Filipe Guilherme Andrade de Godoi

Efeitos do diclofenaco e cafeína nos ajustes fisiológicos reprodutivos de machos de *Astyanax altiparanae* (lambari-do-rabo-amarelo) (Teleostei: Characiformes: Characidae)

Effects of diclofenac and caffeine on reproductive physiological adjustments of *Astyanax altiparanae* males (lambari-do-rabo-amarelo) (Teleostei: Characiformes: Characidae)

São Paulo

2019

Filipe Guilherme Andrade de Godoi

VERSÃO CORRIGIDA

Original encontra-se disponível no Instituto de Biociências da Universidade São Paulo

Efeitos do diclofenaco e cafeína nos ajustes fisiológicos reprodutivos de machos de *Astyanax altiparanae* (lambari-do-rabo-amarelo) (Teleostei: Characiformes: Characidae)

Effects of diclofenac and caffeine on reproductive physiological adjustments of *Astyanax altiparanae* males (lambari-do-rabo-amarelo) (Teleostei: Characiformes: Characidae)

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

Orientador(a): Renata Guimarães Moreira Whitton

Coorientador(a): Fabiana L. Lo Nostro

São Paulo

2019

Andrade de Godoi, Filipe Guilherme

Efeitos do diclofenaco e cafeína nos ajustes fisiológicos reprodutivos de machos de *Astyanax altiparanae* (Lambari-do-rabo-amarelo) (Teleostei: Characiformes: Characidae)

74 p.

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

1. Fármacos

2. Desreguladores endócrinos

3. Peixes

I. Universidade de São Paulo. Instituto de Biociências. Departamento de Fisiologia.

Comissão Julgadora:

_____ _____

Prof. Dr. Fernando Ribeiro Gomes Prof(a). Dr(a). Cassiana Carolina Montagner Raimundo

_____ _____

Prof(a). Dr(a). Maria Inês Borella Prof(a). Dr.(a) Renata Guimarães Moreira Whitton

Orientador(a)

A Deus, a minha família e aos meus amigos.

Trago dentro do meu coração,
Como num cofre que se não pode fechar de cheio,
Todos os lugares onde estive,
Todos os portos a que cheguei,
Todas as paisagens que vi através de janelas ou vigias,
Ou de tombadilhos, sonhando,
E tudo isso, que é tanto, é pouco para o que eu quero.
Fernando Pessoa.

“Tudo quanto te vier à mão para fazer, faze-o conforme as tuas forças, porque na sepultura, para onde tu vais, não há obra nem projeto, nem conhecimento, nem sabedoria alguma”.

Eclesiastes 9:10

Agradecimentos

A Deus por ter colocado pessoas honestas, amigas e companheiras na minha vida. Agradeço pela sabedoria, saúde paz, crescimento e fé que me dá a cada dia em poder acreditar que pelos desafios da vida haverá sempre as vitórias.

À minha família, aos meus pais Vanderlei e Sebastiana e aos meus irmãos Laysa e Victor pelo suporte incondicional em todas as fases da minha vida pessoal e profissional, por terem acreditado no meu potencial e no meu mestrado, o apoio deles sempre foi, é e será importante para mim. Que Deus abençoe vocês e que estejam sempre fazendo parte da minha vida e das minhas conquistas.

À Joseane pela amizade e companheirismo, pelos bons momentos e experiências vividas durante o mestrado, uma pessoa que me ajudou a crescer muito e amadurecer pessoalmente e profissionalmente. Deus te abençoe na caminhada da tua vida.

À todo o pessoal da TOCA DO ESTUDANTE por ter me acolhido na comunidade, por todos os bons momentos que passamos juntos nas reuniões, nos estudos e nas atividades que foram desenvolvidas. Aqui fica os meus sinceros agradecimentos ao Pastor Libério e esposa Juliane, Evaldo e Rebeca, Emerson, Dani, Carol Pimentel, Thales, Giovana, João , Vitor, Daniel, Carol Rios, Renan, Lauro, Isabelle, Isadora, Fernando e todos os integrantes da comunidade que estiveram presentes na minha formação.

Aos lameroenses do Laboratório de Metabolismo e Reprodução de Organismos Aquáticos (LAMEROA) por toda ajuda e os conhecimentos que foram desenvolvidos ao longo deste mestrado, cada um dos integrantes me ensinou algo na vida pessoal e profissional. Eu agradeço a Gabi, a Aline, a Marcela, o Kadu, a Giovana, o Kainã, a Rapha, a Valquíria, o Victor, o João, o Honji, a Victória, a Bia, a Fernanda, o Bruno Araújo, o Bruno, o Paulo, a Cecília, a Ethiene, a Natália, a Maria e ao Vagner.

Ao Instituto de Biociências e ao Departamento de Fisiologia por me cederem o espaço necessário para realizar as pesquisas. À Roseli e à Erika pela ajuda nas burocracias e documentos.

À CESP, em nome do MSc. Danilo Canepelle pela doação dos animais utilizados nos experimentos.

Ao CNPq pela bolsa inicial do mestrado (130190/2017-9) e a Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pela bolsa ao longo do mestrado (2017/07139-5) e a bolsa de estágio de pesquisa no exterior (2018/10495-0), sem o fomento dessas agências não seria possível a realização deste mestrado.

Ao Professor Lucio Agnes do Instituto de Química pela disponibilidade nos testes iniciais para quantificação dos fármacos.

À Professora Dra. Oliana Carnevali da *Universitá Politécnica Delle Marche* por ter me aceitado para realizar o meu estágio de pesquisa no exterior e à Isabel Forner por todos os conhecimentos técnicos e científicos trabalhados ao longo do estágio. Ao pessoal (Valentina, Michela, Francesca, Basilio, Danilo, Matteo, Chiara, Giorgia, Arturo) do Laboratório da professora Oliana pelo suporte na pesquisa conduzida e por terem me ajudado na conversação em italiano quando necessária. Aprendi muitas coisas durante a minha estadia em Ancona na Itália, muito obrigado.

À Professora Dra. Fabiana L Lo Nostro (Fabi) da *Universidad de Buenos Aires* (UBA) pela coorientação durante todo o mestrado, uma pessoa fantástica que sempre disponibilizou seu tempo e conhecimentos para ajudar nessa caminhada pela pós-graduação. Eu peço a Deus por ti muita saúde, sabedoria e força e eu espero continuar as colaborações com a professora.

À minha querida orientadora Professora Dra. Renata Guimarães Moreira Whitton, para mim pessoalmente Re/Mãe na ciência, amiga de longa data. Eu agradeço por todos os ensinamentos sobre o mundo acadêmico e os conhecimentos na área da fisiologia reprodutiva e ecotoxicologia. Durante esse mestrado, nós passamos por muita coisa juntos, alguns momentos desafiadores, mas sempre ela esteve presente, com calma e seriedade demonstrando o seu lado profissional e um belíssimo lado humano. A Rê é

uma pessoa sábia, honesta, direta e, sobretudo, tem uma paz interior que passa aos seus orientandos , meu muito obrigado Re.

Aqui ficam os meus sinceros agradecimentos!

Lista de abreviações

CESP Companhia Energética de São Paulo

CONAMA Conselho Nacional de Meio Ambiente

COX cicloxigenases

CL_{50} Concentração Letal

CAF Cafeína

CTL Controle

DCF Diclofenaco

ECs *Emerging Compounds*

EDCs *Endocrine disrupting chemicals*

EEA *European Environmental Agency*

US EPA *Environmental Protection Agency*

E_2 17β - Estradiol

FSH Hormônio Folículo Estimulante

RFT *Range Finding Test*

LC – MS/MS *Liquid Chromatography coupled to tandem mass spectometry*

HHG Eixo Hipotálamo - Hipófise - gonadal

HPG *Hypotalamus – Pituitary - Gonad axis*

IBGE Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística

IGS Indice gonadossomático

IUPAC *International Union of Pure and Applied Chemistry*

HIS Indice hepatossomatico

IVS Indice viscerossomático

LH hormônio lutenizante

vtgA Vitelogenina A

T Testosterona

11-KT 11-cetotestosterona

PPCP Produtos farmacêuticos e de cuidado pessoal (pharmaceuticals and personal care products)

Lista de Figuras

Figura 1. Gráfico de barras da razão entre número de idosos com mais de 65 anos para cada 100 jovens com menos de 14 anos. Fonte IBGE (2008).

Figura 2. Esquema ilustrativo do funcionamento do eixo Hipotálamo - hipófise – gônadas (HHG) em teleósteos machos. Adaptado de (MYLONAS *et al.*, 2010; ZOHAR *et al.,* 2010).

Figura 3. Estrutura bidimensional do diclofenaco sódico (D6899_SIGMA) aplicado nos experimentos. Fonte: PubChem.

Figura 4. Estrutura bidimensional da cafeína (C0750_SIGMA) aplicada nos experimentos. Fonte: PubChem.

Figura 5. Estação de Hidrobiologia e Aquicultura de Paraibuna – CESP.

Figura 6. Aquários utilizados nos experimentos, mantidos no Biotério de Ectotérmicos do IB/USP.

Figura 7. Teste de decaimento dos grupos diclofenaco (DCF), cafeína (CAF) e mistura (DCF+CAF).

Figura 8. Delineamento experimental do *Range Finding Test* (RFT) do diclofenaco. As letras A, B e C correspondem às concentrações 200 mg L^{-1}, 100 mg L^{-1} e 50 mg L^{-1}, respectivamente.

Figura 9. Delineamento experimental do *Range Finding Test* (RFT) da cafeína. As letras A, B e C correspondem às concentrações 500 mg L^{-1}, 100 mg L^{-1} e 50 mg L^{-1}, respectivamente.

Figura 10. Delineamento experimental do teste de concentração letal (CL_{50}) do diclofenaco (DCF).

Figura 11. Delineamento experimental do teste de concentração letal (CL_{50}) da cafeína (CAF).

Figura 12. Delineamento experimental do teste de toxicidade aguda de 96h. Os grupos do experimento são nomeadamente o controle (CTL), diclofenaco (DCF), Cafeína (CAF) e diclofenaco e cafeína (CAF+DCF).

Figura 13. Coleta de sangue através da vasculatura caudal em *A. altiparanae*. Foto do autor .

Figura 14. Câmera de Neubauer. Foto do autor.

Figura 15. Gráficos do teste de decaimento em 24h. **A**. Diclofenaco sem peixes (DCF); Diclofenaco com peixes (DCF P); Diclofenaco e cafeína sem peixes (DCF+CAF); Diclofenaco e cafeína com peixes (DCF+CAF P). **B**. Cafeína sem peixes (CAF); Cafeína com peixes (CAF P); Diclofenaco e cafeína sem peixes (DCF+CAF); Diclofenaco e cafeína com peixes (DCF+CAF P).

Figura 16. Curva de mortalidade do teste de concentração letal (CL_{50}) do diclofenaco (DCF).

Figura 17. Curva de mortalidade do teste de concentração letal (CL_{50}) da cafeína (CAF).

Figura 18. A. Índice Gonadossomático (IGS) (n=10); **B.** Índice hepatossomático (IHS) (n=20); **C**. Índice viscerossomático (IVS) (n=20) dos animais dos grupos experimentais DCF, CAF e DCF+CAF. Letras minúsculas (a, b) correspondem às diferenças significativas entre os grupos ($p<0.05$). Letras minúsculas iguais (a) correspondem à ausência de diferenças significativas entre os grupos experimentais ($p>0.05$).

Figura 19. Concentração plasmática (pg mL^{-1}) do estradiol (E_2). No gráfico estão representados os grupos experimentais: controle (CTL) diclofenaco (DCF), cafeína (CAF) e diclofenaco e cafeína (DCF+CAF) (n=10). As letras minúsculas (a, b) diferentes correspondem à presença de diferenças significativas entre os grupos experimentais ($p<0.05$).

Figura 20. Concentração plasmática (pg mL^{-1}) de 11-cetotestosterona (11-KT). No gráfico estão representados os grupos experimentais: controle (CTL) diclofenaco (DCF), cafeína (CAF) e diclofenaco e cafeína (DCF+CAF) (n=15). Letras minúsculas iguais (a) correspondem à ausência de diferenças significativas entre os grupos experimentais ($p>0,05$).

Figura 21. Concentração plasmática (pg mL^{-1}) de testosterona (T). No gráfico estão representados os grupos experimentais: controle (CTL), diclofenaco (DCF), cafeína (CAF)

e diclofenaco e cafeína (DCF+CAF) (n=10). As letras minúsculas (a, b) correspondem à presença de diferenças significativas entre os grupos experimentais ($p<0,05$).

Figura 22. Expressão relativa do gene vitelogenina (vtg). No gráfico estão representados os grupos experimentais: controle (CTL), diclofenaco (DCF), cafeína (CAF) e diclofenaco e cafeína (DCF+CAF) (n=6). Letras minúscula iguais (a) correspondem à ausência diferenças significativas entre os grupos experimentais ($p>0,05$).

Figura 23. Concentração espermática. No gráfico estão representados os grupos experimentais : controle (CTL), diclofenaco (DCF), cafeína (CAF) e diclofenaco e cafeína (DCF+CAF) (n=8). Letras minúsculas iguais (a) correspondem à ausência de diferenças significativas entre os grupos experimentais ($p>0.05$).

