

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP**

**CENTRO DE AQUICULTURA DA UNESP**

**Efeitos da exposição ao microplástico na  
estrutura gonadal e no sucesso reprodutivo de  
*Danio rerio* (Teleostei: Cypriniformes)**

**Davi Araújo Fernandes**

**Jaboticabal – São Paulo**

**2021**

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP**

**CENTRO DE AQUICULTURA DA UNESP**

**Efeitos da exposição ao microplástico na  
estrutura gonadal e no sucesso reprodutivo de  
*Danio rerio* (Teleostei: Cypriniformes)**

**Davi Araújo Fernandes**

**Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Talita Sarah Mazzoni**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Aquicultura do Centro de Aquicultura da UNESP - CAUNESP, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre.

**Jaboticabal – São Paulo**

**2021**

F363e Fernandes, Davi Araújo

Efeitos da exposição ao microplástico na estrutura gonadal e no sucesso reprodutivo de Danio rerio (Teleostei:

Cypriniformes) / Davi Araújo Fernandes. -- Jaboticabal, 2021

84 f. : fotos

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal

Orientadora: Talita Sarah Mazzoni

1. Peixe-zebra. 2. Reprodução. 3. Gônadas. 4.

Microplásticos. I. Título.

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal. Dados fornecidos pelo autor(a).

Essa ficha não pode ser modificada.

### CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

Título: EFEITOS DA EXPOSIÇÃO AO MICROPLÁSTICO NA ESTRUTURA GONADAL E NO SUCESSO REPRODUTIVO DE *DANIO RERIO* (TELEOSTEI: CYPRINIFORMES)

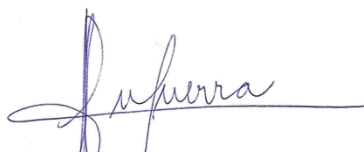
**AUTOR:** DAVI ARAÚJO FERNANDES

**ORIENTADORA:** TALITA SARAH MAZZONI

Aprovado como parte das exigências para obtenção do Título de Mestre em AQUICULTURA, pela Comissão Examinadora:



Profa. Dra. TALITA SARAH MAZZONI (Participação Virtual). Universidade Federal de Alfenas; UNIFAL, Alfenas-MG.



Profa. Dra. MARINA TREVISAN GUERRA (Participação Virtual). Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, UFMS; Três Lagoas-MG.



Prof. Dr. RENATO MASSAAKI HONJI (Participação Virtual). Universidade de São Paulo, CEBIMAR - USP; São Sebastião-SP.

Jaboticabal, 23 de dezembro de 2021

## **DEDICATÓRIA**

Em memória de Mozart Gonçalves de Araújo, que entre comentários sarcásticos e pacotes de balas sortidas ensinou-me a ter leveza para viver e a sempre fazer o possível para ajudar quem precisa.

## AGRADECIMENTOS

“E” e “SE” são palavras que por si não apresentam ameaça, mas se colocadas juntas, lado a lado, têm o poder de nos assombrar a vida toda. “E se...”; “E se...”; “E se...”. A escolha de um caminho para trilhar é sempre acompanhada de incertezas, porém assumir riscos é o que torna a vida interessante. Tenho em mim uma fagulha que foi acesa há muito tempo, enquanto ainda era criança, o desejo de me tornar um professor. Hoje já poderia dizer que meu desejo se cumpriu, mas o que antes era uma fagulha, hoje se tornou uma chama e agora sou levado a buscar mais.

Minha jornada até aqui não foi solitária; sempre contei com as melhores amizades que alguém poderia ter. Agradecer em forma de palavras é o mínimo que posso fazer por essas pessoas que me ajudaram a chegar até aqui.

Em primeiro lugar eu agradeço a Deus, sempre. Sem Ele eu não teria saído da casa dos meus pais, não teria conhecido uma universidade federal, me graduado, e não teria conhecido anjos disfarçados de amigos que me ajudaram a seguir firme perante todas as adversidades que encontrei pelo caminho. Obrigado Senhor!

Agradeço à minha família por ser o meu porto seguro, o meu refúgio nos momentos mais difíceis. As broncas que levei quando criança, os ensinamentos, os almoços de domingo, tudo isso me ajudou a formar o meu caráter e a buscar ser sempre uma versão melhor de mim mesmo.

Agradeço a todos os amigos que fiz, os da minha terra e os do laboratório. Para o meu contentamento seria preciso mais do que um texto para conseguir citar o nome de todos aqueles que marcaram minha vida. As alegrias e as tristezas tornam-se mais leves quando são divididas, por isso eu agradeço por terem partilhado comigo os seus momentos e por terem me deixado partilhar os meus.

Agradeço à minha namorada por sempre me apoiar em minhas decisões, por ser o motivo da minha saudade de Alfenas, por tornar brandos os sofrimentos da vida acadêmica e por ser o meu amor.

Sempre haverá pessoas que sabem mais do que você, que já passaram pelo que você está passando e que possuem um conhecimento invejável de tão belo. Professora Talita Sarah Mazzoni, você foi a minha orientadora durante dois anos; primeiro gostaria de parabenizá-la pela paciência em corrigir os meus textos e por relevar todos os meus atrasos; em segundo gostaria de agradecer por todos os ensinamentos, conselhos, risadas e pelo carinho que teve para comigo enquanto estive com você. O sentimento que tenho por você só pode ser expresso pela palavra gratidão, embora esta seja uma palavra pequena, que não comporte tudo o que representa para mim e o quanto eu desejo o melhor para você.

Agradeço também ao Professor Rafael Henrique Nóbrega pela oportunidade de ingressar inicialmente como seu aluno neste programa de pós-graduação.

Agradeço à Professora Irani Quagio Grassiotto pelos ensinamentos indiretos que recebi através da minha orientadora e por tudo o que propiciou para a execução deste trabalho.

Agradeço ao meu grupo de pesquisa “Biologia da Reprodução de Peixes e Organismos Aquáticos” por ter me acolhido durante estes dois anos e pelas inestimáveis horas de prosa boa durante aqueles cafezinhos.

Agradeço à UNIFAL-MG e a todas as pessoas do Laboratório de Biologia Animal Integrativa por permitirem que realizasse minha pesquisa.

Agradeço à UNESP e ao CAUNESP por todo aprendizado que obtive ao longo do meu mestrado.

## **APOIO FINANCEIRO**

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001; e auxílio financeiro da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) – n° processo: APQ-02933-21.

## RESUMO

Os plásticos vêm se tornando uma crescente ameaça para o meio ambiente, afetando diversos organismos em quase todos os ecossistemas. Dentre os habitats mais afetados, destacam-se os ambientes aquáticos, visto que neles as condições adversas transformam grandes pedaços de plásticos em pequenas partículas, chamadas de microplásticos (MPs). Essas micropartículas entram na cadeia alimentar de diversos organismos causando inúmeras alterações fisiológicas que podem ser irreparáveis. Neste aspecto, o presente estudo teve por objetivo verificar a influência de MPs na biologia reprodutiva de *Danio rerio* (zebrafish) através de técnicas de histologia, imunohistoquímica e ensaio sorológico imunoenzimático de esteroides sexuais. Machos e fêmeas adultos de *D. rerio* foram expostos por 30 dias a duas concentrações diferentes de MPs (0,5g/L e 2,5g/L) e, posteriormente, separados para a reprodução. Todos os grupos experimentais foram capazes de reproduzir, entretanto o tempo de desenvolvimento embrionário foi retardado significativamente, embora a prole não tenha sido exposta diretamente aos MPs, resultando em alta mortalidade dos ovos nas duas concentrações testadas, além de causar malformações nos embriões que conseguiram se desenvolver. Análises histológicas demonstraram que a exposição aos MPs causou esteatoses, rompimento de hepatócitos, dilatação de sinusoides e lacerações em fígados de machos e fêmeas. Nos ovários houve hipertrofização das células foliculares, alterações estruturais nos oócitos vitelogênicos e aumento de centros melanomacrofágicos. Nos testículos, o acúmulo de gordura e vacuolizações nos compartimentos intersticial e germinativo levou a uma descaracterização do epitélio germinativo. Análises de imunohistoquímica demonstraram que a exposição aos MPs induziu a produção de vitelogenina em fígados de machos e possivelmente afetou sua produção em fêmeas com esteatose hepática, embora os níveis plasmáticos de hormônios esteroides sexuais masculinos e femininos não tenham sido alterados substancialmente, contribuindo para a fecundação dos ovos. Diante do exposto, a detecção de micropartículas nos diferentes tecidos de fêmeas e machos de zebrafish denunciam a ameaça dos MPs para a sobrevivência das espécies, especialmente dos peixes e outros animais aquáticos.

**Palavras-chave:** Microplásticos, reprodução, gônadas, hepatotoxicidade

## ABSTRACT

The plastics are becoming a growing threat to the environment, affecting many organisms in almost all ecosystems. Among the most affected habitats, aquatic environments stand out, once that some adverse conditions transform big plastics into small particles, called microplastics (MPs). These microparticles enter the food chain of several organisms causing numerous physiological changes, and sometimes irreparable. In this respect, the present study aimed to verify the influence of MPs on the reproductive biology of *Danio rerio* (zebrafish) through histology, immunohistochemistry and enzyme-linked immunosorbent assay of sex steroids. Adults males and females of *D. rerio* were exposed for 30 days to two different concentrations of MPs (0.5g/L and 2.5g/L) and, later, separated for reproduction. All experimental groups were able to reproduce, however the embryo development time was significantly delayed, although the offspring were not directly exposed to MPs, resulting in high egg mortality at the two concentrations tested, in addition to causing malformations in embryos that managed to develop. Histological analyzes showed that exposure to MPs caused steatosis, hepatocyte disruption, sinusoid dilatation and lacerations in male and female livers. In the ovaries, there was hypertrophy of follicle cells, structural changes in the vitellogenic oocytes and an increase in melanomacrophage centers. In the testes, the fat accumulation and vacuolization in the interstitial and germinal compartments led to a mischaracterization of the germinal epithelium. Immunohistochemical analyzes demonstrated that exposure to MPs induced vitellogenin production by the male livers and possibly it affected vitellogenin production in females with hepatic steatosis, although plasma levels of male and female sex steroid hormones were not altered, contributing to the success reproductive. Given the results presented, the detection of microparticles in different tissues from *zebrafish* females and males reveals the threat of MPs to the survival of species, especially fish and other aquatic animals.

**Keywords:** Microplastic, reproduction, gonads, hepatotoxicity

## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....	3
2.1. Os Peixes Teleostei e sua Biologia Reprodutiva .....	3
2.2. Controle Endócrino na Reprodução.....	6
2.3. Microplástico e o Ambiente Aquático.....	7
2.4. O Modelo Biológico.....	9
3. OBJETIVOS.....	11
4. MATERIAL E MÉTODOS .....	12
4.1. Os Animais.....	12
4.2. Grupos Experimentais.....	12
4.3. Análise dos Microplásticos com Ressonância Magnética Nuclear .....	15
4.4. Preparação do Material para a Microscopia de Luz.....	15
4.5. Imunohistoquímica para Localização da Vitelogenina .....	16
4.6. Identificação de Microplásticos .....	16
4.7. Quantificação dos Esteroides Plasmáticos .....	17
4.8. Análises Estatísticas .....	18
5. RESULTADOS.....	19
5.1. Qualidade da água .....	19
5.2. Análise dos Microplásticos com Ressonância Magnética Nuclear .....	21
5.3. Anatomia dos Órgãos Viscerais.....	22
5.4. Histologia dos Ovários.....	27
5.5. Histologia dos Testículos.....	32
5.6. Histologia dos Fígados de Fêmeas .....	36
5.7. Histologia dos Fígados de Machos.....	38

5.8. Desenvolvimento Embrionário .....	40
5.9. Imunohistoquímica.....	45
5.10. Digestão Ácida.....	46
5.11. Fluorescência .....	48
5.12. Níveis Plasmáticos de Esteroides Sexuais .....	51
6. DISCUSSÃO.....	53
6.1. Microplásticos e Órgãos Viscerais.....	53
6.2. Microplásticos e a Gônada Feminina.....	55
6.3. Microplásticos e a Gônada Masculina .....	57
6.4. Microplásticos, Reprodução e o Desenvolvimento Embrionário .....	58
7. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	60
8. CONCLUSÃO .....	61
9. REFERÊNCIAS .....	62
10. ANEXO .....	72

# 1. INTRODUÇÃO

Nas últimas décadas, o acúmulo de plásticos por todo planeta vem se tornando uma crescente ameaça para o meio ambiente, afetando diversos organismos nos mais diferentes ecossistemas (Castro et al., 2018). Dentre os ambientes mais afetados, destacam-se os ambientes aquáticos, visto que neles as condições adversas transformam grandes pedaços de plásticos em pequenas partículas, chamadas de microplásticos (MPs). Essas micropartículas entram na cadeia alimentar de diversos organismos (Castro et al., 2018) causando inúmeras alterações fisiológicas que podem ser irreparáveis.

No ambiente aquático, o monitoramento dos MPs constitui-se de um importante indicador de contaminação ambiental (Horton et al., 2017) e os riscos potenciais dessas partículas (incluindo os nanoplásticos) nos diferentes organismos (como peixes e humanos) a níveis celulares e moleculares em relação aos estágios iniciais da vida, metabolismo e reprodução, fazem dos peixes excelentes modelos biológicos. Tais animais, além de apresentarem características que permitem seu uso em diferentes meios experimentais, estão em contato direto com o ambiente aquático, o qual pode apresentar elevadas concentrações e diversidade de plásticos. Além disso, muitas espécies de peixes encontram-se no topo da cadeia trófica (Christensen e Pauly, 1993) podendo bioacumular uma maior concentração destes compostos em relação a outros animais. Entretanto, além de poderem ser usados como biomarcadores para monitoramento ambiental aquático, a história de vida dos peixes pode sofrer danos irreversíveis no futuro, visto que os MPs podem afetar a produção de gametas, a fertilização e os estágios iniciais da vida (Pitt et al., 2018a), eventos estes cruciais para a sobrevivência e evolução das espécies biológicas.

Apesar dos MPs já terem sido detectados em organismos de todos os níveis da cadeia alimentar, seus possíveis efeitos como desreguladores endócrinos na reprodução e os mecanismos que afetam a gametogênese, a fertilização e o desenvolvimento larval permanecem pouco compreendidos nos peixes e vertebrados em geral. Um recente estudo em *Danio rerio* relatou a transferência materna de nanoplásticos para a prole e bradicardia nas larvas

derivadas de pais expostos a MPs (Pitt et al., 2018a, 2018b). Em adição, Cedervall e colaboradores (2012) mostraram que nanopartículas de poliestireno, fabricadas comercialmente, são transportadas através da cadeia alimentar aquática, a partir das algas, ingeridas por zooplâncton e posteriormente por peixes, afetando seu comportamento e metabolismo lipídico.

Considerando que estudos recentes mostraram que entre 70 a 80% dos MPs existentes nas águas oceânicas, são provenientes de rios, resultantes de atividades antrópicas (Horton et al., 2017), é de suma importância o estudo da ação do MPs na atividade reprodutiva dos peixes, visto que substâncias associadas aos MPs, como ftalatos e bisfenol A, comumente utilizadas para lhe conferir propriedades especiais, são tidas como desreguladores endócrinos, ou seja, apresentam capacidade para alterar negativamente o funcionamento do sistema hormonal. Adicionalmente, quando expostos no ambiente, os nanoplásticos podem, através da ingestão, atravessar as barreiras biológicas, como a membrana plasmática (da Costa et al., 2016), penetrando e se acumulando nos tecidos e órgãos, podendo haver, conseqüentemente, efeitos toxicológicos e deletérios, alteração das funcionalidades celulares (da Costa et al., 2016), inibição de crescimento, desordens comportamentais e alimentares, disfunção reprodutiva, mobilidade reduzida e até mesmo a morte dos organismos aquáticos (Ma et al., 2016; da Costa, 2018).

Neste sentido, estudos sobre a biologia reprodutiva em peixes, frente à exposição MPs no ambiente são imprescindíveis para o entendimento de possíveis alterações causadas por estes compostos nos mecanismos celulares, permitindo o estabelecimento de medidas de conservação da ictiofauna, um bom desempenho das pisciculturas, e possibilitando também o desenvolvimento de novos protocolos reprodutivos que podem vir a ser aplicados a diferentes modelos experimentais e/ou usados em pesquisas básicas.

## **2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**

### **2.1. Os Peixes Teleostei e sua Biologia Reprodutiva**

Os peixes Teleostei constituem mais de 30.000 espécies (Nelson et al., 2016) que habitam quase todos os ambientes aquáticos, como lagos, rios, estuários e oceanos, nas mais diversas latitudes e altitudes, sendo tantos marinhos, de água doce ou de águas salobras (Jobling, 1996; Nelson et al., 2016). Ocorrem, portanto, em uma grande diversidade de habitat, estando submetidos às diferentes condições ambientais, constituindo, assim, um grupo extremamente amplo em termos de anatomia, comportamento e ecologia (Nakatani et al., 2001). Essa diversidade de ambientes representa uma grande variedade nas condições ambientais, em que as diferentes espécies de peixes têm que tolerar e, por isso, esses animais apresentam diversos mecanismos de adaptação fisiológica (Rankin e Jensen, 1993). Na água, as propriedades físico-químicas como temperatura, pH, concentração de oxigênio e salinidade, por exemplo, exercem grande influência na sua fisiologia e a variação desses parâmetros apresentam desafios à manutenção da homeostase, exigindo ajustes fisiológicos, podendo afetar sua biologia reprodutiva.

Os Teleostei, em sua maioria, são predominantemente dioicos (Nagahama, 1983). Sua reprodução é cíclica e sazonal, ocorrendo uma série de modificações morfo-fisiológicas em suas gônadas (Nagahama, 1983). Seu ciclo reprodutivo ocorre em função da variação das condições ambientais, sendo que a temperatura e o fotoperíodo são considerados os mais potentes moduladores da atividade reprodutiva (Billard, 1986). Esses animais apresentam inúmeras estratégias reprodutivas (Nagahama, 1983; Vazzoler, 1996; Nakatani et al., 2001). Dentre estas, mecanismos como a liberação dos gametas no ambiente aquático para a fertilização externa e até estratégias mais complexas, como o desenvolvimento de órgãos especializados para a fertilização interna, seguida da liberação dos ovos fertilizados ou ainda podem apresentar gestação interna dos embriões (Le Gac e Loir, 1999; Moreira et al., 2001).

Durante a formação do gameta feminino, o epitélio germinativo passa por uma série de modificações. A partir da proliferação e diferenciação das oogônias,

estas entram em meiose originando os oócitos profásicos iniciais, que se projetam em direção ao estroma ovariano (Grier, 2000). Ao final do paquíteno, células pré-foliculares, avançam por entre esses oócitos, individualizando-os, formando os folículos ovarianos (Matova e Cooley, 2001; Quagio-Grassiotto et al., 2011). O desenvolvimento do oócito ocorre dentro do complexo folicular e compreende os estágios de crescimento primário e secundário, maturação e ovocitação (Grier et al., 2009). Os crescimentos primário e secundário são conhecidos respectivamente como estágios pré-vitelogênico e vitelogênico (Tyler e Sumpter, 1996; Patiño e Sullivan, 2002; Grier et al., 2009). Durante o período pré-vitelogênico, uma grande quantidade de RNAm acumula-se no citoplasma, as organelas membranosas proliferam, a zona pelúcida é formada e, em muitas espécies, principalmente aquelas que liberam os ovos na água salgada, aparecem gotas de lipídeo ao redor do núcleo. Os precursores dos alvéolos corticais iniciam sua formação que se completa ao final do período pré-vitelogênico (Selman e Wallace, 1989). A progressiva deposição de vitelo e o espessamento da zona pelúcida caracterizam a vitelogênese ou crescimento secundário (Wallace e Selman, 1990). Durante o crescimento secundário, a vitelogenina sintetizada pelo fígado e liberada na circulação sanguínea, é incorporada pelo oócito e dá origem aos glóbulos ou grânulos de vitelo (Patiño e Sullivan, 2002; Le Menn et al., 2007; Grier et al., 2009). A vitelogênese progride até que o oócito esteja completamente desenvolvido e o ooplasma totalmente preenchido pelos glóbulos de vitelo. Ao término do desenvolvimento secundário o oócito entra em maturação.

A maturação do oócito de peixes é caracterizada pela migração do núcleo ou vesícula germinativa em direção ao polo animal, no qual a micrópila está localizada, pela quebra da vesícula germinativa, ou seja, pela fragmentação do envoltório nuclear e retomada da meiose. Durante a maturação na maioria das espécies marinhas, as gotas de lipídeo formadas durante os crescimentos primário e secundário fundem-se progressivamente em um único e grande glóbulo. Nas espécies com ovos pelágicos, os glóbulos de vitelo também se fundem precedendo a ovocitação; o vitelo é hidrolisado e, devido à força osmótica dos aminoácidos livres, hidratado (Patiño e Sullivan, 2002; Le Menn et al., 2007; Grier et al., 2009). Nas espécies com ovos bentônicos, a hidrólise do

vitelo é limitada e conseqüentemente a hidratação do vitelo é mais discreta (La Fleur et al., 2005). A ovocitação pode então ocorrer com o oócito sendo liberado do interior do complexo folicular para o lúmen ovariano (Patiño e Sullivan, 2002; Grier et al., 2009).

Após a desova, os ovos de peixes podem ser de dois tipos: pelágicos (Moreira et al., 2001) ou adesivos (Mansour et al., 2009), apresentando diferentes graus de densidade e adesividade, respectivamente (Kunz, 2004). Durante a fertilização, o espermatozoide associa-se à superfície do oócito através da micrópila; ocorre reconhecimento dos gametas, seguido da adesão e fusão de suas membranas citoplasmáticas (Hart, 1990). Através da reação cortical, na qual o conteúdo dos grânulos corticais é liberado no espaço perivitelínico, forma-se a membrana de fertilização (córion) e o ovo torna-se impermeável a um próximo espermatozoide (Gilbert, 2003). Como consequência da fecundação, o metabolismo do ovo é ativado e iniciam-se as divisões mitóticas, no processo de clivagem. Após a formação da blastoderme, os folhetos germinativos darão início ao seu processo de diferenciação durante a gastrulação (Kunz, 2004), formando um embrião e posteriormente uma larva que irá continuamente se desenvolver até sua fase juvenil e adulta.

Da mesma forma que o epitélio germinativo feminino, o epitélio germinativo masculino passa por uma série de modificações para formação dos gametas. Assim, através do processo de espermatogênese, compreendida como uma sequência de eventos morfo-funcionais, as espermatogônias transformam-se em espermatozoides aptos para a fertilização. Nos peixes Teleostei, as espermatogônias destinadas à espermatogênese são envoltas individualmente por processos citoplasmáticos das células de Sertoli. A produção das células gaméticas masculinas ocorre, portanto, no interior dos cistos, com desenvolvimento sincrônico, no epitélio germinativo que reveste o compartimento seminífero dos testículos (Grier et al., 2009; Nóbrega et al., 2009; Schultz et al., 2010). Nos cistos as espermatogônias proliferam, e ao entrarem em meiose dão origem aos espermátócitos I, os quais por sua vez, com a progressão da meiose, dão origem aos espermátócitos II. O término da meiose resulta na formação das espermátides que em geral completam a sua diferenciação no interior dos cistos. Ao final da espermiogênese, os cistos

abrem-se e os espermatozoides são liberados no compartimento luminal dos testículos (Grier et al., 2009; Nóbrega et al., 2009; Schultz et al., 2010).

## **2.2. Controle Endócrino na Reprodução**

A reprodução é um processo complexo e a interação do animal com o ambiente resulta em alterações fisiológicas diversas (Kim et al., 2006), cujas respostas determinam as estratégias reprodutivas e o sucesso da reprodução nas diferentes espécies. Mediadas pelo eixo hipotálamo-hipófise-gônadas, os estímulos para a reprodução iniciam-se pela liberação do hormônio liberador de gonadotropinas (GnRH), pelo hipotálamo (Kim et al., 2006), diretamente sobre a hipófise. Esta secreta uma série de hormônios que atuam como fatores-chave para a regulação da reprodução (Swason et al., 2003).

O hormônio folículo estimulante (FSH) e o hormônio luteinizante (LH) são importantes gonadotropinas secretadas durante o ciclo reprodutivo (Levavi-Sivan et al., 2010). Através da corrente sanguínea chegam às gônadas e em ambos os sexos desempenham dupla função: desenvolvimento de células germinativas e produção de esteroides (Hafez et al., 2004). Os esteroides são importantes agentes metabólicos que atuam sobre os mais diversos aspectos, tendo nos peixes, importante influência sobre o crescimento (Cleveland e Weber, 2015) e reprodução (Munakata e Kobayashi, 2010).

As mudanças no perfil de esteroides sexuais ao longo do ciclo reprodutivo podem ser evidenciadas e utilizadas como indicadores de atividade reprodutiva, tanto para machos (Degani et al., 1998; Barcellos et al., 2002) quanto para fêmeas de Teleostei (Barcellos et al., 2001; Arantes et al., 2010). Devido à integração dos processos fisiológicos envolvidos na reprodução, a ação dos hormônios se reflete diretamente sobre o desenvolvimento das gônadas (Munakata e Kobayashi, 2010), que é dependente da modificação das células germinativas (Grier e Lo Nostro, 2000; Brown-Peterson et al., 2002). Essas alterações celulares refletem-se sob os aspectos morfológicos das gônadas, modificando sua forma, tamanho, cor e textura, parâmetros estes utilizados para a identificação do período reprodutivo (Vazzoler, 1996; Andrade et al., 2010; Mazzoni et al., 2020). Associado a isso, a observação do epitélio germinativo

permite a verificação dos estágios de desenvolvimento celular nos ovários e testículos, promovendo a caracterização de fases reprodutivas durante o ciclo reprodutivo dos peixes (Brown-Peterson et al., 2011; Mazzoni et al., 2020).

Durante o desenvolvimento ovariano, o FSH atua na fase de crescimento oocitário, tendo um papel predominante na regulação do crescimento de oócitos vitelogênicos, ativando a produção de 17 $\beta$ -estradiol pelos próprios folículos ovarianos. Os estrógenos estão relacionados a processos de proliferação celular (Schulz e Miura, 2002) e são especialmente citados no processo de oogênese, no qual o estradiol circulante age no fígado estimulando a produção de vitelogenina, que é incorporada nos ovócitos em desenvolvimento (Tyler e Sumpter, 1996; Lubzens et al., 2010).

Já os andrógenos estão envolvidos com a proliferação celular e espermatogênese (Miura e Miura, 2003), início da puberdade e maturação espermática (Schulz et al., 2010), além de atuarem sobre o comportamento reprodutivo (Munakata e Kobayashi, 2010) e sobre a regulação da via hipotálamo e hipófise (Schulz e Henk, 1999).

