

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
DEPARTAMENTO DE MORFOLOGIA  
PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR  
DISSERTAÇÃO DE MESTRADO**

Efeitos da exposição subcrônica ao chumbo nos parâmetros  
reprodutivos de *Astyanax bimaculatus*

**Camila Stephanie Ferreira**

**BELO HORIZONTE**

**2021**

**Camila Stephanie Ferreira**

**Efeitos da exposição subcrônica ao chumbo nos parâmetros reprodutivos de *Astyanax bimaculatus***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biologia Celular do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais como requisito para obtenção do título de Mestra em Ciências (Área de Concentração: Biologia Celular).

**Universidade Federal de Minas Gerais**

**Belo Horizonte**

**2021**

043      Ferreira, Camila Stephanie.  
            Efeitos da exposição subcrônica ao chumbo nos parâmetros reprodutivos de  
            *Astyanax bimaculatus* [manuscrito] / Camila Stephanie Ferreira. - 2021.  
            64 f. : il. ; 29,5 cm.

            Orientadora: Professora Dra. Elizete Rizzo.  
            Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de  
            Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular.

            1. Biologia Celular. 2. Metais Pesados. 3. Chumbo. 4. Toxicologia. 5.  
            Gametogênese. 6. Teleostei. I. Bazzoli, Elizete Rizzo. II. Universidade Federal de  
            Minas Gerais. Instituto de Ciências Biológicas. III. Título.

CDU: 576



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

**ATA DA DEFESA DE DISSERTAÇÃO DE MESTRADO DE**

**CAMILA STEPHANIE FERREIRA**

346/2021  
entrada  
1º/2019  
2019690025

Às quatorze horas do dia 30 de agosto de 2021, reuniu-se, no Instituto de Ciências Biológicas da UFMG, a Comissão Examinadora da Dissertação, indicada pelo Colegiado do Programa, para julgar, em exame final, o trabalho final intitulado: "EFEITOS DA EXPOSIÇÃO SUBCRÔNICA AO CHUMBO NOS PARÂMETROS REPRODUTIVOS DE ASTYANAX BIMACULATUS", requisito final para obtenção do grau de Mestre em Biologia Celular. Abrindo a sessão, a Presidente da Comissão, Dra. Elizete Rizzo Bazzoli, após dar a conhecer aos presentes o teor das Normas Regulamentares do Trabalho Final, passou a palavra à candidata, para apresentação de seu trabalho. Seguiu-se a arguição pelos examinadores, com a respectiva defesa da candidata. Logo após, a Comissão se reuniu, sem a presença da candidata e do público, para julgamento e expedição de resultado final. Foram atribuídas as seguintes indicações:

Prof./Pesq.	Instituição	Indicação
Dra. Elizete Rizzo Bazzoli	UFMG	Aprovada
Dra. Gleide Fernandes de Avelar	UFMG	Aprovada
Dr. Alessandro Loureiro Paschoalini	PUC-MG	Aprovada

Pelas indicações, a candidata foi considerada: Aprovada

O resultado final foi comunicado publicamente à candidata pela Presidente da Comissão. Nada mais havendo a tratar, a Presidente encerrou a reunião e lavrou a presente ATA, que será assinada por todos os membros participantes da Comissão Examinadora. Belo Horizonte, 30 de agosto de 2021.

Dr<sup>a</sup>. Elizete Rizzo Bazzoli (Orientadora)

Dr<sup>a</sup>. Gleide Fernandes de Avelar

Dr. Alessandro Loureiro Paschoalini

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

Esta dissertação foi realizada no laboratório de Ictiohistologia do Departamento de Morfologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, sob orientação da Professora Dra. Elizete Rizzo com apoio das seguintes instituições:

- Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES)
- Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq)
- Fundação de Amparo à Pesquisa do estado de Minas Gerais (FAPEMIG)

## **AGRADECIMENTOS**

- A professora Dra. Elizete Rizzo por me receber em seu laboratório de braços abertos, pela confiança, paciência, ensinamentos e orientação durante toda minha jornada científica;
- Aos mestres e doutorandos Yves e Davidson pelo auxílio na bancada, amizade e disponibilização de tempo durante todo projeto de mestrado;
- Aos amigos do laboratório de Ictiohistologia por me proporcionarem momentos incríveis e troca de experiências: Camila, Thais, Francisco, Marina, Samuel, Alessandro, Lourenço, Ana Paula e Bruna.
- Ao programa de Pós-graduação em Biologia Celular e seus coordenadores;
- Aos professores da graduação e pós-graduação pelos ensinamentos e exemplo de profissionais;
- Aos meus amigos da graduação e pós-graduação;
- Aos meus familiares que sempre me apoiaram em minhas decisões. Minha mãe Luciane, que deve estar orgulhosa me olhando lá de cima, meu pai Jonaide, que nunca me deixou desistir, sempre acreditou e vibrou pelas minhas conquistas. E meu irmão, William. Amo vocês!
- Ao Felipe por estar ao meu lado durante toda minha jornada acadêmica.
- Aos meus amigos de Sabará, por sempre me apoiarem.
- A Deus por me dar forças para seguir em frente nos momentos mais difíceis da minha vida.

**A vida me ensinou a nunca desistir,  
nem ganhar, nem perder, mas procurar  
evoluir.**

Charlie Brown Jr.

## RESUMO

O chumbo (Pb) é frequentemente encontrado no ambiente aquático devido a atividades antrópicas. Este elemento não possui função biológica conhecida, é altamente tóxico e pode causar danos comportamentais, renais, neurológicos e reprodutivos nos animais. Estudos mostram que o Pb atua como desregulador endócrino (EDC), no entanto seus efeitos na gametogênese de peixes não são claros, sendo necessários novos estudos experimentais para melhor compreender sua ação na reprodução. Sendo assim, o objetivo do estudo foi avaliar os efeitos da exposição subcrônica a diferentes concentrações de Pb sobre os parâmetros reprodutivos do lambari *Astyanax bimaculatus*, espécie de relevância ecológica e bioindicadora de poluição aquática. Para realização do experimento, os peixes foram expostos ao acetato de chumbo durante 28 dias, em três concentrações (15, 50 e 100 µg/L de Pb) e o grupo controle, sem adição do químico. Os peixes foram eutanasiados, dissecados e tiveram dados biométricos e índices biológicos obtidos. Amostras de gônadas, fígado e sangue foram coletadas para emprego de diferentes técnicas morfológicas e moleculares. Os dados mostraram que a exposição de lambaris as diferentes concentrações de Pb provocam redução significativa do índice gonadossomático, diâmetro dos folículos vitelogênicos e túbulos seminíferos. A análise morfométrica mostrou aumento significativo da proporção de folículos perinucleolares no grupo de 50 µg/L, diminuição de folículos vitelogênicos e aumento de atresia folicular nos grupos de 50 e 100 µg/L, indicando uma inibição do crescimento ovocitário. Em machos, observou-se aumento de espermatogônias do tipo Aund, Adiff nos grupos de 50 e 100 µg/L e espermatogônias do tipo B no grupo de 100 µg/L, aumento de espermatócitos no grupo de 50 µg/L e redução drástica de espermatozoides em 50 e 100 µg/L em relação ao controle. Em nosso experimento o 17β-estradiol aumentou nos grupos de 15 e 50 µg/L em fêmeas e 15 µg/L em machos, que também foi observado aumento significativo de 11-ketotestosterona no grupo de 100 µg/L. Apesar do Pb não alterar os níveis hepáticos de metalotioneína em *A. bimaculatus*, a toxicidade de 100 µg/L Pb reduziu a vitelogenina hepática em fêmeas. No ovário, receptores de estrógeno (ERα e ERβ) e andrógeno (AR) foram imunolocalizados em células foliculares e nas células germinativas, com padrões de intensidade distintos dependendo da fase de desenvolvimento. No testículo, a expressão do ERα e ERβ foi observada nas espermatogônias, espermatócitos e células de Leydig, entretanto, células de Sertoli, espermátides e espermatozoides expressaram somente o ERα, e uma forte imunomarcagem para AR foi observada em células de Sertoli e de Leydig, mas uma



marcação mais fraca foi também detectada nas células germinativas. Comparando-se os grupos, valores mais elevados de ER $\alpha$  foi observado nas fêmeas no grupo de 100  $\mu\text{g/L}$  Pb e para o ER $\beta$  nos grupos de 15 e 100  $\mu\text{g/L}$  Pb comparados com o grupo controle. Nos machos, houve somente aumento significativo de ER $\alpha$  no grupo de 100  $\mu\text{g/L}$  Pb em comparação com os demais grupos. Para ambos os sexos, não houve diferença significativa entre os níveis de AR nos grupos tratados em relação ao controle. Desta forma, este estudo demonstra que mesmo em concentrações relativamente baixas, a exposição subcrônica ao Pb pode alterar a reprodução dos lambaris, afetando o índice gonadossomático, a distribuição das células germinativas, a produção de esteroides sexuais pelas gônadas e de proteínas essenciais para o desenvolvimento reprodutivo, bem como os níveis dos receptores de estrógenos, portanto atuando como metaloestrógeno.

**Palavras-Chave – Gametogênese, peixes teleósteos, receptores de estrógeno, toxicologia, metais pesados.**

## ABSTRACT

Lead (Pb) is frequently found in the aquatic environment due to anthropic activities. This element has no known biological function, is highly toxic and can cause behavioral, renal, neurological and reproductive damage in animals. Studies show that Pb acts as an endocrine disruptor (EDC), however, its effects on fish gametogenesis are unclear, and more experimental studies are needed to better understand its action on reproduction. Therefore, the aim of the study was to assess the effects of sub-chronic exposure to different concentrations of Pb on reproductive physiology of the lambari *Astyanax bimaculatus*, ecological relevance species and bioindicator of aquatic pollution. To carry out the experiment, the fish were exposed to lead acetate for 28 days, in three concentrations (15, 50 and 100  $\mu\text{g/L}$  of Pb) and the control group, without addition of the chemical. The fish were euthanized, dissected and had biometric data and biological indices obtained. Gonad, liver and blood samples were collected to use different morphological and molecular techniques. The data showed that the exposure of lambaris to different concentrations of Pb caused a significant reduction in the gonadosomatic index, diameter of vitellogenic follicles and seminiferous tubules. The morphometric analysis of the gonads showed a significant increase in the proportion of perinucleolar follicles in the 50  $\mu\text{g/L}$  group, a decrease in vitellogenic follicles and an increase in follicular atresia in the 50 and 100  $\mu\text{g/L}$  groups, indicating an inhibition of oocyte growth. In males, an increase in Aund and Adiff type spermatogonia was observed in the 50 and 100  $\mu\text{g/L}$  groups and B type spermatogonia in the 100  $\mu\text{g/L}$  group, an increase in spermatocytes in the 50  $\mu\text{g/L}$  group and a drastic reduction of sperm at 50 and 100  $\mu\text{g/L}$  compared to control. In our experiment  $17\beta$ -estradiol (E2) increased in the 15 and 50  $\mu\text{g/L}$  groups in endorsing and 15  $\mu\text{g/L}$  in males, which was also observed a significant increase in 11-ketotestosterone in the 100  $\mu\text{g/L}$ . Although Pb did not alter hepatic metallothionein levels in *A. bimaculatus*, the toxicity of 100  $\mu\text{g/L}$  Pb reduced hepatic vitellogenin in females. In the ovary, estrogen (ER $\alpha$  and ER $\beta$ ) and androgen (AR) receptors were immunolocalized in follicular and germ cells, with different intensity patterns depending on the stage of development. In the testis, an expression of ER $\alpha$  and ER $\beta$  was observed in spermatogonia, spermatocytes and Leydig cells, however, Sertoli cells, spermatids and spermatozoa expressed only ER $\alpha$ , and strong immunostaining for RA was observed in Sertoli and Leydig cells, but weaker labeling was also detected in germ cells. Comparing the groups, the highest values for ER $\alpha$  were observed in the 100

$\mu\text{g/L}$  Pb group and for ER $\beta$  in the 15 and 100  $\mu\text{g/L}$  Pb groups compared to the control group. In males, there was a significant increase in ER $\alpha$  in the 100  $\mu\text{g/L}$  Pb group compared to the other groups. For both sexes, there was no significant difference between the levels of AR in the treated groups compared to the control. This way, this study demonstrates that even at relatively low concentrations, subchronic exposure to Pb can impair lambari reproduction, affecting the gonadosomatic index, germ cell distribution, production of sex steroids by the gonads and essential proteins for reproductive development, as well as the levels of estrogen receptors, therefore acting as a metalloestrogen.

**Keywords – Gametogenesis, teleost fish, estrogen receptor, toxicology, heavy metals.**

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1:</b> Ação agonista e antagonista de receptores.....	21
<b>Figura 2:</b> Crescimento primário do ovócito em peixes teleósteos.....	23
<b>Figura 3:</b> Transição do crescimento primário para o secundário, crescimento secundário e maturação final do ovócito em peixes teleósteos.....	24
<b>Figura 4:</b> Espermatogênese nos peixes teleósteos.....	26
<b>Figura 5:</b> Possíveis mecanismos de controle da espermatogênese.....	26
<b>Figura 6:</b> Ação genômica também conhecida como “via clássica” dos receptores de estrógeno (ER) e andrógeno (AR).....	27
<b>Figura 7:</b> Lambari ( <i>Astyanax bimaculatus</i> ).....	28
<b>Figura 8.</b> A-H. Seções transversais de ovários de <i>A. bimaculatus</i> nos diferentes tratamentos corados com HE.....	38
<b>Figura 9.</b> A-H. Seções transversais de testículos de <i>A. bimaculatus</i> nos diferentes tratamentos corados com HE.....	39
<b>Figura 10.</b> Níveis hepáticos de vitelogenina (VTG) e Metalotioneína (MT).....	40
<b>Figura 11.</b> Concentrações plasmáticas de 17 $\beta$ -estradiol e 11-ketotestosterona.....	41
<b>Figura 12.</b> Imunolocalização dos receptores de estrógeno (ER $\alpha$ e ER $\beta$ ) e andrógeno (AR) em ovários de <i>Astyanax bimaculatus</i> .....	43
<b>Figura 13.</b> Imunolocalização dos receptores de estrógeno (ER $\alpha$ e ER $\beta$ ) e andrógeno (AR) em testículos de <i>Astyanax bimaculatus</i> .....	44
<b>Figura 14.</b> Expressão de receptores de estrógeno e andrógeno em gônadas de lambaris.....	45

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b> Parâmetros físico-químicos na água e concentração real de chumbo (Pb) na água durante exposição de <i>Astyanax bimaculatus</i> ao acetato de chumbo.....	35
<b>Tabela 2.</b> Dados biológicos de fêmeas e machos de <i>Astyanax bimaculatus</i> expostos a diferentes concentrações de chumbo (Pb).....	35
<b>Tabela 3.</b> Proporção (%) de folículos ovarianos e diâmetro ( $\emptyset$ ) do folículo vitelogênico em <i>Astyanax bimaculatus</i> exposto a diferentes concentrações de chumbo (Pb).....	37
<b>Tabela 4.</b> Proporção (%) de componentes testiculares e diâmetro ( $\emptyset$ ) dos túbulos seminíferos em <i>Astyanax bimaculatus</i> expostos a diferentes concentrações de chumbo (Pb).....	37
<b>Tabela 5.</b> Padrão de distribuição dos receptores de estrógeno (ER $\alpha$ e ER $\beta$ ) e andrógeno (AR) em ovários e testículos de <i>Astyanax bimaculatus</i> detectados pela técnica de imunohistoquímica.....	42

## LISTA DE ABREVIATURAS

**11-KT** - 11-ketotestosterona

**17 $\alpha$ ,20 $\beta$ -DHP** -17 $\alpha$ ,20 $\beta$ -Dihydroxy-4-pregnen-3-one

**A<sub>diff</sub>** - Espermatogônia tipo A diferenciada

**AMH** - Hormônio anti-Mülleriano

**AR** - Receptor de andrógeno

**AREs** - Elementos responsivos ao andrógeno

**As** - Arsênio

**AT**- Folículo atrésico

**A<sub>und</sub>** - Espermatogônia tipo A indiferenciada

**B** - Espermatogônia do tipo B

**C** - Espermatócito

**C1** - Espermatócito primário

**C2** - Espermatócito secundário

**Ca** - Cálcio

**Cd** - Cádmiio

**Co** - Cobalto

**Cr** - Cromo

**CT**- Comprimento total

**Cu** - Cobre

**CYP19a** - Enzima aromatase P450

**E2** - 17 $\beta$ -estradiol

**EDCs** - Desreguladores endócrinos

**ER** - Receptor de estrógeno

**EREs** - Elementos responsivos ao estrógeno

**ER $\alpha$**  - Receptor de estrógeno  $\alpha$

**ER $\beta$**  - Receptor de estrógeno  $\beta$

**Fe** - Ferro

**FSH** - Hormônio folículo estimulante

**FV** - Diâmetro dos folículos vitelogênicos

**G** - Espermatogônias

**GnRH** - Hormônio liberador de gonadotrofina

**GPER** - Receptor de estrógeno acoplado à proteína G associado à membrana

**Hg** - Mercúrio

**HSPs** - Chaperonas

**IGS** - Índice gonadossomático

**IHS** - Índice hepatossomático

**K** - Fator de condição de fulton

**LH** - Hormônio luteinizante

**MIS** - Indutor da maturação final

**MPF** - fator promotor da maturação

**MT**- Metalotioneína

**Ni** - Níquel

**Pb** - Chumbo

**PC** - Peso corporal

**PG** - Peso das gônadas

**PGCs** - Células germinativas primordiais

**PN**- Folículo perinuclear

**ROS** - Espécies reativas de oxigênio

**Sn** - Estanho

**SSC** - Células tronco espermatogoniais

**T** - Testosterona

**TS** - Diâmetro dos túbulos seminíferos

**VC**- Folículo com vesícula cortical

**VT**- Folículo vitelogênico

**VTG** - Vitelogenina

**Z** - Espermatozoide

**Zn** – Zinco

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	17
1.1 CHUMBO .....	18
1.2 DESREGULADORES ENDÓCRINOS (EDCs) .....	20
1.3 OVOGÊNESE EM PEIXES .....	22
1.4 ESPERMATOGÊNESE EM PEIXES .....	25
1.5 RECEPTORES DE ESTEROIDES SEXUAIS .....	27
1.6 ESPÉCIE DE ESTUDO .....	28
<b>2. JUSTIFICATIVA</b> .....	28
<b>3. OBJETIVOS</b> .....	30
3.1 OBJETIVO GERAL .....	30
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	30
<b>4. MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	30
4.1 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL .....	30
4.2 PARÂMETROS FÍSICO-QUÍMICOS DA ÁGUA .....	31
4.3 DADOS BIOMÉTRICOS E ÍNDICES BIOLÓGICOS .....	31
4.4 HISTOLOGIA E MORFOMETRIA .....	31
4.5 QUANTIFICAÇÃO DOS NÍVEIS HEPÁTICOS DE VTG E MT .....	32
4.6 DOSAGEM HORMONAL .....	32
4.7 IMUNOHISTOQUÍMICA .....	33
4.8 QUANTIFICAÇÃO DOS NÍVEIS GONADAIS DOS RECEPTORES ER $\alpha$ , ER $\beta$ E AR..	33
4.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA .....	34
<b>5. RESULTADOS</b> .....	34
5.2 DADOS BIOMÉTRICOS E ÍNDICES BIOLÓGICOS .....	35
5.3 DESENVOLVIMENTO DOS GAMETAS .....	36
5.4 NÍVEIS HEPÁTICOS DE VTG E MT .....	40
5.5 CONCENTRAÇÃO PLASMÁTICA DE ESTEROIDES SEXUAIS .....	41
5.6 IMUNOLocalização DE ER $\alpha$ , ER $\beta$ e AR .....	41
5.7 EXPRESSÃO DOS RECEPTORES ER $\alpha$ , ER $\beta$ e AR .....	45
<b>6. DISCUSSÃO</b> .....	46
<b>7. CONCLUSÕES</b> .....	53
<b>8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	54



## 1. INTRODUÇÃO

Na última década, o Brasil tem sido afetado por diversos desastres ambientais dentre os quais podemos citar o rompimento de barragens de rejeito, que ocorreram entre os anos de 2015 e 2019, o que elevou significativamente os níveis destes metais nos ambientes aquáticos (Pena et al., 2020). Os principais elementos presentes na água e solo de regiões onde há exploração mineral são chumbo (Pb), ferro (Fe), cromo (Cr), níquel (Ni), cádmio (Cd), cobre (Cu), zinco (Zn), arsênio (As) (Fashola et al., 2016; Wei et al., 2018).

O rompimento da barragem do Fundão localizada no distrito de Bento Rodrigues, município de Mariana (MG) em novembro de 2015 liberou cerca de 45 milhões de metros cúbicos de rejeitos no meio ambiente (Weber et al., 2020). A lama tóxica atingiu o rio Doce e seus tributários percorrendo mais de 600 Km até atingir o oceano Atlântico no estado do Espírito Santo (Garcia et al., 2017). Este grave acidente causou um dos maiores impactos ambientais da história do Brasil e de acordo com o laudo técnico preliminar do IBAMA (2015), logo após o acidente foram identificadas mais de 7000 carcaças de peixes de 21 espécies, sendo as principais *Astyanax sp.* (lambari), *Prochilodus sp.* (curimatás), *Pimelodus sp.* (mandis), *Cichla* (tucunaré), *Salminus brasiliensis* (dourado), *Hoplias sp.* (traíra), *Tilapia rendalli* (tilápia), *Oreochromis niloticus* (tilápia do Nilo), *Hypostomus sp.* (cascudo), *Pygocentrus nattereri* (piranha), *Acestrorhynchus sp.* (peixe cachorro), *Metynnis sp.* (pacu CD). Logo após o acidente, níveis elevados de manganês, arsênio e chumbo foram encontrados na água do rio Doce e, mesmo após 3 anos, os níveis desses metais permaneceram acima dos limites permitidos pela legislação brasileira (IGAM, 2018). Um estudo realizado próximo a foz do Rio Doce, relatou que os padrões de qualidade da água não estavam em conformidade com a legislação vigente para a concentração de diversos metais incluindo As, Cd e Pb, cujas concentrações variaram de 9,27 a 130,4 µg/L (Bianchini, 2016).