Figura 24. Seções histológicas dos testículos de *Astyanax altiparanae* coradas por H-E (Hematoxilina-Eosina). Grupo controle (A), diclofenaco (B), cafeína (C) e diclofenaco e cafeína (D). Nomenclaturas das células germinativas: espermatogônia (SG), espermatócito (SC), espermátide (ST) e espermatozoide (SZ). Barra 25 µm.

Figura 25. Seções histológicas do fígado de *Astyanax altiparanae* coradas por H-E . Grupo controle (A), diclofenaco (B), cafeína (C) e diclofenaco e cafeína (D). Nomenclaturas das células e estruturas: hepatócito (h), eritrócito (e) e vasos sanguíneos (v). Barra 25 µm.

Lista de Tabelas

Tabela 1. Parâmetros físico-químicos da água utilizada no experimento de toxicidade aguda por 96 horas. LQ = Limite de detecção.

Tabela 2. Concentrações de DCF e CAF na água dos grupos experimentais. A concentração real A corresponde ao tempo inicial experimental de 0 horas e a concentração B corresponde a reposição do meio em 48 horas de experimento.

ÍNDICE

Resumo **18**

Abstract **19**

1.Introdução **20**

1.1 Considerações sobre os estudos na problemática da poluição ambiental 20

1.2 O cenário atual dos contaminantes de preocupação emergente 22

1.3. Os efeitos das substâncias farmacêuticas na biota aquática 25

1.4.Aspectos gerais da fisiologia reprodutiva de teleósteos 27

1.5.*Astyanax altiparanae* 30

2. Objetivos **31**

2.1 Objetivo geral 31

2.2 Objetivos específicos 31

3. Materiais e métodos 32

3.1 Substâncias químicas 32

3.1.1 Diclofenaco (DCF) 32

3.1.2 Cafeína (CAF) 32

3.1.3 Soluções experimentais 33

3.1.4 Descarte de fármacos 33

3.2. Animais 34

3.2.1 Local de obtenção 34

3.2.2 Manutenção dos indivíduos 34

3.3. Delineamento experimental 35

3.3.1 Decaimento dos compostos diclofenaco (DCF) e cafeína (CAF) 36

3.3.2 *Range Finding Test* (RFT) 36

3.3.3 Teste de concentração média letal (CL_{50}) 37

3.3.4 Bioensaio de exposição aguda 38

3.4. Análise química dos fármacos na água 39

3.5. Análises biológicas 39

3.5.1 Indices gonadossomático (IGS), hepatossomático (IHS) e viscerossomático (IVS) 40

3.5.2 Análises histológicas 41

3.5.3 Concentração espermática 41

3.5.4 Concentração plasmática dos hormônios esteroides 42

3.5.5 Análises moleculares 42

3.5.6 Análises estatísticas 43

4. Resultados 44

4.1 Parâmetros físico-químicos da água 44

4.2 Decaimento dos compostos diclofenaco (DCF) e cafeína (CAF) 44

4.3 Teste de concentração média letal (CL50) 45

4.4 Ensaio de exposição aguda 48

4.5 Análises biométricas 48

4.5.1 Indices gonadossomático (IGS), hepatossomático (IHS) e viscerossomático (IVS) 48

4.6 Concentração plasmática dos hormônios esteroides 49

4.7 Expressão gênica da vitelogenina (*vtgA*) 48

4.8 Concentração espermática 49

4.9 Histologia de fígado e testículo 50

5. Discussão **52**

5.1 *Astyanax altiparanae* 52

5.2 Físico-química da água e dos fármacos 54

5.3 Mortalidade de *Astyanax altiparanae* expostos ao diclofenaco e à cafeína 56

5.4 Efeitos dos fármacos no perfil hormonal de machos *Astyanax altiparane* 56

5.5 Expressão da vitelogenina (*vtgA*) em machos de *Astyanax altiparanae* 59

5.6 Histologia dos testículos e fígado e índices somáticos 60

5.7 Concentração espermática 62

5.8 Misturas dos fármacos diclofenaco e cafeína 62

6. Conclusões.....65

7. Referências bibliográficas 69

RESUMO

A contaminação ambiental por misturas de poluentes sintéticos produzidos pelas atividades humanas têm alterado o equilíbrio dos ecossistemas aquáticos. Os fármacos, como diclofenaco (DCF) e cafeína (CAF), hegemonicamente presentes e persistentes nos ambientes aquáticos impactam a reprodução de organismos não alvo. O presente estudo teve por objetivo avaliar os ajustes da fisiologia reprodutiva de machos de *Astyanax altiparanae* (Teleostei: Characidae) expostos ao DCF e a CAF bem como o potencial sinérgico de DCF+CAF nas respostas fisiológicas dos animais. *A. altiparanae* é uma importante espécie no contexto ecológico e desenvolvimento econômico, sendo aplicada em estudos ecotoxicológicos. Inicialmente foi analisado o decaimento (concentração real) de DCF e CAF, sendo este de 5% do valor inicial no período de 24 horas e em seguida foi realizado o teste de detecção de alcance, do inglês *Range Finding Test* (RFT). A concentração média letal (CL_{50}) do DCF e CAF encontrada para *A. altiparanae* foi de e 30,8 mg L^{-1} e 95,9 mg L^{-1}, respectivamente. No ensaio de exposição aguda (96h, utilizando 10% da CL_{50}), os animais expostos ao DCF (3,1 mg L^{-1}) e CAF (9,5 mg L^{-1}) isoladamente, apresentaram uma redução da concentração plasmática de 17β estradiol (E_2). Em relação aos andrógenos, os animais apresentaram uma redução da concentração de testoterona (T) quando expostos ao DCF e não foram observadas diferenças na concentração plasmática de 11-cetotestosterna (11-KT). No tratamento DCF+CAF não foram observadas diferenças significativas na concentração hormonal de T, E_2 e 11-KT. Os fármacos não alteraram a expressão gênica da vitelogenina A (*vtgA*) e a concentração espermática nos machos. O fígado e os testículos dos animais não apresentaram alterações teciduais após a exposição aguda. O presente estudo demonstrou que DCF e CAF são desreguladores endócrinos, quando isolados afetaram o perfil dos esteroides gonadais dos machos, mas não quando expostos em conjunto. DCF e CAF isolados e combinados em uma exposição aguda não apresentaram atividade estrogênica, bem como não causaram histopatologias. Considerando a presença de diversos compostos no ambiente e a importância da reprodução na conservação das espécies, faz-se necessário avaliar os impactos das misturas de fármacos tanto exposições agudas quanto crônicas, visto que, os efeitos tóxicos destas substâncias na fisiologia reprodutiva de peixes podem ser ocultos por combinações de fármacos.

Abstract

The environment contamination by synthetic pollutants mixtures has altered the biological balanced of aquatic environments. Pharmaceuticals compounds, like diclofenac (DCF) and caffeine (CAF) are characterized by the ubiquitous presence and persistence in the aquatic environments causing effects the reproductive physiology of no target aquatic organisms. The aim of the present study was to evaluate the physiological reproductive adjustments of *Astyanax altiparanae* (Teleostei: Characidae) males exposed to DCF and CAF, as well as, the potential synergism of these pharmaceuticals in the physiological responses of the animals. *A. altiparanae* is considered an important species in the ecological and social development context, also this species is currently used as biological model in ecotoxicological studies. The DCF and CAF decay were 5% of the total initial value (1 mg L^{-1}) in 24 h, then the *Range Finding Test* (RFT) was carried out. The lethal concentration 50 (LC_{50}) of the DCF and CAF for the species were 95,9 mg L^{-1} e 30,8 mg L^{-1}, respectively. In the acute exposure (96h, using 10% of LC_{50}), males exhibited a reduction of 17β Estradiol (E_2) plasma concentration when exposed to DCF (3,1 mg L^{-1}) and CAF (9,5 mg L^{-1}). Similarly, the concentration of testosterone (T) was also reduced under DCF exposure, but this response was not observed in plasma 11 ketotestosterone (11-KT) concentration. Animals exposed to DCF+CAF did not show any difference in T, E_2 e 11-KT plasma concentrations. The vitellogenin (*vtg*) gene expression was also measured but none of the treatments altered significantly the expression, as well as the spermatic concentration. Moreover, the acute exposure did not reveal any morphological alteration in liver and testes. The present study elucidated the effects of single pharmaceuticals in the male steroid profile of *A. altiparane* and the annul response caused by the mixture. Despite of the absence of interference in the *vtg* expression, as well as lack of damage within testes and liver, this study showed that pharmaceuticals can cause a disruptive activity in the exposed males. Considering the presence of mixtures in the environment and the importance of reproduction in species conservation, it is necessary to evaluate the impacts of drug mixtures on both acute and chronic exposures, as the toxic effects of drugs on the reproductive physiology of fish can be hidden by the mixtures.

Introdução

1.1 Considerações sobre a problemática da poluição ambiental

No final do século XIX, a revolução industrial permitiu o aumento na produção de bens de consumo industriais e domésticos possibilitando o desenvolvimento econômico e o crescimento exponencial da população humana em uma escala mundial (COHEN, 1995). Todavia, o acentuado crescimento populacional implicou no aumento de processos extrativistas de matéria primas e o descarte inadequado de resíduos tóxicos nocivos ao meio ambiente levando a um processo de poluição do solo, da água e do ar (ISLAM; TANAKA, 2004).

Desde a revolução industrial, pesquisas e levantamentos de dados baseados em estudos demográficos e projeções estatísticas sobre dinâmica populacional demonstram que até o final do século XXI a população humana será de aproximadamente 9 bilhões à 12 bilhões de indivíduos (GERLAND *et al*., 2014). Neste contexto, estudos científicos salientam que o crescimento populacional acoplado ao consumo de recursos naturais poderá agravar os danos ambientais, haja vista que, por exemplo, um terço da água doce de todo o mundo já é utilizada na agricultura, indústria e atividades domésticas (SCHWARZENBACH *et al*., 2006).

Em sua grande maioria os contaminates encontrados no meio ambiente alteram o equilíbrio dinâmico das populações naturais, tais substâncias estão envolvidas em processos de bioacumulação e biomagnificação na cadeia trófica que, ao longo prazo, ampliam os seus efeitos deletérios em diversos níveis biológicos e, consequentemente, impactam os ecossistemas e as relações ecológicas entre as espécies (VAN DER OOST *et al.,* 2003). Com os efeitos adversos de diferentes xenobióticos de origem antropogênica, fez-se necessário a criação de agências regulatórias em todo mundo a fim de mitigar, estimular e analisar concentrações de diferentes compostos que possam induzir efeitos nocivos sobre a biota não alvo nos diferentes ambientes. As diretrizes regulatórias nas áreas ecotoxicologia e toxicologia ambiental pelas agências como a *Europe Environment Agency (EEA)* na União Europeia, *US Enviromental Protection Agency* (EPA) nos Estados Unidos da América e, no caso do Brasil, Conselho Nacional do

Meio Ambiente (CONAMA) e a Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental do Estado de São Paulo (CETESB) têm sido essenciais no marco regulatório para auxiliar nas avaliações de risco dos diversos xenobióticos encontrados nos ambientes.

A ecotoxicologia como ciência integradora que estuda os efeitos toxicológicos de compostos sintéticos ou naturais no equilíbrio ecológico dos ambientes naturais tem como base a utilização de biomarcadores que englobam os níveis molecular, bioquímico, histológico, sistêmico e populacional que, por sua vez, auxiliam na compreensão dos impactos adversos de tais substâncias nos diferentes níveis de organização biológica (ZAGATTO; BERTOLETTI, 2008). Assim sendo, a ecotoxicologia oferece algumas das ferramentas necessárias para avaliar os impactos da poluição na biota que podem ser úteis no desenvolvimento de estudos toxicológicos que demonstrem os potenciais danos de xenobióticos no equilíbrio ambiental (CHAPMAN, 2002).

No contexto dos estudos toxicológicos, os biomarcadores empregados podem ser classificados em dois grupos: os de exposição e os de efeito. No caso dos biomarcadores de exposição contemplam a utilização de moléculas que respondem especificamente a um estressor com um modo de ação conhecido, por exemplo, a análise da concentração plasmática e/ou expressão gênica da vitelogenina (vtg) em machos, que pode estar aumentada devido à ação de desreguladores endócrinos (EDCs) com efeito estrogênico. Os biomarcadores de efeito são indicadores que sinalizam mudanças na fisiologia e bioquímica do organismo pela exposição aos xenobioticos, como por exemplo, alterações no perfil dos hormônios circulantes, atividades de enzimas detoxificantes e índices biométricos, mas que não permitem identificar ações específicas dos EDCs (HOOK; GALLAGHER; BATLEY, 2014).