### **2.3. Microplástico e o Ambiente Aquático**

Nos últimos anos, a presença de resíduos plásticos nos ambientes costeiro e marinho tornou-se uma preocupação internacional devido à grande quantidade de partículas plásticas encontradas em amostras planctônicas, sedimentos e biota marinha (Castro et al., 2018). Considerados não biodegradáveis, os resíduos plásticos sofrem ação da radiação solar, decompondo-se em partículas de menor tamanho, denominadas de MPs (Watson, 2001). Os MPs são partículas menores que 05mm originadas de plásticos maiores que podem ser classificados como fontes primárias ou secundárias (IMO, 2015; Castro et al., 2018). As fontes primárias são materiais maiores, fabricados propositalmente em dimensões específicas para aplicação industrial como grânulos, pellets e microesferas abrasivas utilizadas em produtos de limpeza e higiene (IMO, 2015). Já quando as partículas são oriundas da ruptura e/ou lavagens de roupas sintéticas ou outras peças plásticas maiores, esses materiais são classificados como fontes secundárias (IMO, 2015). Esses

MPs, onipresentes nos ambientes marinho e dulcícola, são considerados contaminantes de preocupações emergentes, sendo encontrados em vários lugares do mundo, como na coluna d'água (Zhang et al., 2017), em sedimentos marinhos e praias (Alomar et al., 2016; Retama et al., 2016), efluentes de águas residuais (Gallagher et al., 2016) e no gelo polar do Ártico (Obbard et al., 2014). Embora onipresentes, potenciais implicações ecológicas e toxicológicas adversas dos MPs e nanoplásticos (partículas menores que 100nm) são amplamente desconhecidas (Andrady, 2011).

Devido ao seu pequeno tamanho, os MPs podem ser ingeridos por diferentes representantes da biota aquática, desde organismos planctônicos até vertebrados como peixes, répteis aquáticos, aves e até baleias (Cole et al., 2013; Lusher et al., 2015; Ferreira et al., 2016; Wesch et al., 2016; Auta et al., 2017; Castro et al., 2018). Essa ingestão pode causar estresses patológicos, como falsa saciedade, subnutrição, comprometimento das reações enzimáticas, estresse oxidativo, redução na taxa de crescimento e complicações reprodutivas (Besseling et al., 2014; Fossi et al., 2016; Sutton et al., 2016; Aljaibachi e Callaghan, 2018; Castro et al., 2018). Junto aos efeitos fisiológicos, os MPs podem servir como substrato para a formação de biofilme em sua superfície, carregando vários patógenos que podem causar doenças (Harrison et al., 2014; Castro et al., 2018). Outro fator agravante é o fato de que poluentes organoclorados, como bifenilos policlorados (PCBs), hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs) e pesticidas organoclorados, possuem alta afinidade com materiais plásticos, tendendo a serem adsorvidos e acumulados na superfície do MP (Teuten et al., 2007), assim como alguns metais pesados como ferro e alumínio (Vedolin et al., 2017). Portanto, os MPs oferecem um duplo risco, agindo como vetores para contaminantes e liberando substâncias da lixiviação plástica, como o bisfenol A e os ftalatos, ambos possuindo efeitos cancerígenos, teratogênicos e mutagênicos já conhecidos nos organismos (Browne et al., 2013; Zhang et al., 2016).

A presença de plásticos no ambiente causa efeitos de anomalia e morte no desenvolvimento larval de invertebrados (Nobre et al., 2015; Gandara e Silva et al., 2016), inibe várias vias enzimáticas e metabólicas em invertebrados e vertebrados (Anbumani e Kakkar, 2018), induz o estresse oxidativo como

respostas subcelulares (Paul-Pont et al., 2016) e afeta a reprodução diminuindo a mobilidade espermática, fecundidade, tamanho do ovo, incubação e sobrevivência da progênie em invertebrados (Cole et al., 2015; Cui et al., 2017). Além disso, vários estudos também demonstraram que os nanoplásticos podem se acumular no ambiente aquático e também levar a alterações fisiológicas, embora muito menos se saiba sobre os efeitos toxicológicos dessas nanopartículas (Cozar et al., 2014). As nanopartículas de poliestireno podem se acumular no cérebro de adultos do cyprinídeo *Carassius carassius*, induzindo alterações morfológicas cerebrais e comportamentais (Mattsson et al., 2017). Curiosamente, embriões e larvas do *zebrafish* *Danio rerio* expostos a nanopartículas de poliestireno também mostraram alterações comportamentais, além de estresse oxidativo e redução da atividade da acetilcolinesterase (Chen et al., 2017). Estudos semelhantes demonstraram que os nanoplásticos (poliestireno) podem penetrar no córion de *zebrafish* e se acumular no saco vitelino e em outras regiões, levando a bradicardia e hipoatividade locomotora nos embriões / larvas (Pitt et al., 2018a). Um estudo recente mostrou que fêmeas adultas de *zebrafish* expostas a nanoplásticos pode transferir essas partículas de plástico para a prole, afetando o sistema antioxidante em tecidos adultos e larvas de F1 (Pitt et al., 2018b).

#### **2.4. O Modelo Biológico**

*Danio rerio*, conhecido popularmente como *zebrafish* ou paulistinha, pertence à família Cyprinidae e é um pequeno peixe teleósteo (3 - 4 cm) de água doce. Muito popular na aquariorfilia como espécie ornamental, apresenta grande tolerância a variações ambientais e a manipulações em cativeiro, podendo viver até três anos de idade (Dammski et al., 2011). Nativo do sul da Ásia, *Danio rerio* é originário dos principais rios da Índia, Bangladesh e Nepal. São onívoros e, na natureza, suportam grande variações de pH (5.9 a 8.5) e temperatura (16 a 38°C). Vivem em cardumes e se acasalam em grupos, durante o início da manhã. As fêmeas espalham seus ovos sobre o substrato, sem apresentar cuidado parental. Os ovos, demersais e não adesivos, desenvolvem-se rapidamente, dando origem às larvas após o período de 24 a 48h (Dammski et al., 2011).

*Danio rerio* é uma espécie que vem sendo cada vez mais utilizada como modelo experimental nas mais diversas áreas de pesquisas científicas, incluindo estudos referentes à saúde e doenças humanas (Westerfield, 1994) e mais recentemente sobre os efeitos de micro e nanoplasticos (Bhagat et al., 2020). As principais justificativas para isso devem-se ao seu pequeno tamanho, facilidade na criação e manutenção, além de apresentar importante homologia com os mamíferos, incluindo seres humanos (Lieschke e Currie, 2007). Nos últimos anos, a espécie tem sido bastante utilizada para determinação de mutações e identificação de genes funcionalmente importantes, uma vez que seu genoma se encontra inteiramente sequenciado (Briggs, 2002). Dessa forma, *Danio rerio* constitui-se de um excelente modelo experimental para o desenvolvimento da proposta aqui apresentada, devido à sua alta taxa reprodutiva, rápido desenvolvimento embrionário (Dammski et al., 2011) e por apresentar ovos transparentes, que permitem sua manipulação em laboratório. Dada essa enorme versatilidade da espécie, as pesquisas científicas têm sido grandemente beneficiadas pela expansão dos estudos com *Danio rerio*, uma vez que os resultados obtidos em laboratório podem, muitas vezes, serem extrapolados para outros Teleostei, além de sua aplicação, na aquicultura, para outras espécies, especialmente àquelas de difícil manipulação, como peixes marinhos.

### 3. OBJETIVOS

Com base nas informações apresentadas, o presente estudo teve por objetivos:

- 1) Verificar possíveis alterações na reprodução dos espécimes após a exposição aos MPs;
- 2) Verificar, através da microscopia óptica e análises histológicas, possíveis alterações no desenvolvimento larval e embrionário da prole, frente à exposição aos MPs;
- 3) Analisar as estruturas gonadais femininas e masculinas, bem como as alterações do epitélio germinativo de *Danio rerio* utilizando técnicas histológicas, de indivíduos que desovaram após o período de exposição aos MPs;
- 4) Analisar as estruturas hepáticas femininas e masculinas, por meio de técnicas histológicas, após o período de exposição ao MP;
- 5) Quantificar os níveis plasmáticos dos hormônios esteroides (11-cetotestosterona, estradiol e testosterona) em fêmeas e machos de *D. rerio* pela técnica imunoenzimática de ELISA após exposição ao MP;
- 6) Detectar, através de imunohistoquímica, a produção de Vitelogenina pelos hepatócitos de fígados de indivíduos femininos e masculinos;
- 7) Identificar a presença de MPs nos tecidos das amostras analisadas, por meio de digestão ácida;
- 8) Verificar, por microscopia de fluorescência, a presença e localização de MPs nas gônadas e nos fígados de indivíduos adultos, e em embriões de *D. rerio*.

## 4. MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1. Os Animais

Animais adultos de *D. rerio* foram adquiridos por reprodução em cativeiro junto ao Grupo de Pesquisa BIOREPOAQUA (Biologia da Reprodução de Peixes e Organismos Aquáticos) na cidade de Alfenas - MG, e transferidos para o laboratório, onde foram mantidos por 40 dias para aclimatação em aquários de 200 litros, com temperatura de  $27 \pm 1^\circ\text{C}$ ,  $\text{pH} = 7.0 \pm 2$  e fotoperíodo ambiente. Após aclimatação dos espécimes, 20 indivíduos adultos (10 fêmeas e 10 machos) foram transferidos para aquários individuais de 20 litros para montagem dos grupos experimentais. Durante todo período, os peixes foram alimentados exclusivamente com ração comercial para peixes “Tetra® Color Bits” e “Alcon Basic® Large Flakes”, duas vezes ao dia.

### 4.2. Grupos Experimentais

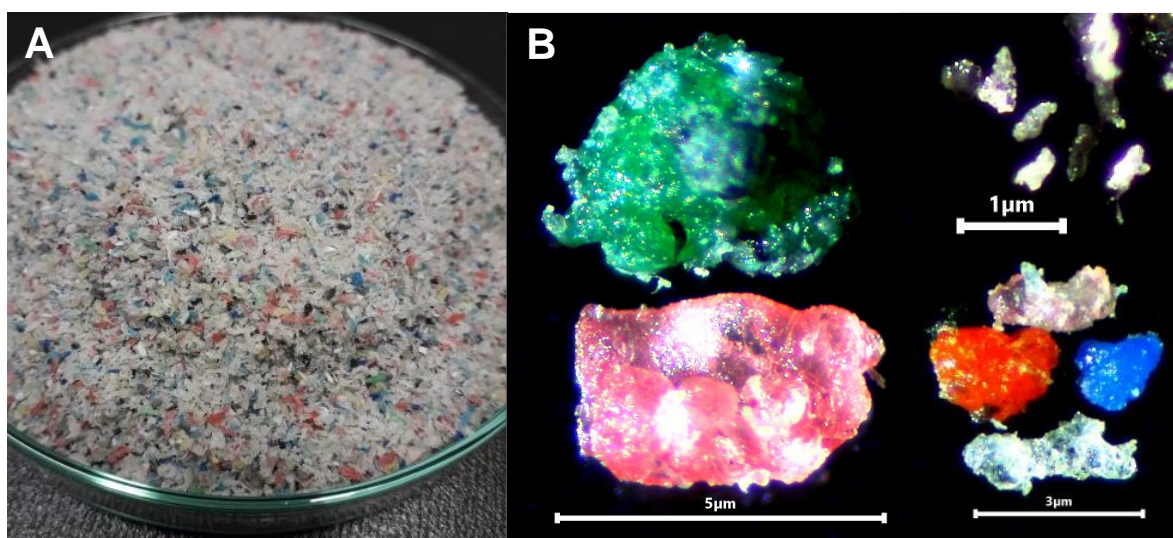
Para testar a influência dos MPs na maturação dos gametas e atividade reprodutiva dos peixes, os animais foram separados em 3 grupos experimentais: grupo controle e grupos expostos a diferentes concentrações de MPs (0,5g/L e 2,5g/L), utilizadas em estudos prévios com mexilhões (Browne et al., 2008; Von Moos et al., 2012). Cada grupo experimental continha 10 fêmeas e 10 machos, sendo realizadas 3 réplicas, duas destinadas a coleta de gônadas e fígados para histologia e sangue para quantificação de esteroides plasmáticos, a terceira réplica foi destinada a digestão ácida de tecidos variados.

Com base em estudos de coleta e identificação de MPs em ambientes aquáticos (Eerkes-Medrano et al., 2015) optou-se pelo uso de micropartículas de plástico com cores variadas, formatos irregulares e tamanhos de 1 a  $5\mu\text{m}$  (Fig. 1), para que houvesse verossimilhança com o que realmente ocorre no meio ambiente. Os MPs utilizados neste estudo possuíam autofluorescência e foram adquiridos na empresa de reciclagem PROFILM Embalagens Plásticas, situada na cidade de Divinópolis-MG.

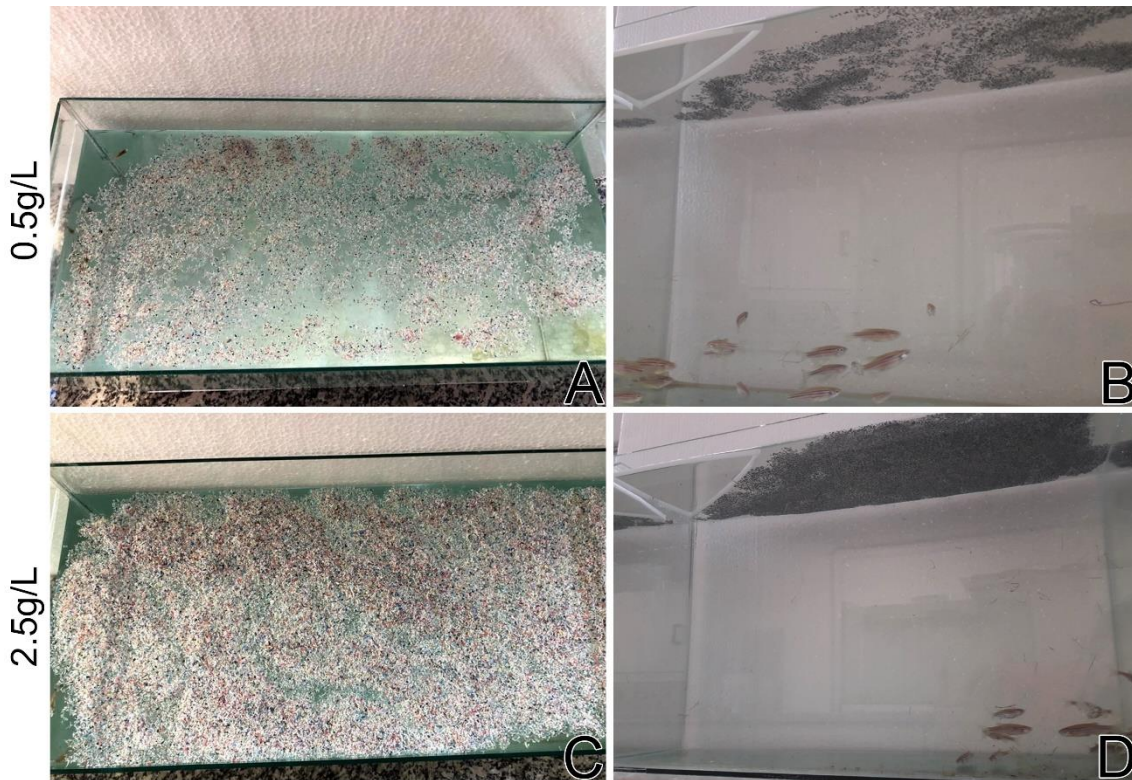
Os MPs foram depositados superficialmente nos aquários e deixados durante um período de 30 dias (Fig. 2 e 3), durante o experimento os valores de

pH foram medidos diariamente utilizando um phmetro de bancada (Mylabor). Concluído o período de exposição os animais aptos à desova, de cada um dos grupos, foram transferidos para aquários individuais de 15 litros, para a reprodução, na proporção de 3 machos para 1 fêmea por aquário (Fig. 4). Após a desova e fertilização, ovos e embriões foram contados e coletados diariamente desde o momento da fertilização até a eclosão das primeiras larvas para avaliação da viabilidade dos mesmos. Ao final da reprodução, o equivalente a 12 horas após a montagem dos grupos de reprodução, os animais adultos também foram coletados e dissecados para análises de suas gônadas e fígados. Amostras de sangue dos adultos foram coletadas e utilizadas para ensaios de dosagem hormonais.

Os espécimes foram anestesiados por imersão em solução aquosa de benzocaína, dissolvida em álcool absoluto na dose de 1 mg/L, eutanasiados de acordo com as normas da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA - nº 4503250320 - IBB – UNESP – BOTUCATU, em anexo) e transferidos para diferentes soluções fixadoras, específicas para cada metodologia.



**FIGURA 1.** Microplásticos utilizados para avaliar seus efeitos na biologia reprodutiva. **(A)** Microplásticos observadas a olho nu. **(B)** Microplásticos observados por microscopia de luz salientando sua variação de tamanho.



**FIGURA 2.** Montagem do experimento. (A-B) Grupo experimental de 0,5g/L, (A) visão superior do aquário, (B) visão inferior do aquário. (C-D) Grupo experimental de 2,5g/L, (C) visão superior do aquário, (D) visão inferior do aquário.



**FIGURA 3.** Para que os peixes conseguissem se alimentar corretamente estruturas triangulares feitas com canudos de plástico foram colocadas nos aquários dos grupos experimentais. Dessa forma foi criada uma área sem microplásticos na superfície da água



**FIGURA 4.** Grupo de reprodução composto por três machos e uma fêmea. Uma tela foi colocada no fundo dos aquários de reprodução para isolar os embriões dos adultos.

#### **4.3. Análise dos Microplásticos com Ressonância Magnética Nuclear**

Para detectar a composição dos microplásticos utilizados neste trabalho foi realizada uma análise de ressonância magnética nuclear (RMN). Para a obtenção dos espectros de ressonância magnética nuclear de  $^1\text{H}$  e de  $^{13}\text{C}$  foi utilizado um espectrômetro Bruker AC-300 operado em 300 MHz ( $^1\text{H}$ ) e em 75 MHz ( $^{13}\text{C}$ ) do Laboratório de Ressonância Magnética Nuclear da UNIFAL-MG.

Como referência interna, foi utilizado o pico do tetrametilsilano (TMS) ou o sinal interno residual do solvente. Os deslocamentos químicos ( $\delta$ ) são expressos em partes por milhão (ppm) e as constantes de acoplamento (J) obtidos através do programa Mestre Nova, em Hertz (Hz). A numeração adotada para os átomos nas estruturas não corresponde à numeração da nomenclatura IUPAC. Isso foi feito para que os compostos com estruturas análogas pudessem ter seus dados de RMN comparados, quando necessário.

#### **4.4. Preparação do Material para a Microscopia de Luz**

No total 20 amostras de gônadas e fígados, pertencentes a machos e fêmeas, foram fotografadas em estereomicroscópio e fixadas em solução de glutaraldeído 2% e paraformaldeído 4% em tampão Sorensen (0,1M a pH 7,2)

por pelo menos 24 horas. Posteriormente, foram desidratadas em uma série crescente de etanol, infiltradas e incluídas em historesina (Leica). Os cortes histológicos com 3µm de espessura, obtidos em micrótomo equipado com navalhas de aço, foram corados com Azul de Toluidina – Bórax e Ácido Periódico de Schiff (PAS) + Hematoxilina + Metanil Yellow (Quintero-Hunter et al., 1991) para análise no microscópio fotônico. A documentação do material foi realizada através de um sistema de foto-documentação digital (AMScope MU-1000 Software).

#### **4.5. Imunohistoquímica para Localização da Vitelogenina**

Para detecção da vitelogenina, fragmentos de fígado de fêmeas e machos adultos foram fixados em solução de paraformaldeído 4% por 1-3h, e mantidos em álcool 70% (etanol) até o início do processamento. O material foi lavado em tampão TBS (tris +tampão fosfato, 5mM, pH 7.6), por 5 minutos. Foi realizado um bloqueio da peroxidase endógena (3% de peróxido de hidrogênio em TBS) por 15 minutos e posterior recuperação antigênica em panela a vapor, com tampão citrato (0,01M; pH 6,0) por 20 minutos. As amostras foram então lavadas em tampão TBS e o bloqueio inespecífico realizado com soro bloqueador (5% de leite Molico desnatado, em tampão TBS) por 15 minutos. O material foi incubado com anticorpo primário policlonal anti-Vitelogenina (1:50) (Rhea Biotech – IM-0129) por 2h em temperatura ambiente (em câmara úmida). As amostras foram lavadas e incubadas com o polímero MR HRP-Polymer (MACH4 Universal HRP Polymer Kit) por 30 minutos. O material foi revelado com DAB (3',3'-diaminobenzidina, dissolvido em TBS) e 0,03% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, contrastado com hematoxilina de Harris, e as lâminas histológicas foram montadas.

#### **4.6. Identificação de Microplásticos**

Após os 30 dias de exposição aos MPs foram coletados gônadas, fígados, trato digestivo e carcaças (compostas por pele, tecido muscular e esqueleto) de adultos, 10 fêmeas e 10 machos, de cada grupo experimental para verificação da presença de MPs. Foram utilizadas duas técnicas distintas e complementares:

- **Identificação de Microplásticos por Digestão Ácida:** As amostras foram congeladas a  $-20^{\circ}\text{C}$  e em seguida foram maceradas em um cadinho com a ajuda de um almofariz. Após a maceração, o conteúdo do cadinho foi lavado com uma solução saturada de NaCl (0,36g/mL) e filtrado em filtros Whatman de fibra de vidro de  $0,6\mu\text{m}$ . Em seguida os filtros foram depositados em placas de Petri contendo peróxido de hidrogênio ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) a 15% para a digestão de restos de matéria orgânica e deixados em uma estufa à  $60^{\circ}\text{C}$  por 24h (adaptado de Avio e Regoli, 2015). O material retido foi depositado em lâminas para visualização em microscopia fotônica e estereomicroscópio.

- **Identificação de Microplásticos por Fluorescência:** Cortes histológicos com  $3\mu\text{m}$  de espessura, processados em historesina, foram lavados em tampão TBS e as lâminas histológicas montadas com meio de montagem com DAPI (Fluoroshield Mounting Medium with DAPI - Sigma-Aldrich) para detecção dos núcleos e observados em microscópio de fluorescência (BX61 Olympus), usando filtro FITC.

#### **4.7. Quantificação dos Esteroides Plasmáticos**

Para a dosagem dos esteroides plasmáticos foram utilizados pools de 20 machos e 20 fêmeas, de cada grupo experimental; o sangue foi coletado após o período de exposição aos MPs. Para obtenção do plasma sanguíneo, os animais foram anestesiados com solução de benzocaína, e com o uso de seringas de insulina Ultra-Fine 0,5CC, agulha 6mm, heparinizadas, o sangue foi coletado por punção cardíaca. Em seguida as amostras de sangue depositadas em tubo plástico de 1ml, foram centrifugadas por 15 minutos a 3000 g. O plasma obtido foi condicionado em tubos plásticos e mantido a  $-20^{\circ}\text{C}$  até o momento do ensaio. Os esteroides gonadais 11-cetotestosterona (11-KT), testosterona (T) e  $17\beta$ -estradiol (E2) foram quantificados no plasma dos animais pela técnica imunoenzimática de ELISA (*Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay*) – método competitivo. Para a dosagem de E2, e 11-KT e T foram utilizados kits da marca Interkit e Cayman Chemicals, respectivamente. O protocolo consistiu no estabelecimento da curva padrão, incubação das amostras com enzimas conjugadas e lavagem das amostras. A leitura das placas foi realizada em leitora de microplaca ELISA Asys Hitech GmbH - Microplate Reader Expert Plus

(BIOCHROM), por meio da absorbância, utilizando um comprimento de onda de 450 nanômetros (nm) para E2, e 412nm para 11-KT e T, segundo recomendação dos fabricantes.

#### **4.8. Análises Estatísticas**

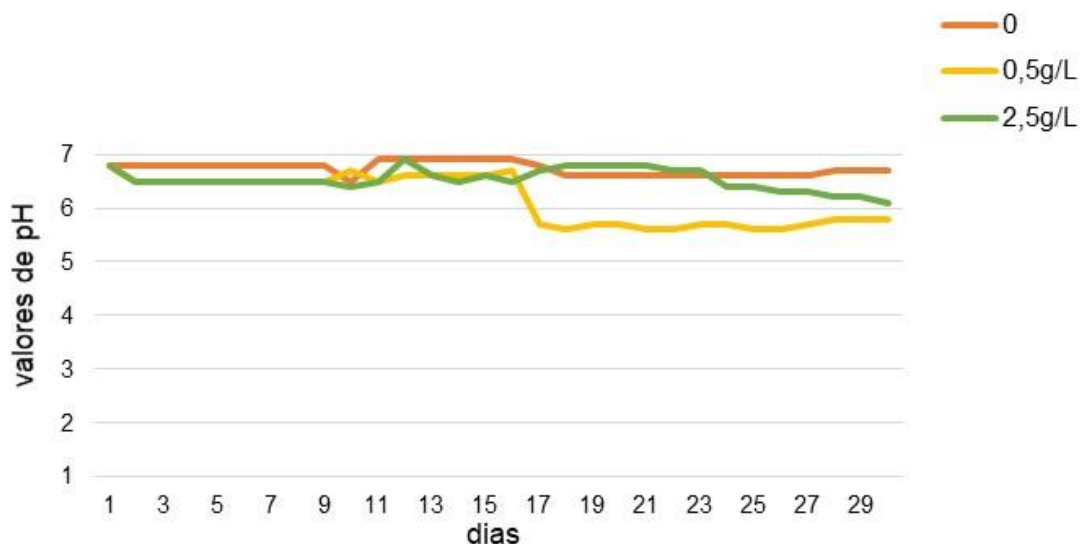
Os dados obtidos dos níveis plasmáticos foram apresentados na forma de “média + desvio padrão da média”, os quais foram submetidos à análise variância (one way ANOVA) e ao teste de Tukey (Statistica® 7.0), quando obtidos dados com diferença significativa (com nível de significância (p) menor que 0.05). Para a contagem dos ovos e embriões, os dados obtidos e apresentados na forma de “média + desvio padrão da média” e em “porcentagem”, foram submetidos ao teste de Dunnett (Statistica® 7.0), após análise variância (one way ANOVA), quando obtidos valores com diferença significativa (com nível de significância (p) de 0.05).

