

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

Instituto de Ciências Biológicas

Programa de Pós-graduação em Biologia Celular

Yves Moreira Ribeiro

**EFEITOS DA EXPOSIÇÃO CRÔNICA A ESTRONA NA GAMETOGÊNESE E
REPRODUÇÃO DO ZEBRAFISH (*Danio rerio*)**

Belo Horizonte

2022

Yves Moreira Ribeiro

Efeitos da exposição crônica a estrona na gametogênese e reprodução do zebrafish (*Danio rerio*)

Versão final

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial obtenção do título de Doutor em Ciências.

Orientadora: Dra. Elizete Rizzo

Belo Horizonte

2022

043

Ribeiro, Yves Moreira.

Efeitos da exposição crônica a estrona na gametogênese e reprodução do zebrafish (*Danio rerio*) [manuscrito] / Yves Moreira Ribeiro. – 2022.

109 f. : il. ; 29,5 cm.

Orientadora: Dra. Elizete Rizzo.

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular.

1. Biologia Celular. 2. Estrona. 3. Hormônios Esteroides Gonadais. 4. Estresse Oxidativo. 5. Reprodução. I. Bazzoli, Elizete Rizzo. II. Universidade Federal de Minas. Gerais. Instituto de Ciências Biológicas. III. Título.

CDU: 576



ATA DA DEFESA DE TESE DE DOUTORADO DE

YVES MOREIRA RIBEIRO

253/2022
entrada
1º/2019
2019693318

Às **nove horas** do dia **14 de outubro de 2022**, reuniu-se, no Instituto de Ciências Biológicas da UFMG, a Comissão Examinadora da Tese, indicada pelo Colegiado do Programa, para julgar, em exame final, o trabalho final intitulado: "**EFEITOS DA EXPOSIÇÃO CRÔNICA A ESTRONA NA GAMETOGÊNESE E REPRODUÇÃO DO ZEBRAFISH (DANIO RERIO)**", requisito final para obtenção do grau de Doutor 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 ao candidato, para apresentação de seu trabalho. Seguiu-se a arguição pelos examinadores, com a respectiva defesa do candidato. Logo após, a Comissão se reuniu, sem a presença do candidato e do público, para julgamento e expedição de resultado final. Foram atribuídas as seguintes indicações:

Prof./Pesq.	Instituição	Indicação
Dra. Elizete Rizzo Bazzoli	UFMG	APROVADO
Dra. Cleida Aparecida de Oliveira	UFMG	Aprovado
Dra. Gleide Fernandes de Avelar	UFMG	APROVADO
Dr. Lucas Marcon	PUC-MG	APROVADO
Dr. Ives Charlie Silva	USP	APROVADO

Pelas indicações, o candidato foi considerado: APROVADO
O resultado final foi comunicado publicamente ao candidato 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, 14 de outubro de 2022.**

Dr^a. Elizete Rizzo Bazzoli (Orientadora) Elizete Rizzo

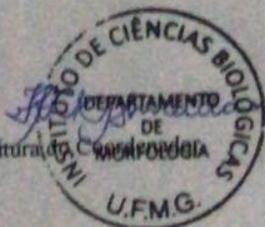
Dr^a. Cleida Aparecida de Oliveira Cleida

Dr^a. Gleide Fernandes de Avelar Gleide Fernandes de Avelar

Dr. Lucas Marcon Lucas Marcon

Dr. Ives Charlie Silva Ives Charlie Silva

Obs: Este documento não terá validade sem a assinatura do





UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
 Instituto de Ciências Biológicas
 Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular

ATA DE DEFESA DE TESE DE YVES MOREIRA RIBEIRO

Às **nove horas** do dia **14 de outubro de 2022**, reuniu-se, no Instituto de Ciências Biológicas da UFMG, a Comissão Examinadora da Tese, indicada pelo Colegiado do Programa, para julgar, em exame final, o trabalho final intitulado: "**EFEITOS DA EXPOSIÇÃO CRÔNICA A ESTRONA NA GAMETOGÊNESE E REPRODUÇÃO DO ZEBRAFISH (DANIO RERIO)**", requisito final para obtenção do grau de Doutor 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 ao candidato, para apresentação de seu trabalho. Seguiu-se a arguição pelos examinadores, com a respectiva defesa do candidato. Logo após, a Comissão se reuniu, sem a presença do candidato e do público, para julgamento e expedição de resultado final. Foram atribuídas as seguintes indicações:

Prof./Pesq.	Instituição	Indicação
Dra. Elizete Rizzo Bazzoli	UFMG	APROVADO
Dra. Cleida Aparecida de Oliveira	UFMG	APROVADO
Dra. Gleide Fernandes de Avelar	UFMG	APROVADO
Dr. Lucas Marcon	PUC-MG	APROVADO
Dr. Ives Charlie Silva	USP	APROVADO

Pelas indicações, o candidato foi considerado: **APROVADO**

O resultado final foi comunicado publicamente ao candidato 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, 14 de outubro de 2022.**

Dr^a. Elizete Rizzo Bazzoli (Orientadora)

Drª. Cleida Aparecida de Oliveira

Drª. Gleide Fernandes de Avelar

Dr. Lucas Marcon

Dr. Ives Charlie Silva



Documento assinado eletronicamente por **Lucas Marcon, Usuário Externo**, em 17/10/2022, às 14:32, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Gleide Fernandes de Avelar, Professora do Magistério Superior**, em 17/10/2022, às 16:08, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Fernanda Radicchi Campos Lobato de Almeida, Coordenador(a)**, em 17/10/2022, às 17:35, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Elizete Rizzo Bazzoli, Coordenador(a)**, em 19/10/2022, às 09:54, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Cleida Aparecida de Oliveira, Professora do Magistério Superior**, em 21/10/2022, às 19:28, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Ives Charlie Da Silva, Usuário Externo**, em 24/10/2022, às 15:06, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.ufmg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **1836049** e o código CRC **37843397**.

AGRADECIMENTOS

A Dra. Elizete Rizzo pela orientação, paciência e pelos anos de amizade.

Aos meus Professores da Escola de Veterinária e do Instituto de Ciências Biológicas, por seus conselhos e amizade durante todos esses anos na UFMG.

Aos amigos que passaram e os que ainda estão no Laboratório de Ictiohistologia, em especial à Mônica, Claudinha, Ana Paula, Luis, Davidson, Paula, Yuri, Violeta, Ralph, Fabrício, Rafael, Guto, André, Alessandro, Lourenço, Thaís, Chico e Camila Sales e Camila Stephanie.

A equipe do Departamento de Morfologia, que me acolheu e guiou pelos caminhos da Anatomia, em especial as Professoras Gleide, Karin, Micena e ao Prof. Marcos.

Ao CNPq agradeço pela concessão da bolsa que permitiu minha dedicação integral à pesquisa e a produção de materiais didáticos.

A minha família, em especial a minha mãe Elén, meu pai Alonso, minha tia Jussara, minhas avós Izabel e Djanira, e meu irmão Yan.

RESUMO

A estrona é um contaminante ambiental importante em países que tem a pecuária como atividade econômica relevante devido a contaminação dos corpos d'água a partir de lixiviação das excretas de aves, suínos, bovinos e equinos. O objetivo do presente trabalho foi analisar os efeitos da exposição a estrona em concentrações ambientalmente relevantes na gametogênese e reprodução do zebrafish (*Danio rerio*). Para isto, os peixes foram expostos a estrona nas concentrações de 20, 200 e 2000 ng/L por 49 dias. Nas gônadas, foram analisadas a proporção (%) de componentes teciduais, dosagem de 11-ketotestosterona e 17 β -estradiol, proliferação e morte celular, expressão de IGF1, IGF2, IGF1R e iNOS e avaliada a produção de óxido nítrico. Foram também avaliados os parâmetros de qualidade do sêmen, a produção de ovos e a taxa de fertilização. Os resultados mostraram que a exposição a estrona provoca alterações na produção dos esteroides sexuais, via de sinalização dos IGFs e aumento da produção de óxido nítrico que levaram a alterações na proporção das células germinativas e componentes somáticos gonadais. A produção de ovos foi reduzida em todos os grupos expostos a estrona e qualidade do sêmen foi afetada com redução significativa da motilidade progressiva, velocidade curvilínea e frequência do batimento flagelar nos grupos de 20 e 2000 ng/L, junto da redução significativa da taxa de fertilização nos grupos 200 e 2000 ng/L de estrona. Os resultados do presente estudo indicam que a estrona exerce efeitos deletérios nos testículos, ovários e na reprodução dos peixes mesmo nas concentrações ambientalmente relevantes, e que suas concentrações nas águas devem ser monitoradas visando a conservação deste grupo de vertebrados.

Palavras-chave: Estrógenos ambientais. Toxicologia reprodutiva. Esteroides sexuais. Estresse oxidativo.

ABSTRACT

Estrone is an important environmental contaminant in waters of countries that have livestock as a relevant economic activity because its leaching from the excreta of poultry, pigs, cattle and horses. The objective of the present study was to analyze the effects of the estrone exposure at environmentally relevant concentrations on gametogenesis and reproduction of zebrafish (*Danio rerio*). After exposure to estrone at concentrations of 20, 200 and 2000 ng/L for 49 days, gametogenesis and reproduction of zebrafish were analyzed through morphometric and molecular analyses. In the gonads, the proportion (%) of tissue components, dosage of 11-ketotestosterone and estradiol, cell proliferation and death, expression of IGF1, IGF2, IGF1R and iNOS were analyzed and the production of nitric oxide was evaluated. In addition, semen quality parameters in males, egg production by females and fertilization rate were evaluated. The results showed that estrone exposure was responsible to changes in the sex steroids production, IGF signaling pathway and increased nitric oxide production that led to changes in the proportion of germ cells and gonadal somatic components. As a consequence, egg production was reduced in all estrone-exposed groups together with reduced progressive motility, curvilinear velocity, and beat cross frequency in the sperm of 20 and 2000 ng/L E1 groups, and significantly lower fertilization rate in the 200 and 2000 ng/L groups. The results of the present study indicate that estrone exerts deleterious effects on the testes, ovaries and reproduction of fish, even at environmentally relevant concentrations, and that its concentrations in water should be monitored for the conservation of this group of vertebrates.

Keywords: Environmental estrogens. Reproductive toxicology. Sex steroids. Oxidative Stress.

SUMÁRIO

1. REVISÃO DE LITERATURA.....	11
1.1. <i>Estrógenos.....</i>	12
1.2. <i>Receptores de estrógenos.....</i>	14
1.3. <i>Gametogênese.....</i>	17
1.4. <i>Fatores de crescimento semelhantes à insulina.....</i>	23
1.5. <i>Óxido nítrico.....</i>	24
1.6. <i>Proliferação e morte celular.....</i>	25
2. JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS.....	27
3. RESULTADOS.....	31
3.1. <i>Artigo 1: Chronic estrone exposure affects spermatogenesis and sperm quality in zebrafish (Danio rerio) - (Submetido para publicação na Environmental Toxicology and Pharmacology – em fase de revisão)</i>	32
3.2. <i>Artigo 2: Efeitos da exposição crônica a estrona na ovogênese e desova do zebrafish (Danio rerio) - (A ser submetido para publicação).....</i>	68
4. DISCUSSÃO GERAL.....	93
5. CONCLUSÕES.....	98
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	100
7. ANEXO.....	112

1. Revisão de literatura

1.1 Estrógenos

Quando de origem exógena, os hormônios, são considerados contaminantes emergentes e se comportam como uma classe complexa de compostos que alteram o funcionamento normal dos diversos órgãos e sistemas dos seres vivos (Bhandari et al., 2015; Söffker and Tyler, 2012). Esses contaminantes emergentes são considerados desreguladores endócrinos porque podem afetar as vias de sinalização de diversos hormônios ao alterar sua produção, metabolismo e excreção (La Merrill et al., 2019; Kabir et al., 2015). A exposição a estes compostos compromete a atividade reprodutiva dos vertebrados ao causar alteração da expressão gênica nas gônadas e da produção de hormônios ligados a gametogênese, o que se reflete no desbalanço entre a proliferação e morte celular, alterações histopatológicas e redução ou perda da capacidade de gerar descendentes (Murata & Kang, 2018; Nadal et al., 2018; Adeel et al., 2017). Estrógenos como o 17 β -estradiol, estrona, estriol e etinilestradiol são desreguladores endócrinos frequentemente encontrados nas águas superficiais (Tabela 1).

Tabela 1. Concentrações de estrógenos em águas superficiais.

Contaminante	Classe	Concentração (ng/L)	Local
Estrona (E1)	Hormônio natural	1,81 - 256,66 ^{c,b}	Brasil, EUA, Jamaica
17 β -Estradiol (E2)	Hormônio natural	0,1 - 216,67 ^{a,b,c}	Brasil, EUA, Inglaterra
Estriol (E3)	Hormônio natural	50 - 211,5 ^{b,c}	Brasil, EUA
Etinilestradiol (EE)	Hormônio sintético	<0,98 - 10,2 ^c	EUA

^a Petrie et al., 2015; ^b Kolpin et al., 2002; ^c Weber et al., 2017; ^d Wilkinson et al., 2017.

Apesar de serem considerados contaminantes quando encontrados no meio ambiente, os estrógenos são hormônios esteróides que desempenham importante papel fisiológico nos vertebrados (Hamid e Eskicioglu, 2012). Os esteróides sexuais são produzidos nas gônadas, pelas células de Leydig, Sertoli e foliculares, devido ao estímulo das gonadotrofinas produzidas pela adeno-hipófise (Sanderson, 2006). A produção dos estrógenos e de outros esteróides sexuais inicia com a chegada do colesterol endógeno ou absorvido pela dieta e transportado até as gônadas através de lipoproteínas plasmáticas (LDL, HDL, VLDL) (Miller e Auchus, 2011). O colesterol transportado pelas lipoproteínas, bem como o sintetizado no retículo endoplasmático através do acetato, são transportados da membrana mitocondrial

externa para a interna pela proteína reguladora aguda da esteroidogênese (STAR) (Stocco, 2000). Após acessar a membrana mitocondrial interna, o colesterol é convertido em pregnenolona pela enzima citocromo P450 *side-chain cleavage* (P450_{sc}/cyp11a1) e em seguida segue para o retículo endoplasmático liso, onde sofre ação de várias enzimas e originam diversos hormônios esteróides (Diotel et al., 2018; Tokarz et al., 2015, Miller e Auchus, 2011) (Figura 1).

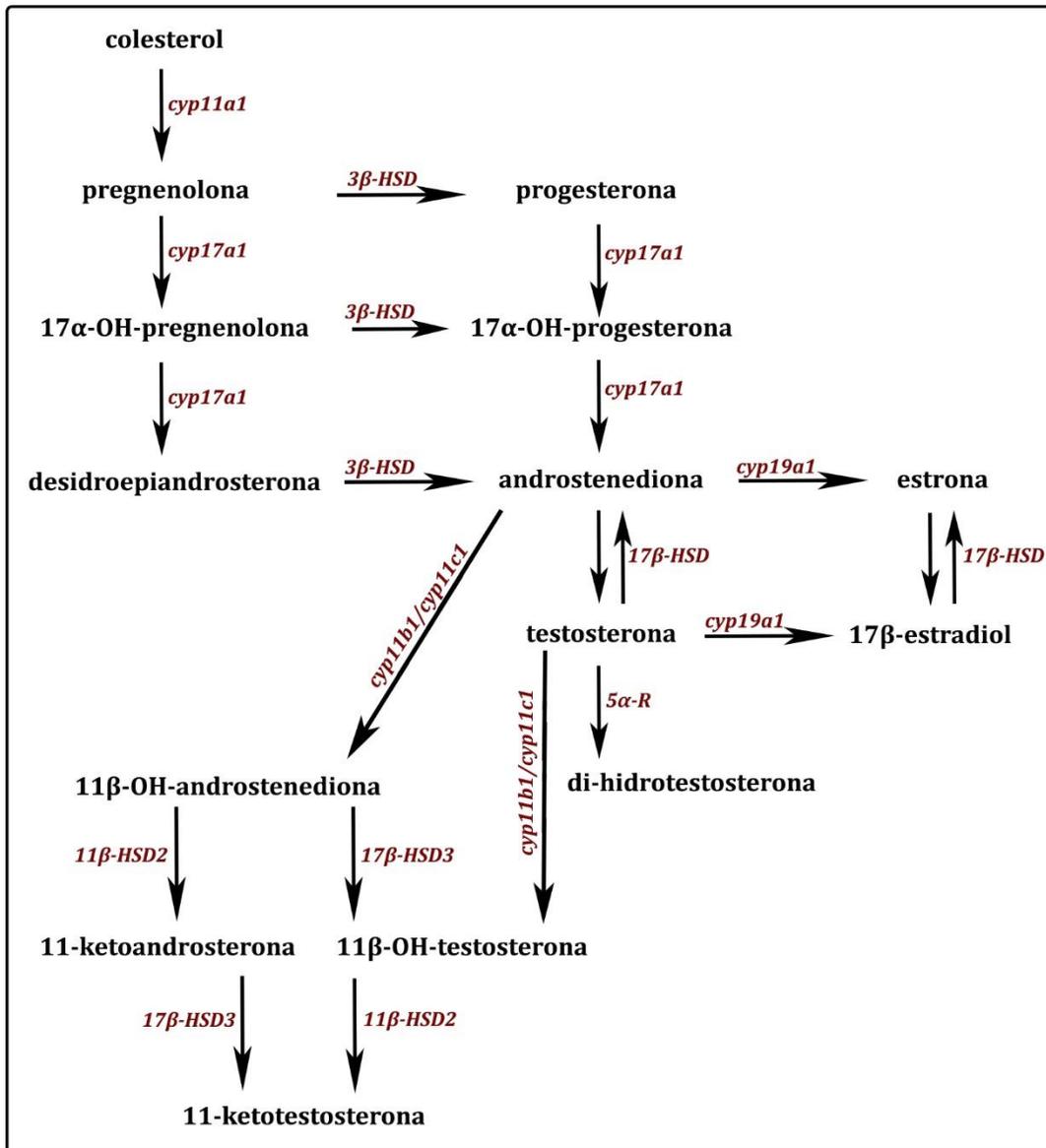


Figura 1: Representação das principais vias de síntese dos esteróides sexuais nos vertebrados. Abreviações: cyp, citocromo P450; HSD, hidroxisteroide desidrogenase; OH, hidroxí. Fonte: autoria própria (Diotel et al., 2018; Tokarz et al., 2015).

Tanto a estrona (E1) como a testosterona podem originar o 17 β -estradiol (E2) pela ação das enzimas 17 β -HSD e cyp19a1, respectivamente (Diotel et. al.,2018). A testosterona por sua vez é base para a síntese de di-hidrotestosterona (DHT) através da enzima 5 α -redutase (5 α -R) e 11 β -OH-testosterona através das enzimas cyp11b1 e cyp11c1 (Tokarz et al., 2015). A 11-ketotestosterona (11-KT) é um esteróide não-aromatizável com atividade androgênica semelhante a testosterona, presente nos humanos e em outros vertebrados como os peixes (Turcu et al., 2018). A 11-KT pode se originar da 11 β -OH-testosterona ou 11-ketoandrosterona após a ação das enzimas 11 β -HSD2 e 11 β -HSD3 respectivamente (Tokarz et al., 2015). Algumas vias de síntese de esteróides sexuais que participam da maturação final de gametas são exclusivas dos peixes, como é o caso da produção da 17 α , 20 β -dihidroxi-4-pregnen-3-ona a partir da 17 α -OH-progesterona pela enzima 11 β -HSD2 (Tokarz et al., 2015). Apesar de diferenças de expressão e afinidade por substrato pelas enzimas e vias de síntese que originam os esteróides sexuais em alguns grupos de vertebrados (Luu-The, 2010), de forma geral, a produção de estrógenos e andrógenos é conservada neste grupo.

1.2 Receptores de estrógenos

Tanto os estrógenos como os andrógenos, após serem liberados na corrente sanguínea desempenham sua atividade nos tecidos ao interagirem com seus respectivos receptores (Beato et al., 1996). Todavia, somente uma quantidade menor que 2% desses hormônios é bioativa, pois grande parte se encontra complexada com proteínas plasmáticas produzidas principalmente pelo fígado, como globulina ligadora de hormônios sexuais (SHBG) e a albumina (Balogh et al., 2019; Selby, 1990). A formação do complexo esteróide-albumina ou esteróide-SHBG, compromete a capacidade desses hormônios ativarem receptores de membrana e também de atravessá-la, para acessar os receptores que estão localizados dentro das células (Liu & Veldhuis, 2019). Diferenças sexo-específicas na produção de SHBG (Hammond et al., 2012) podem estar relacionadas a modulação de sua síntese nos hepatócitos pela ação de estrógenos, andrógenos não aromatizáveis, tiroxina, insulina e fator de crescimento semelhante a insulina tipo 1 (IGF-1) (Liu & Veldhuis, 2019).

A fração livre dos estrógenos é capaz de ativar os receptores de estrógeno intracelulares e de membrana (Balogh et al., 2019). A ação clássica ou genômica dos estrógenos endógenos ou xenoestrógenos acontece após esses hormônios atravessarem a

membrana plasmática e se ligarem aos receptores de estrógeno alfa ($ER\alpha$) ou beta ($ER\beta$), que se encontram no citoplasma ou núcleo das células complexados com chaperonas (Pillerová et al., 2021) (Figura 2). A interação dos estrógenos com resíduos de aminoácidos dos sítios de ligação dos receptores promove alterações conformacionais nos ERs α/β que ocasionam a fosforilação do receptor e liberação da chaperona (Amir et al., 2021). Esse complexo então é translocado para o núcleo onde se liga a regiões específicas do DNA denominadas elementos responsivos ao estrógeno (EREs), que estão localizados em regiões promotoras de determinados genes (Farooq, 2015). A interação dos ERs α/β com os EREs e cofatores regula a expressão gênica influenciando diretamente o funcionamento dos sistemas reprodutivo, cardiovascular, esquelético e imune (Mauvais-Jarvis et al., 2013). Além disso, por exemplo, o $ER\alpha$ também pode interagir com outros fatores de transcrição como por exemplo o fator nuclear kappa B e se ligar indiretamente ao DNA (Mor et al., 2003), bem como ativar o receptor de IGF-1 (IGF1R) (Björnström & Sjöberg, 2005), afetando assim outras vias de sinalização. Esses processos estão relacionados com a ação clássica dos estrógenos, que demandam horas, e não explicam alguns efeitos causados sobre as células que podem acontecer no curto prazo de segundos e minutos (Balogh et al., 2019; Adori et al., 2010). Essas ações, em sua maioria rápidas, não genômicas, ocorrem através dos ERs de membrana, como por exemplo o receptor de estrógeno acoplado a proteína G (GPER), que é uma proteína integral encontrada na membrana celular, e na membrana do retículo endoplasmático e do complexo de Golgi (Vo et al., 2019; Romano & Gorelick, 2018; Sakamoto et al., 2007; Revankar et al., 2005) (Figura 2). A ligação dos estrógenos com o GPER desencadeia a mobilização de cálcio, óxido nítrico (NO), AMP cíclico (cAMP) e outros segundos mensageiros, bem como a ativação de proteínas quinases como as MAP quinases (MAPK/ERK) e as proteínas quinases B (PKB/Akt) (Amir et al., 2021; Puglisi et al., 2019). Como um exemplo de resposta rápida a ação dessas vias podemos citar a vasodilatação causada pelo estradiol ao aumentar a eficiência da enzima óxido nítrico sintase o que eleva a liberação de NO pelas células endoteliais (Fredette et al., 2018; Caulin-Glaser et al., 1997). Além disso, a ativação das proteínas quinases promove a fosforilação tanto dos ERs como de outros fatores de transcrição e afeta a expressão gênica indiretamente, promovendo ou reprimindo a transcrição de genes relacionados com a síntese de DNA, sobrevivência e proliferação celular (Puglisi et al., 2019). Curiosamente, algumas espécies

de peixes teleósteos possuem quatro receptores de estrógeno clássicos, o ER α 1, ER α 2, ER β 1 e ER β 2, que tiveram origem em um evento de duplicação gênica que ocorreu entre 300-450 milhões de anos atrás, após sua divergência do grupo que originou os tetrápodes (Volf, 2005). Por fim, em várias situações, os estrógenos têm a capacidade de aumentar as concentrações celulares do RNA mensageiro (mRNA) de seus receptores ao estabilizar essas moléculas através de modificações pós-transcricionais (Ing, 2005). Por exemplo, os estrógenos estabilizam e aumentam a meia-vida do mRNA do ER α no fígado de peixes durante o início da ovogênese e também no endométrio dos mamíferos durante a fase pré-ovulatória, elevando a concentração citosólica desses mRNAs sem estimular a sua transcrição (Mitchell & Ing, 2003; Flouriot et al., 1996).

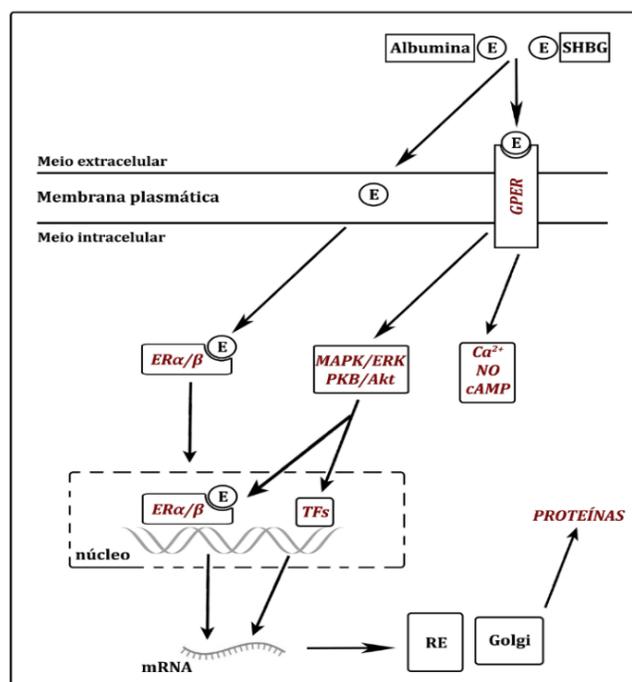


Figura 2: Vias de sinalização dos estrógenos endógenos ou xenoestrógenos sobre os receptores de estrógeno. Abreviações: E, estrógenos; ER α/β , receptores de estrógeno alfa e beta; cAMP, AMP cíclico; Ca²⁺, íon cálcio; MAPK/ERK, MAP quinases; PKB/Akt, proteínas quinases B; mRNA, rna mensageiro; NO, óxido nítrico; RE, retículo endoplasmático; TFs, fatores de transcrição. Fonte: autoria própria (Amir et al., 2021; Pillerová et al., 2021; Balogh et al., 2019; Puglisi et al., 2019; Vo et al., 2019; Romano & Gorelick, 2018; Adori et al., 2010).

Considerando que os receptores de estrógeno são amplamente expressos nos testículos, ovários, pituitária e hipotálamo dos vertebrados (Thomas, 2016; Frank et al., 2014; Sánchez-Criado et al., 2004; Hess, 2003; Menuet et al., 2002), as vias de sinalização

estrogênicas são extremamente importantes para a gametogênese e reprodução (Cooke et al., 2017).

1.3 Gametogênese

Dentro dos vertebrados, os peixes constituem excelente modelo para o estudo da reprodução devido a suas diferentes estratégias reprodutivas (Muchlisin, 2014) que incluem desova contínua ou parcelada, gonocorismo ou hermafroditismo, fertilização externa ou interna, bem como o tempo de gametogênese reduzido se comparado com outros vertebrados (Leal et al., 2009; Pudney, 1995).

Durante as diferentes estações do ano, a variação de fatores ambientais como fotoperíodo, temperatura, e precipitação são percebidos por receptores sensoriais que convergem essas informações para o eixo hipotalâmico-pituitário-gonadal dos peixes (Schulz et al., 2010; Lubzens et al., 2010) (Figura 3). Em resposta a esses sinais, o hipotálamo libera o hormônio liberador de gonadotrofinas (GnRH) que atua nos gonadotrofos localizados no lobo anterior da glândula pituitária, a adeno-hipófise, que é responsável por sintetizar o hormônio folículo estimulante (FSH) e o hormônio luteinizante (LH) (Nóbrega et al., 2017; Zohar et al., 2010). Além disso, tanto a produção de GnRH pelo hipotálamo bem como a expressão dos receptores das gonadotrofinas nas gônadas são regulados por neuropeptídeos produzidos no sistema nervoso central como a kisspeptina (KISS) e o neuropeptídeo Y (NPY) (Ohga et al., 2018; Subhedar et al., 2005), respectivamente.

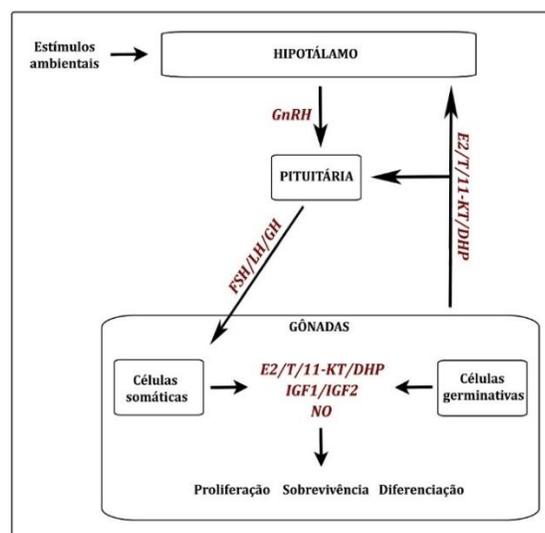


Figura 3: Funcionamento do eixo hipotalâmico-pituitário-gonadal nos peixes. Abreviações: DHP, 17α , 20β -dihidroxi-4-pregnen-3-ona; E2, 17β -estradiol; IGF1/IGF2, fatores de crescimento semelhantes a insulina 1 e 2; FSH, hormônio folículo estimulante; GnRH, hormônio liberador de gonadotrofinas; LH, hormônio luteinizante; NO, óxido nítrico; T, testosterona; 11-KT, 11-ketotestosterona. Fonte: autoria própria (Singh & Lal, 2017; Diotel et al., 2011; Lubzens et al., 2010; Schulz et al., 2010).

Em vertebrados, a espermatogênese pode ser dividida em três fases: a fase espermatogonial ou mitótica, onde espermatogônias diplóides proliferam e se diferenciam em espermatócitos, a fase espermatocitária ou meiótica, onde os espermatócitos primários originam os secundários e estes as espermátides, e a fase espermiogênica, onde espermátides haplóides sofrem diversas modificações e dão origem aos em espermatozóides (Ribeiro et al., 2017; Uribe et al., 2014) (Figura 4). Nos testículos, tanto o FSH como o LH controlam as funções realizadas pelas células de Sertoli que são necessárias ao desenvolvimento das células da linhagem espermatogênica e a produção de esteróides sexuais local (Chu et al., 2015).

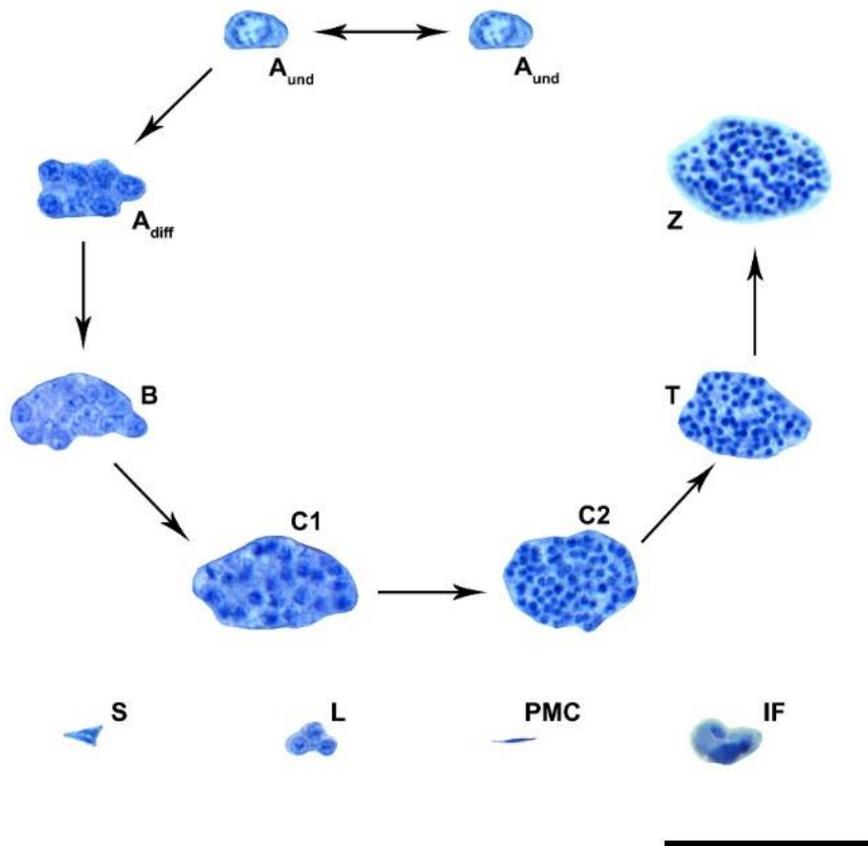


Figura 4: Morfologia das células testiculares do peixe *Danio rerio*. Coloração: hematoxilina. Abreviações: A_{und}, espermatogônia do tipo A indiferenciada; A_{diff}, espermatogônia do tipo A diferenciada; B, espermatogônia do tipo B; C1, espermatócito primário; C2, espermatócito secundário; T, espermátide; Z, espermatozóide; S, célula de Sertoli; L, célula de Leydig; PMC, célula peritubular mióide e IF, infiltrado. Escala: 50 µm. Fonte: autoria própria.