Agravando ainda mais a conservação dos recursos ambientais, em janeiro de 2019, a barragem de rejeito da mina córrego do Feijão, localizada em Brumadinho, na região metropolitana de Belo Horizonte (MG) rompeu e o vazamento dos rejeitos atingiu o rio Paraopeba, ocasionando um grave impacto socioambiental e a morte imediata de várias espécies de peixes nativas da bacia do Rio São Francisco (Pereira et al., 2019). Nesse acidente, concentrações de Pb, mercúrio (Hg), Ni, Cd e Zn ficaram acima do limite permitido pelas normas ambientais (IGAM, 2019).

Segundo Ali e Khan (2018) os metais pesados são aqueles de ocorrência natural com número atômico (Z) maior do que 20 e uma densidade elementar maior do que 5 g cm<sup>-3</sup>. Em geral, os metais podem ser classificados como essenciais e não essenciais para os organismos, mas a importância biológica ou toxicidade pode variar entre organismos e espécies (Simionov et al., 2019; Paschoalini et al., 2021). Metais essenciais como o Zn, Cu, Ni, cobalto (Co), Fe, Cr são necessários para manter o metabolismo do corpo, entretanto são tóxicos para o organismo quando estão presentes em concentrações mais elevadas (Simionov et al., 2019). Metais não essenciais dentre eles o Pb, Cd, estanho (Sn) e Hg não possuem funções biológicas conhecidas e sua toxicidade aumenta à medida que sua concentração se eleva em um organismo (Ali et al., 2019; Paschoalini et al., 2021). Dentre os metais encontrados nos últimos desastres, o Pb que embora seja um elemento presente na água e solo de Minas Gerais onde há intensa exploração mineral, cerca de 80% do chumbo metálico no mundo é utilizado em baterias de automóveis (Hsu e Guo, 2002; Vergilio et al., 2020).

## 1.1 CHUMBO

O Pb é um dos metais pesados mais frequentemente encontrado no ambiente aquático devido a atividades antrópicas, e como já mencionado, este metal tem a mais ampla aplicabilidade, como por exemplo, mineração, produção de baterias, processo de fundição, aditivos de combustíveis, brinquedos, maquiagens, preparação de tintas e pigmentos (Dignam et al., 2019). Este elemento não possui função biológica conhecida, é altamente tóxico, e pode causar danos reprodutivos, comportamentais, renais, neurológicos, além de estresse oxidativo em órgãos alvos de humanos e outros animais (Hsu e Guo, 2002; Lee et al., 2019). Por ser estranho ao organismo, estudos feitos em humanos e animais demonstram que o Pb entra no organismo e é complexado em macromoléculas sendo diretamente absorvido, distribuído e pouco excretado (Moreira e Moreira, 2004). Em humanos, o Pb normalmente é absorvido no corpo pelo trato gastrointestinal, pelo trato respiratório e em pequenas quantidades pela pele (Rădulescu e Lundgren, 2019). Uma vez absorvido, o Pb é distribuído e pode seguir três vias, corrente sanguínea, tecidos moles e tecidos mineralizados (ATSDR, 2020). Apesar de não ser metabolizado, quantidades mínimas de Pb são excretadas através dos rins e do trato gastrointestinal (ATSDR, 2020).

Os peixes são um dos grupos de vertebrados especialmente vulneráveis aos metais pesados, pois sua assimilação ocorre por múltiplas vias como a dieta, respiração e o

contato com o sedimento e água contaminada (Olsson et al., 1998). Considerando a via respiratória, nos peixes a absorção de metais é mais eficiente se comparada com os humanos pois o volume de água que passa pela superfície branquial é 20 vezes maior do que o volume de ar que passa pelos pulmões para se obter a mesma quantidade de oxigênio, fato que favorece e intensifica a absorção de metais pelos peixes (Olsson et al., 1998). Além das brânquias, outras possíveis rotas realizadas por metais como Pb, são similares as dos mamíferos, pelo trato gastrointestinal e pele (Rajeshkumar e Li 2018). Após serem absorvidos e se ligarem a proteínas plasmáticas, os metais são distribuídos pela corrente sanguínea aos diferentes tecidos do corpo onde se acumulam e são responsáveis por efeitos deletérios (Rădulescu e Lundgren, 2019).

Dentre os efeitos deletérios do Pb podemos citar sua influência sobre o metabolismo de nutrientes essenciais, como cálcio (Ca), Zn e Fe (Kwong et al., 2004; Ettinger et al., 2007; Kordas, 2017). Estudos relatam que a deficiência nutricional desses elementos favorece a absorção de Pb e outros metais pelo organismo além de competir pela absorção destes nutrientes (Kordas, 2017). A interação entre Pb e Ca por exemplo ocorre em vários tecidos do corpo e interferem em mecanismos celulares que regulam o transporte de íons através das membranas. Esta interação, pode alterar a função de várias proteínas e a homeostase do  $\text{Ca}^{++}$  (Ettinger et al., 2007). Já o Zn funciona como um componente estrutural de muitas proteínas e como um co-fator para várias enzimas. O Zn e Pb apresentam características químicas semelhantes e podem acarretar em sinergismo ou antagonismo entre o Pb e os fatores nutricionais (Batra et al., 2001). Quanto ao Fe, estudos mecanísticos descobriram a existência de um transportador intestinal de ferro denominado DMT1 (*divalent metal transporter 1*) que além de transportar o ferro da dieta, pode transportar o Pb e causar efeitos tóxicos (Bressler et al., 2004). O alto nível de expressão DMT1 pode ser associado com o aumento substancial da absorção de Pb (Kwong et al., 2004).

A bioacumulação de Pb nos tecidos dos peixes depende de diversos fatores, tais como: concentração, tempo de exposição, nutrição, idade, temperatura, composição da água e interação com outros íons metálicos (Al-Balawi et al., 2013). Devido a perturbações no sistema de defesa antioxidante, o acúmulo de Pb nos tecidos dos peixes causa estresse oxidativo em virtude da produção excessiva de espécies reativas de oxigênio (ROS) e espécies reativas de nitrogênio (RNS) (Lee et al., 2019). Principalmente os radicais, superóxido ( $\text{O}_2^\bullet$ ) hidroxil ( $\text{OH}^\bullet$ ), alcoxil ( $\text{RO}^\bullet$ ) e óxido nítrico ( $\text{NO}^\bullet$ ) e os não radicais, peróxido de hidrogênio ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) e peroxinitrito ( $\text{ONOO}^-$ ) (Paschoalini e

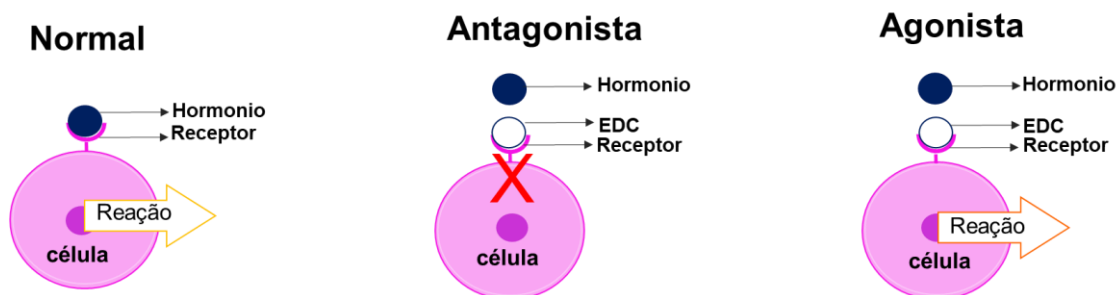
Bazzoli, 2021). O mecanismo de defesa antioxidante em peixes é muito semelhante ao de outros vertebrados e pode atuar enzimaticamente por meio de superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), glutatona peroxidase (GPx) e glutatona S-dismutase (GST) e / ou não enzimaticamente, por meio de glutatona reduzida (GSH) e glutatona dissulfeto (GSSG) (Fatima et al., 2015; Paschoalini e Bazzoli, 2021). Quando há um desequilíbrio entre os mecanismos de defesa antioxidante e os níveis de ROS, ocorre estresse oxidativo no corpo. Níveis elevados de ROS levam à oxidação de macromoléculas em diversos tecidos, peroxidação lipídica e danos ao DNA (Jiang et al., 2021).

Apesar de participarem de funções essenciais para os tecidos, os efeitos tóxicos dos metais modulam a síntese de metalotioneínas (MTs), proteínas de baixo peso molecular (6-7 kDa) ricas em cisteínas, encontradas no citoplasma de células eucarióticas, especialmente no fígado, rins, intestino e cérebro e que tem papel protetor contra toxicidade de metais (Coyle et al., 2002). As MTs regulam a homeostase de metais essenciais para maquinaria celular, desintoxicação de metais não essenciais e proteção contra o estresse oxidativo em vertebrados (Wang et al., 2014). Seu papel na desintoxicação de metais pesados e na manutenção da homeostase de íons metálicos essenciais, é devido à sua alta afinidade por esses metais, as MTs geralmente estão ligadas ao Zn, entretanto a presença excessiva de outros metais, pode facilmente substituí-lo (Ruttikay-Nedecky et al., 2013). A indução da expressão das MTs é bastante complexa e pode variar dependendo do tipo de metal e dose de cada um, período de maturidade sexual do peixe, idade e condições ambientais (Hemmadi, 2016). Devido à sua indução em resposta aos metais, a expressão das MTs vêm sendo utilizada como biomarcador de contaminação por metais pesados (Hemmadi, 2016).

## **1.2 DESREGULADORES ENDÓCRINOS (EDCs)**

Diversos metais tais como Pb, Hg, As, Cd, Al, Cr, Cu e Ni tem a capacidade de alterar o funcionamento normal do sistema endócrino de vertebrados, e podem afetar a esteroidogênese gonadal e a produção de gametas, sendo considerados desreguladores endócrinos (Dyer, 2007; Łuszczek-Trojnar et al., 2014). Os desreguladores endócrinos (EDCs) são quaisquer substâncias naturais ou sintéticas que causem desequilíbrio, interferência ou alteração no sistema endócrino, que por sua vez afeta direta ou indiretamente na síntese, secreção, transporte e metabolismo dos hormônios responsáveis pela homeostase, reprodução e desenvolvimento dos organismos (Diamanti-Kandarakis et al., 2009). Os EDCs podem atuar das seguintes formas: (1) mimetizar hormônios

naturais agindo como agonista ou antagonista de seus receptores (**Fig. 1**), (2) modificar o padrão de síntese e metabolismo hormonal, e (3) alterar a expressão dos receptores hormonais (Diamanti-Kandarakis et al., 2009).



**Figura 1:** Em condições normais, o hormônio se liga ao seu receptor, e desencadeia uma resposta celular. Os EDCs podem interagir com os receptores e atuar como antagonista (ou seja, bloqueia a ação do receptor) ou agonista (ou seja, ativa o receptor do hormônio natural). Adaptado de Ghiselli e Jardim (2007).

Os efeitos da exposição aos EDCs nos organismos dependem de suas concentrações no ambiente e também de outros fatores, tais como, solubilidade em lipídeos, persistência, bioacumulação, tempo de exposição, mecanismos de biotransformação e excreção (Bila e Dezotti, 2007). Além disso, em alguns casos, os subprodutos da biotransformação desses compostos podem ser mais danosos que os compostos originais. A exposição prolongada a EDCs bioacumulativos, como os metais pesados, mesmo em baixas concentrações pode levar a altos níveis de contaminação, de forma que ao longo do tempo, e quanto maior o nível ocupado na cadeia trófica, mais elevada é a concentração desses compostos no organismo (Sharma et al., 2009).

Nos peixes, os EDCs podem afetar negativamente o crescimento, o desenvolvimento, reprodução e comportamento, podendo afetar populações inteiras (Scott e Sloman 2004). Além de afetar negativamente os parâmetros reprodutivos dos peixes, os EDCs têm a capacidade de alterar a expressão e síntese de determinadas proteínas, que por essa razão são consideradas biomarcadores de desregulação endócrina (Hansen et al., 1998). Um biomarcador muito utilizado em estudos de desregulação endócrina é a vitelogenina (VTG) (Prado et al., 2014; Weber et al., 2017). A VTG é produzida pelos hepatócitos, secretada na circulação sistêmica e transportada até os ovários, onde é seletivamente incorporada pelos ovócitos em desenvolvimento (Arukwe e Goksøyr, 2003). A VTG, é uma fosfoglicolipoproteína precursora do vitelo que posteriormente é utilizada como nutriente para o desenvolvimento de embriões e larvas (Denslow e Sepúlveda, 2007). Em fêmeas, a expressão de VTG é estimulada pelo  $17\beta$ -

estradiol durante a maturação gonadal, e a expressão alterada dessa proteína é um indicador de contaminação por substâncias estrogênicas (Vajda et al., 2011; Prado et al., 2014). Em condições normais, machos expressam níveis basais de VTG, mas sob influência de EDCs estrogênicos seus níveis podem aumentar significativamente (Denslow e Sepúlveda, 2007; Weber et al., 2017).

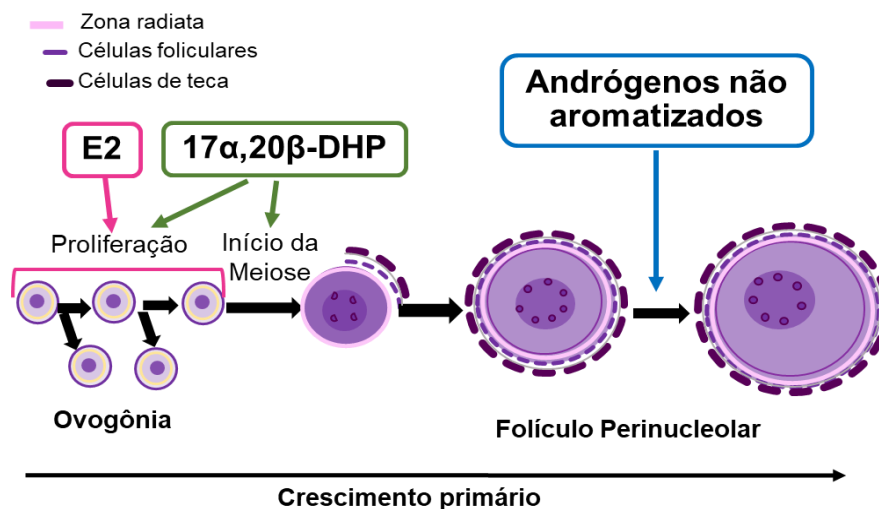
### **1.3 OVOGÊNESE EM PEIXES**

Nos peixes, fatores ambientais atuam no hipotálamo, e estimulam a secreção do hormônio liberador de gonadotrofina (GnRH), que controla a produção na pituitária de gonadotrofinas FSH (hormônio folículo estimulante) e LH (hormônio luteinizante). As gonadotrofinas, induzem a síntese de esteroides sexuais, testosterona (T), 11-ketotestosterona (11-KT) e  $17\beta$ -estradiol (E2), os quais são responsáveis pelo desenvolvimento e maturação das gônadas (Juntti e Fernald, 2016).

A ovogênese inicia com a diferenciação das células germinativas primordiais (PGCs) em ovogônias. O desenvolvimento folicular ocorre quando ovogônias entram em divisão mitótica e originam ovócitos dentro das lamelas ovulíferas. Este processo é regulado principalmente por E2, que promove a mitose das ovogônias e, adicionalmente,  $17\alpha,20\beta$ -Dihydroxy-4-pregnen-3-one ( $17\alpha,20\beta$ -DHP) promove a entrada das ovogônias na meiose (Lubzens et al., 2017). A meiose é interrompida quando os ovócitos atingem o estágio de diplóteno na prófase I (Lubzens et al., 2010). Durante esse processo, o ovócito é envolto por uma camada acelular, chamada zona radiata, e por células pré-foliculares que se ligam ao ovócito e os circundam progressivamente, passando a ser reconhecidas como células foliculares, que são homólogas as células da granulosa de mamíferos (Lubzens et al., 2017). A zona radiata tem papel crucial durante a fertilização, participando da ligação e recrutamento dos espermatozoides e impedindo a polispermia, além de promover a proteção para o embrião contra choques mecânicos durante seu desenvolvimento (Arukwe e Goksøyr, 2003). Externamente, logo acima das células foliculares, encontram-se as células da teca apoiadas em uma lâmina basal que separa os compartimentos germinal e intersticial (Lubzens et al., 2010). Em mamíferos, a proliferação de ovogônias é completada durante sua fase embrionária, enquanto em peixes a proliferação de ovogônias e o recrutamento de ovócitos continua ao longo do ciclo reprodutivo (Kagawa, 2013).

Durante o desenvolvimento dos folículos, os ovócitos passarão por três fases: crescimento primário, crescimento secundário e maturação final ovocitária (Lubzens et

al., 2017). O crescimento primário inclui os estágios perinucleolares iniciais e avançados (**Fig. 2**). Diversos estudos experimentais apontam a participação dos andrógenos na regulação do crescimento primário até o término do desenvolvimento do estágio perinucleolar avançado (García-López et al., 2011; Wang et al., 2020).



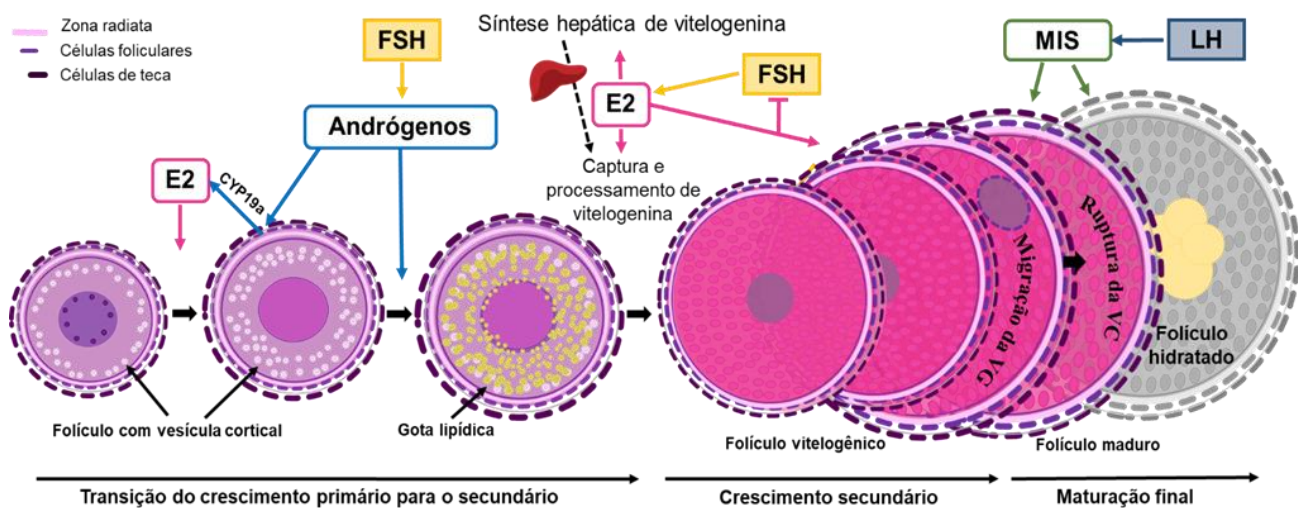
**Figura 2:** Crescimento primário do ovócito em peixes teleósteos. Da esquerda para a direita: E2 juntamente com  $17\alpha, 20\beta$ -DHP estimula a proliferação de ovogônia,  $17\alpha, 20\beta$ -DHP promove a entrada na meiose, e esta é bloqueada na prófase I, ocorrendo então a formação do complexo folicular (ovócitos envolvidos pela zona radiata, células foliculares e células da teca), formam então os folículos perinucleolares com vários nucléolos periféricos. O crescimento de folículos perinucleares é estimulado por andrógenos não aromatizados. Adaptado de Lubzens et al., (2017).

A transição para o crescimento secundário é caracterizada pelo acúmulo e aumento de vesículas corticais nos folículos com o aporte de E2, aumento de gotas lipídicas no ooplasma com auxílio do andrógeno 11-KT e lipoproteína de densidade muito baixa (VLDL) endógena (Patiño e Sullivan, 2002; Lubzens et al., 2017) (**Fig. 3**). Os níveis plasmáticos de FSH aumentam durante a transição do crescimento primário para o secundário, o que induz a produção de testosterona nas células especiais da teca e sua conversão pela enzima aromatase P450 (CYP19a) em E2 nas células foliculares, e com níveis elevados mantidos, recrutam os folículos para a fase vitelogênica (Lubzens et al., 2010; Lee e Lou, 2019). A vitelogênese é a principal fase do crescimento secundário do ovócito, na qual o E2 estimula a síntese hepática de vitelogenina (VTG), que será incorporada pelo ovócito por endocitose, formando o folículo vitelogênico.

Nas fases finais de vitelogênese, o aumento nos níveis plasmáticos de E2, inibe a síntese de FSH (Feedback negativo), estimulando a secreção de LH. O aumento dos níveis de LH estimula a produção do hormônio  $17\alpha,20\beta$ -DHP conhecido como o hormônio

indutor da maturação final (MIS) que é responsável pela retomada da meiose (Nagahama e Yamashita, 2008). O MIS é um derivado da progesterona que se liga a um receptor de membrana do ovócito e induz a produção do fator promotor da maturação (MPF). Com o processo de maturação finalizado, o ovócito encontra-se em metafase II até ser liberado do folículo como resultado do processo ovulatório (Nagahama e Yamashita, 2008; Lubzens et al., 2017).

Após a desova, podemos encontrar no tecido, folículos pós-ovulatórios, que são reabsorvidos em poucos dias, ou por um processo degenerativo os folículos ovarianos perdem sua integridade e são eliminados antes da ovulação dando origem aos folículo atresícos (Drummond et al., 2000; Santos et al., 2008). Em fêmeas que não desovaram, os folículos atresícos são removidos dos ovários gradativamente em um processo lento, com meses de duração (Santos et al., 2008).



