originated heavy metals (lead, copper, iron, and cadmium) on fish living in (Yeşilirmak) (River), (Turkey). *Toxicol. Ind. Heal.* 32, 1438–1449. <https://doi.org/10.1177/0748233714565709>.
- Prado, P.S., Pinheiro, A.P.B., Bazzoli, N., Rizzo, E., 2014. Reproductive biomarkers responses induced by xenoestrogens in the characid fish *Astyanax fasciatus* inhabiting a South American reservoir: an integrated field and laboratory approach. *Environ. Res.* 131, 165–173. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2014.03.002>.
- Prado, P.S., Souza, C.C., Bazzoli, N., Rizzo, E., 2011. Reproductive disruption in lambari *Astyanax fasciatus* from a Southeastern Brazilian reservoir. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 74, 1879–1887. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2011.07.017>.
- Procópio, M.S., Ribeiro, H.J., Pereira, L.A., Oliveira Lopes, G.A., Santana Castro, A.Ó.C., Rizzo, E., Sato, Y., Castro Russo, R., Corrêa, J.D., 2014. Sex-response differences of immunological and histopathological biomarkers in gill of *Prochilodus argenteus* from a polluted river in southeast Brazil. *Fish. Shellfish Immunol.* 39, 108–117. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2014.04.010>.
- Rabbito, L.S., Alves Costa, J.R.M., Silva De Assis, H.C., Pelletier, É., Akaiishi, F.M., Anjos, A., Randi, M.A.F., Oliveira Ribeiro, C.A., 2005. Effects of dietary Pb(II) and tributyltin on neotropical fish, *Hoplias malabaricus*: histopathological and biochemical findings. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 60, 147–156. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2004.03.002>.
- Razmiafshari, M., Kao, J., d'Avignon, A., Zawia, N.H., 2001. NMR identification of heavy metal-binding sites in a synthetic zinc finger peptide: toxicological implications for the interactions of xenobiotic metals with zinc finger proteins. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 172, 1–10. <https://doi.org/10.1006/taap.2001.9132>.
- Reddy, G.R., Zawia, N.H., 2000. Lead exposure alters Egr-1 DNA-binding in the neonatal rat brain. *Int. J. Dev. Neurosci.* 18, 791–795.
- Safe, S., 2003. Cadmium's disguise dupes the estrogen receptor. *Nat. Med.* 9, 1000–1001. <https://doi.org/10.1038/nm0803-1000>.
- Santos, R.S., Martins, M.L., Marengoni, N.G., Francisco, C.J., Piazza, R.S., Takahashi, H.K., Onaka, E.M., 2005. *Neoechinorhynchus curemae* (Acanthocephala: neoechinorhynchidae). *Prochilodus lineatus* (Osteichthyes: Prochilodontidae) from the Paraná River 134. *Vet. Parasitol.* Brazil, pp. 111–115. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2005.06.025>.
- Sassi, A., Annabi, A., Kessabi, K., Kerkeni, A., Saïd, K., Messaoudi, I., 2010. Influence of high temperature on cadmium-induced skeletal deformities in juvenile mosquitofish (*Gambusia affinis*). *Fish Physiol. Biochem.* 36, 403–409. <https://doi.org/10.1007/s10695-009-9307-9>.
- Sato, Y., Godinho, H.P., 2003. Migratory fishes of the São Francisco River. In: Carols-feld, J., Harvey, B., Ross, C., Baer, A. (Eds.), *Migratory Fishes of South America: Biology, Fisheries and Conservation Status*. Development Research Centre, Vic-toria, pp. 195–222.
- Sato, Y., Bazzoli, N., Rizzo, E., Boschi, M.B., Miranda, M.O.T., 2005. Influence of the Abaeté River on the reproductive success of the neotropical migratory teleost *Prochilodus argenteus* in the São Francisco River, downstream from the Três Marias Dam, southeastern Brazil. *River Res. Appl.* 21, 939–950. <https://doi.org/10.1002/rra.859>.
- Savvasi, L.A., Arantes, F.P., Gomes, M.V.T., Bazzoli, N., 2016. Heavy metals and histopathological alterations in *Salminus franciscanus* (Lima & Britski, 2007) (Pisces: Characiformes) in the Paraopeba River, Minas Gerais, Brazil. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 478–483. <https://doi.org/10.1007/s00128-016-1732-8>.
- 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. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 15, 394–404. <https://doi.org/10.1007/s11356-008-0018-z>.
- Scholz, S., Klüver, N., 2009. Effects of endocrine disruptors on sexual, gonadal development in fish. *Sex. Dev.* 3, 136–151. <https://doi.org/10.1159/000223078>.
- Schulz, R.W., de Fran??a, L.R., Lareyre, J.J., LeGac, F., Chiarini-Garcia, H., Nobrega, R.H., Miura, T., 2010. Spermatogenesis in fish. *Gen. Comp. Endocrinol.* 165, 390–411. <https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2009.02.013>.
- Sfakianakis, D.G., Renieri, E., Kentouri, M., Tsatsakis, A.M., 2015. Effect of heavy metals on fish larvae deformities: a review. *Environ. Res.* 137, 246–255. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2014.12.014>.
- Silva, P., Rocha, M.J., Cruzeiro, C., Malhão, F., Reis, B., Urbatzka, R., Monteiro, R.A.F., Rocha, E., 2012. Testing the effects of ethinylestradiol and of an environmentally relevant mixture of xenoestrogens as found in the Douro River (Portugal) on the maturation of fish gonads-A stereological study using the zebrafish (*Danio rerio*) as model. *Aquat. Toxicol.* 124–125, 1–10. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2012.07.002>.
- Siscar, R., Torreblanca, A., Del Ramo, J., Solé, M., 2014. Modulation of metallothionein and metal partitioning in liver and kidney of *Solea senegalensis* after long-term acclimation to two environmental temperatures. *Environ. Res.* 132, 197–205. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2014.04.020>.
- Slovan, K.A., 2007. Effects of trace metals on salmonid fish: the role of social hierarchies. *Appl. Anim. Behav. Sci.* 104, 326–345. <https://doi.org/10.1016/j.applanim.2006.09.003>.
- Subotić, S., Spasić, S., Višnjić-Jeftić, Ž., Hegediš, A., Krpo-Četković, J., Mičković, B., Skorić, S., Lenhardt, M., 2013. Heavy metal and trace element bioaccumulation in target tissues of four edible fish species from the Danube River (Serbia). *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 98, 196–202. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2013.08.020>.
- Thomas, K.V., Hurst, M.R., Matthiessen, P., McHugh, M., Smith, A., Waldo, M.J., 2002. An assessment of in vitro androgenic activity and the identification of environmental androgens in United Kingdom estuaries. *Environ. Toxicol. Chem.* 21, 1456–1461. <https://doi.org/10.1002/etc.v21>.
- Tilton, S.C., Foran, C.M., Benson, W.H., 2003. Effects of cadmium on the reproductive axis of Japanese medaka (*Oryzias latipes*). *Comp. Biochem. Physiol. - C Toxicol. Pharmacol.* 136, 265–276. <https://doi.org/10.1016/j.cca.2003.09.009>.
- 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. <https://doi.org/10.1007/s10695-011-9551-7>.
- Truman, P.S., van den Hurk, P., 2012. Xenoestrogen exposure and effects in Bluegill from the Reedy River, South Carolina, USA. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 58, 165–175.
- US Environmental Protection Agency (USEPA), 2017. National Recommended Water Quality Criteria - Aquatic Life Criteria Table. <https://www.epa.gov/wqc/national-recommended-water-quality-criteria-aquatic-life-criteria-table>.
- Van Der Ven, L.T.M., Van Den Brandhof, E.J., Vos, J.H., Wester, P.W., 2007. Effects of the estrogen agonist 17β-estradiol and antagonist tamoxifen in a partial life-cycle assay with zebrafish (*Danio rerio*). *Environ. Toxicol. Chem.* 26, 92–99. <https://doi.org/10.1897/06-092R1.1>.
- Veado, M.A.R.V., Arantes, I.A., Oliveira, A.H., Almeida, M.R.M.G., Miguel, R.A., Severo, M.L., Cabaleiro, H.L., 2006. Metal pollution in the environment of Minas Gerais state - Brazil. *Environ. Monit. Assess.* 117, 157–172. <https://doi.org/10.1007/s10661-006-8716-9>.
- Viarengo, A., Burlando, B., Ceratto, N., Panfoli, I., 2000. Antioxidant role of metallothioneins: a comparative overview. *Cell. Mol. Biol.*
- Wallace, R.A., 1985. Vitellogenesis and Oocyte Growth in Nonmammalian Vertebrates. *Dev. Biol.* 127–177. [https://doi.org/10.1007/978-1-4615-6814-8\\_3](https://doi.org/10.1007/978-1-4615-6814-8_3).
- Wang, W.X., Rainbow, P.S., 2010. Significance of metallothioneins in metal accumulation

- kinetics in marine animals. *Comp. Biochem. Physiol. - C. Toxicol. Pharmacol.* <https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2010.02.015>.
- Weber, A.A., Moreira, D.P., Melo, R.M.C., Vieira, A.B.C., Prado, P.S., da Silva, M.A.N., Bazzoli, N., Rizzo, E., 2017. Reproductive effects of oestrogenic endocrine disrupting chemicals in *Astyanax rivularis* inhabiting headwaters of the Velhas River, Brazil. *Sci. Total Environ.* 592, 693–703. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.02.181>.
- Wolf, J.C., Wolfe, M.J., 2005. A brief overview of nonneoplastic hepatic toxicity in fish. *Toxicol. Pathol.* 33, 75–85. <https://doi.org/10.1080/01926230590890187>.
- Yamaguchi, S., Miura, C., Ito, A., Agusa, T., Iwata, H., Tanabe, S., Tuyen, B.C., Miura, T., 2007. Effects of lead, molybdenum, rubidium, arsenic and organochlorines on spermatogenesis in fish: monitoring at Mekong Delta area and in vitro experiment. *Aquat. Toxicol.* 83, 43–51. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2007.03.010>.
- Yanda, P.Z., Madulu, N.F., 2005. Water resource management and biodiversity conservation in the Eastern Rift Valley Lakes, Northern Tanzania. *Phys. Chem. Earth* 30, 717–725. <https://doi.org/10.1016/j.pce.2005.08.013>.
- Yin, P., Li, Y.-W., Chen, Q.-L., Liu, Z.-H., 2017. Diethylstilbestrol, flutamide and their combination impaired the spermatogenesis of male adult zebrafish through disrupting HPG axis, meiosis and apoptosis. *Aquat. Toxicol.* 185, 129–137. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2017.02.013>.
- Yohannes, Y.B., Ikenaka, Y., Saengtienchai, A., Watanabe, K.P., Nakayama, S.M.M., Ishizuka, M., 2013. Occurrence, distribution, and ecological risk assessment of DDTs and heavy metals in surface sediments from Lake Awassa–Ethiopian Rift Valley Lake. *Environ. Sci. Pollut. Res. Int.* 20, 8663–8671. <https://doi.org/10.1007/s11356-013-1821-8>.
- Zawia, N.H., Sharan, R., Brydie, M., Oyama, T., Crumpton, T., 1998. Sp1 as a target site for metal-induced perturbations of transcriptional regulation of developmental brain gene expression. *Dev. Brain Res.* 107, 291–298. [https://doi.org/10.1016/S0165-3806\(98\)00023-6](https://doi.org/10.1016/S0165-3806(98)00023-6).
- Zheng, S., Chen, B., Wang, Z., Qiu, X., Yu, X., Freestone, D., Liu, Z., Huang, H., Yu, W., Xu, X., 2010. Reproductive toxic effects of sublethal cadmium on the marine polychaete *Perinereis nuntia*. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 73, 1196–1201. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2010.05.022>.

#### **4. CAPÍTULO II**

**Avaliação do potencial estrogênico de Estrona e Bisfenol-A em machos de *Astyanax bimaculatus* após exposição sub-aguda**

**(Artigo a ser publicado - Aquatic toxicology)**

## **Avaliação do potencial estrogênico de Estrona e Bisfenol-A em machos de *Astyanax bimaculatus* após exposição sub-aguda**

<sup>1</sup>Paschoalini, A.L.; <sup>1</sup>Savassi, L.A.; <sup>3</sup>Weber A.A.; <sup>1</sup>Moreira, D.P.; <sup>1</sup>Ribeiro, Y.M.; <sup>1</sup>Rizzo, E.; <sup>2</sup>Bazzoli, N.