Curiosamente, diferentemente de outros grupos de vertebrados, nos peixes, as funções das gonadotrofinas se sobrepõem, de modo que estudos demonstraram que somente mutantes *double knockout* para as subunidades beta e receptores de gonadotrofinas simultaneamente (fsh β -lh β ou FSHR-LHR) exibem efeitos relevantes sobre a esteroidogênese e maturação testicular (Chu et al., 2015).

Os esteróides sexuais são os principais efetores das ações das gonadotrofinas nos testículos dos peixes (Miura & Miura, 2003). O 17 β -estradiol (E2) apesar de encontrado em baixas concentrações no plasma sanguíneo de machos, aumenta no início da espermatogênese e se liga a células de Sertoli estimulando a auto-renovação espermatogonial (Schulz et al., 2010). O E2 está também envolvido com a expressão de importantes fatores relacionados à esteroidogênese como a proteína reguladora aguda esteroidogênica (Star), a 3 β -hidroxiesteroide desidrogenase (3 β -HSD) e aromatase A e B (Miura et al., 1999; Schulz et al., 2010) e os IGFs. No caso dos andrógenos, tanto a T como a 11-KT são responsáveis por estimular a diferenciação espermatogonial, regular a progressão da espermatogênese e seus níveis aumentam progressivamente até a espermição (Schulz et al., 2010). As ações dos andrógenos são exercidas pelas células somáticas do testículo, visto que nos teleósteos, seus receptores se encontram expressos nas células de Sertoli e células de Leydig (Ikeuchi et al., 2001). Um importante processo mediado pelos andrógenos é a formação de junções de oclusão entre células de Sertoli adjacentes no epitélio seminífero, o que isola os cistos de espermátides de substâncias que possam porventura acessar seu interior, constituindo assim um componente da barreira hemato-testicular (Mruk & Cheng, 2010; Batlouni et al., 2009). A maturação final dos gametas nos machos é iniciada pela elevação do LH que desencadeia a produção das progestinas 17 α , 20 β dihidroxi-4-pregnen-3-ona (DHP) ou a 17 α , 20 β ,21-trihydroxy-4-pregnen-3-one (20 β S), hormônios que induzem a espermição, o aumento do

volume do sêmen e estimulam a migração dos espermatozóides para o ducto espermático (Chen et al., 2013). O aumento das concentrações testiculares de 11-KT durante a espermição eleva a quantidade de substrato necessário para a síntese de DHP e 20β -S (Milla et al., 2008; Yueh and Chang, 1997). A progressão da espermatogênese e a sobrevivência das células germinativas são coordenadas pela ação conjunta das células de Sertoli e dos componentes intersticiais do testículo mediados pela ação das gonadotrofinas, esteróides sexuais e fatores de crescimento (Chen et al., 2013; Schulz et al., 2010).

Considerando os mamíferos, a espermatogênese dos peixes teleósteos possui algumas diferenças dentre as quais podemos destacar: a influência da temperatura na determinação sexual e maturação gonadal, duração reduzida da espermatogênese e bipotência sexual das espermatogônias tronco (Lacerda et al., 2014; Melo et al., 2016). O epitélio germinativo dos peixes possui atividade contínua ou cíclica onde cistos de células germinativas envolvidos por células de Sertoli se desenvolvem sincronicamente para a manutenção da produção de espermatozóides em cada ciclo reprodutivo (Miura and Miura, 2003; Schulz et al., 2010; Uribe et al., 2014). Após serem liberados no meio externo, os espermatozóides são ativados devido a alteração dos parâmetros físico-químicos da água, como o pH (Alavi & Cosson, 2005). Considerando que nos espermatozóides dos peixes de fertilização externa o acrossoma é inexistente, a fertilização ocorre quando os espermatozoides atingem a micrópila, uma estrutura em forma de funil presente na superfície dos ovócitos das fêmeas (Lubzens et al., 2010). Vários fatores influenciam a qualidade dos espermatozóides dentre os quais podemos citar a presença de antioxidantes como as vitaminas C e E no plasma seminal, a temperatura da água e a idade dos animais (Kowalski & Cejko, 2019). Semelhante ao realizado com os mamíferos, a qualidade do sêmen dos peixes pode também ser avaliada a partir de sistemas computadorizados como o CASA (*Computer Assisted Sperm Analysis*), que permite a visualização e análise do movimento individual de cada espermatozóide (Kime et al., 2001).

No início de cada ciclo reprodutivo das fêmeas, as ovogônias, células tronco bipotenciais do epitélio germinativo ovariano, se dividem-se várias vezes por mitose e parte delas é envolta por processos citoplasmáticos das células pré-foliculares, que posteriormente virão a dar origem as células da granulosa (Quagio-Grassiotto et al., 2011). Dentro destes cistos ou ninhos, as ovogônias já diferenciadas continuam se dividindo por mitose de forma

sincrônica, devido a presença de pontes citoplasmáticas entre essas células (Haglund et al., 2011). Depois de ciclos de divisões mitóticas, as ovogônias entram em meiose se diferenciando em ovócitos (Quagio-Grassiotto et al., 2011). Durante a progressão da meiose, na fase cromatina nucléolo, os ovócitos estacionam na fase diplóteno da prófase I e após isso se individualizam e junto das células da granulosa constituem o folículo ovariano (Quagio-Grassiotto et al., 2013). Esses ovócitos podem ser chamados de perinucleolares e se encontram na fase chamada de crescimento primário (Lubzens et al., 2010). As células da granulosa então, sintetizam sua membrana basal e são envolvidas por células do estroma ovariano, formando a teca (Quagio-Grassiotto et al., 2013). Durante esse processo os ovócitos secretam uma matriz extracelular em sua superfície, chamada zona radiata, que posteriormente formam o córion do embrião (Le Menn et al., 2007; Selman et al., 1993). Apesar disso o contato com as células da granulosa é mantido pois o ovócito emite projeções até a membrana plasmática destas células formando poros-canais na zona radiata (Le Menn et al., 2007; Selman et al., 1993). Os ovócitos perinucleolares então se desenvolvem e dão origem aos ovócitos com alvéolos corticais, quando organelas, RNAs e moléculas importantes na reação cortical e bloqueio a poliespermia são sintetizadas (Lubzens et al., 2010). Com a endocitose de lipídeos e vitelogenina, moléculas que irão constituir a reserva de energia do embrião, os ovócitos passam para a fase vitelogênica, sendo esse crescimento secundário dependente de gonadotrofinas (Lubzens et al., 2010). Em seguida, observa-se a redução da endocitose, formação de uma camada espessa constituída pelos alvéolos corticais logo abaixo da membrana plasmática do ovócito e a migração da vesícula germinativa em direção ao polo animal do ovócito, onde se encontra a micrópila, finalizando com a quebra da vesícula germinativa, retomada da meiose e progressão até a metáfase II (Grier, 2012, Lubzens et al., 2010; Grier 2000).

O fim da primeira divisão meiótica origina duas células, a primeira, de tamanho reduzido contém o primeiro corpúsculo polar que se degenera, e a segunda célula de maior volume, é o próprio ovócito, que no final do processo de maturação é ovulado (Grier, 2012). Após isso, o ovócito avança para a segunda divisão meiótica, e como resultado dessa fase, é observada a liberação do segundo corpúsculo polar (Abascal & Medina 2005). Durante o processo de ovulação, essa célula haplóide, é liberada do folículo ovariano para a cavidade celomática dos peixes (salmonídeos), ou diretamente para o ambiente, onde pode ser

fertilizada (Kagawa, 2013). Após ovulação, o folículo pós-ovulatório é formado, constituído pelas células pós-ovulatórias da granulosa e da teca separadas por uma membrana basal envolvendo uma cavidade, o lúmen folicular (Grier et al., 2017).

Semelhante ao observado nos machos, tanto a proliferação de ovogônias como a progressão da ovogênese/foliculogênese é regulada pelas gonadotrofinas, o hormônio folículo estimulante (FSH) e o hormônio luteinizante (LH), que são sintetizadas mediante estimulação do GnRH hipolatâmico (Jalabert, 2005). O aumento dos níveis de 17β -estradiol e de 17α , 20β -dihidroxi-4-pregnen-3-ona (DHP) induzidos pelo FSH estimulam a proliferação de ovogônias, diferenciação em ovócitos e a sua entrada na primeira divisão meiótica, respectivamente (Lubzens et al., 2010). Esses efeitos são mediados diretamente ou indiretamente, pela ação de outros fatores como os IGFs e o GSDF (*gonadal soma-derived growth factor*) (Sawatari et al., 2007; Lubzens et al., 2010). A retomada da meiose e progressão da maturação final ovocitária estão diretamente correlacionadas com o aumento dos níveis plasmáticos de LH (Kagawa, 2013). O LH estimula a produção de esteróides derivados da progesterona como o DHP que se ligam a receptores na membrana dos ovócitos e ativam o fator promotor de maturação (MPF) que reinicia a meiose (Lubzens et al., 2010).

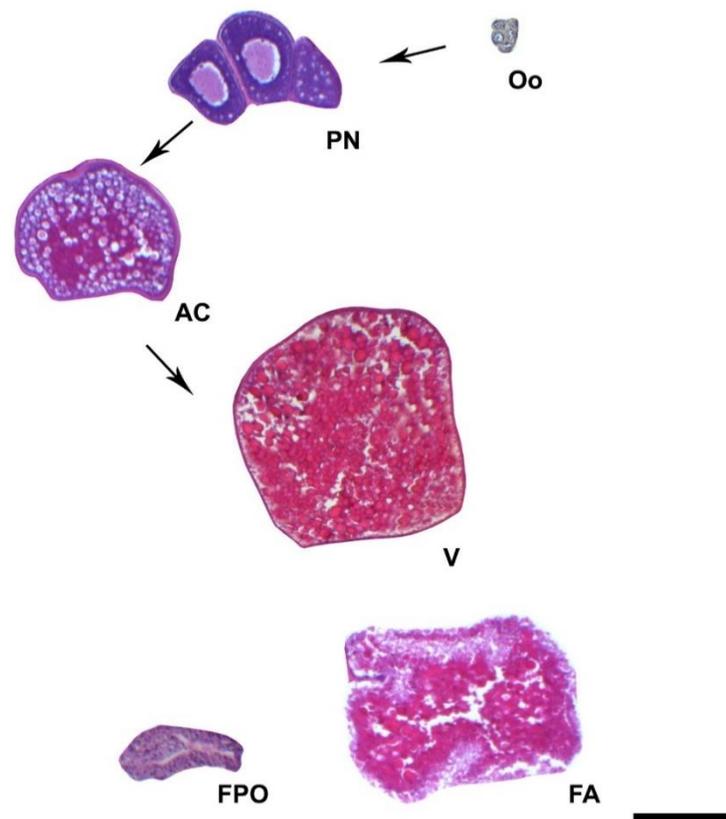


Figura 5: Morfologia dos folículos ovarianos do peixe *Danio rerio*. Coloração com hematoxilina-eosina. Abreviações: Oo, ovogônias; PN, ovócitos perinucleolares; AC, ovócitos com alvéolos corticais; V, ovócitos vitelogênicos; FPO, folículos pós-ovulatórios; FA, folículos atrésicos. Escala: 100µm. Fonte: autoria própria.

Durante o processo de ovulação, vários genes relacionados com a inflamação são expressos como *cxcl14* e o *fgf2* (Bober et al., 2006). Entretanto, alguns ovócitos tanto em condições naturais como experimentais, não conseguem prosseguir na maturação e ovulação e degeneram (Lubzens et al., 2010). Esse processo chamado de atresia folicular é caracterizado morfológicamente pela desintegração de organelas e do núcleo do ovócito, fragmentação da zona radiata e pela hipertrofia das células foliculares (Miranda et al., 1999). Na atresia, as células foliculares fagocitam o vitelo e outros componentes dos ovócitos e junto a isso, granulócitos eosinofílicos e macrófagos invadem essa estrutura e liberam seus grânulos contendo enzimas (Miranda et al., 1999; Besseau & Falliex, 1994). Esse processo termina com a morte das células foliculares e imunes, seguida da proliferação do tecido conjuntivo nessa região (Lubzens et al., 2010). A atresia folicular é importante para a manutenção da homeostase ovariana durante o ciclo reprodutivo, todavia a exposição a contaminantes ambientais é responsável pelo aumento de sua ocorrência (Weber et al., 2017; Silva et al., 2012; Douxfils et al., 2007).

1.4 Fatores de crescimento semelhantes à insulina

Os fatores de crescimento semelhantes à insulina 1 e 2 (IGF1 e IGF2) juntamente com a insulina, são peptídeos anabólicos que promovem a sobrevivência, proliferação e diferenciação de células, sendo descritos inicialmente na década de 50 do século passado (van den Brande, 1999). Esses fatores são produzidos por praticamente todos tecidos dos vertebrados em resposta ao estímulo da somatotrofina também conhecida como hormônio do crescimento (GH) (Neirijnck et al., 2019). O IGF1 sintetizado pelo fígado dos mamíferos desencadeia os efeitos de crescimento produzidos pelo GH após o nascimento, e o IGF2 é responsável por esses efeitos durante o desenvolvimento fetal (Adamek & Kasprzak, 2018).

Semelhante ao observado com os esteróides sexuais, os IGFs ligados a transportadores presentes no plasma, as proteínas de ligação aos fatores de crescimento semelhantes a insulina (IGFBPs), não são capazes de se ligar a seus receptores que estão presentes na superfície das células-alvo (Allard & Duan, 2018). Os IGFs 1 e 2 executam seus

efeitos a partir do receptor do fator de crescimento semelhante a insulina 1 (IGF1R) e em menor proporção a partir do receptor de insulina (INSR) e receptores híbridos (IGF1R-IR) (Adamek & Kasprzak, 2018; Werner et al., 1994). Apesar de serem produzidos principalmente no fígado, tanto o IGF 1 como o 2 são expressos em diversos tecidos e os níveis de IGF circulantes não representam diretamente sua produção pelos diversos tecidos (Liu et al., 2016). Além de desempenharem efeitos endócrinos via circulação, esses fatores desempenham também um importante papel na reprodução, devido a sua ação parácrina/autócrina nos ovários e testículos (Neirijnck et al., 2019), e a sua produção local, em alguns casos, independente do GH (Nóbrega et al., 2015). Em machos de peixes, os IGFs são expressos nas células de Sertoli, Leydig e germinativas, e estimulam a diferenciação espermatogonial (Reineke, 2010). Nas fêmeas os IGFs são expressos nas células da granulosa, da teca e nos ovócitos (Reineke, 2010). Tanto o IGF1 como o 2 podem induzir a retomada da meiose e a quebra da vesícula germinativa dos ovócitos, bem como responder ao DHP (Reineke, 2010). O IGF1 também estimula a produção de aromatase em folículos ovarianos da truta (Nakamura et al., 2003) e a proliferação espermatogonial no salmão (Campbell et al., 2003). Esses fatores estão relacionados com o metabolismo energético destes tecidos, a expressão de enzimas esteroidogênicas e proliferação e morte celular (Lubzens et al., 2010; Schulz et al., 2010).

1.5 Óxido nítrico

O óxido nítrico (NO) é uma molécula gasosa que age como mediador extra e intracelular e está envolvido na manutenção da homeostase tecidual, neurotransmissão, citotoxicidade, inflamação e defesa a patógenos (Choudhury & Saha, 2016). O NO é gerado nas células a partir da oxidação da L-arginina em L-citrulina, por uma das três isoformas da enzima óxido nítrico sintase (NOS) (Forstermann & Sessa, 2012). Expressas constitutivamente, a óxido nítrico-sintase endotelial (eNOS) e a neuronal (nNOS) são necessárias para a manutenção da vasodilatação e controle da pressão sanguínea, e para a sinalização nervosa, respectivamente (Cinelli et al., 2019; Alderton et al., 2001). As isoformas constitutivas de NOS são responsáveis por gerar NO dependente de cálcio durante períodos de tempo menores que minutos e em concentrações nanomolares (Cinelli et al., 2019; Kone et al., 2003; Abu-Soud et al., 1997). A óxido nítrico-sintase induzida (iNOS) somente é expressa nas células quando estas são estimuladas, geralmente por sinais

proinflamatórios, e resultam na produção de NO em concentrações micromolares (Cinelli et al., 2019). Várias condições patológicas estão relacionadas com uma alta produção de óxido nítrico via iNOS dentre as quais podemos citar diabetes, neoplasias e cardiopatias (Sharma et al., 2007). Um importante composto derivado do NO é o peroxinitrito (ONOO⁻) (Forstermann & Sessa, 2012), um potente oxidante conhecido por causar danos ao DNA, nitratação e S-nitrosilação de proteínas (Mikkelsen & Wardman, 2003).

Devido a expressão das isoformas de NOS nas gônadas, o NO está diretamente envolvido com processos ligados a reprodução nos vertebrados (Li et al., 2020). A síndrome do ovário policístico em mulheres (Kirshna et al., 2017), o desenvolvimento folicular e a esteroidogênese ovariana em ratos (Delsouc et al., 2018; Zheng et al., 2015), a regressão luteal em ovelhas (Grazul-Bilska et al., 2003), a foliculogênese e produção de esteróides sexuais em peixes (Singh & Lal, 2017), são todos afetados pelas concentrações de NO.

1.6 Proliferação e morte celular

Durante a gametogênese, a proliferação e morte celular garantem a homeostase tecidual do epitélio germinativo ao manter a proporção normal de células somáticas e germinativas, regular a produção de espermatozóides e ovócitos e prevenir a formação de gametas aberrantes (Meroni et al., 2019; Zupa et al., 2013; Shaha et al., 2010; Takle and Andersen, 2007; Vaskivuo & Tapanainen, 2003; Robker & Richards, 1998). Três biomarcadores são usualmente utilizados para avaliação da proliferação celular: antígeno nuclear de proliferação celular (PCNA), Ki-67, e proteína 7 da manutenção de minicromossomos (MCM7) (Juríková et al., 2016). Dentre essas moléculas, o PCNA, é uma proteína extremamente conservada entre os seres vivos, sendo cofator da DNA polimerase delta, um complexo enzimático necessário para síntese DNA (Strzalka & Ziemienowicz, 2011). Além disso o PCNA está associado a processos como a remodelação da cromatina, reparo do DNA e controle do ciclo celular (Maga & Hübscher, 2003). Desta forma, esta proteína é um relevante marcador de células em proliferação, sendo utilizada em diversos estudos envolvendo biologia da reprodução.

Além da proliferação celular, a morte celular é um processo fisiológico que exerce papel vital no desenvolvimento normal das células germinativas para manter o adequado número de células nos tecidos gonadais ao eliminar gametas aberrantes (Meroni et al., 2019;

Takle and Andersen, 2007; Vaskivuo & Tapanainen, 2003). A morte celular pode ser classificada morfológicamente como apoptose, morte celular dependente de autofagia e necrose (Chen et al., 2020). Dentre esses tipos de morte celular, a apoptose é o processo que ocorre de maneira mais rápida (Chen et al., 2020). Também conhecida como morte celular programada, a apoptose apresenta como características a perda de adesão célula-célula e célula-matriz extracelular, condensação da cromatina associada ao envoltório nuclear e a fragmentação da célula afetada em corpos apoptóticos envoltos por membrana que são fagocitados por células vizinhas (Kerr et al., 1972).

As vias responsáveis por desencadear o processo apoptótico são a via intrínseca e a extrínseca (Baum et al., 2005). A via intrínseca é controlada por proteínas da família Bcl-2 que possui membros pró-apoptóticos (Bim, Bid, Bmf, Bax e Bak) e anti-apoptóticos (Bcl-2, Bcl-xL, Mc11 e Bcl-B) (Nagata, 2018). Em condições normais, as proteínas da via anti-apoptótica previnem a expressão de proteínas da via pró-apoptótica em células saudáveis (Elmore, 2007). Entretanto, como resposta a um estímulo apoptótico (ex.: diminuição na produção de fatores de sobrevivência), as proteínas pró-apoptóticas são expressas em maior quantidade e estimulam a liberação do citocromo c que está contido dentro das mitocôndrias (Elmore, 2007). O citocromo c se complexa com a proteína Apaf-1 e juntos recrutam caspases iniciadoras (2, 8, 9 e 10) que resultam na clivagem e ativação das caspases efetoras (3, 6 e 7). Essas caspases ativam endonucleases que clivam o DNA em fragmentos múltiplos de 180-200 pares de bases nucleotídicas (Nagata, 2018). Por sua vez, a via extrínseca da apoptose é ativada quando citocinas da família do fator de necrose tumoral (TNF) se ligam a receptores presentes da membrana das células e ativam proteínas adaptadoras, o que também culminará na ação das caspases (Shaha et al., 2010). A detecção da apoptose pela marcação de fragmentos de DNA pela enzima deoxynucleotidyl transferase (TUNEL) e a expressão de proteínas efetoras da via apoptótica como a caspase 3 são frequentemente utilizados para avaliar a apoptose em diferentes tecidos de mamíferos e peixes (Kaur et al., 2018; Wu et al., 2017; Qi et al., 2014).

2. Justificativa e objetivos

2.1 Justificativa

Os estrógenos são facilmente absorvidos pelos tecidos devido a sua alta lipofilicidade (Pal et al., 2010). Devido a isto, e ao fato de serem capazes de ativar os receptores de estrógeno (Nelson & Habibi, 2013), o aumento dos níveis desses compostos de origem exógena no organismo dos vertebrados pode comprometer vários processos mediados por essa classe de hormônios, entre eles os ligados a reprodução (Adeel et al., 2017).

Assim como em outros vertebrados, os peixes têm a reprodução comprometida após a exposição a estrógenos naturais e sintéticos (Pinto et al., 2014). A exposição a esses compostos é responsável por afetar o fitness reprodutivo (Rose et al., 2013), atrasar a espermatogênese e estimular a produção de vitelogenina em machos (Kidd et al., 2007), reduzir a fecundidade e fertilidade (Jackson e Klerks, 2019), alterar a produção de esteróides sexuais (Rutherford et al., 2020) e a diferenciação sexual (Larsen et al., 2009). Os peixes desempenham relevante papel ecológico e são importante fonte de alimento para os humanos (Lynch et al., 2016). Entretanto, em consequência dos efeitos deletérios de diversos poluentes dentre eles os estrógenos, sobre sua fisiologia, a disponibilidade destes organismos como alimento está ameaçada (FAO, 2020; Adeel et al., 2017). A elucidação dos efeitos da exposição aos estrógenos na reprodução dos peixes e outros vertebrados se torna ainda mais relevante se considerarmos que existe uma grande liberação destes produtos no meio ambiente, destacadamente a estrona, o 17β -estradiol e o etinilestradiol (Petrie et al., 2015; Adeel et al., 2017; Weber et al., 2017; Wilkinson et al., 2017; Kolpin et al., 2002). Apesar dos riscos à saúde dos organismos, várias destas substâncias não têm seus níveis monitorados nas águas superficiais de países como o Brasil e os Estados Unidos (Lopes et al., 2016; CONAMA, 2005; USEPA, 2002).

Aspectos básicos relevantes dos efeitos dos estrógenos ambientais sobre *endpoints* da reprodução dos peixes como a alteração da proporção de células somáticas e germinativas gonadais, alterações nos níveis dos esteróides sexuais, morte e proliferação celular, qualidade de sêmen e fertilidade foram pouco investigados, e mesmo não descritos para alguns estrógenos como a estrona (E1).

A estrona é um contaminante ambiental extremamente importante principalmente em países que tem a pecuária como atividade econômica relevante (Ray et al., 2013). Esse

hormônio polui o solo e os corpos d'água superficiais a partir de sua lixiviação das excretas de aves, suínos, bovinos e equinos (Andaluri et al., 2012). A estrona encontra-se presente nos efluentes de criações de suínos em concentrações que variam de 5200-5400 ng/L por exemplo (Adeel et al., 2017), e as fêmeas grávidas podem liberar até 17000 µg/dia de estrona por animal (Lafrance & Caron, 2013). Os efluentes das estações de tratamento de esgoto também são fonte de estrona, que se origina na sua excreção pelos humanos (Adeel et al., 2017). De forma geral, excreção média de estrona por pessoa é de 19 µg/dia (Laurenson et al., 2014). As mulheres em menopausa fazendo uso da terapia de reposição hormonal, todavia podem excretar até 31.50 µg/dia, enquanto no caso de mulheres grávidas esse valor pode chegar até 787 µg/dia (Kostich et al., 2013). Isso resulta em concentrações ambientalmente relevantes da estrona nas águas superficiais que variam de 1,81 a 28,8 ng/L na China e até 256,66 ng/L no Brasil (Weber et al., 2017; Wang et al., 2015). De forma inadvertida, as legislações que regulam as substâncias e poluentes presentes nas águas tanto para consumo humano como animal ainda não estabeleceram níveis máximos para os estrógenos ambientais em países como o Brasil e os Estados Unidos (CONAMA, 2005; USEPA, 2002).

O modelo experimental utilizado no presente trabalho é o peixe *Danio rerio*, conhecido popularmente como zebrafish ou paulistinha. Essa espécie é nativa do subcontinente indiano onde habita pequenos cursos d'água e lagos (Engeszer et al., 2007). O zebrafish é utilizado em estudos biológicos desde 1930 por possuir características importantes como baixo custo de manutenção, pequeno tamanho, fácil manejo e reprodução contínua e prolífica (Lieschke & Currie, 2007).

2.2 Objetivos

2.2.1 Objetivo geral

Analisar os efeitos da exposição a estrona em concentrações ambientalmente relevantes na gametogênese e reprodução do zebrafish (*Danio rerio*).

2.2.2 Objetivos específicos

- Avaliar os indicadores biométricos, morfofisiológicos e reprodutivos em machos e fêmeas: comprimento total (CT), peso corporal (PC), peso gonadal (PG), índice gonadossomático (IGS) e fator de condição de Fulton (K);

- Quantificar a proporção de células germinativas, somáticas e os biomarcadores de proliferação e morte celular nas gônadas;
- Quantificar os níveis gonadais de 11-ketotestosterona e 17 β -estradiol;
- Avaliar a expressão gonadal de IGF1, IGF2, IGF1R, iNOS e a produção de NO;
- Avaliar os efeitos da estrona sobre a produção de ovos, qualidade do sêmen e fertilidade.

3. Resultados

Os resultados do presente trabalho encontram se sumarizados nos itens abaixo:

3.1. Artigo 1: Chronic estrone exposure affects spermatogenesis and sperm quality in zebrafish (*Danio rerio*) - (Submetido para publicação na Environmental Toxicology and Pharmacology – em fase de revisão)

3.2. Artigo 2: Efeitos da exposição crônica a estrona na ovogênese e desova do zebrafish (*Danio rerio*) - (A ser submetido para publicação)

3.1. Artigo 1

Environmental Toxicology and Pharmacology

Chronic estrone exposure affects spermatogenesis and sperm quality in zebrafish (*Danio rerio*)

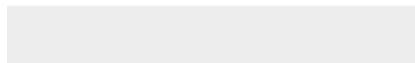
--Manuscript Draft--

Manuscript Number:	
Article Type:	Research Paper
Keywords:	Environmental estrogens; Reproductive toxicology; Sex steroids; Oxidative stress; Germ cell, Cell proliferation
Corresponding Author:	Elizete Rizzo Federal University of Minas Gerais Institute of Biological Sciences Belo Horizonte, Minas Gerais BRAZIL
First Author:	Yves Moreira Ribeiro
Order of Authors:	Yves Moreira Ribeiro Davidson Peruci Moreiraa Peruci Moreira André Alberto Weber Thayná Grazielle Rodrigues Miranda Nilo Bazzoli Elizete Rizzo
Abstract:	<p>Estrone (E1) is a common environmental contaminant found in rivers and streams due to the farming of animals, such as swine and cattle. Our study evaluated the effects of chronic E1 exposure at environmentally relevant concentrations on spermatogenesis and the semen quality of zebrafish (<i>Danio rerio</i>). We exposed the fish to E1 at concentrations of 20, 200, and 2000 ng/L diluted in 0.001% ethanol (v/v) for 49 days. There were two control groups: one was exposed to water only and the other to ethanol at the same concentration used in the E1 groups. Following exposure, we analyzed the proportion of testicular cell types and other components (%), rate of cell proliferation and death, and sex steroid concentrations. Furthermore, we analyzed the expression of insulin-like growth factor 1 (IGF1), IGF2, IGF1 receptor (IGF1R), and inducible nitric oxide synthase and assessed the semen quality. E1 exposure increased spermatogonia, spermatids, Sertoli cells, Leydig cells, and the proportion of inflammatory infiltrate but decreased the spermatozoa amount. These changes were reflected by reductions in the gonadosomatic index and levels of 11-ketotestosterone in the testes. On the other hand, E1 exposure increased testicular estradiol, IGF1R expression, and nitric oxide production. After an evaluation using a computer-assisted sperm analysis (CASA) system, we observed reduced progressive motility, curvilinear velocity, and beat cross frequency of 20 and 2000 ng/L E1 groups. Our findings support that E1 causes deleterious effects on the testicular function and semen quality of <i>D. rerio</i> even at environmental concentrations. Thus, E1 concentrations should be monitored in surface waters for the purposes of fish conservation.</p>
Suggested Reviewers:	David C. Volz, PhD Teacher, University of California San Francisco david.volz@ucr.edu Eduardo Jorge Souza da Rocha, PhD Teacher, University of Porto erocha@icbas.up.pt Wang Zaizhao zzwang@nwsuaf.edu.cn
Opposed Reviewers:	



Click here to access/download

Declaration of Interest Statement
declaration Statement.docx



Michael D. Coleman

Editor-in-Chief of Environmental Toxicology and Pharmacology

June 24th 2022

Dear Editor

We are submitting the manuscript entitled ‘Chronic estrone exposure affects spermatogenesis and semen quality in zebrafish (*Danio rerio*)’ for consideration by Environmental Toxicology and Pharmacology. This manuscript was previously submitted to Environmental Research and transferred to this journal by the Transfer manager as suggested by the editor.

Despite estrone being one of the most abundant environmental estrogens in surface waters, few studies have been carried out to analyze its effects on aquatic biota. In this study, we investigated the effects of estrone on testicular morphology and function using zebrafish as an experimental model. Molecules of the IGFs system and oxidative stress were assessed in the context of spermatogenesis. We also analyze spermatic quality through the CASA system. The results suggest that estrone impairs zebrafish spermatogenesis, sperm production and quality, and thus its concentrations should be monitored in water bodies for environmental conservation and fish populations.

The authors declare that the manuscript is not under consideration for publication elsewhere and, this submission as well as its publication (if accepted) in **Environmental Toxicology and Pharmacology** are approved by all authors.

Thank you very much for your attention and consideration.

Sincerely

Elizete Rizzo
Cell Biology Graduate Program
Department of Morphology, Institute of Biological Science
Federal University of Minas Gerais, Brazil

Highlights

- Reproductive toxicity of estrone (E1) was evaluated in testis of *Danio rerio*.
- E1 exposure increased E2 and decreased 11-KT concentrations in the zebrafish testes.
- iNOS expression and nitrite production were stimulated by E1.
- Sperm production and quality were negatively affected by estrone exposure.

1
2
3
4
5 1 **Chronic estrone exposure affects spermatogenesis and sperm quality in**
6 2 **zebrafish (*Danio rerio*)**
7
8 3
9
10 4
11
12 5
13
14 6
15

16 7 Yves Moreira Ribeiro^a, Davidson Peruci Moreira^a, André Alberto Weber^b, Thayná Grazielle
17 8 Rodrigues Miranda^c, Nilo Bazzoli^d, Elizete Rizzo^{a,*}
19
20 9
21
22 10
23
24 11
25
26 12
27
28 13
29

30 14 ^aDepartamento de Morfologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas
31 15 Gerais, UFMG, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil.

32 16 ^bDepartment of Pharmacology, University of California, San Diego, USA

33 17 ^cEscola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, UFMG, Belo Horizonte, Minas
34 18 Gerais, Brasil

35 19 ^dPrograma de Pós-Graduação em Biologia de Vertebrados, Pontifícia Universidade Católica de
36 20 Minas Gerais, PUC Minas, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil
37
38

39 21
40
41 22
42
43 23
44
45 24
46
47 25
48
49 26
50
51 27
52
53 28
54
55 29 ***Corresponding author:** E-mail: ictio@icb.ufmg.br (E. Rizzo)
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

30 Abstract

31 Estrone (E1) is a common environmental contaminant found in rivers and streams due to the
32 farming of animals, such as swine and cattle. Our study evaluated the effects of chronic E1
33 exposure at environmentally relevant concentrations on spermatogenesis and the semen quality of
34 zebrafish (*Danio rerio*). We exposed the fish to E1 at concentrations of 20, 200, and 2000 ng/L
35 diluted in 0.001% ethanol (v/v) for 49 days. There were two control groups: one was exposed to
36 water only and the other to ethanol at the same concentration used in the E1 groups. Following
37 exposure, we analyzed the proportion of testicular cell types and other components (%), rate of
38 cell proliferation and death, and sex steroid concentrations. Furthermore, we analyzed the
39 expression of insulin-like growth factor 1 (IGF1), IGF2, IGF1 receptor (IGF1R), and inducible
40 nitric oxide synthase and assessed the semen quality. E1 exposure increased spermatogonia,
41 spermatids, Sertoli cells, Leydig cells, and the proportion of inflammatory infiltrate but decreased
42 the spermatozoa amount. These changes were reflected by reductions in the gonadosomatic index
43 and levels of 11-ketotestosterone in the testes. On the other hand, E1 exposure increased testicular
44 estradiol, IGF1R expression, and nitric oxide production. After an evaluation using a computer-
45 assisted sperm analysis (CASA) system, we observed reduced progressive motility, curvilinear
46 velocity, and beat cross frequency of 20 and 2000 ng/L E1 groups. Our findings support that E1
47 causes deleterious effects on the testicular function and semen quality of *D. rerio* even at
48 environmental concentrations. Thus, E1 concentrations should be monitored in surface waters for
49 the purposes of fish conservation.