**Figura 3:** Transição do crescimento primário para o secundário, crescimento secundário e maturação final do ovócito em peixes teleostes. Da esquerda para a direita: E2 estimula síntese de vesículas corticais. Os andrógenos estimulam acúmulo de lipídios em peixes marinhos. FSH impulsiona o crescimento vitelogênico através da promoção da síntese de E2. E2 estimula a síntese hepática de VTG. Fatores de crescimento regulam por feedback negativo a secreção de FSH. E2 e membros da família Bmp mantém a meiose parada. Na maturação final ovocitária ocorre a retomada da meiose quando LH estimula a produção de MIS. A hidratação pre-ovulatória do ovócito de peixes marinhos é devido ao aumento osmótico e à geração de aminoácidos livres (AAs). A absorção de água ocorre após um aumento conduzido por LH / MIS na expressão dos canais de água de aquaporina. Adaptado de Lubzens et al., (2017).



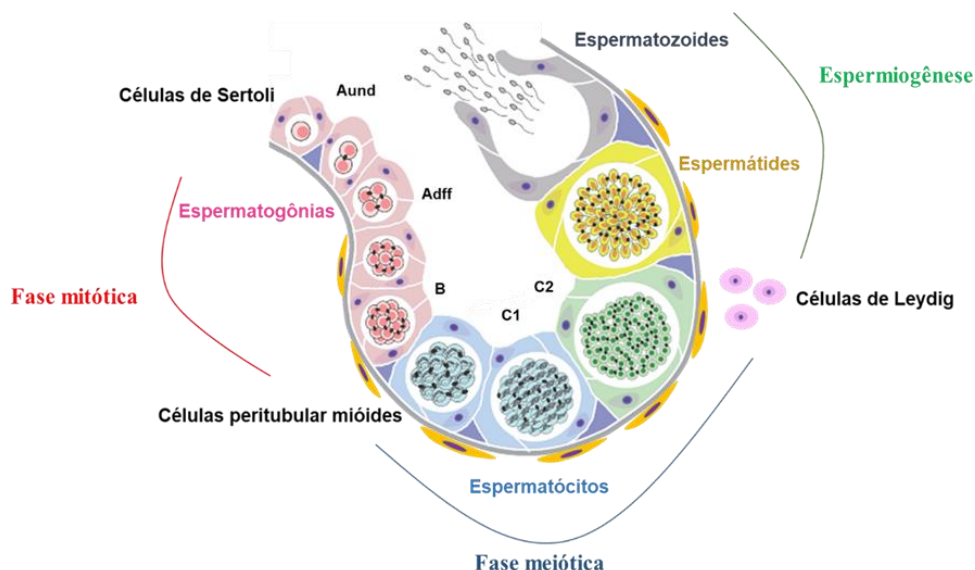
#### 1.4 ESPERMATOGÊNESE EM PEIXES

Em machos, os testículos são delimitados pela túnica albugínea, que emite septos para o interior da gônada formando lóbulos que são preenchidos por túbulos seminíferos. Dentro dos túbulos seminíferos são encontrados cistos de células germinativas envolvidos por células de Sertoli (Grier, 1981). Além de formadora de cistos, estas células nutrem as células germinativas, produzem hormônios e fagocitam espermatozoides residuais após espermiacão (Grier, 1981). No interstício testicular são encontrados tecido conjuntivo composto por fibroblastos, células imunes, fibras de colágeno, fibras nervosas, célula peritubular mióide e vasos sanguíneos. Próximo aos vasos sanguíneos encontram-se as células de Leydig, que são responsáveis pela produção de hormônios esteroides sexuais (Schulz et al., 2010; Uribe et al., 2014).

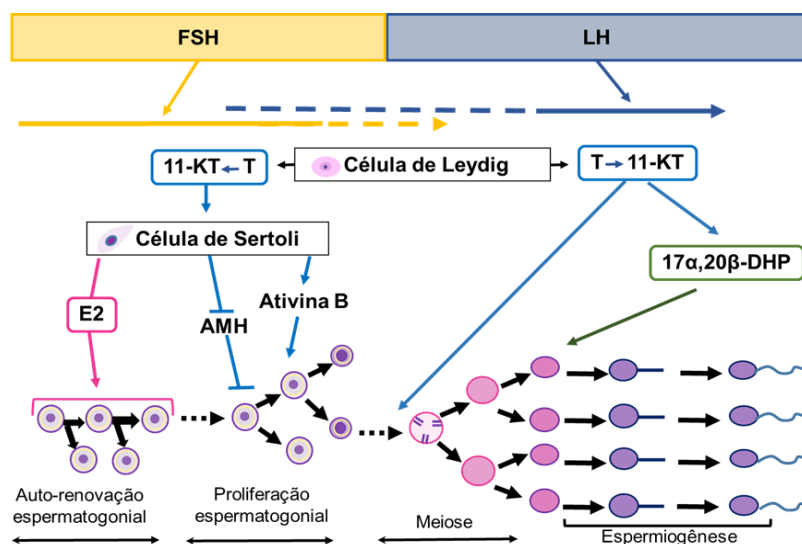
Nos testículos, o FSH atua sobre estágios iniciais da espermatogênese via células de Leydig e / ou células de Sertoli (Miura e Miura, 2011). As funções realizadas pelas células de Sertoli são necessárias ao desenvolvimento das células da linhagem espermatogênica, e os níveis de FSH se elevam nesta célula principalmente durante a proliferação espermatogonial (Schulz et al., 2010). A espermatogênese inicia com a proliferação de espermatogônias, que podem ser classificadas em espermatogônias do tipo A e tipo B. Funcionalmente, as espermatogônias do tipo A podem ser subdivididas em espermatogônias tipo A indiferenciadas (A<sub>und</sub>), incluindo-se as células tronco espermatogoniais (SSC) e espermatogônias tipo A diferenciadas (A<sub>diff</sub>). Das espermatogônias do tipo A<sub>und</sub> originam-se as espermatogônias do tipo A<sub>diff</sub> que se diferenciam em espermatogônias do tipo B (Schulz et al., 2010). As espermatogônias entram na fase meiótica ou espermatocitária originando espermatócitos primários e posteriormente espermatócitos secundários que se diferenciam em espermátides (**Fig. 4**).

A auto-renovação espermatogonial é regulada pelo E2, e a proliferação espermatogonial em direção à meiose é promovida pela 11-KT, o principal andrógeno no teleósteo, produzido por estimulação de FSH (Miura e Miura, 2011). A 11-KT impede a expressão do hormônio anti-Mülleriano (AMH), que inibe a proliferação de espermatogônias e induz a expressão de ativina B, que estimula a proliferação espermatogonial e indução da meiose (Schulz et al., 2010; Miura e Miura, 2011). O LH determina a produção de esteroides sexuais nas células de Leydig, sendo detectado na fase meiótica da espermatogênese, mas seus níveis aumentam de forma significativa principalmente durante a espermiacão (García-López et al., 2009). Durante a espermiogênese, a secreção de LH induz um aumento na produção de 11-KT e 17 $\alpha$ ,20 $\beta$ -

DHP (uma progestina que tem um importante papel na espermiacção e maturação dos espermatozoides), as espermátides maduras formam espermatozoides, os quais são liberados durante a espermiacção (Coward et al., 2002; Schulz et al., 2010) (**Fig. 5**).



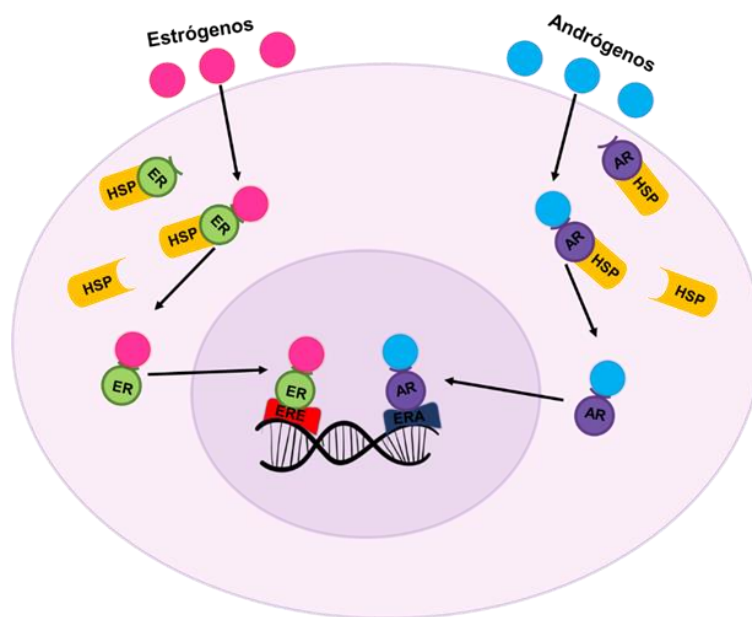
**Figura 4:** Espermatogênese nos peixes teleósteos. Na fase mitótica, espermatogônias do tipo A indiferenciada ( $A_{und}$ ) proliferam e diferenciam em espermatogônia do tipo A diferenciada ( $A_{diff}$ ) e espermatogônia do tipo B (B). Na fase meiótica os espermatócitos primários (C1) diferenciam em secundários (C2), que dão origem às espermátides. Na espermiogênese, espermátides se diferenciam em espermatozoides, os quais serão liberados em um processo chamado espermiacção. Adaptado de Yoshida et al. (2016).



**Figura 5:** Possíveis mecanismos de controle da espermatogênese. O hormônio estimulador do folículo (FSH) desempenha um importante papel regulatório durante os estágios iniciais da espermatogênese, enquanto o hormônio luteinizante (LH) está envolvido principalmente nas fases finais de maturação. (E2) Estradiol, (T) Testosterona, (11-KT) 11-ketotestosterona, ( $17\alpha, 20\beta$ -DHP,  $17\alpha$ ) 20 $\beta$ -dihidroxi-4-pregnen-3-ona. (AMH) Hormônio anti-Mülleriano. Adaptado de Schulz et al., 2010.

### 1.5 RECEPTORES DE ESTEROIDES SEXUAIS

Em vertebrados, as ações genômicas dos esteroides sexuais são mediadas por receptores nucleares de estrógeno (ERs) e andrógeno (ARs) que pertencem a uma superfamília de receptores nucleares (Nelson e Habibi, 2013; Tokarz et al., 2015). Existem dois tipos principais de ERs em peixes teleósteos: receptor de estrógeno  $\alpha$  (ER $\alpha$ ) e receptor de estrógeno  $\beta$  (ER $\beta$ ). Quando não estão ligados aos esteroides sexuais, os ERs e ARs são encontrados em um complexo associado com chaperonas (HSPs) no citoplasma (Nelson e Habibi 2013). Na presença do ligante, o complexo receptor-chaperona se dissocia e após a ligação dos estrógenos e andrógenos com seu respectivo receptor, migra para o núcleo e atua como um fator de transcrição em regiões específicas do DNA, denominado elementos responsivos ao estrógeno (EREs) ou elementos responsivos ao andrógeno (AREs) (Thomas, 2012; Tokarz et al., 2015) (**Fig. 6**).



**Figura 6:** Ação genômica também conhecida como “via clássica” dos receptores de estrógeno (ER) e andrógeno (AR). Adaptado de Shen e Shi, 2015.

As ações não-genômicas dos esteroides são reconhecidos por seus feitos serem rápidos, o que não seria possível advir de uma transcrição gênica. Os estrógenos induzem respostas não genômicas rápidas mediados por receptores intracelular de estrógeno (ERs) ou por receptores não clássicos ligados à membrana, por meio de um receptor de estrógeno acoplado à proteína G associado à membrana (GPER) (Chimento et al., 2014). Os andrógenos, assim como o estrógeno, podem exercer efeitos mediado pela ligação

direta a um sítio de ligação específico da molécula alvo na ausência de um AR, por receptor acoplado à proteína G transmembrana, ou por meio de alterações na fluidez da membrana (Michels e Hoppe, 2008). Entretanto, até o presente momento, os receptores de estrógeno e andrógeno clássicos (via genômica) são os mais estudados (Nelson e Habibi, 2013).

## 1.6 ESPÉCIE DE ESTUDO

O lambari *Astyanax bimaculatus* (Linnaeus, 1758) é um peixe neotropical onívoro de relevância ecológica, que contribui para o equilíbrio da cadeia alimentar nos ecossistemas de água doce (Siqueira-Silva et al., 2015) (**Fig. 7**). É espécie de pequeno porte, amplamente distribuída, sendo encontrada em várias bacias hidrográficas da América do Sul (Lucena e Soares, 2016). Os lambaris vivem em cardume, desovam durante todo ano e são importante produto para a piscicultura e pesca extrativista (Weber et al., 2013; Siqueira-Silva et al., 2015). Distúrbios como a construção de barragens, poluição por metais pesados e degradação de habitats que são frequentes em rios e reservatórios em países em desenvolvimento como o Brasil, podem prejudicar o sucesso reprodutivo de espécies como o lambari (Araújo et al., 2019). Os lambaris têm sido utilizados como espécie sentinela em estudos de impacto ambiental, pois possuem relativa tolerância à degradação ambiental, sendo considerados bioindicadores de poluição aquática (Schulz e Martins-Júnior, 2001; Santos et al, 2012).



**Figura 7:** Lambari (*Astyanax bimaculatus*). Fonte: klimanaturali.org

## 2. JUSTIFICATIVA

O crescimento populacional, a urbanização e industrialização afetam cada vez mais os ambientes aquáticos. Em consequência desses processos, os níveis de poluentes ambientais aumentaram significativamente, e a demanda pela exploração dos recursos naturais criou problemas ambientais e de saúde pública em todo mundo (Briffa et al.,

2020; Paschoalini et al., 2021). Atualmente, os metais pesados constituem um dos principais contaminantes devido ao aumento surpreendente do seu uso nas últimas décadas. A difícil metabolização e natureza bioacumulativa nos tecidos dos animais, levantam preocupações sobre seus efeitos na saúde humana e no meio ambiente (Venkateswarlu e Venkatrayulu, 2020; Paschoalini et al., 2019). A bioacumulação afeta negativamente a qualidade de produtos pesqueiros sendo uma ameaça eminente para as populações que possuem esses animais como parte de sua dieta (Zeitoun e Mehana, 2014). Dentre as fontes antropogênicas de metais pesados podemos citar a descarga de esgotos doméstico e industrial, atividades agrícolas e de mineração, derramamentos acidentais de produtos tóxicos, entre outros (Zhong et al., 2018; Venkateswarlu e Venkatrayulu, 2020).

Dentre os principais elementos presentes na água e solo de Minas Gerais, onde há intensa exploração mineral encontra-se o Pb, um metal pesado não essencial, que não possui função biológica conhecida e cuja toxicidade é proporcional ao aumento de sua concentração (Hsu e Guo, 2002; Vergilio et al., 2020). Apesar de os países desenvolvidos terem implementado medidas para o controle das fontes de poluição pelo Pb, esse tipo de controle não foi ainda estabelecido no Brasil (Moreira e Moreira, 2004). A norma técnica T. 187/5 da COPASA, estabelece que pode ser lançado na rede coletora pública de efluente até 10 mg/L de Pb, e os limites de padrão de qualidade da água permitidos pela legislação brasileira são de 0,01 mg/L e 0,33 mg/L de Pb para água classe I e III, respectivamente (CONAMA, 2005), entretanto os efeitos tóxicos subcrônicos nos organismos ainda não foram bem investigados. Desta forma, estudos experimentais e em ambientes naturais podem fornecer informações indispensáveis para subsidiar os órgãos de saúde pública e meio ambiente nas ações de controle. Apesar disso, considerando que os estudos toxicológicos envolvendo estes metais têm sido direcionados principalmente para o sistema renal e nervoso, pouco se sabe sobre os efeitos do Pb na gametogênese e reprodução dos peixes neotropicais. Uma vez que a reprodução é indispensável para conservação das espécies e considerando que os peixes são um importante recurso alimentar, é importante avaliar os efeitos subcrônicos adversos do Pb a fim de compreender sua ação na gametogênese e maturação gonadal desses animais.

### 3. OBJETIVOS

#### 3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar os efeitos da exposição subcrônica a diferentes concentrações de chumbo (Pb) sobre os parâmetros reprodutivos do lambari *Astyanax bimaculatus*.

#### 3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar os indicadores biométricos e reprodutivos dos peixes;
- Medir o diâmetro dos túbulos seminíferos e dos folículos vitelogênicos;
- Quantificar a proporção de células germinativas e somáticas de machos e dos folículos ovarianos nas fêmeas;
- Determinar os níveis de expressão hepática de VTG e MT nos diferentes tratamentos;
- Dosar as concentrações de 11-ketotestosterona e 17 $\beta$ -estradiol no plasma.
- Imunolocalizar e quantificar os níveis dos receptores de estrógenos (ER $\alpha$  e ER $\beta$ ) e de andrógeno (AR) nas gônadas.

### 4. MATERIAIS E MÉTODOS

#### 4.1 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

O experimento foi realizado em novembro e dezembro de 2019, utilizando exemplares adultos do lambari *Astyanax bimaculatus*. Os peixes foram manuseados de acordo com o Guia de experimentação Animal estabelecido pelo Colégio Brasileiro de experimentação Animal (COBEA) e o projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética e Uso dos Animais da UFMG (protocolo CEUA 223/2017).

Para realização do experimento, um total de 64 peixes foram distribuídos aleatoriamente em 8 aquários de 20 L (8 peixes/aquário) e aclimatados durante 7 dias a 28 °C, com fotoperíodo de 12L:12E e alimentação comercial com 40% de proteína bruta. Durante o experimento, os peixes foram expostos ao acetato de chumbo durante 28 dias em três concentrações de Pb (15, 50 e 100  $\mu$ g/L) e foram baseadas em valores próximos aos permitidos pela resolução CONAMA 357 (Classe 1 a 3) e concentrações ambientalmente relevantes, e um grupo controle mantido nas mesmas condições, porém sem adição do químico, totalizando 4 grupos experimentais, em duplicata. Para manter a qualidade da água, 50% da água dos aquários foi renovada diariamente repondo as concentrações originais de Pb de cada grupo. Com 28 dias de exposição, os peixes foram

eutanasiados por meio da secção transversal da medula espinhal após analgesia com eugenol. Os dados biométricos foram obtidos de cada exemplar e, em seguida, amostras de sangue, gônadas e fígado foram coletadas para análises histológicas, hormonais e moleculares.

#### **4.2 PARÂMETROS FÍSICO-QUÍMICOS DA ÁGUA**

Os principais parâmetros de qualidade da água: temperatura, oxigênio dissolvido, pH e amônia foram monitorados duas vezes por semana em cada aquário utilizando o kit colorimétrico (Labcon test). Para determinação de chumbo na água, foi coletado 0,5 L de água de cada aquário no início e no final do tratamento, perfazendo 4 amostras de água analisadas por grupo. A concentração real de Pb na água foi mensurada pela técnica de espectrofotometria de absorção molecular no UV-VIS (Espectofotômetro HACH DR-3900 seguindo o método padrão 3500-pb B) após a extração com ditizona, com limite de quantificação 0,002 mg/L Pb.

#### **4.3 DADOS BIOMÉTRICOS E ÍNDICES BIOLÓGICOS**

Comprimento total (CT), peso corporal (PC), peso das gônadas (PG) e peso do fígado (PF) foram obtidos e os índices gonadossomático ( $IGS=100 PG/PC$ ), hepatossomático ( $IHS= 100 PF/PC$ ) e fator de condição de Fulton ( $K=100 PC/CT^3$ ) foram calculados para cada peixe.

#### **4.4 HISTOLOGIA E MORFOMETRIA**

Para análise histológica do desenvolvimento gonadal, amostras de gônadas de todos os exemplares foram fixadas em líquido de Bouin durante 8 h, incluídas em parafina, seccionadas com 5  $\mu$ m de espessura, coradas com hematoxilina e eosina (HE) e analisadas ao microscópio de luz.

A morfometria da gametogênese foi realizada em cortes histológicos de gônadas ( $n = 5/\text{tratamento}$ ) conforme metodologia previamente estabelecida (Domingos et al., 2012, Melo et al., 2015). Nos ovários, a proporção (%) de folículos perinucleolares (PN), com vesículas corticais (VC), vitelogênicos (VT), atresícos (AT) e tecido intersticial foi determinada. Nos testículos, foram quantificados a proporção (%) de espermatogônias tipo A indiferenciadas ( $A_{und}$ ), espermatogônias tipo A diferenciadas ( $A_{diff}$ ), espermatogônias tipo B (B), espermatócitos, espermátides (T), espermatozoides (Z), células de Sertoli, células de Leydig, lúmen tubular e tecido intersticial. Para isso, foram digitalizados 5 campos aleatórios de cada corte histológico dos ovários com ampliação

de 10X e testículos com ampliação de 400X, totalizando 25 campos analisados por grupo. As contagens foram feitas com auxílio do software ImageJ 1.4.9, utilizando uma graticula com 638 pontos equidistantes. O diâmetro dos folículos vitelogênicos (FV) e dos túbulos seminíferos (TS) foram obtidos em 5 secções histológicas de ovários e testículos com auxílio do software Zeiss AxioVision 4.8, e um total de 100 FV e 60 TS foram analisados por grupo. Devido a forma irregular dos FV e dos TS, os diâmetros maior e menor foram medidos e uma média foi obtida para cada estrutura analisada.

#### **4.5 QUANTIFICAÇÃO DOS NÍVEIS HEPÁTICOS DE VTG E MT**

Para determinação dos níveis de vitelogenina (VTG) e metalotioneína (MT), amostras de fígado ( $n = 5/\text{tratamento}$ ) foram submetidas ao ensaio de ELISA. Para isso, as amostras foram processadas de acordo com protocolo estabelecido previamente (Prado et al., 2014). Brevemente, as amostras foram sonicadas em tampão de lise com inibidores homogenatos do fígado foi determinada pelo método de Bradford (1976) usando albumina sérica bovina (BSA) como padrão. As amostras, em duplicata, de 100  $\mu\text{g/mL}$  da proteína (VTG ou MT) foram incubadas *overnight* em microplacas com 96 poços (Nunc, Denmark). Em seguida, elas foram bloqueadas com 2% de BSA e incubadas novamente a 37 °C por 2 h com anticorpo primário na diluição 1:500 (anti-Vtg policlonal de coelho anti-salmão e anti-MT policlonal de coelho anti-bacalhau, ambos da Biosense Laboratories AS, Noruega). Após lavagem com PBS-Tween 0,05%, as placas foram incubadas com anticorpo secundário anti-IgG (1: 1000, Sigma, St. Louis, MO) conjugado com peroxidase durante 2 h a 37 °C. Após a lavagem, a reação foi revelada com 200  $\mu\text{l}$  de solução de dicloridrato de o-fenilenodiamina (OPD) (Sigma, St. Louis, MO, EUA) em tampão fosfato-citrato 0,05 M contendo 0,0025% de peróxido de hidrogênio. A reação foi interrompida por adicionar 50  $\mu\text{l}$  de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  a 5% a cada poço e a absorbância foi medida em 492 nm usando um espectrofotômetro BioTek Instruments Inc. Para validação dos ensaios ELISA, as curvas de diluição dos homogenatos de fígado foram realizadas para cada proteína analisada.