<sup>1</sup>Universidade Federal de Minas Gerais, Departamento de Morfologia, Instituto de Ciências Biológicas, 31270-901 Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil.

<sup>2</sup>Pontifícia Universidade Católica de Minas Gerais, Programa de Pós-graduação em Zoologia de Vertebrados, 30535-610 Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil

<sup>3</sup>University of California, Department of Pharmacology, Robert Tukey Lab, San Diego, California, United States.

### **RESUMO**

Nas últimas décadas, estrona-E1 e estradiol- E2, juntamente com outros compostos estrogênicos inorgânicos (Ex: metais pesados) ou sintéticos (Ex: Bisfenol-A), são frequentemente reportados em concentrações relevantes nos ambientes aquáticos em todo o mundo, representando um grande risco à vida aquática. A maioria dos estudos com xenoestrógenos realizados em laboratório, tenta entender os efeitos de um único contaminante, porém, em ambientes naturais, os efeitos desses xenoestrógenos podem ser bastante diferentes devido às interações com outros compostos. Diante deste cenário, o presente estudo visa comparar a ação de dois compostos estrogênicos (estrona - E1 e Bisfenol-A – BPA), atuando de forma isolada e conjunta, na biologia reprodutiva de uma espécie modelo neotropical, após exposição subaguda. Exemplares adultos de *Astyanax bimaculatus* foram dispostos em 8 aquários de 20L, em duplicata, totalizando um número de 10 indivíduos por aquário. Após exposição a 10µg/L de estrona, Bisfenol-A e a mistura deles, durante 15 dias, os resultados mostraram que a estrona possui um potencial estrogênico e desregulador endócrino superior ao Bisfenol-A, uma vez que foram detectados maiores níveis de estradiol e vitelogenina no fígado. Além disso, E1 alterou significativamente o número de diferentes células espermatogênicas, enquanto BPA apresentou queda apenas em espermátides. Por outro lado, BPA apresentou mais toxicidade pois foi observado um

maior número de histopatologias e de células em apoptose. A análise da mistura dos dois compostos estrogênicos mostrou que estrona e bisfenol-A não possuem efeitos aditivos ou sinérgicos. Em suma, os resultados do presente estudo mostram que substâncias analisadas isoladamente podem apresentar um comportamento diferente de quando administradas com outras substâncias.

**Palavras-chave:** Espermatogênese, misturas, xenoestrógenos, reprodução de peixes, desregulação endócrina

## INTRODUÇÃO

Recentemente, diversos estudos mostram que muitos compostos possuem a capacidade de desregular a função, os níveis e a distribuição de hormônios endógenos, sendo classificadas como desreguladores endócrinos (EDCs)(Archer et al., 2017; Hachfi et al., 2012; Pojana et al., 2007). Essas substâncias podem ocorrer naturalmente (Ex.: fitoestrógenos) ou podem entrar no meio ambiente por meio de atividades antrópicas. Efluentes urbanos, rurais e industriais não tratados, despejam regularmente em corpos d'água diversos EDCs que podem atuar em diferentes classes de organismos vivos, principalmente em peixes, uma vez que estão diretamente em contato com esses poluentes no meio aquático. Dentre essa gama de toxinas, aquelas que possuem a capacidade de interagir com os receptores de estrógenos (ERs) e/ou mimetizar a ação de estrógenos naturais, são conhecidas como xenoestrógenos (Falconer et al., 2006; Metcalfe et al., 2001; Ying et al., 2002).

Dentre os principais estrógenos atuantes nos peixes, estão a estrona (E1), originada da aromatização de androstenediona, e o estradiol (E2) originado da aromatização da testosterona (T), ambos processos através da atuação da enzima aromatase (CYP19) (Van, 2013). Esses estrógenos são fundamentais no processo

reprodutivo de peixes, uma vez que estão envolvidos na regulação da ovogênese, vitelogênese, regulação de gonadotrofinas, desenvolvimento testicular, dentre outros (Hachfi et al., 2012; Heldring et al., 2007; Nelson and Habibi, 2013). No entanto, quando estão em excesso no organismo, ativam um “feedback” negativo no intuito de controlar a secreção hormonal, suprimindo a liberação de GnRH, e conseqüentemente das gonadotrofinas LH e FSH, diminuindo a produção de estrógenos nas células somáticas das gônadas.

Nas últimas décadas, esses dois hormônios naturais (E1 e E2), juntamente com outros compostos estrogênicos inorgânicos (Ex: metais pesados) ou sintéticos (Ex: Bisfenol-A), têm sido frequentemente reportados em concentrações relevantes nos ambientes aquáticos em todo o mundo, representando um grande risco à vida aquática (Kidd et al., 2007; Pojana et al., 2007; Weber et al., 2017). Estrona e estradiol são derivados principalmente da excreta de humanos e da pecuária. Por exemplo, a utilização de esterco de gados na agricultura é um dos fatores que pode contribuir consideravelmente para o aumento da concentração de estrona em ambientes aquáticos, uma vez que a concentração deste hormônio pode ser de 700 a 17000 mg/dia (Johnson et al., 2006).

Bisfenol-A (BPA) é um clássico componente sintético mimetizador de estrógenos naturais, proveniente da indústria do plástico, e detectado em ecossistemas aquáticos do mundo todo (Crain et al., 2007; Elango et al., 2006; Klecka et al., 2009). BPA pode ligar-se a receptores de estrógenos nucleares alpha e beta, além de receptores associados à membrana GPR30, produzindo efeitos semelhantes à hormônios naturais (Thomas and Dong, 2006). Estudos mostram que alguns organismos aquáticos expostos a este composto, apresentaram alterações em parâmetros reprodutivos, inclusive na proporção sexual entre machos e fêmeas, resultando em feminização da população

devido a ação estrogênica de BPA (Huang et al., 2012; Virk et al., 2014; Zhang et al., 2018). Além dos efeitos estrogênicos em peixes de água doce, BPA também pode impedir a ação de neurotransmissores e diminuir batimentos cardíacos, bem como promover a peroxidação lipídica e danos oxidativos no fígado e rins (Faheem et al., 2017; Li et al., 2015). Alterações metabólicas relacionadas ao BPA também já foram relatadas em outros vertebrados, inclusive humanos, tais como: aterosclerose, doenças cardíacas, obesidade, diabetes e câncer (Rancièrè et al., 2015; Seachrist et al., 2016; Stojanoska et al., 2017).

Nas últimas décadas foram observados diversos avanços no conhecimento sobre a desregulação endócrina em peixes de água doce, porém a maioria dos estudos utiliza espécies modelos tradicionais, como: *Danio rerio*, *Pimephales promelas* e *Oryzias latipes*. Apesar de grande diversidade de peixes encontrada na região neotropical, a utilização de espécies nativas desta região em abordagens toxicológicas foi negligenciada durante muitos anos (Martins and Bianchini, 2011). *Astyanax bimaculatus* é uma espécie forrageira amplamente distribuída nas bacias hidrográficas da América do Sul (Lima et al., 2003). Devido ao seu pequeno porte e fácil manipulação em laboratório, esta espécie é apropriada para abordagens ecotoxicológicas e pode ser utilizada como modelo para outros peixes neotropicais de maior porte (Felizardo et al., 2012; Prado et al., 2014; Weber et al., 2017).

Ultimamente, estudos relacionados à xenoestrógenos realizados em laboratório, visam entender os efeitos de um único contaminante em diferentes espécies de peixes. No entanto, em ambientes naturais são detectados diversas classes de desreguladores endócrinos, e os efeitos desses EDCs podem ser diferentes de quando analisados isoladamente devido às interações com outros compostos (Almeida and Ribeiro, 2014). De fato, o conhecimento sobre os efeitos tóxicos de misturas nem sempre facilita a

interpretação dos resultados, uma vez que a interação entre diferentes poluentes pode apresentar efeitos sinérgicos, aditivos ou antagônicos. Considerando que este tipo de abordagem em peixes neotropicais ainda é raro, o presente estudo visa comparar a ação de dois compostos estrogênicos, atuando de forma isolada e conjunta, sobre a biologia reprodutiva de *Astyanax bimaculatus*, após exposição subaguda.

## **MATERIAIS E MÉTODOS**

### *Condições de cultivo*

O presente estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de Minas Gerais (CEUA-UFMG n223/2017), e todos os procedimentos, condições de cultivo e eutanásia seguiram os princípios éticos e legais estabelecidos pelo Colégio Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA).

Para a realização do estudo comparativo entre os compostos estrogênicos (ECs), machos adultos de *Astyanax bimaculatus* (n=80) foram adquiridos de fornecedor local e foram dispostos em 8 aquários de 20L. Os peixes foram aclimatados por aproximadamente 30 dias prévios a realização do experimento e foram dispostos dez indivíduos por aquário, resultando em uma densidade de estocagem de 0.2g de peixe/L. Os tratamentos foram executados em duplicata, tais como: controle (10µg/L de metanol); Estrona-E1 (10µg/L); Bisfenol-A (10µg/L); mistura (10µg/L E1 + 10µg/L BPA). Os aquários foram montados com sistema de oxigenação e de filtração mecânica, química e biológica. O sistema de filtração ficou operante apenas durante o período de pré-exposição dos peixes para evitar degradação acelerada dos compostos químicos administrados. Durante todo o experimento a temperatura da água foi mantida

entre 26-28°C e o fotoperíodo controlado (12h luz: 12h escuro), além disso foram monitorados periodicamente os níveis de oxigênio dissolvido, amônia tóxica e pH, através de sonda multiparâmetros Horiba U-50. Os peixes foram alimentados duas vezes ao dia *ad libitum* com ração comercial. O período de exposição foi de 15 dias e a renovação de água ocorreu a cada 2 dias de forma que fossem administradas novas doses de ECs a cada troca. Após o período de exposição todos os animais foram anestesiados com Eugenol (85 mg/L) e eutanasiados com secção transversal da coluna vertebral.

#### *Dados biométricos e Índices biológicos*

Em todos os espécimes foram obtidos comprimento total (TL), peso corporal (BW), peso gonadal (GW) e peso do fígado (LW). A partir dos dados biométricos, os seguintes índices biológicos foram calculados: índice gonadossomático ( $GSI = GW/BW \times 100$ ), índice hepatossomático ( $HSI = LW/BW \times 100$ ) e fator de condição de Fulton ( $K = BW/TL^3 \times 100$ ).

#### *Histologia e Imunohistoquímica*

Foram coletados fragmentos de gônadas e fígado, os quais foram fixados em solução de Bouin por 12 h, incluídos em parafina, seccionados com 4-6  $\mu$ m de espessura e corados com hematoxilina e eosina (HE).

Nos ensaios imunohistoquímicos para vitelogenina - Vtg e receptores de estrógeno ( $ER\alpha$  e  $ER\beta$ ) (Tabela 1), secções de fígado e gônadas passaram por lavagem em água corrente durante 60 min. A recuperação antigênica ocorreu em tampão citrato (pH 6,0), durante 30 minutos em banho maria a 60°C. Em seguida, as secções foram incubadas em  $H_2O_2$  a 3% para evitar a peroxidase endógena e em tampão de bloqueio (albumina de soro bovino a 2% + Triton X-100 a 0,05% + Tween 20 a 0,01%) para a

permeabilização e bloqueio da coloração inespecífica. O anticorpo primário foi aplicado às secções “*overnight*” em câmara úmida a 4°C e incubadas durante 30 minutos com anticorpo secundário. As marcações foram visualizadas por 3'3-diaminobenzidina (DAB) contrastada com hematoxilina. Para o controle negativo de todos os biomarcadores, o tratamento com o anticorpo primário foi omitido.