## 5. RESULTADOS

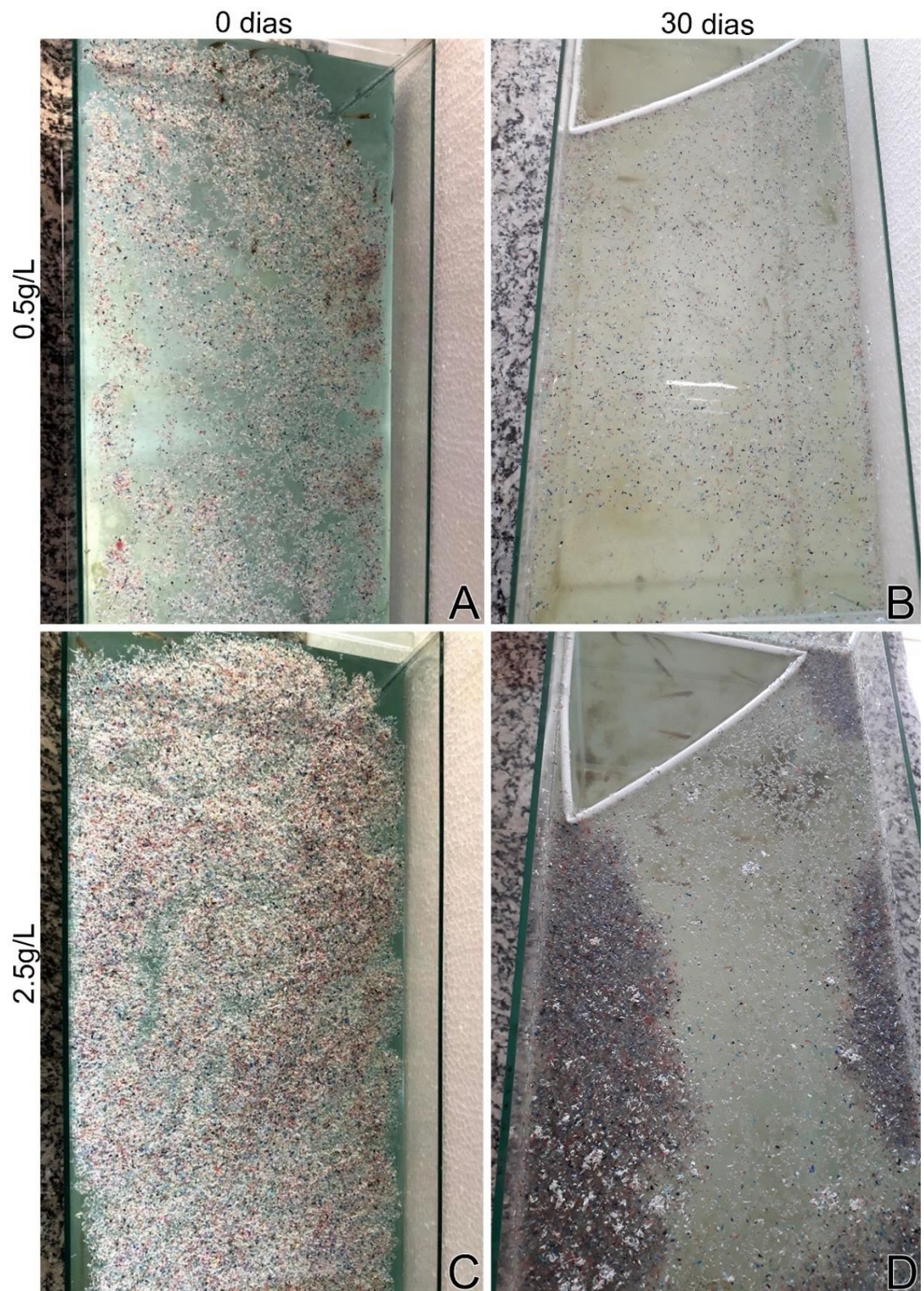
### 5.1. Qualidade da água

A variação do pH ao longo do experimento foi demonstrada na Figura 5. Após 24h de exposição, o pH dos aquários dos grupos experimentais DE 0,5g/L e 2,5g/L diminuiu. No grupo experimental de 0,5g/L o pH se manteve abaixo do grupo controle até o final do experimento, sendo que a partir do 16º dia houve uma queda acentuada. No grupo experimental de 2,5g/L, o pH sofreu variações maiores, tornando-se maior ou igual ao do grupo controle entre o 10º e 23º dia. A partir do 24º dia, notou-se uma queda contínua dos valores até o 30º dia.

Durante o experimento foi possível observar que os MPs se aglutinaram em algumas regiões, desobstruindo áreas na superfície d'água, o que possibilitou uma mobilidade maior dos peixes entre as partículas de plástico (Fig. 6).



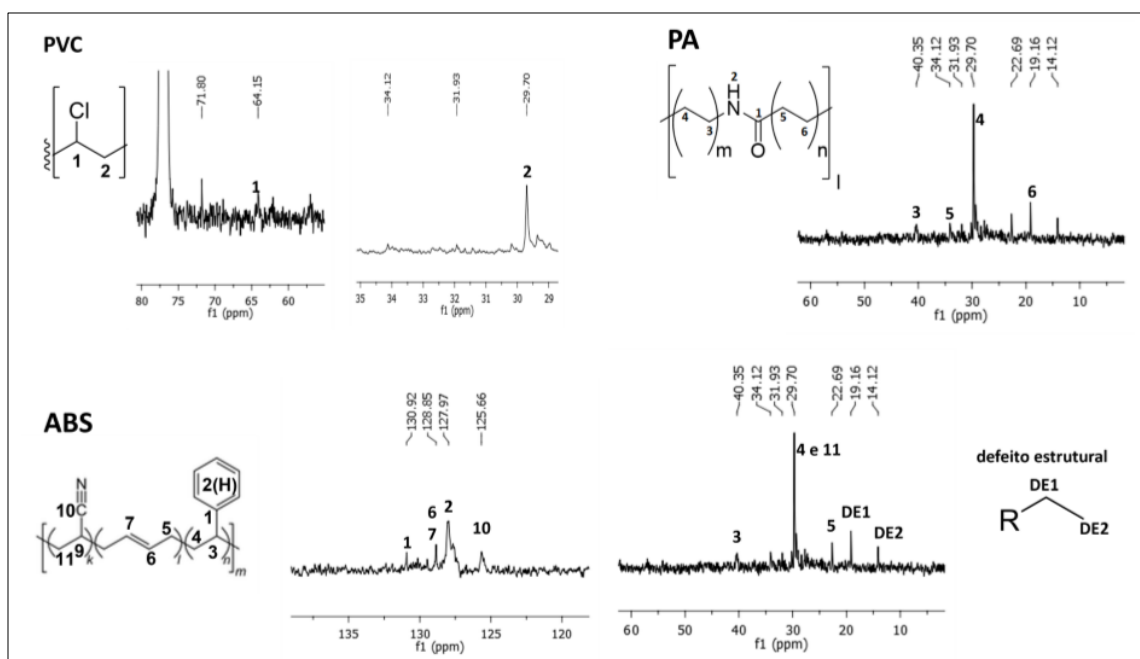
**FIGURA 5.** Comparação dos valores de pH entre o Grupo Controle (0) e os Grupos Experimentais de 0,5g/L e 2,5g/L ao longo dos dias de exposição aos PMs.



**FIGURA 6.** Aglutinação dos MPs durante o experimento. (A-B) Grupo Experimental de 0,5g/L. (C-D) Grupo Experimental de 2,5g/L.

## 5.2. Análise dos Microplásticos com Ressonância Magnética Nuclear

Os resultados da RMN permitiram perceber sinais compatíveis com três polímeros majoritários: Policloreto de Vinila (PVC), Poliamida (PA) e Acrilonitrila Butadieno Estireno (ABS), de acordo com assinalamento registrado nas respectivas expansões de cada espectro. A não detecção de outros componentes não significa que os MPs utilizados neste estudo são formados apenas pelos três componentes citados.

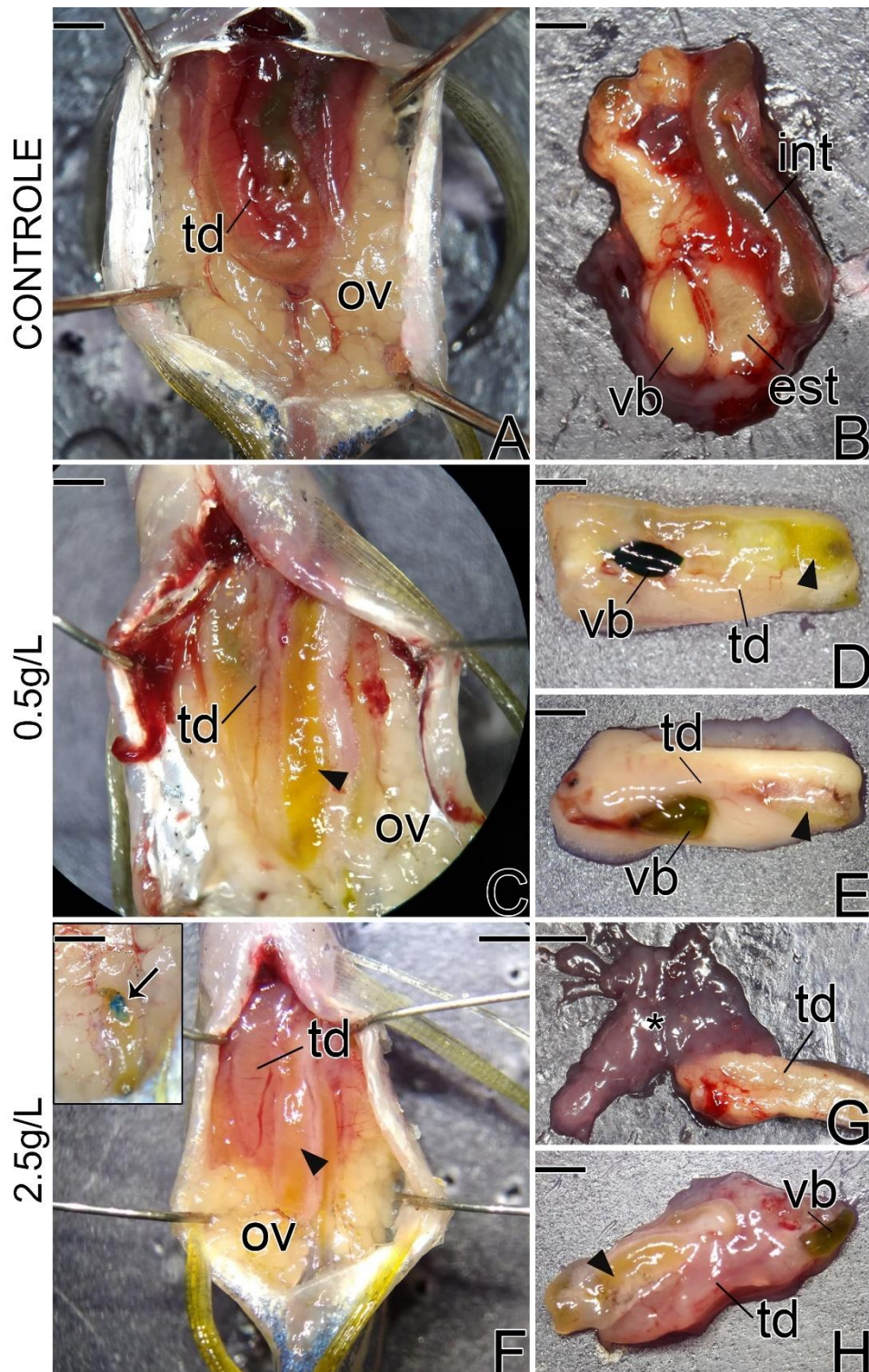


**FIGURA 7.** Composição dos microplásticos utilizados, demonstrada por ressonância Magnética Nuclear. PVC: Policloreto de Vinila; PA: Poliamida; ABS: Acrilonitrila Butadieno Estireno.

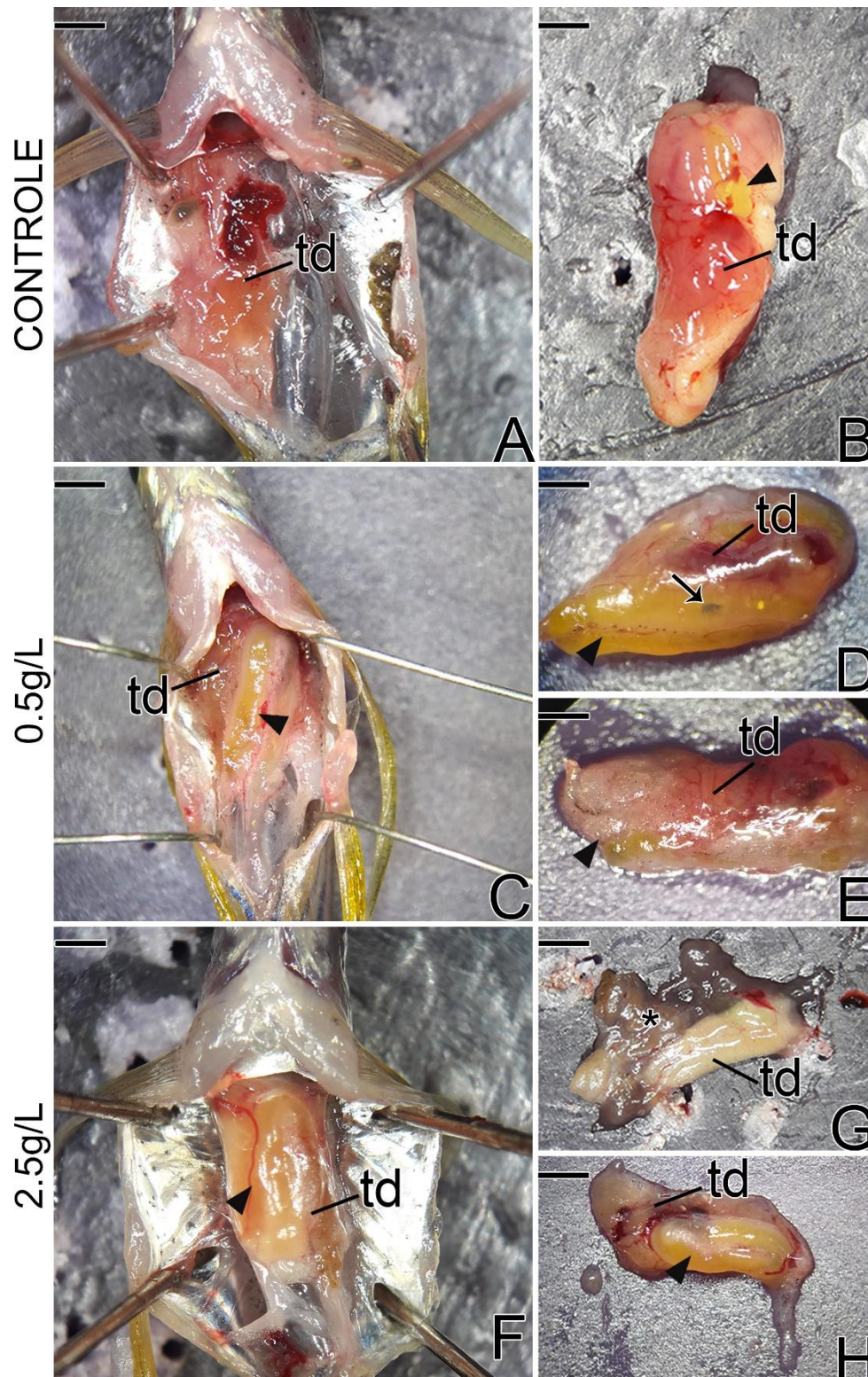
### 5.3. Anatomia dos Órgãos Viscerais

Durante a dissecação pode-se perceber acúmulo de gordura visceral e diferenças na coloração do trato digestivo em fêmeas e machos dos grupos expostos aos MPs. No grupo controle, os tratos digestivos apresentavam uma coloração rosada, com fácil distinção dos órgãos que os compõem e pouco acúmulo de gordura (Fig. 8A, B, 9A, B). No grupo experimental de 0,5 g/L, houve excessivo acúmulo de gordura visceral; uma espessa camada amarela foi nitidamente observada imediatamente após à incisão da cavidade abdominal das fêmeas (Fig. 8C). Nos machos, o intestino encontrava-se intensamente amarelado e foi possível observar MPs em seu interior e, em alguns animais, a gordura visceral mostrava-se translúcida (Fig. 9D, E). Nas fêmeas, os tratos digestivos mostravam-se esbranquiçados, tornando difícil a identificação de órgãos como fígado e baço (Fig. 8D, E). No grupo experimental de 2,5 g/L, também foi identificado acúmulo de gordura visceral (Fig. 8, 9). Os tratos digestivos variaram sua coloração entre o rosa claro e branco (Fig. 8F-H, 9F-H). Em ambos os sexos, o tecido encontrava-se em estágios avançados de degeneração (Fig. 8G, 9G).

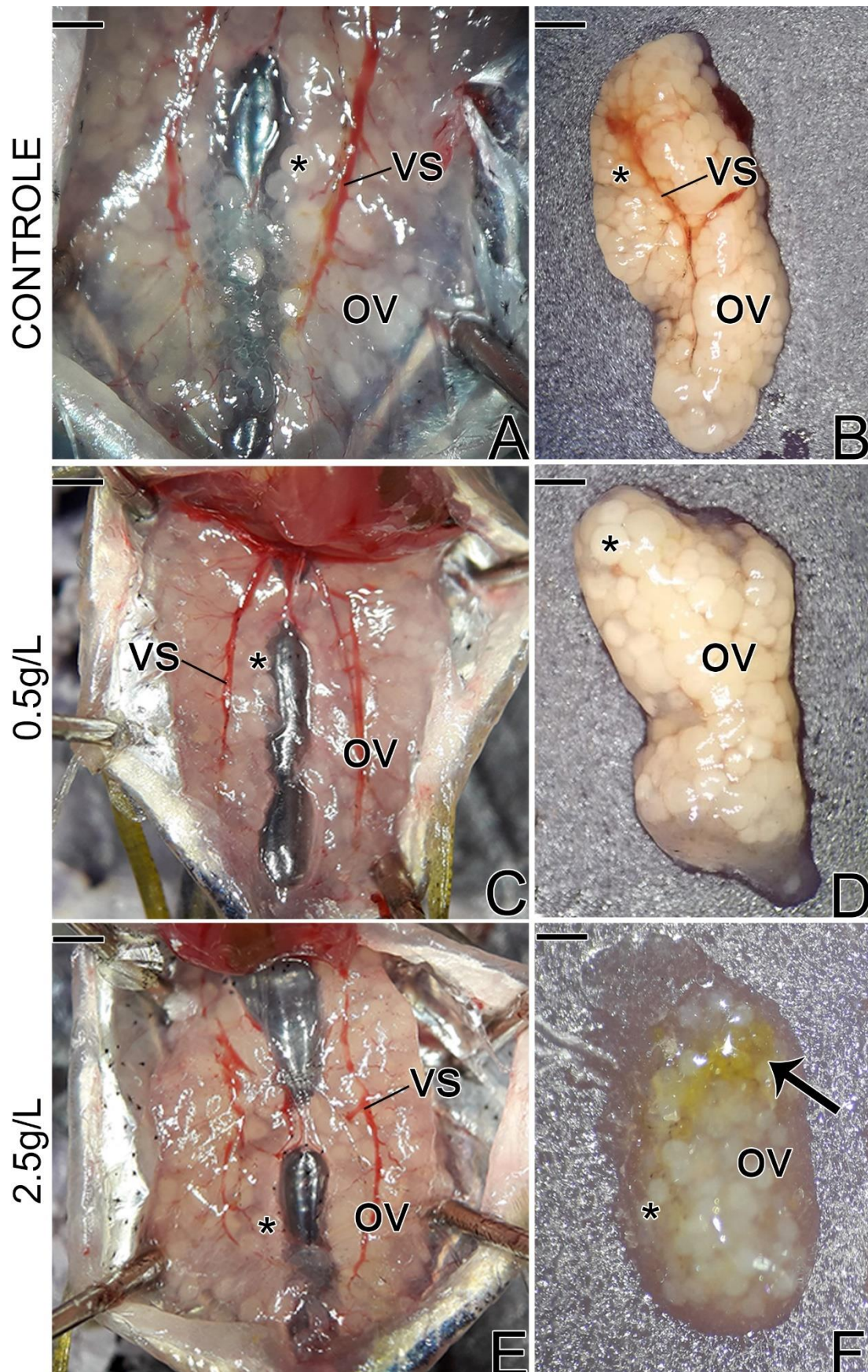
Macroscopicamente, os ovários do grupo experimental de 0,5g/L não apresentaram alterações, porém foi possível observar acúmulo de gordura em gônadas femininas do grupo experimental de 2,5g/L (Fig. 10F), em todos os grupos os ovários mostravam-se repletos de oócitos vitelogênicos (Fig. 10). Já as gônadas masculinas variaram de tamanho; no grupo controle e no grupo experimental de 2,5 g/L, os testículos apresentavam-se delgados, enquanto que no grupo experimental de 0,5 g/L, os órgãos mostravam-se mais espessos (Fig. 11). Em testículos do grupo experimental de 2,5 g/L, foi observado acúmulo de gordura (Fig. 11E).



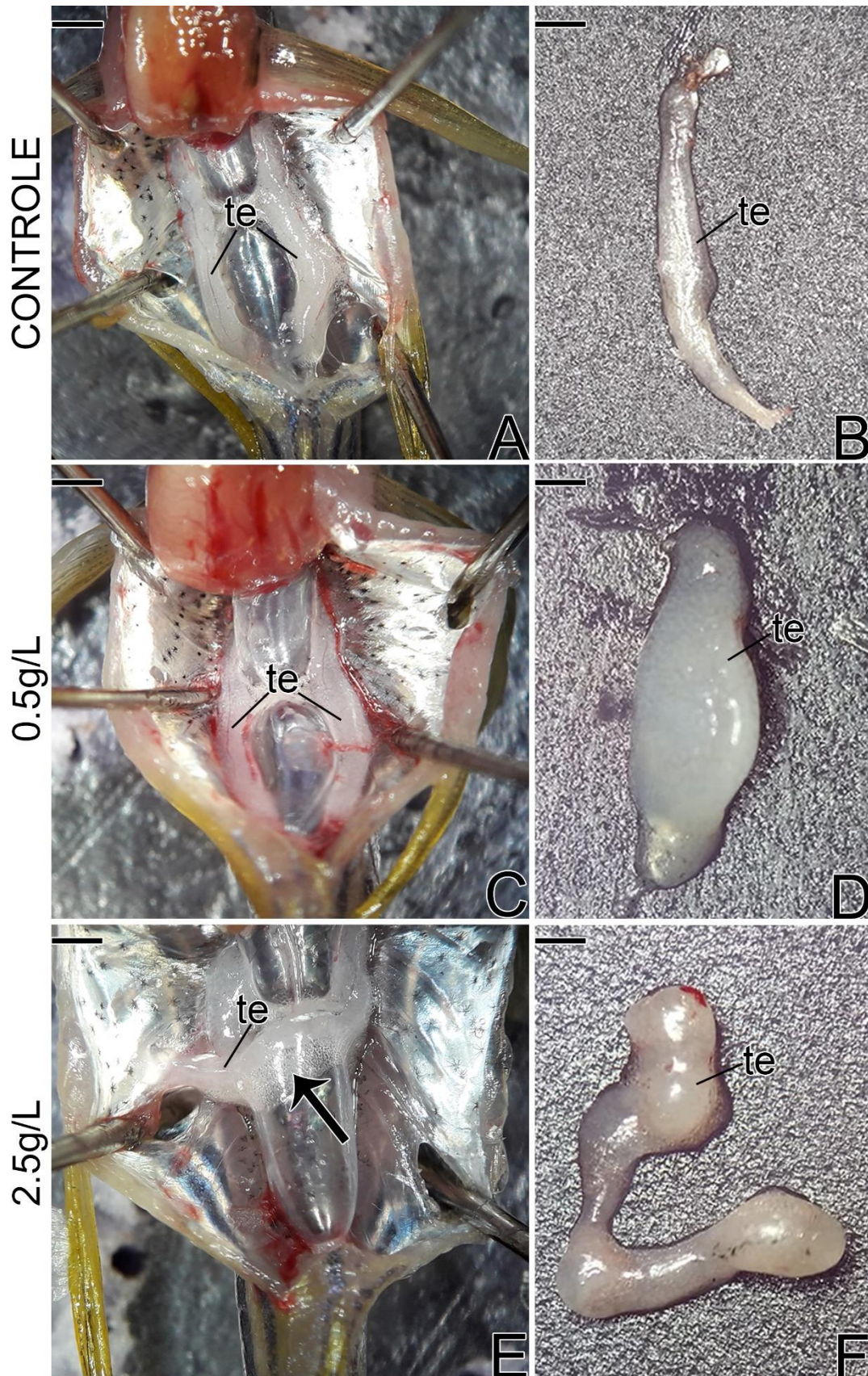
**FIGURA 8.** Fêmeas de *Danio rerio* mostrando as alterações dos órgãos viscerais, no Grupo Controle (A-B), Grupo Experimental 0,5g/L (C-E) e Grupo Experimental 2,5g/L (F-H). (A-B) Não foram observadas alterações. (C) Notar acúmulo de gordura (cabeça da seta). (D-E) Notar o trato digestivo esbranquiçado, acúmulo de gordura (cabeça da seta) e esverdeamento da vesícula biliar. (F) Em detalhe: presença de MPs na porção final do intestino (seta). Notar também acúmulo de gordura (cabeça da seta). (G) Degeneração dos órgãos digestivos (asterisco). (H) Vesícula biliar com alterações e acúmulo de gordura (cabeça da seta). ov: ovários, td: trato digestivo, int: intestino, est: estômago, vb: vesícula biliar. Barra: 200µm.



**FIGURA 9.** Machos de *Danio rerio* mostrando as alterações dos órgãos viscerais no Grupo Controle (A-B), Grupo experimental 0,5g/L (C-E) e Grupo experimental 2,5g/L (F-H). (A-B) Não foram observadas alterações, em (B) pouco acúmulo de gordura (cabeça da seta). (C) Trato digestivo com acúmulo de gordura (cabeça da seta). (D) Intestino com acúmulo de gordura (cabeça da seta) e presença de MPs (seta). (E) Presença de gordura visceral translúcida (cabeça da seta). (F) Trato digestivo com acúmulo de gordura (cabeça da seta). (G) Esbranquiçamento e degeneração dos órgãos digestivos (asterisco). (H) Acúmulo de gordura (cabeça da seta). td: trato digestivo. Barra: 200 $\mu$ m.



**FIGURA 10.** Ovários de *Danio rerio* do Grupo Controle (A-B), Grupo experimental 0,5g/L (C-D) e Grupo experimental 2,5g/L (E-F). Em (F) notar acúmulo de gordura (seta). ov: ovários, vs: vaso sanguíneo. Oócitos identificados com asterisco. Barra: 200µm.