1.2. O cenário atual dos contaminantes de preocupação emergente

Na literatura, os dados resultantes das pesquisas sobre a temática da contaminação ambiental em diferentes matrizes demonstram que grande parte dos resíduos que chegam às estações de tratamento de resíduos não são removidos de maneira eficaz e, deste modo, os impactos sobre a saúde humana e ambiental necessitam de constante avaliação através de estudos ecotoxicológicos (HEBERER, 2002). Dos impactos globais e regionais observados sobre a biodiversidade, destacam-se os efeitos dos poluentes nos ambientes aquáticos já que, em uma escala global, 65% de todos os resíduos são descartados nestes locais, sendo uma ameaça à biodiversidade aquática (VÖRÖSMARTY *et al*., 2010).

Ao longo dos anos diversos estudos tem reportado a ocorrência de diferentes substâncias nos ambientes aquáticos e seus efeitos tóxicos em diversas espécies, em diferentes níveis de organização trófica. Em diversas investigações e revisões tem sido elucidado a presença de metais (FLOREA; BÜSSELBERG, 2006), hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (PAHs) (JOHNSON-RESTREPO *et al.,* 2008; LIANG *et al.*, 2007), pesticidas (FLEEGER; CARMAN; NISBET, 2003; PEREIRA *et al.,* 2015), microplásticos (COLE *et al.,* 2011; WAGNER *et al.,* 2014) e compostos farmacêuticos (AUS DER BEEK et *al.,* 2016; MONTAGNER et al., 2018). Dentre as alterações biológicas observadas, são compreendidos e descritos efeitos no comportamento de forrageio que modificam os padrões naturais de predação dos indivíduos e também no comportamento reprodutivo. Além disso, sistemas fisiológicos como neural, sensorial, endócrino são impactados, bem como o metabolismo de proteínas, lipídios e carboidratos, causando alterações no funcionamento dos animais (SCOTT; SLOMAN, 2004).

As diferentes substâncias encontradas no ambiente e descritas em periódicos científicos levou a origem do termo contaminantes emergentes do inglês *Emerging contaminants* (ECs) que são compostos tóxicos presentes no ambiente que não são comumente monitorados, mas podem apresentar efeitos tóxicos adversos sobre a saúde humana e a vida selvagem (MURRAY; THOMAS; BODOUR, 2010). As avaliações toxicológicas dos compostos de preocupação emergente se fazem necessárias, visto que, muitos dos efeitos ecotoxicológicos de diferentes substâncias sobre a biosfera ainda são parcialmente elucidados (PEREIRA *et al*., 2015). Os contaminantes emergentes

em sua grande maioria são grupos de substâncias que incluem pesticidas aplicados na agricultura, ftalatos utilizados em produtos plásticos e compostos farmacêuticos aplicados nos tratamentos de doenças humanas e de animais domésticos e selvagens (LUO *et al.*, 2014). Os efluentes que contém tais compostos são transportados para as estações de tratamento de resíduos para a remoção destas substâncias, no entanto, alguns compostos, como os fármacos, são persistentes sendo encontradas diversas moléculas desta classe, com baixa porcentagem de remoção (cerca de 40%) (DEBLONDE; COSSU-LEGUILLE, 2011).

A presença de compostos farmacêuticos no ambiente tem sido relatada desde o final do século XX com estudos de diferentes substâncias como antibióticos, analgésicos e estimulantes provenientes de aplicações na medicina humana e veterinária, sendo que muitos dos efeitos tóxicos destes compostos sobre a biota aquática eram até então pouco conhecidos (HALLING-SORENSEN *et al*., 1998). Todavia, com o desenvolvimento tecnológico das técnicas analíticas para quantificar os compostos encontrados ambientalmente e os sucessivos estudos sobre os efeitos toxicológicos de tais substâncias, o conhecimento sobre os efeitos dos compostos farmacêuticos e demais contaminates no ambiente tem sido aprofundado (PAL *et al.*, 2010).

No Brasil, recentes levamentos do atual panorama dos fármacos no ambiente aquático tem demonstrado que grande parte destes compostos encontrados em rios e reservatórios pertence à classe dos analgésicos, anti-inflamatórios e hormônios de uso humano e veterinário (QUADRA *et al*., 2017). Segundo Montagner e colaboradores (2018) muitos destes compostos como pesticidas, fármacos e hormônios sintéticos são encontrados em águas superficiais, águas subterrâneas e inclusive em água potável para consumo, reforçando a importância de se avaliar o impacto de tais substâncias sobre a saúde humana e biota aquática em geral. Na legislação brasileira, o descarte de resíduos sólidos hospitalares que contenham medicamentos são apenas contemplados pela resolução CONAMA 358/2005, portanto, não há uma legislação específica do descarte de efluentes farmacêuticos no ambiente aquático. A resolução CONAMA 357/2005 que estabelece as condições e padrões de lançamento de efluentes não descreve as diretrizes ambientais para a presença e controle de tais substâncias em águas. Assim, a presença de tais substâncias é um fator preocupante tendo em vista seus efeitos tóxicos

sobre a biota aquática e, adicionalmente, a ausência de limites de concentrações que ainda não foram estabelecidas para estes compostos nos ambientes aquáticos (QUADRA et al., 2017).

Além do crescimento populacional, o envelhecimento da população mundial é um dos catalisadores no aumento do consumo de produtos farmacêuticos, já que grande parte deste público necessita destas substâncias para o tratamento de doenças e manutenção da qualidade de vida (ARNOLD *et al.*, 2014). No caso do Brasil, este cenário pode ser agravado, visto que, segundo as projeções do Instituto Brasileiro de Geografia e estatística (IBGE), a população brasileira apresenta uma tendência ao envelhecimento populacional, fato que já é observado atualmente. Com base nesses dados, em 1980 havia 10,5 idosos de 65 ou mais de idade para cada 100 crianças entre 0-14 anos de idade, nas projeções feitas para o ano de 2050, neste processo de envelhecimento a relação seria de 172,7 idosos para cada 100 crianças (Figura 1).

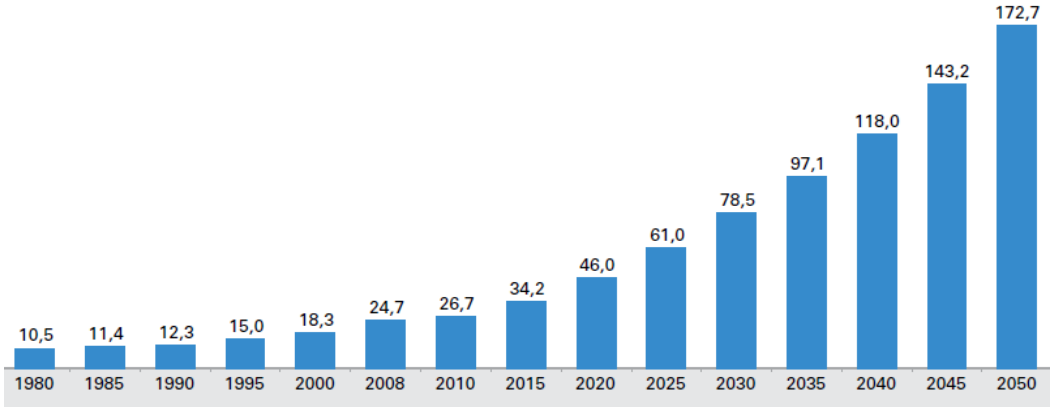

Figura 1. Razão entre o número de idosos com mais de 65 anos para cada 100 jovens com menos de 14 anos. Fonte IBGE (2008).

A presença de fármacos nas águas superficiais e em águas litorâneas, assim como o aumento do consumo de medicamentos e substâncias psicoativas é uma realidade já observada no Brasil (PEREIRA *et al.*, 2016). Estudos de Quadra e colaboradores (2019) sobre o consumo e descartes de substâncias farmacêuticas mostra que cerca de 66% dos entrevistados descartam os compostos de maneira inadequada sendo que 71% desconhece locais adequados para receber medicamentos vencidos ou sem uso definido. Com base nas informações que estão sendo descritas na literatura é de suma importância avaliar tais compostos farmacêuticos que por ter modos de ação específicos na fisiologia animal, podem afetar organismos não alvos como a biota aquática e, nestas circunstâncias, impactar o equilíbrio ecológico (FENT; WESTON; CAMINADA, 2006).

1.3. Os efeitos das substâncias farmacêuticas na biota aquática

Atualmente, o termo mais utilizado na literatura para medicamentos de uso humano e veterinário são produtos farmacêuticos e de cuidado pessoal (PPCP) da sigla em inglês *pharmaceuticals and personal care products* (OVERTURF *et al.*, 2015). Os PPCPs estão presentes nos recursos hídricos de todo o mundo (AUS DER BEEK *et al.,* 2016) e estudos têm sido feitos em diferentes países a fim de investigar os efeitos destes compostos, em países desenvolvidos (FENT *et al.*, 2006) e mais recentemente em países em desenvolvimento como o Brasil (GUILOSKI *et al.*, 2015; MONTAGNER *et al*., 2018; QUADRA *et al*., 2017).

Os fármacos, em sua grande maioria, são substâncias produzidas com um modo de ação específico para as atividades fisiológicas, mas têm a similar capacidade de induzir alterações em organismos não alvo (VASQUEZ *et al.*, 2014). Dentre os compostos farmacêuticos avaliados, os anti-inflamatórios não esteroides, dado a sua importância na saúde, utilização e eficácia, correspondem à uma classe de fármacos mais frequentemente detectadas nos ambientes aquáticos de todo o mundo correspondendo cerca de 31% dos registros na literatura (HUGHES *et al.*, 2013). No caso dos compostos anti-inflamatórios não esteroidais do inglês *non-steroidal anti-inflammatories drugs* (NSAIDs), o diclofenaco tem sido uma das principais substâncias farmacêuticas encontradas no ambiente aquático (AUS DER BEEK *et al.*, 2016).

As pesquisas toxicológicas apontam que organismos aquáticos quando expostos a diferentes concentrações e períodos de exposição ao DCF apresentam alterações nos parâmetros reprodutivos, no metabolismo energético, assim como alterações no comportamento (BONNEFILLE *et al.*, 2018). A exposição de tilápias ao DCF nas concentrações de 0,17 mg L^{-1} a 0,68 mg L^{-1} por 60 dias causou danos no DNA e estresse oxidativo no fígado, além de alterações nos parâmetros hematológicos (PANDEY *et al.*, 2017). Outras alterações foram observadas em parâmetros imunológicos e histológicos de trutas marrons expostas a 0,05 mg L^{-1} (HOEGER *et al.*, 2005) e histopatologias no rim de peixes (NÄSLUND *et al.*, 2017). Em estudos com machos *Oreochromis niloticus* expostos ao DCF nas concentrações de 1 µg L^{-1} observou-se um aumento da expressão da *vtg*, os resultados sugeriram a atividade estrogênica do DCF (GRÖNER *et al.,* 2017), similarmente a atividade estrogênica do DCF fora observada em investigações com

machos *Xenopus laevis* (EFOSA *et al.*, 2017). Além do DCF, outros antiinflamatórios não esteroidais, como o ibuprofeno, alteraram o tempo de reprodução de peixes reduzindo o número de eventos de desova, quando expostos às concentrações 0,1 mg L^{-1} por 6 semanas (FLIPPIN *et al.,* 2007).

Além do diclofenaco, a cafeína (CAF), um estimulante do sistema nervoso central, é também encontrada em águas superficiais (MONTAGNER *et al.,* 2018; QUADRA *et al.*, 2017). Este composto é comumente utilizado como um indicador de ocupação humana (BUERGE *et al.*, 2003). Apesar de alguns estudos destacarem a cafeína como um composto que não apresenta ameaça aos organismos aquáticos (MOORE *et al.*, 2008), pesquisas recentes demonstram que a CAF altera o balanço oxidativo em peixes (AGUIRRE-MARTÍNEZ; DELVALLS; LAURA MARTÍN-DÍAZ, 2015; SANTOS-SILVA; MONTAGNER; MARTINEZ, 2018) e, pode induzir o aumento de vtg plasmática em machos da espécie *Carassius auratus* quando expostos por 7 dias na concentração de 2mg L^{-1} (LI *et al.*, 2012).

Na maioria dos estudos toxicológicos, as exposições e avaliações dos efeitos dos compostos farmacêuticos são realizados com uma única substância. No entanto, os PPCPs são encontrados no ambiente na forma de misturas, sendo relevantes e necessários estudos com tais combinações de compostos (CLEUVERS, 2003; VASQUEZ *et al.*, 2014). Os efeitos das misturas de substâncias podem ser distintos quando comparado com exposições únicas, e as interações com a fisiologia dos organismos podem reduzir, potencializar, ou até mesmo bloquear os efeitos de certas combinações de substâncias (ZAGATTO; BERTOLETTI, 2008). A revisão de Overtuf e colaboradores (OVERTURF *et al.,* 2015) destaca que compostos farmacêuticos podem afetar o eixo neuroendócrino que controla a reprodução de organismos aquáticos e também salienta a relevância de estudos toxicológicos com misturas dos PPCPs de modo a analisar os possíveis efeitos sinérgicos das diferentes substâncias. Em um recente estudo com o lambari, *Astyanax rivularis*, expostos ambientalmente às misturas de resíduos Bisphenol A (BPA), Oestradiol (E2), Nonylphenol (NP) nas concentrações de 230.6 ± 175.9 ng L^{-1} , 260.0 ± 196.9 ng L^{-1}, 926.8 ± 592.1 ng L^{-1} , respectivamente com potencial estrogênico demonstraram um aumento na concentração de estradiol (E_2) e redução na concentração de andrógenos em machos desta espécie (WEBER *et al.*, 2019).