**Tabela 1** - Anticorpos primários e suas respectivas diluições utilizados no presente estudo

<b>Anticorpos primários</b>	<b>Origem</b>	<b>Diluição</b>
rabbit anti-zebrafish Vtg	Biosense	1:200
rabbit anti-human ER $\alpha$	Santa Cruz Biotech	1:50
rabbit anti-human ER $\beta$	Santa Cruz Biotech	1:50

#### *Proporção volumétrica de células espermatogênicas*

A proporção (%) das células germinativas foi determinada usando cinco exemplares aleatórios de cada tratamento. De cada exemplar, cinco imagens com aumento de 400X foram obtidas, as quais foram sobrepostas por uma grade de 26  $\times$  19 pontos (494 pontos de intersecção) utilizando o software Image J, totalizando 25 imagens e 12.350 pontos analisados por tratamento. Foi quantificada em cada exemplar a proporção de: espermatogônias A indiferenciadas (Aund), espermatogônias A diferenciadas (Adiff), espermatogônias B (B), espermatócitos primários (C1), espermatócitos secundários (C2), espermátides (T), espermatozoides (Z), células de Leydig e células de Sertoli.

#### *Ensaio de imunoabsorção enzimática – ELISA*

As amostras (n=5/tratamento) congeladas de fígado foram homogeneizadas em tampão de extração (50 mM Tris-HCl pH 8,0 com 0,002% de aprotinina e 1 mM de fenilmetilsulfonilo) numa proporção de 1: 2 do peso do tecido: volume de tampão,

utilizando um homogeneizador Potter S (Braun, Melsungen, Alemanha). Subsequentemente, os extratos foram sonicados utilizando um processador GEX 600 EC e depois centrifugados a 15.000 g durante 60 minutos a 4 ° C. Após a centrifugação, os sobrenadantes foram armazenados em alíquotas a -80 ° C até a análise. Para determinar as concentrações do hormônio sexual Estradiol (E2) das alíquotas, foi utilizado um kit-ELISA específico, seguindo o protocolo proposto pelo fabricante (Cayman Chemical)

#### *Reação de TUNEL in situ*

Os fragmentos de testículos foram fixados em solução de Bouin, incluídos em parafina, seccionados com 5 µm de espessura e submetidos ao ensaio de TUNEL *in situ* utilizando o kit de detecção de apoptose *in situ* Millipore (S7101 ApopTag Plus peroxidase) seguindo o protocolo do fabricante. As secções foram lavadas em tampão TRIS pH 7,6 (TBS) e tratadas com 20 µg / ml de proteinase K em tampão Tris-HCl 0,01 M a pH 8 durante 20 min. Para inativar a peroxidase endógena, utilizou-se H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a 3% em soro fisiológico tamponado com TRIS (TBS) durante 30 min. As secções foram incubadas com desoxinucleotidil transferase terminal (TdT) e desoxinucleotídeos biotinilados durante 3 h a 37 ° C e, subsequentemente, com estreptavidina conjugada com peroxidase durante 45 min à temperatura ambiente. A reação foi revelada com diaminobenzidina (DAB, Sigma Aldrich, St. Louis, MO, EUA) em TBS por 2 min e as secções foram contra coradas com hematoxilina.

#### *Quantificação da expressão de VTG e receptores de estrógenos*

As marcações peroxidase-positivas para vitelogenina e receptores de estrógenos  $\alpha$  e  $\beta$ , foram quantificadas utilizando plugin "IHC toolbox" para o software Image J (NIH) (adaptado de Gupta et al., 2007). A seleção de cor foi utilizada para identificar manualmente a região de interesse com cor mais escura (DAB), isto é, reações positivas.

As regiões selecionadas foram isoladas e transformadas em imagens binárias, as quais foram posteriormente analisadas no software Image J. Os resultados foram expressos em porcentagem de área marcada (reações positivas) em relação ao campo total. Para cada biomarcador, 5 lâminas de cada tratamento foram selecionadas. De cada lâmina, 5 campos foram escolhidos aleatoriamente na ampliação de 100X e quantificadas as marcações positivas, totalizando 25 campos quantificados por tratamento.

#### *Análises estatísticas*

Os dados foram apresentados como médias  $\pm$  erro padrão (SE), e para comparar os dados entre os tratamentos, foi utilizado a análise de variância não-paramétrica de Kruskal-Wallis com pós-teste de Dunn. As análises foram realizadas pelo software Graphpad Prism 7.0 e todos os testes foram considerados significativos quando  $P < 0.05$ .

## **RESULTADOS**

#### *Dados biométricos e índices biológicos*

A análise dos dados biométricos dos 80 exemplares de *A. bimaculatus* utilizados no presente estudo mostra que o peso corporal e o comprimento total não variaram significativamente entre os tratamentos. Com relação aos índices biológicos, o índice hepatossomático (HSI) apresentou maiores valores no tratamento com estrona (E1) ( $p < 0.05$ ). Contrariamente, o índice gonadossomático (GSI) diminuiu significativamente nos três tratamentos: Estrona (E1), Bisfenol-A (BPA) e mistura (E1+BPA), apresentando os menores valores nos exemplares expostos a E1 ( $p < 0.05$ ). Os parâmetros físico-químicos da água não apresentaram variações entre os tratamentos mantendo-se estáveis durante todo o experimento (Tabela 2).

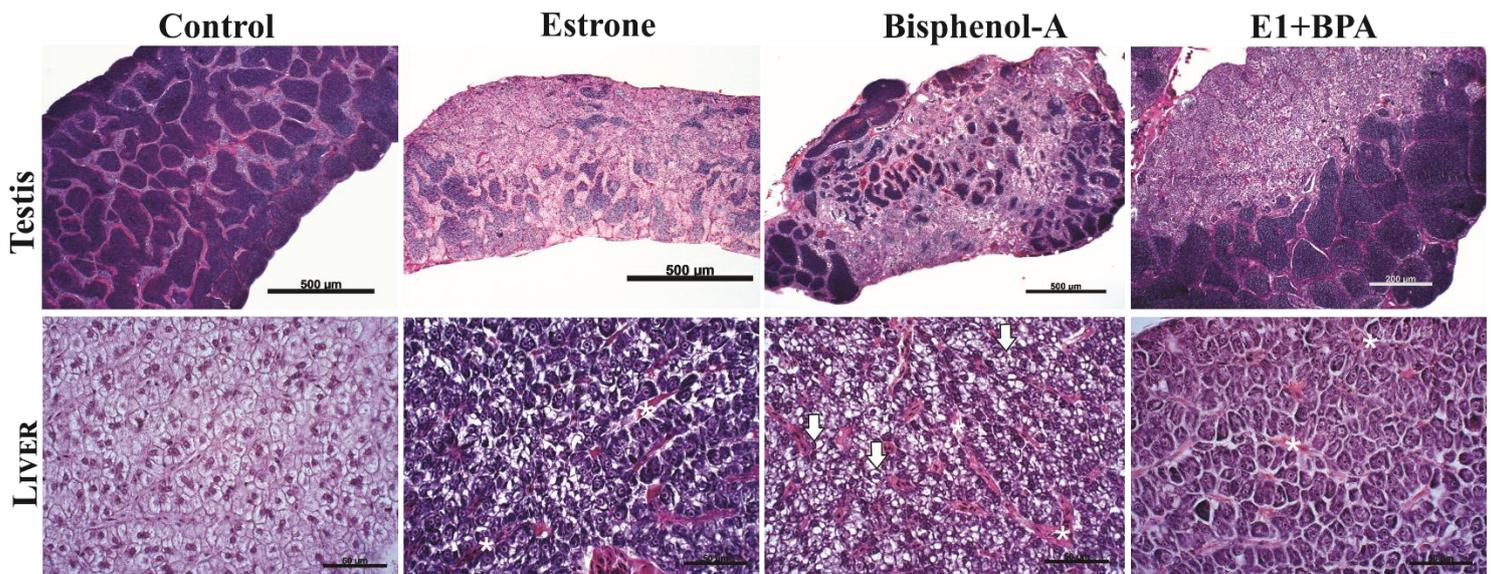
**Tabela 2** – Índices biológicos e parâmetros físico-químicos registrados durante o experimento nos machos adultos de *A. bimaculatus*

	<b>Control</b>	<b>E1</b>	<b>BPA</b>	<b>E1+BPA</b>
<i>Biometric data</i>				
<b>Body Weight (g)</b>	3.34 ± 0.33	4.19 ± 0.24	4.17 ± 0.37	3.71 ± 0.43
<b>Total Length (cm)</b>	6.08 ± 0.18	6.41 ± 0.14	6.46 ± 0.16	6.21 ± 0.13
<b>Hepatosomatic index</b>	1.30 ± 0.14	2.39 ± 0.34*	1.16 ± 0.09	1.75 ± 0.22
<b>Gonadosomatic Index</b>	2.21 ± 0.01	0.41 ± 0.07*	1.12 ± 0.13*	0.60 ± 0.08*
<b>Condition factor</b>	1.48 ± 0.05	1.49 ± 0.03	1.52 ± 0.04	1.50 ± 0.07
<i>Physical-chemical parameters</i>				
<b>Temperature (°C)</b>	26.5 ± 0.35	26.5 ± 0.35	26.5 ± 0.35	26.5 ± 0.35
<b>Dissolved Oxygen (ppm)</b>	5.0 ± 0.44	5.0 ± 0.44	5.0 ± 0.44	5.0 ± 0.44
<b>pH</b>	7.62 ± 0.24	7.62 ± 0.24	7.62 ± 0.24	7.62 ± 0.24
<b>Toxic ammoniun (ppm)</b>	0.08 ± 0.04	0.08 ± 0.04	0.08 ± 0.04	0.08 ± 0.04

\* = Diferença estatística com relação ao controle (p<0.05).

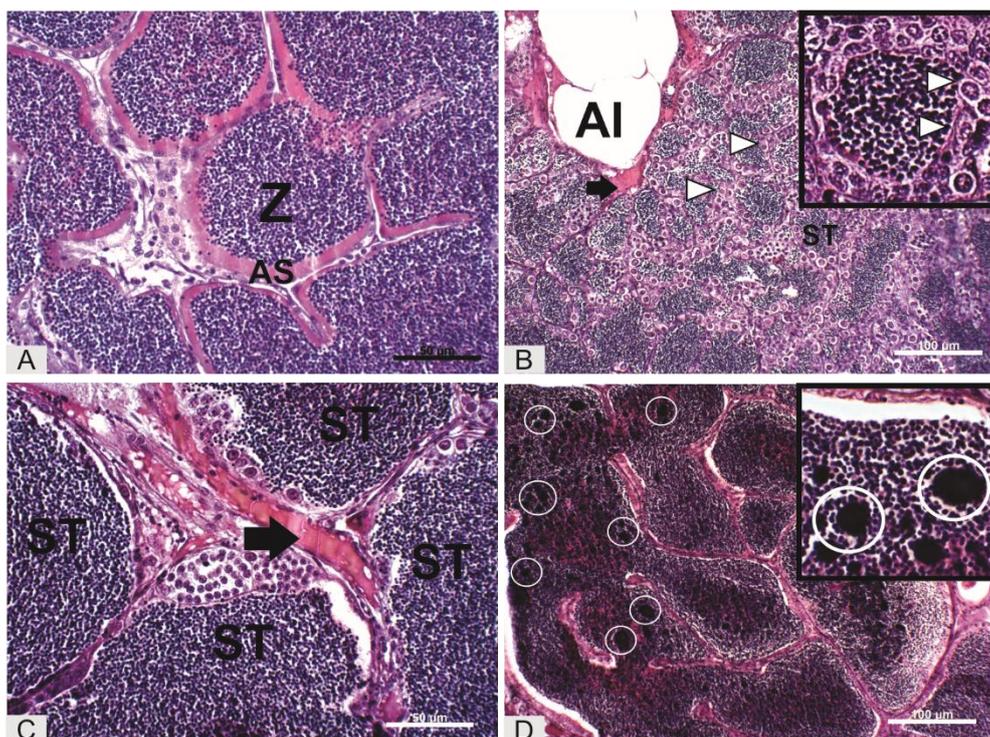
#### *Análises histológicas*

As amostras de fígado do grupo controle, apresentaram uma aparência normal do tecido, com hepatócitos arranjados em cordões, citoplasma homogêneo e levemente basófilo, além de capilares sinusoides pouco evidentes. Nas amostras dos grupos expostos aos compostos estrogênicos, as alterações observadas foram semelhantes, tais como: aumento da basofilia do citoplasma, dilatação e congestão dos capilares sinusoides. Além disso, no tratamento com bisfenol-A foram observados hepatócitos apresentando vacuolizações (Figura 1).