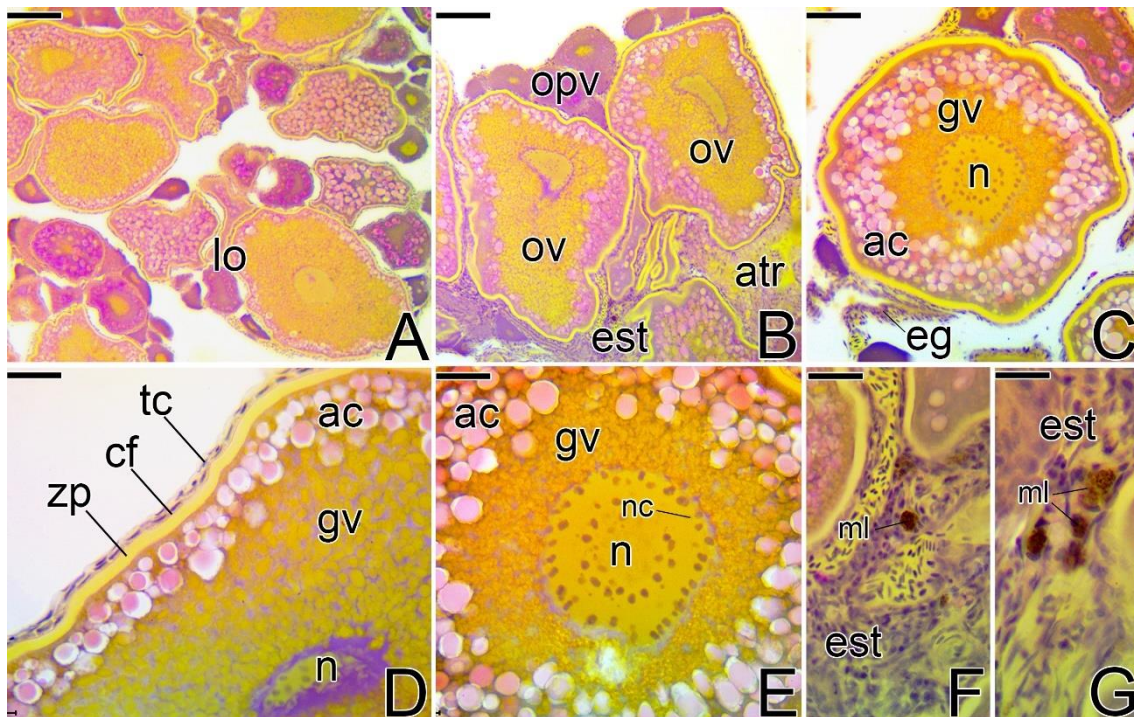


**FIGURA 11.** Testículos de *Danio rerio* do Grupo Controle (A-B), Grupo experimental 0,5g/L (C-D) e Grupo experimental 2,5g/L (E-F). Em (E) notar acúmulo de gordura (seta). te: testículo. Barra: 200µm (A, C, E), 150µm (B, D, F).

## 5.4. Histologia dos Ovários

### 5.4.1. Grupo Controle

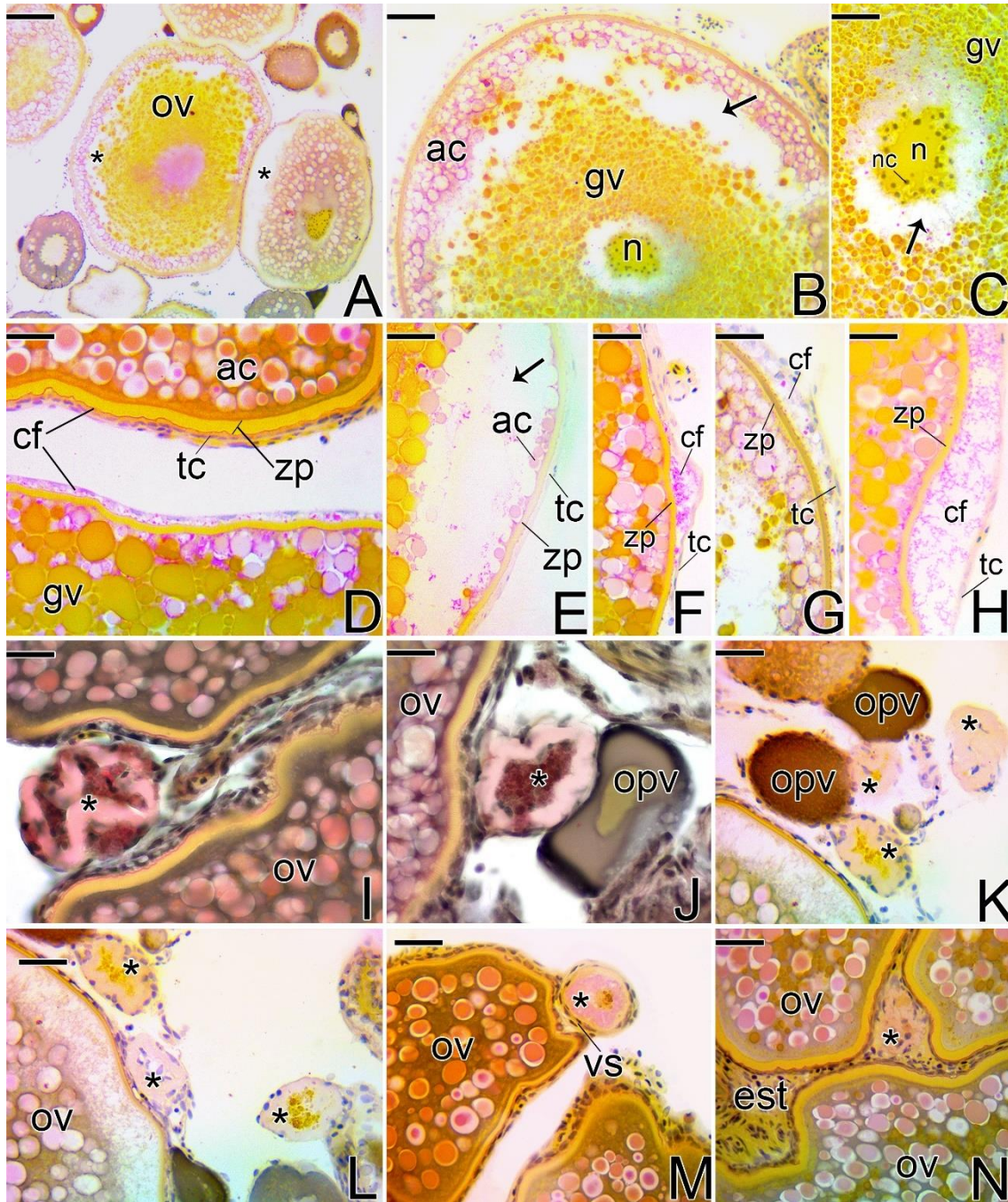
No grupo controle, as lamelas ovígeras apresentavam oócitos em diferentes estágios de desenvolvimento (Fig. 12A, B). O ooplasma apresentou distribuição de grânulos de vitelo e alvéolos corticais característicos e sem alterações (Fig. 12C, E). As células foliculares mantiveram sua conformação normal, pavimentosa, da mesma forma a zona pelúcida e a teca também mantiveram suas estruturas (Fig. 12D). No estroma ovariano, foram observados melanomacrófagos (Fig. 12F, G).



**FIGURA 12.** Cortes histológicos dos ovários de *Danio rerio* do Grupo Controle. **(A-B)** Lamelas ovígeras com oócitos em diferentes estágios de desenvolvimento **(C)** Oócito vitelogênico. **(D)** Detalhe dos envoltórios de oócito vitelogênico com presença de grânulos de vitelo e alvéolos corticais. **(E)** Núcleo e nucléolos de oócito vitelogênico. **(F-G)** Melanomacrófagos, lo: lamela ovígera, ov: oócito vitelogênico, opv: oócito pré-vitelogênico, atr: oócito atrésico, est: estroma ovariano, eg: epitélio germinativo, gv: grânulos de vitelo, ac: alvéolos corticais, tc: teca, cf: células foliculares, zp: zona pelúcida, ml: melanomacrófagos, n: núcleo, nc: nucléolos. Coloração: Metanil Yellow, Hematoxilina, PAS. Barra: 200µm (A), 100µm (B), 50µm (C), 10µm (D, E, F, G).

#### **5.4.2. Grupo Experimental de 0,5 g/L**

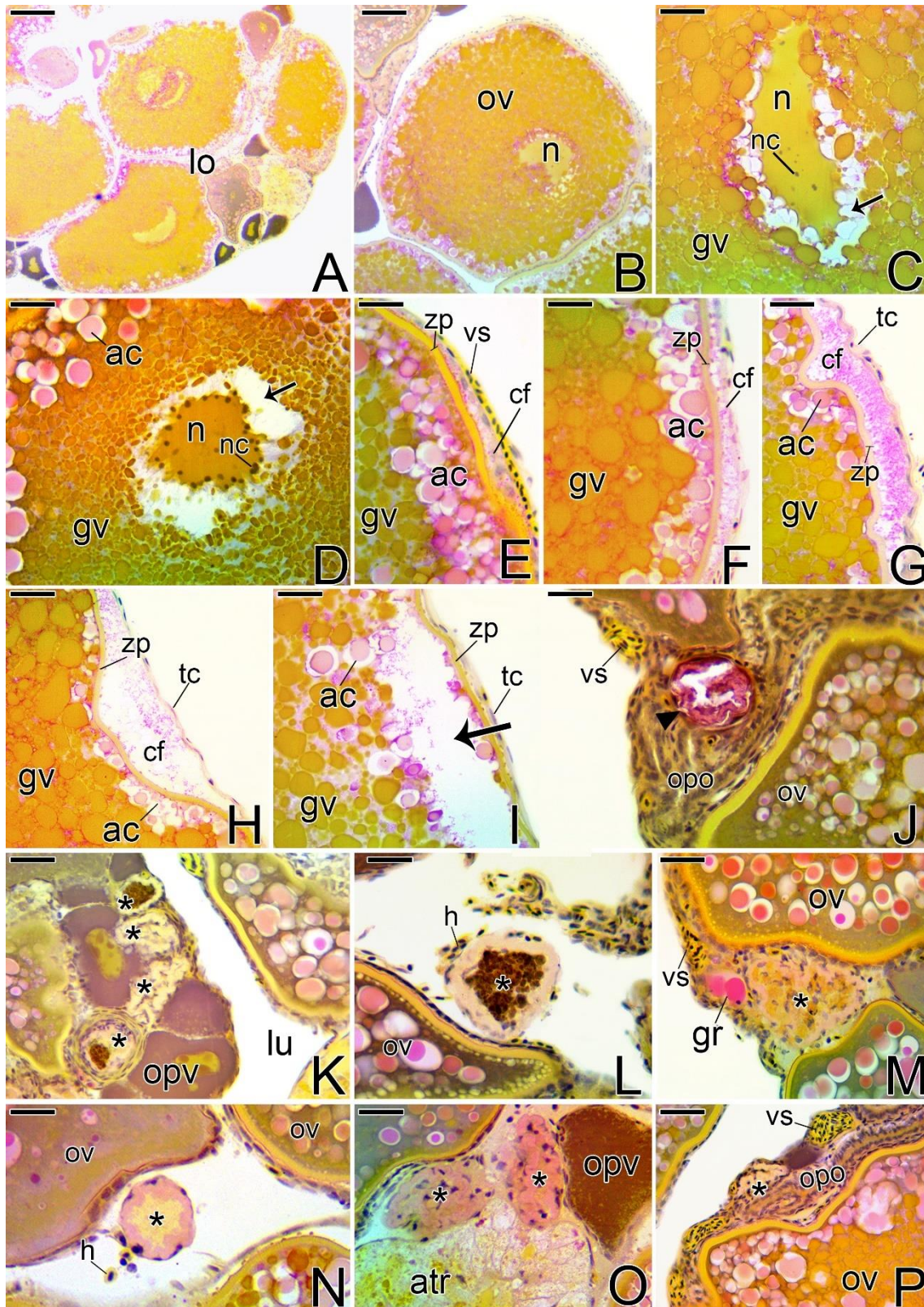
Foram constatadas alterações no ooplasma e nas células foliculares de oócitos vitelogênicos. Nas extremidades do ooplasma, foram observadas áreas não marcadas, denominadas aqui de lacunas (Fig. 13A, B). Estas lacunas estavam presentes entre os alvéolos corticais e entre os grânulos de vitelo (Fig. 13B, E). Também houve registro de lacunas entre o núcleo e os grânulos de vitelo (Fig. 13C). As células foliculares apresentaram distensões, mudando sua conformação normal de pavimentosa para cúbica (Fig. 13D). As distensões continuaram até o ponto de hipertrofização, no qual as células foliculares exibiram grânulos PAS positivos em seus citoplasmas (Fig. 13F, H). No estroma ovariano e próximo ao epitélio germinativo foram encontrados centros melanomacrofágicos com variações na marcação de seus conteúdos, com uma camada glicoprotéica os envolvendo. Em algumas regiões, o conteúdo granular dos centros melanomacrofágicos exibiu sobreposição de marcadores como PAS e Hematoxilina (Fig. 13J) ou marcação predominante de Metanil Yellow (Fig. 13K-N). Em alguns ovários, foram observadas camadas glicoprotéicas sem a presença de grânulos em seu interior (Fig. 13L-O).



**FIGURA 13.** Cortes histológicos dos ovários de *Danio rerio* apresentando as alterações encontradas no Grupo Experimental 0,5g/L. **(A)** Visão geral de oócitos vitelogênicos com alterações no ooplasma. **(B)** Presença de lacunas entre os grânulos de vitelo (seta). **(C)** Presença de lacuna entre os grânulos de vitelo e o núcleo (seta). **(D)** Alterações na conformação das células foliculares. **(E)** Presença de lacunas entre os alvéolos corticais (seta). **(F-H)** Hipertrofia das células foliculares. **(I-N)** Centros Melanomacrofágicos (asterisco). Em **(I-J)** conteúdo granular com marcação PAS positiva. Em **(K-M)** conteúdo granular com marcação de Metanil Yellow. Em **(N)** não houve conteúdo granular aparente. ov: oócito vitelogênico, opv: oócito pré-vitelogênico, est: estroma, eg: epitélio germinativo, gv: grânulos de vitelo, ac: alvéolos corticais, tc: teca, cf: células foliculares, zp: zona pelúcida, n: núcleo, nc: nucléolos, vs: vaso sanguíneo. Coloração: Metanil Yellow, Hematoxilina, PAS. Barra: 200µm (A), 100µm (B), 50µm (C), 10µm (D, E, F, G, H, I, J, K, L, M).

#### **5.4.3. Grupo Experimental de 2,5 g/L**

Foram observadas alterações em oócitos vitelogênicos, no ooplasma e nas células foliculares, além da presença de corpos estranhos pelo tecido gonadal. Entre o núcleo e os grânulos de vitelo, houve a formação de glóbulos vazios que eram circundados por uma fina camada glicoproteica (Fig. 14C). Estes glóbulos se expandiram formando lacunas (Fig. 14D). Lacunas entre os alvéolos corticais também foram observadas (Fig. 14I). As células foliculares sofreram hipertrofia e seu conteúdo variou entre regiões marcadas mais fortemente ou menos fortemente pelo PAS (Fig. 14E-G). Outros envoltórios foliculares como a teca e zona pelúcida não sofreram alterações (Fig. 14G-H). Uma estrutura não-característica foi observada entre folículos pós-ovulatórios, com conteúdo amorfo e PAS positivo (Fig. 14J). Foram observados centros melanomacrofágicos semelhantes aos encontrados no tratamento de 0,5 g/L. Assim como no outro tratamento, neste o conteúdo granular dos centros melanomacrofágicos apresentou variações na marcação com Metanil Yellow (Fig. 14L, 14M), e em alguns casos, somente a camada glicoprotéica que os envolve foi observada (Fig. 14K, 14O, 14P).



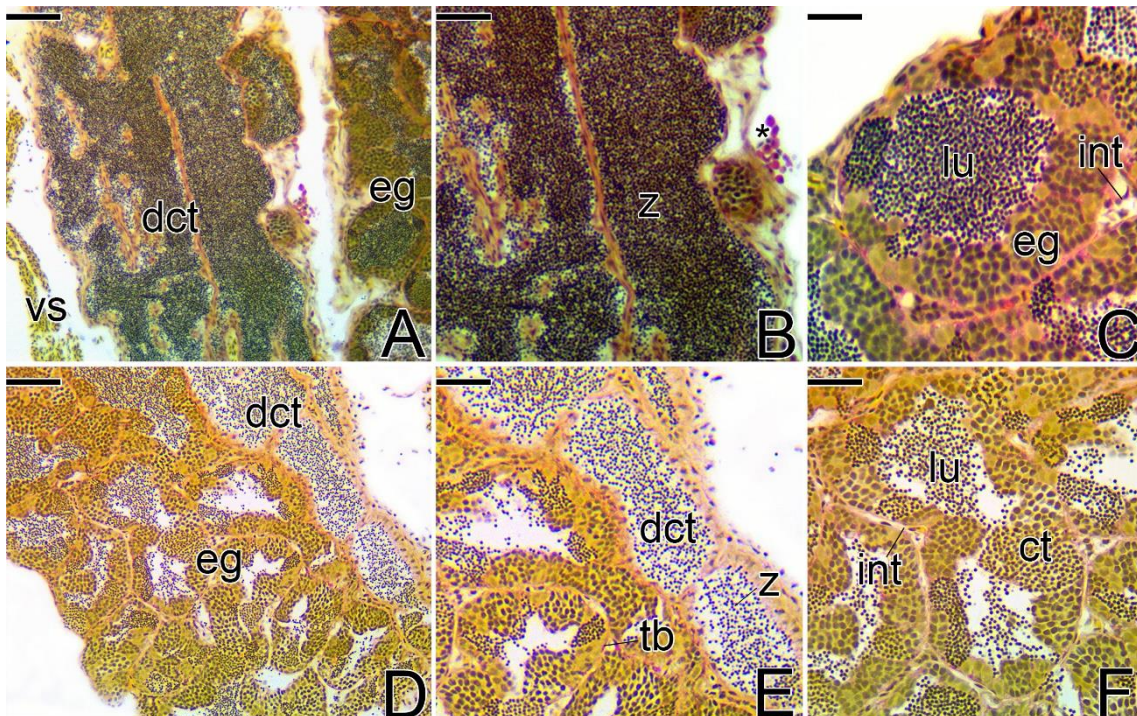
**FIGURA 14.** Corte histológico dos ovários de *Danio rerio* apresentando as alterações encontradas no Grupo Experimental 2,5g/L. **(A-B)** Visão geral das lamelas ovígeras. Em **(B)** detalhe de um oócito vitelogênico. **(C)** Presença de glóbulos não marcados entre grânulos de vitelo e o núcleo (seta). **(D)** Presença de lacunas entre os grânulos de vitelo e o núcleo (seta). **(E-H)** Hipertrofia das células foliculares. **(I)** Presença de lacunas entre os alvéolos corticais (seta). **(J)** Presença de corpos estranhos encontrados no estroma ovariano (cabeça da seta). **(K-P)** Centros Melanomacrofágicos (asterisco) com diferenças na quantidade e composição do

conteúdo granular. Em **(K-L)** conteúdo granular intensamente marcado com Metanil Yellow. Em **(M-N)** conteúdo granular com marcação moderada de metanil yellow. Em **(O-P)** não houve conteúdo granular aparente. lo: lamela ovígera, ov: oócito vitelogênico, opv: oócito pré-vitelogênico, atr: oócito atrésico, est: estroma ovariano, eg: epitélio germinativo, gv: grânulos de vitelo, ac: alvéolos corticais, tc: teca, cf: células foliculares, zp: zona pelúcida, lu: luz ovariana, n: núcleo, nc: nucléolos, gr: granulócitos, vs: vasos sanguíneos, h: hemácias. Coloração: Metanil Yellow, Hematoxilina, PAS. Barra: 200µm (A), 100µm (B), 50µm (C, D), 10µm (E, F, G, H, I, J, K, L, M, N, O, P).

## 5.5. Histologia dos Testículos

### 5.5.1. Grupo Controle

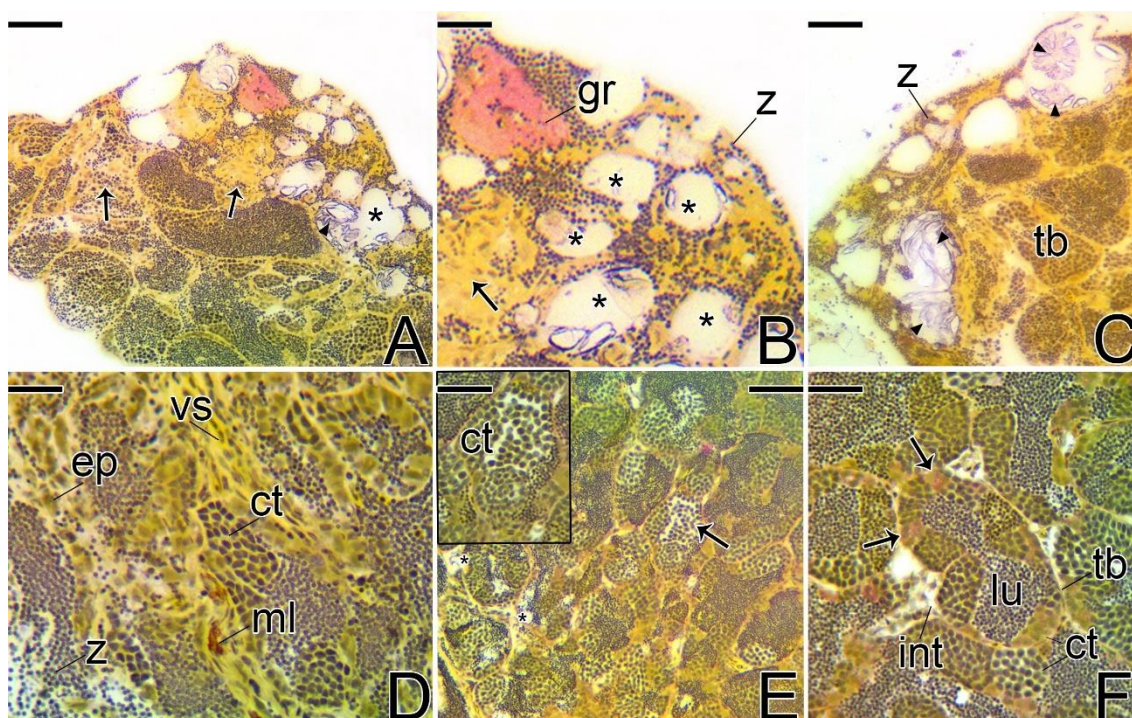
Os testículos do grupo controle não apresentaram alterações nos compartimentos germinativos ou intersticiais e não foram observados corpos estranhos no tecido gonadal (Fig. 15). Foram identificados testículos com características de animais aptos à reprodução, com ductos espermáticos repletos de espermatozoides (Fig. 15A, B), assim como os túbulos testiculares (Fig. 15C). Também foram identificados testículos com ductos espermáticos e túbulos testiculares apresentando espermatozoides residuais (Fig. 15D-F), característicos de animais que haviam se reproduzido recentemente.



**FIGURA 15.** Corte histológico dos testículos de *Danio rerio* do Grupo Controle. **(A)** Visão geral do ducto espermático. **(B)** Detalhe da presença de espermatozoides no ducto espermático e presença de granulócitos (asterisco). **(C)** Túbulo testicular com a luz preenchida por espermatozoides. **(D-E)** Epitélio germinativo após a espermição. **(F)** Detalhe de (D) mostrando luz do túbulo testicular com espermatozoides residuais. dct: ducto espermático, eg: epitélio germinativo, z: espermatozoides, tb: túbulos testiculares, lu: luz dos túbulos testiculares, int: interstício, vs: vaso sanguíneo. Coloração: Metanil Yellow, Hematoxilina, PAS. Barra: 200µm (A, D), 50µm (B, E), 10µm (C, F).

### 5.5.2. Grupo Experimental de 0,5 g/L

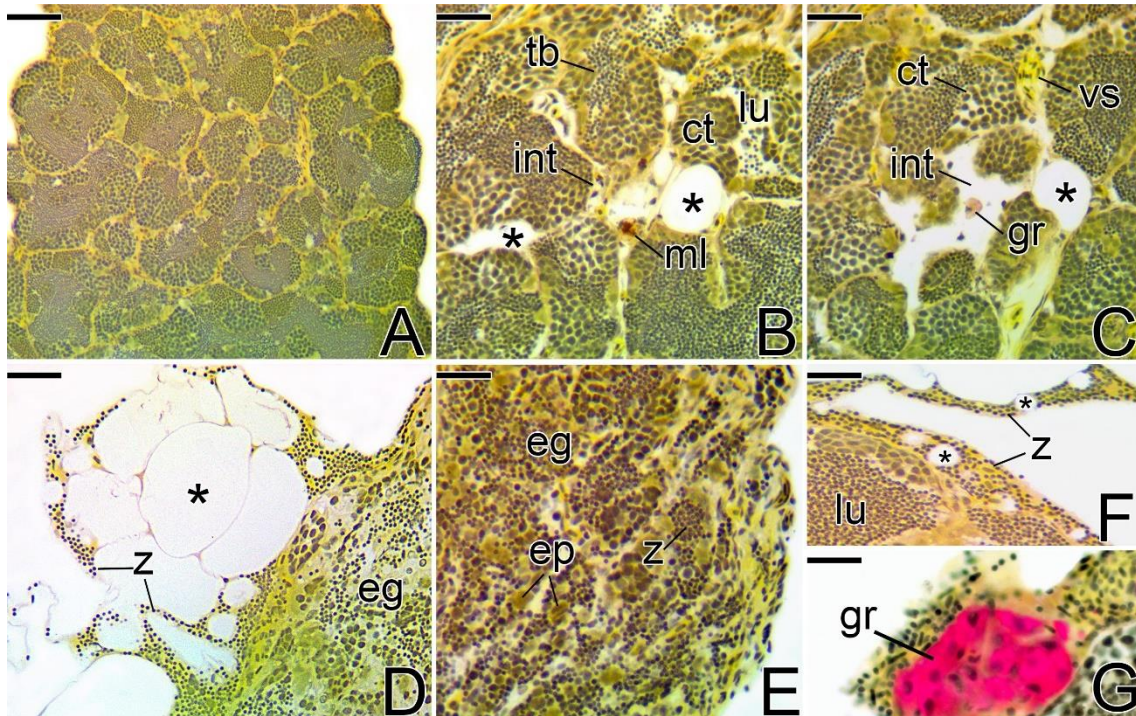
Foram observadas alterações nos espermatocistos e no epitélio germinativo, além da presença de corpos estranhos. Houve vacuolizações no epitélio germinativo, as quais, em sua maioria, não responderam positivamente a nenhum dos corantes aqui utilizados (Fig. 16B). Entretanto, em algumas regiões do testículo, tais estruturas apresentavam, em seu interior, corpos estranhos preto-amarronzados e de formas variadas (Fig. 16C). Próximo a estas áreas, os túbulos testiculares parecem ter se rompido, fazendo com que houvesse uma desorganização entre os compartimentos germinativo e intersticial, os quais apresentaram resposta intensa ao Metanil Yellow (Fig. 16A, B), havendo também acúmulo de granulócitos (Fig. 16B). Em algumas porções testiculares, houve rompimento de cistos e túbulos, dificultando a identificação dos compartimentos germinativos e intersticiais. Nestas regiões, foi observada a presença de melanomacrófagos (Fig. 16D). No epitélio germinativo, alguns cistos mostravam aspecto frouxo, sendo possível observar espaçamentos incomuns entre os espermatócitos (Fig. 16E). No interstício, formaram-se vacuolizações e foi possível observar a presença de granulócitos dentro dos cistos (Fig. 16F). Pequenas vacuolizações também foram observadas dentro dos cistos, em diferentes fases de desenvolvimento das células germinativas (Fig. 18).