50
51
52
53
54
55
56
57 **Keywords:** Environmental estrogens; Reproductive toxicology; Sex steroids; Oxidative stress;
58
59 Germ cell, Cell proliferation
60
61
62
63
64
65

1
2
3
4 **61 Funding Sources**

5
6 **62** The research was funded by the following Brazilian institutions: Conselho Nacional de
7
8 **63** Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq 310283/2020-5 and 407778/2016-0),
9
10 **64** Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES, financial code 001) and
11
12 **65** Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG)

13 **66**

14
15 **67**

16
17 **68**

18
19 **69 Ethics Committee of the Federal University of Minas Gerais approval (CEUA protocol**
20
21 **70 115/2020)**

22 **71**

23
24 **72**

25
26 **73**

27
28 **74**

29
30 **75**

31
32 **76**

33
34 **77**

35
36 **78**

37
38 **79**

39
40 **80**

41
42 **81**

43
44 **82**

45
46 **83**

47
48 **84**

49
50 **85**

51
52 **86**

53
54 **87**

55
56 **88**

57
58 **89**

59
60 **90**

61
62 **91**

63

64

65

1. Introduction

Environmental estrogens, including estrone (E1), 17 β -estradiol (E2), and estriol (E3), are endocrine-disrupting chemicals that affect cellular pathways involved with the production, metabolism, and excretion of several hormones (La Merrill et al., 2020; Kabir et al., 2015). The exposure to these estrogens impairs reproductive activity, leading to changes in gonadal gene expression, alterations in sex steroid levels, and a reduction in the number of offspring (Murata & Kang, 2018; Nadal et al., 2018; Adeel et al., 2017). Nevertheless, the environmental laws of some countries, including Brazil, do not stipulate the maximum allowable level of estrogens in surface waters (Comunidade Européia, 2008; CONAMA, 2005; USEPA, 2002), disregarding the effects of the environmental estrogens on aquatic animals. The high lipophilicity of estrogens means that they are easily absorbed by tissue, where they activate alpha, beta or G protein-coupled estrogen receptors (Pillerová et al., 2021; Vo et al., 2019). The exposure of fish to natural and synthetic estrogens impairs reproduction, including delays in spermatogenesis, activation of vitellogenin in males (Kidd et al., 2007), reduction of fecundity and fertility (Jackson & Klerks, 2019), and alterations in sex differentiation (Larsen et al., 2009) and sex steroid production (Rutherford et al., 2020).

Spermatogenesis comprises three phases: the spermatogonial or mitotic phase, in which spermatogonia begin differentiating into spermatocytes; the meiotic phase, in which primary spermatocytes give rise to secondary spermatocytes that later divide to give rise to haploid spermatids; and the spermiogenic phase, in which the spermatids undergo several modifications to give rise to spermatozoa (Schulz et al., 2010; Uribe et al., 2014). Spermatogenesis is controlled by gonadotrophins, produced by the pituitary gland, and sex steroids (Chu et al., 2015). Besides these hormones, several other molecules can influence gametogenesis and reproduction in fish, such as insulin-like growth factors (IGFs) and nitric oxide (NO) (Breves et al., 2018; Prado et al., 2014; Reinecke, 2010; Shved, 2008).

IGFs are synthesized in several tissues in response to growth hormone (Neirijnck et al., 2019). IGF1 and IGF2 act through both IGF receptor 1 (IGF1R), insulin receptor (IR) and hybrid receptors (IGFR-IR) (Adamek & Kasprzak, 2018; Werner et al., 1994). These molecules function in a paracrine/autocrine manner in fish gonads (Neirijnck et al., 2019) and are expressed in Sertoli cells, Leydig cells, and germ cells, stimulating spermatogonial differentiation (Reinecke, 2010). Both IGF1 and IGF2 play important roles in testicular cell proliferation, and downregulation of

1
2
3
4 123 these proteins increases apoptosis in spermatogenic cells (Moreira et al., 2020). Along with IGFs,
5
6 124 NO plays a vital role in vertebrate reproductive processes, such as folliculogenesis, sex steroid
7
8 125 production (Singh & Lal, 2017), ovarian steroidogenesis (Delsouc et al., 2018), and luteal
9
10 126 regression (Grazul-Bilska et al., 2006). NO is a molecule generated by the enzyme nitric oxide
11
12 127 synthase (NOS), and its production is related to estrogenic action in tissues (Choudhury & Saha,
13
14 128 2016; Nevzati et al., 2015; Xia & Krukoff, 2004). Despite its relevance to reproduction, an increase
15
16 129 in NO derivatives, including peroxynitrite (ONOO⁻), is related to DNA damage, protein nitration,
17
18 130 and S-nitrosylation (Forstermann & Sessa, 2012; Mikkelsen & Wardman, 2003).

19 131 E1 is one of the most abundant environmental estrogens in surface waters, particularly in
20
21 132 countries such as Brazil, where animal farming is the main economic activity (Ray et al., 2013).
22
23 133 An important route of contamination of surface waters by E1 is through the leaching of cattle and
24
25 134 swine excreta (Andaluri et al., 2012). For example, E1 was detected at concentrations of up to
26
27 135 5400 ng/L in effluents from swine farms (Adeel et al., 2017), and pregnant swine were reported to
28
29 136 release up to 17,000 µg of E1 per day (Lafrance & Caron, 2013). Effluents from human excrement
30
31 137 at sewage treatment plants are also a source of E1 pollution (Adeel et al., 2017). Furthermore,
32
33 138 environmentally relevant concentrations of E1 have been detected in surface waters in China
34
35 139 (1.81–28.8 ng/L) and Brazil (up to 256.66 ng/L) (Weber et al., 2017; Wang et al., 2015).

36 140 Despite having lower biological potency than E2, 17 α -ethinylestradiol, and bisphenol A (BPA),
37
38 141 evidence suggests that E1 can be converted to E2 by the enzyme 17 β -hydroxysteroid
39
40 142 dehydrogenase (17 β -HSD) (Ankley et al., 2017). The persistent detection of E1 in surface waters
41
42 143 across different studies led us to hypothesize that this E1 can cause deleterious effects on the
43
44 144 reproductive system of male fish. Considering that few studies have analyzed the effects of E1
45
46 145 exposure on spermatogenesis and semen quality in fish, we exposed zebrafish (*Danio rerio*) to
47
48 146 different environmentally relevant concentrations of E1 to investigate this further.

49 50 148 **2. Materials and methods**

51 52 149 *2.1. Fish collection and exposure to E1*

53
54 150 Eighteen-week-old adult wild-type zebrafish (*D. rerio*) were obtained from a local provider.
55
56 151 They were handled according to the Animal Experimentation Guidelines of the Brazilian College
57
58 152 of Animal Experimentation. Our study was approved by the Ethics Committee and the Animal
59
60 153 Handling Committee of the Federal University of Minas Gerais (CEUA protocol 115/2020).

1
2
3
4 154 Before the experiments, the fish were acclimatized for 15 days in two 120-L tanks at a
5
6 155 temperature of 26–28°C under a photoperiod of 12L:12D. The tanks contained a biological filter
7
8 156 and aerators. During acclimatization, biological filters were removed, and 80% of the aquarium
9
10 157 water was changed every 2 days to maintain normal levels of ammonium, pH, and dissolved
11
12 158 oxygen suitable for fish.

13 159 After acclimatization, the fish were sexed according to external morphological characteristics
14
15 160 and transferred to 25-L aquariums (n = 10 per aquarium) at a 1:1 female/male sex ratio to form
16
17 161 five groups. Three groups were exposed to E1 (Sigma-Aldrich, USA) dissolved in absolute ethanol
18
19 162 (0.001% v/v) at concentrations of 20, 200, and 2000 ng/L (v/v). The 20 and 200 ng/L groups are
20
21 163 environmentally relevant concentrations that have been detected in surface waters (Weber et al.,
22
23 164 2017; Wang et al., 2015). The remaining two groups were negative controls: one was only exposed
24
25 165 to water (control) and the other was exposed to ethanol (EtOH) at the same concentration used to
26
27 166 dilute the E1 in the exposure groups. Considering that the half-life of E1 is 3–4 days in water, 80%
28
29 167 of the water in the aquariums was changed every 2 days, and the relevant E1 concentrations were
30
31 168 added at every water change. All exposure experiments were performed in duplicate (two
32
33 169 aquariums per treatment). After 7 weeks (49 days), we recorded the total length (TL), body weight
34
35 170 (BW), and gonadal weight (GW) for each fish. These data were used to calculate the
36
37 171 gonadosomatic index ($GSI = [GW/BW] \times 100$) and Fulton condition factor ($K = [BW/TL^3] \times 100$)
38
39 172 of each fish.

39 173 The water quality parameters, including temperature, dissolved oxygen, pH, and ammonium,
40
41 174 were monitored weekly using a thermometer and commercial kits (LabconTest, Brazil) (Table 1).
42
43 175 Water samples were collected in the first and third weeks of exposure and used for E1
44
45 176 quantification by high-performance liquid chromatography on an HPLC SPD-20A Prominence
46
47 177 UV-Vis Detector (Shimadzu, Japan) with a C18 column (250 × 4.6 mm, 2 μm; Kromasil) as
48
49 178 previously described (Weber et al., 2017). The identity of the analyte were confirmed by mass
50
51 179 spectrometry on an Autoflex III Maldi-TOF/TOF System (Bruker, USA). Quality control was
52
53 180 performed using blank HPLC runs and by injections of E1 standard (Sigma-Aldrich). All samples
54
55 181 were analyzed in duplicate. The quantification and detection limits were 2.34 and 1.71 ng/L,
56
57 182 respectively (Table 1).

57 183

Table 1. Water physicochemical parameters and concentrations of estrone (E1) during the exposure.

Group	Temperature (°C)	pH	Oxygen (mg/L)	Ammonia (mg/L)	E1 (ng/L)
Control	28.18 ± 0.22	6.53 ± 0.08	6.50 ± 0.14	0.006 ± 0.001	nd
EtOH	28.46 ± 0.28	6.80 ± 0.13	6.71 ± 0.16	0.007 ± 0.001	nd
E1 20 ng/L	27.93 ± 0.39	6.36 ± 0.06	6.29 ± 0.55	0.007 ± 0.001	19.78 ± 1.63
E1 200 ng/L	28.18 ± 0.26	6.53 ± 0.10	7.07 ± 0.20	0.006 ± 0.001	229.10 ± 7.31
E1 2000 ng/L	28.36 ± 0.13	6.50 ± 0.08	6.79 ± 0.21	0.006 ± 0.001	1941.92 ± 2.81

The values represent mean ± standard error, nd = not detected.

2.2. Morphometry

Testis samples (n = 6 per treatment) were fixed in Bouin fluid for 8 h, embedded in paraffin, sectioned at 5 µm thickness, and stained with hematoxylin-eosin for spermatogenesis analysis. The proportion of testicular components was quantified using five longitudinal testis sections chosen at random from six males in each treatment group. We used AxioVision SE64 software (Zeiss, Germany) coupled with a light microscope to obtain images at a magnification of 400×. A total of 30 images per group were analyzed by ImageJ software (ImageJ, U. S. National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA) using 540 intersection points. The following germ cells and testicular somatic components were quantified according to morphological characteristics: undifferentiated type A spermatogonia (A_{und}), differentiated type A spermatogonia (A_{diff}), type B spermatogonia (B), primary and secondary spermatocytes (C1 and C2, respectively), spermatids, spermatozoa, Sertoli cells, peritubular myoid cells, Leydig cells, connective tissue, blood vessels, inflammatory infiltrate, and tubular lumen.

2.3. Immunohistochemistry

We evaluated cell proliferation in testis samples (n = 6 per group) that were fixed in 4% paraformaldehyde, embedded in paraffin, and then processed as previously described (Ribeiro et al., 2021). Endogenous peroxidase was blocked for 30 min at room temperature with 3% H₂O₂ diluted in phosphate-buffered saline. The antigens were retrieved using 10 mM citrate buffer (pH 6.0) for 20 min at 95 °C and blocked with 2% bovine serum albumin at room temperature for 45

min. Then, the sections were incubated overnight with primary monoclonal anti-proliferating cell nuclear antigen (PCNA) antibody at 1:100 dilution in a humidity chamber at 4 °C. After that, they were then subjected to the secondary linking system with horseradish peroxidase (HRP) (Dako EnVision + Dual Link System-HRP, kit K4063 Dako, USA), visualized with 3,3'-Diaminobenzidine (DAB, Sigma-Aldrich, St. Louis, USA), rinsed in PBS for 10 min, and counterstained with hematoxylin. Finally, the sections were counterstained with hematoxylin. One section was not treated with the primary antibody and was used as the negative control. PCNA-positive reactions were quantified at a magnification of 400× in five longitudinal sections chosen from six random males in each treatment group (n = 30 fields per treatment). A_{und}, A_{diff}, B, Sertoli, and Leydig cells were examined for proliferation (PCNA-positive). The percentage of PCNA-positive cells were calculated considering the ratio of the positive and non-positive cells for each type.

We determined the levels of IGF1, IGF2, IGF1R, and inducible NOS (iNOS) protein expression in testis samples (n = 6 per group) using primary antibodies (Table 2) as previously described for PCNA. Posteriorly, five images (400× magnification) chosen at random from six males in each treatment group (n = 30 per group) were analyzed using the Fiji/Image J software (<https://imagej.net/Fiji/Downloads>) to determine the optical density of the DAB staining (Color Deconvolution 1.7 plugin, vector H DAB). The optical density (OD) was calculated for each image using the formula $OD = \log(\text{max intensity}/\text{mean intensity})$.

Table 2. Primary antibodies and dilution used in immunohistochemistry

Primary antibody	Origin	Number	Dilution
Monoclonal anti-PCNA	Sigma-Aldrich	P8825	1:100
Policlonal anti-IGF1	Santa Cruz Biotechnology	Sc-9013	1:100
Policlonal Anti-IGF2	Santa Cruz Biotechnology	Sc-5622	1:100
Policlonal Anti-IGF1R	Santa Cruz Biotechnology	Sc-713	1:100
Policlonal Anti-iNOS	Sigma-Aldrich	SAB4502012	1:150

(PCNA) proliferating cell nuclear antigen, (IGF) insulin-like growth factor (iNOS) inducible nitric oxide synthase

2.4. *In situ terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling assay*

We determined the percentage of cell death in testis samples (n = 6 per group) using a transferase dUTP nick end labeling (TUNEL) in situ kit (TdT-FragEL DNA Fragmentation Kit, Calbiochem, USA) according to the manufacturer's instructions. First, the slides were deparaffinized in xylene and washed in running water for 10 min. Then, the samples were incubated for 20 min with 20 µg/mL proteinase K for antigen retrieval and 3% H₂O₂ for to inhibit endogenous peroxidase. Next, the sections were incubated with terminal deoxynucleotidyl transferase (TdT) enzyme for 1 h at 37 °C, followed by incubation with anti-digoxigenin conjugated with peroxidase for 30 min. The peroxidase reaction was revealed using DAB, and the slides were counterstained with hematoxylin. One slide was not treated with TdT and was used as a negative control. We quantified the TUNEL-positive cells in five longitudinal images (400× magnification) chosen at random from six males in each treatment group (n = 30 per group). The percentage of cell death was determined from the percentage of TUNEL-positive cells according to the total number of cells for each type.

2.5. *ELISA assay*

Fish testis samples were used to determine the testicular concentration of 11-ketotestosterone (11-KT) and E2 (n = 6 per group). Briefly, the samples were collected and frozen at -80 °C prior to homogenization in extraction buffer (50 mM Tris-HCl [pH 8.0] with 0.002% aprotinin and 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride). Then, the extracts were centrifuged at 15,000 ×g for 60 min at 4 °C. The supernatants were collected for use with commercial ELISA kits (Cayman Chemical, Ann Arbor). The detection limit for 11-KT and E2 were 1.3 and 6.6 pg/mL, respectively. The absorbance was measured at 405 nm using a microplate reader (BioTek Instruments, USA). All samples were analyzed in duplicate, according to the manufacturer's instructions.

2.6. *Quantification of nitric oxide*

We determined the concentration of NO indirectly by measuring nitrite (NO₂) production following the Griess reaction. The samples were collected and prepared in the same manner as for the ELISA assay. Then, we mixed 100 µL of supernatant with Griess reagent (1% sulfanilamide, 0.1% N-(1-naphthyl)ethylenediamine dihydrochloride, and 5% phosphoric acid) and incubated the mixture in the dark at room temperature for 10 min. The absorbance was measured at 540 nm in

1
2
3
4 263 duplicate using a microplate reader and the NO₂ concentrations of the samples were determined
5
6 264 using a standard curve of sodium nitrite (NaNO₂).
7

8 265

10 266 2.7. *Computer-assisted sperm analysis*

11 267 Semen samples (n = 5 per group) were obtained after mild massage of dissected testis and kept
12
13 268 in Hanks balanced salt solution at a ratio of 1:50 w/v. After 10 min, samples were activated with
14
15 269 distilled water in a Makler chamber and analyzed in duplicate at 20, 30, 40, 50, and 60 s using the
16
17 270 computer-assisted sperm analysis system (CASA), with a contrast microscope coupled with Sperm
18
19 271 Class Analyzer v4.0 software (Microptic S.L., Spain). The following parameters of semen quality
20
21 272 were analyzed: sperm total motility (%), progressive motility (%), nonprogressive motility (%),
22
23 273 curvilinear velocity (VCL, $\mu\text{m/s}$), and the beat-cross frequency (BCF, Hz).
24

25 274

26 275 2.8. *Statistical analysis*

27
28 276 We used GraphPad Prism 6.0 software for all statistical analyses and graphs. Shapiro–Wilk test
29
30 277 was used to verify the normality of the data. Non-parametric data, including morphometry,
31
32 278 biological indices, steroid concentrations, cell proliferation, cell death, protein expressions, and
33
34 279 semen quality parameters, were analyzed by the Kruskal–Wallis test followed by Dunn test.
35
36 280 Parametric data such as testicular morphometry and NO₂ concentrations, were analyzed by one-
37
38 281 way ANOVA followed by Tukey test. The groups exposed to E1 were compared with the Control
39
40 282 groups, and data were expressed as mean \pm standard error. *P* values < 0.05 were considered
41
42 283 statistically significant. There was no significative difference between the control and EtOH
43
44 284 groups.
45

46 285

46 286 **3. Results**

48 287 3.1. *Morphometric data, biological indices, and sex steroid levels*

49
50 288 The TL, BW, and K values ranged from 3–4 cm, 0.5–0.7 g, and 0.8–1.2, respectively, with no
51
52 289 statistical differences among the groups (*p* > 0.05). GSI values were statistically lower in fish at
53
54 290 E1 concentrations of 200 ng/L and 2000 ng/L when compared with the control group (*p* < 0.05)
55
56 291 (Fig. 1A). The testicular concentrations of 11-KT were dramatically reduced in all groups exposed
57
58 292 to E1 (*p* < 0.05) (Fig. 1B). On the other hand, the testicular concentrations of E2 were significantly
59
60 293 increased in all groups exposed to E1 (*p* < 0.01) (Fig. 1C).
61
62
63
64
65

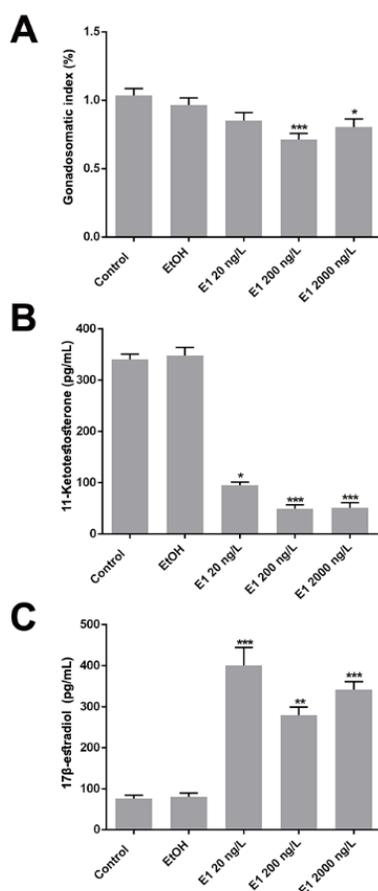


Fig. 1. Gonadosomatic index and testicular concentrations of sex steroids in *Danio rerio* after exposure to estrone (E1) for 49 days. Values represent mean \pm SEM, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

3.2. Morphometry of the testicular cells

We observed an increase in A_{und} proportion in all groups exposed to E1 when compared with the control group in cells in the spermatogonial phase ($p < 0.01$) (Fig. 2A). The proportion of A_{diff} was significantly increased in the 200 and 2000 ng/L E1 groups ($p < 0.001$) and in B spermatogonia in the 2000 ng/L E1 group only ($p < 0.001$) (Fig. 2A). In the meiotic phase, the proportion of C1 was higher in the 20 ng/L and lower in the 200 ng/L E1 groups ($p < 0.01$), while the proportion of C2 was statistically higher in the 200 ng/L E1 group only ($p < 0.05$) (Fig. 2A). In the spermiogenic phase, we observed an increase in the proportion of spermatids in the 20 ng/L E1 group only ($p < 0.001$) and a dramatic reduction in the proportion of spermatozoa in all groups exposed to E1 ($p < 0.001$) (Fig. 2A). Sertoli cells were statistically increased in all E1 groups ($p < 0.001$), and Leydig cells showed higher proportions in the 20 ng/L and 200 ng/L E1 groups ($p < 0.05$) (Fig. 2A). The

proportion of connective tissue was statistically higher all groups exposed to E1 ($p < 0.001$) (Fig. 2A). There was no difference in the proportion of peritubular myoid cells among groups ($p > 0.05$), but the proportions of blood vessels and inflammatory infiltrate were statistically higher in the 200 and 2000 ng/L E1 groups when compared with the control group ($p < 0.05$) (Fig. 2A). The proportion of tubular lumen was statistically decreased all groups exposed to E1 ($p < 0.01$) (Fig. 2A).

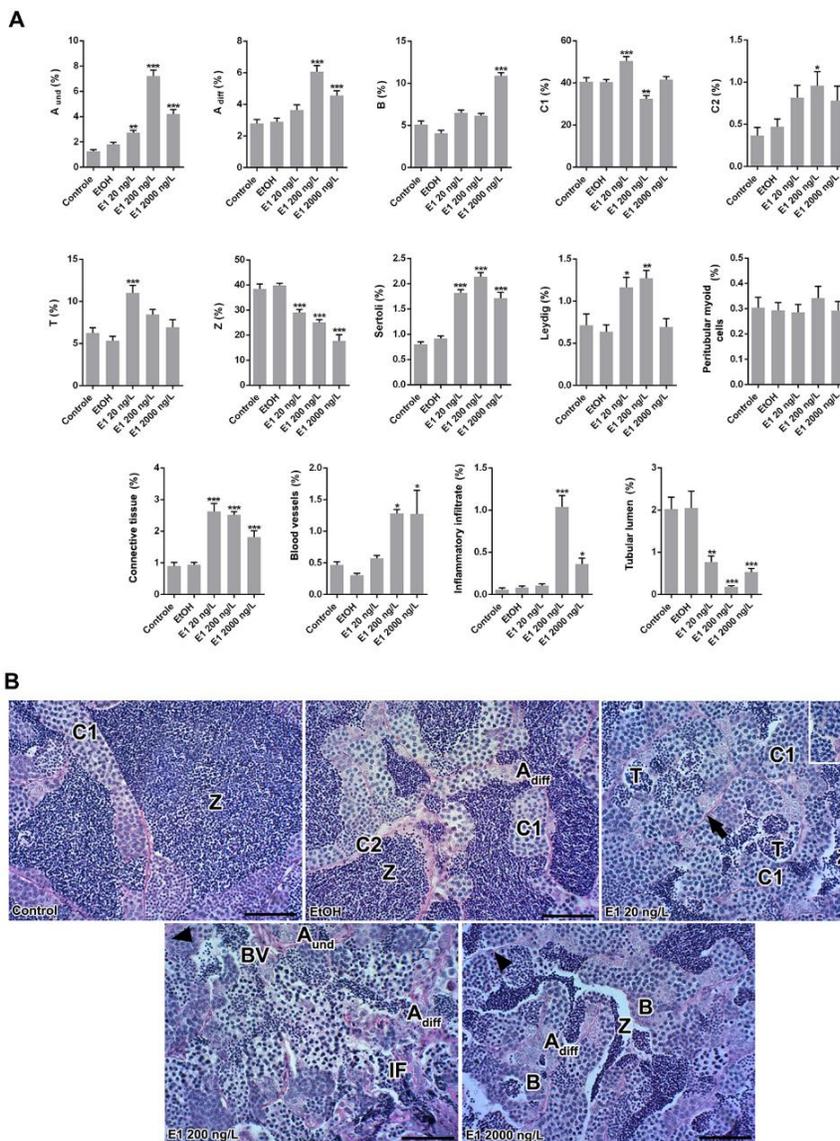


Fig. 2. Effects of exposure to estrone (E1) for 49 days during spermatogenesis in *Danio rerio*. (A) Proportion of testicular components and (B) histological sections of the germinative epithelium: Type A undifferentiated spermatogonia (A_{und}), type A differentiated spermatogonia (A_{diff}), type B spermatogonia (B), primary spermatocytes (C1), secondary spermatocytes (C2), spermatids (T), spermatozoa (Z), Sertoli (arrowhead), Leydig (L) and peritubular myoid cells (arrow), connective tissue, blood vessels (BV), inflammatory infiltrate (IF) and tubular lumen. Values represent mean \pm SEM, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$. Scale bar: 50 μ m.

3.3. Cell proliferation, apoptosis, and immunohistochemistry for IGF

There were no PCNA-positive Sertoli cells in any of the treated groups, and only a small number on the control and EtOH groups (Fig. S1). We observed a significant increase in PCNA-positive A_{diff} spermatogonia in the proliferative phase in all E1-exposure groups ($p < 0.001$) but no statistical difference among groups for A_{und} and B spermatogonia ($p > 0.05$) (Fig 3A). TUNEL-positive reactions were found in the Sertoli cells, A_{und} , A_{diff} , C1 and T, with few significant variations among groups (Fig. 3B, and S1).

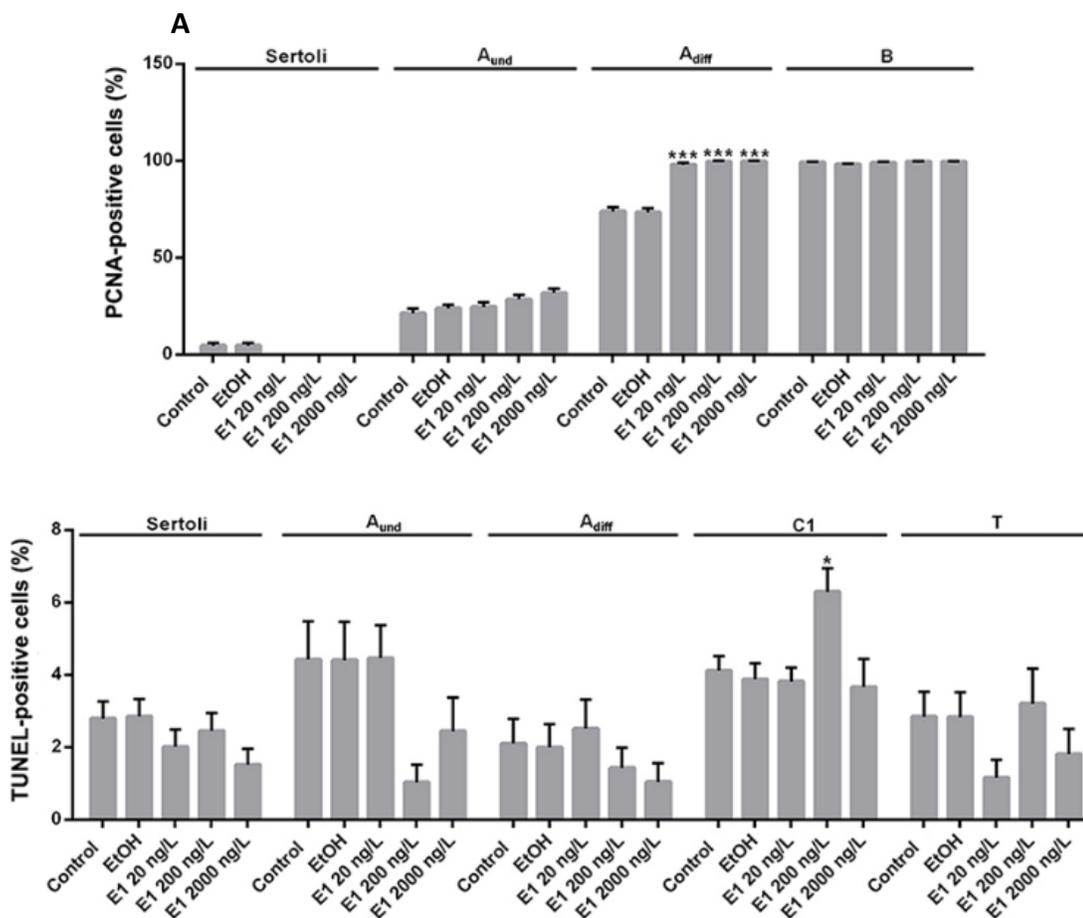


Fig. 3. Testicular cell proliferation (PCNA immunoreaction) and apoptosis (TUNEL reaction) in *Danio rerio*. Values represent mean \pm SEM, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

IGF1, IGF2 and IGF1R immunostaining was observed in Sertoli cells, Leydig cells, and in all germ cells, except for spermatozoa (Fig S2). Immunohistochemistry quantification of IGF1 and IGF2 by optical density showed no statistical differences among groups ($p > 0.05$); however, IGF1R was statistically higher in all groups exposed to E1 ($p < 0.05$) (Fig. 4).

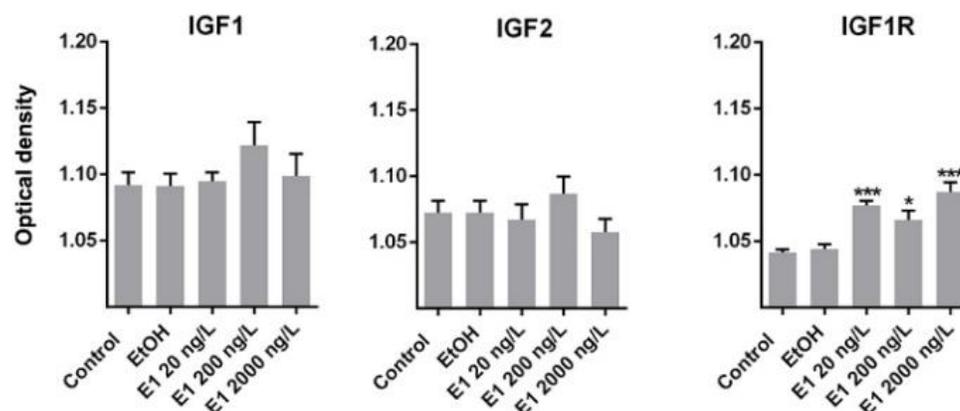


Fig. 4. Testicular expression of IGF1, IGF2 and IGF1R in *Danio rerio*. Values represent mean \pm SEM, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

3.4. Immunohistochemistry for iNOS and nitrite concentrations

Except for spermatozoa, iNOS immunostaining in all groups was observed in all germ cells (Fig. 5). Leydig cells and inflammatory infiltrate showed an immunoreaction for iNOS in all groups exposed to E1, but inflammatory infiltrate had no iNOS reaction in the control groups (Fig. 5). There were no iNOS immunoreaction of Sertoli cells in any of the groups (Fig. 5). The iNOS immunohistochemistry reaction quantification by optical density was statistically higher in the 2000 ng/L E1 group ($p < 0.05$) and showed an increasing trend in the 20 and 200 ng/L E1 groups (Fig. 5). The nitrite concentration was statistically higher in the 200 and 2000 ng/L exposure groups when compared with the control groups ($p < 0.01$) (Fig. 5).