**Figura 1** – Análise histológica de testículo e fígado de *A. bimaculatus* expostos a diferentes compostos estrogênicos: Controle, Estrona, Bisfenol-A e a mistura deles, respectivamente. \*= Dilatação e congestão dos sinusoides; **Seta Branca**= vacuolização dos hepatócitos

Nas amostras de testículo, o grupo controle apresentou uma aparência normal com todas as amostras em maturação avançada, contendo poucos cistos de células da linhagem germinativa na parede dos túbulos seminíferos e lúmen cheios de espermatozoides. No entanto, nos tratamentos com os CE foi observado que os túbulos seminíferos apresentaram um desenvolvimento assincrônico, com alguns túbulos seminíferos apresentando maturação “inicial” e outros maturação “avançada” (Figura 1). Adicionalmente, foram detectadas outras histopatologias específicas para cada tratamento. Nos grupos E1 e BPA foram observadas as mesmas alterações histológicas nas gônadas, tais como: infiltração de adipócitos no tecido gonadal e presença de fluido proteináceo intersticial. O tratamento com a mistura além do desenvolvimento assincrônico, foi o único que apresentou a mineralização de espermatozoides (Figura 2). Vale ressaltar que em nenhum dos tratamentos a incidência de histopatologias no testículo atingiu mais de 30% da população total de peixes de cada tratamento (Tabela 3).



**Figura 2** – Secções de testículo mostrando exemplos de histopatologias detectadas nos tratamentos do presente estudo. (A) Controle: aparência normal dos túbulos seminíferos em maturação avançada, contendo poucos cistos de células germinativas e repletos de espermatozoides embebedos em secreção acidófila; (B) Secção apresentando proliferação de espermatogônias, presença de fluido proteináceo intersticial e infiltração de adipócitos; (C) Fluido proteináceo intersticial observado entre os túbulos seminíferos; (D) Mineralização de espermatozoides nos túbulos seminíferos. AS= Secreção acidófila; ST= Túbulos seminíferos; Z= espermatozoides; AI= Infiltração de adipócitos; Seta= Fluido proteináceo intersticial; Cabeça de seta= espermatogônias; VO= Ovócito vitelogênico; PNO= Ovócito perinucleolar; Círculos= Pontos de mineralização de espermatozoides. Barras de escala A e C= 50 µm; B e D= 100µm.

**Tabela 3** – Incidência de histopatologias gonadais associadas aos diferentes tratamentos com compostos estrogênicos (ECs) em machos de *A. bimaculatus*.

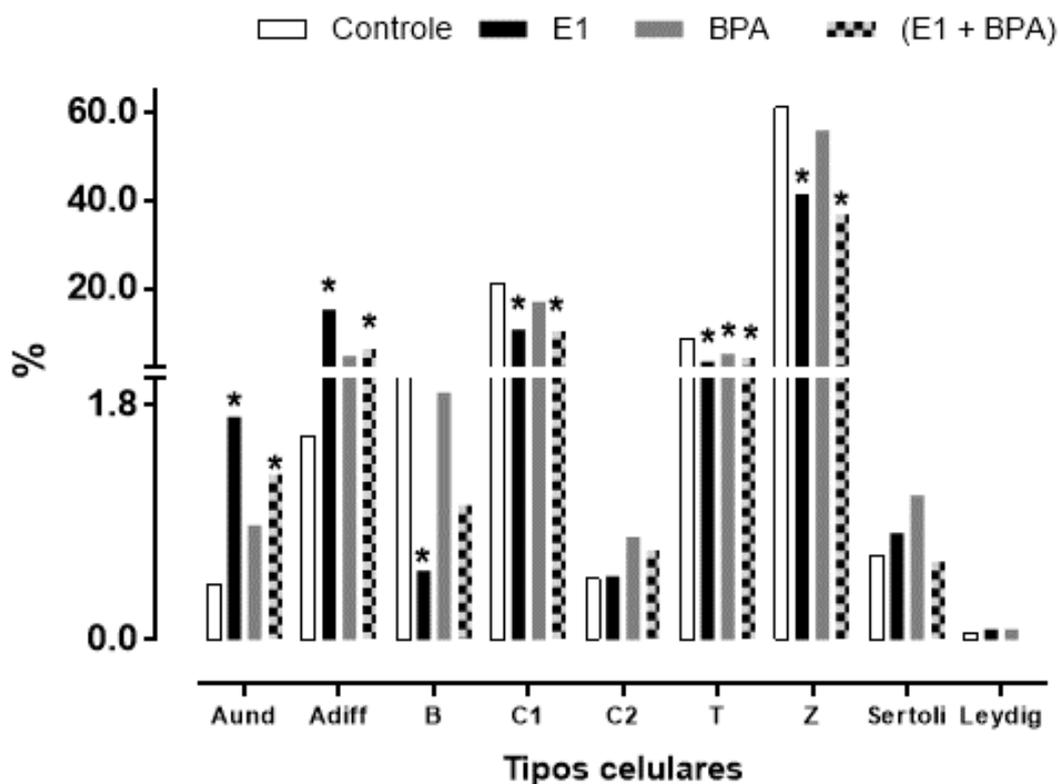
Condição/ ECs	Estrona (E1)	Bisfenol-A (BPA)	(E1 + BPA)
Fluído proteináceo intersticial	*	*	
Infiltração de adipócitos	*	*	
Desenvolvimento assincrônico	*	*	*
Mineralização de espermatozoides			*

\*= 0 - 30%; \*\*= 30 - 60%; \*\*\*= 60 - 100%

#### *Proporção volumétrica de células da linhagem espermatogênica*

A contagem de cada tipo celular da linhagem espermatogênica revelou algumas alterações na proporção volumétrica entre os diferentes tratamentos, quando

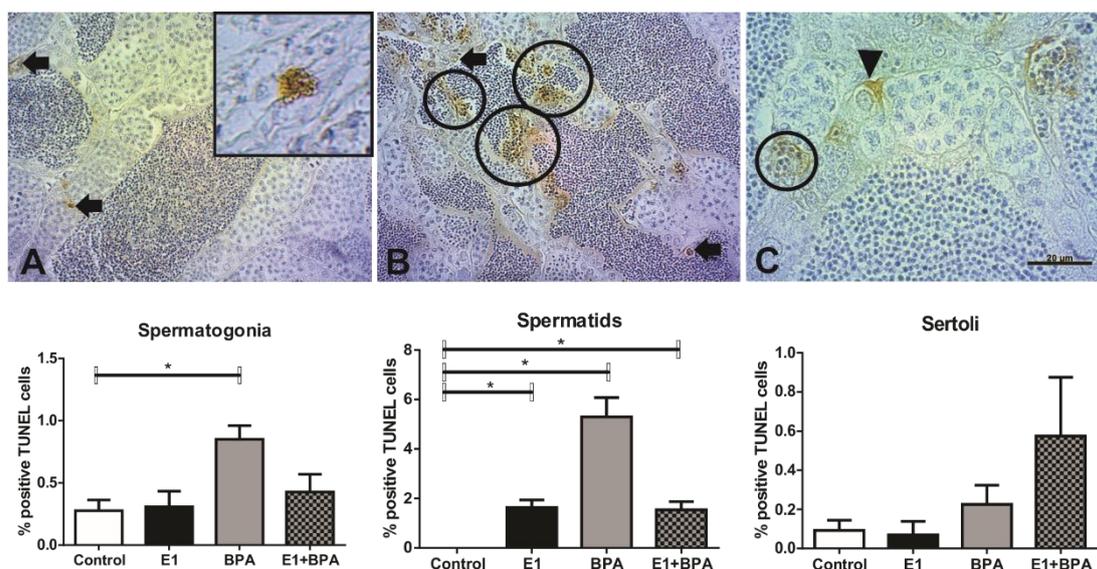
comparados ao controle. Foi observado uma elevação significativa no número de espermatogônias do tipo Aund e Adiff nos tratamentos E1 e mistura (E1+BPA), e do tipo B houve diminuição em E1. Com relação aos espermatócitos, houve uma diminuição nos espermatócitos primários nos tratamento com E1 e mistura. O número de espermátides diminuiu significativamente nos três tratamentos com compostos estrogênicos, porém a quantificação de espermatozoides mostrou uma diminuição apenas nos tratamentos com estrona e na mistura dos compostos. As células somáticas (Sertoli e Leydig) não variaram estatisticamente entre os tratamentos ( $p < 0.05$ ) (Figura 3).



**Figura 3** – Diferenças entre os tratamentos na proporção das células da linhagem espermatogênica: Espermatogônia A indiferenciada (Aund); Espermatogônia A diferenciada (Adiff); Espermatogônia B (B); Espermatócitos primário (C1) e secundário (C2); Espermátide (T); Espermatozoides (Z); células de Sertoli e Leydig. \*= diferença significativa com relação ao controle.

### Apoptose

Nas amostras de testículos provenientes do tratamento controle foram observadas raras células da linhagem espermatogênica em apoptose (TUNEL-positivas). Nos tratamentos com os compostos estrogênicos e a mistura deles foi observado um aumento de apoptose em espermatogônias, espermatídes e células de Sertoli. Em E1 e na mistura, houve aumento apenas em espermatídes, já os peixes expostos a BPA apresentaram elevação significativa na apoptose de espermatogônias e espermatídes ( $p < 0.05$ ). Nas células de Sertoli, apesar de não apresentar diferença estatística entre os tratamentos e o controle, foi observado uma tendência a elevação da taxa de apoptose nos tratamentos com BPA e na Mistura (Figura 4).

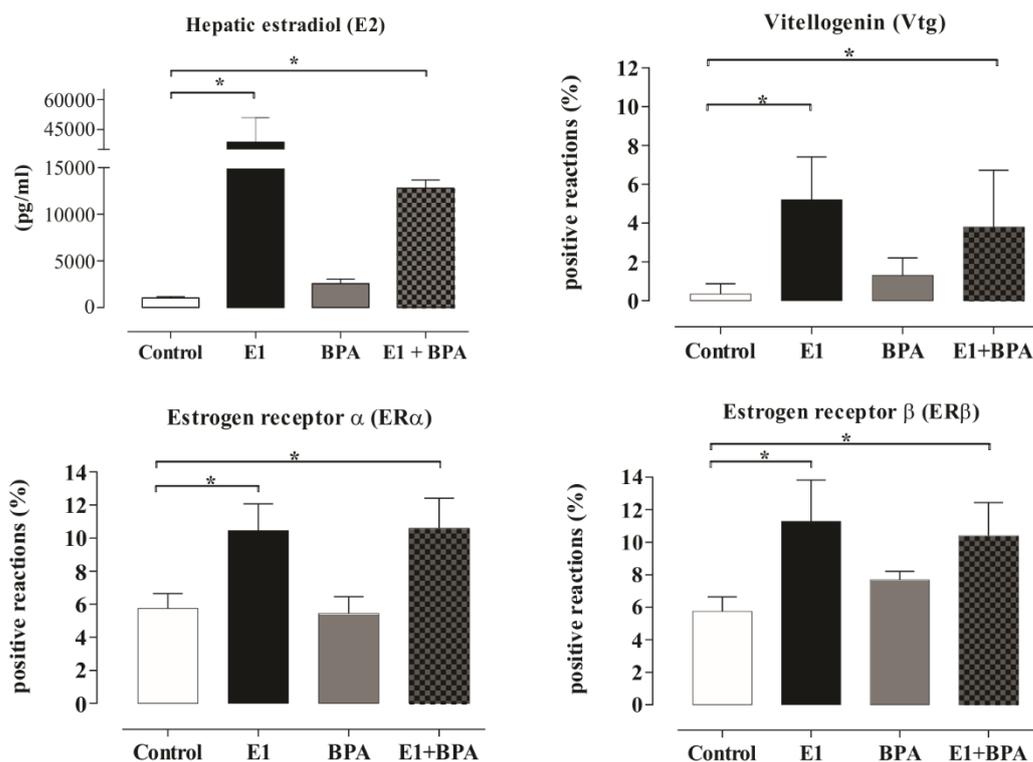


**Figura 4** – Reações TUNEL-positivas indicando espermatogônias, espermatídes e células de Sertoli em apoptose nas amostras de testículo de *A. bimaculatus* nos diferentes tratamentos. (A) Espermatogônias túnel-positivas; (B) apoptose em espermatídes e espermatogônias; (C) apoptose em célula de Sertoli e espermatídes. **Seta preta**= espermatogônias em apoptose; **cabeça de seta**= célula de Sertoli em apoptose; \*= diferenças significativas entre os tratamentos ( $P < 0.05$ ).