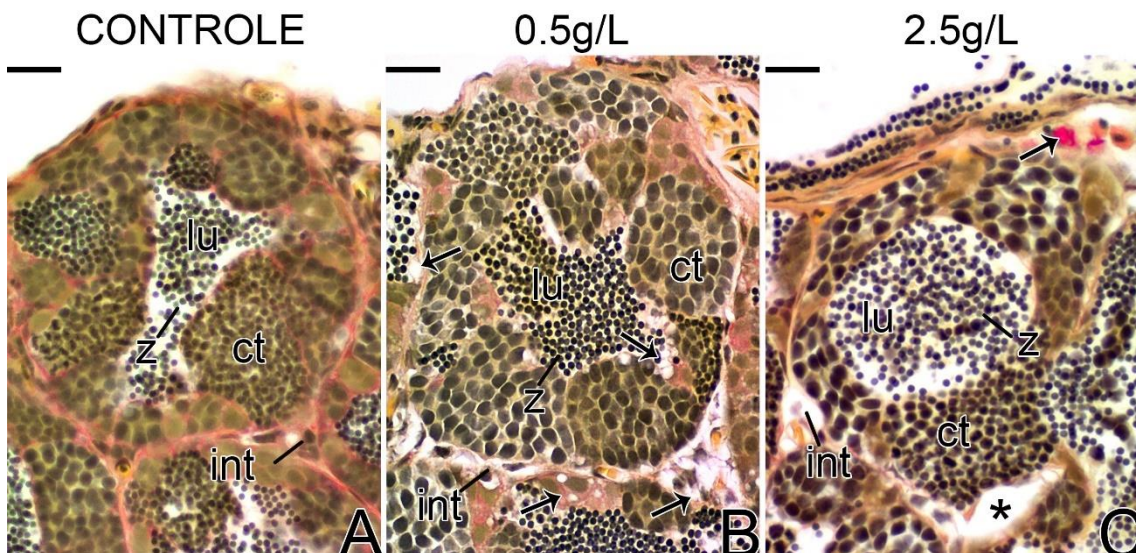
**FIGURA 16.** Cortes histológicas dos testículos de *Danio rerio* apresentando as alterações encontradas no Grupo Experimental 0,5g/L. **(A)** Visão geral das alterações no epitélio germinativo: vacuolizações (asterisco), rompimento dos túbulos testiculares (setas) e presença de corpos estranhos (cabeça da seta). **(B)** Vacuolizações do epitélio (asterisco), marcação excessiva com Metanil Yellow (seta) e acúmulo de granulócitos. Em **(C)** notar os corpos estranhos dentro das vacuolizações do epitélio (cabeça da seta). **(D)** Descaracterização dos túbulos seminíferos e presença de melanomacrófagos. **(E)** Vacuolização do epitélio (asterisco) e afrouxamento dos cistos (seta). **(F)** Vacuolizações no interstício e conteúdo de granulócitos marcado dentro dos cistos (setas). ep: espermatogônias, gr: granulócitos, ml: melanomacrófagos, ct: cistos, z: espermatozoides, tb: túbulos testiculares, lu: luz dos túbulos testiculares, int: interstício, vs: vaso sanguíneo. Coloração: Metanil Yellow, Hematoxilina, PAS. Barra: 200µm (A), 100µm (E), 50µm (B, C), 10µm (D, E, F).

### 5.5.3. Grupo Experimental de 2,5 g/L

Os testículos apresentavam túbulos testiculares com a luz preenchida por espermatozoides (Fig. 17A). Foram observadas vacuolizações do interstício e a presença de centros melanomacrofágicos e granulócitos em seu interior (Fig. 17B, C, 18). Na periferia do órgão, foram observadas intensas vacuolizações circundadas por espermatozoides (Fig. 17D). Em algumas regiões, houve descaracterização de espermatocistos e túbulos, com difícil identificação dos compartimentos germinativos e intersticiais (Fig. 17E). Foi observado o acúmulo de granulócitos (Fig. 17G).



**FIGURA 17.** Cortes histológicos dos testículos de *Danio rerio* apresentando as alterações encontradas no Grupo Experimental 2,5g/L. **(A)** Visão geral do testículo. **(B-C)** Vacuolizações no interstício (asterisco) com a presença de melanomacróforo e em **(C)** notar a presença de granulócito. **(D)** Epitélio germinativo com vacuolizações. **(E)** Descaracterização dos túbulos seminíferos. **(F)** Detalhe das vacuolizações (asterisco). **(G)** Acúmulo de granulócitos. ep: espermatogônias, gr: granulócitos, eg: epitélio germinativo, ml: melanomacróforo, ct: cistos, z: espermatozoides, tb: túbulos testiculares, lu: luz dos túbulos testiculares, int: interstício, vs: vaso sanguíneo. Coloração: Metanil Yellow, Hematoxilina, PAS. Barra: 200µm (A), 100µm (D, F), 50µm (B, C, E), 10µm (G).



**FIGURA 18.** Cortes histológicos comparativos entre o Grupo Controle **(A)** e os Grupo Experimental 0,5g/L **(B)** e Grupo Experimental 2,5g/L **(C)** apresentando as alterações encontradas nos túbulos seminíferos. **(A)** Túbulo testicular com epitélio contínuo e luz parcialmente preenchida por espermatozoides. **(B)** Túbulo testicular com vacuolizações dentro dos cistos e no interstício (setas). **(C)** Túbulo testicular com vacuolizações no interstício

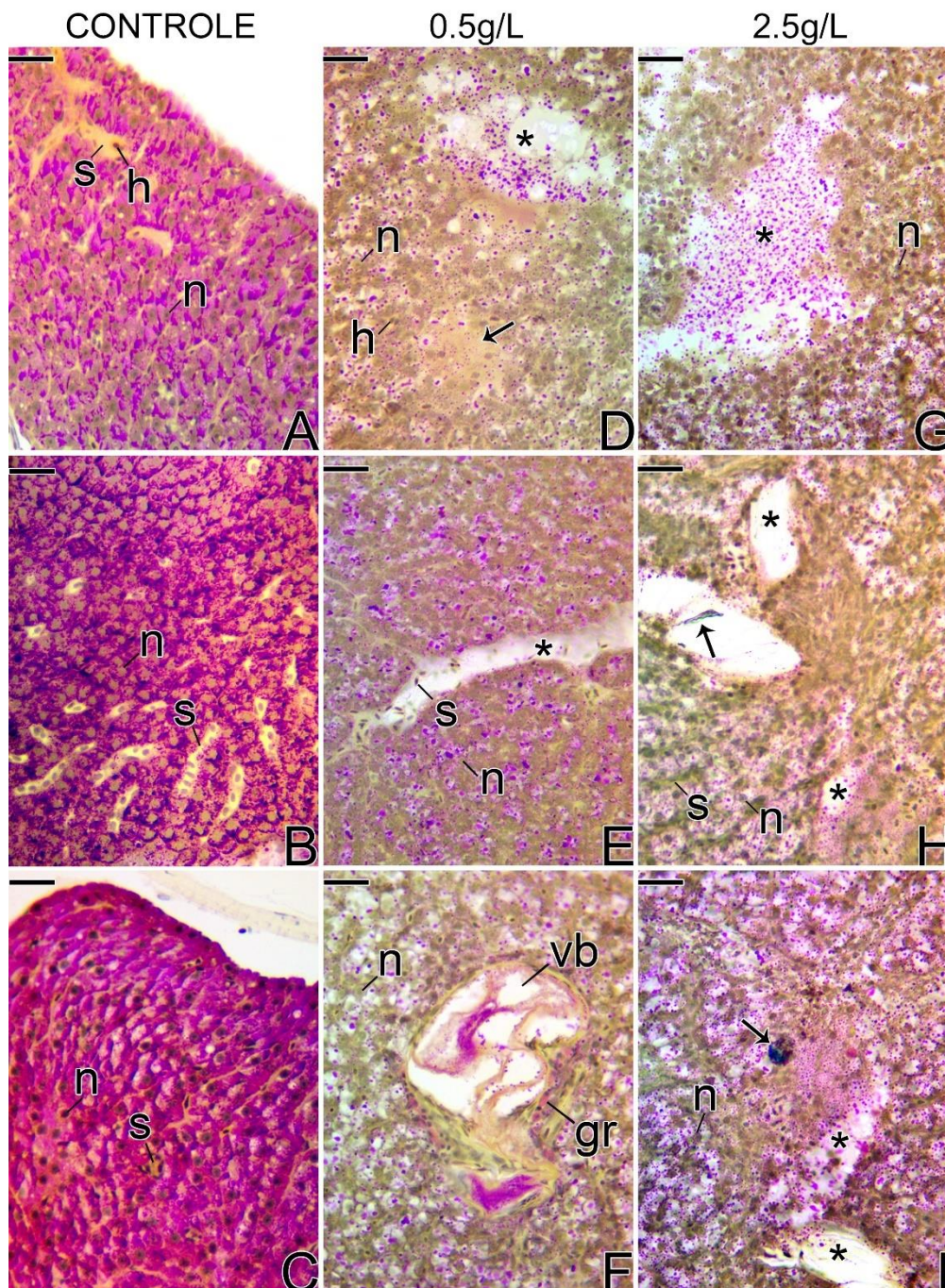
(asterisco) e presença de granulócitos (seta). ct: cistos, z: espermatozoides, luz: luz dos túbulos testiculares, int: interstício. Coloração: Metanil Yellow, Hematoxilina, PAS. Barra: 10µm.

## **5.6. Histologia dos Fígados de Fêmeas**

No grupo controle, o citoplasma dos hepatócitos de indivíduos femininos foi intensamente marcado com PAS. Não foram observadas alterações quanto à conformação histológica dos hepatócitos ou dos sinusoides (Fig. 19A-C).

No grupo experimental de 0,5g/L, houve frequente esteatose; o citoplasma dos hepatócitos apresentou pouca marcação com PAS, sendo possível identificar diversas gotículas de glicogênio espaçadas. Houve degeneração dos hepatócitos e formação de lacerações no órgão. Também foram observadas áreas com fibroses (Fig. 19D). Além disso, foram identificadas dilatações dos sinusoides (Fig. 19E). Dentre o parênquima hepático, foi possível observar a vesícula biliar, que apresentou conteúdo amorfo e fibroso, além de possuir granulócitos em seu entorno (Fig. 19F).

No grupo experimental de 2,5g/L, foram observadas lacerações e a presença de corpos estranhos. Nas áreas afetadas foi possível observar o rompimento dos hepatócitos, formando grandes lacerações no parênquima hepático (Fig. 19G). Dentro de uma das lacerações, foi possível observar um corpo estranho pontiagudo que não foi marcado com nenhum dos corantes utilizados (Fig. 19H). Próximo a uma região de rompimento de hepatócitos foi observada uma estrutura amorfa azulada, cor que difere dos corantes utilizados (Fig. 19I).



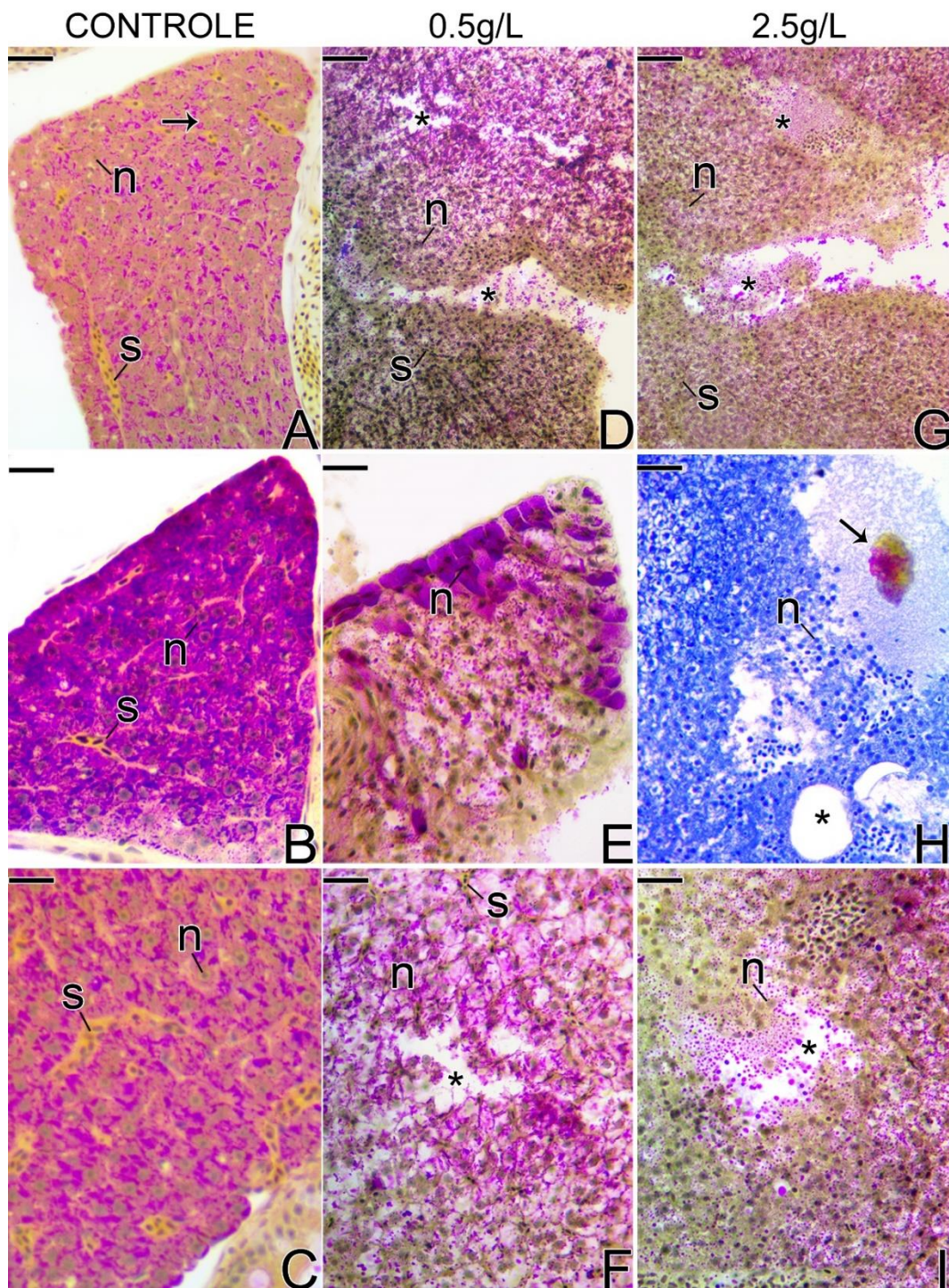
**FIGURA 19.** Cortes histológicos comparativos dos fígados de fêmeas de *Danio rerio* entre Grupo Controle (A-C) os Grupos Experimentais de 0,5g/L (D-F) e 2,5g/L (G-I). (A) visão geral do parênquima hepático do Controle. (B-C) hepatócitos com citoplasma marcado com PAS e fácil identificação de sinusoides. (D) parênquima hepático com lacerações (asterisco) e fibroses (seta). (E) dilatação do sinusóide (asterisco). (F) vesícula biliar com alterações e presença de granulócitos em seu entorno. (G) parênquima hepático com lacerações (asterisco). (H) presença de corpo estranho (seta) no interior das lacerações hepáticas (asterisco). (I) presença de corpo estranho entre o parênquima hepático (seta) e rompimento dos hepatócitos (esterisco). n: núcleo de hepatócito, s: sinusoides, h: hemácias, gr: granulócitos, vb: vesícula biliar. Coloração: Metanil Yellow, Hematoxilina, PAS. Barra: 50µm (A, C), 10µm (C, D, G, B, E, H, F, I).

### **5.7. Histologia dos Fígados de Machos**

No grupo controle, o citoplasma dos hepatócitos de indivíduos masculinos foi intensamente marcado com PAS. Não foram observadas alterações quanto à conformação histológica dos hepatócitos ou dos sinusoides (Figura 20A-C).

No grupo experimental de 0,5g/L, foi observado o rompimento dos hepatócitos e lacerações no parênquima hepático. A marcação com PAS no citoplasma dos hepatócitos foi menos intensa do que no grupo controle, sendo que somente a extremidade do órgão apresentava algumas semelhanças (Fig. 20F). Em algumas regiões do tecido, foi possível observar o rompimento de hepatócitos e a formação de lacerações (Fig. 20D, E).

No grupo experimental de 2,5g/L também foram observadas lacerações no parênquima hepático causadas pelo rompimento dos hepatócitos (Fig. 20G). Extensas porções hepáticas responderam fracamente ao PAS (Fig. 20I). Em alguns cortes histológicos marcados com azul de toluidina, foi possível observar um corpo estranho próximo a uma região com lacerações, com cores distintas da coloração aqui utilizada (Fig. 20H).



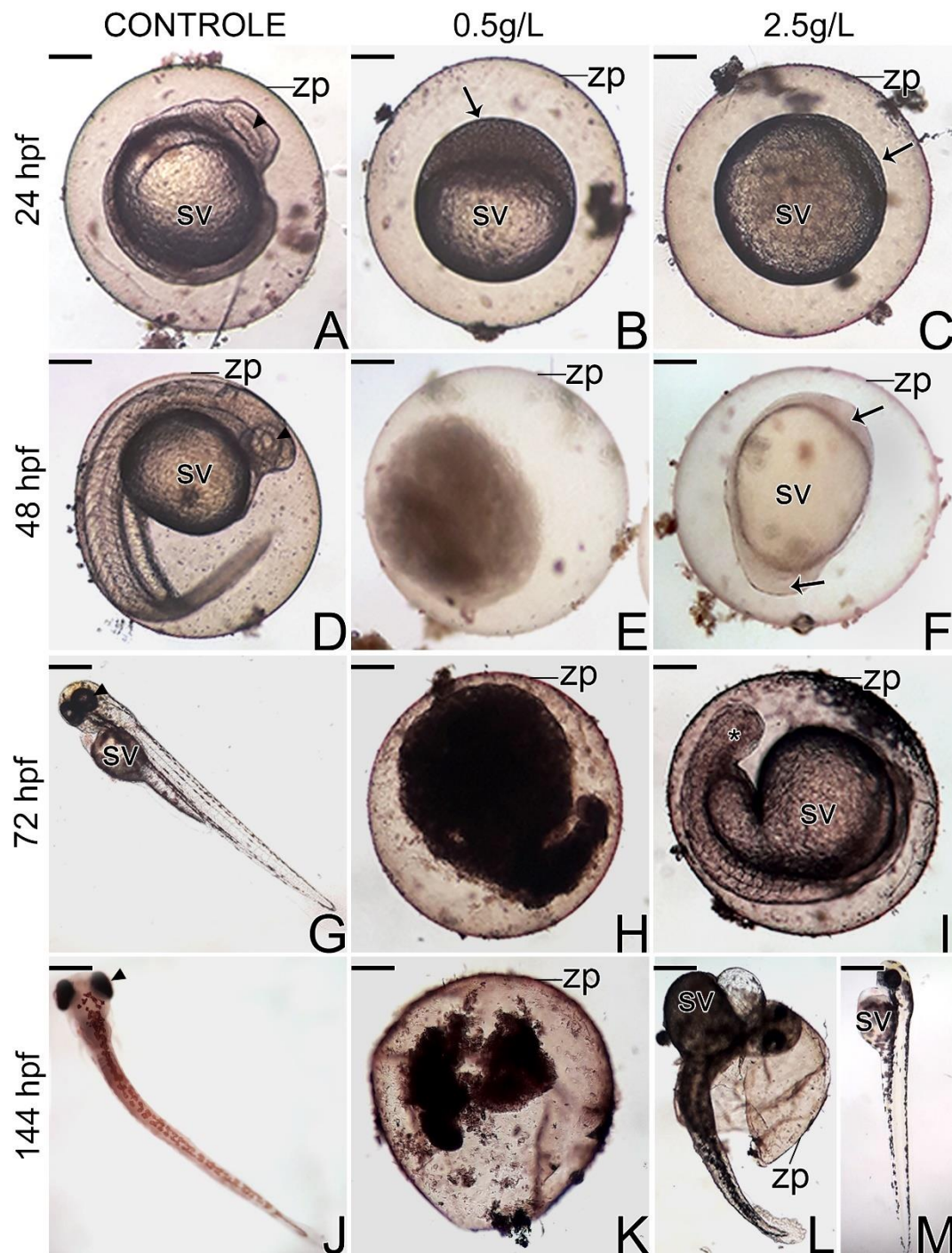
**FIGURA 20.** Cortes histológicas comparativos dos fígados de machos de *Danio rerio* entre Grupo Controle (A-C) os Grupos Experimentais de 0,5g/L (D-F) e 2,5g/L (G-I). (A) visão geral do parênquima hepático do Controle. (B-C) hepatócitos com citoplasma marcado com PAS e presença de sinusoides. (D) parênquima hepático com lacerações (asterisco). (E) extremidades do fígado com marcações PAS positivas. (F) rompimento dos hepatócitos asterisco. (G) parênquima hepático com lacerações e rompimento de hepatócitos (asterisco). (H) presença de corpo estranho (seta) próximo a regiões com laceração (asterisco). (I) detalhe do rompimento dos hepatócitos (asterisco). n: núcleo de hepatócitos, s: sinusoides, h: hemácias. Coloração: Metanil Yellow, Hematoxilina, PAS e Azul de Toluidina-Bórax (H). Barra: 50µm (A, B, D, E, G), 10µm (H, F, I).

## 5.8. Desenvolvimento Embrionário

O desenvolvimento embrionário de filhotes oriundos de pais expostos aos MPs foi tardio, levando até o dobro do tempo para acontecer. Com 24 horas pós-fertilização (24 hpf), no grupo controle, os embriões encontravam-se em período correspondente à formação dos olhos e da cauda (Fig. 21A). Já os ovos dos grupos experimentais, ainda estavam nos estágios iniciais de desenvolvimento. No grupo experimental de 0,5g/L, os embriões permaneciam no estágio de mórula (Fig. 21B), enquanto no grupo experimental de 2,5g/L, os embriões estavam mais avançados que no grupo de 0,5g/L, porém mais atrasados que o grupo controle passando pelo período de epibolia (Fig. 21C).

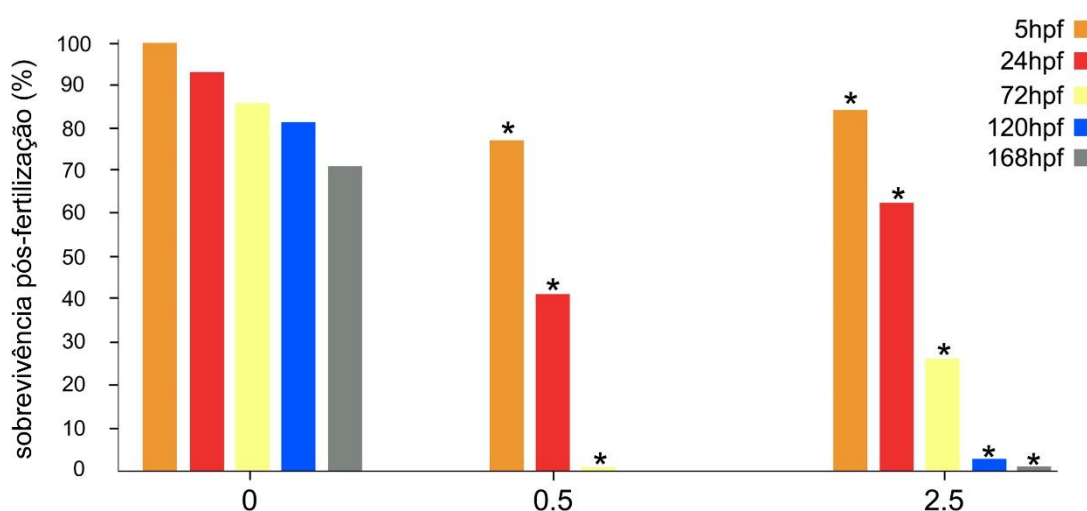
A partir do segundo dia de desenvolvimento (48 hpf), no grupo controle, os embriões já estavam com a cauda totalmente formada sendo possível observar seus primeiros movimentos no interior do ovo (Fig. 21D). Em contrapartida, os ovos do grupo experimental de 0,5g/L passaram a apresentar sinais de morte celular e não concluíram a embriogênese (Fig. 21E). No grupo experimental de 2,5g/L, os embriões ainda estavam no início do período de segmentação (Fig. 21F).

Com 72 horas pós-fecundação (72 hpf), as larvas do grupo controle eclodiram (Fig 21G). Durante o mesmo período foi possível perceber a cauda bem pronunciada e se desprendendo do saco vitelino no grupo experimental de 2,5g/L (Fig 21I). Foram necessários mais dois dias para que os embriões completassem o seu desenvolvimento. Assim, com 144 hpf a larva do grupo controle já era livre natante (Fig. 21J), enquanto que os indivíduos do grupo experimental de 2,5g/L morreram horas antes da eclosão (Fig. 21L), tendo somente de 1 a 3 larvas conseguido eclodir (Fig. 21L), em cada réplica. Ainda assim, estes espécimes morreram um dia após eclosão.

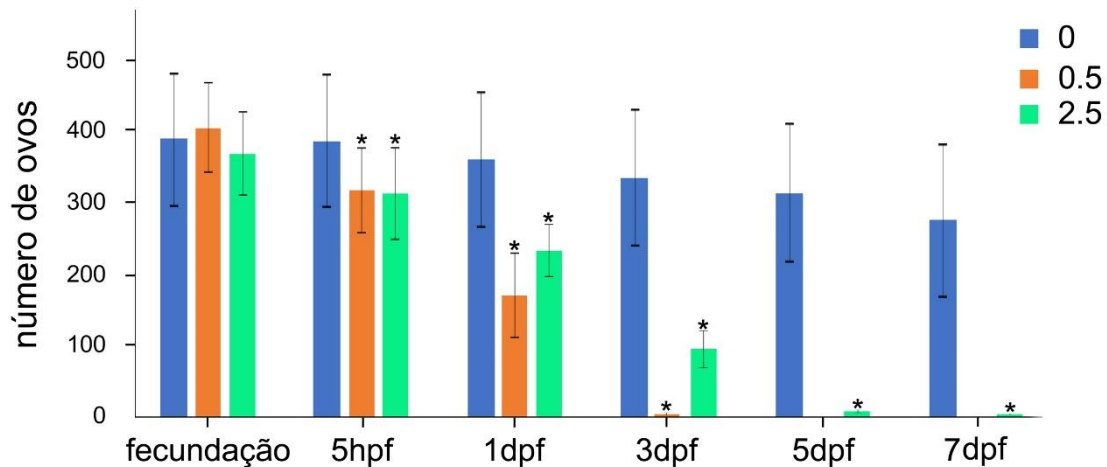


**FIGURA 21.** Fases do desenvolvimento embrionário de *Danio rerio* apresentando as alterações encontradas no Grupo Controle e nos Grupos Experimentais de 0,5g/L e 2,5g/L. **(A)** Embrião formado. Notar a formação dos olhos (cabeça da seta). **(B)** Disco embrionário em fase de mórula (seta). **(C)** Disco embrionário em processo de epibolia (seta). **(D)** Cauda completamente formada, momento em que o embrião realizava seus primeiros movimentos. **(E)** Ovo em estágio de decomposição avançado. **(F)** Embrião em processo de epibolia (seta). **(G)** Larva eclodida após três dias de desenvolvimento. **(H)** Ovo em estágio de decomposição. **(I)** Cauda proeminente e já se separando do vitelo (asterisco). **(J)** Larva nadante. **(K)** Ovo em estágio de decomposição. **(L)** Larva morta antes da eclosão. **(M)** Larva viva eclodida após seis dias de desenvolvimento. sv: saco vitelínico, zp: zona pelúcida, hpf; horas pós-fertilização. Barra: 100µm.