1.4.Aspectos gerais da fisiologia reprodutiva de teleósteos

Os vertebrados de formal geral apresentam similarmente um controle fisiológico da reprodução estruturalmente organizado por um eixo neuroendócrino, comumente conhecido como eixo hipotálamo-hipófise-gônadas (do inglês hy*pothalamus-pituitary-gonadal axis; HPG:HHG*), que integra a neurobiologia e a endocrinologia do organismo regulando as funções e respostas reprodutivas às mudanças ambientais e internas do indivíduo (LEVAVI-SIVAN *et al.*, 2010). Todavia, contrariamente aos demais vertebrados que possuem um sistema porta conectando o hipotálamo a hipófise, os teleósteos apresentam uma inervação direta de fibras neurosecretoras que se originam no hipotálamo e se ramificam até as células alvo receptora dos neurohormônios, tal modificação anatômica não intefere no funcionamento do eixo HHG sendo fisiologicamente similar aos demais vertebrados (ZOHAR *et al.,* 2010).

Nos animais vertebrados, o eixo HHG é modulado por fatores externos respondendo a estímulos ambientais como temperatura, pH, fotoperíodo, condutividade e sazonalidade (MYLONAS; FOSTIER; ZANUY, 2010). As variações ambientais externas e as respostas fisiológicas internas do organismo estimulam o hipotálamo, onde em um grupo específico de células neurosecretoras é sintetizado o hormônio liberador de gonadotropinas (GnRH), o mesmo estimula a hipófise a sintetizar e liberar as gonadotropinas hipofisárias, hormônio folículo estimulante (FSH) e hormônio lutenizante (LH). Estes hormônios hipofisários são responsáveis pelo crescimento e maturação dos tecidos reprodutivos e células germinativas por meio da síntese e liberação gonadal de hormônios esteroides como a testosterona (T), 11-cetotestosterona (11-KT) e 17β estradiol (E_2) (LUBZENS *et al.*, 2010; SCHULZ *et al.*, 2010) (Figura 2).

Os hormônios esteroides desempenham um papel fundamental no desenvolvimento e maturação das gônadas e células germinativas de machos e fêmeas, no caso de machos os andrógenos T e 11-KT regulam a proliferação e diferenciação espermatogonial (SCHULZ; MIURA, 2002) e em fêmeas tem sido observado efeitos estimulatórios no crescimento de óocitos (LUBZENS et al., 2010). No caso dos estrógenos como o E_2 , em machos, o E_2 tem como atividade fisiológica arenovação das células germinativas (SCHULZ; MIURA, 2002) e em fêmeas o E_2 interage com os

receptores de estradiol (ER) do fígado induzindo a expressão do gene *vtg* e, posteriormente, a síntese de Vtg para ser incorporada pelos oócito das fêmeas (LUBZENS *et al.*, 2010).

O eixo HHG apresenta mecanismos de controle internos como a modulação inibitória do GnRH pela dopamina e hormônio inibidor de gonadotropinas (GnIH) e atividades estimulatórias na secreção de hormônios hipofisários como LH e FSH através da indução do GnRH pelo GABA, um neutrotransmissor inibitório abundante no cérebro de vertebrados (ZOHAR et al., 2010). Além destes neurohormônios, novas moléculas como as *kisspeptinas* provenientes do sistema KiSS1/GPR54 aparentemente inibem as gonadotropinas, desta forma, sendo um fator adicional no controle deste eixo. A comunicação observada no eixo também apresenta um sistema de *feedback* negativo e positivo no qual os esteroides gonadais (andrógenos, estrógenos e progestágenos) modulam a ação da dopamina e GABA, inibindo-os, além de também modular o sistema de GnRH (ZOHAR et al., 2010).

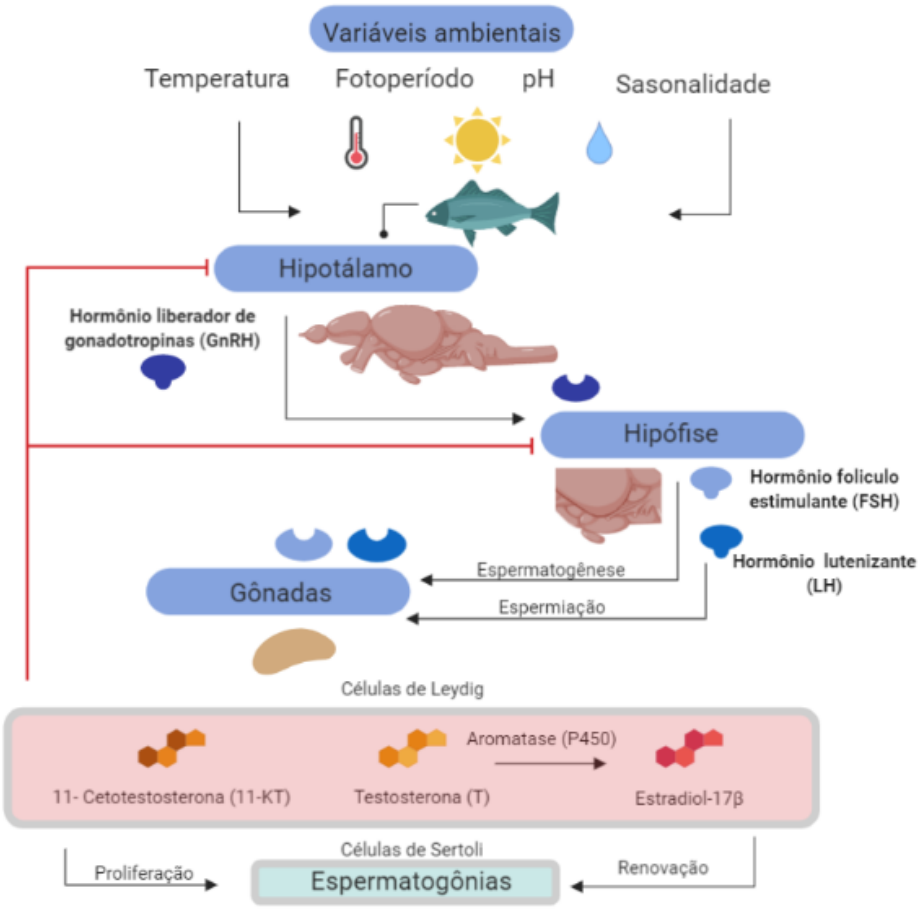

Figura 2. Esquema ilustrativo do funcionamento do eixo hipotálamo-hipófise-gônadal (HHG) em teleósteos machos. Adaptado de (MYLONAS; FOSTIER; ZANUY, 2010; ZOHAR *et al.*, 2010).

Apesar das respostas do eixo as variáveis abióticas naturais, o controle HHG pode sofrer alterações devido à fatores exógenos como a presença de xenobióticos nos ambientes naturais resultantes das atividades antropogênicas. A revisão de Kime (1995) já destacava muitos dos efeitos da poluição sobre variados parâmetros reprodutivos em peixes, sendo tais estudos enfatizados por sucessivas revisões (ANKLEY *et al.,* 2009; FORNER-PIQUER *et al.*, 2018), este feito englobam alterações no perfil hormonal dos animais, modificações estruturais nas gônadas e redução do desempenho reprodutivo dos organismos. Com os efeitos adversos de xenobióticos na reprodução cunhou - se o termo desreguladores endócrinos (DE) do inglês *endocrine disrupting chemical* (EDC) que por definição descreve o potencial de um determinado composto apresentar a habilidade de interagir com o sistema neuroendócrino causando uma alteração nas respostas fisiológicas dos animais. Os DE são substâncias capazes de afetar em diferentes níveis do eixo reprodutivo podendo interferir nos mecanismos moleculares envolvendo receptores e mensageiros, no metabolismo hormonal, na estrutura dos orgãos reprodutivos e no comportamento dos organismos que são expostos aos efeitos de tais substâncias (KAVLOCK *et al*., 1996).

No contexto ecológico, a utilização da reprodução no estudo dos impactos ambientais apresenta um papel essencial na conservação das espécies naturais sendo um dos pilares no equilíbrio dos ecossistemas (WIKELSKI; COOKE, 2006). O estudo da fisiologia reprodutiva de peixes fornece ferramentas de monitoramento ambiental para estabelecer estratégias no gerenciamento de risco de diferentes substâncias (KIME, 1999). No caso de organismos aquáticos, os DE tem apresentado efeitos na fisiologia reprodutiva de machos e fêmeas influenciando a qualidade dos gametas através das alterações nos processos de gametogênese, reduzindo assim o sucesso reprodutivo dos indivíduos (CARNEVALI *et al*., 2018). Deste modo, as variáveis reprodutivas como a presença de vtg em machos (HANSEN *et al*., 1998), análises histopatológicas com a exposição aos xenobióticos (STENTIFORD *et al*., 2003) e demais análises em variáveis do eixo HHG fornecem dados essenciais sobre a toxicidade de certas substâncias (KIME, 1999)

1.5 . *Astyanax altipanae*

O gênero *Astyanax* tem sido um dos modelos biológicos aplicados nos estudos ecotoxicológicos do Laboratório de Metabolismo e Reprodução de Organismos Aquáticos (LAMEROA) (ABDALLA et al., 2019; GOMES et al., 2016; KIDA; ABDALLA; MOREIRA, 2016; PINHEIRO et al., 2019; TOLUSSI et al., 2018). Inclusive, estudos recentes demonstraram alterações hormonais em machos e fêmeas de *A. fasciatus* amostrados no reservatório Billings (TOLUSSI *et al.*, 2018). *Astyanax altiparanae* (lambari-do-rabo-amarelo) (GARUTTI; BRITSKI, 2000) é uma espécie pertencente à família Characidae, sendo uma das mais diversificadas famílias encontradas na América do Sul (REIS; KULLANDER; FERRARIS, 2003). Recentemente, foi proposta uma alteração do nome da espécie para *Astyanax lacustris* (LUCENA; SOARES, 2016), mas esta revisão de nome da espécie está sendo valiada pela comunidade científica. Desta forma, nesse trabalho preconizou-se pela manutenção da classificação anterior até que seja estabelecida por completo a nova nomenclatura e no momento da publicação do artigo será decidido junto com pesquisadores da área de sistemática a classificação a ser mantida.

O lambari-do-rabo-amarelo, como é conhecido popularmente, apresenta um hábito alimentar onívoro, crescimento rápido chegando a uma rápida maturação sexual. Esta espécie tem sido utilizada em bioensaios em laboratório devido à sua praticidade e resposta aos estudos (KIDA; ABDALLA; MOREIRA, 2016). Este modelo biológico é amplamente distribuído pelas bacias hidrográficas brasileiras e tem sido estudado devido à sua importância ecológica nos ecossistemas neotropicais e no desenvolvimento socioeconômico (GONÇALVES *et al.*, 2014). No contexto do estudos com DE, animais machos são importantes indicadores da presença de desreguladores endócrinos em ambientes impactados, considerando-se principalmente compostos estrogênicos, devido à sua capacidade de expressar genes associados à síntese de vitelogenina (vtg) (SUMPTER; JOBLING, 1995).

Com base no exposto e considerando-se a presença de fármacos no ambiente e seus potenciais efeitos sobre a reprodução de organismos aquáticos, a hipótese deste estudo é que o diclofenaco (DCF) e a cafeína (CAF) tem ação estrogênica no eixo HHG alterando os parâmetros reprodutivos dos animais e, adicionalmente que estes efeitos podem ser potencializados pela sinergia da mistura (DCF+CAF) de ambos os fármacos.

2. Objetivos

2.1 Objetivo geral

O estudo teve por objetivo avaliar possíveis ajustes da fisiologia reprodutiva de machos de *Astyanax altiparanae* frente ao diclofenaco (DCF) e a cafeína (CAF) em uma exposição aguda, bem como o potencial sinérgico da mistura (DCF+CAF) de ambos os fármacos nas respostas fisiológicas reprodutivas dos animais.

2.2 Objetivos Específicos

a) Avaliar a toxicidade de ambos os fármacos na mortalidade da espécie *A. altiparanae.*

b) Analisar o perfil plasmático dos esteroides gonadais, testostetona (T), 11 cetotestosterona (11-KT) e17β-estradiol (E_2) nos machos expostos aos fármacos.

c) Verificar alterações morfológicas nos tecidos hepático e testicular dos machos de *A. altiparanae* expostos aos fármacos DCF e CAF.

d) Avaliar a expressão do biomarcador de exposição, vitelogenina (vtg) nos machos expostos aos fármacos.

e) Avaliar os biomarcadores fisiológicos e morfológicos mencionados acima em exposições isoladas e conjuntas de DCF e CAF.