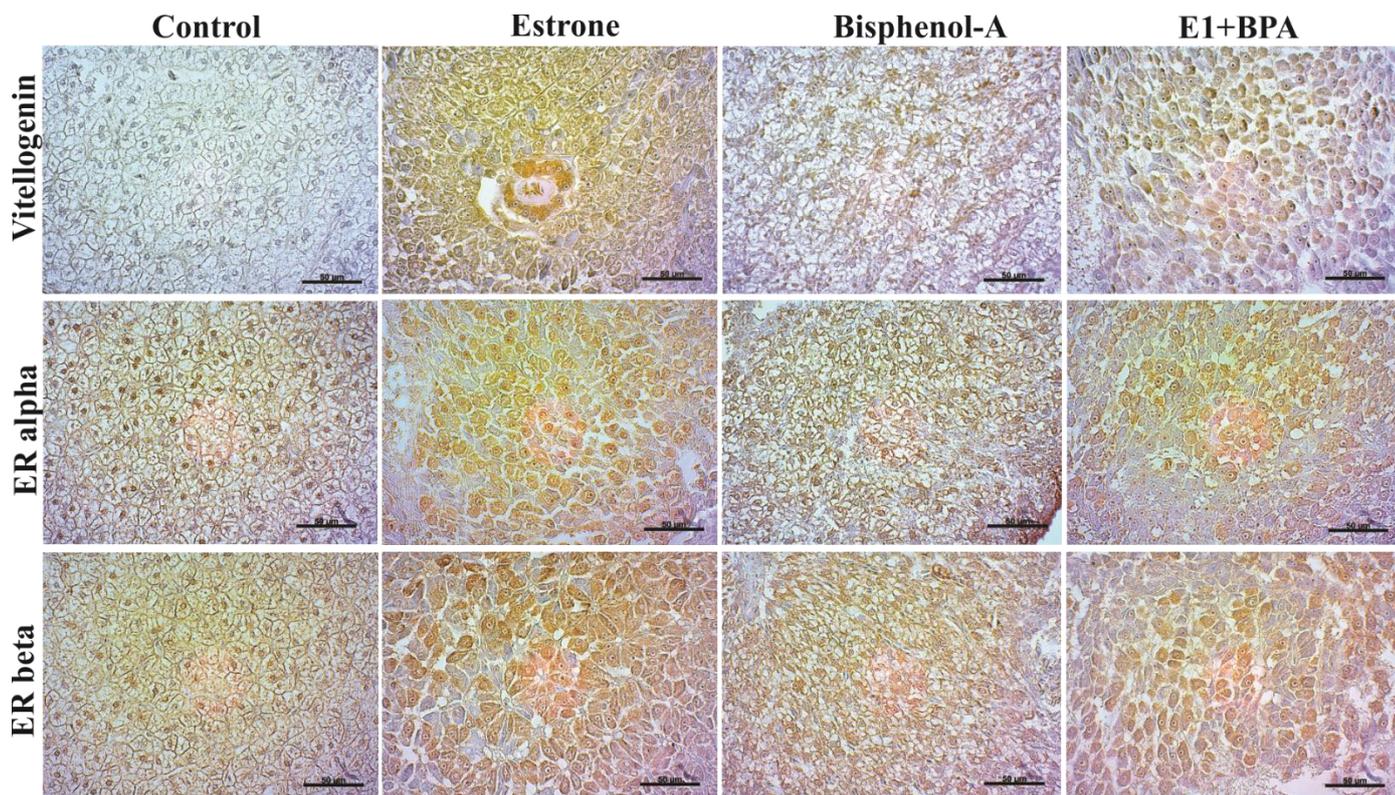
### Níveis de Estradiol e expressão de biomarcadores de desregulação endócrina

A análise da expressão hepática de estradiol apresentou variações significativas entre os tratamentos com compostos estrogênicos. Foram observadas elevações

significativas nos tratamentos E1 e E1+BPA, quando comparados ao controle ( $P < 0.05$ ). No tratamento apenas utilizando Bisfenol-A não foi observada elevação significativa na concentração de E2 no fígado. Da mesma forma, a expressão de vitelogenina e receptores de estrógeno  $\alpha$  e  $\beta$ , variaram significativamente apenas nos tratamentos com estrona e na mistura (Figuras 5 e 6).



**Figura 5** – Nível hepático de estradiol (E2) e quantificação de marcações peroxidase-positivas de vitelogenina (Vtg) e receptores de estrógeno  $\alpha$  e  $\beta$ , após exposição subaguda a estrona (E1), Bisfenol-A (BPA) e a mistura deles (E1+BPA). \*= diferença significativa entre os tratamentos ( $P < 0.05$ ).



**Figura 6** – Marcações peroxidase-positivas no fígado de *A. bimaculatus* para vitelogenina (Vtg) e receptores de estrógeno  $\alpha$  e  $\beta$ , após exposição subaguda a estrona (E1), Bisfenol-A (BPA) e a mistura deles (E1+BPA). Aumento de 40X e barra de escala = 50 $\mu$ m

## DISCUSSÃO

Nas últimas décadas, estudos realizados em ambiente natural e laboratório mostraram os efeitos de diversas substâncias estrogênicas sobre a reprodução de peixes, porém a maioria deles analisando individualmente cada uma. Apesar desse tipo de abordagem ter importância toxicológica relevante, o cenário observado em diversos ecossistemas aquáticos no mundo é de uma complexa mistura onde são encontrados diversos tipos de poluentes (Brian et al., 2007; Silva et al., 2012). Ainda que raros em peixes neotropicais, o estudo de misturas é importante para o melhor entendimento dos mecanismos de ação dos poluentes. No presente estudo, foram observadas diferenças marcantes nas respostas de *A. bimaculatus* após exposição subaguda à estrona, Bisfenol-A e a mistura deles. Diversos estudos já mostraram que Bisfenol-A e estrona apresentam efeitos estrogênicos em diferentes espécies de peixes de água doce (Ankley

et al., 2017; Faheem et al., 2017; Guan et al., 2019; Lei et al., 2013; Zhang et al., 2018), porém nosso estudo é dos poucos a comparar a capacidade estrogênica dessas duas substâncias e a influência delas no processo reprodutivo de peixes de água doce.

O fígado de peixes é o principal órgão envolvido no processo de detoxificação, e a análise histológica deste tecido pode fornecer indícios importantes sobre o status de saúde do organismo (Faheem et al., 2016; Moon et al., 2012). Em *A. bimaculatus*, foi detectado um aumento significativo do volume hepático apenas no tratamento com E1. Alguns autores relacionam essa condição à alta capacidade de estrógenos naturais, como estrona-E1 e estradiol-E2, em induzir a produção de vitelogenina nos hepatócitos, aumentando assim o volume do órgão (Joon Kang et al., 2002; Sun et al., 2009). Essa condição também foi observada no presente estudo e discutida posteriormente. Microscopicamente foram detectadas histopatologias semelhantes nos fígados de todos os tratamentos com os ECs, como dilatação e congestão dos sinusoides, e o aumento da basofilia nos hepatócitos. Essas alterações histológicas também podem estar relacionadas com o aumento da síntese hepática de proteínas para metabolização de poluentes ou até mesmo no aumento da síntese de vitelogenina e proteínas de zona radiata induzidas pela ação estrogênica (Van Der Ven et al., 2003; Wolf and Wheeler, 2018).

Dentre os índices biológicos, o GSI é um importante indicador reprodutivo e alterações neste índice é frequentemente relacionada à desregulação endócrina em peixes (Bahamonde et al., 2015; Ibor et al., 2016; Paschoalini et al., 2019; A. Weber et al., 2017). Em todos os tratamentos do presente estudo foi observada uma redução significativa do volume gonadal – índice gonadossomático. Adicionalmente a isso, a análise histológica dos testículos mostrou que em todas as exposições foram detectadas histopatologias reportadas em peixes expostos a compostos estrogênicos, como:

presença de fluido proteináceo intersticial (Silva et al., 2012; Wolf and Wheeler, 2018), infiltração de adipócitos (Luzio et al., 2016), desenvolvimento assincrônico dos cistos de células espermatogênicas (OECD, 2009; Van Der Ven et al., 2007) e mineralização de espermatozoides (Luzio et al., 2016; OECD, 2009). Mesmo sendo um composto menor capacidade estrogênica que a estrona, (Elango et al., 2006; Kuiper et al., 1998), no tratamento com BPA foram detectadas as mesmas histopatologias gonadais observadas em E1.

Além das alterações histológicas, diversos estudos recentes mostraram que machos expostos a compostos estrogênicos apresentaram alterações na dinâmica da gametogênese, como por exemplo o aumento significativo na proporção de espermatogônias, células testiculares sabidamente dependentes de estrógenos para auto renovação e diferenciação (Ibor et al., 2016; Paschoalini et al., 2019; Silva et al., 2012; Weber et al., 2017). Resultados semelhantes também foram observados no presente estudo, principalmente nos tratamentos com E1 e na mistura, onde foram detectadas variações significativas com relação ao controle, como: o aumento no número de espermatogônias do tipo A, e redução significativa dos espermatócitos, espermátides e espermatozoides. Por outro lado, no tratamento somente com BPA foi observado somente a redução no número de espermátides em relação ao controle. Essa alteração na espermatogênese pode estar relacionada com o aumento na atividade de aromatase (CYP19A), enzima responsável pela conversão de testosterona em estradiol, aumentando assim a proliferação de espermatogônias. Além disso, o aumento na concentração de estrógenos no organismo pode promover a diminuição na produção de andrógenos, afetando também a dinâmica das células germinativas dependentes de andrógenos nas fases finais da espermatogênese, i.e espermátides e espermatozoides (de Almeida et al., 2018; Martins-Santos et al., 2017; Schulz et al., 2010; Weber et al., 2019).

A elevação nos níveis de vitelogenina em machos, é um biomarcador amplamente utilizado na detecção de desregulação endócrina causada por compostos estrogênicos em peixes (Jobling et al., 1998; Jones et al., 2000; Prado et al., 2011; Weber et al., 2017). Em nosso estudo foi observado uma tendência de aumento na expressão de VTG em todos os tratamentos, porém o aumento foi significativo apenas no tratamento com estrona e na mistura. Além disso, o mesmo padrão de expressão foi observado para os receptores de estrógenos  $\alpha$  e  $\beta$ .

A dosagem de estradiol-E2 no fígado dos machos confirmou que a estrona-E1 de forma isolada possui uma maior capacidade de estimulação estrogênica que BPA e a mistura. Em um estudo sobre os efeitos da combinação de E1 e E2 em *Carassius auratus*, Yan et al., (2013) observou que quando misturados, os estrógenos possuíam seus efeitos potencializados, aumentando ainda mais os níveis de VTG. No entanto, contrariamente a isso, nossos dados mostram que no tratamento com a mistura houve uma queda na expressão de E2, VTG, ER $\alpha$  e ER $\beta$ , comparando com E1 de forma isolada. Na toxicologia ambiental, são considerados efeitos sinérgicos quando o efeito da mistura é maior que a soma dos efeitos das substâncias de forma isolada (Sisinno and Oliveira-filho, 2013). Essa diminuição da ação estrogênica quando os E1 e BPA estão em mistura, pode estar relacionada a atuação anti-estrogênica de BPA em receptores de estrógeno  $\alpha$  observada por Hisahiko Hiroi et al. (1999). Neste sentido, os resultados do presente estudo indicam que E1 e BPA misturados em concentrações iguais, não apresentam efeitos sinérgicos sobre a biologia reprodutiva de *A. bimaculatus*.