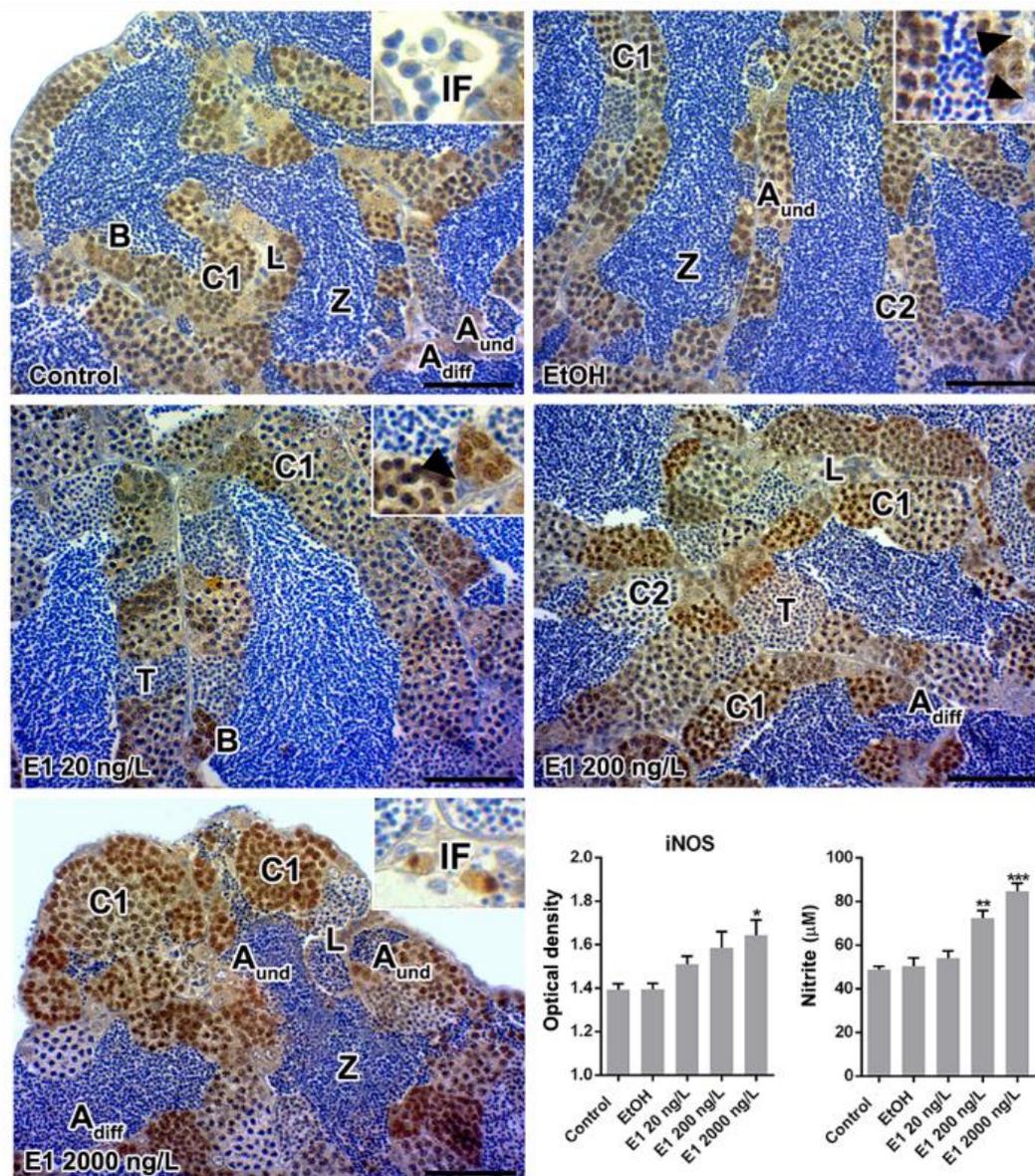


Fig. 5. Oxidative stress in *Danio rerio* testis after exposure to estrone (E1). Immunohistochemical reactions, optical density of iNOS, and nitrite concentrations: Type A undifferentiated spermatogonia (A_{und}), type A differentiated spermatogonia (A_{diff}), type B spermatogonia (B), primary spermatocytes (C1), secondary spermatocytes (C2), spermatids (T), spermatozoa (Z) and Sertoli cells (arrowhead). Values represent mean \pm SEM, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$. Scale bar: 50 μm .

3.5. Sperm parameters

Spermatozoa total motility was statistically lower in the 20 ng/L exposure group at 50 and 60 s after activation ($p < 0.05$) (Fig. 6A). The progressive motility was statistically lower in the 20 and 2000 ng/L E1 group at 50 and 60 s ($p < 0.05$) (Fig. 6B), while nonprogressive motility increased in the 2000 ng/L E1 group 40 s after spermatozoa activation ($p < 0.001$) (Fig. 6C). VCL had a statistical reduction in the 20 ng/L E1 group at 60 s and the 2000 ng/L E1 group at 40, 50, and 60 s after spermatozoa activation ($p < 0.05$) (Fig. 6D). The BCF was statistically decreased in the 20 ng/L E1 group at 60 s after spermatozoa activation and in the 2000 ng/L E1 group at 50 and 60 s after activation ($p < 0.05$) (Fig. 6E).

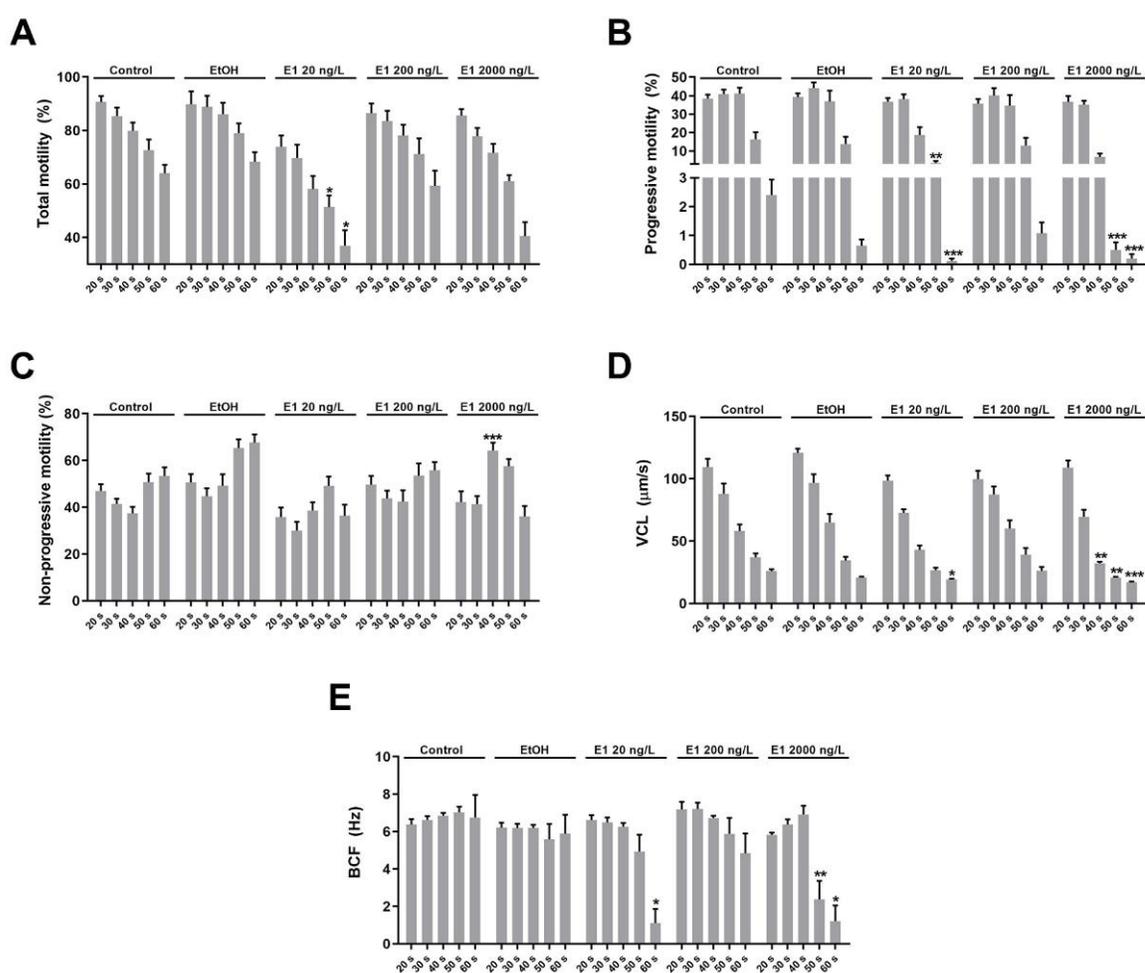


Fig. 6. Sperm quality in *Danio rerio* after exposure to estrone (E1). Total (A), progressive (B) and non-progressive (C) motility, curvilinear velocity (VCL, D) and beat-cross frequency (BCF, E). Values represent mean \pm SEM, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

4. Discussion

The exposure of fish to pollutants that contaminate aquatic environments compromises fish populations, an important source of protein in the human diet (Chan et al., 2019). This concern is most relevant in developing countries due to uncontrolled populational expansion and weak environmental legislation (FAO, 2020). Data on the effects of environmental estrogens, particularly E1, are scarce. In this study, we investigated the effects of different E1 concentrations on spermatogenesis and semen quality in zebrafish. This environmental estrogen is most frequently detected in countries with a strong presence of livestock farming (Weber et al., 2017; Adeel et al., 2017; Wang et al., 2015), and is also is the major postmenopausal estrogen.

Our study revealed that exposure to E1 in the 200 and 2000 ng/L groups reduced GSI, an important parameter that evaluates the progression of gonadal maturation under normal physiological conditions. Although several studies have reported that EDCs and other pollutants tend to increase the K index in fish (Weber et al., 2017; Paschoalini et al., 2021), in our study, the K index, which reflects the ratio between BW and TL, did not show statistical differences among groups, probably because of the short-term exposure.

The increase in E2 testicular concentrations after E1 exposure was observed in all groups in our study and showed similar results to those observed for fathead minnow (*Pimephales promelas*) exposed to E1 (Ankley et al., 2017). The increase in E2 concentration is probably related to the conversion of exogenous E1 to E2 by the enzyme 17 β -HSD (Ankley et al., 2017). In our study, the reduction of testicular concentrations of 11-KT may be related to the increase in aromatase (*Cyp19a1*), an enzyme that converts testosterone into E2, or a decrease in *Cyp17a1* expression, leading to a reduction in the levels of androstenedione, a precursor of testosterone and 11-KT. Interestingly, it has been reported that the exposure of zebrafish to nonylphenol, benzopyrene, and ethinylestradiol stimulates aromatase activity, but exposure to E2 led to the reduction of *Cyp17a1* expression (Kazeto et al., 2004; Hinfray et al., 2013).

In addition to sex steroids, we found that E1 exposure led to changes in germ and somatic cells in zebrafish testis. It has been reported that exposure to environmental estrogens alters the proportion of spermatogenic cells (Weber et al., 2019; Prado et al., 2014). In our study, the increase in E2 levels in all E1 groups was followed by an increase in spermatogonia and cell proliferation (PCNA-positive reactions) in A_{diff}. In fact, studies have shown that estradiol leads to cell proliferation in the testis and inhibits apoptosis in the spermatogonial phase (Schulster et al., 2016;

1
2
3
4 501 Schulz et al., 2010). Although no proliferating Sertoli cells were observed in the treated groups in
5
6 502 our study, E1 exposure led to an increase in Sertoli cells in these groups. This could be explained
7
8 503 because Sertoli cell proliferation precedes the expansion of germ cell clones (França et al., 2015),
9
10 504 what led us to the hypothesis that E1 exposure stimulated the proliferation of these cells
11
12 505 somewhere during the experiment, to support the increased numbers of spermatogonia. In contrast,
13
14 506 11-KT mainly acts in the meiotic phase of spermatogenesis and spermiation induction (Schulz et
15
16 507 al., 2010). Thus, the reduction of 11-KT caused by E1 exposure leads to the accumulation of A_{diff}
17
18 508 spermatogonia in all E1-exposed groups and can be related to alterations in spermatocytes and
19
20 509 spermatids in the 20 and 200 ng/L groups. It has been demonstrated that estrogenic compounds
21
22 510 can break spermatocyte DNA and delay the progression of the meiotic phase of spermatogenesis,
23
24 511 leading to an increase in spermatogonia and spermatocytes in testis (Giari et al., 2016; Liu et al.,
25
26 512 2013). An increase in TUNEL-positive spermatocytes was only observed in the 200 ng/L E1
27
28 513 group, indicating cell death by apoptosis. Furthermore, changes in sex steroids compromises
29
30 514 spermatogenesis progression as they regulate gene expression (Schulz et al., 2010), and the balance
31
32 515 between proliferation and cell death in the seminiferous epithelium (Ribeiro et al., 2021;
33
34 516 Paschoalini et al., 2021; Weber et al., 2019). Collectively, the alterations in germ cell proportions
35
36 517 caused by E1 lead to a decreased proportion of spermatozoa. Considering that spermatozoa are
37
38 518 responsible, in part, for testis weight (Stockley et al., 1997), the reduction in sperm production in
39
40 519 all E1 groups have contributed to decrease the GSI.

41 520 IGFs play an important role in spermatogenesis, including cell proliferation and
42
43 521 spermatogenesis progression (Moreira et al., 2020; Reinecke et al., 2010). It was reported that
44
45 522 IGFs are targets of endocrine disruptors, mainly environmental estrogens (Prado et al., 2014;
46
47 523 Reinecke et al., 2010). In our study, the protein expression of IGF1 and IGF2 remained unchanged
48
49 524 following exposure to E1, but IGF1R increased. The significant increase of IGF1R expression may
50
51 525 have been an additional stimulus for the proliferation of spermatogonia in the testicular epithelium.
52
53 526 This may be related to the increased efficiency of the proliferation mediated by IGFs, since there
54
55 527 is a greater number of receptors they can bind and activate. In fact, the proliferative and anti-
56
57 528 apoptotic effects of IGF1R had already been observed in fish (Schlueter et al., 2007). Although it
58
59 529 was not the objective of our study, another member of IGF family, IGF3, could be a target of E1
60
61 530 exposure, since this molecule plays a key role in fish testis (Nóbrega et al., 2015), and has been
62
63 531 reported as correlated with spermatogonial proliferation and differentiation (Li et al., 2020).
64
65

1
2
3
4 532 The effects of E1 exposure on spermatogenesis in the 200 and 2000 ng/L E1 groups may be
5
6 533 related to the increase in NO in zebrafish testis. Although the increase in testicular iNOS was only
7
8 534 statistically significant in the 2000 ng/L E1 group, a rising trend was observed in all E1 groups
9
10 535 according to the concentration. It has already been reported that increases in NO lead to the
11
12 536 inhibition of testosterone in Leydig cells in fish (Lal & Dubey, 2013). Along with the effects
13
14 537 caused by the increase of E1 and E2, this could be another pathway to the testicular endocrine
15
16 538 disruption after the E1 exposure, since Leydig cells are a major source of sex steroids.
17
18 539 Additionally, oxidative stress caused by NO is responsible for disturbance and oxidative in testis
19 540 (Turner & Lysiak, 2008; Sabeti et al., 2016).

20
21 541 Exposure to environmental estrogens and xenobiotics affects semen quality (Bautista et al.,
22
23 542 2018; Chen et al., 2017). In our study, E1 exposure affected several semen parameters in the 20
24
25 543 and 2000 ng/L E1 groups. Although the quality of the semen is mainly affected by heavy metals
26
27 544 and pesticides, exposure to estrogens also leads to deleterious effects on spermatozoa (Gallego &
28
29 545 Asturiano, 2019). Spermatozoa motility was significantly reduced after BPA exposure in goldfish
30
31 546 (*Carassius auratus*) and estrogen exposure in pejerrey (*Odontesthes bonariensis*) (Hatef et al.,
32
33 547 2012; Gárriz et al., 2015). In our study, the deleterious effects of E1 exposure over testicular
34
35 548 epithelium and the decrease of 11-KT may have affected energetic metabolism and structure of
36
37 549 spermatozoa, contributing to the reduction of total and progressive motility, VCL and BCF.
38
39 550 Although not evaluated in our study, intracellular ATP consumption and plasma membrane
40
41 551 damage caused by environmental contaminants are known to affect spermatozoa (Hatef et al.,
42
43 552 2013). Our results indicate that E1 exposure negatively affects spermatozoa function and
44
45 553 assessments using the CASA system are an important tool for studying the effects of xenobiotics
46
47 554 over fish sperm.

48 555

49 556 **5. Conclusion**

50 557 Our results show that E1 causes deleterious effects on testicular function in zebrafish. Changes
51
52 558 in sex steroids are followed by alterations in proliferation, cell death, and the proportion of
53
54 559 testicular cells. E1 exposure also modifies signaling pathways of IGFs and NO, contributing
55
56 560 negatively to spermatogenesis progression, which is reflected in the reduction and quality of
57
58 561 spermatozoa. Considering that the effects were observed at environmentally relevant
59
60 562 concentrations, our results indicate that E1 must be classified as an emerging contaminant capable

61
62
63
64
65

1
2
3
4 563 of affecting the reproductive physiology of males and consequently the sustainability of fish
5
6 564 populations, and its concentrations should be monitored in water bodies.

7
8 565

9 10 566 **Author contributions**

11 567 YMR: conceptualization, methodology, data curation, formal analysis, writing, review &
12
13 568 editing, DPM, AAW and TGRM: methodology, data curation; ER: conceptualization, supervision,
14
15 569 funding acquisition, writing, review & editing. All authors performed data interpretation.

16
17 570

18 19 571 **Declaration of competing interest**

20 572 The authors declare that there is no conflict of interest that could have influenced the work
21
22 573 reported in this paper.

23
24 574

25 26 575 **Acknowledgements**

27
28 576 The authors would like to thank Enago (www.enago.com) for the English language review.

29
30 577

31 32 578 **References**

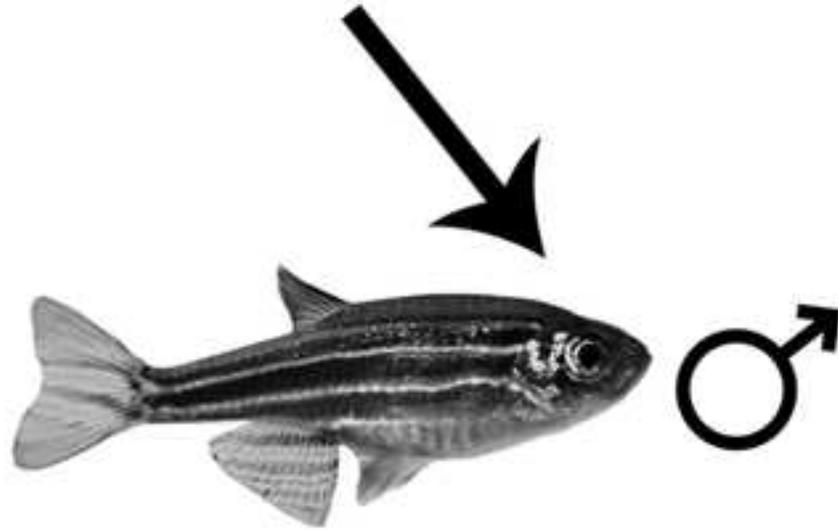
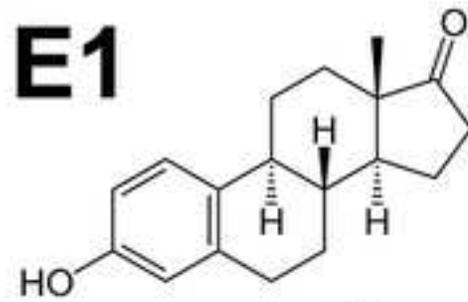
- 33
34 579 Adamek, A., Kasprzak, A., 2018. Insulin-Like Growth Factor (IGF) System in Liver Diseases.
35 580 *IJMS* 19, 1308. <https://doi.org/10.3390/ijms19051308>
- 36 581 Adeel, M., Song, X., Wang, Y., Francis, D., Yang, Y., 2017. Environmental impact of estrogens
37 582 on human, animal and plant life: A critical review. *Environment International* 99, 107–119.
38 583 <https://doi.org/10.1016/j.envint.2016.12.010>
- 39 584 Andaluri, G., Suri, R.P.S., Kumar, K., 2012. Occurrence of estrogen hormones in biosolids, animal
40 585 manure and mushroom compost. *Environ Monit Assess* 184, 1197–1205.
41 586 <https://doi.org/10.1007/s10661-011-2032-8>
- 42 587 Ankley, G.T., Feifarek, D., Blackwell, B., Cavallin, J.E., Jensen, K.M., Kahl, M.D., Poole, S.,
43 588 Randolph, E., Saari, T., Villeneuve, D.L., 2017. Re-evaluating the Significance of Estrone as
44 589 an Environmental Estrogen. *Environ. Sci. Technol.* 51, 4705–4713.
45 590 <https://doi.org/10.1021/acs.est.7b00606>
- 46 591 Bautista, F.E.A., Varela Junior, A.S., Corcini, C.D., Acosta, I.B., Caldas, S.S., Primel, E.G.,
47 592 Zanette, J., 2018. The herbicide atrazine affects sperm quality and the expression of
48 593 antioxidant and spermatogenesis genes in zebrafish testes. *Comparative Biochemistry and*
49 594 *Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology* 206–207, 17–22.
50 595 <https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2018.02.003>
- 51 596 Breves, J.P., Duffy, T.A., Einarsdottir, I.E., Björnsson, B.T., McCormick, S.D., 2018. In vivo
52 597 effects of 17 α -ethinylestradiol, 17 β -estradiol and 4-nonylphenol on insulin-like growth-factor
53 598 binding proteins (igfbps) in Atlantic salmon. *Aquatic Toxicology* 203, 28–39.
54 599 <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2018.07.018>
- 55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

- 1
2
3
4 600 Chan, C.Y., Tran, N., Pethiyagoda, S., Crissman, C.C., Sulser, T.B., Phillips, M.J., 2019. Prospects
5 601 and challenges of fish for food security in Africa. *Global Food Security* 20, 17–25.
6 602 <https://doi.org/10.1016/j.gfs.2018.12.002>
- 7 603 Chen, J., Saili, K.S., Liu, Y., Li, L., Zhao, Y., Jia, Y., Bai, C., Tanguay, R.L., Dong, Q., Huang,
8 604 C., 2017. Developmental bisphenol A exposure impairs sperm function and reproduction in
9 605 zebrafish. *Chemosphere* 169, 262–270. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2016.11.089>
- 10 606 Choudhury, M.G., Saha, N., 2016. Induction of Inducible Nitric Oxide Synthase by
11 607 Lipopolysaccharide and the Influences of Cell Volume Changes, Stress Hormones and
12 608 Oxidative Stress on Nitric Oxide Efflux from the Perfused Liver of Air-Breathing Catfish,
13 609 *Heteropneustes fossilis*. *PLoS ONE* 11, e0150469.
14 610 <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0150469>
- 15 611 Chu, L., Li, J., Liu, Y., Cheng, C.H.K., 2015. Gonadotropin Signaling in Zebrafish Ovary and
16 612 Testis Development: Insights From Gene Knockout Study. *Molecular Endocrinology* 29,
17 613 1743–1758. <https://doi.org/10.1210/me.2015-1126>
- 18 614 Comunidade Européia. Parlamento Europeu. Conselho da União Europeia. Directiva 2008/105/CE
19 615 de 16 de Dezembro de 2008, relativa a normas de qualidade ambiental no domínio da política
20 616 da água.
- 21 617 CONAMA 357, 2005. Classificação de águas, doces, salobras e salinas do Território Nacional.
- 22 618 Delsouc, M.B., Della Vedova, M.C., Ramírez, D., Delgado, S.M., Casais, M., 2018. The
23 619 production of nitric oxide in the coeliac ganglion modulates the effect of cholinergic
24 620 neurotransmission on the rat ovary during the preovulatory period. *Nitric Oxide* 75, 85–94.
25 621 <https://doi.org/10.1016/j.niox.2018.02.010>
- 26 622 Food and Agriculture Organization of the United Nations, 2020. The State of World Fisheries and
27 623 Aquaculture 2020. <https://doi.org/10.4060/ca9229en>
- 28 624 Forstermann, U., Sessa, W.C., 2012. Nitric oxide synthases: regulation and function. *European*
29 625 *Heart Journal* 33, 829–837. <https://doi.org/10.1093/eurheartj/ehr304>
- 30 626 França, L.R., Nóbrega, R.H., Morais, R.D.V.S., De Castro Assis, L.H., Schulz, R.W., 2015. Sertoli
31 627 cell structure and function in anamniote vertebrates, in: *Sertoli Cell Biology*. Elsevier, pp.
32 628 385–407. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-417047-6.00013-2>
- 33 629 Gallego, V., Asturiano, J.F., 2019. Fish sperm motility assessment as a tool for aquaculture
34 630 research: a historical approach. *Rev Aquacult* 11, 697–724. <https://doi.org/10.1111/raq.12253>
- 35 631 Gárriz, Á., Menéndez-Helman, R.J., Miranda, L.A., 2015. Effects of estradiol and ethinylestradiol
36 632 on sperm quality, fertilization, and embryo–larval survival of pejerrey fish (*Odontesthes*
37 633 *bonariensis*). *Aquatic Toxicology* 167, 191–199.
38 634 <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2015.08.011>
- 39 635 Giari, L., Vincenzi, F., Badini, S., Guerranti, C., Dezfuli, B.S., Fano, E.A., Castaldelli, G., 2016.
40 636 Common carp *Cyprinus carpio* responses to sub-chronic exposure to perfluorooctanoic acid.
41 637 *Environ Sci Pollut Res* 23, 15321–15330. <https://doi.org/10.1007/s11356-016-6706-1>
- 42 638 Grazul-Bilska, A.T., Navanukraw, C., Johnson, M.L., Arnold, D.A., Reynolds, L.P., Redmer,
43 639 D.A., 2006. Expression of endothelial nitric oxide synthase in the ovine ovary throughout the
44 640 estrous cycle. *Reproduction* 132, 579–587. <https://doi.org/10.1530/REP-06-0009>
- 45 641 Hatef, A., Alavi, S.M.H., Abdulfatah, A., Fontaine, P., Rodina, M., Linhart, O., 2012. Adverse
46 642 effects of bisphenol A on reproductive physiology in male goldfish at environmentally
47 643 relevant concentrations. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 76, 56–62.
48 644 <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2011.09.021>
- 49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

- 1
2
3
4 645 Hatef, A., Alavi, S.M.H., Golshan, M., Linhart, O., 2013. Toxicity of environmental contaminants
5 646 to fish spermatozoa function in vitro—A review. *Aquatic Toxicology* 140–141, 134–144.
6 647 <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2013.05.016>
- 8 648 Hinfrey, N., Nóbrega, R.H., Caulier, M., Baudiffier, D., Maillot-Maréchal, E., Chadili, E., Palluel,
9 649 O., Porcher, J.-M., Schulz, R., Brion, F., 2013. Cyp17a1 and Cyp19a1 in the zebrafish testis
10 650 are differentially affected by oestradiol. *Journal of Endocrinology* 216, 375–388.
11 651 <https://doi.org/10.1530/JOE-12-0509>
- 13 652 Jackson, L.M., Klerks, P.L., 2019. Impact of Long-Term Exposure to 17 α -Ethinylestradiol in the
14 653 Live-Bearing Fish *Heterandria formosa*. *Arch Environ Contam Toxicol* 77, 51–61.
15 654 <https://doi.org/10.1007/s00244-019-00600-5>
- 16 655 Kabir, E.R., Rahman, M.S., Rahman, I., 2015. A review on endocrine disruptors and their possible
17 656 impacts on human health. *Environmental Toxicology and Pharmacology* 40, 241–258.
18 657 <https://doi.org/10.1016/j.etap.2015.06.009>
- 20 658 Kazeto, Y., Place, A.R., Trant, J.M., 2004. Effects of endocrine disrupting chemicals on the
21 659 expression of CYP19 genes in zebrafish (*Danio rerio*) juveniles. *Aquatic Toxicology* 69, 25–
22 660 34. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2004.04.008>
- 24 661 Kidd, K.A., Blanchfield, P.J., Mills, K.H., Palace, V.P., Evans, R.E., Lazorchak, J.M., Flick, R.W.,
25 662 2007. Collapse of a fish population after exposure to a synthetic estrogen. *Proceedings of the*
26 663 *National Academy of Sciences* 104, 8897–8901. <https://doi.org/10.1073/pnas.0609568104>
- 27 664 La Merrill, M.A., Vandenberg, L.N., Smith, M.T., Goodson, W., Browne, P., Patisaul, H.B.,
28 665 Guyton, K.Z., Kortenkamp, A., Cogliano, V.J., Woodruff, T.J., Rieswijk, L., Sone, H.,
29 666 Korach, K.S., Gore, A.C., Zeise, L., Zoeller, R.T., 2020. Consensus on the key characteristics
30 667 of endocrine-disrupting chemicals as a basis for hazard identification. *Nat Rev Endocrinol* 16,
31 668 45–57. <https://doi.org/10.1038/s41574-019-0273-8>
- 33 669 Lafrance, P., Caron, E., 2013. Impact of recent manure applications on natural estrogen
34 670 concentrations in streams near agricultural fields. *Environmental Research* 126, 208–210.
35 671 <https://doi.org/10.1016/j.envres.2013.05.008>
- 37 672 Lal, B., Dubey, N., 2013. Existence of a nitric oxide synthase/nitric oxide system in fish testis and
38 673 its role in modulation of androgenesis. *Fish Physiol Biochem* 39, 65–69.
39 674 <https://doi.org/10.1007/s10695-012-9648-7>
- 41 675 Larsen, M.G., Bilberg, K., Baatrup, E., 2009. Reversibility of estrogenic sex changes in zebrafish
42 676 (*Danio rerio*). *Environ Toxicol Chem* 28, 1783. <https://doi.org/10.1897/08-563.1>
- 43 677 Li, M., Liu, X., Dai, S., Xiao, H., Qi, S., Li, Y., Zheng, Q., Jie, M., Cheng, C.H.K., Wang, D.,
44 678 2020. Regulation of spermatogenesis and reproductive capacity by Igf3 in tilapia. *Cell. Mol.*
45 679 *Life Sci.* 77, 4921–4938. <https://doi.org/10.1007/s00018-019-03439-0>
- 47 680 Liu, C., Duan, W., Li, R., Xu, S., Zhang, L., Chen, C., He, M., Lu, Y., Wu, H., Pi, H., Luo, X.,
48 681 Zhang, Y., Zhong, M., Yu, Z., Zhou, Z., 2013. Exposure to bisphenol A disrupts meiotic
49 682 progression during spermatogenesis in adult rats through estrogen-like activity. *Cell Death*
50 683 *Dis* 4, e676–e676. <https://doi.org/10.1038/cddis.2013.203>
- 52 684 Mikkelsen, R.B., Wardman, P., 2003. Biological chemistry of reactive oxygen and nitrogen and
53 685 radiation-induced signal transduction mechanisms. *Oncogene* 22, 5734–5754.
54 686 <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1206663>
- 55 687 Moreira, D.P., Melo, R.M.C., Weber, A.A., Rizzo, E., 2020. Insulin-like growth factors 1 and 2
56 688 are associated with testicular germ cell proliferation and apoptosis during fish reproduction.
57 689 *Reprod. Fertil. Dev.* 32, 988. <https://doi.org/10.1071/RD20128>
- 59
60
61
62
63
64
65

- 1
2
3
4 690 Murata, M., Kang, J.-H., 2018. Bisphenol A (BPA) and cell signaling pathways. *Biotechnology*
5 691 *Advances* 36, 311–327. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2017.12.002>
6 692 Nadal, A., Fuentes, E., Ripoll, C., Villar-Pazos, S., Castellano-Muñoz, M., Soriano, S., Martinez-
7 693 Pinna, J., Quesada, I., Alonso-Magdalena, P., 2018. Extranuclear-initiated estrogenic actions
8 694 of endocrine disrupting chemicals: Is there toxicology beyond paracelsus? *The Journal of*
9 695 *Steroid Biochemistry and Molecular Biology* 176, 16–22.
10 696 <https://doi.org/10.1016/j.jsbmb.2017.01.014>
11 697 Neirijnck, Papaioannou, Nef, 2019. The Insulin/IGF System in Mammalian Sexual Development
12 698 and Reproduction. *IJMS* 20, 4440. <https://doi.org/10.3390/ijms20184440>
13 699 Nevzati, E., Shafighi, M., Bakhtian, K.D., Treiber, H., Fandino, J., Fathi, A.R., 2015. Estrogen
14 700 Induces Nitric Oxide Production Via Nitric Oxide Synthase Activation in Endothelial Cells,
15 701 in: Fandino, J., Marbacher, S., Fathi, A.-R., Muroi, C., Keller, E. (Eds.), *Neurovascular Events*
16 702 *After Subarachnoid Hemorrhage*. Springer International Publishing, Cham, pp. 141–145.
17 703 https://doi.org/10.1007/978-3-319-04981-6_24
18 704 Nóbrega, R.H., Morais, R.D.V. de S., Crespo, D., de Waal, P.P., de França, L.R., Schulz, R.W.,
19 705 Bogerd, J., 2015. Fsh Stimulates Spermatogonial Proliferation and Differentiation in
20 706 Zebrafish via Igf3. *Endocrinology* 156, 3804–3817. <https://doi.org/10.1210/en.2015-1157>
21 707 Paschoalini, A.L., Savassi, L.A., Weber, A.A., Moreira, D.P., Ribeiro, Y.M., Rizzo, E., Bazzoli,
22 708 N., 2021. Evaluation of the oestrogenic potential of oestrone and bisphenol-A on the
23 709 reproduction of *Astyanax bimaculatus* males after subacute exposure. *Fish Physiol Biochem*
24 710 47, 797–810. <https://doi.org/10.1007/s10695-021-00938-5>
25 711 Pillerová, M., Borbélyová, V., Hodosy, J., Riljak, V., Renczés, E., Frick, K.M., Tóthová, L., 2021.
26 712 On the role of sex steroids in biological functions by classical and non-classical pathways. An
27 713 update. *Frontiers in Neuroendocrinology* 62, 100926.
28 714 <https://doi.org/10.1016/j.yfrne.2021.100926>
29 715 Prado, P.S., Pinheiro, A.P.B., Bazzoli, N., Rizzo, E., 2014. Reproductive biomarkers responses
30 716 induced by xenoestrogens in the characid fish *Astyanax fasciatus* inhabiting a South American
31 717 reservoir: An integrated field and laboratory approach. *Environmental Research* 131, 165–
32 718 173. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2014.03.002>
33 719 Ray, P., Zhao, Z., Knowlton, K.F., 2013. Emerging contaminants in livestock manure: hormones,
34 720 antibiotics and antibiotic resistance genes., in: Kebreab, E. (Ed.), *Sustainable Animal*
35 721 *Agriculture*. CABI, Wallingford, pp. 268–283. <https://doi.org/10.1079/9781780640426.0268>
36 722 Reinecke, M., 2010. Insulin-like Growth Factors and Fish Reproduction. *Biology of Reproduction*
37 723 82, 656–661. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.109.080093>
38 724 Ribeiro, Y.M., Weber, A.A., Paschoalini, A.L., Moreira, D.P., Sales, C.F., Almeida, T.V.P. de,
39 725 Neres, M.A., Bazzoli, N., Rizzo, E., 2021. Biomarker responses induced by bisphenol A on
40 726 spermatogenesis in a Neotropical teleost fish are temperature-dependent. *Ecotoxicology and*
41 727 *Environmental Safety* 224, 112670. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2021.112670>
42 728 Rutherford, R., Lister, A., Bosker, T., Blewett, T., Gillio Meina, E., Chehade, I., Kanagasabesan,
43 729 T., MacLatchy, D., 2020. Mummichog (*Fundulus heteroclitus*) are less sensitive to 17 α -
44 730 ethinylestradiol (EE2) than other common model teleosts: A comparative review of
45 731 reproductive effects. *General and Comparative Endocrinology* 289, 113378.
46 732 <https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2019.113378>
47 733 Sabeti, P., Pourmasumi, S., Rahiminia, T., Akyash, F., Talebi, A.R., 2016. Etiologies of sperm
48 734 oxidative stress. *Int J Reprod Biomed* 14, 231–240.
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