3. Materiais e métodos

3.1 Fármacos e soluções experimentais

3.1.1 Diclofenaco (DCF)

O DCF é um anti-inflamatório não esteroidal (AINE) inibidor da atividade das enzimas ciclooxigenases 1 (COX-1) e 2 (COX-2), que são enzimas responsáveis pela conversão do ácido araquidônico em prostaglandinas (SCHOLER *et al.*, 1986). O fármaco proveniente da fabricante *Merck* foi adquirido na forma de sal a fim de facilitar a diluição do compostos em água e não utilizar uma molécula veículo para os tratamentos. O diclofenaco sódico aplicado nos experimentos apresentava pureza ≥ 98% (Sigma-Aldrich, USA), peso molecular de 318,129 $gmol^{-1}$, número CAS de 15307-79-6, nomenclatura IUPAC: sodium; 2-[2-(2,6-dichloroanilino)phenyl]acetate e solubilidade de 0,85 mg mL^{-1} em H_2O em pH neutro (LLINÀS *et al.*, 2007) a 50 $mg.mL^{-1}$ em metanol (Sigma-Aldrich, USA).

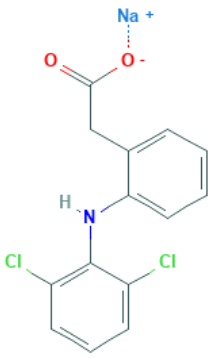

Figura 3. Estrutura bidimensional do diclofenaco sódico (D6899, SIGMA) utilizado no experimento (Fonte: PubChem)

3.1.2 Cafeína (CAF)

A cafeína é um fármaco pertencente a classe das metilxantinas, o composto é um estimulante do sistema nervoso, e descrito como um possível antagonista de receptores de adenosina (RIBEIRO; SEBASTIÃO, 2010). A cafeína utilizada nos experimentos apresenta pureza ≥98% (Sigma-Aldrich, USA), peso molecular de 194,19

g/mol, número CAS de 58-08-2, sua nomenclatura IUPAC : 1,3,7-trimethylpurine-2,6-dione e uma solubilidade de 15 mg ml^{-1} (Sigma-Aldrich, USA).

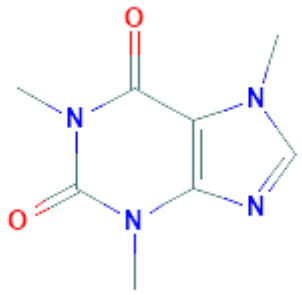

Figura 4. Estrutura bidimensional da cafeína (C0750, SIGMA) utilizado no experimento (Fonte: PubChem)

3.1.3 Soluções experimentais

A preparação das soluções experimentais foi realizada com agitador magnético e balança digital de precisão. Em um primeiro instante os fármacos DCF e CAF foram pesados usando uma balança digital de precisão (0,0001 g) e colocados em balões volumétricos de 1L. Os mesmos foram diluídos em água declorada para a preparação do meio de exposição. A pesagem dos fármacos foi calculada relativamente à concentração final das soluções nos meios de exposição, assim diferentes pesagens foram feitas a fim de contemplar a concentração final dos fármacos nos aquários. Em todas as preparações, um volume de água similar da solução mãe foi retirado dos aquários de modo a fornecer as concentrações nominais preestabelecidas para os experimentos.

3.1.4 Descarte dos fármacos

Os resíduos de fármacos resultantes dos bioensaios foram armazenados em bombonas de 200L para serem posteriormente conduzidos ao descarte apropriado de acordo com as intruções da Universidade.

3.2. Animais

3.2.1. Local de obtenção

Os animais (n=350), machos sexualmente maduros da espécie *A. altiparanae* (comprimento e massa corpórea 9,9±1,3 cm; 13,4±6,1 g) foram cedidos pela Estação de Hidrobiologia e Aquicultura de Paraibuna (Figura 5), pertencente à Companhia Energética de São Paulo, CESP, no município de Paraibuna, SP (23°24'53.1"S 45°35'59.5"W). Os animais foram transportados para São Paulo em sacos plásticos devidamente lacrados e oxigenados e mantidos no Biotério de Ectotérmicos do Departamento de Fisiologia, IB/USP para os procedimentos de aclimatação e bioensaios.

Figura 5. Estação de Hidrobiologia e Aquicultura de Paraibuna - CESP

3.2.2. Manutenção dos indivíduos

No Biotério de Ectotérmicos do Departamento de Fisiologia, IB/USP, os animais foram ambientados durante 7 dias em caixas pretas de 350 L, sendo alimentados com ração extrusada (*pellet* de 4 mm com 32% de proteína bruta) uma vez ao dia. A retirada da ração não consumida era realizada diariamente a fim de manter o mínimo de matéria orgânica na água. A cada 2 dias houve renovação parcial da água (75 %) com uma bomba de sucção, evitando o estresse nos indivíduos. Considerando-se os parâmetros físico-químicos no processo de aclimatação, os animais foram mantidos nas seguintes condições: concentração de oxigênio na água - 6,3±0,2 mg L^{-1}; temperatura da água - 25,3±0,2^{0}C; pH da água - 7,6±0,1; e fotoperíodo 12:12 C:E mantido por um *timer* acoplado aos interruptores de lâmpadas, além de uma constante aeração de 24h. O monitoramento da mortalidade dos indivíduos também foi realizado a fim de acompanhar o bem estar e manter a assepsia do meio.

3.3 Delineamento experimental

O delineamento experimental seguiu quatro fases para a exposição dos organismos aos fármacos e obtenção dos dados. Em uma primeira fase foi realizado o teste de decaimento dos compostos DCF e CAF, na segunda fase o teste de detecção de alcance, do inglês *Range Finding Test* (RFT), na terceira fase o teste de concentração média letal (CL_{50}) e na quarta fase o ensaio de toxicidade aguda no tempo de 96h. Todas as fases foram conduzidas em sistema semi-estático de aquários de vidro com volume de 140 L no biotério, sendo os mesmos envolvidos por EVA castanho de forma a minimizar o estresse aos animais. O sistema é alimentado pelas caixas adjacentes que são as reservas de água para a troca do meio experimental, e o descarte da água foi realizado por bombas de pressão que conduzem a água pelos tubos inferiores acoplados aos aquários como mostra a figura 6.

Figura 6. Aquários utilizados nos experimentos, mantidos no Biotério de Ectotérmicos do IB/USP.

3.3.1 Decaimento dos compostos diclofenaco e cafeína

Para obter os dados de reposição dos fármacos foi realizado um teste de decaimento com três grupos experimentais em duplicata : DCF, CAF e DCF+CAF (Figura 7). O teste de decaimento foi realizado com aquários contendo os indivíduos (n=6) e aquários sem os animais, sendo utilizada a concentração nominal de 1 mg L^{-1} em todos os grupos. A amostragem da água foi realizada no tempo inicial 0 h, 12 horas e 24 horas. Em todos os casos, parâmetros experimentais foram monitorados de modo a manter as variáveis de temperatura, luz e fotoperíodo controladas ao longo do teste.

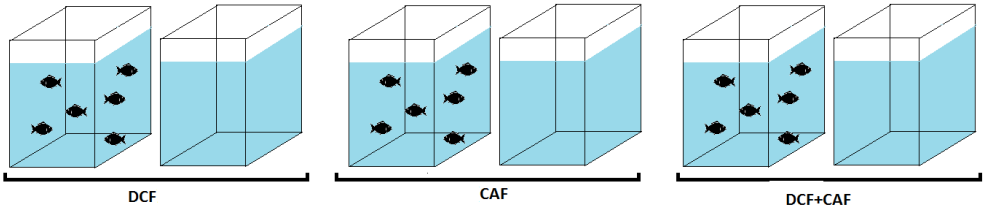

Fig. 7. Teste de decaimento dos grupos diclofenaco (DCF), cafeína (CAF) e mistura (DCF+CAF).

3.3.2 *Range Finding Test* (RFT)

Para determinar as faixas de concentrações dos fármacos para o cálculo da concentração letal e aquela a ser utilizada no experimento de exposição aguda foi realizado o RFT. No teste de RFT foram utilizadas concentrações em duplicata de 500 mg L^{-1}, 100 mg L^{-1} e 50 mg L^{-1} para CAF e 200 mg L^{-1}, 100 mg L^{-1} e 50 mg L^{-1} para DCF por 96h. Estas concentrações foram aplicada a fim de reduzir a amplitude de concentrações para os testes seguintes d emortalidade. O delineamento experimental é representado nas figuras 8 e 9.

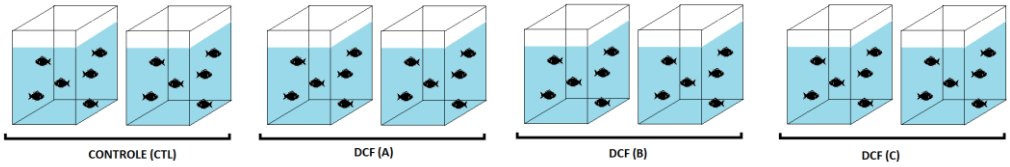

Figura 8. Delineamento experimental do *Range Finding Test* (RFT) do diclofenaco. As letras A, B e C correspondem as concentrações 200 mg L^{-1}, 100 m .L^{-1} e 50 mg L^{-1}, respectivamente.

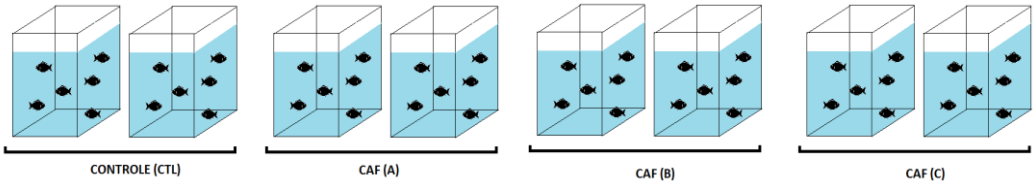

Figura 9. Delineamento experimental do *Range Finding Test* (RFT) da cafeína. As letras A,B e C correspondem as concentrações 500 mg L^{-1}, 100 mg L^{-1} e 50 mg L^{-1}, respectivamente.

3.3.3 Teste de concentração média letal (CL_{50})

Após os resultados obtidos no RFT foi realizado o teste CL_{50} no tempo de 96 h. Com base na mortalidade dos indivíduos no RFT e na escolha de concentrações mais reduzidas, a CL_{50} foi conduzida com 6 grupos experimentais em duplicata (n=6/aquário), sendo um grupo controle e cinco concentrações de ambos os fármacos, baseados nos dados encontrados na literatura e nos resultados do RFT. O teste de CL_{50} foi calculado usando o método *Probit* onde os valores foram transformados em uma curva logarítimica de dose-resposta (mortalidade) (Finney, 1971). Para o DCF as concentrações utilizadas foram 10, 20, 30, 40 e 50 $mg.L^{-1}$ e para a CAF 7,5; 12; 30; 60 e 120 $mg.L^{-1}$. Durante o teste os animais foram acompanhados, os indivíduos que vieram a óbito eram retirados com pulsar e contabilizados. O esquema do delineamento experimental é representado nas figuras 10 e 11.

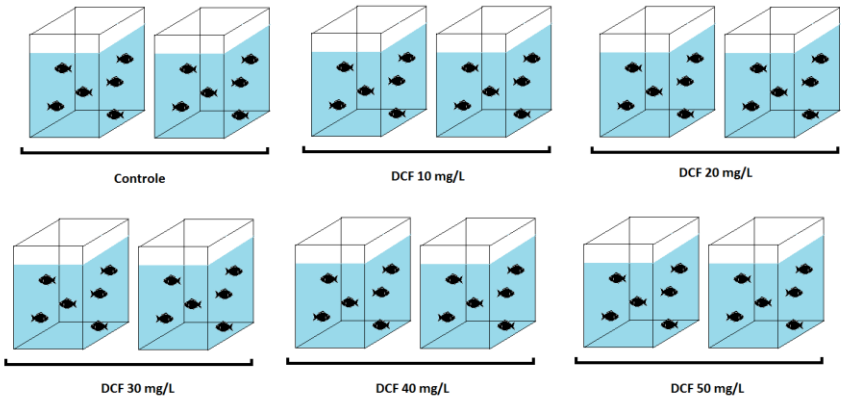

Figura 10. Delineamento experimental do teste de concentração letal (CL_{50}) do diclofenaco (DCF).

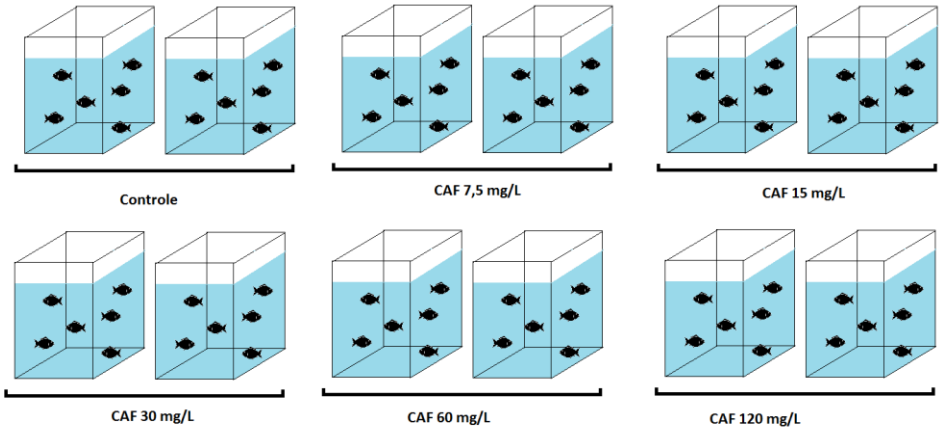

Figura 11. Delineamento experimental do teste de concentração letal (CL_{50}) da cafeína (CAF).