Em uma análise integrada e comparativa dos resultados, nossos dados confirmam que a estrona possui um potencial estrogênico superior ao Bisfenol-A, quando administrados na mesma concentração em *A. bimaculatus*. BPA é conhecido como um mimetizador de estrógenos, porém sua afinidade por receptores de

estrógeno  $\beta$  é cerca de 1000 vezes menor que os estrógenos endógenos (Elango et al., 2006; Kuiper et al., 1998). Diferentemente do tratamento com a estrona e na mistura, em BPA não foi diagnosticada a desregulação endócrina nos machos de *A. bimaculatus*. Apesar de ter diminuído significativamente o GSI, Bisfenol-A não alterou os outros “endpoints” reprodutivos analisados. Nossos dados sugerem que a diminuição do GSI causada por BPA, provavelmente está relacionada com o aumento da taxa de apoptose nas gônadas, diminuindo assim o número de células e consequentemente o volume do órgão. Além disso, a análise da apoptose nos testículos e das histopatologias hepáticas e gonadais no presente estudo, sugerem que BPA possui maior citotoxicidade que a Estrona. De fato, Janz and Van Der Kraak (1997) e Wood and Van Der Kraak (2002) mostram que hormônios naturais e fatores de crescimento podem atuar como fatores anti-apoptóticos nas gônadas de peixes, fato que pode explicar a baixa taxa de apoptose no tratamento com estrona e na mistura, quando comparados a BPA de forma isolada.

Em suma, os resultados do presente estudo mostram que substâncias analisadas isoladamente podem apresentar comportamento diferente de quando administradas com outras substâncias. Este tipo de abordagem experimental, ainda que raras, são importantes para ampliar o conhecimento sobre a desregulação endócrina em peixes neotropicais e o entendimento sobre o comportamento de misturas de poluentes, situação frequentemente observada em ecossistemas aquáticos no mundo.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Almeida, E.A. de, Ribeiro, C.A.O., 2014. Pollution and Fish Health in Tropical Ecosystems.
- Ankley, G.T., Feifarek, D., Blackwell, B., Cavallin, J.E., Jensen, K.M., Kahl, M.D., Poole, S., Randolph, E., Saari, T., Villeneuve, D.L., 2017. Re-evaluating the Significance of Estrone as an Environmental Estrogen. *Environ. Sci. Technol.* 51, 4705–4713. doi:10.1021/acs.est.7b00606
- Arantes, F.P., Santos, H.B., Rizzo, E., Sato, Y., Bazzoli, N., 2010. Profiles of sex steroids, fecundity, and spawning of the curimatã-pacu *Prochilodus argenteus* in the São Francisco River, downstream from the Três Marias Dam, Southeastern Brazil. *Anim. Reprod. Sci.* 118, 330–336. doi:10.1016/j.anireprosci.2009.07.004
- Archer, E., Petrie, B., Kasprzyk-Hordern, B., Wolfaardt, G.M., 2017. The fate of pharmaceuticals and personal care products (PPCPs), endocrine disrupting contaminants (EDCs), metabolites and illicit drugs in a WWTW and environmental waters. *Chemosphere* 174, 437–446. doi:10.1016/j.chemosphere.2017.01.101
- Bahamonde, P.A., Fuzzen, M.L., Bennett, C.J., Tetreault, G.R., McMaster, M.E., Servos, M.R., Martyniuk, C.J., Munikitrick, K.R., 2015. Whole organism responses and intersex severity in rainbow darter (*Etheostoma caeruleum*) following exposures to municipal wastewater in the Grand River basin, ON, Canada. Part A. *Aquat. Toxicol.* 159, 290–301.
- Baldisserotto, B., Gomes, L.C., 2005. Espécies nativas para a piscicultura no Brasil, in: *Espécies Nativas Para a Piscicultura No Brasil*. p. 470. doi:10.1590/S1679-62252006000300010
- Beato, M., Truss, M., Chavez, S., 1996. Control of transcription by steroid hormones. *Ann NY Acad Sci.*
- Brasil. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística - IBGE, 2010. Pesquisa Nacional de Saneamento Básico 2008, Ministério das cidades. doi:978-85-240-4135-8
- Brian, J. V., Harris, C.A., Scholze, M., Kortenkamp, A., Booy, P., Lamoree, M., Pojana, G., Jonkers, N., Marcomini, A., Sumpter, J.P., 2007. Evidence of estrogenic mixture effects on the reproductive performance of fish. *Environ. Sci. Technol.* 41, 337–344. doi:10.1021/es0617439
- Cheshenko, K., Pakdel, F., Segner, H., Kah, O., Eggen, R.I.L., 2008. Interference of endocrine disrupting chemicals with aromatase CYP19 expression or activity, and consequences for reproduction of teleost fish. *Gen. Comp. Endocrinol.* 155, 31–62. doi:10.1016/j.ygcen.2007.03.005
- Crain, D.A., Eriksen, M., Iguchi, T., Jobling, S., Laufer, H., LeBlanc, G.A., Guillette, L.J., 2007. An ecological assessment of bisphenol-A: Evidence from comparative biology. *Reprod. Toxicol.* 24, 225–239. doi:10.1016/j.reprotox.2007.05.008
- de Almeida, M.D., Pereira, T.S.B., Batlouni, S.R., Boscolo, C.N.P., de Almeida, E.A., 2018. Estrogenic and anti-androgenic effects of the herbicide tebuthiuron in male Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Aquat. Toxicol.* doi:10.1016/j.aquatox.2017.11.006
- Dzieweczynski, T.L., Hebert, O.L., 2013. The effects of short-term exposure to an endocrine disrupter on behavioral consistency in male juvenile and adult siamese

- fighting fish. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 64, 316–326. doi:10.1007/s00244-012-9820-1
- Elango, A., Shepherd, B., Chen, T.T., 2006. Effects of endocrine disrupters on the expression of growth hormone and prolactin mRNA in the rainbow trout pituitary. *Gen. Comp. Endocrinol.* doi:10.1016/j.ygcen.2005.08.003
- Faheem, M., Jahan, N., Lone, K.P., 2016. Histopathological effects of bisphenol-a on liver, kidneys and gills of Indian major carp, *Catla catla* (Hamilton, 1822). *J. Anim. Plant Sci.* 26, 514–522.
- Faheem, M., Khaliq, S., Lone, K.P., 2017. Disruption of the Reproductive Axis in Freshwater Fish, *Catla catla*, After Bisphenol-A Exposure. *Zoolog. Sci.* 34, 438–444. doi:10.2108/zs170009
- Falconer, I.R., Chapman, H.F., Moore, M.R., Ranmuthugala, G., 2006. Endocrine-disrupting compounds: A review of their challenge to sustainable and safe water supply and water reuse. *Environ. Toxicol.* doi:10.1002/tox.20172
- Felizardo, V.O., Murgas, L.D.S., Andrade, E.S., López, P.A., Freitas, R.T.F., Ferreira, M.R., 2012. Effect of timing of hormonal induction on reproductive activity in lambari (*Astyanax bimaculatus*). *Theriogenology* 77, 1570–1574. doi:10.1016/j.theriogenology.2011.11.025
- Fenske, M., Maack, G., Schäfers, C., Segner, H., 2005. An environmentally relevant concentration of estrogen induces arrest of male gonad development in zebrafish, *Danio rerio*. *Environ. Toxicol. Chem.* 24, 1088–1098. doi:10.1897/04-096R1.1
- Francis, R.C., 1992. Sexual Lability in Teleosts: Developmental Factors. *Q. Rev. Biol.* 67, 1–18. doi:10.1086/417445
- Franco de Camargo, S.A., Petrere Jr, M., 2001. Social and financial aspects of the artisanal fisheries of middle Sao Francisco river, Minas Gerais, Brazil. *Fish. Manag. Ecol.* 8, 163–171. doi:10.1046/j.1365-2400.2001.00246.x
- Gray, J.S., 2002. Biomagnification in marine systems: The perspective of an ecologist, in: *Marine Pollution Bulletin*. pp. 46–52. doi:10.1016/S0025-326X(01)00323-X
- Guan, Y., Zhang, T., He, J., Jia, J., Zhu, L., Wang, Z., 2019. Bisphenol A disturbed the lipid metabolism mediated by sterol regulatory element binding protein 1 in rare minnow *Gobiocypris rarus*. *Aquat. Toxicol.* 207, 179–186. doi:10.1016/j.aquatox.2018.12.011
- Hachfi, L., Couvray, S., Simide, R., Tarnowska, K., Pierre, S., Gaillard, S., Richard, S., Coupe, S., Grillasca, J.-P., Prevot-D'Alvise, N., 2012. Impact of Endocrine Disrupting Chemicals [ EDCs ] on Hypothalamic-Pituitary-Gonad-Liver [ HPGL ] Axis in Fish. *World J. Fish Mar. Sci.* 4, 14–30. doi:10.5829/idosi.wjfm.2012.04.01.6138
- Heldring, N., Pike, A., Andersson, S., Matthews, J., Cheng, G., Hartman, J., Tujague, M., Strom, A., Treuter, E., Warner, M., Gustafsson, J.A., 2007. Estrogen receptors: how do they signal and what are their targets. *Physiol Rev.* doi:10.1152/physrev.00026.2006
- Hu, J., Jin, F., Wan, Y., Yang, M., An, L., An, W., Tao, S., 2005. Trophodynamic behavior of 4-nonylphenol and nonylphenol polyethoxylate in a marine aquatic food web from Bohai Bay, North China: Comparison to DDTs. *Environ. Sci.*

Technol. 39, 4801–4807. doi:10.1021/es048735h

- Huang, Y.Q., Wong, C.K.C., Zheng, J.S., Bouwman, H., Barra, R., Wahlström, B., Neretin, L., Wong, M.H., 2012. Bisphenol A (BPA) in China: A review of sources, environmental levels, and potential human health impacts. *Environ. Int.* 42, 91–99. doi:10.1016/j.envint.2011.04.010
- Hutchinson, T.H., Ankley, G.T., Segner, H., Tyler, C.R., 2006. Screening and testing for endocrine disruption in fish-biomarkers as “signposts,” not “traffic lights,” in risk assessment. *Environ. Health Perspect.* 114, 106–114. doi:10.1289/ehp.8062
- Ibor, O.R., Adeogun, A.O., Fagbohun, O.A., Arukwe, A., 2016. Gonadohistopathological changes, intersex and endocrine disruptor responses in relation to contaminant burden in Tilapia species from Ogun River, Nigeria. *Chemosphere* 164, 248–262.
- Janz, D.M., Van Der Kraak, G., 1997. Suppression of apoptosis by gonadotropin, 17 $\beta$ -estradiol, and epidermal growth factor in rainbow trout preovulatory ovarian follicles. *Gen. Comp. Endocrinol.* doi:10.1006/gcen.1996.6820
- Jobling, S., Nolan, M., Tyler, C.R., Brighty, G., Sumpter, J.P., 1998. Widespread sexual disruption in wild fish. *Environ. Sci. Technol.* 32, 2498–2506. doi:10.1021/es9710870
- Johnson, A.C., Williams, R.J., Matthiessen, P., 2006. The potential steroid hormone contribution of farm animals to freshwaters, the United Kingdom as a case study. *Sci. Total Environ.* 362, 166–178. doi:10.1016/j.scitotenv.2005.06.014
- Jones, P.D., De Coen, W.M., Tremblay, L., Giesy, J.P., 2000. Vitellogenin as a biomarker for environmental estrogens. *Water Sci. Technol.* 42, 1–14.
- Joon Kang, I., Yokota, H., Oshima, Y., Tsuruda, Y., Yamaguchi, T., Maeda, M., Imada, N., Tadokoro, H., Honjo, T., 2002. Effect of 17 $\beta$ -estradiol on the reproduction of Japanese medaka (*Oryzias latipes*). *Chemosphere* 47, 71–80. doi:10.1016/S0045-6535(01)00205-3
- Kidd, K.A., Blanchfield, P.J., Mills, K.H., Palace, V.P., Evans, R.E., Lazorchak, J.M., Flick, R.W., 2007. Collapse of a fish population after exposure to a synthetic estrogen. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 104, 8897–8901. doi:10.1073/pnas.0609568104
- Kime, D.E., 1999. A strategy for assessing the effects of xenobiotics on fish reproduction. *Sci. Total Environ.* doi:10.1016/S0048-9697(98)00328-3
- Klecka, G.M., Staples, C. a, Clark, K.E., Van der Hoeven, N., Thomas, D.E., Hentges, S.G., 2009. Exposure analysis of bisphenol A in surface water systems in North America and Europe. *Environ. Sci. Technol.* doi:10.1021/es900598e
- Kuiper, G.G.J.M., Lemmen, J.G., Carlsson, B., Corton, J.C., Safe, S.H., Van Der Saag, P.T., Van Der Burg, B., Gustafsson, J.Å., 1998. Interaction of estrogenic chemicals and phytoestrogens with estrogen receptor  $\beta$ . *Endocrinology.* doi:10.1210/endo.139.10.6216
- Leet, J.K., Gall, H.E., Sepúlveda, M.S., 2011. A review of studies on androgen and estrogen exposure in fish early life stages: effects on gene and hormonal control of sexual differentiation. *J. Appl. Toxicol.* 31, 379–98. doi:10.1002/jat.1682
- Lei, B., Wen, Y., Wang, X., Zha, J., Li, W., Wang, Z., Sun, Y., Kang, J., Wang, Y.,