- 1
2
3
4 735 Schlueter, P.J., Peng, G., Westerfield, M., Duan, C., 2007. Insulin-like growth factor signaling
5 736 regulates zebrafish embryonic growth and development by promoting cell survival and cell
6 737 cycle progression. *Cell Death Differ* 14, 1095–1105. <https://doi.org/10.1038/sj.cdd.4402109>
8 738 Schulster, M., Bernie, A., Ramasamy, R., 2016. The role of estradiol in male reproductive function.
9 739 *Asian J Androl* 18, 435. <https://doi.org/10.4103/1008-682X.173932>
10 740 Schulz, R.W., de França, L.R., Lareyre, J.-J., LeGac, F., Chiarini-Garcia, H., Nobrega, R.H.,
11 741 Miura, T., 2010. Spermatogenesis in fish. *General and Comparative Endocrinology* 165, 390–
12 742 411. <https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2009.02.013>
14 743 Shved, N., Berishvili, G., Baroiller, J.-F., Segner, H., Reinecke, M., 2008. Environmentally
15 744 Relevant Concentrations of 17 α -Ethinylestradiol (EE2) Interfere With the Growth Hormone
16 745 (GH)/Insulin-Like Growth Factor (IGF)-I System in Developing Bony Fish. *Toxicological*
17 746 *Sciences* 106, 93–102. <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfn150>
19 747 Singh, V.K., Lal, B., 2017. Nitric oxide (NO) stimulates steroidogenesis and folliculogenesis in
20 748 fish. *Reproduction* 153, 133–146. <https://doi.org/10.1530/REP-16-0482>
21 749 Stockley, P., Gage, M.J.G., Parker, G.A., Møller, A.P., 1997. Sperm Competition in Fishes: The
22 750 Evolution of Testis Size and Ejaculate Characteristics. *The American Naturalist* 149, 933–
23 751 954. <https://doi.org/10.1086/286031>
25 752 Turner, T.T., Lysiak, J.J., 2008. Oxidative Stress: A Common Factor in Testicular Dysfunction.
26 753 *Journal of Andrology* 29, 488–498. <https://doi.org/10.2164/jandrol.108.005132>
27 754 Uribe, M.C., Grier, H.J., Mejía-Roa, V., 2014. Comparative testicular structure and
28 755 spermatogenesis in bony fishes. *Spermatogenesis* 4, e983400.
29 756 <https://doi.org/10.4161/21565562.2014.983400>
31 757 USEPA, 2002. National Recommended Water Quality Criteria: 2002.
32 758 Vo, D.-K.H., Hartig, R., Weinert, S., Haybaeck, J., Nass, N., 2019. G-Protein-Coupled Estrogen
33 759 Receptor (GPER)-Specific Agonist G1 Induces ER Stress Leading to Cell Death in MCF-7
34 760 Cells. *Biomolecules* 9, 503. <https://doi.org/10.3390/biom9090503>
36 761 Wang, Y., Wang, Q., Hu, L., Lu, G., Li, Y., 2015. Occurrence of estrogens in water, sediment and
37 762 biota and their ecological risk in Northern Taihu Lake in China. *Environ Geochem Health* 37,
38 763 147–156. <https://doi.org/10.1007/s10653-014-9637-0>
39 764 Weber, A.A., Moreira, D.P., Melo, R.M.C., Ribeiro, Y.M., Bazzoli, N., Rizzo, E., 2019.
40 765 Environmental exposure to oestrogenic endocrine disruptors mixtures reflecting on gonadal
41 766 sex steroids and gametogenesis of the neotropical fish *Astyanax rivularis*. *General and*
42 767 *Comparative Endocrinology* 279, 99–108. <https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2018.12.016>
44 768 Weber, A.A., Moreira, D.P., Melo, R.M.C., Vieira, A.B.C., Prado, P.S., da Silva, M.A.N., Bazzoli,
45 769 N., Rizzo, E., 2017. Reproductive effects of oestrogenic endocrine disrupting chemicals in
46 770 *Astyanax rivularis* inhabiting headwaters of the Velhas River, Brazil. *Science of The Total*
47 771 *Environment* 592, 693–703. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.02.181>
49 772 Werner, H., Adamo, M., Roberts, C.T., Eroith, D.L., 1994. Molecular and Cellular Aspects of
50 773 Insulin-like Growth Factor Action, in: *Vitamins & Hormones*. Elsevier, pp. 1–58.
51 774 [https://doi.org/10.1016/S0083-6729\(08\)60495-1](https://doi.org/10.1016/S0083-6729(08)60495-1)
53 775 Xia, Y., Krukoff, T.L., 2004. Estrogen Induces Nitric Oxide Production via Activation of
54 776 Constitutive Nitric Oxide Synthases in Human Neuroblastoma Cells. *Endocrinology* 145,
55 777 4550–4557. <https://doi.org/10.1210/en.2004-0327>
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65





UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

 CEUA
 COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS
CERTIFICADO

Certificamos que o projeto intitulado "Efeito de desreguladores endócrinos na reprodução de peixes de água doce", protocolo do CEUA: 115/2020 sob a responsabilidade de Elizete Rizzo que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem) para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899 de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS, em reunião de 03/08/2020.

Vigência da Autorização	03/08/2020 a 02/08/2025
Finalidade	Pesquisa
*Espécie/linhagem	Peixe / Danio rerio
Nº de animais	16
Peso/Idade	5g / 90(dias)
Sexo	indiferente
Origem	Ecofish aquários e lagos EIRELI
*Espécie/linhagem	Peixe / Danio rerio
Nº de animais	16
Peso/Idade	5g / 90(dias)
Sexo	indiferente
Origem	Ecofish aquários e lagos EIRELI
*Espécie/linhagem	Peixe / Danio rerio
Nº de animais	16
Peso/Idade	5g / 90(dias)
Sexo	indiferente
Origem	Ecofish aquários e lagos EIRELI
*Espécie/linhagem	Peixe / Danio rerio
Nº de animais	16
Peso/Idade	5g / 90(dias)
Sexo	indiferente
Origem	Ecofish aquários e lagos EIRELI
*Espécie/linhagem	Peixe / Danio rerio
Nº de animais	16
Peso/Idade	5g / 90(dias)

Sexo	indiferente
Origem	Ecofish aquários e lagos EIRELI
*Espécie/linhagem	Peixe / Danio rerio
Nº de animais	16
Peso/Idade	5g / 90(dias)
Sexo	indiferente
Origem	Ecofish aquários e lagos EIRELI
*Espécie/linhagem	Peixe / Danio rerio
Nº de animais	16
Peso/Idade	5g / 90(dias)
Sexo	indiferente
Origem	Ecofish aquários e lagos EIRELI
*Espécie/linhagem	Peixe / Danio rerio
Nº de animais	16
Peso/Idade	5g / 90(dias)
Sexo	indiferente
Origem	F0 Controle
*Espécie/linhagem	Peixe / Danio rerio
Nº de animais	16
Peso/Idade	5g / 90(dias)
Sexo	indiferente
Origem	F0 ACE
*Espécie/linhagem	Peixe / Danio rerio
Nº de animais	16
Peso/Idade	5g / 90(dias)
Sexo	indiferente
Origem	F0 BPA
*Espécie/linhagem	Peixe / Danio rerio
Nº de animais	16
Peso/Idade	5g / 90(dias)
Sexo	indiferente
Origem	F0 E1
*Espécie/linhagem	Peixe / Danio rerio
Nº de animais	16
Peso/Idade	5g / 90(dias)
Sexo	indiferente
Origem	F0 Controle - Duplicata
*Espécie/linhagem	Peixe / Danio rerio
Nº de animais	16
Peso/Idade	5g / 90(dias)
Sexo	indiferente
Origem	F0 ACE - Duplicata
*Espécie/linhagem	Peixe / Danio rerio
Nº de animais	16
Peso/Idade	5g / 90(dias)
Sexo	indiferente
Origem	F0 BPA - Duplicata

*Espécie/linhagem	Peixe / Danio rerio
Nº de animais	16
Peso/Idade	5g / 90(dias)
Sexo	indiferente
Origem	F0 E1 - Duplicata
*Espécie/linhagem	Peixe / Danio rerio
Nº de animais	16
Peso/Idade	1g / 1(dias)
Sexo	indiferente
Origem	F1 Controle
*Espécie/linhagem	Peixe / Danio rerio
Nº de animais	16
Peso/Idade	1g / 1(dias)
Sexo	indiferente
Origem	F1 ACE
*Espécie/linhagem	Peixe / Danio rerio
Nº de animais	16
Peso/Idade	1g / 1(dias)
Sexo	indiferente
Origem	F1 BPA
*Espécie/linhagem	Peixe / Danio rerio
Nº de animais	16
Peso/Idade	1g / 1(dias)
Sexo	indiferente
Origem	F1 E1
*Espécie/linhagem	Peixe / Danio rerio
Nº de animais	16
Peso/Idade	1g / 1(dias)
Sexo	indiferente
Origem	F1 Controle - Duplicata
*Espécie/linhagem	Peixe / Danio rerio
Nº de animais	16
Peso/Idade	1g / 1(dias)
Sexo	indiferente
Origem	F1 ACE - Duplicata
*Espécie/linhagem	Peixe / Danio rerio
Nº de animais	16
Peso/Idade	1g / 1(dias)
Sexo	indiferente
Origem	F1 BPA - Duplicata
*Espécie/linhagem	Peixe / Danio rerio
Nº de animais	16
Peso/Idade	1g / 1(dias)
Sexo	indiferente
Origem	F1 E1 - Duplicata

Considerações posteriores:

03/08/2020

Aprovado na reunião "on line" do dia 03/08/2020.
Validade: 03/08/2020 à 02/08/2025.

Belo Horizonte, 17/09/2021.

Atenciosamente,

Sistema Solicite CEUA UFMG

https://aplicativos.ufmg.br/solicite_ceua/

Universidade Federal de Minas Gerais
Avenida Antônio Carlos, 6627 – Campus Pampulha
Unidade Administrativa II – 2º Andar, Sala 2005
31270-901 – Belo Horizonte, MG – Brasil
Telefone: (31) 3409-4516
www.ufmg.br/bioetica/ceua - cetea@prpq.ufmg.br

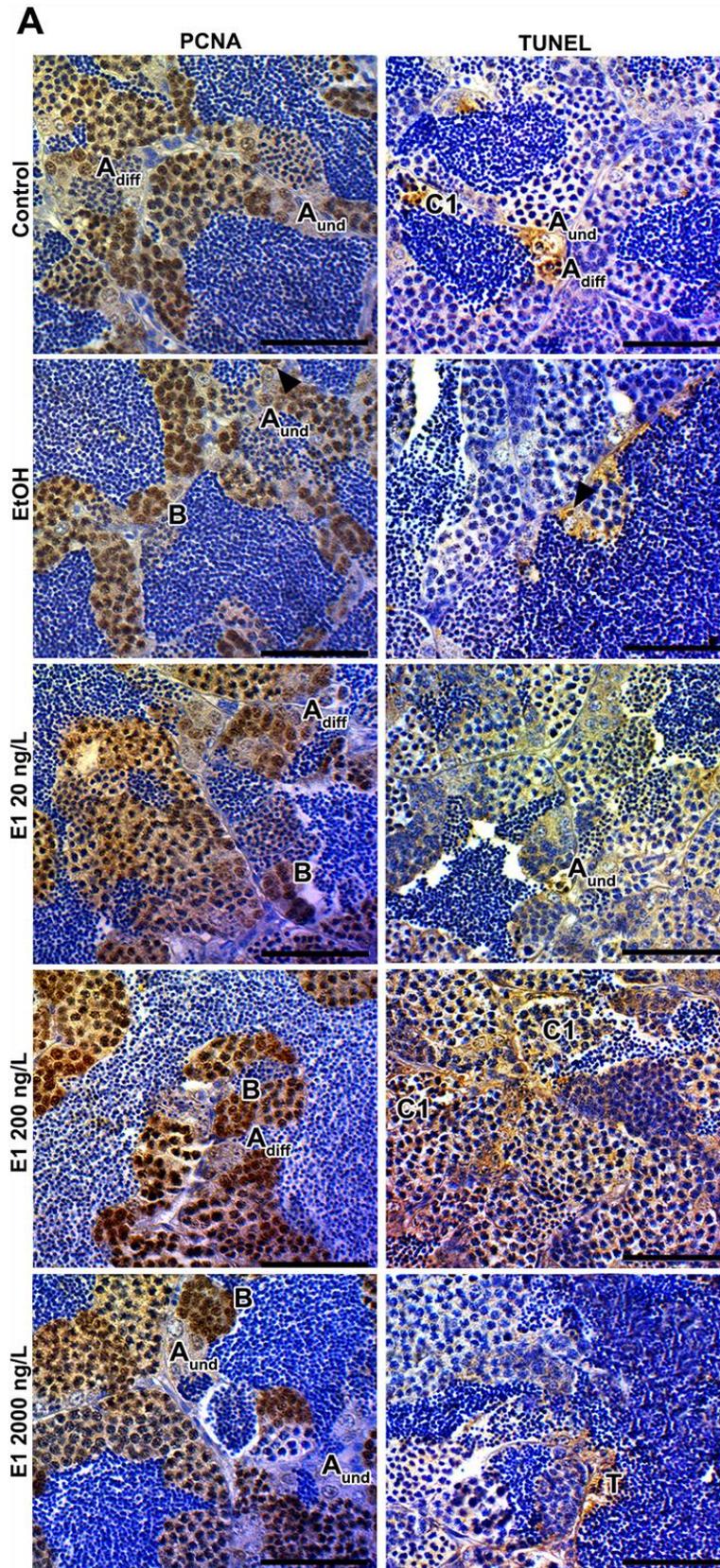


Fig. S1. Immunohistochemistry for PCNA and TUNEL reaction: Type A undifferentiated spermatogonia (A_{und}), type A differentiated spermatogonia (A_{diff}), type B spermatogonia (B), primary spermatocytes (C1), secondary spermatocytes (C2), spermatids (T), Sertoli (arrowhead). Scale bar: 50 μ m.

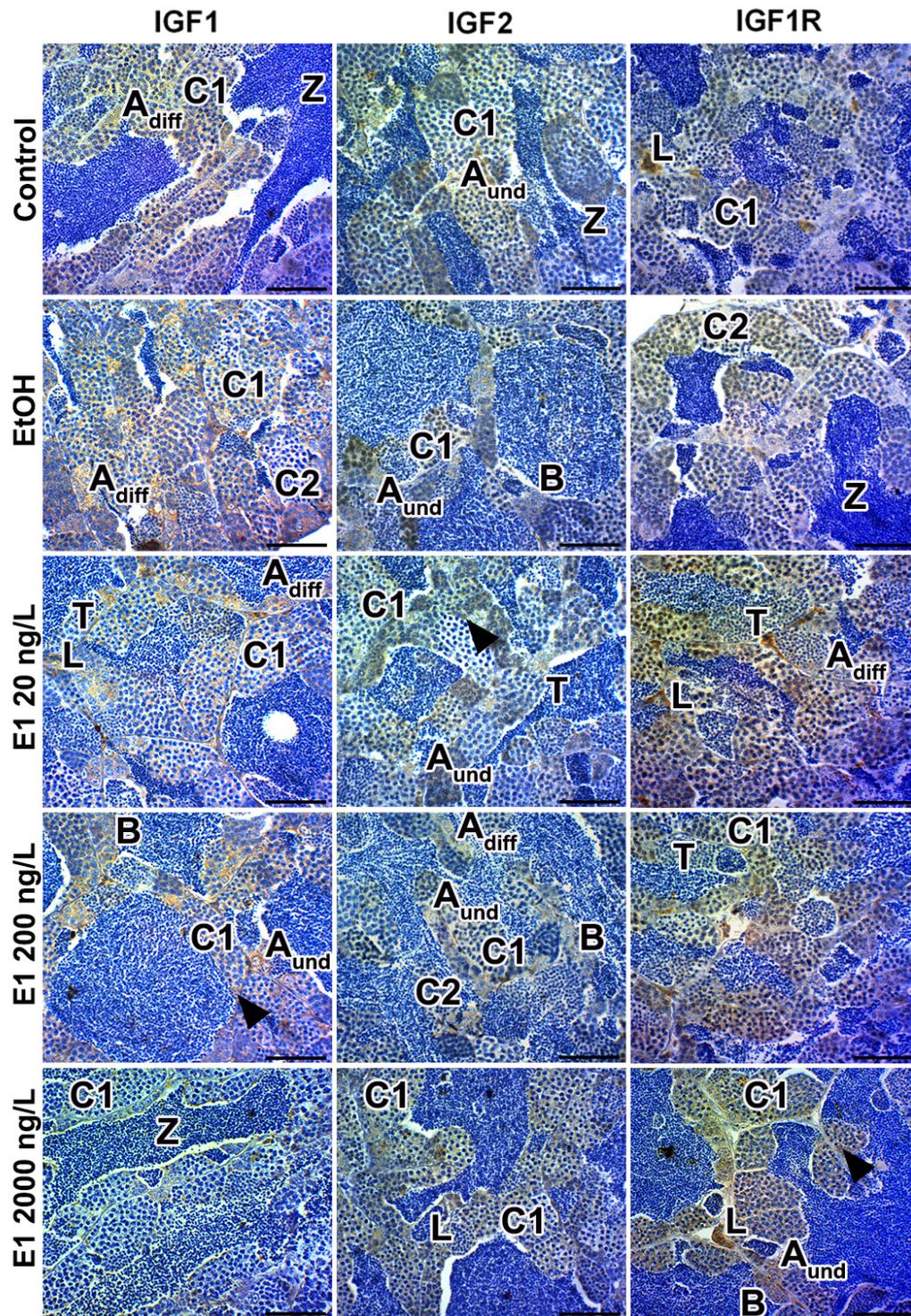


Fig. S2. Immunohistochemistry for IGF1, IGF2 and IGF1R in testis from *Danio rerio*. Type A undifferentiated spermatogonia (A_{und}), type A differentiated spermatogonia (A_{diff}), type B spermatogonia (B), primary spermatocytes (C1), secondary spermatocytes (C2), spermatids (T), spermatozoa (Z) and Sertoli cells (arrowhead). Scale bar: 50 μ m.

3.2. Artigo 2

Efeitos da exposição crônica a estrona na ovogênese e desova do zebrafish (*Danio rerio*)

Yves Moreira Ribeiro^a, Davidson Peruci Moreira^a, Elizete Rizzo^{a*}

^aDepartamento de Morfologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, UFMG, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil.

***Autor correspondente:** E-mail: ictio@icb.ufmg.br (Rizzo E)

Resumo

A estrona é um dos principais estrógenos que atua no sistema reprodutor de vertebrados. Apesar disso esse hormônio contamina os corpos d'água a partir da lixiviação das excretas de animais de criação. No presente trabalho, analisamos os efeitos da exposição a estrona em concentrações ambientalmente relevantes na ovogênese do zebrafish (*Danio rerio*). Para isto, após a exposição a estrona nas concentrações de 20, 200 e 2000 ng/L por 49 dias, a ovogênese do zebrafish foi analisada por meio de análises morfométricas e moleculares. Foram analisadas a proporção (%) de componentes teciduais, dosagem de 11-ketotestosterona e estradiol, proliferação e morte celular, expressão de IGF1, IGF2, IGF1R e iNOS e avaliada a produção de óxido nítrico nos ovários. Os resultados mostraram que a exposição a estrona foi responsável por alterar a proporção das células germinativas e componentes somáticos nos ovários. Esses efeitos foram causados por alterações na via de sinalização dos IGFs, desbalanço da produção de 17 β -estradiol e aumento da produção de óxido nítrico. Como consequência, a produção de ovos foi reduzida em todos os grupos expostos a estrona e a taxa de fertilização foi significativamente menor nos grupos de 200 e 2000 ng/L de estrona. Os resultados do presente estudo indicam que a estrona exerce efeitos deletérios sobre os ovários, afetando a gametogênese e reprodução dos peixes mesmo nas concentrações encontradas no ambiente aquático, e suas concentrações nas águas superficiais devem ser monitoradas visando a conservação dos peixes.

Palavras-chave: Toxicologia reprodutiva. Desregulação endócrina. Estrógenos ambientais. IGF. Óxido nítrico.

1. Introdução

A exposição dos vertebrados aos estrógenos ambientais compromete a atividade reprodutiva deste grupo de organismos ao causar alterações na expressão gênica gonadal, na produção de esteroides sexuais e redução ou perda da capacidade de gerar descendentes (Nadal et al., 2018; Adeel et al., 2017). Após serem absorvidos, os estrógenos se ligam aos receptores de estrógeno alfa e beta ($ER\alpha/\beta$) ou aos receptores de estrógenos acoplados a proteína G (GPER) (Pillerová et al., 2021; Vo et al., 2019), e afetam vias de sinalização celular ao alterar a produção, metabolismo e excreção de diversos hormônios (La Merrill et al., 2020; Kabir et al., 2015), sendo deste modo considerados desreguladores endócrinos. Considerando que os receptores de estrógeno são expressos em vários tecidos e órgãos dos vertebrados (Frank et al., 2014; Sánchez-Criado et al., 2004; Hess, 2003), a absorção de estrógenos pode comprometer diversos processos fisiológicos, dentre os quais podemos destacar o reprodutivo (Nelson & Habibi, 2013, Adeel et al., 2017). Estudos recentes demonstraram que a gametogênese e reprodução dos peixes é comprometida após a exposição a estrógenos naturais e sintéticos (Pinto et al., 2014). A exposição a esses compostos é responsável por reduzir a fecundidade e fertilidade (Jackson e Klerks, 2019), alterar a diferenciação sexual (Larsen et al., 2009) e a produção de esteróides sexuais nos peixes (Rutherford et al., 2020).

Nas fêmeas de peixes, o início de cada ciclo reprodutivo é marcado por várias divisões mitóticas das ovogônias, células tronco bipotenciais do epitélio germinativo ovariano (Quagio-Grassiotto et al., 2011). Após essa fase proliferativa, as ovogônias entram em meiose e se diferenciam em ovócitos (Quagio-Grassiotto et al., 2011). Durante a progressão da meiose, na fase cromatina nucléolo, os ovócitos estacionam na fase diplóteno da prófase I e após isso se individualizam e junto das células da granulosa constituem o folículo ovariano (Quagio-Grassiotto et al., 2013). Em seguida, ocorre a produção hepática de vitelogenina e coreogenina estimulada pelo estradiol, que são acumuladas nos ovócitos, sendo precursores do vitelo e das proteínas da zona radiata, respectivamente (Lubzens et al., 2010). As gonadotrofinas produzidas pela pituitária e os esteróides sexuais controlam a ovogênese, o crescimento e a maturação dos folículos ovarianos (Borella et al., 2020; Chu et al., 2015).

Além destes hormônios, diversas outras moléculas podem influenciar a gametogênese e a desova das fêmeas, dentre eles os fatores de crescimento relacionados a insulina (IGFs) e o óxido nítrico (NO) (Breves et al., 2018; Prado et al., 2014; Reinecke, 2010; Shved, 2008). Os IGFs desempenham um importante papel na gametogênese e reprodução dos vertebrados, devido a sua ação parácrina/autócrina nos ovários e testículos (Neirijnck et al., 2019). Nas fêmeas de peixes os IGFs são expressos nas células da granulosa, da teca e nos ovócitos (Reinecke, 2010). Tanto o IGF1 como o 2 podem induzir a retomada da meiose e a quebra da vesícula germinativa dos ovócitos, bem como responder a 17,20 β -dihidroxi-4-pregnen-3-ona (DHP) (Reinecke, 2010). O NO está envolvido com processos ligados gametogênese e maturação ovariana em peixes, como a foliculogênese e produção de esteróides sexuais (Singh & Lal, 2017). O NO é um mediador molecular produzido pela ação das óxido nítrico sintases (NOS) e pode ter sua produção induzida devido a estimulação estrogênica nos tecidos (Choudhury & Saha, 2016; Nevzati et al., 2015). Apesar de seu papel fisiológico, a elevação da produção local de compostos derivados do NO pode impactar negativamente o funcionamento de diversos tecidos ao causar danos ao DNA e oxidação de proteínas e lipídeos (Forstermann & Sessa, 2012; Mikkelsen & Wardman, 2003). Os efeitos negativos do NO são mediados principalmente pelo peroxinitrito (ONOO-), composto altamente oxidante, originado da reação do NO com o ânion superóxido (O₂⁻) (Luo et al., 2021).

A contaminação dos rios e lagos por estrógenos ambientais como a estrona (E1), 17 β -estradiol (E2) e o estriol (E3) oriundos de atividades como a pecuária e efluentes das estações de tratamento de esgoto ameaça a reprodução dos peixes e conseqüentemente a sustentabilidade de suas populações no meio ambiente (Adeel et al., 2017; Andaluri et al., 2012). Embora, a E1 seja menos potente em relação os efeitos estrogênicos quando comparada com outros estrógenos ambientais, esse composto pode ser um importante desregulador endócrino, devido a capacidade de ser prontamente convertida pelos tecidos dos vertebrados em E2 pela enzima 17 β -hidroxisteroide desidrogenase (17 β -HSD) (Goldstone et al., 2016; Tokarz et al., 2015). Considerando em particular a E1, que é encontrada nos ambientes aquáticos em concentrações que podem variar de 0,1 até 256,66 ng/L nas Américas e Europa (Weber et al., 2017; Petrie et al., 2015; Kolpin et al., 2002), poucos estudos avaliaram seus efeitos deste estrógeno ambiental na ovogênese e desova dos peixes. Deste modo, o objetivo do presente trabalho foi avaliar os efeitos da exposição a E1

em concentrações ambientalmente relevantes na ovogênese e desova do zebrafish (*Danio rerio*). Os limites máximos para a E1 e outros estrógenos ambientais como o E2 e E3 nos ambientes aquáticos, ainda não foram definidos pelas leis ambientais na América do Norte e Sul (CONAMA, 2005; USEPA, 2002).

2. Materiais e métodos

2.1. Delineamento experimental

Para realização do estudo, foram utilizados 300 exemplares adultos do zebrafish *Danio rerio* (*wild-type*), com 120 dias de vida, provenientes de um distribuidor local. Os animais foram manuseados de acordo com o Guia para Experimentação Animal estabelecido pelo Colégio Brasileiro para Experimentação Animal (COBEA) e o projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética e Uso de Animais da Universidade Federal de Minas Gerais (protocolo CEUA 115/2020).

Os peixes foram aclimatados durante 15 dias em 2 tanques de 120 L em temperatura entre 26 e 28°C, fotoperíodo 12L:12E, filtro biológico, aeradores e foram alimentados duas vezes por dia com dieta comercial (Tetramin flakes, Germany). Em seguida, os peixes foram sexados com base em características morfológicas externas e transferidos para 10 aquários de 25 L na proporção macho/fêmea de 1:1. Durante a exposição, os filtros biológicos foram removidos e foram realizadas trocas de 80% da água dos aquários a cada 2 dias, para manter a amônia, o pH e o oxigênio dissolvido em condições aceitáveis para os animais. Ao final da aclimação, os animais foram expostos durante 7 semanas (49 dias) a estrona (E1, Sigma-Aldrich, USA) solubilizada em etanol absoluto 0.001% (v/v). Os peixes foram divididos em 5 tratamentos e a exposição foi realizada em duplicata (2 aquários/tratamento). Os grupos tratados com estrona foram: E1 20 ng/L, E1 200 ng/L e E1 2000 ng/L. As concentrações de 20 e 200 ng/L são ambientalmente relevantes e foram detectadas nas águas superficiais (Weber et al., 2017; Wang et al., 2015), e a concentração de 2000 ng/L é artificialmente alta. Somente água foi utilizada no grupo controle. No grupo EtOH foi adicionado etanol absoluto na mesma concentração utilizada nos grupos expostos a estrona (0.001% v/v). Considerando a meia vida da estrona na água de 3 a 4 dias (Adeel et al., 2017), e para manter as concentrações de amônia controladas, foi realizada renovação de 80% da água dos aquários a cada 2 dias junto da reaplicação da estrona nos grupos tratados. As trocas de água também

foram realizadas nos grupos controle e o etanol absoluto reaplicado no grupo EtOH. De cada fêmea, os dados biométricos foram obtidos comprimento total (CT), peso corporal (PC) e peso gonadal (PG), e os índices gonadossomático ($IGS=100 PG/PC$) e fator de condição de Fulton ($K=100 PC/CT^3$) foram calculados.

Os parâmetros de qualidade da água foram monitorados semanalmente utilizando termômetro e kits comerciais (LabconTest, Brasil) (Tabela 1). Após a primeira e a terceira semana de exposição, amostras de água foram coletadas para quantificação das concentrações de estrona por cromatografia líquida de alta performance e espectrometria de massas (HPLC/MS) conforme previamente padronizado (Weber et al., 2017) (Tabela 1). Para isto, foram utilizados um cromatógrafo líquido Shimadzu HPLC 20A Prominence uv-vis, com coluna C_{18} (250 mm, 4.6 mm, 2 mm – Kromasil) e um espectrômetro de massa Maldit-TOF/TOF Bruker Autoflex III. As amostras foram analisadas em duplicata e os limites de detecção e quantificação foram 1,71 ng/L e 2,34 ng/L respectivamente.

Tabela 1: Parâmetros físico-químicos e concentrações de estrona (E1) na água.

Grupo	Temperatura (°C)	pH	Oxigênio (mg/l)	Amônia (mg/l)	E1 (ng/L)
Controle	28,18 ± 0,22	6,53 ± 0,08	6,50 ± 0,14	0,006 ± 0,001	nd
EtOH	28,46 ± 0,28	6,80 ± 0,13	6,71 ± 0,16	0,007 ± 0,001	nd
E1 20 ng/L	27,93 ± 0,39	6,36 ± 0,06	6,29 ± 0,55	0,007 ± 0,001	19,78 ± 1,63
E1 200 ng/L	28,18 ± 0,26	6,53 ± 0,10	7,07 ± 0,20	0,006 ± 0,001	229,10 ± 7,31
E1 2000 ng/L	28,36 ± 0,13	6,50 ± 0,08	6,79 ± 0,21	0,006 ± 0,001	1941,92 ± 2,81

Valores expressam média ± erro padrão, nd = não detectado.

2.2. Morfometria

Para análise da gametogênese e maturação gonadal, amostras de ovários dos exemplares ($n = 6/\text{grupo}$) foram fixadas em líquido de Bouin durante 8 h, incluídas em parafina, seccionadas com 5 μm de espessura e coradas com hematoxilina-eosina. Para determinação da proporção (%) dos componentes ovarianos, 5 secções transversais escolhidas aleatoriamente de 6 fêmeas de cada tratamento (30 campos/tratamento), foram digitalizadas com ampliação de 200X usando o software Axio Vision E64 da Zeiss acoplado a um microscópio de luz. As imagens foram analisadas no software ImageJ utilizando uma grátula de 540 pontos. De acordo com características morfológicas (Quagio-Grassiotto et

al., 2013; Bazzoli & Rizzo, 1990), as seguintes células germinativas e componentes somáticos ovarianos foram quantificados: ovogônia (Oo), ovócito perinucleolar (PN), ovócitos com alvéolos corticais (AC), ovócitos vitelogênicos (V), folículos pós-ovulatórios (FPO), folículos atrésicos (FA), tecido conjuntivo (componentes extracelulares), vasos sanguíneos, infiltrado (IF). As ovogônias (O1) e células foliculares foram quantificadas no aumento de 400X em 5 secções transversais escolhidas aleatoriamente de 6 fêmeas de cada tratamento.