A contagem dos ovos durante a primeira semana de desenvolvimento embrionário mostrou a alta taxa de mortalidade dos ovos e embriões oriundos de pais expostos ao MPs (Fig. 22). Enquanto no grupo controle, a taxa de sobrevivência em 168hpf é de mais de 70%, no grupo experimental de 2,5g/L é de apenas 0,27%, embora o número de ovos liberados durante a desova tenha sido semelhante entre os 3 grupos experimentais e em grande quantidade (Fig. 23). Ainda assim, a taxa de sobrevivência dos ovos e embriões nos grupos experimentais de 0,5 e 2,5g/L foi extremamente baixa, já nas primeiras 24hpf (Fig. 22 e 23).

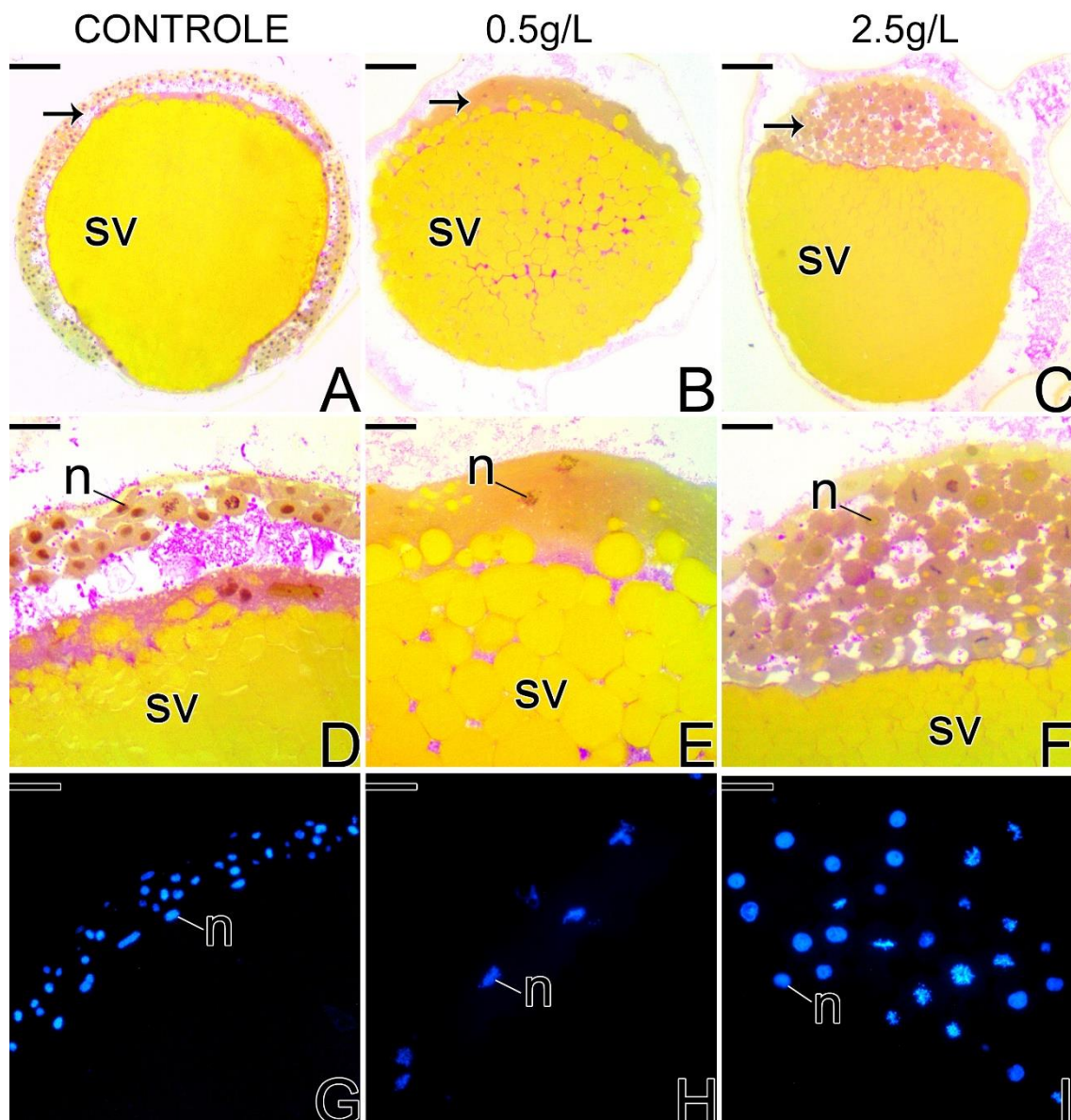


**FIGURA 22.** Médias das taxas de sobrevivência (%) dos ovos / embriões de *Danio rerio* após 5, 24, 72, 120 e 168hpf (horas pós-fertilização), nos grupos controle e experimentais de 0,5g/L e 2,5g/L. Uma redução significativa da taxa de sobrevivência ( $p < 0,05$ ) foi observada em concentrações de MPs de 0,5g/L e 2,5g/L. Diferenças estatísticas significativas em comparação ao grupo controle foram marcadas com asterisco (\*).



**FIGURA 23.** Contagem de ovos / embriões de *Danio rerio* sobreviventes ( $n^{\circ}$ ;  $\pm$  desvio padrão) após 5hpf (horas pós-fertilização), 1, 3, 5 e 7dpf (dias pós-fertilização), nos grupos controle e experimentais de 0,5g/L e 2,5g/L. Uma redução significativa de sobreviventes ( $p < 0,05$ ) foi observada em nos grupos experimentais de 0,5g/L e 2,5g/L, a partir das primeiras horas de desenvolvimento embrionário. Diferenças estatísticas significativas em comparação ao grupo controle foram marcadas com asterisco (\*).

Em cortes histológicos realizados em ovos fertilizados com 12 hpf, foi possível evidenciar as diferenças nas divisões celulares durante as primeiras etapas do desenvolvimento embrionário (Fig. 24). No grupo controle (Fig. 24A), as células encontravam-se em intensas divisões mitóticas (Fig. 18D, G) e o processo de epibolia encontrava-se concluído (Fig. 24A). No grupo experimental de 0,5g/L, o disco embrionário constituído pela blastoderme (Fig. 24B) mostrou-se amorfo e com a presença de núcleos esparsos (Fig. 24E, H), que na microscopia de fluorescência demonstraram conformação anormal (Fig. 24H). Além disso, os grânulos de vitelo no saco vitelínico mostravam-se mais individualizados (Fig. 24E) do que os do grupo controle. No grupo experimental de 2,5g/L, não foram observadas alterações nas células em divisão mitótica, porém houve atraso no desenvolvimento, sendo o embrião encontrado ainda em fase de mórula (Fig. 24C, F, I).

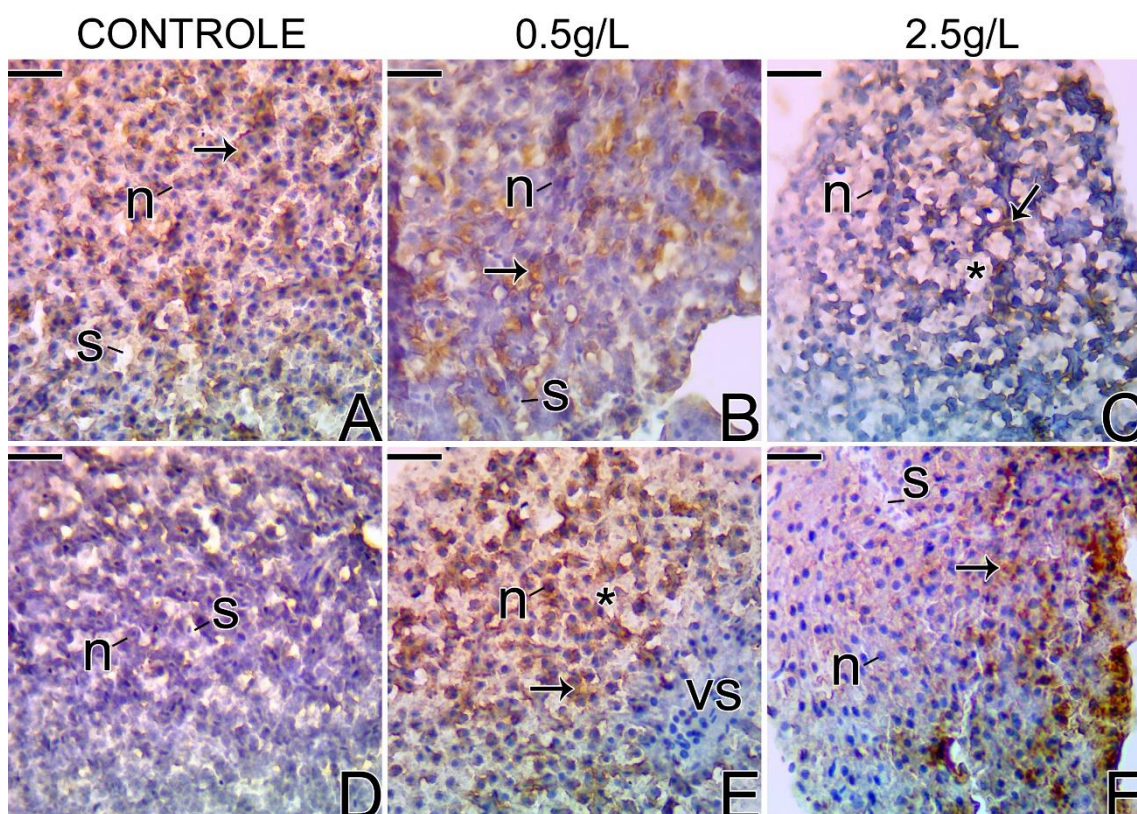


**FIGURA 24.** Cortes histológicos de embriões de *Danio rerio* após 24h da fertilização. **(A)** Embrião do Grupo Controle em estágio de epibolia (seta). **(B)** Embrião do Grupo Experimental de 0,5g/L com degenerações (seta). **(C)** Embrião do Grupo Experimental de 2,5g/L apresentando desenvolvimento tardio, ainda em mórula (seta). **(D-F)** Detalhes das divisões celulares dos embriões. **(G-I)** Marcações com DAPI de núcleos das células embrionárias. N: núcleo, sv: saco vitelínico. Coloração: Metanil Yellow, Hematoxilina, PAS. Barra: 50 $\mu$ m (A, B, C), 10 $\mu$ m (D, E, F, G, H, I).

### 5.9. Imunohistoquímica

Em fígados de fêmeas, houve marcação de vitelogenina no grupo controle (Fig. 25A) e nos grupos experimentais de 0,5g/L (Fig. 25B) e de 2,5g/L (Fig. 25C), sendo que no fígado do grupo experimental de 2,5g/L foi possível identificar distensões do citoplasma dos hepatócitos, tornando a resposta da marcação para vitelogenina menos intensa do que no grupo experimental de 2,5g/L.

Em fígados de machos, não houve marcação de vitelogenina no grupo controle (Fig. 25D), porém nos grupos experimentais de 0,5g/L (Fig. 25E) e de 2,5g/L (Fig. 25F), a vitelogenina foi marcada nos hepatócitos. No fígado do grupo experimental de 0,5g/L também foram observadas distensões do citoplasma dos hepatócitos.

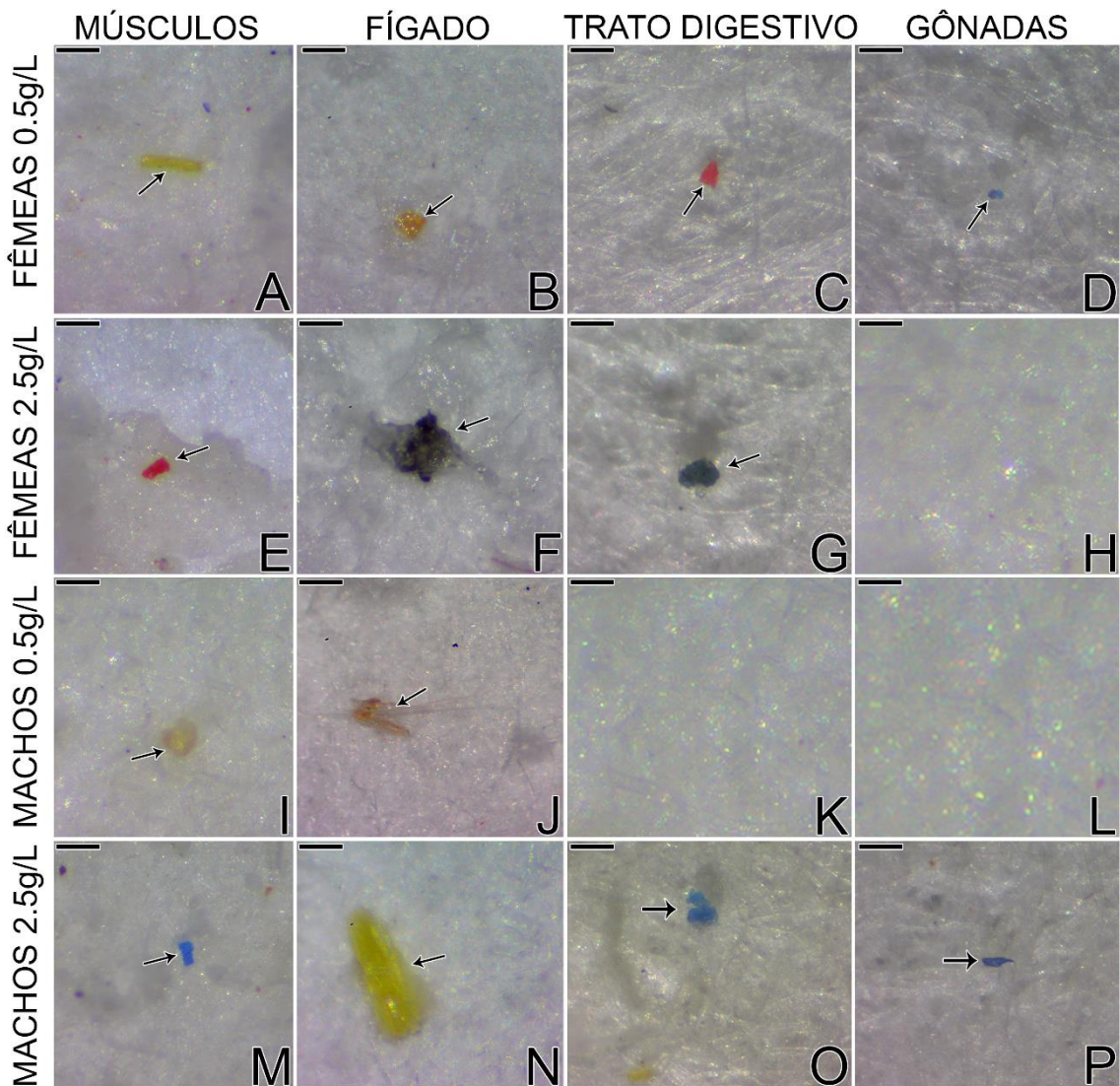


**FIGURA 25.** Imunohistoquímica para detecção da Vitelogenina em fígados de *Danio rerio* do Grupo Controle (A, D) e dos Grupos Experimentais de 0,5g/L (B, E) e 2,5g/L (C, F). Notar a marcação positiva indicada pelas setas. Alterações do citoplasma dos hepatócitos são indicadas por asterisco. **(A-C)** Fígados de fêmea. **(D-F)** Fígados de macho. n: núcleo dos hepatócitos, vs: vaso sanguíneo, s: sinusóide. Barra: 50µm.

### **5.10. Digestão Ácida**

A digestão ácida identificou a presença de MPs em todos tecidos utilizados. Os MPs encontrados variaram em formato, cor e tamanho. Em fêmeas do grupo experimental de 0,5g/L, foram encontrados MPs no tecido muscular (Fig. 26A), no fígado (Fig. 26B), no trato digestivo (Fig. 26C) e em ovários (Fig. 26D). Em fêmeas do grupo experimental de 2,5g/L, foi constatada a presença de MPs no tecido muscular (Fig. 26E), no fígado (26F) e no trato digestivo (Fig. 26G).

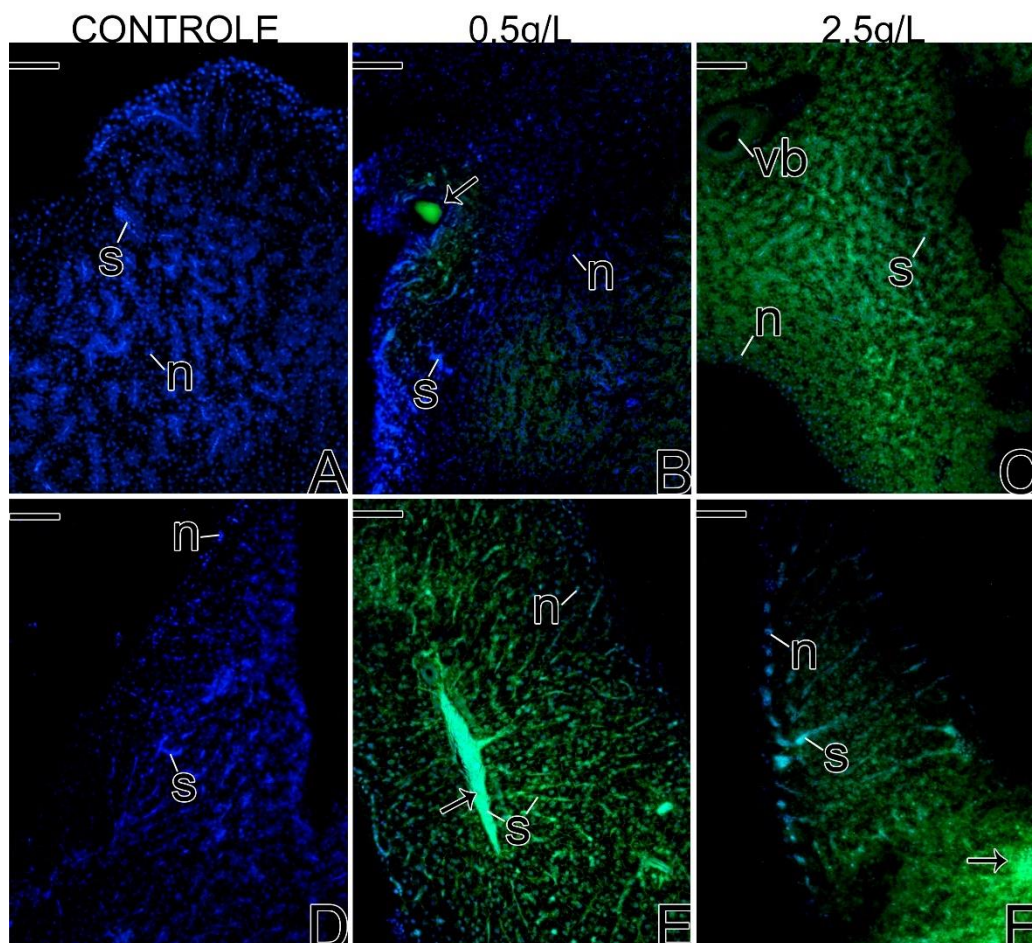
Os machos do grupo experimental de 0,5g/L, apresentaram presença de MPs somente no tecido muscular (Fig. 26I) e no fígado (Fig. 26J). Em machos do grupo experimental de 2,5g/L foram encontrados MPs no tecido muscular (Fig. 26M), no fígado (Fig. 26N), no trato digestivo (Fig. 26O) e nos testículos (Fig. 26P).



**FIGURA 26.** Digestão ácida de *Danio rerio* para identificação da presença de MPs. **(A-D)** Fêmeas do Grupo Experimental de 0,5g/L. **(E-H)** Fêmeas do Grupo Experimental de 2,5g/L. **(I-L)** Machos do Grupo Experimental de 0,5g/L. **(M-P)** Machos do Grupo Experimental de 2,5g/L. **(A-E-I-M)** Digestão de tecido muscular. **(B-F-J-N)** Digestão do fígado. **(C-G-K-O)** Digestão do trato digestivo. **(D-H-L-P)** Digestão da gônada. Notar a presença da variação de tamanhos, cores e formatos dos MPs encontrados indicados pelas setas. Barra: 10µm.

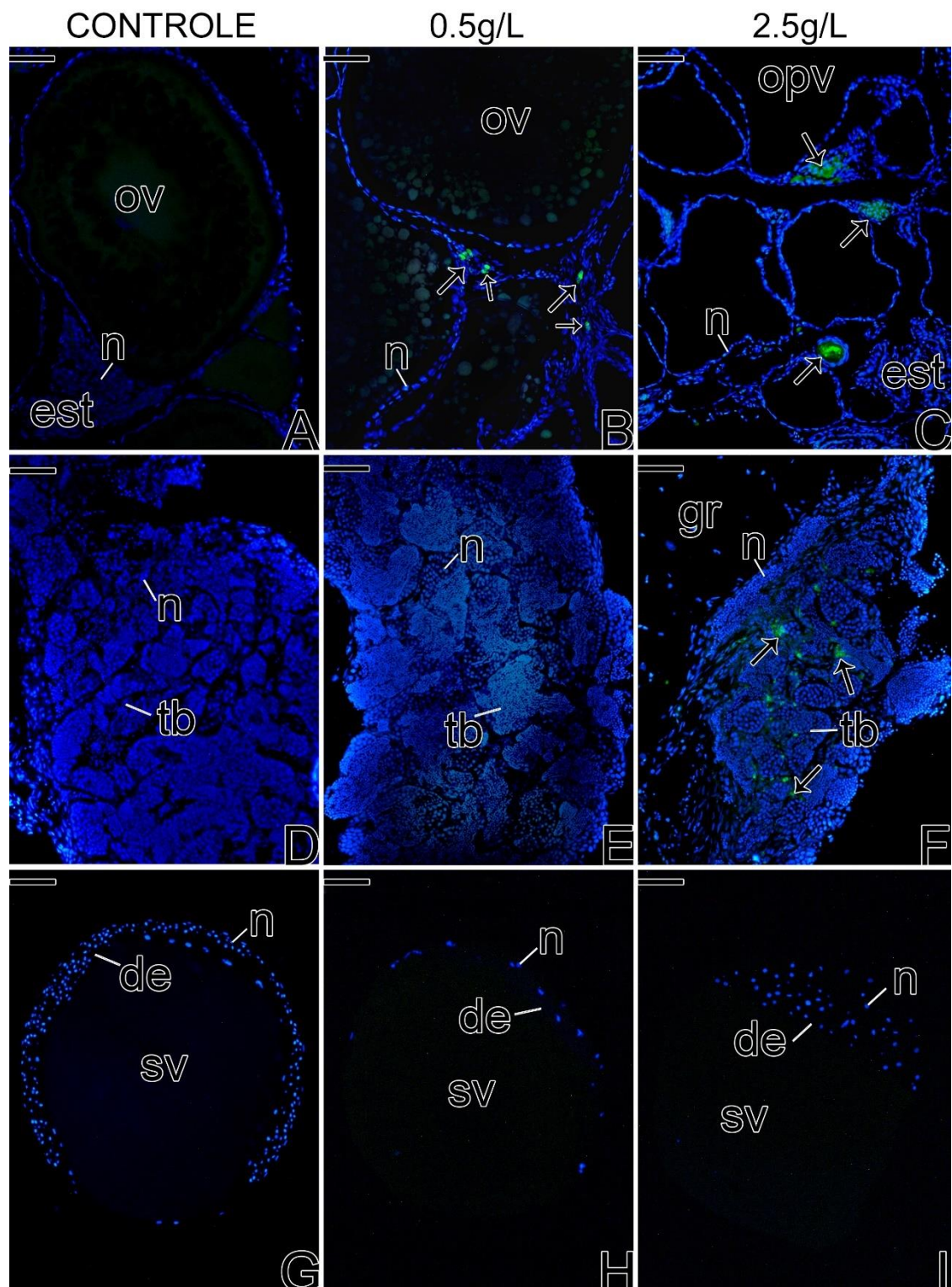
### 5.11. Fluorescência

Análises em microscopia de fluorescência demonstraram a presença de MPs em gônadas e fígados dos dois grupos experimentais (Fig. 27). A autofluorescência não é detectada nos grupos controle (Fig. 27A, D). Entretanto, em fígados de fêmeas do grupo experimental de 0,5g/L foram observadas regiões fluorescentes (Fig. 27B). No grupo experimental de 2,5g/L os fígados femininos também foram marcados, porém em regiões mais extensas (Fig. 27C). Em machos, extensa área do parênquima hepático apresentou autofluorescência (Fig. 27E, F). No fígado dos machos do grupo experimental de 0,5g/L houve intensa marcação dos sinusoides (Fig. 27E), enquanto que no grupo experimental de 2,5g/L, a observação da autofluorescência foi dificultada pelo rompimento dos hepatócitos (Fig. 27F).



**Figura 27.** Microscopia de fluorescência em fígados do Grupo Controle (A, D) e dos Grupos Experimentais de 0,5g/L (B, E) e 2,5g/L (C, F). **(A-C)** Fígado de fêmeas. **(D-F)** Fígado de machos. Observar regiões auto fluorescentes apontadas por setas. n: núcleos de hepatócitos, s: sinusoides, vb: vesícula biliar. Barra: 50µm.

Em relação às gônadas e ovos analisados, a autofluorescência não foi detectada nos grupos controle (Fig. 28A, D, G). Porém, em ovários do grupo experimental de 0,5g/L, foram observados pequenos pontos fluorescentes no estroma ovariano (Fig. 28B) e no grupo experimental de 2,5g/L, houve marcações em regiões mais extensas do estroma (Fig. 28C). Em ambos os grupos expostos aos MPs, alguns grânulos de vitelo também mostraram autofluorescência (dados não mostrados). Já nas gônadas masculinas, os testículos do grupo experimental 0,5g/L não mostraram autofluorescência (Fig. 28E); somente em testículos do grupo experimental de 2,5g/L foram encontradas regiões auto fluorescentes (Fig. 28F). Embriões com 12 hpf também foram analisados, porém nenhuma autofluorescência foi detectada (Fig. 28G-I), mesmo nos grupos expostos aos MPs.