2013. Effects of estrone on the early life stages and expression of vitellogenin and estrogen receptor genes of Japanese medaka (*Oryzias latipes*). *Chemosphere* 93, 1104–1110. doi:10.1016/j.chemosphere.2013.06.025
- Lewis, M., Pryor, R., Wilking, L., 2011. Fate and Effects of anthropogenic chemicals in mangrove ecosystems: A review. *Environ. Pollut.* 159, 2328–2346. doi:DOI 10.1016/j.envpol.2011.04.027
- Li, D., Xie, L., Cao, J., Chen, H., Cedergreen, N., Xie, H., Li, L., Chen, Q., 2015. The chronic effects of lignin-derived bisphenol and bisphenol A in Japanese medaka *Oryzias latipes*. *Aquat. Toxicol.* 170, 199–207. doi:10.1016/j.aquatox.2015.11.024
- Lima FCT, Malabarba LR, Buckup PA, Silva JFP, Vari RP, Harold A, Benine R, Oyakawa OT, Pavanelli CS, Menezes NA, et al. 2003. Genera incertae sedis in Characidae. In: Reis RE, Kullander SO, Ferraris CJ Jr., editors. Check list of the freshwater fishes of South and Central America. Porto Alegre: EDIPUCRS; p. 106–169.
- Luzio, A., Monteiro, S.M., Rocha, E., Fontáinhas-Fernandes, A.A., Coimbra, A.M., 2016. Development and recovery of histopathological alterations in the gonads of zebrafish (*Danio rerio*) after single and combined exposure to endocrine disruptors (17 $\alpha$ -ethinylestradiol and fadrozole). *Aquat. Toxicol.* 175, 90–105. doi:10.1016/j.aquatox.2016.03.014
- Martins-Santos, E., Pimenta, C.G., Campos, P.R.N., Franco, M.B., Gomes, D.A., Mahecha, G.A.B., Oliveira, C.A., 2017. Persistent testicular structural and functional alterations after exposure of adult rats to atrazine. *Reprod. Toxicol.* doi:10.1016/j.reprotox.2017.08.010
- Martins, S.E., Bianchini, A., 2011. Toxicity tests aiming to protect Brazilian aquatic systems: current status and implications for management. *J. Environ. Monit.* 13, 1866–1875. doi:10.1039/c0em00787k
- Metcalfe, C.D., Metcalfe, T.L., Kiparissis, Y., Koenig, B.G., Khan, C., Hughes, R.J., Croley, T.R., March, R.E., Potter, T., 2001. Estrogenic potency of chemicals detected in sewage treatment plant effluents as determined by in vivo assays with Japanese medaka (*Oryzias latipes*). *Environ. Toxicol. Chem.* 20, 297–308. doi:10.1002/etc.5620200210
- Moon, M.K., Kim, M.J., Jung, I.K., Koo, Y. Do, Ann, H.Y., Lee, K.J., Kim, S.H., Yoon, Y.C., Cho, B.J., Park, K.S., Jang, H.C., Park, Y.J., 2012. Bisphenol A impairs mitochondrial function in the liver at doses below the no observed adverse effect level. *J. Korean Med. Sci.* doi:10.3346/jkms.2012.27.6.644
- Nagahama, Y., Yamashita, M., 2008. Regulation of oocyte maturation in fish. *Dev Growth Differ* 50 Suppl 1, S195-219. doi:DGD1019 [pii]r10.1111/j.1440-169X.2008.01019.x
- Nelson, E.R., Habibi, H.R., 2013. Estrogen receptor function and regulation in fish and other vertebrates. *Gen. Comp. Endocrinol.* 192, 15–24. doi:10.1016/j.ygcen.2013.03.032
- OECD, 2009. OECD Guidance document for the diagnosis of endocrine-related histopathology of fish gonads. OECD Environ. Heal. Saf. Publ. Ser. Test. Assess. 1–42.

- Okuzawa, K., Gen, K., Bruysters, M., Bogerd, J., Gothilf, Y., Zohar, Y., Kagawa, H., 2003. Seasonal variation of the three native gonadotropin-releasing hormone messenger ribonucleic acids levels in the brain of female red seabream. *Gen. Comp. Endocrinol.* 130, 324–332. doi:10.1016/S0016-6480(02)00629-9
- Overturf, M.D., Anderson, J.C., Pandelides, Z., Beyger, L., Holdway, D.A., 2015. Pharmaceuticals and personal care products: A critical review of the impacts on fish reproduction. *Crit. Rev. Toxicol.* 45, 469–491. doi:10.3109/10408444.2015.1038499
- Paschoalini, A.L., Perini, V. da R., Ribeiro, D.M., Formagio, P.S., Rizzo, E., Bazzoli, N., 2013. Reproduction of *pimelodus maculatus* (Siluriformes: Pimelodidae) in three section of Grande river basin, Downstream Porto Colombia Dam, South-Eastern Brazil. *Neotrop. Ichthyol.* 11, 615–623. doi:10.1590/S1679-62252013000300015
- Paschoalini, A.L., Savassi, L.A., Arantes, F.P., Rizzo, E., Bazzoli, N., 2019a. Heavy metals accumulation and endocrine disruption in *Prochilodus argenteus* from a polluted neotropical river. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 169, 539–550. doi:10.1016/j.ecoenv.2018.11.047
- Paschoalini, A.L., Savassi, L.A., Arantes, F.P., Rizzo, E., Bazzoli, N., 2019b. Heavy metals accumulation and endocrine disruption in *Prochilodus argenteus* from a polluted neotropical river. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* doi:10.1016/j.ecoenv.2018.11.047
- Pojana, G., Gomiero, A., Jonkers, N., Marcomini, A., 2007. Natural and synthetic endocrine disrupting compounds (EDCs) in water, sediment and biota of a coastal lagoon. *Environ. Int.* 33, 929–936. doi:10.1016/j.envint.2007.05.003
- Prado, P.S., Pinheiro, A.P.B., Bazzoli, N., Rizzo, E., 2014. Reproductive biomarkers responses induced by xenoestrogens in the characid fish *Astyanax fasciatus* inhabiting a South American reservoir: An integrated field and laboratory approach. *Environ. Res.* 131, 165–173. doi:10.1016/j.envres.2014.03.002
- Prado, P.S., Souza, C.C., Bazzoli, N., Rizzo, E., 2011. Reproductive disruption in lambari *Astyanax fasciatus* from a Southeastern Brazilian reservoir. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 74, 1879–1887. doi:10.1016/j.ecoenv.2011.07.017
- Rancière, F., Lyons, J.G., Loh, V.H.Y., Botton, J., Galloway, T., Wang, T., Shaw, J.E., Magliano, D.J., 2015. Bisphenol A and the risk of cardiometabolic disorders: A systematic review with meta-analysis of the epidemiological evidence. *Environ. Heal. A Glob. Access Sci. Source* 14. doi:10.1186/s12940-015-0036-5
- Reis, R.E., Kullander, S.O., Ferraris, C.J., 2003. Check List of the Freshwater Fishes of South and Central America, Copeia. doi:10.1643/OT-04-142
- Rogers, J.A., Metz, L., Yong, V.W., 2013. Review: Endocrine disrupting chemicals and immune responses: A focus on bisphenol-A and its potential mechanisms. *Mol. Immunol.* 53, 421–430. doi:10.1016/j.molimm.2012.09.013
- Schlumpf, M., Schmid, P., Durrer, S., Conscience, M., Maerkel, K., Henseler, M., Gruetter, M., Herzog, I., Reolon, S., Ceccatelli, R., Faass, O., Stutz, E., Jarry, H., Wuttke, W., Lichtensteiger, W., 2004. Endocrine activity and developmental toxicity of cosmetic UV filters - An update, in: *Toxicology*. pp. 113–122. doi:10.1016/j.tox.2004.06.043

- Scholz, S., Klüver, N., 2009. Effects of endocrine disrupters on sexual, gonadal development in fish. *Sex. Dev.* 3, 136–151. doi:10.1159/000223078
- Schulz, R.W., de Fran??a, L.R., Lareyre, J.J., LeGac, F., Chiarini-Garcia, H., Nobrega, R.H., Miura, T., 2010. Spermatogenesis in fish. *Gen. Comp. Endocrinol.* 165, 390–411. doi:10.1016/j.ygcen.2009.02.013
- Schulz, U.H., Martins-Junior, H., 2001. *Astyanax fasciatus* as bioindicator of water pollution of Rio dos Sinos, RS, Brazil. *Braz. J. Biol.* 61, 615–22. doi:10.1590/S1519-69842001000400010
- Schwarzenbach, R.P., Escher, B.I., Fenner, K., Hofstetter, T.B., Johnson, C.A., Von Gunten, U., Wehrli, B., 2006. The challenge of micropollutants in aquatic systems. *Science* (80-. ). doi:10.1126/science.1127291
- Seachrist, D.D., Bonk, K.W., Ho, S.M., Prins, G.S., Soto, A.M., Keri, R.A., 2016. A review of the carcinogenic potential of bisphenol A. *Reprod. Toxicol.* 59, 167–182. doi:10.1016/j.reprotox.2015.09.006
- Silva, C.P., Otero, M., Esteves, V., 2012. Processes for the elimination of estrogenic steroid hormones from water: A review, in: *Environmental Pollution*. pp. 38–58. doi:10.1016/j.envpol.2012.02.002
- Silva, P., Rocha, M.J., Cruzeiro, C., Malhão, F., Reis, B., Urbatzka, R., Monteiro, R.A.F., Rocha, E., 2012. Testing the effects of ethinylestradiol and of an environmentally relevant mixture of xenoestrogens as found in the Douro River (Portugal) on the maturation of fish gonads-A stereological study using the zebrafish (*Danio rerio*) as model. *Aquat. Toxicol.* 124–125, 1–10. doi:10.1016/j.aquatox.2012.07.002
- Sisinno, C.L.S.; Oliveira-Filho, E.C., 2013. *Princípios de Toxicologia Ambiental; Interciência: Rio de Janeiro.*
- Stojanoska, M.M., Milosevic, N., Milic, N., Abenavoli, L., 2017. The influence of phthalates and bisphenol A on the obesity development and glucose metabolism disorders. *Endocrine* 55, 666–681. doi:10.1007/s12020-016-1158-4
- Sun, L., Zha, J., Wang, Z., 2009. Effects of binary mixtures of estrogen and antiestrogens on Japanese medaka (*Oryzias latipes*). *Aquat. Toxicol.* 93, 83–89. doi:10.1016/j.aquatox.2009.03.010
- Themmen, A.P.N., Huhtaniemi, I.T., 2000. Mutations of gonadotropins and gonadotropin receptors: Elucidating the physiology and pathophysiology of pituitary-gonadal function. *Endocr. Rev.* doi:10.1210/er.21.5.551
- Thomas, P., 2012. Rapid steroid hormone actions initiated at the cell surface and the receptors that mediate them with an emphasis on recent progress in fish models. *Gen. Comp. Endocrinol.* 175, 367–383. doi:10.1016/j.ygcen.2011.11.032
- Thomas, P., Dong, J., 2006. Binding and activation of the seven-transmembrane estrogen receptor GPR30 by environmental estrogens: A potential novel mechanism of endocrine disruption. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* doi:10.1016/j.jsbmb.2006.09.017
- 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.