2.3. Imunohistoquímica para PCNA, IGF1, IGF2, IGF1R e iNOS

Amostras de ovários (n =6/grupo) foram fixadas em paraformaldeído a 4%, incluídas em parafina e seccionadas com 5 µm de espessura. Para o bloqueio da peroxidase endógena, as secções foram incubadas com H₂O₂ 3% em tampão fosfato-salina (PBS) por 30 min a temperatura ambiente. Os cortes foram submetidos à reativação antigênica com tampão citrato 10mM pH 6 por 20 min a 95 °C. O bloqueio de ligações inespecíficas foi feito com albumina bovina a 2% em tampão PBS por 30 min à temperatura ambiente. Em seguida, os cortes foram incubados com o anticorpo primário, em câmara úmida a 4 °C *overnight* (Tabela 2). Para a revelação os cortes foram submetidos ao kit da Dakocytomation LSAB (anticorpo secundário de cabra conjugado com biotina e estreptavidina conjugada com peroxidase), corados com diaminobenzidina (DAB, Sigma-Aldrich, USA) e contra-corados com hematoxilina. Para o controle negativo, um dos cortes não recebeu o anticorpo primário. A quantificação da imunomarcação por PCNA foi realizada em 5 secções transversais escolhidas aleatoriamente de 6 machos de cada tratamento (30 campos/grupo) digitalizadas com ampliação de 400X. Nos ovários foram consideradas as seguintes células para determinação do índice: células foliculares e ovogônias. A proliferação celular foi determinada considerando-se a porcentagem de células PCNA-positivas em relação ao total de células de cada tipo na secção.

Para avaliação da expressão proteica de IGF1, IGF2, IGF1R e iNOS, 5 secções transversais escolhidas aleatoriamente de 6 fêmeas de cada tratamento (30 campos/grupo) foram digitalizadas na ampliação de 400X. A partir do software Fiji/Image J software (<https://imagej.net/Fiji/Downloads>) a densitometria óptica das marcações de DAB foi determinada (plugin Color Deconvolution 1.7, vetor H DAB). A densidade óptica foi

calculada para cada imagem utilizando a seguinte fórmula $DO = \log$ (intensidade máxima/intensidade média).

Tabela 2. Anticorpos primários e diluições utilizadas na imunohistoquímica

Anticorpo primário	Fabricante	Código	Diluição
Monoclonal anti-PCNA	Sigma-Aldrich	P8825	1:100
Policlonal Anti-IGF1	Santa Cruz Biotechnology	Sc-9013	1:100
Policlonal Anti-IGF2	Santa Cruz Biotechnology	Sc-5622	1:100
Policlonal Anti-IGF1R	Santa Cruz Biotechnology	Sc-713	1:100
Policlonal Anti-iNOS	Sigma-Aldrich	SAB4502012	1:150

2.4. Ensaio TUNEL (*terminal deoxynucleotidyl transferase mediated dUTP nick end labeling assay*)

Para avaliação da morte celular, amostras de ovários (n =6/grupo) foram fixadas em paraformaldeído a 4%, incluídas em parafina e seccionadas com 5 µm de espessura e submetidas à técnica de TUNEL in situ utilizando o kit QIA33 (TdT-FragEL DNA fragmentation, Calbiochem, USA), seguindo o protocolo do fabricante e padronização previa (Ribeiro et al., 2021). As amostras foram desparafinizadas em xilol e lavadas em água corrente por 10 min para remoção do fixador. Posteriormente, as amostras foram tratadas com 20 µg/ml de proteinase K em tampão fosfato salino (PBS) por 20 min e com água oxigenada 3% em PBS para inativação da peroxidase endógena. As secções foram então incubadas com a enzima terminal deoxynucleotidyl transferase (TdT) por 1 h a 37 °C e posteriormente, com anti-digoxigenina conjugado com peroxidase por 30 min. A reação da peroxidase foi revelada com DAB e as secções foram contra-coradas com hematoxilina. Para controle negativo, uma das lâminas não recebeu o tratamento com a enzima TdT. A quantificação das células TUNEL-positivas foi realizada em 5 secções transversais escolhidas aleatoriamente de 6 fêmeas de cada tratamento (30 campos/grupo) digitalizadas com ampliação de 400X. A morte celular foi determinada a partir da porcentagem de células TUNEL-positivas em relação ao número total de células em cada fase de desenvolvimento.

2.5. Esteróides sexuais

Para a determinação das concentrações de 11-ketotestosterona (11-KT) e 17 β -estradiol (E2), amostras de ovários (n=6/grupo) foram coletadas e congeladas a -80°C, seguindo protocolo previamente estabelecido (Ribeiro et al., 2021). Posteriormente, as amostras foram homogeneizadas em tampão de extração (50 mM Tris-HCl pH 8.0 0,002% de aprotinina e 1 mM phenylmethylsulfonyl), os extratos foram vortexados e centrifugados a 15000 g por 60 min a 4 °C. Os sobrenadantes foram coletados e submetidos a técnica de ELISA utilizando kits comerciais (Cayman Chemical Company, Michigan, USA). O limite de detecção dos testes para 11-KT e E2 foi de 1,3 e 6,6 pg/ml respectivamente. A absorbância foi medida em 405 nm usando um leitor de microplacas (BioTek Instruments, USA) e as amostras foram dosadas em duplicata de acordo com instruções do fabricante.

2.6 Quantificação de óxido nítrico

As concentrações de óxido nítrico (NO) foram determinadas indiretamente a partir da medida de nitrito (NO₂) após a reação de Griess (Zheng et al., 2015; Griess 1879). Amostras de ovários (n=6/grupo) foram coletadas e congeladas a -80°C. Posteriormente, essas amostras foram homogeneizadas em tampão de extração (50 mM Tris-HCl pH 8.0 0,002% de aprotinina e 1 mM phenylmethylsulfonyl) e os extratos vortexados e centrifugados a 15000 g por 60 min a 4 °C. Em seguida, 100 μ L de sobrenadante foi misturado com 100 μ L do reagente de Griess (1% sulfanilamida, 0.1% dicloridrato de n-(1-naftil)etilenodiamina, 5% ácido fosfórico) e a mistura foi incubada no escuro a temperatura ambiente por 10 min. A absorbância foi medida usando um leitor de microplacas (BioTek Instruments, USA) em 540 nm. A partir das leituras da absorbância das amostras e da curva padrão de nitrito de sódio (NaNO₂), as concentrações de nitrito foram determinadas.

2.7 Desova e taxa de fertilização

Para avaliar o efeito dos tratamentos sobre a desova e fertilização dos ovos, em cada aquário, foi colocada uma caixa coletora de ovos a cada 7 dias, que era recolhida no dia seguinte pela manhã. Com o auxílio de um microscópio estereoscópio, o número de ovos liberados foi contado, e a taxa de fertilização (%) foi determinada a partir da proporção dos embriões no estágio de blástula (2-5h pós-fertilização, Kimmel et al., 1995) em relação ao número total de ovos liberados.

2.8. Análises estatísticas

As análises estatísticas realizadas e os gráficos obtidos no software GraphPad Prism v.6. A normalidade da distribuição dos dados foi avaliada utilizando-se o teste de Shapiro-Wilk. Os dados biométricos e índices biológicos, a morfometria dos ovários, concentrações de esteróides sexuais, proliferação celular, morte celular, expressão de IGF1, IGF2, IGF1R e iNOS, não passaram no teste de normalidade e foram analisados pelo teste de Kruskal-Wallis seguido do pós-teste de Dunn. As concentrações de nitrito foram analisadas pela Anova One-way seguido do pós-teste de Tukey. Os resultados dos grupos tratados foram comparados com o grupo controle, e expressos como média \pm erro padrão (EP) e a diferença entre as médias foi considerada significativa com $p < 0,05$. Não foram detectadas diferenças significativas em nenhuma das variáveis analisadas quando comparados o grupo controle e o grupo etanol (EtOH).

3. Resultados

3.1. Parâmetros de qualidade da água, parâmetros biométricos dos peixes e fator de condição de Fulton (K)

Os parâmetros físico-químicos da água permaneceram nos limites adequados para o cultivo da espécie, com temperatura da água variando entre 27 a 28,5 °C, pH de 6 a 7, oxigênio dissolvido de 6 a 7,2 mg/L e amônia menor do que de 0,01 mg/L. Não foi detectada estrona nos grupos controle e EtOH. As concentrações reais de estrona nos grupos tratados E1 20, 200 e 2000 ng/L foram 19,78 ng/L, 229,10 ng/L e 1941,92 ng/L, respectivamente. Em relação aos dados biométricos e fator de condição das fêmeas do zebrafish, não foram observadas diferenças significativas para os valores de CT (4,26 a 4,43 cm), PC (0,92 a 1,08 g) e K (1,12 a 1,30) entre o grupo controle e os grupos tratados, $p > 0,05$.

3.2. Índice gonadossomático e esteróides sexuais

Os valores de IGS do grupo E1 20 ng/L foram significativamente menores que o grupo controle ($p < 0,05$) (Fig. 1). As concentrações de E2 apresentaram aumento significativo nos grupos E1 20 ng/L e E1 200 ng/L ($p < 0,01$ e $p < 0,001$). As concentrações

ovarianas de 11-KT não apresentaram diferença significativa entre os grupos, embora uma ligeira tendência de aumento de 11-KT tenha sido observada nos grupos tratados (Fig. 1).

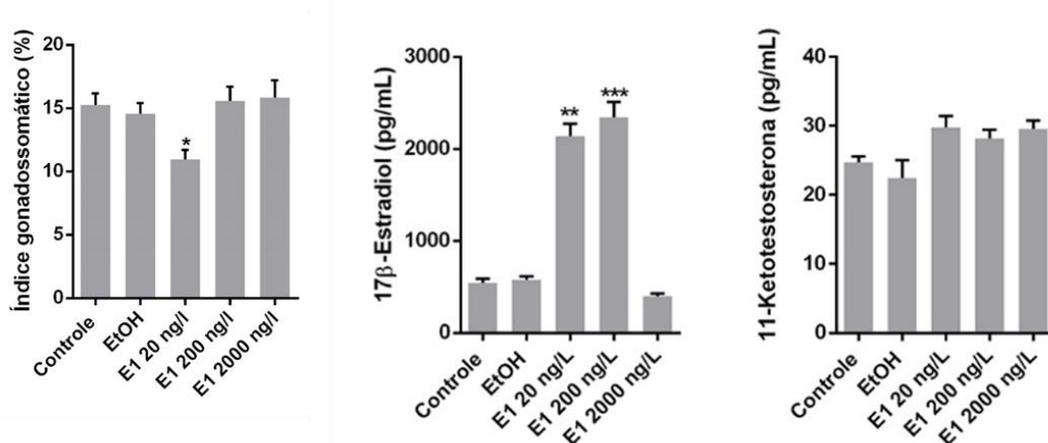


Fig. 1 Índice gonadosomático (IGS) e concentrações de 17β-estradiol e 11-ketotestosterona em ovários de *Danio rerio* expostos a diferentes concentrações de estrona durante 49 dias. Os dados representam média ± erro padrão, n = 6 (*p < 0.05, **p < 0.01, ***p < 0.001).

3.3. Morfometria da gametogênese

Análises histológicas evidenciaram que todas as fêmeas dos grupos controle e expostos a estrona apresentavam ovários em maturação com folículos em diferentes fases de desenvolvimento (Fig. 2A). Análises morfométricas mostraram que a proporção de folículos perinucleolares (PN), com vesículas corticais (CV), vitelogênicos (V), folículos pós-ovulatórios (POF), tecido conjuntivo e vasos sanguíneos não apresentaram diferenças significativas entre os grupos tratados e o controle (Fig. 2B). A proporção de células foliculares foi significativamente menor nos grupos E1 20 ng/L e E1 200 ng/L se comparada com o grupo controle (p < 0.05). A proporção de folículos vitelogênicos atrésicos (AF) dos grupos expostos a E1 e a proporção de infiltrado inflamatório (IF) foram significativamente maiores nos grupos E1 200 ng/L e E1 2000 ng/L se comparadas com o controle (p < 0.01) (Fig 2B).

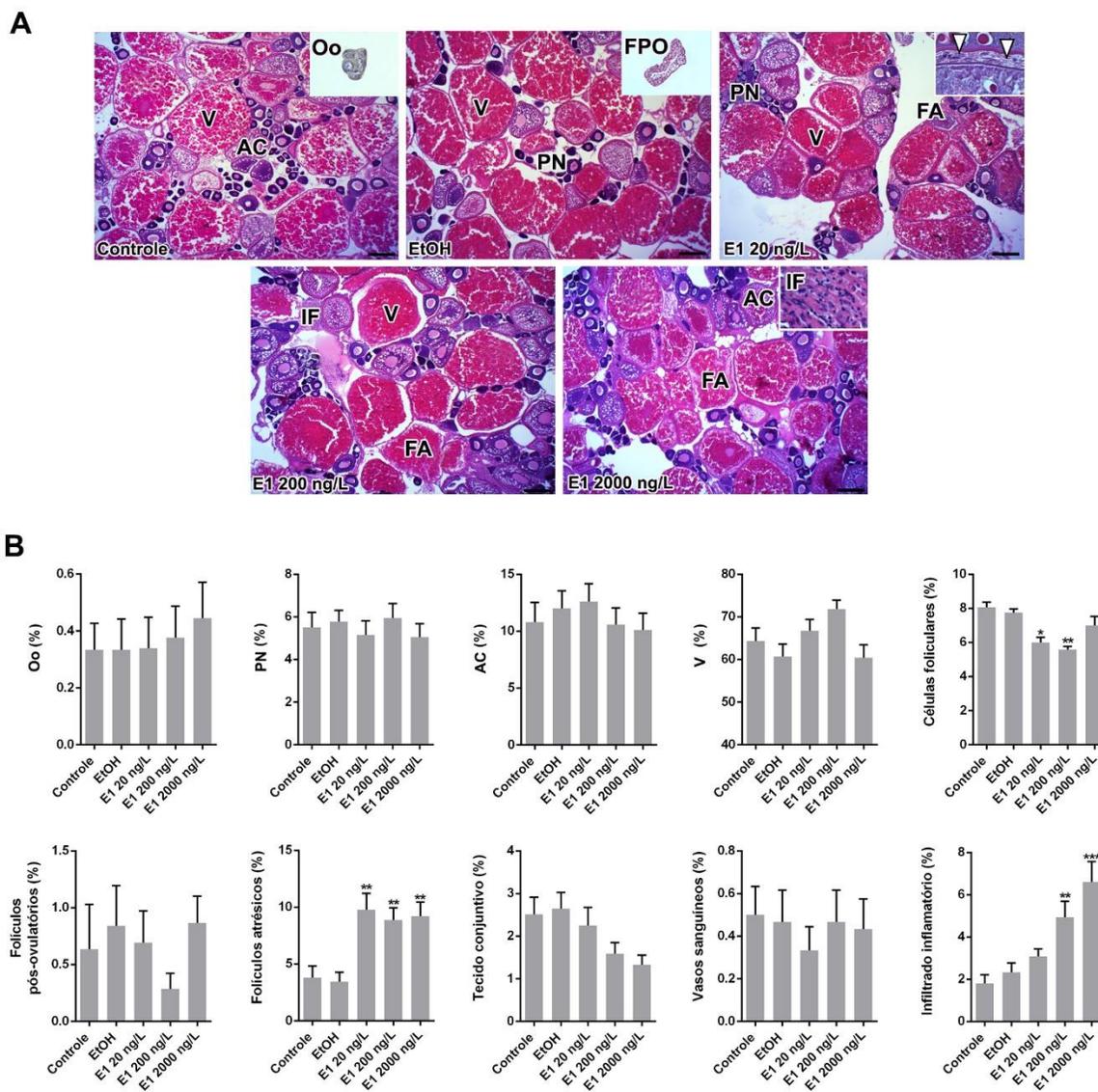


Fig. 2. A. Secções histológicas de ovários de *Danio rerio* expostos a estrona durante 49 dias. Coloração com hematoxilina e eosina. Ovocônias (Oo), ovócitos perinucleolares (PN), ovócitos com alvéolos corticais (AC), ovócitos vitelogênicos (V), células foliculares (cabeça de seta branca), folículos pós-ovulatórios (FPO), folículos atresicos (FA) e infiltrado inflamatório (IF). Barra = 50 μ m. B. Proporção de folículos e componentes somáticos nos ovários de *Danio rerio* nos grupos controle, etanol, e expostos a estrona: E1 20, 200 e 2000 ng/L. Os dados representam média \pm erro padrão, n = 6 (*p < 0.05, **p < 0.01, ***p < 0.001).

3.4. Proliferação e morte celular

O índice de proliferação celular (reação PCNA positiva) foi significativamente maior nas ovogônias (p < 0.01) e significativamente menor nas células foliculares (p < 0.001) dos grupos expostos a E1 comparado ao controle (Fig. 3). A morte celular (reação TUNEL-

positiva) foi significativamente maior para as células foliculares do grupo E1 200 ng/L se comparado com o grupo controle ($p < 0.05$) (Fig. 3).

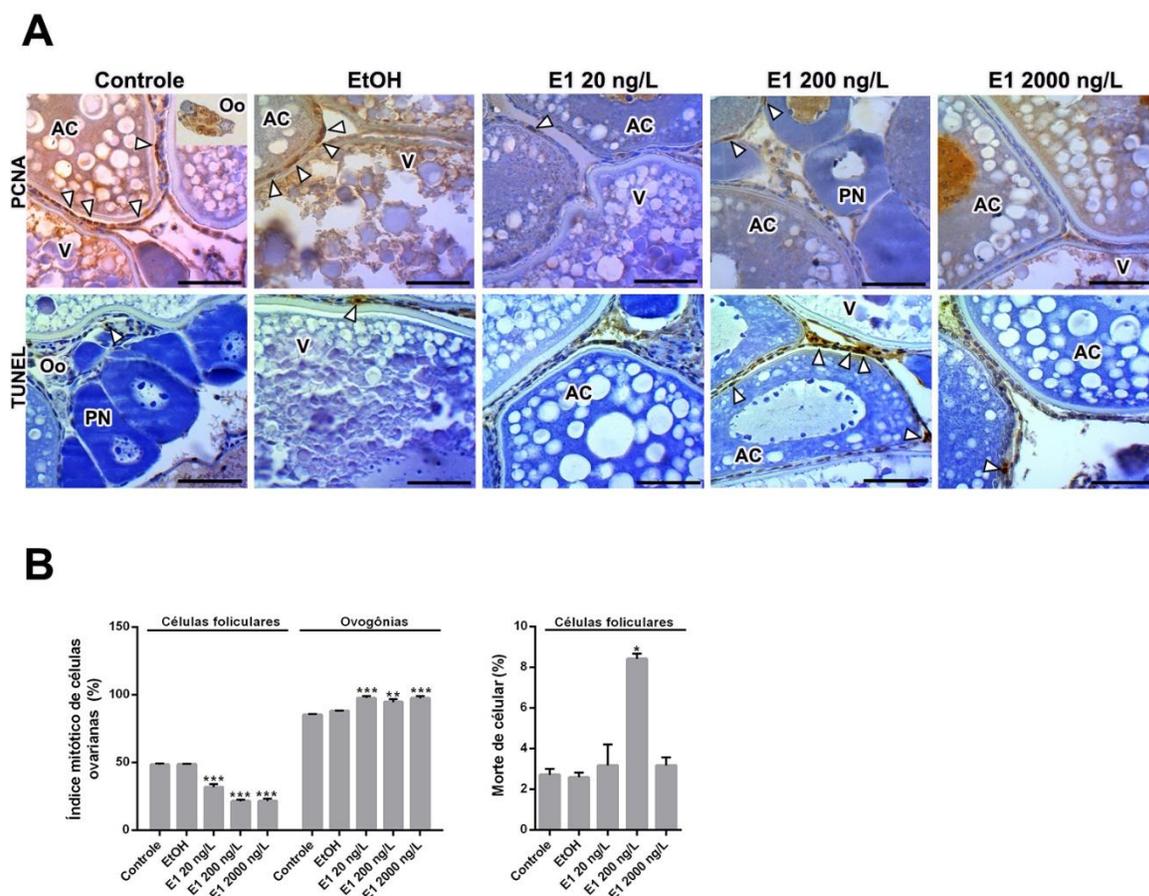


Fig. 3. A) Reação Imunohistoquímica para PCNA e reação de TUNEL em ovários de *Danio rerio* expostos a estrona durante 49 dias. Contra coloração com hematoxilina. Ovogônias (Oo), ovócitos perinucleolares (PN), ovócitos com alvéolos corticais (AC), ovócitos vitelogênicos (V), células foliculares (cabeça de seta branca). Barra = 50 μ m. B) Quantificação da marcação para PCNA e para TUNEL nos ovários do zebrafish. Os dados representam média \pm erro padrão, $n = 6$ (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$).

3.5. Imunohistoquímica para IGF1, IGF2 e IGF1R

As marcações para IGF1 e IGF2 foram observadas no citoplasma de ovócitos em todas as fases de desenvolvimento, folículos pós-ovulatórios, folículos atrésicos e células foliculares (Fig. 4). A marcação para IGF1R foi observada no citoplasma de ovócitos AC, V, células foliculares, folículos pós-ovulatórios e folículos atrésicos (Fig. 4). A quantificação da marcação imunohistoquímica para IGF1 foi significativamente maior nos grupos E1 20 ng/L

e E2 200 ng/L em relação ao controle ($p < 0.01$) e não houve diferença significativa para IGF2 e IGF1R ($p > 0,05$) (Fig.4).

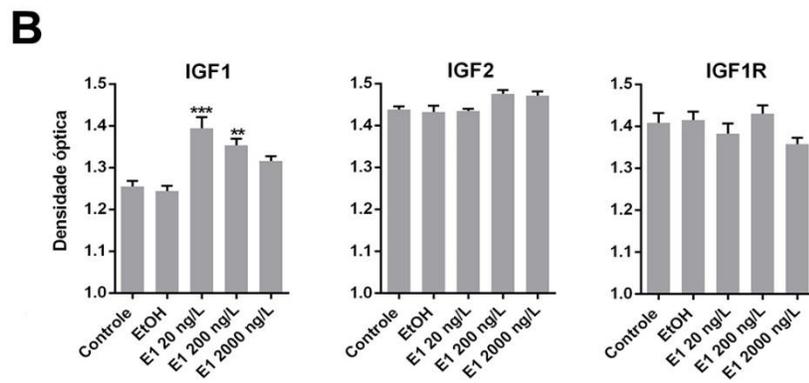
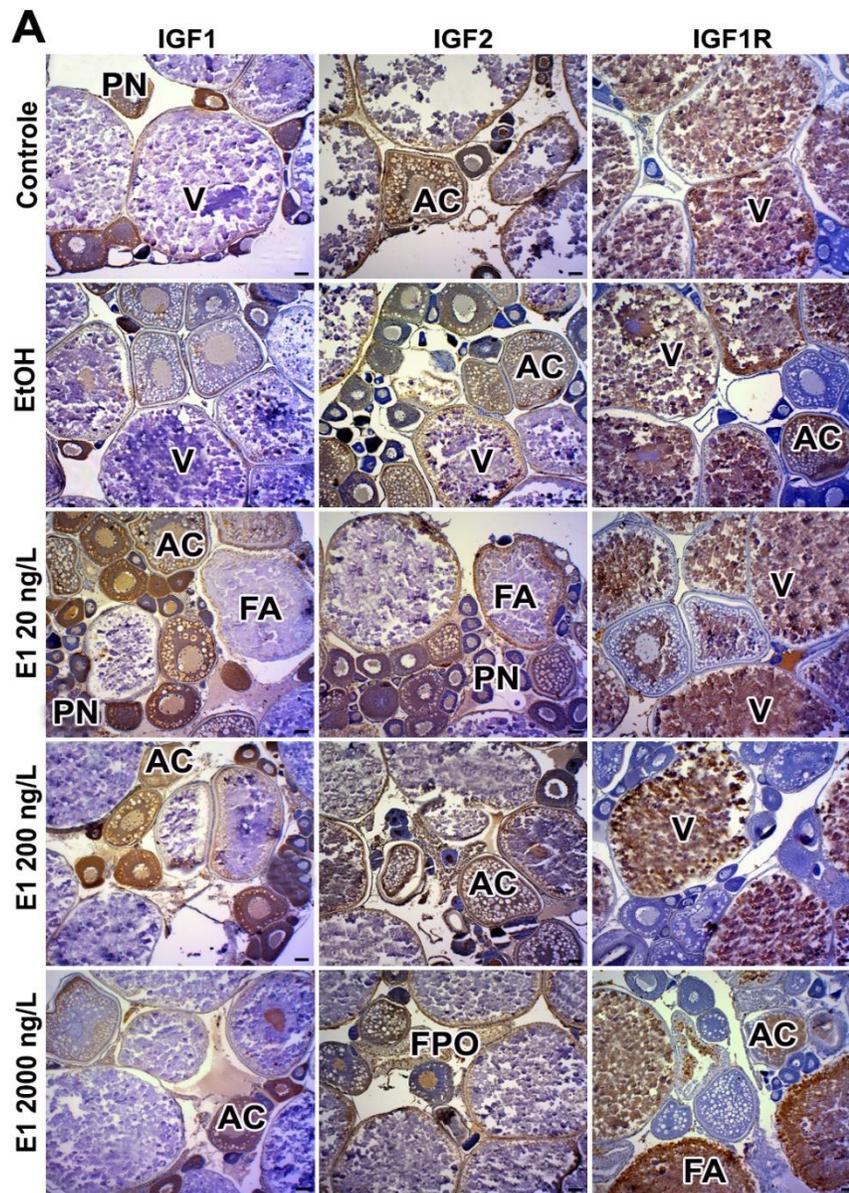


Fig. 4. A) Reação imuno-histoquímica para IGF1, IGF2 e IGF1R em ovários de *Danio rerio* expostos a estrona durante 49 dias. Ovogônias (Oo), ovócitos perinucleolares (PN), ovócitos com alvéolos corticais (AC), ovócitos vitelogênicos (V), células foliculares (cabeça de seta branca), folículos pós-ovulatórios (FPO), folículos atresicos (FA) e infiltrado inflamatório (IF), barra = 50 μ m. B) quantificação das reações nos ovários. Os dados representam média \pm erro padrão, n = 6 (*p < 0.05, **p < 0.01, ***p < 0.001).

3.6. Imunohistoquímica para iNOS e produção de Nitrito

A reação imunohistoquímica para iNOS foi observada em todas as células germinativas, nos folículos pós-ovulatórios e atresicos em todos os grupos (Fig. 5). A marcação em células foliculares foi observada com maior intensidade nos grupos expostos a estrona, enquanto a marcação no infiltrado foi observada somente nos grupos expostos a E1. A densidade óptica da marcação para iNOS nos ovários não apresentou diferenças significativas entre os grupos, embora uma tendência de aumento nos grupos expostos a E1 possa ser observada em relação ao controle (Fig. 5). A produção de nitrito foi significativamente maior nos grupos E1 200 ng/L e E1 2000 ng/L (p < 0.05) (Fig 5).

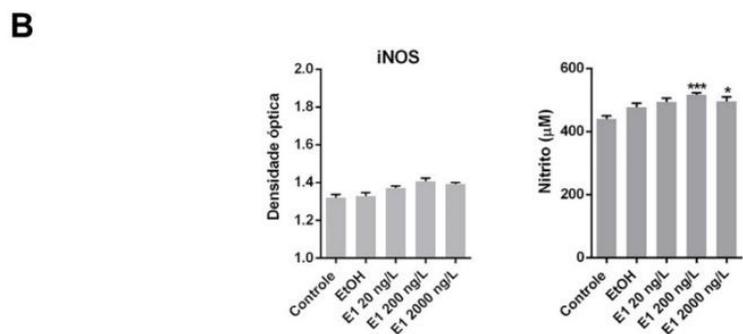
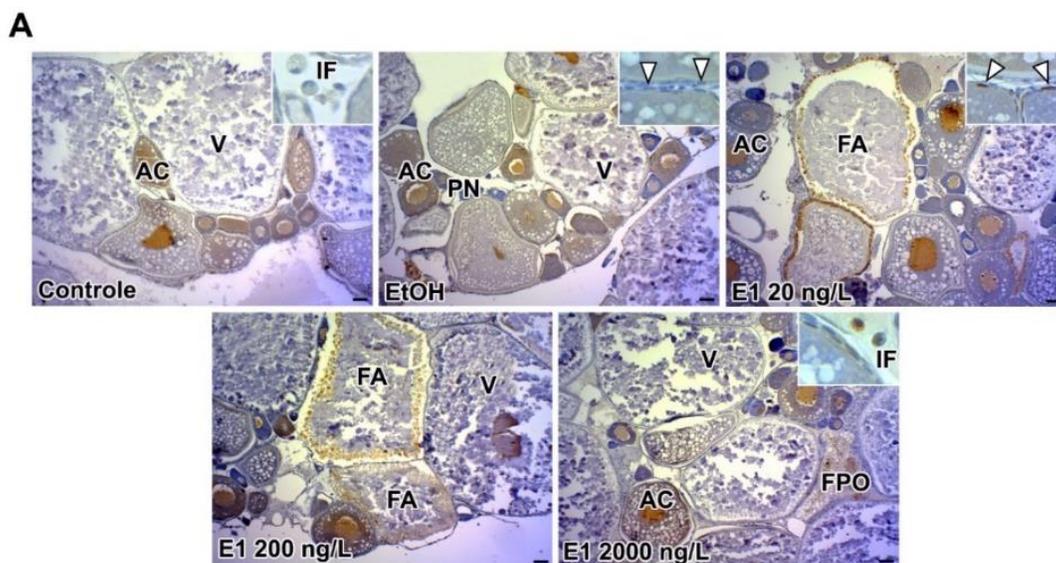


Fig. 5. A) Reação imunohistoquímica para iNOS em ovários de *Danio rerio* expostos a estrona durante 49 dias. Contra coloração com hematoxilina. Ovogônias (Oo), ovócitos perinucleolares (PN), ovócitos com alvéolos corticais (AC), ovócitos vitelogênicos (V), células foliculares (cabeça de seta branca), folículos pós-ovulatórios (FPO), folículos atrésicos (FA) e infiltrado inflamatório (IF). B) Quantificação da reação imunohistoquímica para iNOS e produção de nitrito nos ovários do zebrafish. Os dados representam média \pm erro padrão, $n = 6$ (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$). Barra = 50 μm .

3.7. Produção de ovos e taxa de fertilização

A produção de ovos (número de ovos desovados) foi significativamente menor nos grupos E1 20 ng/L e E1 2000 ng/L ($p < 0.05$) e a taxa de fertilização (% de ovos fertilizados) apresentou redução significativa nos grupos E1 200 ng/L e E1 2000 ng/L ($p < 0.05$) (Fig. 6).

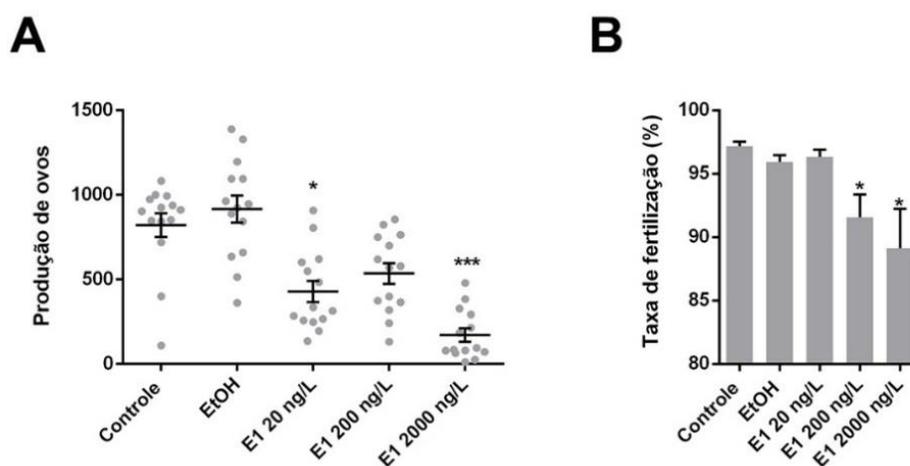


Fig. 6. Produção de ovos (A) e taxa de fertilização (B) em zebrafish *Danio rerio* nos grupos: controle, etanol (EtOH) e expostos a diferentes concentrações de estrona: E1 20, 200 e 2000 ng/L por 49 dias. Os dados representam média \pm erro padrão (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$).

4. Discussão

A estrona (E1) é um dos estrógenos ambientais mais frequentemente detectado nas águas superficiais (Weber et al., 2017; Adeel et al., 2017; Wang et al., 2015). Apesar disso, as legislações ambientais ainda não estabeleceram níveis máximos para a estrona nas águas continentais (CONAMA, 2005; USEPA, 2002). No presente estudo, demonstramos que a exposição a E1 é responsável por alterações na produção de esteróides sexuais, proliferação e morte celular, alterações na expressão de IGF1 e produção de NO nos ovários do zebrafish.

Esses efeitos impactaram negativamente o epitélio germinativo das fêmeas, com consequente alteração da proporção de células somáticas ovarianas, redução da desova e taxa de fertilização.