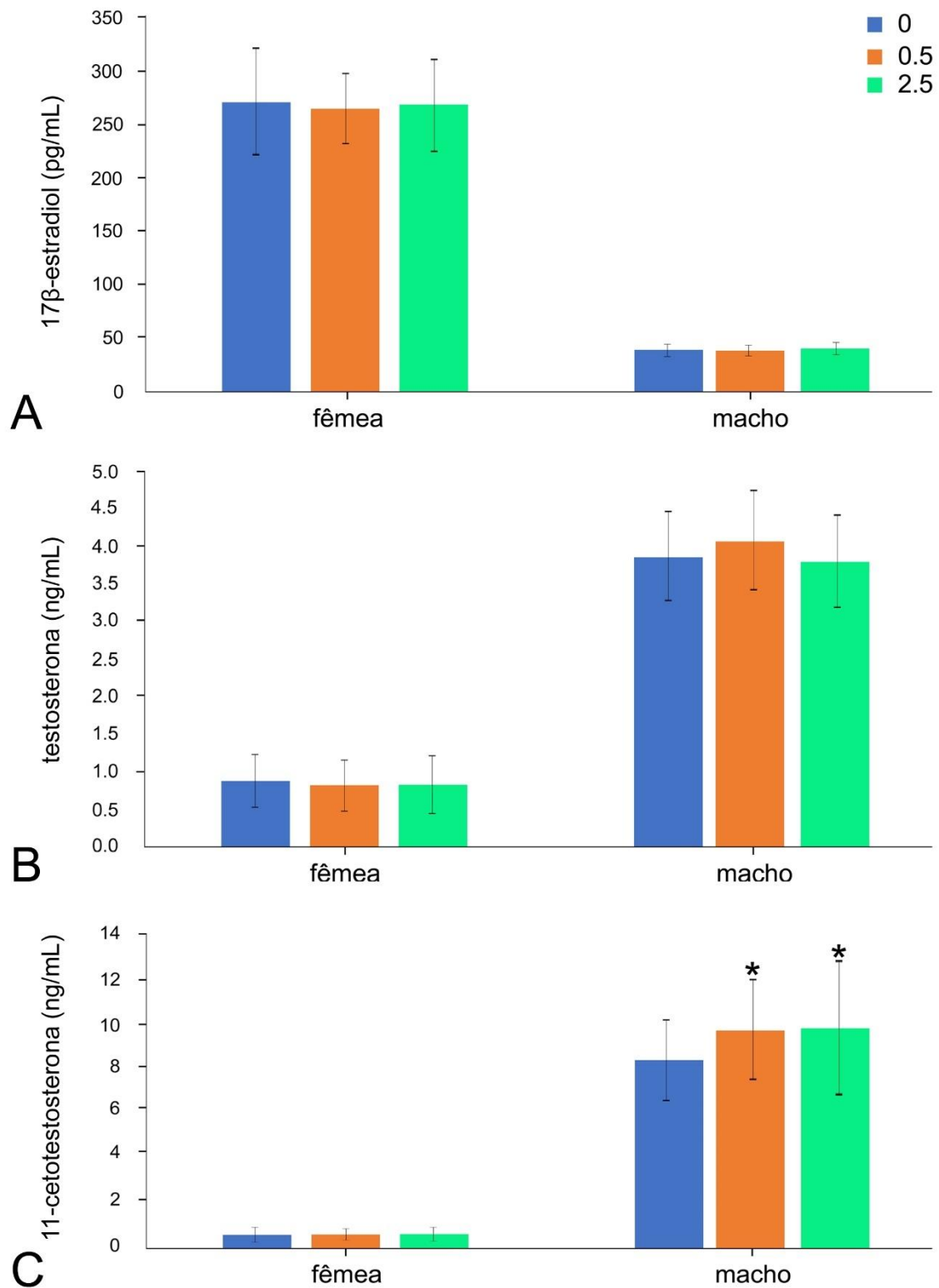
**Figura 28:** Microscopia de fluorescência em gônadas e embriões do Grupo Controle (A, D, G) e dos Grupos Experimentais de 0,5g/L (B,E,H) e 2,5g/L (C, F, I). **(A-C)** Ovários. **(D-F)** Testículos. **(G-F)** Embriões. Observar regiões mais marcadas apontadas por setas. n:núcleos, ov: oócitos vitelogênicos, opv: oócitos pré-vitelogênicos, est: estroma ovariano, tb: túbulos testiculares, de: disco embrionário, sv: saco vitelínico. Barra: 50µm.

### **5.12. Níveis Plasmáticos de Esteroides Sexuais**

Os níveis plasmáticos de 17 $\beta$ -estradiol (E2) não mostraram diferença significativa em relação ao grupo controle, tampouco entre os grupos experimentais de 0,5g/L e 2,5g/L (Fig. 29A), sejam estes indivíduos femininos ou masculinos. A média dos níveis plasmáticos de E2 das fêmeas variou entre 266,0 e 272,4 pg/mL, enquanto que nos machos, a variação de E2 foi de 39 a 40,37 pg/mL.

Os níveis plasmáticos de testosterona (T) também não mostraram diferença significativa em relação ao grupo controle, nem entre os grupos experimentais de 0,5g/L e 2,5g/L (Fig. 29B), tanto em indivíduos femininos como nos masculinos. A média dos níveis plasmáticos de T das fêmeas variou entre 0,81 e 0,83 ng/mL, enquanto que nos machos, a variação de T foi de 3,8 a 4,0 ng/mL.

Em relação aos níveis plasmáticos de 11-cetotestosterona (11-KT) das fêmeas analisadas, não houve diferença significativa em relação ao grupo controle ou entre os grupos experimentais de 0,5g/L e 2,5g/L (Fig. 29C). Nessas fêmeas, a média dos níveis plasmáticos de 11-KT variou entre 0,52 e 0,55 ng/mL. Já nos machos, ambos os grupos experimentais de 0,5g/L e 2,5g/L apresentaram diferença significativa em relação do grupo controle (8,53 ng/mL), sendo que média dos níveis plasmáticos de 11-KT foi igual a 9,90 ng/mL e 9,97 ng/mL nos grupos experimentais de 0,5g/L e 2,5g/L, respectivamente.



**Figura 29:** Níveis plasmáticos de: **A)** 17β-Estradiol; **B)** Testosterona; e **C)** 11-Cetotestosterona (média + desvio padrão) em fêmeas e machos nos diferentes grupos experimentais: controle (n=30), 0,5g/L (n=30) e 2,5g/L (n=30). Grupos marcados com asterisco (\*) denotam diferenças significativas ( $p < 0.05$ ) em relação ao grupo controle.

## 6. DISCUSSÃO

### 6.1. Microplásticos e Órgãos Viscerais

As alterações macroscópicas mais evidentes encontradas neste trabalho foram o acúmulo de gordura visceral e a degradação em órgãos dos tratos digestivos. Os principais meios de entrada de micro e nanoplasticos em organismos aquáticos são pelas brânquias, através da respiração, e pelo trato digestivo, através da ingestão (Mallik et al., 2021). Embora receba grandes quantidades dessas partículas, o potencial acumulativo de MPs no trato digestivo é baixo (Jovanović, 2017). Entretanto, a passagem crônica de MPs pode causar graves alterações a nível celular e tecidual, como alargamento da lâmina própria, descolamento do epitélio da mucosa da lâmina própria, encurtamento e inchaço das vilosidades, vacuolização dos enterócitos, aumento e hiperplasia das células calciformes, e perda da estrutura regular da camada serosa (Pedà et al., 2016).

Além disso, MPs podem se translocar para outros órgãos, aumentando sua nocividade (Lu et al., 2016; Ding et al., 2018). Isso mostra-se bastante preocupante, uma vez que, no presente estudo, por meio da digestão ácida foram encontrados MPs nos tratos digestivos de todos os grupos tratados, demonstrando que houve a ingestão destes materiais. Também foram encontrados MPs em testículos do grupo experimental de 2,5g/L e ovários do grupo experimental de 0,5g/L, demonstrando que houve translocação de MPs, embora a forma de transporte para estes órgãos e entrada de tais partículas nos tecidos gonadais permaneçam desconhecidos. Em um levantamento bibliográfico realizado por Sales Ribeiro e colaboradores (2020) foi proposto que a absorção de MPs do trato gastrointestinal para outros órgãos possui duas rotas principais: transcelular e paracelular. A rota transcelular envolve a absorção pelas microvilosidades do intestino, enquanto a rota paracelular ocorre pela passagem entre as zonas oclusivas, sendo que, em ambas as rotas, o destino dos MPs é o sangue. Um estudo sobre interações entre polímeros e membranas biológicas demonstrou que nanopartículas de poliestireno permeiam facilmente nas membranas lipídicas alterando sua estrutura e reduzindo a difusão molecular (Rossi, 2014), entretanto partículas em escalas de micrômetros não conseguiram penetrar as membranas. Já foi sugerido que a passagem pelas

zonas oclusivas é a rota mais provável para os MPs chegarem à corrente sanguínea devido a faixa de tamanho que abrangem (Wright, 2017). Neste aspecto, um estudo demonstrou que os MPs podem causar a diminuição de 8 genes ligados à adesão celular e à manutenção das junções celulares (Limonta et al., 2019). Assim, é possível que partículas menores entrem por difusão nas células epiteliais do intestino e enfraqueçam suas junções oclusivas, facilitando a passagem de partículas maiores para a corrente sanguínea.

Dentre os órgãos utilizados para avaliar os efeitos dos MPs, o fígado tem chamado atenção para a toxicidade destes materiais. Estudos realizados em peixes demonstram que a exposição a micro e nanoplásticos pode causar necrose, infiltração, acúmulo de gotículas de lipídeos, depleção de glicogênio e vacuolização de gordura (Rochman et al., 2013; Lu et al., 2016). Em girinos, o acúmulo hepático de MPs resultou em esteatose, degeneração hidrópica, congestão e dilatação dos vasos sanguíneos (Malafaia et al., 2020). Em camundongos foram observados sinais de inflamação e acúmulo de lipídeos no fígado, aumento de marcadores de estresse oxidativo hepático e alterações na transcrição de genes relacionados ao metabolismo de glicolipídeos (Deng et al., 2017; Lu et al., 2018; Luo et al., 2019). Acúmulo de lipídeos em hepatócitos são sintomas comuns em condições inflamatórias, sendo usados como marcadores para respostas inflamatórias (Bozza e Viola, 2010). Utilizando organoides do fígado humano Cheng e colaboradores (2021) demonstraram que os MPs causaram hepatotoxicidade e interrupção do metabolismo lipídico. Efetivamente, os efeitos dos MPs no fígado não se resumem às alterações histológicas, mas se estendem às funções metabólicas. Embora o presente estudo não tenha feito avaliações metabólicas, o acúmulo anormal de gordura visceral, as esteatoses e as lacerações observadas sugerem graves disfunções do metabolismo lipídico. A baixa resposta positiva ao PAS nos grânulos dos hepatócitos sugerem que o armazenamento de glicogênio nos fígados dos grupos experimentais expostos aos MPs também foi afetado, tanto em indivíduos femininos quanto masculinos.

Para além das funções metabólicas, o fígado dos peixes exerce funções sintetizantes cruciais para a reprodução, como a produção da vitelogenina, uma proteína específica, que é a responsável pela formação dos grânulos de vitelo que nutrirão os embriões (Lazier, 1993). Esta proteína sintetizada no fígado na

forma de glicolipofosfoproteína sob influência de esteroides sexuais, especialmente o 17 $\beta$ -estradiol (Lubzens et al., 2010), é secretada para a corrente sanguínea e então transportada para os ovários, sendo capturadas por micropinocitose, via receptores de membrana nos oócitos em desenvolvimento para o processo de vitelogênese (Lubzens et al., 2010; Hara et al., 2016). Embora seja uma proteína característica de fêmeas, machos de *zebrafish* também podem sintetizá-la e secretá-la quando exposto a poluentes mimetizadores de estrogênio (Sumpter e Jobling, 1995; Marin e Matozzo, 2004). Deste modo a vitelogenina tem sido usada como um biomarcador de poluição estrogênica ou de desregulador endócrino (Denslow et al., 1999; Zhong et al., 2014). No presente estudo, a presença de vitelogenina em machos tratados com MPs sugere que estas partículas e/ou seus constituintes são capazes de causar desregulação endócrina, uma vez que a produção de vitelogenina em tais animais não foi estimulada por estradiol, já que sua concentração plasmática se manteve semelhante ao grupo controle.

## **6.2. Microplásticos e a Gônada Feminina**

Os efeitos tóxicos dos MPs em gônadas têm se tornado uma temática de interesse crescente para a comunidade científica. Utilizando MPs virgens Quiang e Cheng (2021) demonstraram um aumento nos níveis de espécies reativas de oxigênio (ROS) em ovários e testículos de *zebrafish*, com significativo aumento da taxa de apoptose nos testículos. Um estudo realizado com camundongos revelou que MPs são absorvidos por células foliculares e desencadeiam processos de apoptose e piroptose, uma forma altamente inflamatória de morte celular, diminuindo a reserva ovariana (Hou et al., 2021). É importante salientar que materiais plásticos possuem alta afinidade por contaminantes presentes no meio, como pesticidas organoclorados e metais pesados (Massos e Turner, 2017; Vedolin et al., 2017). Além disso, alguns elementos químicos como o Bisfenol A (BPA), comumente utilizado para conferir propriedades especiais ao plástico, possuem alta capacidade cancerígena e podem alterar o funcionamento do sistema hormonal (Beserra et al., 2012). Embora os níveis plasmáticos nos peixes aqui analisados não tenham sofrido alterações, não se sabe a longo prazo se as concentrações de esteroides sexuais no sangue podem aumentar ou

diminuir, visto que o tempo de exposição aos MPs no presente estudo foi bastante curto.

Entretanto, estudos realizados em peixes têm demonstrado os efeitos prejudiciais de substâncias, comumente encontradas em plásticos, nos ovários. Pequenas concentrações de cádmio foram capazes de gerar vacuolizações em oócitos vitelogênicos e destacamento das células foliculares em tilápia vermelhas do Nilo (El-Ebiary et al., 2013). Em *zebrafish* o BPA mostrou-se prejudicial à oogênese, causando a degenerações de oócitos vitelogênicos (Yon e Akbulut, 2014). Tais estudos demonstram similaridade com os resultados encontrados neste trabalho, no qual as alterações dos oócitos foram exclusivamente observadas naqueles de estágios vitelogênicos. Um estudo realizado em *zebrafish* revelou que degenerações em oócitos vitelogênicos são mais frequentes e normalmente se iniciam com hipertrofia e hiperplasia das células foliculares (Üçüncü e Cakici, 2009). Entretanto, a hipertrofia das células foliculares observada está além do que pode ser considerado um processo comum. Sabe-se que o BPA pode induzir inflamação, apoptose e peroxidação lipídica em ovários de *zebrafish* (Biswas et al., 2020). Embora análises mais aprofundadas dos MPs não tenham sido realizadas, a presença de substâncias tóxicas é uma hipótese plausível.

Dentre as alterações observadas em ovários, as variações na quantidade e no tamanho dos centros melanomacrofágicos chamaram a atenção. Centros melanomacrofágicos (CMMs) são agrupamentos de fagócitos que se localizam majoritariamente dentro do estroma do baço e no interstício renal em teleósteos, e são pigmentados de forma escura devido ao alto teor de lipofuscina, melanina e hemossiderina (Agius, 1985; Agius e Roberts, 2003). CMMs também podem estar presentes em brânquias, cérebros e gônadas (Macchi et al., 1992). Estudos realizados em diferentes espécies de peixes identificaram inúmeras semelhanças entre os centros germinativos dos mamíferos e CMMs, sugerindo que os CMMs sejam o local da resposta imune adaptativa em teleósteos (Steinel e Bolnick, 2017). Neste estudo CMMs foram observados com mais facilidade em peixes expostos a concentrações maiores de MPs, especificamente em fêmeas, explicitando os efeitos inflamatórios dos MPs, sugerindo que os ovários possam ser mais sensíveis a eles ou que o processo de transporte de vitelogenina do

fígado para o ovário aumente a concentração de MPs e seus derivados no tecido gonadal, levando a um processo inflamatório ou formação de cistos, na tentativa de isolar corpos estranhos. Alguns estudos já demonstraram que o número e o tamanho dos CMMs podem aumentar após infecções (Herraez e Zapata, 1986; Vogelbein et al., 1987; Kranz, 1989). Além disso, é sabido que CMMs possuem grande importância na eliminação de detritos e no armazenamento a longo prazo materiais indigestíveis e/ou tóxicos (Ellis et al., 1976; Plusford et al., 1992; Sayed e Younes, 2017).

### **6.3. Microplásticos e a Gônada Masculina**

Apesar de escassos, estudos que avaliaram os efeitos dos MPs em testículos de peixes evidenciaram que estresses oxidativos e apoptoses são os principais efeitos dessas partículas. Em *zebrafish* a exposição a MPs regulou positivamente a expressão de cinco genes relacionados à apoptose, gerando um aumento significativo na taxa de apoptose testicular (Quiang e Cheng, 2021). Na Tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*), os MPs aumentaram o estresse oxidativo em testículos e causaram vacuolizações do epitélio germinativo (Ismail et al., 2021). Após a exposição a MPs as atividades das enzimas antioxidantes em testículos de Medaka marinho (*Oryzias melastigma*) foram significativamente diminuídas, além de causar espessamento do interstício e afrouxamento dos cistos de espermátócitos (Wang et al., 2019). No presente estudo, foi observada uma concentração de granulócitos próximos às regiões com grande acúmulo de gordura e corpos estranhos. Também houve vacuolizações no interstício e nos cistos, conforme observado nos trabalhos supracitados. Aparentemente, a invasão do tecido adiposo nos testículos pode ser considerado um indício de intensa inflamação. Recentemente, em um experimento realizado com camundongos, foi demonstrado que os MPs induzem toxicidade reprodutiva levando a diminuição dos níveis de testosterona, inflamação testicular e destruição da barreira hemato-testicular, além de causarem morfologia anormal dos espermatozoides, como perda do acrossomo, diminuição da cabeça, acefalia, dobra cervical e perda de flagelo (Jin et al., 2021).

#### 6.4. Microplásticos, Reprodução e o Desenvolvimento Embrionário

As alterações gonadais observadas em fêmeas e machos adultos de *zebrafish* não causaram mortes significativas e nem impediram que a reprodução ocorresse. Entretanto, a exposição dos adultos aos MPs resultou em atrasos no desenvolvimento embrionário da prole, com posterior aumento de mortalidade, mesmo que os ovos e embriões não tenham sido expostos diretamente aos MPs. Expondo embriões diretamente a micro e nanoplásticos, Duan e colaboradores (2020) demonstraram que o córion bloqueia a maior parte das partículas, entretanto o tamanho dos nanoplásticos possibilitou sua acumulação em embriões e em cérebros, brânquias, sangue, fígado e trato digestivo de larvas recém-eclodidas. Estudos semelhantes demonstraram que os nanoplásticos podem penetrar no córion de *zebrafish* e se acumular no saco vitelínico e em outras regiões, levando a bradicardia e hipoatividade locomotora nos embriões/larvas (Pitt et al., 2018a).

Malafaia e colaboradores (2020) verificaram a eclosão precoce de embriões expostos a MPs e sugeriram que ela pode estar relacionada com o acúmulo dessas partículas no córion, levando à obstrução dos poros, dificultando assim as trocas gasosas. Assim, o suprimento inadequado de oxigênio ao embrião pode ter estimulado a movimentação muscular e, conseqüentemente, a eclosão precoce do embrião, bem como alterações fisiológicas prejudiciais após o nascimento. Outro estudo demonstrou que quando embriões de *zebrafish* são expostos aos MPs, a taxa de eclosão diminui, assim como a competência natatória de larvas eclodidas (Qiang e Cheng, 2019). Entretanto, a maior parte dos estudos que avaliaram os efeitos de micro e nanoplásticos no desenvolvimento embrionário fizeram-no expondo ovos de *zebrafish* diretamente a estes materiais. Apesar de ter sido demonstrado que fêmeas adultas de *zebrafish*, expostas a nanoplásticos, podem transferir essas partículas para a prole, afetando o sistema antioxidante em tecidos adultos e larvas de F1 (Pitt et al., 2018b), isso não foi o suficiente para retardar o tempo de desenvolvimento embrionário. Nem mesmo a injeção de nanoplásticos em embriões no estágio de blástula resultou em atrasos no desenvolvimento (Venemam et al., 2017).

Embora a presença dos MPs não tenha modificado os padrões de cortejo entre os casais, tampouco influenciado no comportamento reprodutivo e desova,

a prole resultante de pais tratados com MPs foi significativamente afetada, sofrendo atrasos nos eventos celulares e interrupção do progresso da diferenciação celular. Ademais, oócitos vitelogênicos apresentaram alterações em células foliculares que são essenciais para a formação da zona pelúcida (Mazzoni et al., 2010), que constitui o córion, principal proteção dos embriões (Kimmel et al., 1995). Neste estudo, também foram relatadas alterações no epitélio germinativo de testículos e marcações de vitelogenina em machos, indicando que os MPs podem ser bastante nocivos para as funções reprodutivas dos machos a longo prazo. Entretanto, uma vez que não houve alterações importantes nas concentrações de esteroides sexuais tanto de machos, como de fêmeas, é possível que a homeostase de tais hormônios sexuais tenham contribuído para a formação de gametas viáveis, permitindo sucesso na reprodução, ainda que a prole não tenha sobrevivido.

## 7. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Até o momento a maior parte dos estudos realizados com MPs utilizaram concentrações de  $\mu\text{g/L}$ , que geralmente representam valores menores em relação ao que de fato ocorre no meio ambiente (Eerkes-Medrano et al., 2015). Isso demonstra que os efeitos nocivos dos MPs ainda carecem de mais estudos que se aproximem da realidade, para que sua iminente ameaça seja melhor compreendida. Diante de tal variação de resultados encontrados na literatura, supõe-se que, de qualquer forma, os efeitos dos plásticos no desenvolvimento embrionário, e conseqüentemente na reprodução contínua da espécie, podem ser devastadores, mesmo que os ovos e embriões não tenham sido expostos diretamente a diferentes compostos ou que os pais tenham sido expostos por curtos períodos.

## 8. CONCLUSÃO

- A exposição aos microplásticos ocasionou hipertrofização das células foliculares, alterações na disposição dos grânulos de vitelo e de alvéolos corticais em oócitos vitelogênicos de *D. rerio*;
- Fêmeas expostas à diferentes concentrações de microplásticos apresentaram aumento na quantidade de centros melanomacrofágicos nos ovários;
- Em gônadas masculinas de *D. rerio*, a exposição aos microplásticos resultou em acúmulo de gordura, vacuolizações nos compartimentos intersticial e germinativo, afrouxamento dos cistos e descaracterização do epitélio germinativo;
- Independente da concentração utilizada de microplásticos, o cortejo e a reprodução dos adultos tratados de *D. rerio* não foram afetados. Entretanto, houve alta mortalidade dos embriões e atrasos no desenvolvimento embrionário;
- A exposição aos microplásticos levou ao acúmulo de partículas no trato digestivo, ovários, testículos, e tecidos musculares do *zebrafish*;
- Possíveis alterações endócrinas causadas por exposição aos microplásticos resultaram na produção de vitelogenina por agentes mimetizantes de esteroides sexuais, em fígados de machos de *D. rerio*, uma vez que os níveis plasmáticos basais de tais hormônios não foram afetados;
- A exposição aos microplásticos causou esteatoses, fibroses e lacerações em fígados de *zebrafish*, tanto nos machos como nas fêmeas tratadas;
- A exposição aos microplásticos afetou o trato digestivo, gerando acúmulo de gordura e degenerações, em ambos os sexos.

## 9. REFERÊNCIAS

- Agius, C. (1985). The melano-macrophage centres of fish: a review. *Fish Immunology*, 85-105.
- Agius, C., & Roberts, R. J. (2003). Melano-macrophage centres and their role in fish pathology. *Journal of Fish Diseases*, 26(9), 499-509.
- Aljaibachi, R., & Callaghan, A. (2018). Impact of polystyrene microplastics on *Daphnia magna* mortality and reproduction in relation to food availability. *PeerJ*, 6, e4601.
- Alomar, C., Estarellas, F., & Deudero, S. (2016). Microplastics in the Mediterranean Sea: deposition in coastal shallow sediments, spatial variation and preferential grain size. *Marine Environmental Research*, 115, 1-10.
- Anbumani, S., & Kakkar, P. (2018). Ecotoxicological effects of microplastics on biota: a review. *Environmental Science and Pollution Research*, 25(15), 14373-14396.
- Andrade, V. X. L., Honji, R. M., & Romagosa, E. (2010). Process of gonad maturation of *Pseudoplatystoma corruscans* fed diets containing different levels of protein and supplemented with corn oil. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, 62(2), 332-342.
- Andrady, A. L. (2011). Microplastics in the marine environment. *Marine Pollution Bulletin*, 62(8), 1596-1605.
- Arantes, F. P., Santos, H. B., Rizzo, E., Sato, Y., & Bazzoli, N. (2010). Profiles of sex steroids, fecundity, and spawning of the curimatã-pacu *Prochilodus argenteus* in the São Francisco River, downstream from the Três Marias Dam, Southeastern Brazil. *Animal Reproduction Science*, 118(2-4), 330-336.
- Auta, H. S., Emenike, C. U., & Fauziah, S. H. (2017). Screening of Bacillus strains isolated from mangrove ecosystems in Peninsular Malaysia for microplastic degradation. *Environmental Pollution*, 231, 1552-1559.
- Avio, C. G., Gorbi, S., & Regoli, F. (2015). Experimental development of a new protocol for extraction and characterization of microplastics in fish tissues: first observations in commercial species from Adriatic Sea. *Marine Environmental Research*, 111, 18-26.
- Bhagat, J., Zang, L., Nishimura, N., & Shimada, Y. (2020). Zebrafish: An emerging model to study microplastic and nanoplastic toxicity. *Science of The Total Environment*, 728, 138707.
- Barcellos, L. J., Wassermann, G. F., Scott, A. P., Woehl, V. M., Quevedo, R. M., Ittzés, I., ... & Lulhier, F. (2001). Steroid profiles in cultured female jundia, the siluridae *Rhamdia quelen* (Quoy and Gaimard, Pisces Teleostei), during the first reproductive cycle. *General and Comparative Endocrinology*, 121(3), 325-332.

- Barcellos, L. J. G., Wassermann, G. F., Scott, A. P., Woehl, V. M., Quevedo, R. M., Itzès, I., ... & Lulhier, F. (2002). Plasma steroid concentrations in relation to the reproductive cycle of cultured male *Rhamdia quelen*. *Journal of Fish Biology*, 61(3), 751-763.
- Beserra, M. R., de Araújo Schiavini, J., Rodrigues, W. C., & Pereira, C. D. S. S. (2012). Bisphenol A: its use and the current controversy regarding possible harm to human health. *Revista Eletrônica TECCEN*, 5(1), 37-46.
- Besseling, E., Wang, B., Lüring, M., & Koelmans, A. A. (2014). Nanoplastic affects growth of *S. obliquus* and reproduction of *D. magna*. *Environmental Science & Technology*, 48(20), 12336-12343.
- Billard, R. (1986). Spermatogenesis and spermatology of some teleost fish species. *Reproduction Nutrition Développement*, 26(4), 877-920.
- Biswas, S., Ghosh, S., Samanta, A., Das, S., Mukherjee, U., & Maitra, S. (2020). Bisphenol A impairs reproductive fitness in zebrafish ovary: Potential involvement of oxidative/nitrosative stress, inflammatory and apoptotic mediators. *Environmental Pollution*, 267, 115692.
- Bozza, P. T., & Viola, J. P. (2010). Lipid droplets in inflammation and cancer. *Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids (PLEFA)*, 82(4-6), 243-250.
- Briggs, J. P. (2002). The zebrafish: a new model organism for integrative physiology. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 282(1), R3-R9.
- Browne, M. A., Niven, S. J., Galloway, T. S., Rowland, S. J., & Thompson, R. C. (2013). Microplastic moves pollutants and additives to worms, reducing functions linked to health and biodiversity. *Current Biology*, 23(23), 2388-2392.
- Brown-Peterson, N. J., Wyanski, D. M., Saborido-Rey, F., Macewicz, B. J., & Lowerre-Barbieri, S. K. (2011). A standardized terminology for describing reproductive development in fishes. *Marine and Coastal Fisheries*, 3(1), 52-70.
- Brown-Peterson, N. J., Grier, H. J., & Overstreet, R. M. (2002). Annual changes in germinal epithelium determine male reproductive classes of the cobia. *Journal of Fish Biology*, 60(1), 178-202.
- Castro, R. O., da Silva, M. L., & de Araujo, F. V. (2018). Review on microplastic studies in Brazilian aquatic ecosystems. *Ocean & Coastal Management*, 165, 385-400.
- Cedervall, T., Hansson, L. A., Lard, M., Frohm, B., & Linse, S. (2012). Food chain transport of nanoparticles affects behaviour and fat metabolism in fish. *PLoS one*, 7(2), e32254.
- Christensen, V., & Pauly, D. (Eds.). (1993). *Trophic models of aquatic ecosystems* (Vol. 26). WorldFish.
- Cleveland, B. M., & Weber, G. M. (2015). Effects of sex steroids on expression of genes regulating growth-related mechanisms in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *General and Comparative Endocrinology*, 216, 103-115.