#### **4.6 DOSAGEM HORMONAL**

Para determinação das concentrações plasmáticas de 11-ketotestosterona (11-KT), e 17 $\beta$ -estradiol (E2), o sangue de 5 machos e 5 fêmeas foi obtido da aorta dorsal, logo após secção transversal da medula espinhal. Para isso, foi feita uma secção paralela ao opérculo com profundidade de aproximada 0.5 cm, e o sangue obtido de cada animal foi transferido para tubo de Eppendorf heparinizado e mantido a 4 °C. Posteriormente, o



sangue foi centrifugado durante 10 min a 10.000 rpm e o plasma armazenado em freezer -80 °C. As amostras foram analisadas, em duplicata, utilizando o ensaio de ELISA seguindo o protocolo do fabricante (Cayman Chemical). O limite de detecção dos testes para 11-ketotestosterona e 17 $\beta$ -estradiol foi de 1,3 e 6 pg/mL respectivamente. A absorbância foi medida usando um leitor de microplacas BioTek (ELX800) em 405 nm de acordo com instruções do fabricante.

#### 4.7 IMUNOHISTOQUÍMICA

Amostras de gônadas (n = 5 por grupo) foram submetidas a reação imunohistoquímica para detecção de ER $\alpha$ , ER $\beta$  e AR utilizando os anticorpos primários, anti-ER $\alpha$  (MC-20, sc-542) e anti-ER $\beta$  (H-150, sc-8974) (Santa Cruz Biotechnology, Inc., EUA), e anti-AR (SAB1306176) (Sigma-Aldrich, Inc., USA). Para reativação antigênica, as secções histológicas foram tratadas com tampão citrato de sódio pH 6.0 a 95 °C por 30 min. Em seguida, as secções foram incubadas com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a 3% para inativar a peroxidase endógena. Albumina sérica bovina (BSA) a 2% foi utilizada para bloqueio de reações inespecíficas. Em seguida, os cortes foram incubados em câmara úmida durante a noite a 4 °C com os anticorpos primários descritos acima e utilizados na diluição de 1:50. Posteriormente, as secções foram incubadas em solução de polímero Dako EnVision+dual link System-HRP (DakoCytomation, Carpinteria, USA) contendo anticorpos secundários marcados com peroxidase por 30 min. A reação da peroxidase foi revelada com diaminobenzidina (DAB) e as secções foram contracoloradas com hematoxilina. As imagens foram obtidas pelo software Zeiss AxioVision 4.8.

#### 4.8 QUANTIFICAÇÃO DOS NÍVEIS GONADAIS DOS RECEPTORES ER $\alpha$ , ER $\beta$ E AR

Amostras de ovários e testículos (n = 5/grupo) foram mantidas em um freezer a -80 °C e posteriormente submetidas ao ensaio ELISA indireto. As amostras congeladas (0,1 g de tecido por amostra) foram homogeneizadas em tampão de lise com inibidores de protease, centrifugadas a 15.000g por 60 min a 4 °C, e os sobrenadantes foram armazenados a -80 °C. A proteína total foi determinada pelo método de Bradford (1976) usando albumina de soro bovino (BSA) como padrão. Amostras em duplicata, de 100  $\mu$ g/mL da proteína (ER $\alpha$ , ER $\beta$  e AR) foram incubadas *overnight* em microplacas com 96 poços (Nunc, Denmark). Posteriormente, a 37 °C por 2 h foram incubadas novamente com 2% de BSA para bloqueio das ligações inespecíficas, com os mesmos anticorpos primários usados na imunohistoquímica em diluição 1:250 para ER $\alpha$  e ER $\beta$  (Santa Cruz

Biotechnology, Inc., EUA) e 1:500 para AR (Sigma-Aldrich, Inc., USA). Em seguida, as microplacas foram incubadas com anticorpo secundário anti-IgG conjugado com peroxidase (Sigma, St. Louis, MO) por 1 h a 37 °C a 1: 500. A reação foi revelada com 200 µL de dicloridrato de o-fenilenodiamina (OPD) (Sigma, St. Louis, MO, EUA) e peróxido de hidrogênio. As microplacas foram lidas a 492 nm usando um espectrofotômetro BioTek Instruments Inc. Para validação dos ensaios ELISA, foram realizadas curvas de diluição dos homogenatos de ovários e testículos para cada proteína analisada.

#### **4.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA**

As análises estatísticas foram conduzidas nos softwares GraphPad Prism version 5.0 e BioEstat 3.0. Os dados obtidos (índices biológicos, diâmetros dos FV e TS, concentrações plasmáticas de esteroides sexuais, níveis hepáticos de VTG, MT e expressão de ER $\alpha$ , ER $\beta$  e AR) apresentaram distribuição normal (Teste Lilliefors) e a comparação entre os grupos foi feita utilizando análise de variância One-Way ANOVA seguido pelo pós-teste de Tukey. Os dados morfométricos da proporção de células germinativas não apresentaram distribuição normal e foram submetidos ao teste não paramétrico de Kruskal-Wallis seguido do pós-teste de Dunn. Os resultados foram expressos como média  $\pm$  erro padrão e a diferença entre as médias considerada significativa com  $p < 0,05$ .

### **5. RESULTADOS**

#### **5.1 PARÂMETROS FÍSICO-QUÍMICOS DA ÁGUA**

Os parâmetros físico-químicos da água ficaram dentro de padrões aceitáveis para o cultivo da espécie, sem variações significativas entre os tratamentos. A concentração real de Pb na água no grupo controle foi menor que o limite de quantificação (0,002 mg/L), e nos grupos tratados a concentração real variou 2 a 5% do valor nominal do Pb para cada grupo (**Tabela 1**).

**Tabela 1.** Parâmetros físico-químicos na água e concentração real de chumbo (Pb) na água durante exposição de *Astyanax bimaculatus* ao acetato de chumbo.

	Controle	15 µg/L Pb	50 µg/L Pb	100 µg/L Pb
Temperatura (°C)	27,60 ± 0,09	27,70 ± 0,08	27,60 ± 0,11	27,43 ± 0,10
pH	6,85 ± 0,04	6,87 ± 0,05	6,91 ± 0,04	6,91 ± 0,03
Oxigênio (mg/L)	8,55 ± 0,65	8,55 ± 0,62	8,00 ± 0,67	8,00 ± 0,69
Amônia (mg/L)	0,007 ± 0,001	0,008 ± 0,002	0,007 ± 0,001	0,009 ± 0,002
Chumbo (µg/L)*	< 0,002	15,00 ± 0,58	52,50 ± 0,29	98,00 ± 0,58

Valores expressam média ± erro padrão. Não houve diferença significativa entre os parâmetros da água entre os grupos,  $p < 0,05$ . \*concentração real de Pb na água durante o experimento.

## 5.2 DADOS BIOMÉTRICOS E ÍNDICES BIOLÓGICOS

O tamanho das fêmeas variou de 7,68 a 8,38 cm CT e de 6,06 a 8,59 g PC enquanto os machos apresentaram 7,20 a 7,39 cm CT e 4,11 a 4,72 g PC, sem diferença significativa entre os grupos ( $p > 0,05$ ). O IGS de fêmeas e machos reduziu significativamente nos grupos 100 µg/L Pb para fêmeas e 50 e 100 µg/L Pb para machos,  $p < 0,01$ . O IHS e o K não apresentaram diferença significativa entre os tratamentos (**Tabela 2**).

**Tabela 2.** Dados biológicos de fêmeas e machos de *Astyanax bimaculatus* expostos a diferentes concentrações de chumbo (Pb).

		Controle	15 µg/L Pb	50 µg/L Pb	100 µg/L Pb
	N	5	5	5	5
<b>Fêmeas</b>	CT (cm)	8,38 ± 0,40 <sup>a</sup>	8,26 ± 0,30 <sup>a</sup>	8,04 ± 0,16 <sup>a</sup>	7,68 ± 0,34 <sup>a</sup>
	PC (g)	8,59 ± 1,21 <sup>a</sup>	7,30 ± 0,70 <sup>a</sup>	6,78 ± 0,64 <sup>a</sup>	6,06 ± 0,93 <sup>a</sup>
	IGS	18,32 ± 0,72 <sup>a</sup>	16,58 ± 0,41 <sup>ab</sup>	15,93 ± 0,85 <sup>ab</sup>	14,89 ± 0,42 <sup>b</sup>
	IHS	0,44 ± 0,09 <sup>a</sup>	0,43 ± 0,08 <sup>a</sup>	0,50 ± 0,07 <sup>a</sup>	0,57 ± 0,06 <sup>a</sup>
	K	1,42 ± 0,07 <sup>a</sup>	1,30 ± 0,11 <sup>a</sup>	1,29 ± 0,06 <sup>a</sup>	1,31 ± 0,09 <sup>a</sup>
	N	10	10	11	11
<b>Machos</b>	CT (cm)	7,27 ± 0,16 <sup>a</sup>	7,25 ± 0,15 <sup>a</sup>	7,39 ± 0,18 <sup>a</sup>	7,20 ± 0,20 <sup>a</sup>
	PC (g)	4,10 ± 0,24 <sup>a</sup>	4,30 ± 0,23 <sup>a</sup>	4,66 ± 0,41 <sup>a</sup>	4,72 ± 0,46 <sup>a</sup>
	IGS	3,10 ± 0,11 <sup>a</sup>	2,68 ± 0,16 <sup>ab</sup>	2,54 ± 0,11 <sup>b</sup>	2,57 ± 0,11 <sup>b</sup>
	IHS	0,61 ± 0,09 <sup>a</sup>	0,50 ± 0,08 <sup>a</sup>	0,61 ± 0,08 <sup>a</sup>	0,58 ± 0,10 <sup>a</sup>
	K	1,07 ± 0,04 <sup>a</sup>	1,12 ± 0,05 <sup>a</sup>	1,14 ± 0,04 <sup>a</sup>	1,23 ± 0,04 <sup>a</sup>

Valores expressos em média ± erro padrão, Anova,  $p < 0,05$ . (N) número de animais, (CT) comprimento total, (PC) peso corporal, (IGS) índice gonadossomático, (IHS) índice hepatossomático, e (K) fator de condição de Fulton.

### 5.3 DESENVOLVIMENTO DOS GAMETAS

No presente estudo, todas as fêmeas apresentaram ovários em maturação com folículos em diferentes estágios de desenvolvimento (**Fig. 8A-H**). A análise morfométrica demonstrou aumento significativo da proporção de folículos perinucleolares no grupo de 50 µg/L Pb (**Tabela 3**). A redução significativa da proporção de folículos vitelogênicos nos grupos de 50 e 100 µg/L foi acompanhada pela redução do diâmetro dos FV nos grupos tratados,  $p < 0,0001$ . A proporção de folículos atrésicos aumentou significativamente nos grupos de 50 e 100 µg/L se comparados com controle e 15 µg/L Pb,  $p < 0,0001$ . A proporção de tecido intersticial também aumentou nos grupos tratados em relação ao controle,  $p = 0,003$  (**Tabela 3**).

Os machos apresentaram testículos maduros, contendo cistos de células germinativas em diferentes fases de desenvolvimento envolvidas por células de Sertoli, e lume tubular repleto de espermatozoides embebidos em secreção acidófila intratubular (**Fig. 9A-H**). Na fase mitótica da espermatogênese, observou-se um aumento significativo de espermatogônias do tipo Aund, Adiff nos grupos de 50 e 100 µg/L Pb e espermatogônias do tipo B no grupo de 100 µg/L Pb,  $p < 0,0001$  se comparados com o controle (**Tabela 4**). Na fase meiótica, houve aumento significativo de espermatócitos no grupo de 50 µg/L Pb em relação ao controle,  $p < 0,05$ . Na fase espermiogênica, não houve diferença estatisticamente na proporção de espermátides entre os grupos e os espermatozoides apresentaram redução significativa no grupo de 50 e 100 µg/L Pb,  $p < 0,0001$ . A proporção de células de Sertoli aumentou significativamente nos grupos tratados  $p < 0,0001$ , enquanto as células de Leydig e o tecido intersticial aumentaram significativamente no grupo de 100 µg/L Pb em comparação com os outros grupos ( $p = 0,0012$  e  $p = 0,0003$ ). O diâmetro dos túbulos seminíferos foi significativamente menor em todos os grupos tratados se comparados com o controle,  $p < 0,0001$  (**Tabela 4**).

**Tabela 3.** Proporção (%) de folículos ovarianos e diâmetro ( $\phi$ ) do folículo vitelogênico em *Astyanax bimaculatus* exposto a diferentes concentrações de chumbo (Pb).

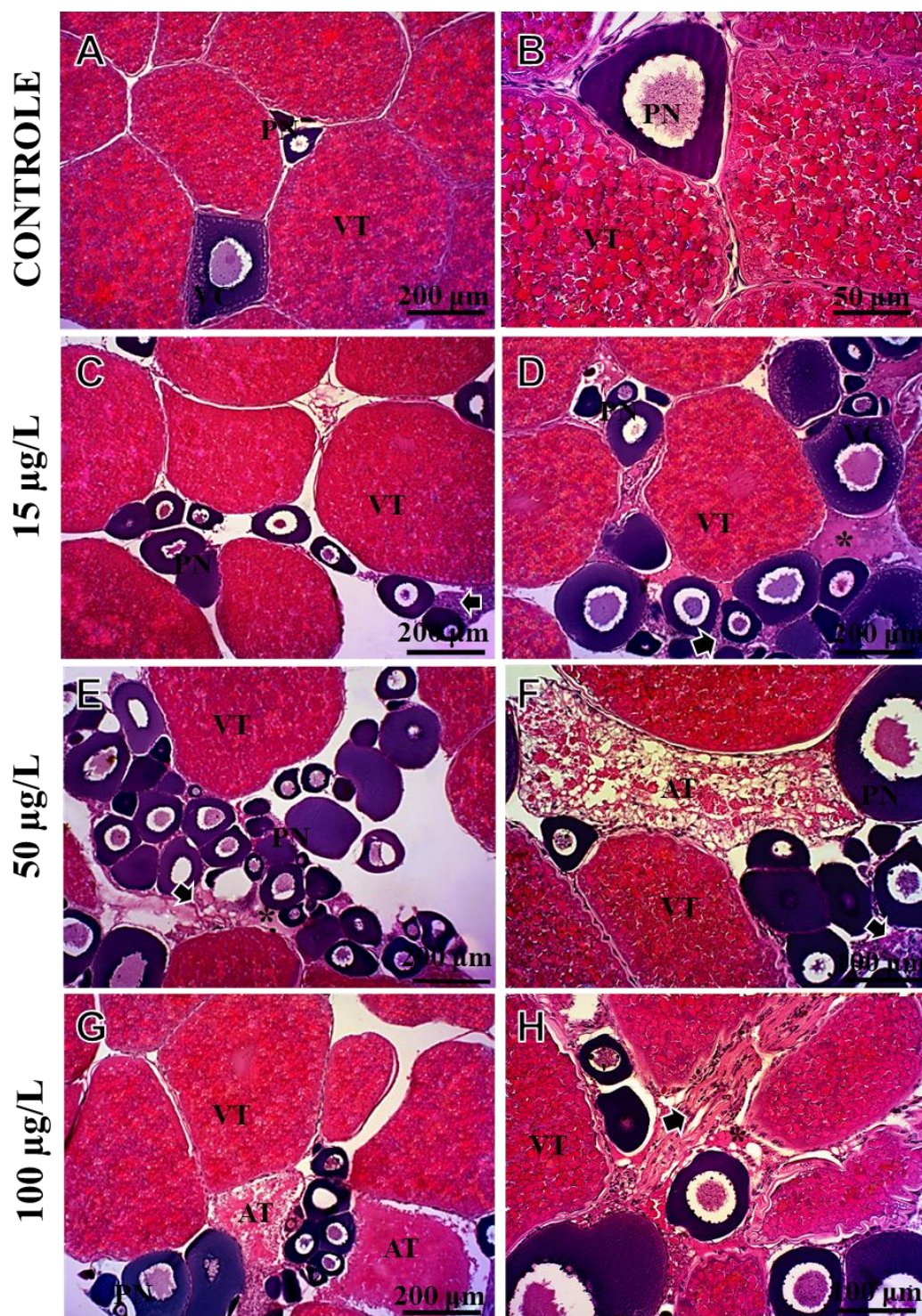
	Controle	15 $\mu\text{g/L Pb}$	50 $\mu\text{g/L Pb}$	100 $\mu\text{g/L Pb}$
Folículo Perinucleolar	8,29 $\pm$ 1,53 <sup>b</sup>	12,03 $\pm$ 1,18 <sup>ab</sup>	14,14 $\pm$ 2,02 <sup>a</sup>	12,08 $\pm$ 1,91 <sup>ab</sup>
Folículo com Vesícula Cortical	1,46 $\pm$ 0,41 <sup>a</sup>	1,25 $\pm$ 0,47 <sup>a</sup>	2,29 $\pm$ 0,56 <sup>a</sup>	3,10 $\pm$ 0,79 <sup>a</sup>
Folículo Vitelogênico	83,74 $\pm$ 2,31 <sup>a</sup>	77,02 $\pm$ 2,88 <sup>ab</sup>	64,41 $\pm$ 4,07 <sup>bc</sup>	57,94 $\pm$ 3,45 <sup>c</sup>
Folículo Atrésico	4,78 $\pm$ 2,22 <sup>b</sup>	5,43 $\pm$ 1,81 <sup>b</sup>	14,58 $\pm$ 4,06 <sup>a</sup>	21,45 $\pm$ 3,86 <sup>a</sup>
Tecido intersticial	1,01 $\pm$ 0,29 <sup>b</sup>	3,77 $\pm$ 1,02 <sup>a</sup>	3,68 $\pm$ 0,68 <sup>a</sup>	4,04 $\pm$ 0,95 <sup>a</sup>
$\phi$ Folículo vitelogênico	511,01 $\pm$ 4,95 <sup>a</sup>	476,40 $\pm$ 3,65 <sup>b</sup>	471,51 $\pm$ 3,18 <sup>b</sup>	440,92 $\pm$ 3,60 <sup>c</sup>

Valores expressos em média  $\pm$  erro padrão de 25 campos analisados por grupo. Diferentes letras indicam significantes diferenças entre grupos, Kruskal-Wallis,  $p < 0,05$ .

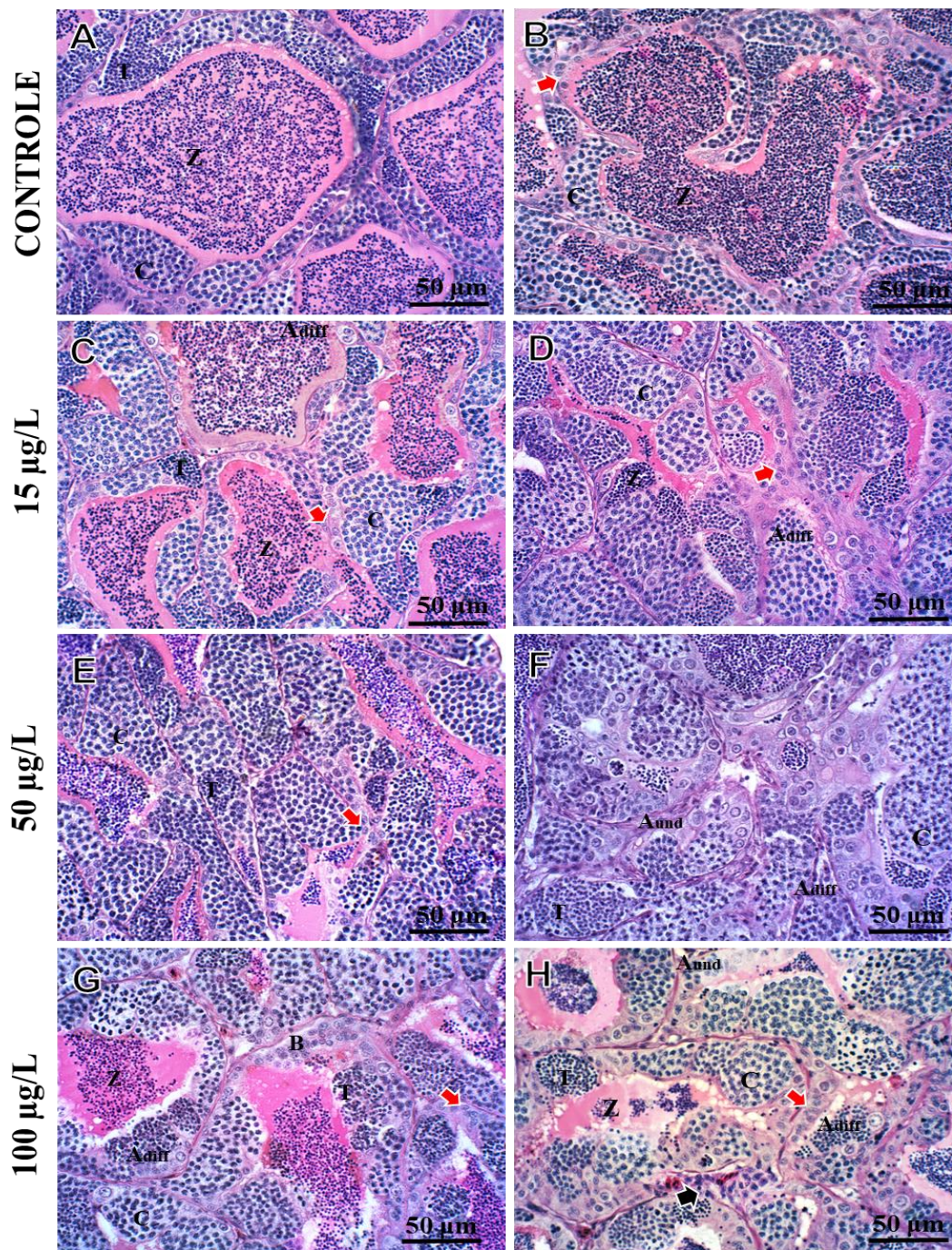
**Tabela 4.** Proporção (%) de componentes testiculares e diâmetro ( $\phi$ ) dos túbulos seminíferos em *Astyanax bimaculatus* expostos a diferentes concentrações de chumbo (Pb).