Devido ao aumento do IGS refletir a progressão da maturação gonadal em condições normais, análises de suas variações são frequentemente consideradas em estudos de biologia reprodutiva de peixes. No presente estudo, o IGS não mostrou variações, entretanto, houve redução do número de ovos desovados, especialmente no grupo E1 2000 ng/L. Essa observação indica que, isoladamente, esse índice nem sempre reflete a maturação gonadal e alterações na gametogênese, como também reportado por outros autores (Ribeiro et al., 2021; Madureira et al., 2011). A exposição a E1 não causou variações no fator de condição de Fulton, o que indica que a condição nutricional dos peixes não foi afetada durante o experimento.

Após a exposição a compostos estrogênicos, a alteração da proporção de células germinativas e somáticas nas gônadas é um dos efeitos mais observados nos peixes (Weber et al., 2019; Prado et al., 2014). Esse efeito é em parte uma consequência da alteração das concentrações dos estrógenos e andrógenos que se refletem na proliferação, morte e sobrevivência dessas células (Ribeiro et al., 2021; Paschoalini et al., 2021; Weber et al., 2019). A elevação das concentrações gonadais de estradiol após a exposição a E1 foi observada nas fêmeas dos grupos E1 20 e 200 ng/L. O aumento das concentrações de E2 nestes grupos pode estar relacionado com a conversão da estrona, pela enzima 17β -HSD em E2, visto que essa enzima junto da aromatase, atuam na etapa final de biossíntese de estrógenos em peixes (Tokarz et al., 2015). Apesar de expressão aumentada de aromatase e consequente conversão de testosterona em estradiol ser observada em peixes expostos a estrógenos (Kazeto et al., 2004; Hinfrey et al., 2013), no presente estudo, a ausência de redução das concentrações de 11-ketotestosterona (11-KT), sugere que esta via pode não ser a principal responsável pelo aumento das concentrações de estradiol nos ovários do zebrafish expostos a estrona. Todavia, o aumento do E1 não foi observado nas fêmeas do grupo E1 2000 ng/L, caracterizando uma curva de dose-resposta não monotônica para as concentrações de E2 nos animais expostos a E1. Esse fato pode sugerir que neste grupo os efeitos da exposição a E1 sobre os mecanismos de feedback do eixo hipotálamo-pituitário-gonadal

possam ter comprometido a expressão de enzimas como a 17β -HSD e aromatase no grupo E1 2000 ng/L, inibindo as vias que estimularam o aumento das concentrações de E2 nos outros grupos. Curvas de dose resposta não-monotônicas para diversos parâmetros teciduais e moleculares são normalmente observadas após a exposição a desreguladores endócrinos (Lagarde et al., 2015).

Tanto a 11-KT como o E2 estão envolvidos na maturação ovariana (Wang et al., 2020; Lubzens et al., 2010), com 11-KT sendo importante no crescimento previtelogênico e acumulação de lipídios nos ovócitos (Wang et al., 2020). Enquanto a alteração das concentrações de 11-KT nos peixes expostos a E1 não tenha sido significativa, a exposição a E1 aumentou significativamente os níveis de E2 o que pode ter estimulado a produção de vitelogenina no fígado e sua incorporação pelos ovócitos. Nos grupos E1 20 e 200 e 2000 ng/L, o aumento dos níveis de E2 pode estar relacionado ao aumento da proliferação das ovogônias. De fato, a estimulação da proliferação de ovogônias é um efeito do E2 nas fêmeas de peixes (Lubzens et al., 2010; Higashino et al., 2002). Além disso, tanto o IGF1 como o IGF2 também exercem efeitos proliferativos e estimulam a progressão da ovogênese nos peixes (Moreira et al.; 2020; Reinecke et al., 2010). Considerando que nos últimos anos foi observada que a expressão hepática e gonadal desses peptídeos nos peixes são alvos de desreguladores endócrinos, principalmente os estrógenos (Prado et al., 2014; Reinecke et al., 2010), a análise da expressão dos IGFs no contexto da maturação gonadal, é de grande relevância. No presente estudo, foi observado que a expressão de IGF1 aumentou nas fêmeas expostas a estrona. Considerando os efeitos mitóticos exercidos pelo IGF1 (Reinecke et al., 2010), o aumento da proliferação de ovogônias pode ter sido também estimulado por esse peptídeo. Outras vias não investigadas no presente trabalho podem também estar envolvidas com os efeitos proliferativos do E2. Por exemplo, em culturas de células humanas o E2 estimula a proliferação celular através dos receptores de estrógeno α e GPER junto do aumento de expressão de β -catenina (Sánchez et al., 2019), e em mamíferos o aumento do número de folículos primordiais é estimulado pelo E2 através da proteína óssea morfogenética 2 (BMP-2) e seus efeitos sobre as células da granulosa (Chakraborty & Roy, 2017).

Nossos resultados também demonstram que além de os efeitos sobre a proliferação de ovogônias, a exposição de fêmeas a E1 pode ter comprometido a maturação final ovocitária, visto que houve um aumento na proporção de folículos vitelogênicos atrésicos, o que pode estar correlacionado com a via de sinalização do LH nos ovários, que controla a retomada da meiose nos ovócitos vitelogenicos (Nagahama & Yamashita, 2008). Como observado no presente estudo, o aumento da atresia folicular foi relatada em peixes expostos ao etinilestradiol, nonilfenol, bisfenol a e dietilhexilftalato, contaminantes estrogênicos, relacionada com a alteração da produção de gonadotrofinas e esteróides sexuais (Ye et al., 2014; Kaptaner & Ünal, 2011; Mandich et al., 2007). Parte dos efeitos deletérios sobre os ovários também podem ter sido mediados por efeitos nas células foliculares, que tiveram sua proporção reduzida como consequência da redução de sua proliferação em todos os grupos expostos a estrona, e aumento da morte celular no grupo E1 200 ng/L. Considerando que a produção de esteroides sexuais nos ovários envolve células especiais da teca e as células foliculares, especialmente E2, que controla o desenvolvimento dos folículos e a vitelogenese, este trabalho sugere a redução do número de células foliculares pode estar relacionada com efeitos deletérios da exposição a estrona sobre a maturação ovocitária. De fato, a exposição a contaminantes ambientais que afetam o número e a funcionalidade de células foliculares, impacta negativamente o desenvolvimento e a maturação folicular (Corriero et al., 2021), além de poder também afetar o processo de ovulação (Lubzens et al., 2010). Como consequência dos efeitos sobre as células foliculares e o aumento da atresia nos grupos expostos a estrona, foi observada a redução do número de ovos desovados pelas fêmeas.

Devido ao aumento de sua produção nos ovários, alguns dos efeitos sobre a gametogênese exercidos nos grupos E1 200 e 2000 ng/L, podem ter sido mediados pelo óxido nítrico. Entretanto, a elevação do óxido nítrico nas fêmeas não foi acompanhada pelo aumento da expressão de iNOS. Esse resultado sugere que, outras isoformas responsáveis pela produção de óxido nítrico como a eNOS e nNOS (Singh & Lal, 2015) possam ter sido afetadas pelo estímulo estrogênico. A elevação do óxido nítrico nos grupos E1 200 e 2000 ng/L foi acompanhada pelo aumento dos folículos atrésicos. Efeito semelhante foi observado no peixe *Heteropneustes fossilis*, onde o aumento da produção de óxido nítrico afetou a quebra da vesícula germinativa dos ovócitos e a progressão da meiose (Tripathi & Krishna, 2008). Além dos efeitos sobre a meiose ovocitária, nossos resultados sugerem que o estresse

oxidativo causado pelo óxido nítrico possa ter afetado a proliferação das células foliculares, o que refletiu na redução de sua proporção. Apesar de determinadas concentrações de óxido nítrico serem capazes de estimular a proliferação celular, o que pode ter sido um de seus efeitos sobre as ovogônias dos grupos expostos ao E1, o óxido nítrico também é capaz de inibir o crescimento e a proliferação celular em diversos tecidos (Napoli et al., 2013).

Em conjunto, nossos indicam que a estrona compromete o desenvolvimento e maturação dos ovócitos de zebrafish, levando a redução da quantidade de ovos desovados e das taxas de fertilização nos grupos E1 200 e 2000 ng/L. Efeitos similares foram observados em medaka exposto a E2 e em zebrafish exposto ao etinilestradiol (Imai et al., 2005; Porseryd et al., 2018).

5. Conclusão

Os resultados do presente estudo demonstram que a estrona exerce efeitos deletérios no desenvolvimento ovariano, comprometendo a maturação ovocitária, desova e fertilização no zebrafish. O desbalanço da produção de esteróides sexuais, acompanhados por efeitos sobre a via de sinalização dos IGFs e a produção de óxido nítrico, contribuem negativamente para a progressão da ovogênese, desova e a qualidade dos ovócitos dos animais expostos a estrona. Baseado nos efeitos observados, nossos resultados indicam que a estrona compromete negativamente a fisiologia reprodutiva de fêmeas de zebrafish.

6. Referências Bibliográficas

- Adeel, M., Song, X., Wang, Y., Francis, D., Yang, Y., 2017. Environmental impact of estrogens on human, animal and plant life: A critical review. *Environment International* 99, 107–119. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2016.12.010>
- Andaluri, G., Suri, R.P.S., Kumar, K., 2012. Occurrence of estrogen hormones in biosolids, animal manure and mushroom compost. *Environ Monit Assess* 184, 1197–1205. <https://doi.org/10.1007/s10661-011-2032-8>
- Bazzoli, N., Rizzo, E., 1990. A comparative cytological and cytochemical study of the oogenesis in ten Brazilian teleost fish species. *European Archives of Biology, Bruxelles* 101, 399–410.
- Borella, M.I., Chehade, C., Costa, F.G., de Jesus, L.W.O., Cassel, M., Batlouni, S.R., 2020. The brain-pituitary-gonad axis and the gametogenesis, in: *Biology and Physiology of Freshwater Neotropical Fish*. Elsevier, pp. 315–341. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-815872-2.00014-2>
- Breves, J.P., Duffy, T.A., Einarsdottir, I.E., Björnsson, B.T., McCormick, S.D., 2018. In vivo effects of 17 α -ethinylestradiol, 17 β -estradiol and 4-nonylphenol on insulin-like growth-

- factor binding proteins (igfbps) in Atlantic salmon. *Aquatic Toxicology* 203, 28–39. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2018.07.018>
- Chakraborty, P., Roy, S.K., 2017. Stimulation of primordial follicle assembly by estradiol-17 β requires the action of bone morphogenetic protein-2 (BMP2). *Sci Rep* 7, 15581. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-15833-4>
- Choudhury, M.G., Saha, N., 2016. Induction of Inducible Nitric Oxide Synthase by Lipopolysaccharide and the Influences of Cell Volume Changes, Stress Hormones and Oxidative Stress on Nitric Oxide Efflux from the Perfused Liver of Air-Breathing Catfish, *Heteropneustes fossilis*. *PLoS ONE* 11, e0150469. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0150469>
- Chu, L., Li, J., Liu, Y., Cheng, C.H.K., 2015. Gonadotropin Signaling in Zebrafish Ovary and Testis Development: Insights From Gene Knockout Study. *Molecular Endocrinology* 29, 1743–1758. <https://doi.org/10.1210/me.2015-1126>
- CONAMA 357, 2005. Classificação de águas, doces, salobras e salinas do Território Nacional. BRASIL. Ministério do Meio Ambiente.
- Corriero, A., Zupa, R., Mylonas, C.C., Passantino, L., 2021. Atresia of ovarian follicles in fishes, and implications and uses in aquaculture and fisheries. *J Fish Dis* 44, 1271–1291. <https://doi.org/10.1111/jfd.13469>
- Forstermann, U., Sessa, W.C., 2012. Nitric oxide synthases: regulation and function. *European Heart Journal* 33, 829–837. <https://doi.org/10.1093/eurheartj/ehr304>
- Frank, A., Brown, L.M., Clegg, D.J., 2014. The role of hypothalamic estrogen receptors in metabolic regulation. *Frontiers in Neuroendocrinology* 35, 550–557. <https://doi.org/10.1016/j.yfrne.2014.05.002>
- Hess, R.A., 2003. Estrogen in the adult male reproductive tract: A review. *Reprod Biol Endocrinol* 1, 52. <https://doi.org/10.1186/1477-7827-1-52>
- Higashino, T., Miura, T., Miura, C., Yamauchi, K., 2002. Effects of 17 β -estradiol on oogonial proliferation in fish. *Fisheries science* 68, 1269–1270. https://doi.org/10.2331/fishsci.68.sup2_1269
- Hinfray, N., Nóbrega, R.H., Caulier, M., Baudiffier, D., Maillot-Maréchal, E., Chadili, E., Palluel, O., Porcher, J.-M., Schulz, R., Brion, F., 2013. Cyp17a1 and Cyp19a1 in the zebrafish testis are differentially affected by oestradiol. *Journal of Endocrinology* 216, 375–388. <https://doi.org/10.1530/JOE-12-0509>
- Imai, S., Koyama, J., Fujii, K., 2005. Effects of 17 β -estradiol on the reproduction of Java-medaka (*Oryzias javanicus*), a new test fish species. *Marine Pollution Bulletin* 51, 708–714. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2005.02.018>
- Jackson, L.M., Klerks, P.L., 2019. Impact of Long-Term Exposure to 17 α -Ethinylestradiol in the Live-Bearing Fish *Heterandria formosa*. *Arch Environ Contam Toxicol* 77, 51–61. <https://doi.org/10.1007/s00244-019-00600-5>
- Kabir, E.R., Rahman, M.S., Rahman, I., 2015. A review on endocrine disruptors and their possible impacts on human health. *Environmental Toxicology and Pharmacology* 40, 241–258. <https://doi.org/10.1016/j.etap.2015.06.009>
- Kaptaner, B., Ünal, G., 2011. Effects of 17 α -ethinylestradiol and nonylphenol on liver and gonadal apoptosis and histopathology in *Chalcalburnus tarichi*. *Environ. Toxicol.* 26, 610–622. <https://doi.org/10.1002/tox.20585>
- Kazeto, Y., Place, A.R., Trant, J.M., 2004. Effects of endocrine disrupting chemicals on the expression of CYP19 genes in zebrafish (*Danio rerio*) juveniles. *Aquatic Toxicology* 69, 25–34. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2004.04.008>

- Kimmel, C.B., Ballard, W.W., Kimmel, S.R., Ullmann, B., Schilling, T.F., 1995. Stages of embryonic development of the zebrafish. *Dev Dyn* 203, 253–310. <https://doi.org/10.1002/aja.1002030302>
- Lagarde, F., Beausoleil, C., Belcher, S.M., Belzunces, L.P., Emond, C., Guerbet, M., Rousselle, C., 2015. Non-monotonic dose-response relationships and endocrine disruptors: a qualitative method of assessment. *Environ Health* 14, 13. <https://doi.org/10.1186/1476-069X-14-13>
- La Merrill, M.A., Vandenberg, L.N., Smith, M.T., Goodson, W., Browne, P., Patisaul, H.B., Guyton, K.Z., Kortenkamp, A., Cogliano, V.J., Woodruff, T.J., Rieswijk, L., Sone, H., Korach, K.S., Gore, A.C., Zeise, L., Zoeller, R.T., 2020. Consensus on the key characteristics of endocrine-disrupting chemicals as a basis for hazard identification. *Nat Rev Endocrinol* 16, 45–57. <https://doi.org/10.1038/s41574-019-0273-8>
- Larsen, M.G., Bilberg, K., Baatrup, E., 2009. Reversibility of estrogenic sex changes in zebrafish (*Danio rerio*). *Environ Toxicol Chem* 28, 1783. <https://doi.org/10.1897/08-563.1>
- 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>
- Madureira, T.V., Rocha, M.J., Cruzeiro, C., Galante, M.H., Monteiro, R.A.F., Rocha, E., 2011. The toxicity potential of pharmaceuticals found in the Douro River estuary (Portugal): Assessing impacts on gonadal maturation with a histopathological and stereological study of zebrafish ovary and testis after sub-acute exposures. *Aquatic Toxicology* 105, 292–299. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2011.06.017>
- Mandich, A., Bottero, S., Benfenati, E., Cevasco, A., Erratico, C., Maggioni, S., Massari, A., Pedemonte, F., Viganò, L., 2007. In vivo exposure of carp to graded concentrations of bisphenol A. *General and Comparative Endocrinology* 153, 15–24. <https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2007.01.004>
- Mikkelsen, R.B., Wardman, P., 2003. Biological chemistry of reactive oxygen and nitrogen and radiation-induced signal transduction mechanisms. *Oncogene* 22, 5734–5754. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1206663>
- Moreira, D.P., Melo, R.M.C., Weber, A.A., Rizzo, E., 2020. Insulin-like growth factors 1 and 2 are associated with testicular germ cell proliferation and apoptosis during fish reproduction. *Reprod. Fertil. Dev.* 32, 988. <https://doi.org/10.1071/RD20128>
- Nadal, A., Fuentes, E., Ripoll, C., Villar-Pazos, S., Castellano-Muñoz, M., Soriano, S., Martínez-Pinna, J., Quesada, I., Alonso-Magdalena, P., 2018. Extranuclear-initiated estrogenic actions of endocrine disrupting chemicals: Is there toxicology beyond paracelsus? *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* 176, 16–22. <https://doi.org/10.1016/j.jsbmb.2017.01.014>
- Nagahama, Y., Yamashita, M., 2008. Regulation of oocyte maturation in fish: Regulation of oocyte maturation in fish. *Development, Growth & Differentiation* 50, S195–S219. <https://doi.org/10.1111/j.1440-169X.2008.01019.x>
- Napoli, C., Paolisso, G., Casamassimi, A., Al-Omran, M., Barbieri, M., Sommese, L., Infante, T., Ignarro, L.J., 2013. Effects of Nitric Oxide on Cell Proliferation. *Journal of the American College of Cardiology* 62, 89–95. <https://doi.org/10.1016/j.jacc.2013.03.070>
- Neirijnck, Papaioannou, Nef, 2019b. The Insulin/IGF System in Mammalian Sexual Development and Reproduction. *IJMS* 20, 4440. <https://doi.org/10.3390/ijms20184440>
- Nezvati, E., Shafiqhi, M., Bakhtian, K.D., Treiber, H., Fandino, J., Fathi, A.R., 2015. Estrogen Induces Nitric Oxide Production Via Nitric Oxide Synthase Activation in Endothelial Cells, in: Fandino, J., Marbacher, S., Fathi, A.-R., Muroi, C., Keller, E. (Eds.), *Neurovascular*

- Events After Subarachnoid Hemorrhage. Springer International Publishing, Cham, pp. 141–145. https://doi.org/10.1007/978-3-319-04981-6_24
- Paschoalini, A.L., Savassi, L.A., Weber, A.A., Moreira, D.P., Ribeiro, Y.M., Rizzo, E., Bazzoli, N., 2021. Evaluation of the oestrogenic potential of oestrone and bisphenol-A on the reproduction of *Astyanax bimaculatus* males after subacute exposure. *Fish Physiol Biochem* 47, 797–810. <https://doi.org/10.1007/s10695-021-00938-5>
- Pillerová, M., Borbélyová, V., Hodosy, J., Riljak, V., Renczés, E., Frick, K.M., Tóthová, Ľ., 2021. On the role of sex steroids in biological functions by classical and non-classical pathways. An update. *Frontiers in Neuroendocrinology* 62, 100926. <https://doi.org/10.1016/j.yfrne.2021.100926>
- Pinto, P., Estêvão, M., Power, D., 2014. Effects of Estrogens and Estrogenic Disrupting Compounds on Fish Mineralized Tissues. *Marine Drugs* 12, 4474–4494. <https://doi.org/10.3390/md12084474>
- Porseryd, T., Reyhanian Caspillo, N., Volkova, K., Elabbas, L., Källman, T., Dinnézt, P., Olsson, P.-E., Porsch-Hällström, I., 2018. Testis transcriptome alterations in zebrafish (*Danio rerio*) with reduced fertility due to developmental exposure to 17 α -ethinyl estradiol. *General and Comparative Endocrinology* 262, 44–58. <https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2018.03.011>
- 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>
- Quagio-Grassiotto, I., Grier, H., Mazzoni, T.S., Nóbrega, R.H., de Arruda Amorim, J.P., 2011. Activity of the ovarian germinal epithelium in the freshwater catfish, *Pimelodus maculatus* (Teleostei: Ostariophysi: Siluriformes): Germline cysts, follicle formation and oocyte development. *J. Morphol.* 272, 1290–1306. <https://doi.org/10.1002/jmor.10981>
- Quagio-Grassiotto, I., Wildner, D.D., Ishiba, R., 2013. Gametogênese em peixes: aspectos relevantes para o manejo reprodutivo. *Revista Brasileira de Reprodução Animal* 37, 181–191.
- Reinecke, M., Zaccone, G., Kapoor, B.G. (Eds.), 2020. *Fish Endocrinology (2 Vols.)*, 0 ed. CRC Press. <https://doi.org/10.1201/9780429094149>
- Reinecke, M., 2010. Insulin-like Growth Factors and Fish Reproduction. *Biology of Reproduction* 82, 656–661. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.109.080093>
- Ribeiro, Y.M., Weber, A.A., Paschoalini, A.L., Moreira, D.P., Sales, C.F., Almeida, T.V.P. de, Neres, M.A., Bazzoli, N., Rizzo, E., 2021. Biomarker responses induced by bisphenol A on spermatogenesis in a Neotropical teleost fish are temperature-dependent. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 224, 112670. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2021.112670>
- Rodil, R., Quintana, J.B., Concha-Graña, E., López-Mahía, P., Muniategui-Lorenzo, S., Prada-Rodríguez, D., 2012. Emerging pollutants in sewage, surface and drinking water in Galicia (NW Spain). *Chemosphere* 86, 1040–1049. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2011.11.053>
- Rutherford, R., Lister, A., Bosker, T., Blewett, T., Gillio Meina, E., Chehade, I., Kanagasabesan, T., MacLatchy, D., 2020. Mummichog (*Fundulus heteroclitus*) are less sensitive to 17 α -ethinylestradiol (EE2) than other common model teleosts: A comparative review of reproductive effects. *General and Comparative Endocrinology* 289, 113378. <https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2019.113378>
- Sánchez-Criado, J.E., Martín de las Mulas, J., Bellido, C., Tena-Sempere, M., Aguilar, R., Blanco, A., 2004. Biological Role of Pituitary Estrogen Receptors ER α and ER β on Progesterone

- Receptor Expression and Action and on Gonadotropin and Prolactin Secretion in the Rat. *Neuroendocrinology* 79, 247–258. <https://doi.org/10.1159/000079100>
- Sánchez, D.S., Fischer Sigel, L.K., Azurmendi, P.J., Vlachovsky, S.G., Oddo, E.M., Armando, I., Ibarra, F.R., Silberstein, C., 2019. Estradiol stimulates cell proliferation via classic estrogen receptor-alpha and G protein-coupled estrogen receptor-1 in human renal tubular epithelial cell primary cultures. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 512, 170–175. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2019.03.056>
- Singh, V.K., Lal, B., 2015. Immunolocalization of nitric oxide synthase (NOS) isoforms in ovarian follicles of the catfish, *Clarias batrachus* and its relation with ovarian activity. *Gen Comp Endocrinol* 220, 98–102. <https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2014.04.001>
- Singh, V.K., Lal, B., 2017. Nitric oxide (NO) stimulates steroidogenesis and folliculogenesis in fish. *Reproduction* 153, 133–146. <https://doi.org/10.1530/REP-16-0482>
- Shved, N., Berishvili, G., Baroiller, J.-F., Segner, H., Reinecke, M., 2008. Environmentally Relevant Concentrations of 17 α -Ethinylestradiol (EE2) Interfere With the Growth Hormone (GH)/Insulin-Like Growth Factor (IGF)-I System in Developing Bony Fish. *Toxicological Sciences* 106, 93–102. <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfn150>
- Tokarz, J., Möller, G., Hrabě de Angelis, M., Adamski, J., 2015. Steroids in teleost fishes: A functional point of view. *Steroids* 103, 123–144. <https://doi.org/10.1016/j.steroids.2015.06.011>
- Tripathi, V., Krishna, A., 2008. Changes in nitric oxide (NO) synthase isoforms and NO in the ovary of *Heteropneustes fossilis* (Bloch.) during the reproductive cycle. *Journal of Endocrinology* 199, 307–316. <https://doi.org/10.1677/JOE-07-0509>
- USEPA, 2002. National Recommended Water Quality Criteria: 2002.
- Vo, D.-K.H., Hartig, R., Weinert, S., Haybaeck, J., Nass, N., 2019. G-Protein-Coupled Estrogen Receptor (GPER)-Specific Agonist G1 Induces ER Stress Leading to Cell Death in MCF-7 Cells. *Biomolecules* 9, 503. <https://doi.org/10.3390/biom9090503>
- Wang, W., Zhu, H., Tian, Z., Sun, A., Dong, Y., Dong, T., Hu, H., 2020. Effects of 11-Ketotestosterone on Development of the Previtellogenic Ovary in the Sterlet, *Acipenser ruthenus*. *Front. Endocrinol.* 11, 115. <https://doi.org/10.3389/fendo.2020.00115>
- Wang, Y., Wang, Q., Hu, L., Lu, G., Li, Y., 2015. Occurrence of estrogens in water, sediment and biota and their ecological risk in Northern Taihu Lake in China. *Environ Geochem Health* 37, 147–156. <https://doi.org/10.1007/s10653-014-9637-0>
- Weber, A.A., Moreira, D.P., Melo, R.M.C., Ribeiro, Y.M., Bazzoli, N., Rizzo, E., 2019. Environmental exposure to oestrogenic endocrine disruptors mixtures reflecting on gonadal sex steroids and gametogenesis of the neotropical fish *Astyanax rivularis*. *General and Comparative Endocrinology* 279, 99–108. <https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2018.12.016>
- Weber, A.A., Moreira, D.P., Melo, R.M.C., Vieira, A.B.C., Prado, P.S., da Silva, M.A.N., Bazzoli, N., Rizzo, E., 2017. Reproductive effects of oestrogenic endocrine disrupting chemicals in *Astyanax rivularis* inhabiting headwaters of the Velhas River, Brazil. *Science of The Total Environment* 592, 693–703. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.02.181>
- Ye, T., Kang, M., Huang, Q., Fang, C., Chen, Y., Shen, H., Dong, S., 2014. Exposure to DEHP and MEHP from hatching to adulthood causes reproductive dysfunction and endocrine disruption in marine medaka (*Oryzias melastigma*). *Aquatic Toxicology* 146, 115–126. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2013.10.025>
- Yu, G., Zhang, D., Liu, W., Wang, J., Liu, X., Zhou, C., Gui, J., Xiao, W., 2018. Zebrafish androgen receptor is required for spermatogenesis and maintenance of ovarian function. *Oncotarget* 9, 24320–24334. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.24407>

4. Discussão geral

Os estrógenos ambientais são um grupo de compostos produzidos pelas gônadas dos vertebrados ou sintetizados industrialmente, capazes de ativar os receptores de estrógeno e que comprometem a reprodução, sistema imune, desenvolvimento e a saúde dos vertebrados (Chighizola & Meroni, 2011 ;Maleky & Sarafpur, 2001). Apesar de estrógenos ambientais como a estrona (E1), etinilestradiol (EE2), bisfenol A (BPA) e o próprio 17 β -estradiol (E2) serem frequentemente encontrados nos rios e lagos, oriundos de atividades humanas como a pecuária e a contaminação pelos efluentes das estações de tratamento de esgoto (Petrie et al., 2015; Adeel et al., 2017; Weber et al., 2017; Wilkinson et al., 2017; Kolpin et al., 2002), várias destas substâncias não têm seus níveis monitorados nas águas superficiais (Lopes et al., 2016). Considerando a existência de alguns estudos sobre os efeitos dos estrógenos ambientais sobre a fisiologia dos vertebrados, é necessário a realização de mais estudos visando a elucidação dos mecanismos pelos quais estes compostos agem.

Dentro dos vertebrados, os peixes são organismos que desempenham relevante papel ecológico e são importante fonte de alimento para os humanos. Entretanto, em consequência dos efeitos deletérios de diversos poluentes, dentre eles os estrógenos, sobre seus tecidos e órgãos, a sobrevivência destes organismos no meio ambiente está ameaçada (FAO, 2020; Adeel et al., 2017). Apesar da existência de alguns estudos caracterizando os efeitos de poluentes sobre a fisiologia destes organismos (Moreira et al., 2022; Ribeiro et al., 2021; Weber et al. 2017), poucos investigaram detalhadamente os efeitos da exposição a estrógenos ambientais na reprodução dos peixes. Aspectos básicos da fisiologia reprodutiva como a proporção de células germinativas e somáticas gonadais, níveis de esteroides sexuais, proliferação e morte celular, qualidade de sêmen e quantidade de ovos produzidos e taxas de fertilização são importantes parâmetros para compreender as alterações causadas nas gônadas pelos desreguladores endócrinos. Embora o E1 seja considerado um dos principais estrógenos ambientais (Adeel et al., 2017), nenhum estudo avaliou os efeitos deste hormônio sobre a reprodução de peixes. Deste modo, o presente estudo descreve detalhadamente os efeitos da exposição crônica a estrona na espermatogênese, ovogênese e reprodução do zebrafish, a partir de múltiplos biomarcadores teciduais e moleculares. Os resultados do presente estudo demonstram que a exposição a estrona é responsável por causar efeitos na gametogênese, bem como alterações na produção de esteróides sexuais e na expressão de IGF1/IGF1R, e o aumento do estresse oxidativo.

Um dos efeitos marcantes da exposição a E1 foi o aumento das concentrações de E2 endógeno tanto nos testículos como nos ovários do zebrafish. Curiosamente, os resultados do presente trabalho sugerem que as vias que levaram o aumento das concentrações de E2 parecem ser distintas ao compararmos machos e fêmeas. Nos testículos, a elevação das concentrações testiculares de E2 foi observada em todos os grupos expostos a E1. Considerando a redução das concentrações testiculares de 11-KT observadas no presente estudo, o aumento das concentrações de E2 nos machos podem ter origem em uma maior produção e atividade da aromatase que converte a testosterona, precursora da 11-KT em E2. Nesse contexto, em zebrafish expostos ao nonilfenol, benzopireno e EE2, a expressão da enzima aromatase foi estimulada (Kazeto et al., 2004). Como nos ovários o aumento das concentrações de E2 não foi acompanhada da redução de 11-KT, a elevação das concentrações de E2 pode ter como origem a ação das enzimas da família 17 β -HSD sobre a E1 absorvida. A conversão de E1 em E2 via 17 β -HSD também pode ter acontecido nos testículos em menor proporção, apesar de essas vias não terem sido investigadas no presente estudo. Fato semelhante também foi relatado por Ankley et al. (2017) no peixe *Pimephales promelas* exposto a estrona.

Considerando que os esteróides sexuais são efetores da ação das gonadotrofinas sobre gônadas, os efeitos marcantes exercidos por eles na espermatogênese e ovogênese como a proliferação de espermatogônias e ovogônias, a progressão meiótica da gametogênese, bem como a maturação final espermática e a incorporação de vitelo nos ovócitos (Jalabert, 2005; Lubzens et al., 2010; Schulz et al., 2010); a alteração das concentrações de E2 e 11-KT nas gônadas do zebrafish levaram a alterações da proporção das células germinativas e na qualidade dos gametas. Nos machos expostos a E1, foi observado aumento da proporção de espermatogônias e redução da proporção de espermatozoides, enquanto nas fêmeas, o aumento da proporção de folículos atrésicos e redução da desova foram notados. Esses resultados demonstram o efeito deletério da exposição a E1 sobre o epitélio germinativo de machos e fêmeas de zebrafish. Observações semelhantes feitas em outras espécies de peixes expostos a contaminantes estrogênicos estão ligadas a efeitos sobre a proliferação, morte celular e atraso na progressão da gametogênese (Giari et al., 2016; Ye et al., 2014; Liu et al., 2013; Kaptaner & Ünal, 2011; Mandich et al., 2007).

Considerando que os IGFs e seus receptores são expressos nas células germinativas e somáticas das gônadas de peixes (Reineke, 2010), e que esses fatores estão relacionados com o metabolismo energético destes tecidos, a expressão de enzimas esteroidogênicas e proliferação e morte celular (Lubzens et al., 2010; Schulz et al., 2010); a alteração de sua expressão nas gônadas do zebrafish após a exposição a E1 pode ter contribuído para os efeitos negativos observados na progressão da gametogênese, como observado em outros peixes expostos a desreguladores endócrinos (Prado et al., 2014; Reinecke et al., 2010).

Apesar de efeitos moleculares sobre as células que proveem suporte para a gametogênese não terem sido investigados no presente estudo, o aumento da proporção de células de Sertoli nos testículos e a redução da proporção e da proliferação de células foliculares nos ovários, junto das consequências observadas da exposição a E1 no epitélio germinativo de machos e fêmeas, sugerem que esse estrógeno possa afetar a funcionalidade desse grupo de células que são responsáveis pela progressão das fases mitótica, meiótica, espermiacão e ovulação. Embora as consequências da exposição a estrógenos em relação a estas células serem pouco investigadas, recentemente foi demonstrado que o bisfenol A, um desregulador endócrino estrogênico, é capaz de causar alterações na cromatina e degeneração das células de Sertoli do peixe *Astyanax bimaculatus* (Ribeiro et al., 2021), afetando negativamente sua espermatogênese.