doi:10.1007/s10695-011-9551-7

- Van Der Ven, L.T.M., Van Den Brandhof, E.J., Vos, J.H., Wester, P.W., 2007. Effects of the estrogen agonist 17 $\beta$ -estradiol and antagonist tamoxifen in a partial life-cycle assay with zebrafish (*Danio rerio*). *Environ. Toxicol. Chem.* 26, 92–99. doi:10.1897/06-092R1.1
- Van Der Ven, L.T.M., Wester, P.W., Vos, J.G., 2003. Histopathology as a tool for the evaluation of endocrine disruption in zebrafish (*Danio rerio*). *Environ. Toxicol. Chem.* 22, 908–913. doi:10.1897/1551-5028(2003)022<0908:HAATFT>2.0.CO;2
- Van, L.T., 2013. Assessment of steroidogenesis and steroidogenic enzyme functions. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 137, 176–182. doi:10.1016/j.jsbmb.2013.05.017
- Virk, P., Al-Sakran, A.A.M., Elobeid, M.A., 2014. Effect of bisphenol a on the levels of vitellogenin and metallothionein in adult male carp, *Cyprinus carpio carpio* linnaeus, 1758. *Trop. J. Pharm. Res.* 13, 1107–1112. doi:10.4314/tjpr.v13i7.14
- Weber, A., Peruci, D., Magno, R., Melo, C., Bicalho, A., Vieira, C., Suzanna, P., Angelina, M., Bazzoli, N., Rizzo, E., 2017. Reproductive effects of oestrogenic endocrine disrupting chemicals in *Astyanax rivularis* inhabiting headwaters of the Velhas River, Brazil. *Sci. Total Environ.* 592, 693–703. doi:10.1016/j.scitotenv.2017.02.181
- Weber, A.A., Moreira, D.P., Melo, R.M.C., Ribeiro, Y.M., Bazzoli, N., Rizzo, E., 2019. Environmental exposure to oestrogenic endocrine disruptors mixtures reflecting on gonadal sex steroids and gametogenesis of the neotropical fish *Astyanax rivularis*. *Gen. Comp. Endocrinol.* 0–1. doi:10.1016/j.ygcen.2018.12.016
- Weber, A.A., Moreira, D.P., Melo, R.M.C., Vieira, A.B.C., Prado, P.S., da Silva, M.A.N., Bazzoli, N., Rizzo, E., 2017. Reproductive effects of oestrogenic endocrine disrupting chemicals in *Astyanax rivularis* inhabiting headwaters of the Velhas River, Brazil. *Sci. Total Environ.* 592, 693–703. doi:10.1016/j.scitotenv.2017.02.181
- Wendler, A., Albrecht, C., Wehling, M., 2012. Nongenomic actions of aldosterone and progesterone revisited, in: *Steroids*. pp. 1002–1006. doi:10.1016/j.steroids.2011.12.023
- Wolf, J.C., Wheeler, J.R., 2018. A critical review of histopathological findings associated with endocrine and non-endocrine hepatic toxicity in fish models. *Aquat. Toxicol.* 197, 60–78. doi:10.1016/j.aquatox.2018.01.013
- Wood, A.W., Van Der Kraak, G., 2002. Inhibition of apoptosis in vitellogenic ovarian follicles of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) by salmon gonadotropin, epidermal growth factor, and 17 $\beta$ -estradiol. *Mol. Reprod. Dev.* doi:10.1002/mrd.10108
- Yan, Z., Lu, G., Liu, J., Jin, S., 2012. An integrated assessment of estrogenic contamination and feminization risk in fish in Taihu Lake, China. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 84, 334–340. doi:10.1016/j.ecoenv.2012.08.010
- Yan, Z.H., Lu, G.H., Yang, X.F., 2013. Single and combined effects of estrone and 17 $\beta$ -estradiol on male goldfish. *Biomed. Environ. Sci.* 26, 176–84. doi:10.3967/0895-3988.2013.03.004
- Ying, G.G., Kookana, R.S., Ru, Y.J., 2002. Occurrence and fate of hormone steroids in

the environment. *Environ. Int.* 28, 545–551. doi:10.1016/S0160-4120(02)00075-2

Zhang, Y., Guan, Y., Fan, X., Wu, L., Wang, Z., 2018. Bisphenol A regulates rare minnow testicular vitellogenin expression via reducing its promoter Er recruitment. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 147, 423–429. doi:10.1016/j.ecoenv.2017.09.001

## 5. CONCLUSÕES GERAIS

- O presente estudo mostrou que a exposição a metais pesados, estrona e bisfenol-A afetam negativamente o processo reprodutivo de *Prochilodus argenteus* e *Astyanax bimaculatus*.
- A alta concentração de metais observada no rio Paraopeba, confirmada pela elevação na expressão de Metalotioneínas, certamente contribui para a desregulação do processo reprodutivo de machos e fêmeas em *Prochilodus argenteus*.
- A presença de histopatologias e a modulação dos biomarcadores de desregulação endócrina de forma semelhante nos dois estudos, confirmam a capacidade estrogênica de todos os compostos analisados.
- Apesar de sabidamente estrogênico, a exposição sub-aguda a 10µg/L de Bisfenol-A não foi capaz de alterar significativamente a expressão de Vtg e estradiol nos machos expostos.
- Além das alterações moleculares, os peixes expostos a xenoestrógenos apresentaram modificações em parâmetros ecológicos importantes, como: alterações na morfologia ovocitária, elevação na taxa de atresia folicular e mudanças na proporção de células espermatogênicas.
- E1 e BPA, quando misturados, não atuaram de forma sinérgica na expressão de biomarcadores de desregulação endócrina e nos níveis de estradiol (E2) em machos de *A. bimaculatus*

## 6. PRODUÇÃO CIENTÍFICA E ATIVIDADES ACADÊMICAS RELEVANTES

### Publicações, co-autorias e potenciais publicações

- 1) **Paschoalini, A.L.**, Savassi, L.A., Arantes, F.P., Rizzo, E., & Bazzoli, N. (2019). Heavy metals accumulation and endocrine disruption in *Prochilodus argenteus* from a polluted neotropical river. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, 169, 539–550.
- 2) **Paschoalini, A.L.**; Savassi, L.A.; Weber A.A.; Moreira, D.P.; Ribeiro, Y.M.; Rizzo, E.; Bazzoli, N. Estrogenic potential assessment of Estrone and Bisphenol-A in *Astyanax bimaculatus* males after sub-acute exposure. **Aquatic toxicology (pronto para submissão)**
- 3) **Paschoalini, A. L.**; Perini, V.R., Oliveira, D.A.A., Bazzoli, N., Rizzo, E., Carvalho, D.C. Metapopulation dynamics and landscape genetics of the Neotropical fish *Prochilodus lineatus*. **Hydrobiologia (submetido/em revisão)**
- 4) Savassi, L. A.; **Paschoalini, A.L.**; Arantes, F. P.; Rizzo, E.; Bazzoli, N. Assessment of heavy metal pollution and potential human health risk in highly consumed fish (*Salminus franciscanus*), using biomarkers and histopathological approach. **Environmental Science and Pollution Research (em preparação)**

### Participação em eventos científicos

- 1) Apresentação de pôster - **11th International Symposium on Reproductive Physiology of Fish, Manaus, Brasil. 2018**  
Heavy metals accumulation and endocrine disruption in *Prochilodus argenteus* from a polluted neotropical river
- 2) Apresentação de pôster - **V Simpósio de Integração dos Programas de Pós-Graduação em Biologia Celular, Belo Horizonte, Brasil. 2017.**  
Alterações morfológicas e desregulação endócrina em *Prochilodus argenteus* cronicamente expostos a metais pesados no rio Paraopeba, MG, Brasil.

### Participação em bancas de trabalhos de conclusão de curso

- 1) MARCON, L.; PASCHOALINI, A. L.; BAZZOLI, N.

Participação em banca de Ana Paula Gorle de Miranda Chaves.

**Análise histológica, histoquímica e histométrica do intestino delgado do acará *Geophagus brasiliensis* (Quoy & Gaimard, 1824) (Pisces:cichlidae), 2017**

(Ciências Biológicas) Pontifícia Universidade Católica de Minas Gerais

- 2) PASCHOALINI, A. L.; VIEIRA, A. B. C.; RIZZO, E.

Participação em banca de Yves Moreira Ribeiro.

**Influência da baixa temperatura na estrutura e dinâmica da espermatogênese durante o cultivo de tilápia-do-nilo *Oreochromis niloticus*, 2016**

(Aquacultura) Universidade Federal de Minas Gerais

3) PASCHOALINI, A. L.; VIEIRA, A. B. C.; ARANTES, F. P.

Participação em banca de Lucas de Esquivel Dias Brandão.

**Parâmetros reprodutivos do piau branco *Schizodon Kneri* (Steindachner, 1875) (Pisces: Anostomidae) em três trechos da bacia do rio São Francisco, 2015**

(Ciências Biológicas) Pontifícia Universidade Católica de Minas Gerais

## **7. ATA DE DEFESA**



Universidade Federal de Minas Gerais - Instituto de Ciências Biológicas  
Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular

**ATA DA DEFESA DE TESE DE DOUTORADO DE**  
**ALESSANDRO LOUREIRO PASCHOALINI**

205/2019  
entrada  
2º/2015  
2015745194

Às oito horas do dia 25 de março de 2019, reuniu-se, no Instituto de Ciências Biológicas da UFMG, a Comissão Examinadora da Tese, indicada pelo Colegiado do Programa, para julgar, em exame final, o trabalho final intitulado: "POTENCIAL ESTROGÊNICO DE METAIS PESADOS, XENOESTROGENOS E ESTROGENEO NATURAIS EM PEIXES NEOTROPICAIS ", requisito final para obtenção do grau de Doutor em Biologia. Abrindo a sessão, o Presidente da Comissão, **Dr. Nilo Bazzoli**, após dar a conhecer aos presentes o teor das Normas Regulamentares do Trabalho Final, passou a palavra ao candidato, para apresentação de seu trabalho. Seguiu-se a arguição pelos examinadores, com a respectiva defesa do candidato. Logo após, a Comissão se reuniu, sem a presença do candidato e do público, para julgamento e expedição de resultado final. Foram atribuídas as seguintes indicações:

Prof./Pesq.	Instituição	Indicação
Dr. Nilo Bazzoli	UFMG	APROVADO
Dr. José Enemir dos Santos	PUC MINAS	APROVADO
Dr. Lucas Marcon	UEMG	APROVADO
Dr. Guilherme Mattos Jardim Costa	UFMG	APROVADO
Dr. Fernanda Radicchi Campos Lobato de Almeida	UFMG	APROVADO

Pelas indicações, o candidato foi considerado: APROVADO  
O resultado final foi comunicado publicamente ao candidato pelo Presidente da Comissão. Nada mais havendo a tratar, o Presidente encerrou a reunião e lavrou a presente ATA, que será assinada por todos os membros participantes da Comissão Examinadora. **Belo Horizonte, 25 de março de 2019.**

Dr. Nilo Bazzoli \_\_\_\_\_

Dr. José Enemir dos Santos \_\_\_\_\_

Dr. Lucas Marcon \_\_\_\_\_

Dr. Guilherme Mattos Jardim Costa \_\_\_\_\_

Dr. Fernanda Radicchi Campos Lobato de Almeida \_\_\_\_\_

Obs: Este documento não terá validade sem a assinatura e carimbo do Coordenador

Prof. Erika Cristina Jorge  
Coordenadora do Programa de Pós Graduação  
em Biologia Celular, ICB/UFMG

*Erika Cristina Jorge*