	Controle	15 $\mu\text{g/L Pb}$	50 $\mu\text{g/L Pb}$	100 $\mu\text{g/L Pb}$
Espermatogônia A <sub>und</sub>	0,28 $\pm$ 0,05 <sup>b</sup>	0,40 $\pm$ 0,09 <sup>b</sup>	1,60 $\pm$ 0,26 <sup>a</sup>	1,60 $\pm$ 0,27 <sup>a</sup>
Espermatogônia A <sub>diff</sub>	1,70 $\pm$ 0,19 <sup>b</sup>	1,73 $\pm$ 0,21 <sup>b</sup>	4,89 $\pm$ 0,61 <sup>a</sup>	4,85 $\pm$ 0,29 <sup>a</sup>
Espermatogônia B	1,62 $\pm$ 0,52 <sup>b</sup>	1,26 $\pm$ 0,26 <sup>b</sup>	2,50 $\pm$ 0,38 <sup>ab</sup>	2,96 $\pm$ 0,29 <sup>a</sup>
Espermatócito	25,99 $\pm$ 1,63 <sup>b</sup>	33,38 $\pm$ 3,00 <sup>ab</sup>	34,28 $\pm$ 2,48 <sup>a</sup>	33,31 $\pm$ 1,90 <sup>ab</sup>
Espermátide	9,32 $\pm$ 1,03 <sup>a</sup>	9,42 $\pm$ 1,04 <sup>a</sup>	10,53 $\pm$ 1,09 <sup>a</sup>	10,92 $\pm$ 0,97 <sup>a</sup>
Espermatozoide	45,71 $\pm$ 2,56 <sup>a</sup>	36,43 $\pm$ 3,96 <sup>ab</sup>	28,14 $\pm$ 2,32 <sup>b</sup>	27,52 $\pm$ 2,44 <sup>b</sup>
Lúmen tubular	10,75 $\pm$ 0,79 <sup>a</sup>	10,35 $\pm$ 1,04 <sup>a</sup>	10,06 $\pm$ 1,12 <sup>a</sup>	9,08 $\pm$ 0,98 <sup>a</sup>
Célula de Sertoli	1,91 $\pm$ 0,26 <sup>b</sup>	4,28 $\pm$ 0,60 <sup>a</sup>	4,65 $\pm$ 0,36 <sup>a</sup>	4,78 $\pm$ 0,41 <sup>a</sup>
Célula de Leydig	0,15 $\pm$ 0,05 <sup>b</sup>	0,36 $\pm$ 0,13 <sup>b</sup>	0,36 $\pm$ 0,11 <sup>b</sup>	0,78 $\pm$ 0,13 <sup>a</sup>
Tecido intersticial	2,56 $\pm$ 0,46 <sup>b</sup>	2,39 $\pm$ 0,30 <sup>b</sup>	2,98 $\pm$ 0,37 <sup>b</sup>	4,29 $\pm$ 0,33 <sup>a</sup>
$\phi$ Túbulos seminíferos	182,24 $\pm$ 4,88 <sup>a</sup>	160,82 $\pm$ 4,65 <sup>b</sup>	151,72 $\pm$ 2,72 <sup>bc</sup>	140,18 $\pm$ 2,21 <sup>c</sup>

Valores expressos em média  $\pm$  erro padrão de 25 campos analisados por grupo. Diferentes letras indicam significantes diferenças entre grupos, Kruskal-Wallis,  $p < 0,05$ .



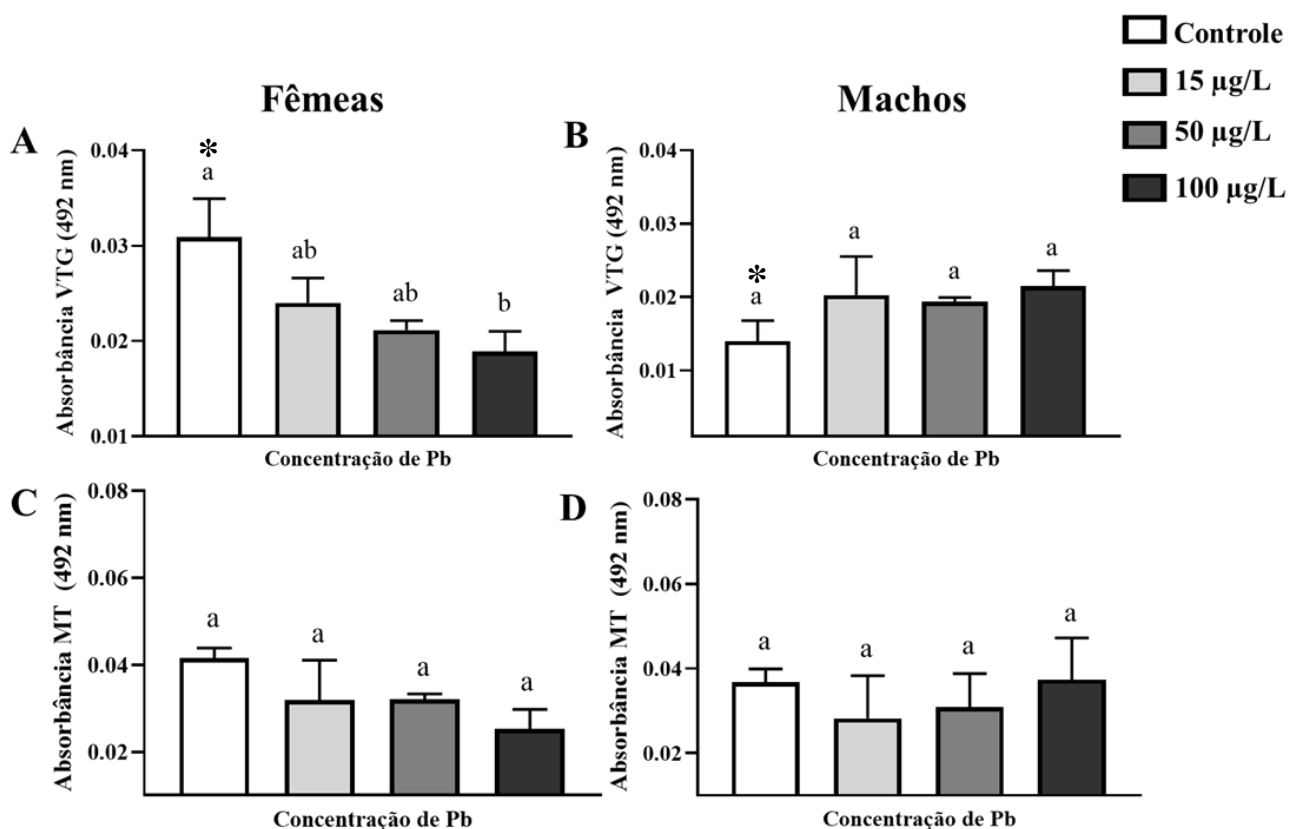
**Figura 8.** A-H. Seções transversais de ovários de *A. bimaculatus* nos diferentes tratamentos corados com HE. Folículos perinucleolares (PN), Folículos com vesículas corticais (VC), Folículos vitelogênicos (VT), Folículos atrésicos (AT), Fluido proteináceo (\*), (seta preta) Tecido intersticial. Barras = 50, 100 e 200  $\mu\text{m}$ .



**Figura 9.** A-H. Seções transversais de testículos de *A. bimaculatus* nos diferentes tratamentos corados com HE. (A-F) O epitélio germinativo apresenta cistos de células espermatogênicas em diferentes fases de desenvolvimento: espermatogônia do tipo A indiferenciada ( $A_{und}$ ), espermatogônia do tipo A diferenciada ( $A_{diff}$ ), espermatogônia do tipo B (B), espermatócitos (C), espermátides (T) e espermatozoides (Z). Os componentes somáticos são constituídos pelas células de Sertoli (seta vermelha), células de Leydig (seta preta). Barras = 50  $\mu\text{m}$ .

#### 5.4 NÍVEIS HEPÁTICOS DE VTG E MT

Foi observada uma redução significativa dos níveis de VTG nas fêmeas do grupo de 100 µg/L Pb em relação ao controle,  $p < 0,05$  (**Fig. 10A**) enquanto nos machos não houve diferença significativa entre os grupos,  $p = 0,39$  (**Fig. 10B**). Como esperado, fêmeas controle apresentam níveis de VTG mais elevados do que machos controle,  $p < 0,05$ , no entanto machos expostos ao Pb apresentaram níveis de VTG semelhantes às fêmeas, sem diferenças significativas entre os sexos. Não foi observada diferença significativa entre os níveis de MT nos grupos tratados tanto em fêmeas quanto em machos,  $p = 0,33$ , e  $p = 0,37$  respectivamente (**Fig. 10 C-D**).

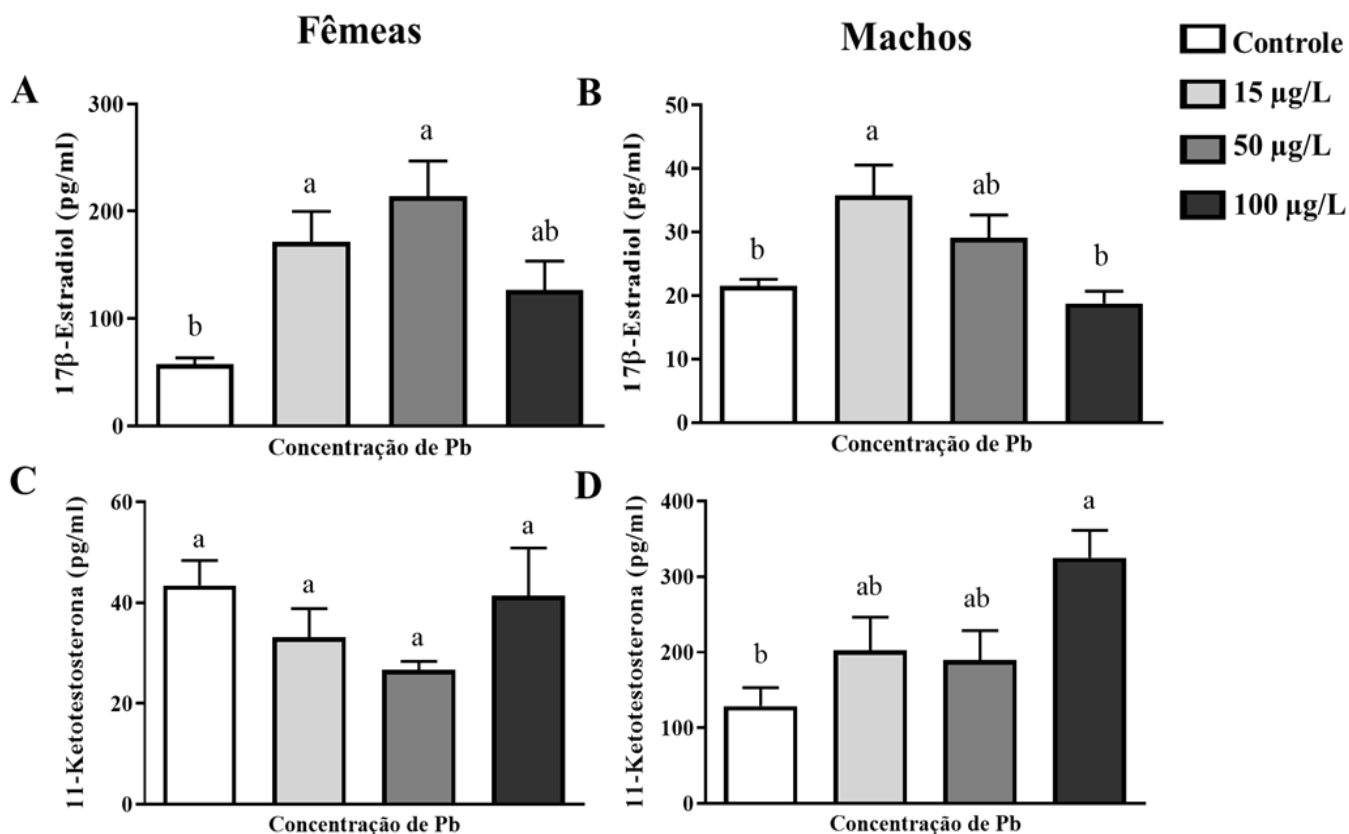


**Figura 10.** Níveis hepáticos de vitelogenina (VTG) e Metalotioneína (MT). A- Vitelogenina em fêmeas. B- Vitelogenina em machos. C- Metalotioneína em fêmeas. D-Metalotioneína em machos. Valores representam média  $\pm$  erro padrão de 5 animais/sexo/grupo analisados por ELISA com absorbância de 492 nm. Diferentes letras indicam significantes diferenças entre grupos, \*diferença estatística entre os sexos, Anova,  $p < 0,05$ .



## 5.5 CONCENTRAÇÃO PLASMÁTICA DE ESTEROIDES SEXUAIS

As concentrações de E2 aumentaram significativamente nas fêmeas dos grupos 15 e 50  $\mu\text{g/L}$  Pb,  $p = 0,004$  (**Fig. 11A**) e nos machos de 15 de  $\mu\text{g/L}$  Pb,  $p = 0,007$  (**Fig. 11B**). Nas fêmeas, as concentrações de 11-KT não foram significativamente diferentes entre os grupos,  $p = 0,23$  (**Fig. 11C**), enquanto nos machos houve aumento significativo no grupo de 100  $\mu\text{g/L}$  Pb em relação ao controle,  $p < 0,05$  (**Fig. 11D**).



**Figura 11.** Concentrações plasmáticas de 17β-estradiol e 11-ketotestosterona. A- 17β-estradiol em fêmeas. B- A- 17β-estradiol em machos. C- 11-ketotestosterona em fêmeas. D- 11-ketotestosterona em machos. Valores representam média  $\pm$  erro padrão de 5 animais/sexo de cada grupo analisados por ELISA com absorvância de 405 nm. Diferentes letras indicam significantes diferenças entre grupos, Anova,  $p < 0,05$ .

## 5.6 IMUNOLocalização DE ER $\alpha$ , ER $\beta$ e AR

A imunohistoquímica evidenciou a distribuição da marcação para os receptores de estrógenos e andrógeno nos ovários e testículos de *A.bimaculatus*. Em fêmeas, com relação ao ER $\alpha$ , houve marcação em células foliculares, ovogônias, e núcleo dos ovócitos e folículos atresicos. Para o ER $\beta$ , foi observado marcação em células foliculares, ovogônias, forte marcação em ovócitos perinucleolares avançados, com vesícula cortical, alguns núcleos de ovócitos vitelogênicos, e folículos atresicos. Para o AR, observamos o

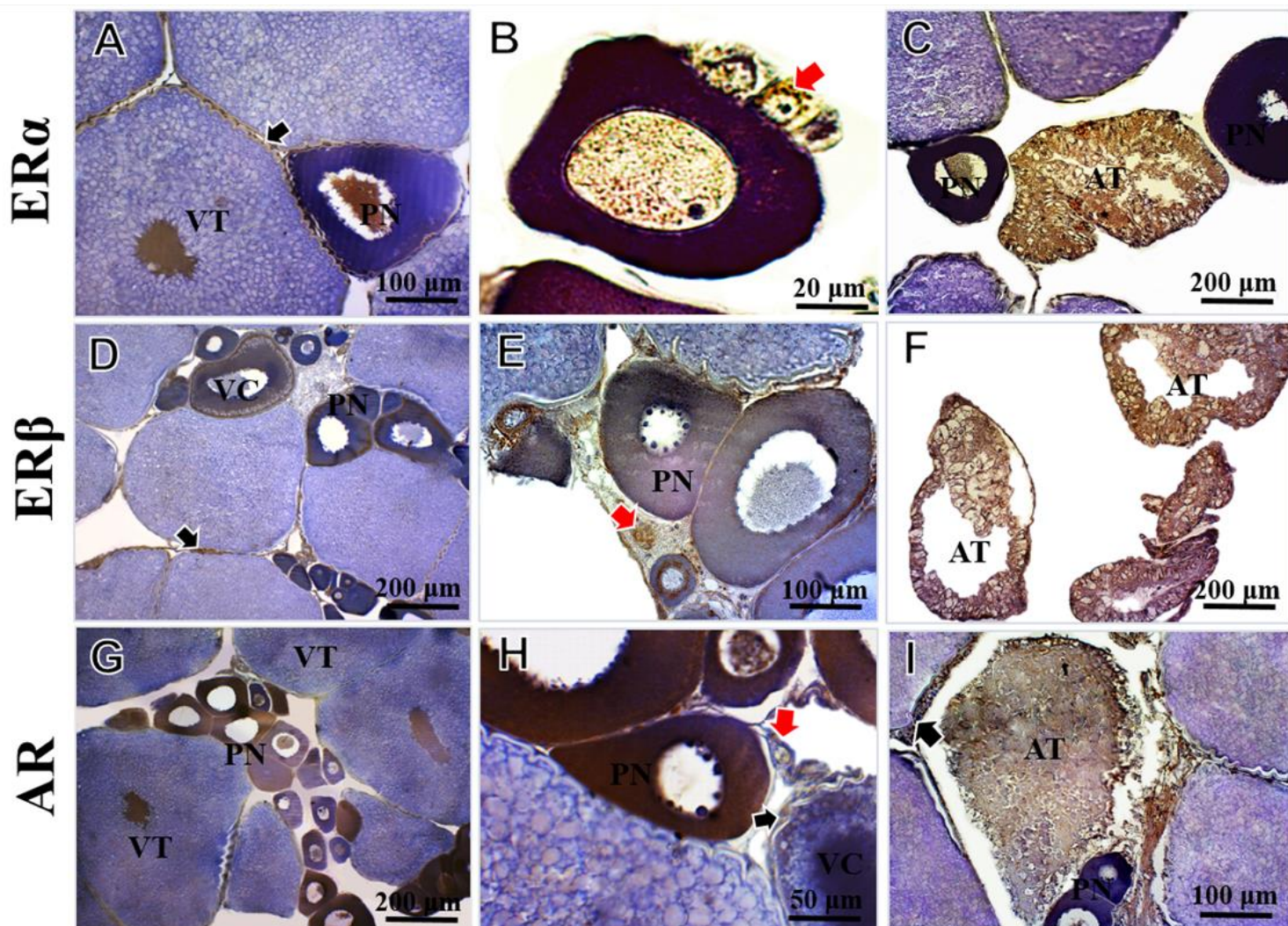
padrão de marcação em células foliculares, forte marcação em ovócitos perinucleolares, alguns núcleos de ovócitos com vesículas corticais, vitelogênicos, e folículos atrésicos (**Fig. 12**) (**Tabela 5**).

Em machos, uma marcação homogênea foi observada para ER $\alpha$  em células de Sertoli, espermatogônias, espermatócitos, espermatídes e espermatozoides. A imunomarcação para ER $\beta$  foi acentuada em espermatogônias e células de Leydig enquanto os espermatócitos estavam ligeiramente marcados. A expressão do AR foi mais acentuada nas células de Sertoli, e mais fracamente em espermatogônias, espermatócitos, espermatídes e espermatozoides (**Fig. 13**) (**Tabela 5**).

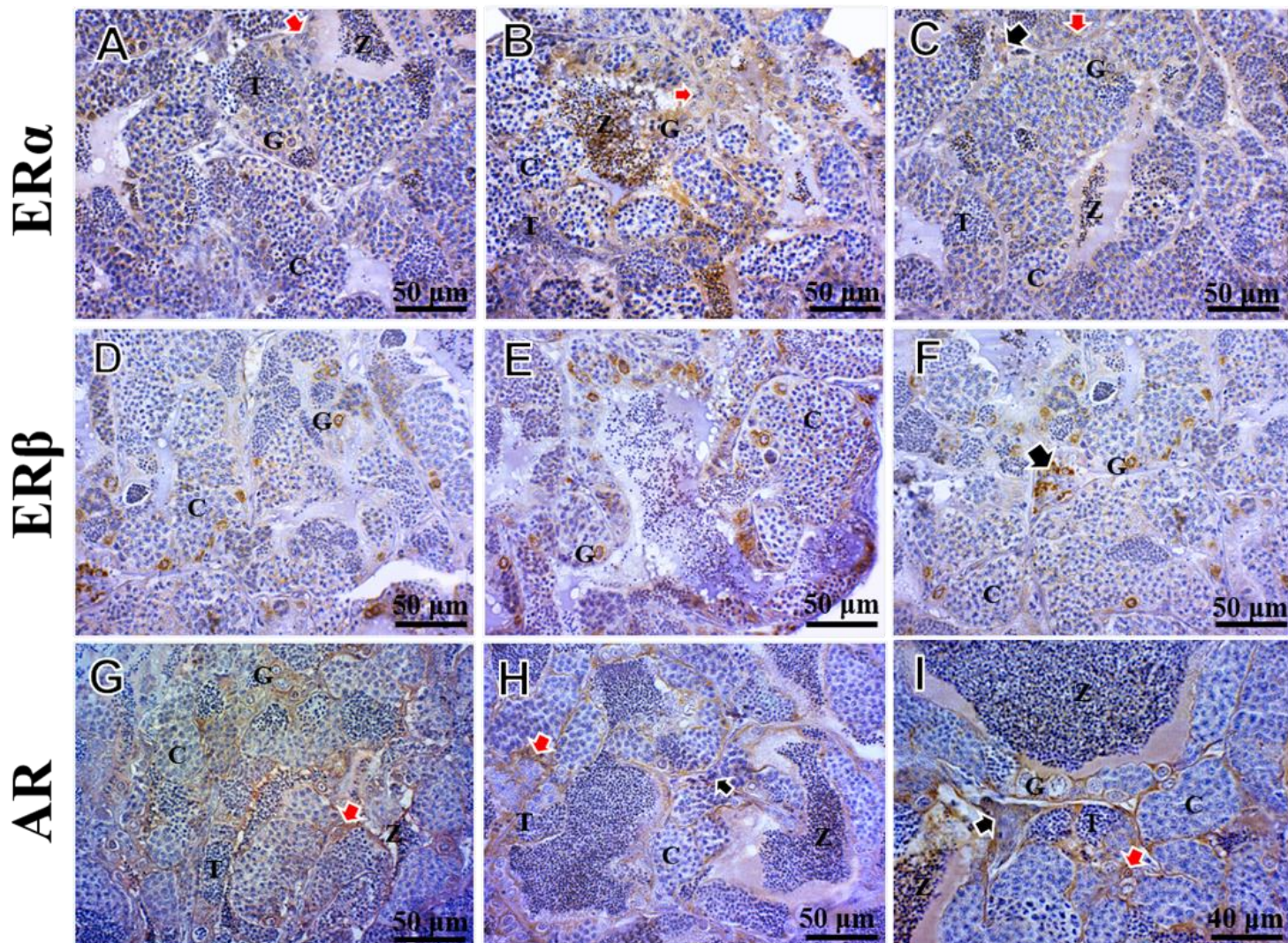
**Tabela 5.** Padrão de distribuição dos receptores de estrogênio (ER $\alpha$  e ER $\beta$ ) e andrógeno (AR) em ovários e testículos de *Astyanax bimaculatus* detectados pela técnica de imunohistoquímica.