Finalmente, junto dos efeitos sobre as concentrações de esteróides sexuais e a expressão de IGF/IGFR1R, o aumento das concentrações de óxido nítrico (NO) nos testículos e ovários podem ter contribuído para a redução da qualidade do sêmen e ovos, o que refletiu na queda de fertilidade do zebrafish. Esses efeitos podem estar ligados ao potencial oxidante do NO e de seus derivados como o peroxinitrito, que são capazes de causar danos a estrutura do DNA e proteínas (Forstermann & Sessa, 2012; Mikkelsen & Wardman, 2003). De fato, impacto negativo dos contaminantes ambientais sobre a qualidade dos gametas dos peixes já foi descrito por alguns autores, e está ligado a alteração do consumo intracelular de ATP e danos a membrana plasmática dos espermatozoides, e alteração da expressão de genes relativos à maturação nos ovócitos (Porseryd et al., 2018; Hatef et al., 2013; Imai et al., 2005). Tendo em consideração que a expressão de óxido nítrico sintase induzida (iNOS) foi pouco afetada nas gônadas após a exposição a E1, outras isoformas responsáveis pela produção de

óxido nítrico como a eNOS e nNOS (Singh & Lal, 2015), podem ter tido sua expressão aumentada pelo estímulo estrogênico.

Os dados obtidos no presente estudo contribuem para a compreensão dos mecanismos moleculares e teciduais relativos aos efeitos dos desreguladores endócrinos estrogênicos na gametogênese e reprodução dos peixes teleósteos. Além de demonstrar os potenciais efeitos negativos sobre o desenvolvimento das células germinativas, considerando que a gametogênese e reprodução são eventos relativamente conservados dentre os diversos grupos de vertebrados e essenciais para a conservação e sustentabilidade suas populações, nosso estudo chama a atenção para os possíveis danos da exposição ao E1 em outros grupos de animais.

5. Conclusões

- A estrona exerce efeitos deletérios na gametogênese e reprodução do zebrafish;
- O desbalanço da produção de esteróides sexuais causados pela estrona é sexo-específico;
- A via de sinalização dos IGFs e do óxido nítrico gonadais são afetadas pela exposição a estrona;
- A estrona compromete a progressão da gametogênese;
- A redução da qualidade dos gametas e fertilidade é observada após a exposição a estrona.

6. Referências Bibliográficas

- Adamek, A., Kasprzak, A., 2018. Insulin-Like Growth Factor (IGF) System in Liver Diseases. *IJMS* 19, 1308. <https://doi.org/10.3390/ijms19051308>
- Adeel, M., Song, X., Wang, Y., Francis, D., Yang, Y., 2017. Environmental impact of estrogens on human, animal and plant life: A critical review. *Environment International* 99, 107–119. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2016.12.010>
- Alavi, S., Cosson, J., 2005. Sperm motility in fishes. I. Effects of temperature and pH: a review. *Cell Biology International* 29, 101–110. <https://doi.org/10.1016/j.cellbi.2004.11.021>
- Andaluri, G., Suri, R.P.S., Kumar, K., 2012. Occurrence of estrogen hormones in biosolids, animal manure and mushroom compost. *Environ Monit Assess* 184, 1197–1205. <https://doi.org/10.1007/s10661-011-2032-8>
- Ankley, G.T., Feifarek, D., Blackwell, B., Cavallin, J.E., Jensen, K.M., Kahl, M.D., Poole, S., Randolph, E., Saari, T., Villeneuve, D.L., 2017. Re-evaluating the Significance of Estrone as an Environmental Estrogen. *Environ. Sci. Technol.* 51, 4705–4713. <https://doi.org/10.1021/acs.est.7b00606>
- Bhandari, R.K., Deem, S.L., Holliday, D.K., Jandegian, C.M., Kassotis, C.D., Nagel, S.C., Tillitt, D.E., vom Saal, F.S., Rosenfeld, C.S., 2015. Effects of the environmental estrogenic contaminants bisphenol A and 17 α -ethinyl estradiol on sexual development and adult behaviors in aquatic wildlife species. *General and Comparative Endocrinology* 214, 195–219. <https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2014.09.014>
- Breves, J.P., Duffy, T.A., Einarsdottir, I.E., Björnsson, B.T., McCormick, S.D., 2018. In vivo effects of 17 α -ethinylestradiol, 17 β -estradiol and 4-nonylphenol on insulin-like growth-factor binding proteins (igfbps) in Atlantic salmon. *Aquatic Toxicology* 203, 28–39. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2018.07.018>
- Cabas, I., Rodenas, M.C., Abellán, E., Meseguer, J., Mulero, V., García-Ayala, A., 2013. Estrogen Signaling through the G Protein–Coupled Estrogen Receptor Regulates Granulocyte Activation in Fish. *J.I.* 191, 4628–4639. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1301613>
- Camacho, C., Coulouris, G., Avagyan, V., Ma, N., Papadopoulos, J., Bealer, K., Madden, T.L., 2009. BLAST+: architecture and applications. *BMC Bioinformatics* 10, 421. <https://doi.org/10.1186/1471-2105-10-421>

- Chan, C.Y., Tran, N., Pethiyagoda, S., Crissman, C.C., Sulser, T.B., Phillips, M.J., 2019. Prospects and challenges of fish for food security in Africa. *Global Food Security* 20, 17–25. <https://doi.org/10.1016/j.gfs.2018.12.002>
- Chighizola, C., Meroni, P.L., 2012. The role of environmental estrogens and autoimmunity. *Autoimmunity Reviews* 11, A493–A501. <https://doi.org/10.1016/j.autrev.2011.11.027>
- Choudhury, M.G., Saha, N., 2016. Induction of Inducible Nitric Oxide Synthase by Lipopolysaccharide and the Influences of Cell Volume Changes, Stress Hormones and Oxidative Stress on Nitric Oxide Efflux from the Perfused Liver of Air-Breathing Catfish, *Heteropneustes fossilis*. *PLoS ONE* 11, e0150469. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0150469>
- Chu, L., Li, J., Liu, Y., Cheng, C.H.K., 2015. Gonadotropin Signaling in Zebrafish Ovary and Testis Development: Insights From Gene Knockout Study. *Molecular Endocrinology* 29, 1743–1758. <https://doi.org/10.1210/me.2015-1126>
- Cinelli, M.A., Do, H.T., Miley, G.P., Silverman, R.B., 2020. Inducible nitric oxide synthase: Regulation, structure, and inhibition. *Med Res Rev* 40, 158–189. <https://doi.org/10.1002/med.21599>
- Comunidade Européia. Parlamento Europeu. Conselho da União Europeia. Directiva 2008/105/CE de 16 de Dezembro de 2008, relativa a normas de qualidade ambiental no domínio da política da água.
- CONAMA 357, 2005. Classificação de águas, doces, salobras e salinas do Território Nacional.
- Delsouc, M.B., Della Vedova, M.C., Ramírez, D., Delgado, S.M., Casais, M., 2018. The production of nitric oxide in the coeliac ganglion modulates the effect of cholinergic neurotransmission on the rat ovary during the preovulatory period. *Nitric Oxide* 75, 85–94. <https://doi.org/10.1016/j.niox.2018.02.010>
- Food and Agriculture Organization of the United Nations, 2020. The State of World Fisheries and Aquaculture 2020. <https://doi.org/10.4060/ca9229en>
- Filby, A.L., Tyler, C.R., 2005. Molecular Characterization of Estrogen Receptors 1, 2a, and 2b and Their Tissue and Ontogenic Expression Profiles in Fathead Minnow (*Pimephales promelas*)1. *Biology of Reproduction* 73, 648–662. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.105.039701>

- Forstermann, U., Sessa, W.C., 2012. Nitric oxide synthases: regulation and function. *European Heart Journal* 33, 829–837. <https://doi.org/10.1093/eurheartj/ehr304>
- França, L.R., Nóbrega, R.H., Morais, R.D.V.S., De Castro Assis, L.H., Schulz, R.W., 2015. Sertoli cell structure and function in anamniote vertebrates, in: *Sertoli Cell Biology*. Elsevier, pp. 385–407. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-417047-6.00013-2>
- Frank, A., Brown, L.M., Clegg, D.J., 2014. The role of hypothalamic estrogen receptors in metabolic regulation. *Frontiers in Neuroendocrinology* 35, 550–557. <https://doi.org/10.1016/j.yfrne.2014.05.002>
- Giari, L., Vincenzi, F., Badini, S., Guerranti, C., Dezfuli, B.S., Fano, E.A., Castaldelli, G., 2016. Common carp *Cyprinus carpio* responses to sub-chronic exposure to perfluorooctanoic acid. *Environ Sci Pollut Res* 23, 15321–15330. <https://doi.org/10.1007/s11356-016-6706-1>
- Gökçe, C.E., Arayici, S., 2016. Adsorption of 17 β -estradiol and estrone by activated carbon derived from sewage sludge. *Desalination and Water Treatment* 57, 2503–2514. <https://doi.org/10.1080/19443994.2015.1034183>
- Goldstone, J.V., Sundaramoorthy, M., Zhao, B., Waterman, M.R., Stegeman, J.J., Lamb, D.C., 2016. Genetic and structural analyses of cytochrome P450 hydroxylases in sex hormone biosynthesis: Sequential origin and subsequent coevolution. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 94, 676–687. <https://doi.org/10.1016/j.ympev.2015.09.012>
- Grazul-Bilska, A.T., Navanukraw, C., Johnson, M.L., Arnold, D.A., Reynolds, L.P., Redmer, D.A., 2006. Expression of endothelial nitric oxide synthase in the ovine ovary throughout the estrous cycle. *Reproduction* 132, 579–587. <https://doi.org/10.1530/REP-06-0009>
- Griess, P., 1879. Bemerkungen zu der Abhandlung der HH. Weselsky und Benedikt „Ueber einige Azoverbindungen”. *Ber. Dtsch. Chem. Ges.* 12, 426–428. <https://doi.org/10.1002/cber.187901201117>
- Hess, R.A., 2003. Estrogen in the adult male reproductive tract: A review. *Reprod Biol Endocrinol* 1, 52. <https://doi.org/10.1186/1477-7827-1-52>
- Hinfray, N., Nóbrega, R.H., Caulier, M., Baudiffier, D., Maillot-Maréchal, E., Chadili, E., Palluel, O., Porcher, J.-M., Schulz, R., Brion, F., 2013. Cyp17a1 and Cyp19a1 in the zebrafish testis are differentially affected by oestradiol. *Journal of Endocrinology* 216, 375–388. <https://doi.org/10.1530/JOE-12-0509>

- Huang, W., Ai, W., Lin, W., Fang, F., Wang, X., Huang, H., Dahlgren, R.A., Wang, H., 2020. Identification of receptors for eight endocrine disrupting chemicals and their underlying mechanisms using zebrafish as a model organism. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 204, 111068. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2020.111068>
- Jackson, L.M., Klerks, P.L., 2019. Impact of Long-Term Exposure to 17 α -Ethinylestradiol in the Live-Bearing Fish *Heterandria formosa*. *Arch Environ Contam Toxicol* 77, 51–61. <https://doi.org/10.1007/s00244-019-00600-5>
- Kabir, E.R., Rahman, M.S., Rahman, I., 2015. A review on endocrine disruptors and their possible impacts on human health. *Environmental Toxicology and Pharmacology* 40, 241–258. <https://doi.org/10.1016/j.etap.2015.06.009>
- Kazeto, Y., Place, A.R., Trant, J.M., 2004. Effects of endocrine disrupting chemicals on the expression of CYP19 genes in zebrafish (*Danio rerio*) juveniles. *Aquatic Toxicology* 69, 25–34. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2004.04.008>
- Kidd, K.A., Blanchfield, P.J., Mills, K.H., Palace, V.P., Evans, R.E., Lazorchak, J.M., Flick, R.W., 2007. Collapse of a fish population after exposure to a synthetic estrogen. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 104, 8897–8901. <https://doi.org/10.1073/pnas.0609568104>
- Kime, D.E., Van Look, K.J.W., McAllister, B.G., Huyskens, G., Rurangwa, E., Ollevier, F., 2001. Computer-assisted sperm analysis (CASA) as a tool for monitoring sperm quality in fish. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology* 130, 425–433. [https://doi.org/10.1016/S1532-0456\(01\)00270-8](https://doi.org/10.1016/S1532-0456(01)00270-8)
- Kowalski, R.K., Cejko, B.I., 2019. Sperm quality in fish: Determinants and affecting factors. *Theriogenology* 135, 94–108. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2019.06.009>
- Kolpin, D.W., Furlong, E.T., Meyer, M.T., Thurman, E.M., Zaugg, S.D., Barber, L.B., Buxton, H.T., 2002. Pharmaceuticals, Hormones, and Other Organic Wastewater Contaminants in U.S. Streams, 1999–2000: A National Reconnaissance. *Environ. Sci. Technol.* 36, 1202–1211. <https://doi.org/10.1021/es011055j>
- Krishna, M.B., Joseph, A., Thomas, P.L., Da silva, B., Pillai, S.M., Laloraya, M., 2017. Impaired Arginine Metabolism Coupled to a Defective Redox Conduit Contributes to Low Plasma Nitric Oxide in Polycystic Ovary Syndrome. *Cell Physiol Biochem* 43, 1880–1892. <https://doi.org/10.1159/000484107>

- La Merrill, M.A., Vandenberg, L.N., Smith, M.T., Goodson, W., Browne, P., Patisaul, H.B., Guyton, K.Z., Kortenkamp, A., Cogliano, V.J., Woodruff, T.J., Rieswijk, L., Sone, H., Korach, K.S., Gore, A.C., Zeise, L., Zoeller, R.T., 2020. Consensus on the key characteristics of endocrine-disrupting chemicals as a basis for hazard identification. *Nat Rev Endocrinol* 16, 45–57. <https://doi.org/10.1038/s41574-019-0273-8>
- Lafrance, P., Caron, E., 2013. Impact of recent manure applications on natural estrogen concentrations in streams near agricultural fields. *Environmental Research* 126, 208–210. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2013.05.008>
- Lal, B., Dubey, N., 2013. Existence of a nitric oxide synthase/nitric oxide system in fish testis and its role in modulation of androgenesis. *Fish Physiol Biochem* 39, 65–69. <https://doi.org/10.1007/s10695-012-9648-7>
- Larsen, M.G., Bilberg, K., Baatrup, E., 2009. Reversibility of estrogenic sex changes in zebrafish (*Danio rerio*). *Environ Toxicol Chem* 28, 1783. <https://doi.org/10.1897/08-563.1>
- Li, J., Zhang, W., Zhu, S., Shi, F., 2020. Nitric Oxide Synthase Is Involved in Follicular Development via the PI3K/AKT/FoxO3a Pathway in Neonatal and Immature Rats. *Animals* 10, 248. <https://doi.org/10.3390/ani10020248>
- Li, M., Liu, X., Dai, S., Xiao, H., Qi, S., Li, Y., Zheng, Q., Jie, M., Cheng, C.H.K., Wang, D., 2020. Regulation of spermatogenesis and reproductive capacity by Igf3 in tilapia. *Cell. Mol. Life Sci.* 77, 4921–4938. <https://doi.org/10.1007/s00018-019-03439-0>
- Liu, C., Duan, W., Li, R., Xu, S., Zhang, L., Chen, C., He, M., Lu, Y., Wu, H., Pi, H., Luo, X., Zhang, Y., Zhong, M., Yu, Z., Zhou, Z., 2013. Exposure to bisphenol A disrupts meiotic progression during spermatogenesis in adult rats through estrogen-like activity. *Cell Death Dis* 4, e676–e676. <https://doi.org/10.1038/cddis.2013.203>
- Liu, Y., Grimm, M., Dai, W., Hou, M., Xiao, Z.-X., Cao, Y., 2020. CB-Dock: a web server for cavity detection-guided protein–ligand blind docking. *Acta Pharmacol Sin* 41, 138–144. <https://doi.org/10.1038/s41401-019-0228-6>
- Lobo, V., Patil, A., Phatak, A., Chandra, N., 2010. Free radicals, antioxidants and functional foods: Impact on human health. *Phcog Rev* 4, 118. <https://doi.org/10.4103/0973-7847.70902>
- Luo, Y., Zhu, Y., Basang, W., Wang, X., Li, C., Zhou, X., 2021. Roles of Nitric Oxide in the Regulation of Reproduction: A Review. *Front. Endocrinol.* 12, 752410. <https://doi.org/10.3389/fendo.2021.752410>

- Mangiamele, L.A., Gomez, J.R., Curtis, N.J., Thompson, R.R., 2017. GPER/GPR30, a membrane estrogen receptor, is expressed in the brain and retina of a social fish (*Carassius auratus*) and colocalizes with isotocin: GPER/GPR30 in the Goldfish Brain. *J. Comp. Neurol.* 525, 252–270. <https://doi.org/10.1002/cne.24056>
- Maleky, F., Sarafpur, S., 2001. Environmental Estrogens and their Wildlife and Human Health Effects: A Review. *Annals of Saudi Medicine* 21, 53–58. <https://doi.org/10.5144/0256-4947.2001.53>
- Menuet, A., Pellegrini, E., Anglade, I., Blaise, O., Laudet, V., Kah, O., Pakdel, F., 2002. Molecular Characterization of Three Estrogen Receptor Forms in Zebrafish: Binding Characteristics, Transactivation Properties, and Tissue Distributions¹. *Biology of Reproduction* 66, 1881–1892. <https://doi.org/10.1095/biolreprod66.6.1881>
- Mikkelsen, R.B., Wardman, P., 2003. Biological chemistry of reactive oxygen and nitrogen and radiation-induced signal transduction mechanisms. *Oncogene* 22, 5734–5754. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1206663>
- Miura, T., Miura, C.I., 2003. Molecular control mechanisms of fish spermatogenesis. *Fish Physiology and Biochemistry* 28, 181–186. <https://doi.org/10.1023/B:FISH.0000030522.71779.47>
- Moreira, D.P., Melo, R.M.C., Weber, A.A., Rizzo, E., 2020. Insulin-like growth factors 1 and 2 are associated with testicular germ cell proliferation and apoptosis during fish reproduction. *Reprod. Fertil. Dev.* 32, 988. <https://doi.org/10.1071/RD20128>
- Murata, M., Kang, J.-H., 2018. Bisphenol A (BPA) and cell signaling pathways. *Biotechnology Advances* 36, 311–327. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2017.12.002>
- Nadal, A., Fuentes, E., Ripoll, C., Villar-Pazos, S., Castellano-Muñoz, M., Soriano, S., Martínez-Pinna, J., Quesada, I., Alonso-Magdalena, P., 2018. Extranuclear-initiated estrogenic actions of endocrine disrupting chemicals: Is there toxicology beyond paracelsus? *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* 176, 16–22. <https://doi.org/10.1016/j.jsbmb.2017.01.014>
- Neirijnck, Papaioannou, Nef, 2019. The Insulin/IGF System in Mammalian Sexual Development and Reproduction. *IJMS* 20, 4440. <https://doi.org/10.3390/ijms20184440>

- 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>
- Nevzati, E., Shafighi, M., Bakhtian, K.D., Treiber, H., Fandino, J., Fathi, A.R., 2015. Estrogen Induces Nitric Oxide Production Via Nitric Oxide Synthase Activation in Endothelial Cells, in: Fandino, J., Marbacher, S., Fathi, A.-R., Muroi, C., Keller, E. (Eds.), *Neurovascular Events After Subarachnoid Hemorrhage*. Springer International Publishing, Cham, pp. 141–145. https://doi.org/10.1007/978-3-319-04981-6_24
- Nóbrega, R.H., Morais, R.D.V. de S., Crespo, D., de Waal, P.P., de França, L.R., Schulz, R.W., Bogerd, J., 2015. Fish Stimulates Spermatogonial Proliferation and Differentiation in Zebrafish via Igf3. *Endocrinology* 156, 3804–3817. <https://doi.org/10.1210/en.2015-1157>
- Paschoalini, A.L., Savassi, L.A., Weber, A.A., Moreira, D.P., Ribeiro, Y.M., Rizzo, E., Bazzoli, N., 2021. Evaluation of the oestrogenic potential of oestrone and bisphenol-A on the reproduction of *Astyanax bimaculatus* males after subacute exposure. *Fish Physiol Biochem* 47, 797–810. <https://doi.org/10.1007/s10695-021-00938-5>
- Pettersen, E.F., Goddard, T.D., Huang, C.C., Couch, G.S., Greenblatt, D.M., Meng, E.C., Ferrin, T.E., 2004. UCSF Chimera-A visualization system for exploratory research and analysis. *J. Comput. Chem.* 25, 1605–1612. <https://doi.org/10.1002/jcc.20084>
- Petrie, B., Barden, R., Kasprzyk-Hordern, B., 2015. A review on emerging contaminants in wastewaters and the environment: Current knowledge, understudied areas and recommendations for future monitoring. *Water Research* 72, 3–27. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2014.08.053>
- Pillerová, M., Borbélyová, V., Hodosy, J., Riljak, V., Renczés, E., Frick, K.M., Tóthová, Ľ., 2021. On the role of sex steroids in biological functions by classical and non-classical pathways. An update. *Frontiers in Neuroendocrinology* 62, 100926. <https://doi.org/10.1016/j.yfrne.2021.100926>
- Pinto, P., Estêvão, M., Power, D., 2014. Effects of Estrogens and Estrogenic Disrupting Compounds on Fish Mineralized Tissues. *Marine Drugs* 12, 4474–4494. <https://doi.org/10.3390/md12084474>
- 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>

- Ray, P., Zhao, Z., Knowlton, K.F., 2013. Emerging contaminants in livestock manure: hormones, antibiotics and antibiotic resistance genes., in: Kebreab, E. (Ed.), *Sustainable Animal Agriculture*. CABI, Wallingford, pp. 268–283. <https://doi.org/10.1079/9781780640426.0268>
- Reinecke, M., 2010. Insulin-like Growth Factors and Fish Reproduction. *Biology of Reproduction* 82, 656–661. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.109.080093>
- Ribeiro, Y.M., Weber, A.A., Paschoalini, A.L., Moreira, D.P., Sales, C.F., Almeida, T.V.P. de, Neres, M.A., Bazzoli, N., Rizzo, E., 2021. Biomarker responses induced by bisphenol A on spermatogenesis in a Neotropical teleost fish are temperature-dependent. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 224, 112670. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2021.112670>
- Rutherford, R., Lister, A., Bosker, T., Blewett, T., Gillio Meina, E., Chehade, I., Kanagasabesan, T., MacLatchy, D., 2020. Mummichog (*Fundulus heteroclitus*) are less sensitive to 17 α -ethinylestradiol (EE2) than other common model teleosts: A comparative review of reproductive effects. *General and Comparative Endocrinology* 289, 113378. <https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2019.113378>
- Sabeti, P., Pourmasumi, S., Rahiminia, T., Akyash, F., Talebi, A.R., 2016. Etiologies of sperm oxidative stress. *Int J Reprod Biomed* 14, 231–240.
- Sánchez-Criado, J.E., Martín de las Mulas, J., Bellido, C., Tena-Sempere, M., Aguilar, R., Blanco, A., 2004. Biological Role of Pituitary Estrogen Receptors ER α and ER β on Progesterone Receptor Expression and Action and on Gonadotropin and Prolactin Secretion in the Rat. *Neuroendocrinology* 79, 247–258. <https://doi.org/10.1159/000079100>
- Schlueter, P.J., Peng, G., Westerfield, M., Duan, C., 2007. Insulin-like growth factor signaling regulates zebrafish embryonic growth and development by promoting cell survival and cell cycle progression. *Cell Death Differ* 14, 1095–1105. <https://doi.org/10.1038/sj.cdd.4402109>
- Schulster, M., Bernie, A., Ramasamy, R., 2016. The role of estradiol in male reproductive function. *Asian J Androl* 18, 435. <https://doi.org/10.4103/1008-682X.173932>
- 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>

- Sharma, J.N., Al-Omran, A., Parvathy, S.S., 2007. Role of nitric oxide in inflammatory diseases. *Inflammopharmacol* 15, 252–259. <https://doi.org/10.1007/s10787-007-0013-x>
- Shved, N., Berishvili, G., Baroiller, J.-F., Segner, H., Reinecke, M., 2008. Environmentally Relevant Concentrations of 17 α -Ethinylestradiol (EE2) Interfere With the Growth Hormone (GH)/Insulin-Like Growth Factor (IGF)-I System in Developing Bony Fish. *Toxicological Sciences* 106, 93–102. <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfn150>
- Singh, V.K., Lal, B., 2017. Nitric oxide (NO) stimulates steroidogenesis and folliculogenesis in fish. *Reproduction* 153, 133–146. <https://doi.org/10.1530/REP-16-0482>
- Singh, V.K., Lal, B., 2015. Immunolocalization of nitric oxide synthase (NOS) isoforms in ovarian follicles of the catfish, *Clarias batrachus* and its relation with ovarian activity. *Gen Comp Endocrinol* 220, 98–102. <https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2014.04.001>
- Söffker, M., Tyler, C.R., 2012. Endocrine disrupting chemicals and sexual behaviors in fish – a critical review on effects and possible consequences. *Critical Reviews in Toxicology* 42, 653–668. <https://doi.org/10.3109/10408444.2012.692114>
- Steinegger, M., Meier, M., Mirdita, M., Vöhringer, H., Haunsberger, S.J., Söding, J., 2019. HH-suite3 for fast remote homology detection and deep protein annotation. *BMC Bioinformatics* 20, 473. <https://doi.org/10.1186/s12859-019-3019-7>
- Stockley, P., Gage, M.J.G., Parker, G.A., Møller, A.P., 1997. Sperm Competition in Fishes: The Evolution of Testis Size and Ejaculate Characteristics. *The American Naturalist* 149, 933–954. <https://doi.org/10.1086/286031>
- Thomas, P., 2017. Role of G-protein-coupled estrogen receptor (GPER/GPR30) in maintenance of meiotic arrest in fish oocytes. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* 167, 153–161. <https://doi.org/10.1016/j.jsbmb.2016.12.005>
- Trott, O., Olson, A.J., 2010. AutoDock Vina: improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization, and multithreading. *J Comput Chem* 31, 455–461. <https://doi.org/10.1002/jcc.21334>
- Uribe, M.C., Grier, H.J., Mejía-Roa, V., 2014. Comparative testicular structure and spermatogenesis in bony fishes. *Spermatogenesis* 4, e983400. <https://doi.org/10.4161/21565562.2014.983400>
- USEPA, 2002. National Recommended Water Quality Criteria: 2002.

- Valdebenito, I.I., Gallegos, P.C., Effer, B.R., 2015. Gamete quality in fish: evaluation parameters and determining factors. *Zygote* 23, 177–197. <https://doi.org/10.1017/S0967199413000506>
- van den Brande, J.L., 1999. A Personal View on the Early History of the Insulin-Like Growth Factors. *Horm Res Paediatr* 51, 149–175. <https://doi.org/10.1159/000053178>
- Vo, D.-K.H., Hartig, R., Weinert, S., Haybaeck, J., Nass, N., 2019. G-Protein-Coupled Estrogen Receptor (GPER)-Specific Agonist G1 Induces ER Stress Leading to Cell Death in MCF-7 Cells. *Biomolecules* 9, 503. <https://doi.org/10.3390/biom9090503>
- Wang, Y., Wang, Q., Hu, L., Lu, G., Li, Y., 2015. Occurrence of estrogens in water, sediment and biota and their ecological risk in Northern Taihu Lake in China. *Environ Geochem Health* 37, 147–156. <https://doi.org/10.1007/s10653-014-9637-0>
- Waterhouse, A., Bertoni, M., Bienert, S., Studer, G., Tauriello, G., Gumienny, R., Heer, F.T., de Beer, T.A.P., Rempfer, C., Bordoli, L., Lepore, R., Schwede, T., 2018. SWISS-MODEL: homology modelling of protein structures and complexes. *Nucleic Acids Research* 46, W296–W303. <https://doi.org/10.1093/nar/gky427>
- Weber, A.A., Moreira, D.P., Melo, R.M.C., Ribeiro, Y.M., Bazzoli, N., Rizzo, E., 2019. Environmental exposure to oestrogenic endocrine disruptors mixtures reflecting on gonadal sex steroids and gametogenesis of the neotropical fish *Astyanax rivularis*. *General and Comparative Endocrinology* 279, 99–108. <https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2018.12.016>
- 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 α and ER β) and Cyp19 and association with oestrogenic contamination in the lambari *Astyanax rivularis* (Pisces: Characidae). *Environ Sci Pollut Res* 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>
- Werner, H., Adamo, M., Roberts, C.T., Eroith, D.L., 1994. Molecular and Cellular Aspects of Insulin-like Growth Factor Action, in: *Vitamins & Hormones*. Elsevier, pp. 1–58. [https://doi.org/10.1016/S0083-6729\(08\)60495-1](https://doi.org/10.1016/S0083-6729(08)60495-1)

- Wilkinson, J., Hooda, P.S., Barker, J., Barton, S., Swinden, J., 2017. Occurrence, fate and transformation of emerging contaminants in water: An overarching review of the field. *Environmental Pollution* 231, 954–970. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2017.08.032>
- Xia, Y., Krukoff, T.L., 2004. Estrogen Induces Nitric Oxide Production via Activation of Constitutive Nitric Oxide Synthases in Human Neuroblastoma Cells. *Endocrinology* 145, 4550–4557. <https://doi.org/10.1210/en.2004-0327>
- Zhang, H., Unal, H., Gati, C., Han, G.W., Liu, W., Zatsepin, N.A., James, D., Wang, D., Nelson, G., Weierstall, U., Sawaya, M.R., Xu, Q., Messerschmidt, M., Williams, G.J., Boutet, S., Yefanov, O.M., White, T.A., Wang, C., Ishchenko, A., Tirupula, K.C., Desnoyer, R., Coe, J., Conrad, C.E., Fromme, P., Stevens, R.C., Katritch, V., Karnik, S.S., Cherezov, V., 2015. Structure of the Angiotensin Receptor Revealed by Serial Femtosecond Crystallography. *Cell* 161, 833–844. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2015.04.011>
- Zheng, K., Sulieman, F.J., Li, J., Wei, Q., Xu, M., Shi, F., 2015. Nitric oxide and thyroid hormone receptor alpha 1 contribute to ovarian follicular development in immature hyper- and hypothyroid rats. *Reproductive Biology* 15, 27–33. <https://doi.org/10.1016/j.repbio.2014.11.002>

7. Anexo

A seguir encontram-se anexados artigos científicos relacionados com o tema da tese e livros publicados pelo autor durante o doutorado.

Artigos

Ribeiro, Y.M., Moreira, D.P., Weber, A.A., Sales, C.F., Melo, R.M.C., Bazzoli, N., Rizzo, E., Paschoalini, A.L. 2022. Adverse effects of herbicides in freshwater Neotropical fish: a review. *Aquatic Toxicology*, 106293. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2022.106293>

Moreira, D.P., **Ribeiro, Y.M.**, Ferreira, C.S., dos Santos Nassif Lacerda, S.M., Rizzo, E., 2022. Exposure to acetaminophen impairs gametogenesis and fertility in zebrafish (*Danio rerio*). *Arch Toxicol*. Online ahead of print. <https://doi.org/10.1007/s00204-022-03390-3>

Ribeiro, Y.M., Weber, A.A., Paschoalini, A.L., Moreira, D.P., Sales, C.F., Almeida, T.V.P. de, Neres, M.A., Bazzoli, N., Rizzo, E., 2021. Biomarker responses induced by bisphenol A on spermatogenesis in a Neotropical teleost fish are temperature-dependent. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 224, 112670. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2021.112670>

Paschoalini, A.L., Savassi, L.A., Weber, A.A., Moreira, D.P., **Ribeiro, Y.M.**, Rizzo, E., Bazzoli, N., 2021. Evaluation of the oestrogenic potential of oestrone and bisphenol-A on the reproduction of *Astyanax bimaculatus* males after subacute exposure. *Fish Physiol Biochem* 47, 797–810. <https://doi.org/10.1007/s10695-021-00938-5>

Sales, C.F., Barbosa Pinheiro, A.P., **Ribeiro, Y.M.**, Weber, A.A., Paes-Leme, F. de O., Luz, R.K., Bazzoli, N., Rizzo, E., Melo, R.M.C., 2020. Effects of starvation and refeeding cycles on spermatogenesis and sex steroids in the Nile tilapia *Oreochromis niloticus*. *Molecular and Cellular Endocrinology* 500, 110643. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2019.110643>

Weber, A.A., Moreira, D.P., Melo, R.M.C., **Ribeiro, Y.M.**, Bazzoli, N., Rizzo, E., 2019. Environmental exposure to oestrogenic endocrine disruptors mixtures reflecting on gonadal sex steroids and gametogenesis of the neotropical fish *Astyanax rivularis*. *General and Comparative Endocrinology* 279, 99–108. <https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2018.12.016>

Cruz Vieira, A.B., Weber, A.A., **Ribeiro, Y.M.**, Luz, R.K., Bazzoli, N., Rizzo, E., 2019. Influence of salinity on spermatogenesis in adult Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) testis. *Theriogenology* 131, 1–8. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2019.03.013>

Livros

Ribeiro, Y. M. Métodos e técnicas de laboratório para uso em peixes. 1. ed. São Paulo: Perse, 2022. 65 p. ISBN 978-65-5879-239-0.

Ribeiro, Y.M., Moreira, Davidson Peruci. Exercícios de Anatomia Humana Básica: Introdução, Sistema Esquelético, Junturas, Sistema Muscular e Sistema Nervoso. 1. ed. Belo Horizonte: s.n., 2020. 40 p. ISBN 978-65-00-12103-2.