3.3.4 Bioensaio de exposição aguda

Com base nos resultados de RFT e CL_{50} foi escolhida uma concentração subletal de 10% do valor da CL_{50} para ambos os fármacos, DCF e CAF. Esta concentração possibilitou analisar os efeitos toxicológicos dos compostos na fisiologia dos animais em exposições agudas (BECHMANN, 1994), as mortalidades nos tratamentos do teste agudo foram calculadas em porcentagem com base no número inicial de indivíduos por tratamento. O teste de toxicidade aguda foi realizado no tempo de 96 horas com os parâmetros de temperatura, pH e oxigênio controlados em laboratório, o monitoramento destas variáveis foi realizado com uma sonda multiparâmetros (*Pro Plus, YSI*) e pHmetro (*Gehaka)*. Previamente, os peixes foram privados de alimentação de modo a evitar interferências no metabolismo dos mesmos, 24 horas antes do início dos experimentos até o término dos mesmos e todos os animais foram distribuídos aleatoriamente pelos aquários. O ensaio foi composto pelos seguintes grupos experimentais: controle (CTL), diclofenaco (DCF), cafeína (CAF) e mistura (CAF+DCF), em duplicata com um n=12 indivíduos por aquário de vidro e densidade de 2g de peixe por L (Figura 12). A reposição da água foi realizada em 48 horas desde o período inicial do experimento seguindo os resultados do decaimento. Esta reposição de 75 % do volume total foi realizada de forma a manter as concentrações constantes durante a execução do teste agudo e também a qualidade da água para os organismos expostos.

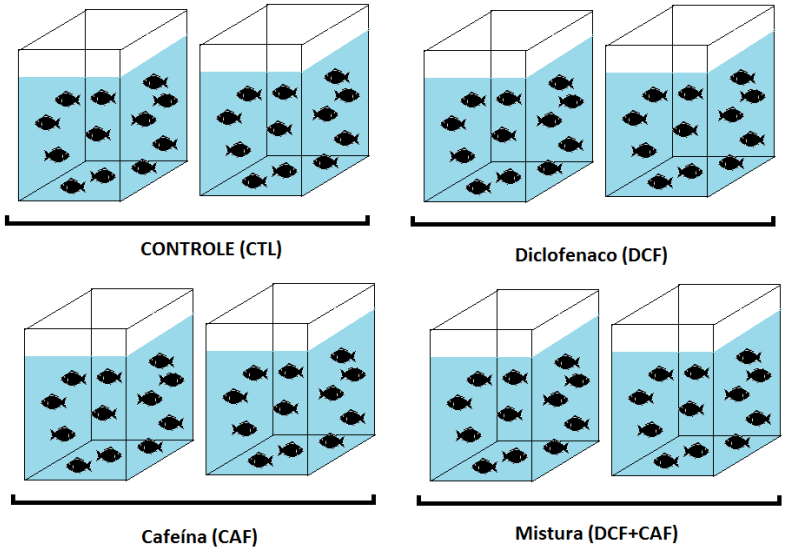

Figura 12. Delineamento experimental do teste de toxicidade aguda de 96h. Os grupos do experimento são: controle (CTL), diclofenaco (DCF), Cafeína (CAF) e mistura, diclofenaco e cafeína (CAF+DCF).

3.4 Análise química dos fármacos na água

Em um primeiro instante, as amostras de água foram coletadas nos aquários utilizando seringas de 5 ml acoplados a filtros de 45 µm (Hexis). As amostras coletadas foram armazenadas em frascos âmbar a 10ºC para posterior análises químicas. A análise de água para a quantificação dos fármacos no teste de decaimento e no teste de toxicidade aguda foram analisadas no Centro de Espectrometria de Massas Aplicada Ltda (CEMSA) utilizando o método de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) do inglês *High Performance Liquid Cromatography* (LC) acoplada a analisador de Espectrometria de Massas do tipo Triplo Quadrupolo (MS/MS). O sistema de LC- MS/MS consiste na utilização de equipamento *Agilent 1260 series (Agilent Technologies)* sendo a aquisição dos dados feita pelo programa *Analyst 1.5.2 (Sciex).*

Nas condições da CLAE-EM/EM foi utilizada uma coluna de cromatografia do tipo Luna C18 HST(2) (100 x 2 mm; 2,5 µm) (Phenomenex) na temperatura de 35 ºC. A fase móvel foi uma mistura da solução A (água ultrapura+ 0,1% ácido fórmico) e a solução B (acetonitrila + 0,1% ácido fórmico) em um volume (v/v) de 50:50 com fluxo de 220 uL min^{-1}. O volume de injeção foi de 5 µL e o tempo de corrida de 6,5 minutos. Os limites de detecção(LOD) e quantificação (LQ) do DCF foram de 0,054.µg L^{-1} e 0,18 µg.L^{-1}, respectivamente, e LD e LQ da CAF foram de 1,5±054 µg L^{-1} e 5,1±054 µg L^{-1}, respectivamente.

Os reagentes utilizados na quantificação dos fármacos foram a água ultrapura (Millipore, USA), acetronila (J.T.Baker), ácido fórmico. cafeína e diclofenaco (Sigma-Aldrich, USA) para o preparo das amostras padrões. A curva analítica dos padrões para ambos os fármacos foi de 0,625; 1,25; 2,5; 5 e 10 mg L^{-1} .

3.5 Análises biológicas

A coleta das amostras biológicas foi elaborada com base no tempo de exposição, sendo cada grupo experimental coletado seguindo o delineamento experimental para o período de 96 h de exposição. Na coleta, os animais foram anestesiados rapidamente em uma solução de benzocaína (Ethyl p-aminobenzoate), previamente diluída em etanol, na concentração de 0,1% (1g para 10L) em água declorada, tal solução não altera os parâmetros a serem avaliados. Em seguida o sangue dos animais (n=24/ grupo) foi

coletado na vasculatura caudal utilizando-se seringas e agulhas heparinizadas (27G) (Figura 13). O sêmen de 8 animais por grupo experimental foi também coletado análise da concentração espermática, o mesmo foi obtido através do orifício urogenital com uma massagem abdominal no sentido ântero-posterior utilizado uma ponteira acoplada a uma pipeta. Posteriormente, os indivíduos foram eutanasiados por secção da medula espinhal na altura do opérculo (NCR, 2019). Além das amostras de sangue e sêmen, o comprimento total e parcial dos indivíduos foram mensurados. Além da massa corpórea, a massa do fígado, vísceras e gônadas também foram mensuradas com uma balança digital (0,001 g) para o cálculo dos índices somáticos.

Os fígados de 6 animais por aquários foram coletados para avaliação da expressão gênica da vitelogenina A (*vtgA*), totalizando um n=12 indivíduos por grupo experimental. Para as análises histológicas foram considerados 3 animais por aquário (n=6/ grupo). Os testículos foram coletados para as análises biométricas e para análises histológicas (n=6/grupo). Os tecidos para as análises histológicas foram fixados em uma solução de Bouin acético e após 24 horas transferidos para etanol 70%, onde ficaram mantidos até o processamento histológico. O projeto foi submetido e aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA/IBUSP) sob o registro nº 275/2017.

Figura 13.Coleta de sangue através da vasculatura caudal em *A. altiparanae* (Foto: Arquivo pessoal)

3.5.1 Indices gonadossomático (IGS), hepatossomático (IHS) e viscerossomático (IVS)

Os índices somáticos (IS) foram calculados usando-se a relação entre a massa do respectivo órgão/estrutura (MX) e massa corpórea total do organismo (MC) (IS= MX/MC*100) (VAZZOLER, 1996).

3.5.2 Análises histológicas

Os fragmentos hepáticos e testiculares, previamente fixados em solução de Bouin, foram desidratados com concentrações crescentes de etanol por 40 minutos, diafanizados em solução de xilol por 20 minutos e infiltrados em Paraplast® (Erv-Past, Erviegas Instrumental Cirúrgico Ltda) (Behmer, et al., 1976). Os cortes histológicos de 5µm foram realizados em micrótomo (Leica-RM/2255, equipado com lâminas descartáveis) montados em lâminas com poli-lisina (*Poly-Lysine Solution, Sigma Diagnostics, USA*). Após a secagem das amostras e retirada extra da parafina das lâminas, o material foi reidratado com concentrações decrescentes de álcool e xilol seguido de água corrente e posteriormente corados com hematoxilina-eosina (QUINTERO-HUNTER, 1991). Em seguida, o material foi novamente desidratado, diafanizado e montado com lamínula e goma Damar. As lâminas histológicas foram analisadas e documentadas através de um sistema computadorizado de captura de imagens (microscópio de luz transmitida, Leica DM 1000; câmera fotográfica Leica DFC 295 e programa de captura de imagem *Leica Application Suite Professional*, LAS V 3.6).

3.5.3 Concentração espermática

Amostras do sêmen de cada animal foram fixadas na proporção de 1 µL de sêmen para: 4 mL de fixador (1:4.000). A solução de fixação foi preparada com 4 ml de formadeido em 100 ml de água destilada com 3,8 g de critato de sódio para uma solução final de 4% solução de citrato formolizada. A partir de amostra diluída, um volume total 20 µL de sêmen foi pipetado em câmera de Neubauer de profundidade de 0,1 mm sendo 10µL em cada quadrante (Figura 14). A contagem foi mensurada com microscópio óptico (400x) e com um contador de células digital. Para a quantificação das células foi aplicada a metodologia de Sanches (2011).

Figura 14. Câmera de Neubauer (Foto: Arquivo pessoal)

3.5.4 Análises dos hormônios esteroides

Os esteroides gonadais: 17β-estradiol (E_2), 11-cetotestosterona (11-KT) e testosterona (T) foram quantificados pelo método de ELISA, no plasma de machos de *A. altiparanae* utilizando-se kits comerciais (Cayman Chemical Company, Michigan, EUA). Todas as amostras de plasma foram analisadas em duplicatas e as medições de absorbância (412 nm) foram realizadas em um leitor de microplacas (Spectra Max 250 *Molecular Devices*). As amostras também foram diluídas seguindo as padronizações de KIDA e colaboradores (2016) sendo 20x para 11KT, 10x para T e 3x para E_2. Na placa, por cada duplicata foi aceito um coeficiente de variação (CV) intraensaio inferior a 20% (SINK; LOCHMANN; FECTEAU, 2008). Os coeficientes obtidos foram entre 2,5 à 19 % nas amostras analisadas.

3.5.5 Análises moleculares

A expressão gênica hepática da vitelogenina A (*vtgA*) foi quantificada pelo método de RT-qPCR. O RNA total de uma porção do fígado foi extraído com reagente Trizol® (Sigma-Aldrich, USA) que consiste em uma solução monofásica de fenol e isotiocianato de guanidina designado para isolar RNA total de alta qualidade. A integridade do material foi avaliada através da análise da razão Abs260/Abs280 no aparelho NanodropTM Spectrophtometer (ND-1000). O RNA assim purificado foi estocado e mantido em -80°C. Em seguida, 12 µL de cada amostra, na concentração de 200 $ng.\mu L^{-1}$ de RNA, foi usado como padrão para a conversão em cDNA por meio da transcriptase reversa utilizando o kit comercial (SuperScript™ II Reverse Transcriptase). Os *primers* utilizados para o gene *vtgA* foram baseados em Tolussi (2016) para a espécie congenérica *Astyanax fasciatus* e validados em *A. altiparanae* por Brambila-Souza e coladoradores (2019). Em microtubos de 0,2mL foram adicionados 12 µL de cada amostra na concentração de 200 $ng.\mu L^{-1}$ de RNA. Em cada tubo foi acrescentado 1µL de Randon hexamer (50 $ng.\mu L^{-1}$), colocado no termociclador por 10 minutos a 70°C. Em seguida, as amostras foram colocadas em gelo para choque térmico (4°C), e foi adicionado 5µL de buffer, 2,5µL de DTT e 1,25µL de dNTPs e colocado no termociclador em 25°C por 10 minutos. Foi dado um novo choque térmico, adicionado 0,6µL da enzima e por fim as amostras foram colocadas no termociclador em 42°C por 50 minutos e em 70°C por 10 min, e estocado em -20 ^{0}C.