		ER $\alpha$	ER $\beta$	AR
<b>Fêmeas</b>	Ovôgonia	++	++	+
	Ovócito Perinucleolar	+	+	++
	Ovócito com Vesícula Cortical	+	+	+
	Ovócito Vitelogênico	++	+	++
	Folículo Atrésico	++	++	++
	Célula Folicular	++	++	++
<b>Machos</b>	Espermatogônia	+	++	+
	Espermatócito	++	+	+
	Espermátide	+	-	+
	Espermatozoide	++	-	+
	Célula de Sertoli	+	-	++
	Célula de Leydig	+	++	++

(+) Marcação positiva fraca para o receptor, (++) Marcação positiva forte para o receptor, (-) Marcação negativa para o receptor.



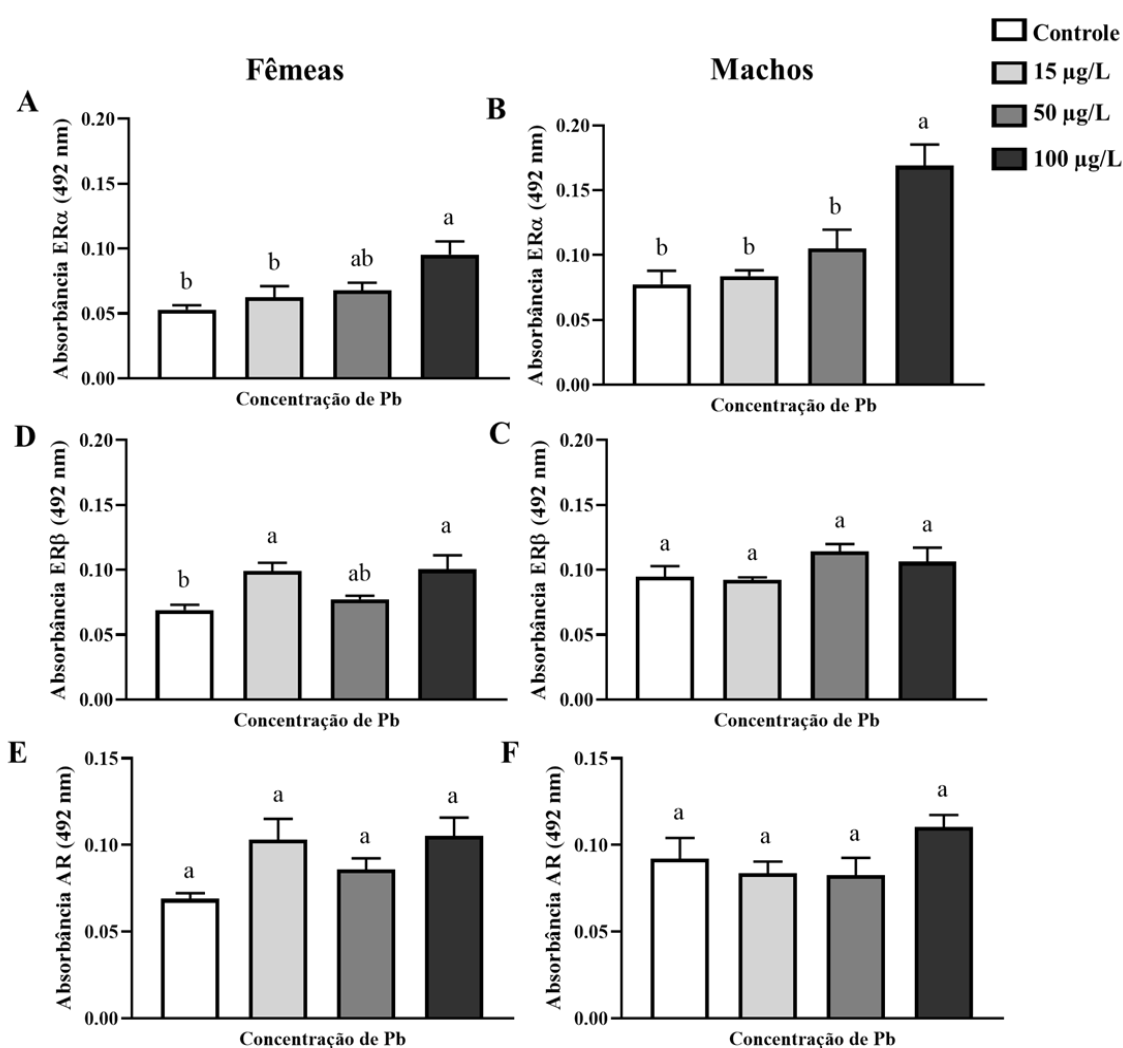
**Figura 12.** A-I. Imunolocalização dos receptores de estrogênio ( $ER\alpha$  e  $ER\beta$ ) e andrógeno ( $AR$ ) em ovários de *Astyanax bimaculatus*. Folículos perinucleolares (PN), Folículos com vesículas corticais (VC), Folículos vitelogênicos (VT), Folículos atresicos (AT), Ovogônia (seta vermelha) e Célula folicular (seta preta). Barras = 20, 50, 100, 200  $\mu\text{m}$ .



**Figura 13.** A-I. Imunolocalização dos receptores de estrógeno ( $ER\alpha$  e  $ER\beta$ ) e andrógeno (AR) em testículos de *Astyanax bimaculatus*. Espermatogônia (G), espermatócito (C), espermatíde (T), espermatozoide (Z), células de Sertoli (seta vermelha), células de Leydig (seta preta). Barras = 40 e 50  $\mu$ m.

## 5.7 EXPRESSÃO DOS RECEPTORES ER $\alpha$ , ER $\beta$ e AR

Os níveis dos receptores ER $\alpha$ , ER $\beta$  e AR foram analisados por ELISA. Nos ovários, valores mais elevados de ER $\alpha$  foi observado no grupo de 100  $\mu\text{g/L}$  Pb,  $p = 0,0094$  (Fig. 14A) e para o ER $\beta$  nos grupos de 15 e 100  $\mu\text{g/L}$  Pb comparados com o grupo controle,  $p < 0,05$  (Fig. 14C). Nos machos, também houve aumento significativo de ER $\alpha$  no grupo de 100  $\mu\text{g/L}$  Pb em comparação com os demais grupos,  $p = 0,0007$  (Fig. 14B). Todavia para o ER $\beta$  não apresentou diferença estatística entre os grupos (Fig. 14D). Para ambos os sexos, não houve diferença significativa entre os níveis de AR nos grupos tratados em relação ao controle (Fig. 14E e 14F).



**Figura 14.** Expressão de receptores de estrogênio e andrógênio em gônadas de lambaris. A- Receptor de estrogênio  $\alpha$  (ER $\alpha$ ) em ovário. B- Receptor de estrogênio  $\alpha$  (ER $\alpha$ ) em ovário em testículo. C- Receptor de estrogênio  $\beta$  (ER $\beta$ ) em ovário. Receptor de estrogênio  $\beta$  (ER $\beta$ ) em testículo. E- Receptor de andrógênio (AR) em ovário. F- Receptor de andrógênio (AR) em testículo. Valores representam média  $\pm$  erro padrão de 4 animais/sexo/grupo analisados por ELISA. Diferentes letras indicam significantes diferenças entre grupos, Anova,  $p < 0,05$

## 6. DISCUSSÃO

Metais pesados advindos de diferentes fontes de contaminação atingem os corpos d'água e afetam os peixes ao provocar um desequilíbrio em seus processos fisiológicos (Suliman e Suliman, 2019). Estudos ambientais prévios, mostraram a ocorrência de disfunções endócrinas e reprodutivas associadas à presença de metais pesados (Cu, Pb, Cd, Zn, Cr, Hg e Fe) nos tecidos de peixes capturados na bacia do Rio São Francisco, e em alguns casos, com níveis de contaminação superior às aquelas consideradas seguras para consumo humano (Savassi et al., 2016; Paschoalini et al., 2019). Entretanto poucos estudos experimentais têm investigado detalhadamente seus efeitos sobre a reprodução das espécies. Dentre os metais pesados, o chumbo tem sido incluído no grupo dos metaloestrógenos, uma classe emergente de compostos que incluem o Pb, Cd, Hg, Al, As, Ni, Cr, dentre outros, os quais se ligam a receptores de estrógenos e podem atuar como agonista dos estrógenos naturais (Safe, 2003; Darbre, 2006). No presente estudo, a exposição de lambaris à diferentes concentrações de chumbo foi responsável por efeitos deletérios na gametogênese, com redução do IGS e dos diâmetros dos folículos vitelogênicos e dos túbulos seminíferos. Em geral, o IGS acompanha a maturação gonadal de teleósteos, atingindo valores mais elevados na fase madura (Rizzo e Bazzoli, 2020) e seus valores reduzidos em animais expostos a compostos estrogênicos pode ser um indicativo de efeitos negativos sobre a gametogênese (Silva et al., 2012), como reportado em carpas prussianas após 6 meses de exposição ao Pb na dieta (Łuszczek-Trojnar et al., 2014) e exposição a 10 µg/L de Pb durante 12 dias em truta arco-íris *Oncorhynchus mykiss* (Ruby e Anderson, 2000). Os efeitos dos metais pesados sobre células germinativas e somáticas, atraso na maturação gonadal e desequilíbrio hormonal são parâmetros reprodutivos relevantes na ecotoxicologia ambiental que podem severamente afetar as populações de peixes (Kar et al., 2021) e a conservação das espécies.

No presente estudo, fêmeas tratadas com 50 µg/L de Pb apresentaram aumento de folículos perinucleolares, seguido de redução dos folículos vitelogênicos e aumento de atresia folicular nos grupos de 50 e 100 µg/L, indicando uma inibição do crescimento ovocitário secundário, que é dependente de FSH e de E2. Estudo feito com peixes *Anabas testudineus* expostos por 30 dias a diferentes concentrações de nitrato de chumbo demonstrou regressão ovariana dose dependente, e conseqüentemente diminuição no IGS (Tulasi et al., 1989). De acordo com Massányi et al., (2020), o chumbo é responsável por alterações no epitélio germinativo nos ovários, com diminuição do crescimento folicular,

alterações na proporção das células germinativas e ocorrência de atresia folicular. Assim como observado no presente estudo, camundongos e enguias expostos ao acetato e nitrato de chumbo também demonstraram aumento significativo de folículos atrésicos e comprometimento do desenvolvimento ovariano (Biswas e Ghosh, 2016; Jiang et al., 2021). O aumento na proporção de folículos atrésicos pode ter consequências graves para as populações de peixes, reduzindo o potencial reprodutivo da espécie por meio de uma diminuição no número de folículos vitelogênicos (Rizzo e Bazzoli, 1995; Santos et al., 2005). De acordo com Azab et al., (2019), os metais pesados podem perturbar o eixo HPG e, como consequência, a produção de esteroides sexuais pode ser inadequada para o desenvolvimento dos gametas, maturação das gônadas, ovulação e desova. Em estudos ambientais, a exposição de *Astyanax rivularis* a compostos estrogênicos (estrone, estradiol e bisfenol A) presentes em córregos contaminados do Rio da Velhas, Brasil provocou aumento dos folículos perinucleares e redução de vitelogênicos (Weber et al., 2017), um perfil de alterações reprodutivas similar ao encontrado neste trabalho.

Nos ovários, as células foliculares são responsáveis por dar todo o suporte para o crescimento dos ovócitos através da incorporação de vitelogenina, uma fosfolipoproteína produzida no fígado pelos hepatócitos durante maturação gonadal, transportada pela corrente sanguínea e incorporada nos ovários por micropinocitose mediada por receptores de membrana presente nas células foliculares (Arukwe e Goksøyr, 2003). Em nosso experimento, o E2 aumentou nos grupos de 15 e 50 µg/L Pb, porém a VTG hepática em fêmeas apresentou uma redução significativa no grupo de 100 µg/L Pb. Em contrapartida, houve elevação da expressão dos ER $\alpha$  em ovários de peixes expostos a 100 µg/L Pb, embora não tenha havido aumento significativo nas concentrações plasmáticas de E2. Estas variações detectadas nesse estudo podem ser relacionadas a complexa interação entre receptores de estrógeno, seus ligantes, co-reguladores e outras vias de sinalização ativas durante maturação ovariana.

Os efeitos dos estrógenos ambientais são mediados pela ligação do E2 com seus respectivos receptores, os quais são responsáveis pela diferenciação das células da granulosa (células foliculares em peixes) assim como o crescimento e desenvolvimento das células germinativas (Tang et al., 2019). A expressão e localização celular dos ERs auxiliam a compreensão dos possíveis efeitos hormonais durante a ovogênese. Em roedores, o ER $\alpha$  e ER $\beta$  são expressos nos ovários em diferentes tipos celulares, sendo o ER $\beta$  expresso em células da granulosa e nos folículos ovarianos primários, secundários e maduros enquanto o ER $\alpha$  não foi detectável nas células da granulosa, mas foi encontrado

no epitélio germinativo e nas células do interstício e da teca (Krege et al., 1998; Sar e Welsch, 1999). No crustáceo *Neomysis japonica*, o ER $\alpha$  foi localizado em células foliculares, e principalmente em ovogônias, ovócito pré-vitelogênico e núcleo de ovócito vitelogênico (Yang et al., 2012). Em peixes, poucos estudos investigaram os tipos celulares que expressam esses receptores nos ovários, principalmente ER $\beta$ . Em medaka (*Oryzias latipes*), a forte expressão do RNA para ER $\alpha$  foi observada em células foliculares de folículos ovarianos coletados durante a fase de crescimento do ovócito (Chakraborty et al., 2011). No presente estudo, evidenciamos a reação imunohistoquímica para ER $\alpha$  e ER $\beta$  em células foliculares, ovogônias, ovócitos perinucleolares, ovócitos com vesícula cortical, ovócitos vitelogênicos e folículos atrésicos de *A. bimaculatus*.

O ER $\alpha$  participa principalmente da secreção de VTG na corrente sanguínea, todavia, como mostrado por Nelson e Habibi (2010), o E2 primeiro se liga ao ER $\beta$ , que induz a síntese de VTG. Subsequentemente, o aumento da expressão de ER $\alpha$  resulta em hepatócitos sensibilizados à estimulação do E2, produzindo ainda mais VTG. Estudos demonstram que o Pb e outros metais têm a capacidade de se ligar aos ER $\alpha$  presentes nas células e dar origem a respostas de forma semelhante aos agonistas de estrógeno (Safe, 2003; Dyer, 2007). Além de ocupar o sítio de ligação do E2, o Pb tem a sua capacidade de ativar os receptores de estrógeno e estimular vias ligadas a proliferação celular (Martin et al., 2003; Fuentes e Silveyra, 2019). Dessa forma, nossos resultados sugerem que apesar do aumento na expressão de ER $\alpha$  no grupo de 100  $\mu\text{g/L}$  e ER $\beta$  no grupo de 15 e 100  $\mu\text{g/L}$ , a afinidade do Pb com os receptores de estrógeno reduz a quantidade disponível de sítio de ligação do E2 e compromete o funcionamento normal da via estrogênica, como observado pela redução da produção de VTG nas fêmeas. Apesar do seu perfil como EDC estrogênico, o Pb pode agir de diversas formas, seja em baixas concentrações causando um efeito estimulante de E2 ou em concentrações maiores onde a sua toxicidade pode ocasionar danos e conseqüentemente morte celular, alteração na produção de proteínas e na expressão de ERs, mostrando sua ação multifatorial e dose dependente.

Além do importante papel dos estrógenos no ovário, os andrógenos desempenham funções importantes, fornecendo o substrato da P450 aromatase, que é responsável pela conversão de testosterona a E2, mas também atuam via receptores de andrógeno (ARs) que auxiliam no crescimento primário dos folículos ovarianos (Lubzens et al., 2017; Lee e Lou, 2019). Em mamíferos, o AR foi encontrado em células da granulosa, folículos em todos os estágios de desenvolvimento (Cárdenas e Pope, 2002; Ma et al., 2017). No presente estudo, a imunolocalização do AR ocorreu nas células foliculares, ovócitos



perinucleolares, com vesícula cortical, vitelogênicos e atresicos de *A. bimaculatus*, entretanto a expressão deste receptor nas células que compõem o ovário é ainda obscuro.

Apesar dos efeitos dos andrógenos sobre a ovogênese serem pouco compreendidos, estudos demonstraram seu papel no crescimento primário e desenvolvimento de folículos perinucleolares (Lee e Lou, 2019; Wang et al., 2020). Estudos indicam também que os andrógenos estão relacionados com menores taxas de atresia em folículos perinucleolares avançados (Forsgren e Young, 2012). No presente estudo, a proporção de folículos perinucleolares aumentou no grupo de 50 µg/L Pb, entretanto, não houve aumento significativo na concentração de 11-KT e expressão de AR nos ovários. Em contrapartida, um estudo realizado com *Heteropneustes fossilis* expostos a diferentes concentrações de Pb durante 24 h, demonstrou que alterações nos níveis de andrógenos podem variar dependendo da concentração no ambiente e da natureza dos insultos (Chaube et al., 2010).

Nos machos, mudanças nas concentrações plasmáticas dos hormônios sexuais como detectado em *A. bimaculatus* deste estudo indicam que a via esteroidogênica sofreu alterações devido a exposição ao Pb, com consequências sobre a espermatogênese e a fisiologia testicular. Segundo Schulz et al., (2010), o E2 apesar de ser encontrado em baixas concentrações no plasma sanguíneo de machos, aumenta no início da espermatogênese, ligando-se a células Sertoli e estimulando a auto-renovação espermatogonial. Nesse sentido, vários estudos têm mostrado que o aumento na proporção de espermatogônias em machos podem estar relacionados a EDCs estrogênicos (Silva et al., 2012; Luzio et al., 2016; Weber et al., 2017). Em nosso estudo, machos expostos ao Pb apresentaram aumento significativo na proporção de espermatogônias e de espermatócitos, que pode ser relacionado ao aumento da proliferação celular estimulada por E2. Em um estudo ambiental, o acúmulo de Pb, Cr, Cu, Fe, Cd acima do limite permitido pela legislação brasileira em *Prochilodus argenteus* do Rio Paraopeba, também levou ao aumento na proporção de espermatogônias e espermatócitos (Paschoalini et al., 2019). Peixes expostos a uma mistura de xenoestrógenos tiveram aumento na expressão testicular de genes relacionados a mitose e meiose, e a marcação positiva de espermatogônias, espermatócitos e espermátides para PCNA (Wang et al., 2019).

Além dos estrógenos, T e 11-KT podem atuar em peixes na diferenciação espermatogonial, controlar a entrada em meiose e junto do LH desempenhar funções durante a espermiogênese (Schulz et al., 2010). Apesar de um aumento significativo de

11-KT no grupo de 100 µg/L, no presente trabalho não foi observado efeito sobre a expressão do AR. Em contrapartida, uma redução drástica na proporção de espermatozoides no grupo de 50 e 100 µg/L foi observada. De acordo com Wang et al., (2019), meiose interrompida e apoptose elevada são as principais causas da redução de espermatozoides em peixes. Apesar de não termos avaliados estas vias, o padrão da proporção de células germinativas em *A.bimaculatus* neste estudo foi semelhante ao encontrado em espécies de zebrafish expostos ao dietilestilbestrol, um estrógeno ambiental, e a interrupção da meiose e ativação da apoptose foram relatadas neste estudo (Yin et al., 2017).

Em machos, os andrógenos são essenciais para a espermatogênese e manutenção da maturação dos espermatozoides e eles atuam nos testículos através do AR (Tokarz et al., 2015). Em vertebrados, o AR é expresso nas células de Sertoli, células peritubulares mióides e células de Leydig (Zhou et al., 2002; Pearl et al., 2011). Em contrapartida, sua presença nas células germinativas permanece controversa e varia entre espécies (Pearl et al., 2011). Em nosso estudo, uma forte imunomarcagem para AR foi observada em células de Sertoli e de Leydig, mas uma marcação mais fraca foi também detectada nas células germinativas.

O aumento das concentrações de 11-KT em machos expostos a 100 µg/L Pb sugere que a expressão das enzimas responsáveis por converter a testosterona em 11-KT pode ter sido alterada após a exposição ao Pb, entretanto sua ação nos receptores de andrógeno não é conhecida. Um experimento feito com machos de zebrafish nocaute para AR relatou redução de IGS, atraso na espermatogênese, aumento de espermatogônias e espermátócitos e ausência de espermatozoides, além da interrupção da segunda divisão meiótica, redução de testosterona e aumento de 11-KT (Yu et al., 2018). Em ratos wistar, a administração de 10 mg/kg de acetato de chumbo diminuiu significativamente o número e viabilidade dos espermatozoides, níveis séricos de LH e testosterona, atividade testicular de 17β-HSD, expressão de AR e a atividade de enzimas antioxidantes (Wahab et al., 2019). Apesar destes relatos, de forma geral, o Pb atua como um desregulador endócrino devido principalmente a suas propriedades estrogênicas (Darbre, 2006).