- Cole, M., Lindeque, P., Fileman, E., Halsband, C., Goodhead, R., Moger, J., & Galloway, T. S. (2013). Microplastic ingestion by zooplankton. *Environmental Science & Technology*, 47(12), 6646-6655.
- Cózar, A., Echevarría, F., González-Gordillo, J. I., Irigoien, X., Úbeda, B., Hernández-León, S., ... & Duarte, C. M. (2014). Plastic debris in the open ocean. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 111(28), 10239-10244.
- Cui, R., Kim, S. W., & An, Y. J. (2017). Polystyrene nanoplastics inhibit reproduction and induce abnormal embryonic development in the freshwater crustacean *Daphnia galeata*. *Scientific Reports*, 7(1), 1-10.
- da Costa, J. P., Santos, P. S., Duarte, A. C., & Rocha-Santos, T. (2016). (Nano) plastics in the environment—sources, fates and effects. *Science of the Total Environment*, 566, 15-26.
- da Costa, J. P. (2018). Micro-and nanoplastics in the environment: research and policymaking. *Current Opinion in Environmental Science & Health*, 1, 12-16.
- Dammski, A. P., Müller, B. R., Gaya, C., & Regonato, D. (2011). *Zebrafish-Manual de criação em Biotério. Curitiba (PR): Universidade Federal do Paraná*, 20-1.
- De Sales-Ribeiro, C., Brito-Casillas, Y., Fernandez, A., & Caballero, M. J. (2020). An end to the controversy over the microscopic detection and effects of pristine microplastics in fish organs. *Scientific Reports*, 10(1), 1-19.
- Degani, G., Boker, R., & Jackson, K. (1998). Growth hormone, sexual maturity and steroids in male carp (*Cyprinus carpio*). *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Pharmacology, Toxicology and Endocrinology*, 120(3), 433-440.
- Deng, Y., Zhang, Y., Lemos, B., & Ren, H. (2017). Tissue accumulation of microplastics in mice and biomarker responses suggest widespread health risks of exposure. *Scientific Reports*, 7(1), 1-10.
- Denslow, N. D., Chow, M. C., Kroll, K. J., & Green, L. (1999). Vitellogenin as a biomarker of exposure for estrogen or estrogen mimics. *Ecotoxicology*, 8(5), 385-398.
- Duan, Z., Duan, X., Zhao, S., Wang, X., Wang, J., Liu, Y., ... & Wang, L. (2020). Barrier function of zebrafish embryonic chorions against microplastics and nanoplastics and its impact on embryo development. *Journal of hazardous materials*, 395, 122621.
- El-Ebiary, E. H., Wahbi, O. M., & El-Greisy, Z. A. (2013). Influence of dietary cadmium on sexual maturity and reproduction of red tilapia. *The Egyptian Journal of Aquatic Research*, 39(4), 313-317.
- Ellis, A. E., Munroe, A. L. S., & Roberts, R. J. (1976). A study of the phagocytic system and the fate of intraperitoneally injected particulate material in the plaice (*Pleuronectes platessa* L.). *Journal of Fish Biology*, 8, 67-78.
- Eerkes-Medrano, D., Thompson, R. C., & Aldridge, D. C. (2015). Microplastics in freshwater systems: a review of the emerging threats, identification of knowledge gaps and prioritisation of research needs. *Water Research*, 75, 63-82.

- Ferreira, P., Fonte, E., Soares, M. E., Carvalho, F., & Guilhermino, L. (2016). Effects of multi-stressors on juveniles of the marine fish *Pomatoschistus microps*: gold nanoparticles, microplastics and temperature. *Aquatic Toxicology*, 170, 89-103.
- Fossi, M. C., Marsili, L., Baini, M., Giannetti, M., Coppola, D., Guerranti, C., ... & Panti, C. (2016). Fin whales and microplastics: The Mediterranean Sea and the Sea of Cortez scenarios. *Environmental Pollution*, 209, 68-78.
- Gallagher, A., Rees, A., Rowe, R., Stevens, J., & Wright, P. (2016). Microplastics in the Solent estuarine complex, UK: an initial assessment. *Marine Pollution Bulletin*, 102(2), 243-249.
- Gilbert, S. F. (2003). The morphogenesis of evolutionary developmental biology. *International Journal of Developmental Biology*, 47(7-8), 467.
- Greenspan, P., Mayer, E. P., & Fowler, S. D. (1985). Nile red: a selective fluorescent stain for intracellular lipid droplets. *The Journal of Cell Biology*, 100(3), 965-973.
- Grier, H. (2000). Ovarian germinal epithelium and folliculogenesis in the common snook, *Centropomus undecimalis* (Teleostei: Centropomidae). *Journal of Morphology*, 243(3), 265-281.
- Grier, H. J., & Nostro, F. L. (2000). The germinal epithelium in fish gonads: The unifying concept. In *Proceedings of the 6th International Symposium on the Reproductive Biology of Fish* (pp. 233-236).
- Grier, H. J., Uribe-Aranzábal, M. C., & Patiño, R. (2009). The ovary, folliculogenesis, and oogenesis in teleosts. *Reproductive Biology and Phylogeny of Fishes (agnathans and bony fishes)*, 8(Part A), 25-84.
- Harrison, J. P., Schratzberger, M., Sapp, M., & Osborn, A. M. (2014). Rapid bacterial colonization of low-density polyethylene microplastics in coastal sediment microcosms. *BMC microbiology*, 14(1), 1-15.
- Hafez, E. S. E., Jainudeen, M. R., & Rosnina, Y. (2004). Hormônios, fatores de crescimento e reprodução. *Reprodução Animal*, 7, 33-53.
- Hara, A., Hiramatsu, N., & Fujita, T. (2016). Vitellogenesis and choriogenesis in fishes. *Fisheries Science*, 82(2), 187-202.
- Hart, N. H. (1990). Fertilization in teleost fishes: mechanisms of sperm-egg interactions. *International Review of Cytology*, 121, 1-66.
- Herraez, M. P., & Zapata, A. G. (1986). Structure and function of the melano-macrophage centres of the goldfish *Carassius auratus*. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 12(1-4), 117-126.
- Horton, A. A., Svendsen, C., Williams, R. J., Spurgeon, D. J., & Lahive, E. (2017). Large microplastic particles in sediments of tributaries of the River Thames, UK—Abundance, sources and methods for effective quantification. *Marine Pollution Bulletin*, 114(1), 218-226.

- Hou, J., Lei, Z., Cui, L., Hou, Y., Yang, L., An, R., ... & Zhang, L. (2021). Polystyrene microplastics lead to pyroptosis and apoptosis of ovarian granulosa cells via NLRP3/Caspase-1 signaling pathway in rats. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 212, 112012.
- International Maritime Organization, IMO. (2015). Plastic particles in the ocean may be as harmful as plastic bags, report says. *International Maritime Organization Press Briefing Archives*. 27/04/2015.
- Ismail, R. F., Saleh, N. E., & Sayed, A. E. D. H. (2021). Microplastics induced endocrine disruption, alteration in testicular tissue in tilapia (*Oreochromis niloticus*) pre-fed on *Amphora coffeaeformis*. *Research Square*.
- Jin, H., Ma, T., Sha, X., Liu, Z., Zhou, Y., Meng, X., ... & Ding, J. (2021). Polystyrene microplastics induced male reproductive toxicity in mice. *Journal of Hazardous Materials*, 401, 123430.
- Jobling, M. (1996). *Environmental Biology of Fishes*. London: *Chapman & Hall*. 456 p.
- Jovanović, B. (2017). Ingestion of microplastics by fish and its potential consequences from a physical perspective. *Integrated Environmental Assessment and Management*, 13(3), 510-515.
- Kim, J., Hayton, W.L., Schultz, I.R. (2006). Modeling the brain–pituitary–gonad axis in salmon. *Marine Environmental Research*. 62: 426-432.
- Kranz, H. (1989). Changes in splenic melano-macrophage centres of dab *Limanda limanda* during and after infection with ulcer disease. *Diseases of Aquatic Organisms*, 6(3), 167-173.
- Kunz, Y.W. (2004). *Developmental Biology of Teleost Fishes*. Dordrecht, Springer. 636p.
- La Fleur Jr, G. J., Raldúa, D., Fabra, M., Carnevali, O., Denslow, N., Wallace, R. A., & Cerdà, J. (2005). Derivation of major yolk proteins from parental vitellogenins and alternative processing during oocyte maturation in *Fundulus heteroclitus*. *Biology of Reproduction*. 73(4): 815-824.
- Lazier, C. B. (1993). Vitellogenin gene expression in teleost fish. *Biochemistry and Molecular Biology of Fishes*, 391-405.
- Le Gac, F., Loir, M. (1999). Male reproductive system, fish. In: KNOBIL, E.; NEILL, J. D. (Ed.). *Encyclopedia of Reproduction*. San Diego: Academic Press. 3: 20-30.
- Le Menn, F., Cerdà, J., Babin, P.J. (2007). Ultrastructural aspects of the ontogeny and differentiation of ray-finned fish ovarian follicles. In: Babin PJ, Cerdà J, Lubzens E. editors. *The Fish Oocyte: From Basic Studies to Biotechnological Applications*. Dordrecht: Springer, p1-37.
- Levavi-Sivan, B., Bogerd, J., Mañanós, E.L., Gómez, A., Lareyre, J.J. (2010). Perspectives on fish gonadotropins and their receptors. *General and Comparative Endocrinology*. 165: 412-437.
- Lieschke, J.G., Currie, P.D. (2007). Animal models of human disease: *Zebrafish* swim into view. *Nature Reviews Genetics*, Vol. 8, no.5.

- Lu, L., Wan, Z., Luo, T., Fu, Z., & Jin, Y. (2018). Polystyrene microplastics induce gut microbiota dysbiosis and hepatic lipid metabolism disorder in mice. *Science of the Total Environment*, 631, 449-458.
- Lubzens, E., Young, G., Bobe, J., Cerdá, J. (2010). Oogenesis in teleosts: how fish eggs are formed. *General and Comparative Endocrinology*. 165: 36-389.
- Luo, T., Wang, C., Pan, Z., Jin, C., Fu, Z., & Jin, Y. (2019). Maternal polystyrene microplastic exposure during gestation and lactation altered metabolic homeostasis in the dams and their F1 and F2 offspring. *Environmental Science & Technology*, 53(18), 10978-10992.
- Lusher, A. L., Hernandez-Milian, G., O'Brien, J., Berrow, S., O'Connor, I., & Officer, R. (2015). Microplastic and macroplastic ingestion by a deep diving, oceanic cetacean: the True's beaked whale *Mesoplodon mirus*. *Environmental Pollution*, 199, 185-191.
- Ma, Y., Huang, A., Cao, S., Sun, F., Wang, L., Guo, H., & Ji, R. (2016). Effects of nanoplastics and microplastics on toxicity, bioaccumulation, and environmental fate of phenanthrene in fresh water. *Environmental pollution*, 219, 166-173.
- Macchi, G.J., Romanol, A. & Christiansen, H.E. (1992). Melanomacrophage centres in white mouth croaker *Micropogonias furneri*, as biological indicators of environmental changes. *Journal of Fish Biology* 40, 971–973.
- Malafaia, G., de Souza, A. M., Pereira, A. C., Goncalves, S., da Costa Araujo, A. P., Ribeiro, R. X., & Rocha, T. L. (2020). Developmental toxicity in zebrafish exposed to polyethylene microplastics under static and semi-static aquatic systems. *Science of The Total Environment*, 700, 134867.
- Mansour, N., Lahnsteiner, F., Patzner, R.A. (2009). Ovarian fluid plays an essential role in attachment of Eurasian perch, *Perca fluviatilis* eggs. *Theriogenology*, 71: 586-593.
- Marin, M. G., & Matozzo, V. (2004). Vitellogenin induction as a biomarker of exposure to estrogenic compounds in aquatic environments. *Marine Pollution Bulletin*, 48(9-10), 835-839.
- Massos, A., & Turner, A. (2017). Cadmium, lead and bromine in beached microplastics. *Environmental Pollution*, 227, 139-145.
- Matova, N., Cooley, L. (2001). Comparative aspects of animal oogenesis. *Development Biology* 231: 291-320. 101.
- Mazzoni, T. S., Grier, H. J., & Quagio-Grassiotto, I. (2010). Germline cysts and the formation of the germinal epithelium during the female gonadal morphogenesis in *Cyprinus carpio* (Teleostei: Ostariophysi: Cypriniformes). *The Anatomical Record: Advances in Integrative Anatomy and Evolutionary Biology*, 293 (9), 1581-1606.
- Mazzoni, T. S., Bombardelli, R. A., & Quagio-Grassiotto, I. (2020). Reproductive Biology of Neotropical Fishes: A Guide to Identification to the Gonadal Morphology During the Reproductive Cycle of Catfish *Rhamdia quelen* (Siluriformes: Heptapteridae). *Aquatic Science and Technology*, 8(2), 15-35.

- Miura, T., Miura, C.I. (2003). Molecular control mechanisms of fish spermatogenesis. *Fish Physiology and Biochemistry*. 28: 181-186
- Moreira, H.L.M., Vargas, L., Ribeiro, R.P., Zimmermann, S. (2001). Fundamentos da Moderna Aquicultura. Editora da ULBRA/ Canoas. 200p.
- Munakata, A., Kobayashi, M. (2010). Endocrine control of sexual behavior in teleost fish. *General and Comparative Endocrinology*. 165: 456-468.
- Nagahama, Y. (1983). The functional morphology of teleost gonads. In: *Fish physiology*. (Hoar, W.S., Randall, D.J., Donaldson, E.M., eds.). New York, Academic Press. V. IX, chap. 6.
- Nakatani, K., Agostinho, A.A., Baumgartner, G., Bialecki, A., Sanches, P.V., Makrakis, M.C., Pavanelli, C.S. (2001). Ovos e larvas de peixes de água doce: Desenvolvimento e manual de identificação. Maringá: EDUEM.
- Nelson, J. S., Grande, T. C., & Wilson, M. V. (2016). Fishes of the World. *John Wiley & Sons*.
- Nobre, C.R., Santana, M.F.M., Maluf, A., Cortez, F.S., Cesar, A., Pereira, C.D.S., Turra, A. (2015). Assessment of microplastic toxicity to embryonic development of the sea urchin *Lytechinus variegatus* (Echinodermata: echinoidea). *Marine Pollution Bulletin*. 92: 99–104.
- Nóbrega, R. H., Batlouni, S. R., & França, L. R. (2009). An overview of functional and stereological evaluation of spermatogenesis and germ cell transplantation in fish. *Fish Physiology and Biochemistry*, 35 (1), 197-206.
- Obbard, R. W., Sadri, S., Wong, Y. Q., Khitun, A. A., Baker, I., & Thompson, R. C. (2014). Global warming releases microplastic legacy frozen in Arctic Sea ice. *Earth's Future*, 2 (6), 315-320.
- Patiño, R., Sullivan, C.V. (2002). Ovarian follicle growth, maturation, and ovulation in teleost fish. *Fish Physiol Biochem*. 26: 57-70.
- Paul-Pont, I., Lacroix, C., Fernández, C. G., Hégaret, H., Lambert, C., Le Goïc, N., ... & Soudant, P. (2016). Exposure of marine mussels *Mytilus* spp. to polystyrene microplastics: toxicity and influence on fluoranthene bioaccumulation. *Environmental Pollution*, 216, 724-737.
- Peda, C., Caccamo, L., Fossi, M. C., Gai, F., Andaloro, F., Genovese, L., ... & Maricchiolo, G. (2016). Intestinal alterations in European sea bass *Dicentrarchus labrax* (Linnaeus, 1758) exposed to microplastics: preliminary results. *Environmental Pollution*, 212, 251-256.
- Pitt, J. A., Kozal, J. S., Jayasundara, N., Massarsky, A., Trevisan, R., Geitner, N., ... & Di Giulio, R. T. (2018a). Uptake, tissue distribution, and toxicity of polystyrene nanoparticles in developing zebrafish (*Danio rerio*). *Aquatic Toxicology*, 194, 185-194.
- Pitt, J. A., Trevisan, R., Massarsky, A., Kozal, J. S., Levin, E. D., & Di Giulio, R. T. (2018b). Maternal transfer of nanoplastics to offspring in zebrafish (*Danio rerio*): A case study with nanopolystyrene. *Science of the Total Environment*, 643, 324-334.

- Pulsford, A. L., Ryan, K. P., & Nott, J. A. (1992). Metals and melanomacrophages in flounder, *Platichthys flesus*, spleen and kidney. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*, 72(2), 483-498.
- Qiang, L., & Cheng, J. (2019). Exposure to microplastics decreases swimming competence in larval zebrafish (*Danio rerio*). *Ecotoxicology and environmental safety*, 176, 226-233.
- Qiang, L., & Cheng, J. (2021). Exposure to polystyrene microplastics impairs gonads of zebrafish (*Danio rerio*). *Chemosphere*, 263, 128161.
- Quagio-Grassiotto, I., Grier, H. J., Mazzoni, T. S., Nóbrega, R. H., & Amorim, J. P. (2011). Activity of the ovarian germinal epithelium on the follicle formation and the oocyte development in the freshwater catfish *Pimelodus maculatus* (Teleostei: Ostariophysi: Siluriformes). *Journal of Morphology*, 272, 1290-1306.
- Quintero-Hunter, I., Grier, H., & Muscato, M. (1991). Enhancement of histological detail using metanil yellow as counterstain in periodic acid Schiff's hematoxylin staining of glycol methacrylate tissue sections. *Biotechnic & Histochemistry*, 66(4), 169-172.
- Rankin, J. C. & Jensen, F. B. (1993). *Fish Ecophysiology*. London: Chapman & hall. 421 p.
- Retama, I., Jonathan, M.P., Shruti, V.C., Velumani, S., Sarkar, S.K., Roy, P.D., Rodriguez Espinosa, P.F. (2016). Microplastics in tourist beaches of Huatulco Bay, Pacific coast of southern Mexico. *Marine Pollution Bulletin*. 113: 530–535.
- Rochman, C. M., Hoh, E., Kurobe, T., & Teh, S. J. (2013). Ingested plastic transfers hazardous chemicals to fish and induces hepatic stress. *Scientific Reports*, 3(1), 1-7.
- Sayed, A. H., & Younes, H. A. (2017). Melanomacrophage centers in *Clarias gariepinus* as an immunological biomarker for toxicity of silver nanoparticles. *Journal of Microscopy and Ultrastructure*, 5(2), 97-104.
- Schulz, R. W., & Henk, J. (1999). Puberty in male fish: concepts and recent developments with special reference to the African catfish (*Clarias gariepinus*). *Aquaculture*, 177(1-4), 5-12.
- 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(3), 390-411.
- Schulz, R. W., & Henk, J. (1999). Puberty in male fish: concepts and recent developments with special reference to the African catfish (*Clarias gariepinus*). *Aquaculture*, 177(1-4), 5-12.
- Schulz, R. W., & Miura, T. (2002). Spermatogenesis and its endocrine regulation. *Fish Physiology and Biochemistry*, 26(1), 43-56.
- Selman, K., & Wallace, R. A. (1989). Cellular aspects of oocyte growth in teleosts. *Zoological Science*, 6(2), p211-231.

- Readfearn, G. (2018). WHO launches health review after microplastics found in 90% of bottled water. *Guardian Online*.
- Steinel, N. C., & Bolnick, D. I. (2017). Melanomacrophage centers as a histological indicator of immune function in fish and other poikilotherms. *Frontiers in Immunology*, 8, 827.
- Sumpter, J. P., & Jobling, S. (1995). Vitellogenesis as a biomarker for estrogenic contamination of the aquatic environment. *Environmental Health Perspectives*, 103(suppl 7), 173-178.
- Sutton, R., Mason, S. A., Stanek, S. K., Willis-Norton, E., Wren, I. F., & Box, C. (2016). Microplastic contamination in the san francisco bay, California, USA. *Marine Pollution Bulletin*, 109(1), 230-235.
- Swanson, P., Dickey, J. T., & Campbell, B. (2003). Biochemistry and physiology of fish gonadotropins. *Fish Physiology and Biochemistry*, 28(1), 53-59.
- Teuten, E. L., Rowland, S. J., Galloway, T. S., & Thompson, R. C. (2007). Potential for plastics to transport hydrophobic contaminants. *Environmental Science & Technology*, 41(22), 7759-7764.
- Tyler, C.R., Sumpter, J.P. (1996). Oocyte growth and development in teleosts. *Reviews in Fish Biology and Fisheries*. 6: 287-318.
- Üçüncü, S. İ., & Cakici, O. (2009). Atresia and apoptosis in preovulatory follicles in the ovary of *Danio rerio* (zebrafish). *Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 9(2).
- Vazzoler, A.E.A.M. (1996). Biologia da reprodução de peixes Teleósteos. Teoria e Prática. *Maringá: EDUEM*, 169p.
- Vedolin, M.C., Teophilo, C.Y.S., Turra, A., Figueira, R.C.L. (2017). Spatial variability in the concentrations of metals in beached microplastics. *Marine Pollution Bulletin*. 129 (2): 487–493.
- Veneman, W. J., Spaink, H. P., Brun, N. R., Bosker, T., & Vijver, M. G. (2017). Pathway analysis of systemic transcriptome responses to injected polystyrene particles in zebrafish larvae. *Aquatic Toxicology*, 190, 112-120.
- Vogelbein, W. K., Fournie, J. W., & Overstreet, R. M. (1987). Sequential development and morphology of experimentally induced hepatic melano-macrophage centres in *Rivulus marmoratus*. *Journal of Fish Biology*, 31, 145-153.
- Von Moos, N., Burkhardt-Holm, P., & Köhler, A. (2012). Uptake and effects of microplastics on cells and tissue of the blue mussel *Mytilus edulis* L. after an experimental exposure. *Environmental Science & Technology*, 46 (20): 11327-11335.
- Wallace, R. A., & Selman, K. (1990). Ultrastructural aspects of oogenesis and oocyte growth in fish and amphibians. *Journal of Electron Microscopy Technique*, 16(3), 175-201.
- Wang, J., Li, Y., Lu, L., Zheng, M., Zhang, X., Tian, H., ... & Ru, S. (2019). Polystyrene microplastics cause tissue damages, sex-specific reproductive disruption and transgenerational effects in marine medaka (*Oryzias melastigma*). *Environmental Pollution*, 254, 113024.

- Watson, P. (2001). Against the Current-The Plastic Sea. *EcoNomads LiBaware-Library of Awareness*. <http://libaware.economads.com/plasticsea.php> (accessed November 3, 2011).
- Wesch, C., Barthel, A. K., Braun, U., Klein, R., & Paulus, M. (2016). No microplastics in benthic eelpout (*Zoarces viviparus*): An urgent need for spectroscopic analyses in microplastic detection. *Environmental Research*, 148, 36-38.
- Westerfield, M. (1995). The *zebrafish* book: a guide for the laboratory use of *zebrafish* (*Brachydanio rerio*). University of Oregon press.
- Yön, N. D., & Akbulut, C. (2014). Histological changes in *zebrafish* (*Danio rerio*) ovaries following administration of bisphenol A. *Pakistan Journal of Zoology*, 46(4), 1153-1159.
- Zhang, W., Zhang, S., Wang, J., Wang, Y., Mu, J., Wang, P., ... & Ma, D. (2017). Microplastic pollution in the surface waters of the Bohai Sea, China. *Environmental pollution*, 231, 541-548.
- Zhang, C., Chen, X., Wang, J., & Tan, L. (2017). Toxic effects of microplastic on marine microalgae *Skeletonema costatum*: interactions between microplastic and algae. *Environmental Pollution*, 220, 1282-1288.
- Zhang, K., Su, J., Xiong, X., Wu, X., Wu, C., & Liu, J. (2016). Microplastic pollution of lakeshore sediments from remote lakes in Tibet plateau, China. *Environmental Pollution*, 219, 450-455.
- Zhong, L., Yuan, L., Rao, Y., Li, Z., Zhang, X., Liao, T., Xu, Y. & Dai, H. (2014). Distribution of vitellogenin in *zebrafish* (*Danio rerio*) tissues for biomarker analysis. *Aquatic Toxicology*, 149, 1-7.

## **10. ANEXO**

Certificado de Aprovação do Protocolo de Comissão de Ética para realização do trabalho.

## CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "Efeitos da exposição ao microplástico na estrutura gonadal e no sucesso reprodutivo de *Danio rerio*", protocolada sob o CEUA nº 4503250320 (ID 000058), sob a responsabilidade de **Prof. Dr. Rafael Henrique Nóbrega e equipe; Talita Sarah Mazzoni** - 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 - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovada** pela Comissão de Ética no Uso de Animais do Universidade Estadual Paulista (IBB/UNESP) na reunião de 07/04/2020.

We certify that the proposal "Effects of microplastic exposure on gonadal structure and reproductive success of *Danio rerio*", utilizing 60 Fishes (males and females), protocol number CEUA 4503250320 (ID 000058), under the responsibility of **Prof. Dr. Rafael Henrique Nóbrega and team; Talita Sarah Mazzoni** - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **approved** by the Ethic Committee on Animal Use of the São Paulo State University (IBB/UNESP) in the meeting of 04/07/2020.

Finalidade da Proposta: [Pesquisa \(Acadêmica\)](#)

Vigência da Proposta: de [04/2020](#) a [03/2022](#) Área: [Ciências Biológicas](#)

Origem: [Animais provenientes de estabelecimentos comerciais](#)

Espécie: [Peixes](#) sexo: [Machos e Fêmeas](#) idade: [10 a 12 meses](#) N: [60](#)

Linhagem: [Danio rerio](#) Peso: [0 a 1 g](#)

Local do experimento: Laboratório de Biologia Molecular e Reprodutiva, sob orientação do Prof. Dr. Rafael Henrique Nóbrega - DBEF- Morfologia - Instituto de Biociências de Botucatu

Botucatu, 07 de abril de 2020

Prof. Dr. Wellerson Rodrigo Scarano  
Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais  
Universidade Estadual Paulista

Prof. Dr. Bruno César Schimming  
Vice-Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais  
Universidade Estadual Paulista