A reação de RT-PCR em tempo real foi realizada utilizando 12,5 µL de POWER SYBR GREEN PCR Master Mix (Applied Biosystems, USA), 0.5 µM de primer (*forward* e *reverse*) e 2 µL do cDNA. A reação foi incubada por 2 min à 50^0C, 10 min a 95^0C seguido por quarenta ciclos de 15 s a 95^0C e 40 s a 60^0C. Ao final destes ciclos foi realizada uma análise da *melt curve* para testar a especificidade da reação. A reação foi realizada em duplicata no Step One Real Time- PCR System (Applied Biosystems). O gene normalizador (*housekeeping*) foi a βactina para a análise da expressão relativa da *vtgA*. A expressão gênica foi calculada de acordo com o valor de *cycle threshold* (Ct), que foi normalizado pelo ΔΔct (ddCt) com o *housekeeper* (LIVAK; SCHMITTGEN, 2001).

3.5.6 Análises estatísticas

Os dados dos índices gonadossomático (IGS), hepatossomático (IHS) e viscerossomático (IVS) e a concentração plasmática dos esteroides gonadais foram comparados entre os diferentes grupos experimentais por Análise de Variância de uma via (*one way* ANOVA), seguido de teste post-hoc Student-Neumann-Keuls ($p<0,05$) atendendo os pré-requisitos de homocedasticidade e normalidade por Shapiro-Wilk Test e D' Agostinho & Person ominbus test.

Os dados de expressão da *vtgA* e concentração espermática também foram comparados (*one way* ANOVA), mas seguido de teste post-hoc Dunnet ($p<0,05$) atendendo os pré-requisitos de homocedasticidade e normalidade por Shapiro-Wilk Test e D' Agostinho & Person ominbus test. Caso os pré-requisitos não fossem atendidos, o teste não-paramétrico de Kruskal-Wallys, post-hoc Dunns foi aplicado.

Para a análise da concentração Letal (CL_{50}) foi feito uma curva logarítmica baseando no método do probit (FINNEY, 1952). Os outliers estatisticamente significativos ($p<0,05$) foram excluídos após a anlise pelo programa Grubbs test (Graph pad). Os valores dos índices somáticos, hormônios esteroides, expressão relativa da vtg foram expressos como média ± erro padrão da média.

4. Resultados

4.1 Parâmetros físico-químicos da água

Os parâmetros físico-químicos da água utilizada nos bioensaios de decaimento, RFT, CL_{50} foram analisados e descritos. Em todos os casos, as variáveis mensuradas foram adequadas para a execução dos experimentos. Os dados dos parâmetros físico-químicos da água são apresentados na tabela 1.

Tabela 1. Parâmetros físico-químicos da água utilizada no experimento de toxicidade aguda de 96h. LQ = Limite de detecção.

Variável	Unidade	LQ	Resultado
Cálcio	mg L^{-1}	0,1	2,1
Fosfato	mg L^{-1}	0,1	<LQ
Carbono Inorgânico Total	mg L^{-1}	1	12,5
Carbono Orgânico Total	mg L^{-1}	0,1	<L.Q
Matéria Orgânica	mg L^{-1}	1	5
Nitrogênio Total	mg L^{-1}	0,02	<L.Q
Turbidez	NTU	0,1	1,4
Alcalinidade Total	mg CaCO3 L^{-1}	5	57,5
Dureza Total	mg CaCO3 L^{-1}	1	51,6
Cloretos	mg Cl L^{-1}	1	21,3
Ferro	mg L^{-1}	0,1	<LQ
Condutividade	µS cm^{-1} a 25 °C	1	71,3
Sulfato	mg $SO^{2}{}_{4}$ L^{-1}	4	<LQ

4.2 Decaimento dos compostos diclofenaco (DCF) e cafeína (CAF)

O decaimento do DCF e da CAF foram de 5% em 24 horas para os aquários com peixe e sem peixe (Figura 15), sendo o valor calculado através da variação da concentração inicial pela final e o resultado expresso em porcentagem. Os valores mensurados no teste tiveram como concentração nominal inicial de 1 mg L^{-1} de ambos os fármacos.

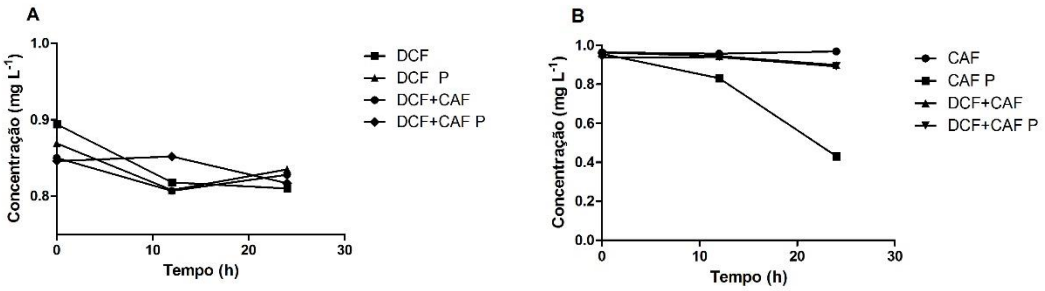

Figura 15. Teste de decaimento em 24h. **A**. Diclofenaco sem peixes (DCF); Diclofenaco com peixes (DCF P); Diclofenaco e cafeína sem peixes (DCF+CAF); Diclofenaco cafeína com peixes (DCF+CAF P). **B**. Cafeína sem peixes (CAF); Cafeína com peixes (CAF P); Diclofenaco e cafeína sem peixes (DCF+CAF); Diclofenaco cafeína com peixes (DCF+CAF P).

4.3 Teste de concentração média letal (CL_{50})

Os resultados dos testes de CL_{50} no período de exposição de 96h foram de 30,8 mg L^{-1} para o DCF e 95,9 mg L^{-1} para a CAF (Figuras 16 e 17).

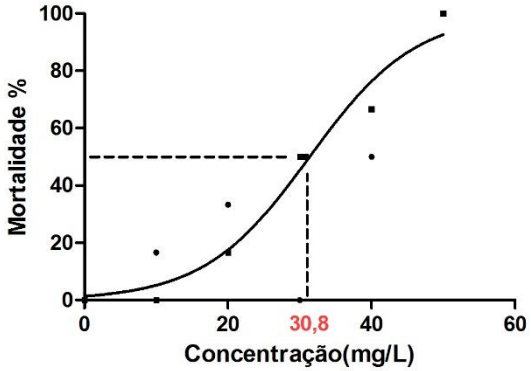

Figura 16. Curva de mortalidade do teste de concentração letal (CL_{50}) do diclofenaco (DCF).

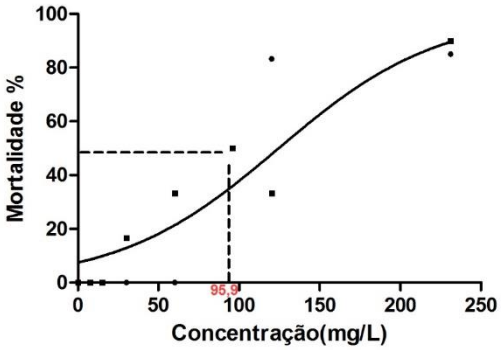

Figura 17. Curva de mortalidade do teste de concentração letal (CL_{50}) da cafeína (CAF).

4.4. Ensaio de exposição aguda

Os resultados das análises de água para as concentrações utilizadas nos diferentes grupos experimentais nos ensaios de exposição aguda são descritos na tabela 2. Os valores para as concentrações ($mg.L^{-1}$) nominais foram 0; 3,1; 9,5; 3,1|9,5 para os grupos Controle (CTL), Diclofenaco (DCF), Cafeína (CAF) e diclofenaco + cafeína (DCF+CAF), respectivamente. As concentrações ($mg.L^{-1}$) reais mensuradas por LC-MS/MS para o tempo inicial e a reposição no tempo de 48h são descritas na tabela 2. Os animais foram monitorados constantemente bem como os parâmetros da água (pH: 7,4±0,1; O_2: 6,3±0,3; temperatura: 25,4±0,7ºC). A mortalidade dos indivíduos no final do ensaio agudo foi observada no grupo DCF (16%) e no grupo DCF+CAF (12%), nos grupos CTL e CAF não foram observados obtidos dos indivíduos.

Tabela 2. Concentrações de DCF e CAF na água dos grupos experimentais expostos. A concentração real A corresponde ao tempo inicial experimental de 0 horas e a concentração B corresponde a reposição do meio em 48 horas de experimento.

Grupos experimentais	Concentração nominal (mgL^{-1})	Concentração Real (mgL^{-1}) A	Concentração Real (mgL^{-1}) B
CTL	0	0	0
DCF	3,1	4,4 ± 0,57	4,3± 0,54
CAF	9,5	12,8 ± 0,78	10,5 ± 0,98
DCF+CAF	3,1| 9,5	3,8± 0,28|13,4 ± 0,49	4,2 ± 0,36|11,1 ± 0,42

4.5 Análises biométricas

4.5.1 Índices gonadossomático (IGS), hepatossomático (IHS) e viscerossomático (IVS)

Os machos da espécie *A. altiparanae*, sexualmente maduros apresentaram comprimento total de 9,9±1,3 cm e massa corpórea de 13,4±6,1 g. O IGS dos animais do grupo DCF+CAF foi maior que dos animais do grupo CTL (*P*= 0,02) (Figura 18A). O IHS e IVS não apresentaram diferenças significativas (IVS - *P*= 0,12 ; IHS - *P*= 0,16), quando comparado o grupo CTL com os grupos DCF, CAF e DCF+CAF (Figuras 18 B e C).

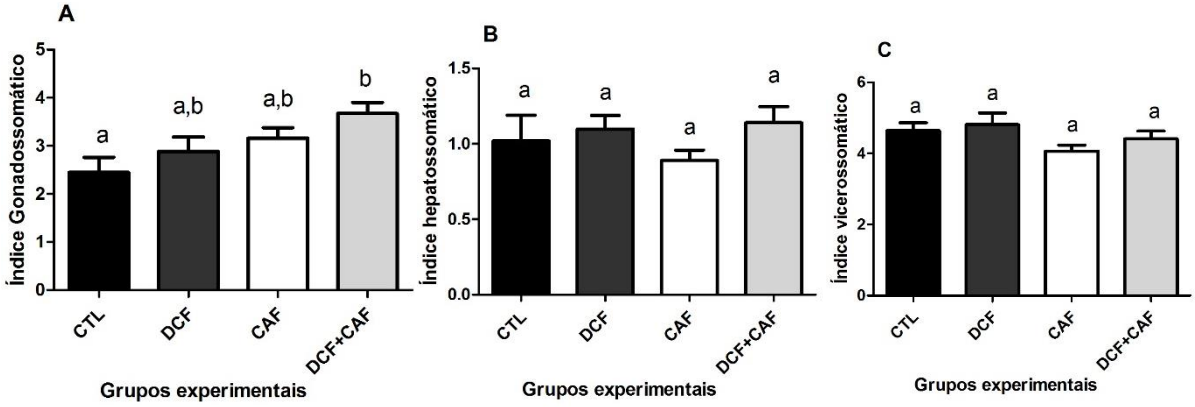

Figura 18. **A.** Índice Gonadossomático (IGS) (n=10); **B.** Índice hepatossomático (IHS) (n=20); **C**. Índice vicerossomático (IVS) (n=20) dos animais dos grupos experimentais DCF, CAF e DCF+CAF. Letras minúsculas (a,b) correspondem às diferenças significativas entre os grupos experimentais (p<0,05). Letras minúsculas similares (a) correspondem a ausência de diferenças significativas (p>0.05).

4.6 Concentração plasmática dos hormônios esteroides

As análises plasmáticas dos hormônios esteroides demonstraram alterações na concentração plasmática de E_2, onde os animais dos grupos experimentais DCF e CAF apresentaram uma menor concentração plasmática do estrógeno quando comparados com o grupo CTL (*P*= 0,020) (Figura 19).

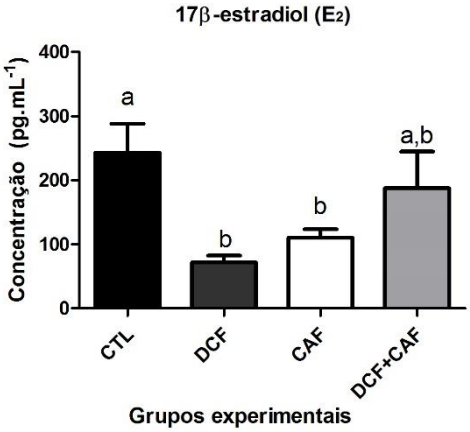

Figura 19. Concentração plasmática ($pg.mL^{-1}$) de 17β estradiol (E_2). No gráfico estão representados os grupos experimentais: controle (CTL) diclofenaco (DCF), cafeína (CAF) e diclofenaco e cafeína (DCF+CAF) (n=10). As letras minúsculas (a,b) correspondem a presença de diferenças significativas entre os grupos experimentais (p<0,05).

Com relação aos andrógenos, não houve alterações na concentração plasmática de 11-KT dos animais dos grupos experimentais DCF, CAF e DCF+CAF quando comparados ao grupo CTL (*P= 0,059*) (Figura 20). No entanto, alterações foram

observadas na concentração plasmática de T, com animais do grupo DCF apresentando uma redução na concentração de T quando comparados aos animais dos grupos CTL e CAF (*P= 0,013*) (Figura 21).