A capacidade do testículo em sintetizar estrógenos tem sido amplamente reconhecida, assim como a capacidade do testículo em reagir à estimulação estrogênica por meio da presença de receptores de estrógeno (ERs) (Sharpe, 1998). Nos testículos, a presença ou ausência de ERα e ERβ são altamente variáveis e exibem um padrão de expressão espécie-específico, dificultando a interpretação dos dados e os possíveis efeitos

relacionados ao tratamento com estrógenos (Hess et al., 2021). Em mamíferos, o ER $\alpha$  e ER $\beta$  encontrado principalmente nas células somáticas, e apenas algumas células germinativas (Zhou et al., 2002, Kotula-Balak et al., 2005; Filipiak et al., 2012). Em relação aos estudos feitos em peixes, nota-se que a maioria dos estudos enfocam o ER $\alpha$  demonstram sua presença em todos os estágios de células germinativas em desenvolvimento, tal como, espermatogônias, espermatócitos, espermátides e espermatozoides (Viñas e Piferrer 2008; Zhu et al., 2008). Em *A. bimaculatus*, a expressão dos receptores de estrógeno (ER $\alpha$  e ER $\beta$ ) foi observada nas espermatogônias, espermatócitos e células de Leydig, entretanto, células de Sertoli, espermátides e espermatozoides expressaram somente o ER $\alpha$ . Dados similares foram relatados em *A. rivularis* (Weber et al., 2018).

Apesar do papel desempenhado pelos ERs, no presente estudo, o Pb foi somente capaz de alterar a produção do ER $\alpha$ , no grupo de 100  $\mu\text{g/L}$ . Além disso, os níveis hepáticos de VTG nos grupos tratados com Pb foram semelhantes ao das fêmeas. De fato, o perfil dos estrógenos ambientais é justamente induzir a regulação positiva de ER $\alpha$  e de VTG em peixes machos (Wen et al., 2013). Por outro lado, a indução de VTG pode ter apenas um pequeno efeito na expressão de ER $\beta$  hepático (Nelson e Habibi, 2013). Em estudos lambaris expostos a composto estrogênicos, resultados semelhantes ao do presente estudo foram encontrados com aumento de ER $\alpha$  e nenhum aumento para ER $\beta$  nos testículos (Weber et al., 2018).

No presente estudo, os efeitos do Pb sobre as diversas fases da espermatogênese refletiram na redução da proporção dos espermatozoides bem como na diminuição do IGS e do diâmetro dos túbulos seminíferos. Efeitos semelhantes foram relatados por Massányi et al., (2020), cujos efeitos tóxicos do Pb nos testículos incluíram alterações nos túbulos seminíferos, aumento de interstício e diminuição da contagem de espermatozoides. Em ratos albinos, a exposição ao Pb também reduziu a quantidade de células espermatogênicas, especialmente suas formas maduras como espermátides e espermatozoides (Shubina e Dudenkova, 2016). Além dos metais interferirem na produção e ação dos esteroides sexuais nas gônadas, outro importante fator que deve ser considerado é o estresse oxidativo provocado pelo Pb, aumentando espécies reativas de oxigênio e perturbação do eixo HPG (Wahab et al., 2019). Está bem documentado que membranas dos espermatozoides são suscetíveis ao ataque de ROS, isso eleva os danos à cromatina / DNA dos espermatozoides (Ghaleno et al., 2021). Sendo assim, mesmo em

baixas concentrações de Pb, o próprio estresse oxidativo pode levar a danos e possivelmente induzir a apoptose das células germinativas.

Um biomarcador importante de ambientes contaminados com metais pesados é a MT, que atua principalmente na homeostase de metais essenciais e na desintoxicação de metais não essenciais. Em condições fisiológicas, o Zn ligado a MT é liberado quando o ambiente se torna oxidado. O estresse oxidativo causado por metais pesados como o Pb, pode levar a uma liberação do zinco de proteínas contendo “zinc-fingers” permitindo a ligação de metais não essenciais (Ruttikay-Nedecky et al., 2013), aqueles que não se ligam a MT ficam disponíveis no citosol e causam diversos danos à proteínas e nos processos enzimáticos (Coyle et al., 2002). Estudos sugerem que a MT têm a capacidade de aumentar sua expressão quando as concentrações de metais nos tecidos aumentam (Saad et al., 2016). Apesar disso, a ausência de efeitos do Pb sobre a expressão de MT nas fêmeas e machos pode ser devido a sua menor afinidade com o Pb do que com outros metais como o Hg, Cu, Cd e Zn (Olsson et al., 1998). De fato, Atli e Canli (2008) também relataram que os níveis de MT em *Oreochromis niloticus* expostos ao Pb sofreram poucas alterações. Entretanto, Werber et al, (2020) e Paschoalini et al., (2019) observaram aumento da expressão de MTs hepática em peixes expostos ao Pb, mas neste caso deve se levar em consideração que os animais estavam expostos a outros poluentes simultaneamente, sugerindo que a indução poderia ser causada por outros metais. Além disso, o acúmulo acentuado de metais no fígado, bem como o alto teor de Pb encontrado nas brânquias e nos rins de *Sparus aurata* não foram acompanhados por um acúmulo concomitante de MT nesses tecidos (Cretì et al., 2010).

Desta forma, este estudo demonstra que mesmo em concentrações relativamente baixas, a exposição subcrônica ao Pb altera a reprodução dos lambaris, afetando o índice gonadossomático, a distribuição das células germinativas, a produção de esteroides sexuais pelas gônadas e de proteínas essenciais para o desenvolvimento reprodutivo, bem como níveis dos ERs, portanto atuando como um metaloestrógeno. A falta de fiscalização ambiental e de pesquisas que avaliem os efeitos de contaminantes como Pb que se fazem cada vez mais presentes nos ambientes aquáticos podem prejudicar o sucesso reprodutivo de muitas espécies de peixes de água doce como o *A. bimaculatus*.

## 7. CONCLUSÕES

- Em concentrações ambientalmente relevantes, o Pb causa impacto negativo na gametogênese e maturação gonadal do *A. bimaculatus*, reduzindo o índice gonadossomático e o diâmetro dos folículos vitelogênicos e dos túbulos seminíferos;
- A exposição ao Pb induz uma clássica resposta não monotônica nas concentrações plasmáticas de E2 em fêmeas e machos de *A. bimaculatus*;
- Apesar do aumento do 11-KT em machos e da expressão de ER $\alpha$  em ovários e testículos, a toxicidade do Pb reduz a produção espermática e a proporção de folículos vitelogênicos em *A. bimaculatus*;
- Apesar de não alterar os níveis hepáticos de MT em *A. bimaculatus*, a toxicidade de Pb reduz a VTG hepática em fêmeas.

## 8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Al-Balawi, F.H.A., Al-Akel, A.S., Al-Misned, F., Amin, E., Suliman, M., Al-Ghanim, K.A., Mahboob, S., Ahmad, Z., 2013. Effects of sub-lethal exposure of lead acetate on histopathology of gills, liver, kidney and muscle and its accumulation in these organs of *Clarias gariepinus*. *Arch. Biol. Technol.* 5656, 293–302. <https://doi.org/10.1590/S1516-89132013000200015>
- Ali, H., Khan, E., 2018. What are heavy metals? Long-standing controversy over the scientific use of the term ‘heavy metals’—proposal of a comprehensive definition. *Toxicological and Environmental Chemistry* 100, 6–19. <https://doi.org/10.1080/02772248.2017.1413652>
- Ali, H., Khan, E., Ilahi, I., 2019. Environmental chemistry and ecotoxicology of hazardous heavy metals: Environmental persistence, toxicity, and bioaccumulation. *Journal of Chemistry* 2019, 1-14. <https://doi.org/10.1155/2019/6730305>
- Araújo, F.G., Nascimento, A.A., Gomes, I.D., Sales, A., Oliveira, B.A.C.D.de, 2019. Gonadal development and reproductive period of the characin *Astyanax aff. bimaculatus* (Characiformes: Characidae) in a tropical reservoir in southeastern Brazil. *Zoologia* 36, 1-14. <https://doi.org/10.3897/zoologia.36.e30610>
- Arukwe, A., Goksøyr, A., 2003. Eggshell and egg yolk proteins in fish: Hepatic proteins for the next generation: Oogenetic, population, and evolutionary implications of endocrine disruption. *Comparative Hepatology* 2, 1–21. <https://doi.org/10.1186/1476-5926-2-4>
- Atli, G., Canli, M., 2008. Responses of metallothionein and reduced glutathione in a freshwater fish *Oreochromis niloticus* following metal exposures. *Environmental Toxicology and Pharmacology* 25, 33–38. <https://doi.org/10.1016/j.etap.2007.08.007>
- ATSDR, Agency for Toxic Substances and Disease Registry, 2020. Toxicological Profile for Lead. <https://www.atsdr.cdc.gov/toxprofiles/tp13.pdf>
- Azab, M., Aly-Eldeen, A.M., Khalaf-Allah, H.M.M., El-Battal, M. M. A., 2019. Effect of heavy metals on the ovary of *Tilapia zillii* in some canals of Nile Delta area, Egypt. *Egyptian Journal of Aquatic Biology and Fisheries* 23, 329-345. <https://doi.org/10.21608/ejabf.2019.45670>
- Bianchini, A., 2016. Avaliação do impacto da lama / pluma Samarco sobre os ambientes costeiros e marinhos (ES e BA) com ênfase nas Unidades de Conservação. *ICMBio* 1, 1-62. [https://www.icmbio.gov.br/portal/images/stories/DCOM\\_relatorio\\_revisado\\_atualizado\\_29\\_04\\_2016\\_AB.pdf](https://www.icmbio.gov.br/portal/images/stories/DCOM_relatorio_revisado_atualizado_29_04_2016_AB.pdf)
- Bila, M.D., Dezotti, M., 2007. Desreguladores endócrinos no meio ambiente: efeitos e conseqüências. *Quim. Nova.* 30, 651–666. <https://doi.org/10.1590/S0100-40422007000300027>
- Biswas, S., Ghosh, A.R., 2016. Lead induced histological alterations in ovarian tissue of freshwater teleost *Mastacembelus pancalus* (Hamilton). *International Journal of Advances in Scientific Research* 02, 45–51. <https://doi.org/10.7439/ijasr.v2i1.2797>
- Bradford, M.M., 1976. Protein utilizing the principle of protein-dye binding, *Anal. Biochem.* 72, 248-254. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(76\)90527-3](https://doi.org/10.1016/0003-2697(76)90527-3)

- Bressler, J.P., Olivi, L., Cheong, J.H., Kim, Y., Bannon, D., 2004. Divalent metal transporter 1 in lead and cadmium transport. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1012, 142–152. <https://doi.org/10.1196/annals.1306.011>
- Briffa, J., Sinagra, E., Blundell, R., 2020. Heavy metal pollution in the environment and their toxicological effects on humans. *Heliyon* 6, 04691 1-26. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2020.e04691>
- Cárdenas, H., Pope, W.F., 2002. Androgen receptor and follicle-stimulating hormone receptor in the pig ovary during the follicular phase of the estrous cycle. *Molecular Reproduction and Development* 62, 92–98. <https://doi.org/10.1002/mrd.10060>
- Chakraborty, S.B., Banerjee, S., Chatterjee, S., 2011. Increased androgen receptor expression in muscle tissue contributing to growth increase in androgen-treated *Nile tilapia*. *Aquaculture International* 19, 1119–1137. <https://doi.org/10.1007/s10499-011-9428-x>
- 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*. *Toxicology in Vitro* 24, 1899–1904. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2010.07.021>
- Chimento, A., Sirianni, R., Casaburi, I., Pezzi, V., 2014. Role of estrogen receptors and G protein-coupled estrogen receptor in regulation of hypothalamus-pituitary-testis axis and spermatogenesis. *Frontiers in Endocrinology* 5, 1–8. <https://doi.org/10.3389/fendo.2014.00001>
- CONAMA, Conselho Nacional do Meio Ambiente, 2005. Resolução Conama N° 357, de 17 de março de 2005. [https://www.icmbio.gov.br/cepsul/images/stories/legislacao/Resolucao/2005/res\\_conama\\_357\\_2005\\_classificacao\\_corpos\\_agua\\_rtfda\\_altrd\\_res\\_393\\_2007\\_397\\_2008\\_410\\_2009\\_430\\_2011.pdf](https://www.icmbio.gov.br/cepsul/images/stories/legislacao/Resolucao/2005/res_conama_357_2005_classificacao_corpos_agua_rtfda_altrd_res_393_2007_397_2008_410_2009_430_2011.pdf)
- Coward, K., Bromage, N.R., Hibbitt, O., Parrington, J., 2002. Gamete physiology, fertilization and egg activation in teleost fish. *Reviews in Fish Biology and Fisheries* 12, 33–58. <https://doi.org/10.1023/A:1022613404123>
- Coyle, P., Philcox, J.C., Carey, L.C., Rofe, A.M., 2002. Metallothionein: The multipurpose protein. *Cellular and Molecular Life Sciences* 59, 627–647. <https://doi.org/10.1007/s00018-002-8454-2>
- Cretì, P., Trinchella, F., Scudiero, R., 2010. Heavy metal bioaccumulation and metallothionein content in tissues of the sea bream *Sparus aurata* from three different fish farming systems. *Environmental Monitoring and Assessment* 165, 321–329. <https://doi.org/10.1007/s10661-009-0948-z>
- Darbre, P.D., 2006. Metalloestrogens: An emerging class of inorganic xenoestrogens with potential to add to the oestrogenic burden of the human breast. *Journal of Applied Toxicology* 26, 191–197. <https://doi.org/10.1002/jat.1135>
- Diamanti-Kandarakis, E., Bourguignon, J.P., Giudice, L.C., Hauser, R., Prins, G.S., Soto, A.M., Zoeller, R.T., Gore, A.C., 2009. Endocrine-disrupting chemicals: An Endocrine Society scientific statement. *Endocrine Reviews* 30, 293–342. <https://doi.org/10.1210/er.2009-0002>
- Dignam, T., Kaufmann, R.B., LeSturgeon, L., Brown, M.J. (2019). Control of lead sources in the United States, 1970-2017: Public health progress and current challenges to eliminating lead exposure. *Journal of Public Health Management and Practice* 25, 1-16. <https://doi.org/10.1097/PHH.0000000000000889>

- Domingos, F.F.T., Thomé, R.G., Arantes, F.P., Castro, A.C.S., Sato, Y., Bazzoli, N., Rizzo, E., 2012. Assessment of spermatogenesis and plasma sex steroids in a seasonal breeding teleost: A comparative study in an area of influence of a tributary, downstream from a hydroelectric power dam, Brazil. *Fish Physiology and Biochemistry* 38, 1709–1719. <https://doi.org/10.1007/s10695-012-9668-3>
- Drummond, C.D., Bazzoli, N., Rizzo, E., Sato, Y., 2000. Postovulatory follicle: a model for experimental studies of programmed cell death or apoptosis in teleosts. *J. Exp. Zool.* 287, 176–182. [https://doi.org/10.1002/1097-010X\(20000701\)287:2<176::AID-JEZ8>3.0.CO;2-2](https://doi.org/10.1002/1097-010X(20000701)287:2<176::AID-JEZ8>3.0.CO;2-2)
- Dyer, C.A., 2007. Heavy Metals as Endocrine-Disrupting Chemicals. *Endocrine-Disrupting Chemicals* 5, 111–133. [https://doi.org/10.1007/1-59745-107-x\\_5](https://doi.org/10.1007/1-59745-107-x_5)
- Ettinger, A.S., Hu, H., Hernandez-Avila, M., 2007. Dietary calcium supplementation to lower blood lead levels in pregnancy and lactation. *Journal of Nutritional Biochemistry* 18, 172–178. <https://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2006.12.007>
- Fashola, M.O., Ngole-Jeme, V.M., Babalola, O.O., 2016. Heavy metal pollution from gold mines: Environmental effects and bacterial strategies for resistance. *International Journal of Environmental Research and Public Health* 13, 1-20. <https://doi.org/10.3390/ijerph13111047>
- 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>
- Filipiak, E., Suliborska, D., Laszczynska, M., Walczak-jedrzejowska, R., Oszukowska, E., Marchlewska, K., Kula, K., Slowikowska-hilczer, J., 2012. Estrogen receptor alpha localization in the testes of men with normal spermatogenesis. *Folia Histochem Cytobiol* 50, 340–345. <https://doi.org/10.5603/19743>
- Forsgren, K.L., Young, G., 2012. Stage-specific effects of androgens and estradiol-17beta on the development of late primary and early secondary ovarian follicles of coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*) in vitro. *Biology of Reproduction* 87, 1–14. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.111.098772>
- Fuentes, N., Silveyra, P., 2019. Estrogen receptor signaling mechanisms. *Adv. Protein Chem. Struct. Biol.* 116, 135-170. <https://doi.org/10.1016/bs.apcsb.2019.01.001>
- Garcia, L.C., Ribeiro, D.B., De Oliveira Roque, F., Ochoa-Quintero, J.M., Laurance, W.F., 2017. Brazil's worst mining disaster: Corporations must be compelled to pay the actual environmental costs: Corporations. *Ecological Applications* 27, 5–9. <https://doi.org/10.1002/eap.1461>
- García-López, Á., Bogerd, J., Granneman, J.C.M., Dijk, W. Van, Trant, J.M., Taranger, G.L., Schulz, W., 2009. Leydig cells express follicle-stimulating hormone Receptors in African catfish. *Endocrinology* 150, 357–365. <https://doi.org/10.1210/en.2008-0447>
- García-lópez, Á., Sánchez-amaya, M.I., Prat, F., 2011. Targeted gene expression profile in European sea bass (*Dicentrarchus labrax*, L.) follicles from primary growth to late vitellogenesis. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 160, 374–380. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2011.07.006>



- Ghaleno, L.R., Alizadeh, A., Drevet, J.R., Shahverdi, A., Valojerdi, M.R., 2021. Oxidation of Sperm DNA and Male Infertility. *Antioxidants (Basel)* 10, 1–15. <https://doi.org/10.3390/antiox10010097>
- Ghiselli, G., Jardim, W.F., 2007. Interferentes endócrinos no ambiente. *Química Nova* 30, 695–706. <https://doi.org/10.1590/S0100-40422007000300032>
- Grier, H.J., 1981. Cellular organization of the testis and spermatogenesis in fishes. *Integrative and Comparative Biology* 21, 345–357. <https://doi.org/10.1093/icb/21.2.345>
- Hansen, P.D., Dizer, H., Hock, B., Marx, A., Sherry, J., McMaster, M., Blaise, C., 1998. Vitellogenin - A biomarker for endocrine disruptors. *Trends in Analytical Chemistry* 17, 448–451. [https://doi.org/10.1016/S0165-9936\(98\)00020-X](https://doi.org/10.1016/S0165-9936(98)00020-X)
- Hemmadi, V., 2016. Metallothionein - A potential biomarker to assess the metal contamination in marine fishes - A review. *International Journal of Bioassays* 5, 4961–4973. <https://doi.org/10.21746/ijbio.2016.04.003>
- Hess, R.A., Sharpe, R.M., Hinton, B.T., 2021. Estrogens and development of the rete testis, efferent ductules, epididymis and vas deferens. *Differentiation* 118, 41–71. <https://doi.org/10.1016/j.diff.2020.11.004>
- Hsu, P.C., Guo, Y.L., 2002. Antioxidant nutrients and lead toxicity. *Toxicology* 180, 33–44. [https://doi.org/10.1016/S0300-483X\(02\)00380-3](https://doi.org/10.1016/S0300-483X(02)00380-3)
- IBAMA, Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais, 2015. Laudo técnico preliminar: Impactos ambientais decorrentes do desastre. [http://www.ibama.gov.br/phocadownload/noticias/noticias2016/laudo\\_tecnico\\_pr\\_eliminar\\_ibama.pdf](http://www.ibama.gov.br/phocadownload/noticias/noticias2016/laudo_tecnico_pr_eliminar_ibama.pdf)
- IGAM, Instituto Mineiro de Gestão das Águas, 2018. Encarte Especial. Qualidade das águas do Rio Doce após 3 anos do rompimento da Barragem de Fundão. [http://www.igam.mg.gov.br/images/stories/2018/QUALIDADE\\_DA\\_AGUA/ENCARTE\\_Tres\\_ANOS.pdf](http://www.igam.mg.gov.br/images/stories/2018/QUALIDADE_DA_AGUA/ENCARTE_Tres_ANOS.pdf)
- IGAM, Instituto Mineiro de Gestão das Águas, 2019. Informativo diário dos parâmetros de qualidade das águas nos locais monitorados ao longo do Rio Paraopeba, após o desastre na barragem B1 no complexo da Mina Córrego Feijão da Mineradora Vale/SA no município de Brumadinho – Minas Gerais. <http://200.198.57.118:8080/jspui/handle/123456789/2948>
- Jiang, X., Xing, X., Zhang, Yingbing, Zhang, C., Wu, Y., Chen, Y., Meng, R., Jia, H., Cheng, Y., Zhang, Yong, Su, J., 2021. Ecotoxicology and Environmental Safety Lead exposure activates the Nrf2 / Keap1 pathway, aggravates oxidative stress, and induces reproductive damage in female mice. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 207, 111231. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2020.111231>
- Juntti, S.A., Fernald, R.D., 2016. Timing reproduction in teleost fish: Cues and mechanisms. *Curr. Opin. Neurobiol.* 38, 57–62. <https://doi.org/10.1016/j.conb.2016.02.006>
- Kagawa, H., 2013. Oogenesis in Teleost Fish. *Aqua-BioScience Monographs* 6, 99–127. <https://doi.org/10.5047/absm.2013.00604.0099>
- Kar, S., Sangem, P., Anusha, N., Senthilkumaran, B., 2021. Endocrine disruptors in teleosts: Evaluating environmental risks and biomarkers. *Aquaculture and Fisheries* 6, 1–26. <https://doi.org/10.1016/j.aaf.2020.07.013>

- Kordas, K., 2017. The “Lead Diet”: Can Dietary Approaches Prevent or Treat Lead Exposure? *Journal of Pediatrics* 185, 224-231. <https://doi.org/10.1016/j.jpeds.2017.01.069>
- Kotula-Balak, M., Gancarczyk, M., Sadowska, J., Bilinskai, B., 2005. The expression of aromatase, estrogen receptor alpha and estrogen receptor beta in mouse Leydig cells *in vitro* that derived from cryptorchid males. *European Journal of Histochemistry* 49, 59–62. <https://doi.org/10.4081/928>
- Krege, J.H., Hodgin, J.B., Couse, J.F., Enmark, E., Warner, M., Mahler, J.F., Sar, M., Korach, K.S., Gustafsson, J.Å., Smithies, O., 1998. Generation and reproductive phenotypes of mice lacking estrogen receptor  $\beta$ . *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95, 15677–15682. <https://doi.org/10.1073/pnas.95.26.15677>.
- Kwong, W.T., Friello, P., Semba, R.D., 2004. Interactions between iron deficiency and lead poisoning: Epidemiology and pathogenesis. *Science of the Total Environment* 330, 21–37. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2004.03.017>
- Lee, J.W., Choi, H., Hwang, U.K., Kang, J.C., Kang, Y.J., Kim, K. Il, Kim, J.H., 2019. Toxic effects of lead exposure on bioaccumulation, oxidative stress, neurotoxicity, and immune responses in fish: A review. *Environmental Toxicology and Pharmacology* 68, 101–108. <https://doi.org/10.1016/j.etap.2019.03.010>
- Lee, S., Lou, S., 2019. Androgenic Modulation in the Primary Ovarian Growth of the Japanese eel, *Anguilla japonica*. *Zoological Studies* 2, 1–15. <https://doi.org/10.6620/ZS.2019.58-02>
- Lubzens, E., Bobe, J., Young, G., Sullivan, C.V., 2017. Maternal investment in fish oocytes and eggs: The molecular cargo and its contributions to fertility and early development. *Aquaculture* 472, 107–143. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2016.10.029>
- Lubzens, E., Young, G., Bobe, J., Cerdà, J., 2010. Oogenesis in teleosts: How fish eggs are formed. *General and Comparative Endocrinology* 165, 367–389. <https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2009.05.022>
- Lucena, C.A.S. de, Soares, H.G., 2016. Review of species of the *Astyanax bimaculatus* “caudal peduncle spot” subgroup sensu Garutti & Langeani (Characiformes, Characidae) from the rio la Plata and rio São Francisco drainages and coastal systems of southern Brazil and Uruguay. *Zootaxa* 4072, 101–125. <https://doi.org/10.11646/zootaxa.4072.1.5>
- Łuszczek-Trojnar, E., Drag-Kozak, E., Szczerbik, P., Socha, M., Popek, W., 2014. Effect of long-term dietary lead exposure on some maturation and reproductive parameters of a female Prussian carp (*Carassius gibelio* B.). *Environmental Science and Pollution Research* 21, 2465–2478. <https://doi.org/10.1007/s11356-013-2184-x>
- Luzio, A., Monteiro, S.M., Rocha, E., Fontaínhas-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). *Aquatic Toxicology* 175, 90–105. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2016.03.014>
- Ma, Y., Andrisse, S., Chen, Y., Childress, S., Xue, P., Wang, Z., Jones, D., Ko, C., Divall, S., Wu, S., 2017. Androgen receptor in the ovary theca cells plays a critical role in

- androgen-induced reproductive dysfunction. *Endocrinology* 158, 98–108. <https://doi.org/10.1210/en.2016-1608>
- 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* 144, 2425–2436. <https://doi.org/10.1210/en.2002-221054>
- Massányi, P., Massányi, M., Madeddu, R., Stawarz, R., Lukáč, N., 2020. Effects of cadmium, lead, and mercury on the structure and function of reproductive organs. *Toxics* 8, 1–31. <https://doi.org/10.3390/toxics8040094>
- Melo, R.M.C., Martins, Y.S., Luz, R.K., Rizzo, E., Bazzoli, N., 2015. PCNA and apoptosis during post-spawning ovarian remodeling in the teleost *Oreochromis niloticus*. *Tissue and Cell* 47, 541–549. <https://doi.org/10.1016/j.tice.2015.10.002>
- Michels, G., Hoppe, U.C., 2008. Rapid actions of androgens. *Frontiers in Neuroendocrinology* 29, 182–198. <https://doi.org/10.1016/j.yfrne.2007.08.004>
- Miranda, L.S., Marques, A.C., 2016. Hidden impacts of the Samarco mining waste dam collapse to Brazilian marine fauna - an example from the staurozoans (Cnidaria). *Biota Neotropica* 16. <https://doi.org/10.1590/1676-0611-bn-2016-0169>
- Miura, C., Miura, T., 2011. Analysis of Spermatogenesis Using an Eel Model. *Aqua-BioScience Monographs* 4, 105–129. <https://doi.org/10.5047/absm.2011.00404.0105>
- Moreira, F; Moreira, J.C., 2004. A cinética do chumbo no organismo humano e sua importância para a saúde Lead. *Ciência & Saúde Coletiva* 9, 167–181. <https://doi.org/10.1590/S1413-81232004000100017>
- Nagahama, Y., Yamashita, M., 2008. Regulation of oocyte maturation in fish. <https://doi.org/10.1111/j.1440-169X.2008.01019.x>
- Nelson, E.R., Habibi, H.R., 2013. Estrogen receptor function and regulation in fish and other vertebrates. *General and Comparative Endocrinology* 192, 15–24. <https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2013.03.032>
- Nelson, E.R., Habibi, H.R., 2010. Functional significance of nuclear estrogen receptor subtypes in the liver of goldfish. *Endocrinology* 151, 1668–1676. <https://doi.org/10.1210/en.2009-1447>
- Olsson, P.-E., Kling, P., Hogstrand, C., 1998. Mechanisms of heavy metal accumulation and toxicity in fish. *Metal Metabolism in Aquatic Environments* 321–350. [https://doi.org/10.1007/978-1-4757-2761-6\\_10](https://doi.org/10.1007/978-1-4757-2761-6_10)
- Paschoalini, A.L., Bazzoli, N., 2021. Heavy metals affecting neotropical freshwater fish: A review of the last 10 years of research. *Aquatic Toxicology* 237, 105906. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2021.105906>
- 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. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2018.11.047>

- Patiño, R., Sullivan, C. V., 2003. Ovarian follicle growth, maturation, and ovulation in teleost fish. *Fish Physiology and Biochemistry* 26, 57-70. <https://doi.org/10.1023/A:1023311613987>
- Pearl, C.A., Mason, H., Roser, J.F., 2011. Immunolocalization of estrogen receptor alpha, estrogen receptor beta and androgen receptor in the pre-, peri- and post-pubertal stallion testis. *Animal Reproduction Science* 125, 103–111. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2011.03.007>
- Pena, P.G.L., Northcross, A.L., Lima, M.A.G. de, Rêgo, R. de C.F., 2020. Derramamento de óleo bruto na costa brasileira em 2019: emergência em saúde pública em questão. *Cadernos de saúde pública* 36, e00231019. <https://doi.org/10.1590/0102-311X00231019>
- Pereira, L.F., Cruz, G. de B., Guimarães, R.M.F., 2019. Journal of environmental analysis and progress JEAP. *Journal of Environmental Analysis and Progress* 4, 122–129. <https://doi.org/10.24221/jeap.4.2.2019.2373.122-129>
- 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. *Environmental Research* 131, 165–173. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2014.03.002>
- Rădulescu, A., Lundgren, S., 2019. A pharmacokinetic model of lead absorption and calcium competitive dynamics. *Scientific Reports* 9, 1–27. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-50654-7>
- Rajeshkumar, S., Li, X., 2018. Bioaccumulation of heavy metals in fish species from the Meiliang Bay, Taihu Lake, China. *Toxicology Reports* 5, 288–295. <https://doi.org/10.1016/j.toxrep.2018.01.007>
- Rizzo, E., Bazzoli, N., 1995. Follicular atresia in curimatá-pioa *Prochilodus affinis* Reinhardt, 1874 (Pisces, Characiformes). *Revista Brasileira de Biologia*. 55, 697-703. <http://www.sfrancisco.bio.br/arquivos/Rizzo%20E001.pdf>
- Rizzo, E., Bazzoli, N., 2020. Reproduction and embryogenesis. *Biology and physiology of freshwater neotropical fish* 13, 287-313 <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-815872-2.00013-0>
- Ruby, S.M., Hull, R., Anderson, P., 2000. Environmental contamination and toxicology sublethal lead affects pituitary function of rainbow trout during exogenous vitellogenesis. *Journal of Environmental Contamination Toxicology* 38, 46–51. <https://doi.org/10.1007/s002449910006>
- Ruttkay-Nedecky, B., Nejdil, L., Gumulec, J., Zitka, O., Masarik, M., Eckschlager, T., Stiborova, M., Adam, V., Kizek, R., 2013. The role of metallothionein in oxidative stress. *International Journal of Molecular Sciences* 14, 6044–6066. <https://doi.org/10.3390/ijms14036044>
- Saad, A.A., El-sikaily, A., Kassem, H., 2016. Metallothionein and glutathione content as biomarkers of metal pollution in mussels and local fishermen in Abu Qir Bay, Egypt. *Journal of Health and Pollution* 6, 50–60. <https://doi.org/10.5696/2156-9614-6-12.50>
- Safe, S., 2003. Cadmium's disguise dupes the estrogen receptor. *Nature Medicine* 9, 1000–1001. <https://doi.org/10.1038/nm0803-1000>

- Santos, D.C.M. dos, Matta, S.L.P. da, Oliveira, J.A. de, Santos, J.A.D. dos, 2012. Histological alterations in gills of *Astyanax* aff. *bimaculatus* caused by acute exposition to zinc. *Experimental and Toxicologic Pathology* 64, 861–866. <https://doi.org/10.1016/j.etp.2011.03.007>
- Santos, H.B., Rizzo, E., Bazzoli, N., Sato, Y., Moro, L., 2005 Ovarian regression and apoptosis in the South American teleost *Leporinus taeniatus* Lutken (Characiformes, Anostomidae) from the São Francisco Basin. *Journal of Fish Biology* 67, 1446–1459. <https://doi.org/10.1111/j.1095-8649.2005.00854.x>
- Santos, H.B., Thomé, R.G., Arantes, F.P., Sato, Y., Bazzoli, N., Rizzo, E., 2008. Ovarian follicular atresia is mediated by heterophagy, autophagy, and apoptosis in *Prochilodus argenteus* and *Leporinus taeniatus* (Teleostei: Characiformes). *Theriogenology* 70, 1449–1460. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2008.06.091>
- Sar, M., Welsch, F., 1999. Differential expression of estrogen receptor- $\beta$  and estrogen receptor- $\alpha$  in the rat ovary. *Endocrinology* 140, 963–971. <https://doi.org/10.1210/endo.140.2.6533>
- Savassi, 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. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 96, 478–483. <https://doi.org/10.1007/s00128-016-1732-8>
- Schulz, R.W., de França, L.R., Lareyre, J.J., LeGac, F., Chiarini-Garcia, H., Nobrega, R.H., Miura, T., 2010. Spermatogenesis in fish. *General and Comparative Endocrinology* 165, 390–411. <https://doi.org/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. *Brazilian Journal of Biology* 61, 615–622. <https://doi.org/10.1590/s1519-69842001000400010>
- Scott, G.R., Sloman, K.A., 2004. The effects of environmental pollutants on complex fish behavior: integrating behavioural and physiological indicators of toxicity. *Aquatic Toxicology* 68, 369–392. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2004.03.016>
- Sharma, C.M., Rosseland, B.O., Almvik, M., Eklo, O.M., 2009. Bioaccumulation of organochlorine pollutants in the fish community in Lake Årungen, Norway. *Environmental Pollution* 157, 2452–2458. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2009.03.007>
- Sharpe, R.M., 1998. The roles of oestrogen in the male. *Trends in Endocrinology and Metabolism* 9, 371–377. [https://doi.org/10.1016/S1043-2760\(98\)00089-7](https://doi.org/10.1016/S1043-2760(98)00089-7)
- Shen, M., Shi, H., 2015. Sex Hormones and Their Receptors Regulate Liver Energy Homeostasis. 2015, 1-12 *International Journal of Endocrinology* <https://doi.org/10.1155/2015/294278>
- Shubina, O.S., Dudenkova, N.A., 2016. The effect of lead on the process of spermatogenesis in sex glands of male albino rats. *Veterinary World* 9, 1129–1134. <https://doi.org/10.14202/vetworld.2016.1129-1134>
- 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. *Aquatic Toxicology* 124–125, 1–10. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2012.07.002>
- Simionov, I., Cristea, V., Petrea, S., Mogodan, A., Nicoara, M., Baltag, E.S., Strungaru, S., Faggio, C., 2019. Bioconcentration of essential and nonessential elements in black sea turbot (*Psetta maxima maeotica* Linnaeus, 1758) in Relation to Fish Gender. *Journal of Marine Science and Engineering* 7, 1-18. <https://doi.org/10.3390/jmse7120466>
- Siqueira-Silva, D.H., Silva, A.P.S., Ninhaus-Silveira, A., Veríssimo-Silveira, R., 2015. Morphology of the urogenital papilla and its components ducts in *Astyanax altiparanae* Garutti and Britski, 2000 (Characiformes: Characidae). *Neotropical Ichthyology* 13, 309–316. <https://doi.org/10.1590/1982-0224-20140102>
- Sulieman, H.M.A., Suliman, E.A.M., 2019. Appraisal of heavy metal levels in some marine organisms gathered from the Vellar and Uppanar estuaries Southeast Coast of Indian Ocean. *Journal of Taibah University for Science* 13, 1658-3655. <https://doi.org/10.1080/16583655.2019.1576276>
- Tang, Z.R., Zhang, R., Lian, Z.X., Deng, S.L., Yu, K., 2019. Estrogen-receptor expression and function in female reproductive disease. *Cells* 8, 1123. <https://doi.org/10.3390/cells8101123>
- 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. *General and Comparative Endocrinology* 175, 367-383. <https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2011.11.032>
- Tokarz, J., Möller, G., Hrabě, de A.M., Adamski, J., 2015. Steroids in teleost fishes: A functional point of view. *Steroids* 103, 123-44. <https://doi.org/10.1016/j.steroids.2015.06.011>
- Tulasi, S.J., Reddy, P.U.M., Ramana Rao, J. V., 1989. Effects of lead on the spawning potential of the fresh water fish, *Anabas testudineus*. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 43, 858–863. <https://doi.org/10.1007/BF01702056>
- Uribe, M.C., Grier, H.J., Mejía-Roa, V., 2014. Comparative testicular structure and spermatogenesis in bony fishes. *Spermatogenesis* 4, e983400- 1-13. <https://doi.org/10.4161/21565562.2014.983400>
- Vajda, A.M., Barber, L.B., Gray, J.L., Lopez, E.M., Bolden, A.M., Schoenfuss, H.L., Norris, D.O., 2011. Demasculinization of male fish by wastewater treatment plant effluent. *Aquatic Toxicology* 103, 213–221. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2011.02.007>
- Venkateswarlu, V., Venkatrayulu, C., 2020. Bioaccumulation of heavy metal lead (Pb) in different tissues of brackish water fish *Mugil cephalus* (Linnaeus, 1758). *Journal of Applied Biology and Biotechnology* 8, 1–5. <https://doi.org/10.7324/JABB.2020.80201>
- Vergilio, C.S.dos., Lacerda, D., Oliveira, B.C.V.de., Sartori, E., Campos, M.C., Pereira, A.L.de.S., Aguiar, D.B. de, Souza, T.da.S., Almeida, M.G.de., Thompson, F., Rezende, C.E.de., 2020. Metal concentrations and biological effects from one of the largest mining disasters in the world (Brumadinho, Minas Gerais, Brazil). *Scientific Reports* 10, 1–12. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-62700-w>

- Viñas, J., Piferrer, F., 2008. Stage-specific gene expression during fish spermatogenesis as determined by laser-capture microdissection and quantitative-PCR in sea bass (*Dicentrarchus labrax*) Gonads. *Biology of Reproduction* 79,738–747. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.108.069708>
- Wahab, O.A., Princely, A.C., Oluwadamilare, A.A., Oore-oluwapo, D.O., Alli, O., Alfred, E.F., 2019. Clomiphene citrate ameliorated lead acetate-induced reproductive toxicity in male Wistar rats. *JBRA Assist. Reprod.* 23, 336–343. <https://doi.org/10.5935/1518-0557.20190038>
- Wang, W., Zhu, H., Tian, Z.H., Sun, A., Dong, Y., Dong, T., Hu, H.X., 2020. Effects of 11-Ketotestosterone on development of the previtellogenic ovary in the sterlet, *Acipenser ruthenus*. *Frontiers in Endocrinology* 11, 1–14. <https://doi.org/10.3389/fendo.2020.00115>
- Wang, W.C., Mao, H., Ma, D.D., Yang, W.X., 2014. Characteristics, functions, and applications of metallothionein in aquatic vertebrates. *Frontiers in Marine Science* 1, 1–12. <https://doi.org/10.3389/fmars.2014.00034>
- Wang, Y.Q., Li, Y.W., Chen, Q.L., Liu, Z.H., 2019. Long-term exposure of xenoestrogens with environmental relevant concentrations disrupted spermatogenesis of zebrafish through altering sex hormone balance, stimulating germ cell proliferation, meiosis and enhancing apoptosis. *Environmental Pollution* 244, 486–494. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2018.10.079>
- Weber, A.A., Arantes, F.P., Sato, Y., Rizzo, E., Bazzoli, N., 2013. Oocyte adhesiveness and embryonic development of *Astyanax bimaculatus* (Linnaeus, 1758) (Pisces: Characidae). *Zygote* 21, 198–202. <https://doi.org/10.1017/S096719941200007X>
- Weber, A.A., Moreira, D.P., Melo, R.M.C., Vieira, A.B.C., Bazzoli, N., Rizzo, E., 2018. Stage-specific testicular protein levels of the oestrogen receptors (ER $\alpha$  and ER $\beta$ ) and Cyp19 and association with oestrogenic contamination in the lambari *Astyanax rivularis* (Pisces: Characidae). *Environmental Science and Pollution Research* 25, 34403–34413. <https://doi.org/10.1007/s11356-018-3392-1>
- 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. *Science of the Total Environment* 592, 693–703. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.02.181>
- Weber, A.A., Sales, C.F., de Souza Faria, F., Melo, R.M.C., Bazzoli, N., Rizzo, E., 2020. Effects of metal contamination on liver in two fish species from a highly impacted neotropical river: A case study of the Fundão dam, Brazil. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 190, 110165. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2020.110165>
- Wei, W., Ma, R., Sun, Z., Zhou, A., Bu, J., Long, X., Liu, Y., 2018. Effects of mining activities on the release of heavy metals (HMs) in a typical mountain headwater region, the Qinghai-Tibet Plateau in China. *International Journal of Environmental Research and Public Health* 15, 1–19. <https://doi.org/10.3390/ijerph15091987>
- Wen, R., Xie, Y., Wan, C., Fang, Z., 2013. Estrogenic and androgenic effects in mosquitofish (*Gambusia affinis*) from streams contaminated by municipal effluent in Guangzhou. *Aquatic Toxicology* 132–133, 165–172. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2013.02.010>

- Yamagami, K., Hamazaki, T.S., Yasumasut, S., Masuda, K., Iuchi, I., 1992. Molecular and cellular basis of formation, hardening, and breakdown of the egg envelope in fish. *International Review of Cytology* 136, 51–92. [https://doi.org/10.1016/S0074-7696\(08\)62050-1](https://doi.org/10.1016/S0074-7696(08)62050-1)
- Yang, X., Zhao, L., Zhao, Z., Hu, B., Wang, C., Yang, Z., Cheng, Y., 2012. Immunolocalization of estrogen receptor  $\alpha$  in *Neomysis japonica* oocytes and follicle cells during ovarian development. *Tissue and Cell* 44, 95–100. <https://doi.org/10.1016/j.tice.2011.12.001>
- Yin, P., Li, Y., Chen, Q., Liu, Z., 2017. Diethylstilbestrol, flutamide and their combination impaired the spermatogenesis of male adult zebrafish through disrupting HPG axis, meiosis and apoptosis. *Aquatic Toxicology* 185, 129–137. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2017.02.013>
- Yoshida, S., 2016. From cyst to tubule: Innovations in vertebrate spermatogenesis. *WIREs Dev. Biol.* 5, 119–131. <https://doi.org/10.1002/wdev.204>
- Yu, G., Zhang, D., Liu, W., Wang, J., Liu, X., Zhou, C., 2018. Zebrafish androgen receptor is required for spermatogenesis and maintenance of ovarian function. *Oncotarget* 9, 24320–24334. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.24407>
- Zeitoun, M.M., Mehana, E.S.E., 2014. Impact of water pollution with heavy metals on fish health: Overview and updates. *Global Veterinaria* 12, 219–231. <https://doi.org/10.5829/idosi.gv.2014.12.02.82219>
- Zhong, W., Zhang, Y., Wu, Z., Yang, R., Chen, X., Yang, J., Zhu, L., 2018. Health risk assessment of heavy metals in freshwater fish in the central and eastern North China. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 157, 343–349. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2018.03.048>
- Zhou, Q., Nie, R., Prins, G.S., Saunders, P.T.K., Katzenellenbogen, B.S., Hess, R.A., 2002. Localization of androgen and estrogen receptors in adult male mouse reproductive tract. *Journal of Andrology* 23, 870–81. <https://doi.org/10.1002/j.1939-4640.2002.tb02345.x>
- Zhu, P., Zhang, Y., Zhuo, Q., Lu, D., Huang, J., Liu, X., Lin, H., 2008. Discovery of four estrogen receptors and their expression profiles during testis recrudescence in male *Spinibarbus denticulatus*. *Gen. Comp. Endocrinol.* 156, 265–276. <https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2008.01.017>