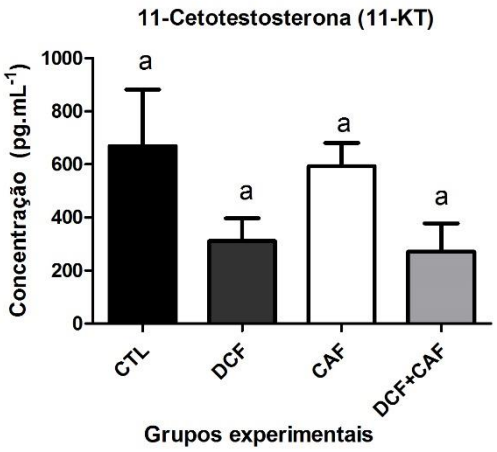

Figura 20. Concentração plasmática (pg.mL^{-1}) de 11-cetotestosterona (11-KT). No gráfico estão representados os grupos experimentais: controle (CTL) diclofenaco (DCF), cafeína (CAF) e diclofenaco e cafeína (DCF+CAF) (n=15). A letra minúscula (a) corresponde à ausência de diferenças significativas entre os grupos experimentais (p>0,05).

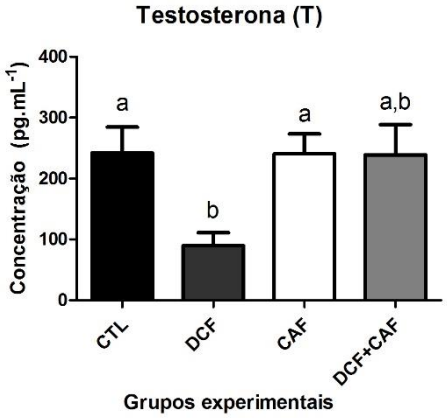

Figura 21. Concentração plasmática (pg.mL^{-1}) de testosterona (T). No gráfico estão representados os grupos experimentais: controle (CTL) diclofenaco (DCF), cafeína (CAF) e diclofenaco e cafeína (DCF+CAF) (n=10). As letras minúsculas (a,b) correspondem à presença de diferenças significativas entre os grupos experimentais (p<0,05).

4.7 Expressão gênica da vitelogenina A (*vtgA*)

Na análise da expressão relativa do gene da *vtgA*, os machos expostos aos fármacos não apresentaram diferenças significativas quando comparado ao grupo CTL (*P=0,08*) (Figura 22).

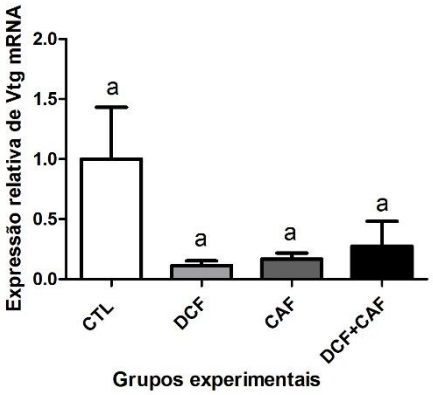

Figura 22. Expressão relativa do gene vitelogenina A (vtgA). No gráfico estão representados os grupos experimentais : controle (CTL) diclofenaco (DCF), cafeína (CAF) e diclofenaco e cafeína (DCF+CAF) (n=6). A letra minúscula (a) corresponde à ausência de diferenças significativas entre os grupos (p>0,05).

4.8 . Concentração espermática

A concentração espermática (SPZ.mL^{-1}) de *A. altiparanae* expostos aos grupos experimentais DCF, CAF e DCF+CAF não apresentarou diferenças significativas quando comparados aos indivíduos do grupo CTL (*P=0,51*) (Figura 23).

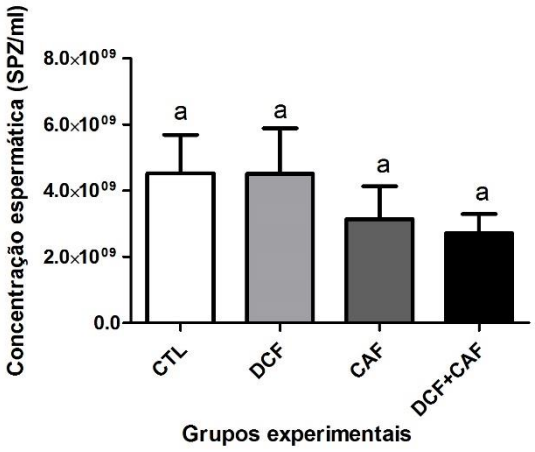

Figura 23. Concentração espermática. No gráfico estão representados os grupos experimentais: controle (CTL) diclofenaco (DCF), cafeína (CAF) e diclofenaco e cafeína (DCF+CAF) (n=8). A letra minúscula (a) corresponde à ausência de diferenças significativas entre os grupos (p>0,05).

4.9 . Análises histológicas do fígado e dos testículos

Com base nos procedimentos histológicos foi possível analisar a morfologia dos testículos e fígado. Os testículos dos diferentes grupos experimentais apresentaram uma morfologia normal sem alterações patológicas que comprometessem o funcionamento do mesmo, todos os animais apresentaram um típico testiculo lobular irrestrito, em estágio maduro na luz dos lóbulos e com o epitélio germinativo contínuo (Figura 26).

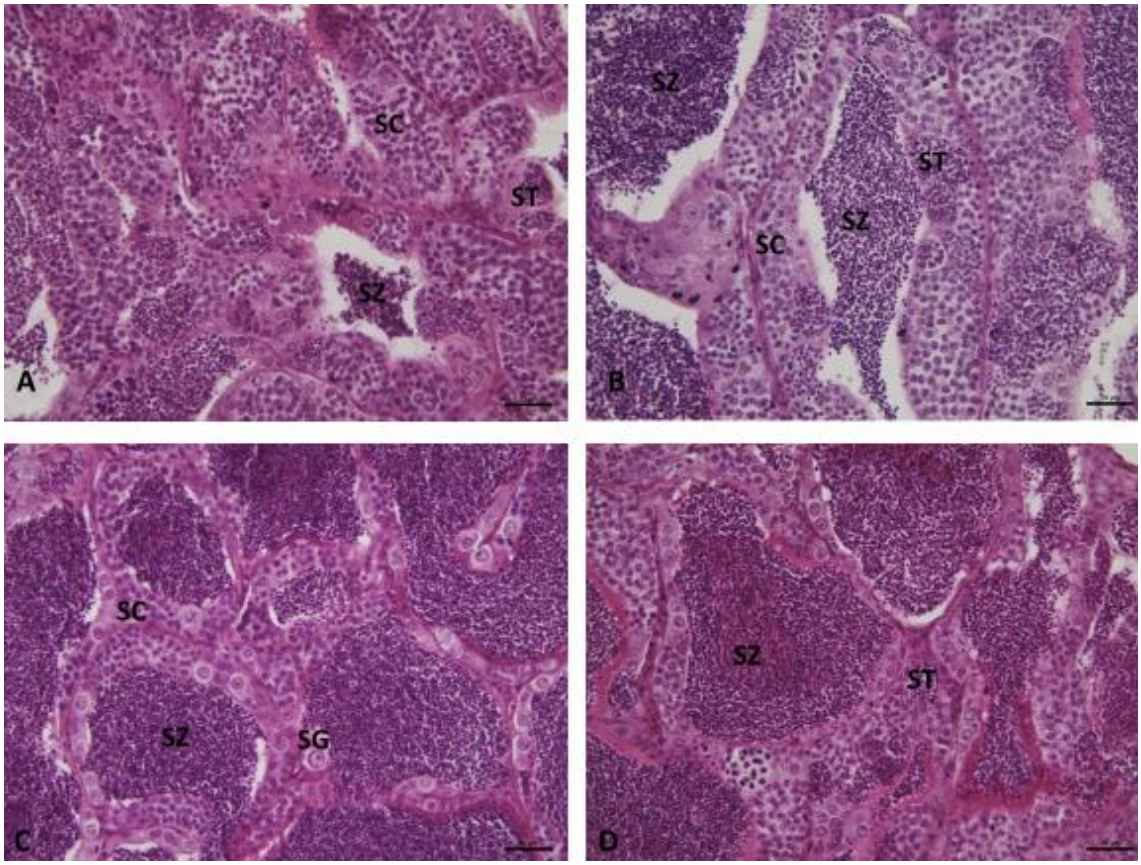

Figura 26. Seções histológicas dos testículos de *Astyanax altiparanae* coradas por HE. Grupo controle (A), diclofenaco (B), cafeína (C) e mistura (D). Nomenclaturas das células germinativas : espermatogônia (SG), espermatócito (SC), espermátide (ST) e espermatozoides (SZ). Barra 25 µm.

O fígado dos diferentes grupos experimentais apresentou uma morfologia estrutural do tecido e das células hepáticas normais, não foram observados centros melanomacrofágicos nos tratamentos quando corados pelo método de hematoxilina e eosina (Figura 27).

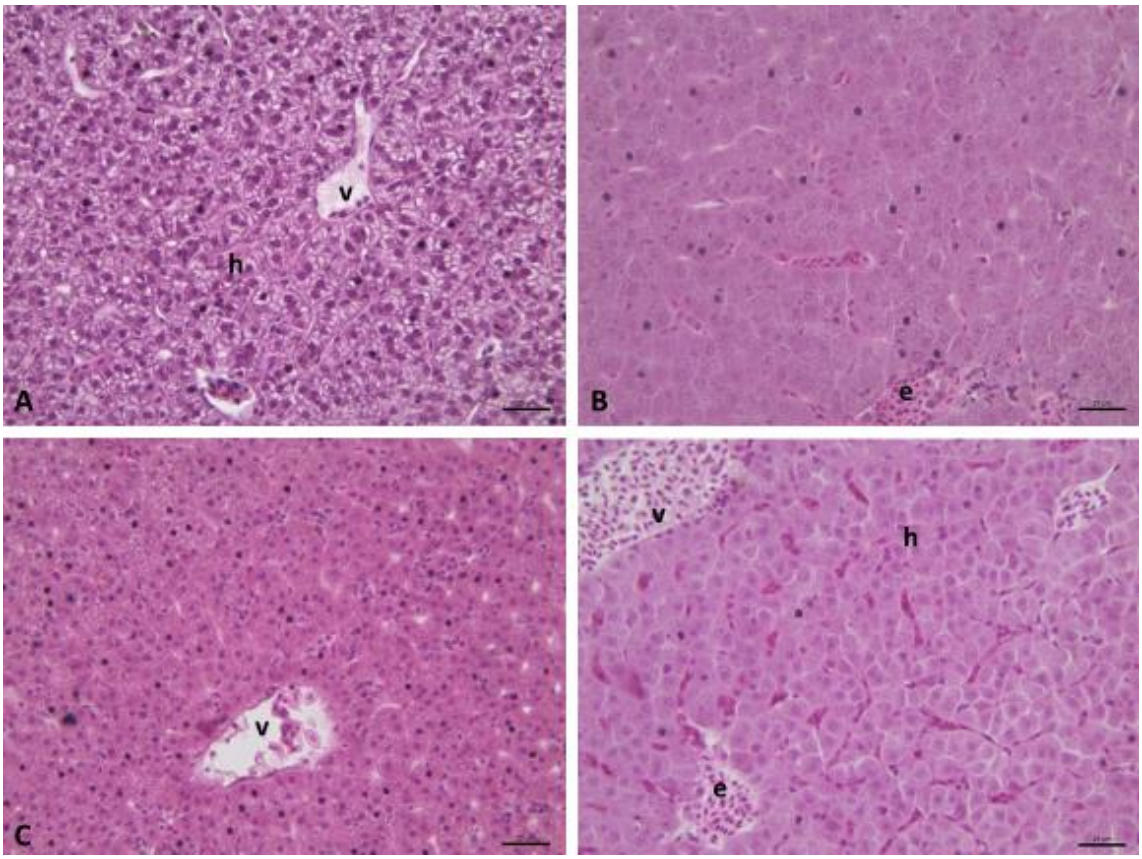

Figura 27. Seções histológicas do figado de *Astyanax altiparanae* coradas por HE . Grupo controle (A), diclofenaco (B), cafeína (C) e mistura (D). Nomenclaturas das células e estruturas: hepatócito (h), eritrócito (e), vaso sanguíneo (v). Barra 25 µm.

5. Discussão

5.1. *Astyanax altiparanae*

A espécie *Astyanax altiparanae* utilizada neste estudo é um importante modelo biológico já utilizado em estudos ecológicos (ORSI; CARVALHO; FORESTI, 2004), reprodutivos (BRAMBILA-SOUZA et al., 2019) e toxicológicos (ABDALLA et al., 2019; KIDA; ABDALLA; MOREIRA, 2016; PINHEIRO *et al.*, 2019). Este fato se deve principalmente pela sua distribuição geográfica nos rios brasileiros, sendo uma importante espécie na cadeia trófica (VILELLA; BECKER; HARTZ, 2002) e na produção (GONÇALVES *et al.*, 2014).

Os animais do presente estudo apresentaram características biométricas similares aos indivíduos encontrados em ambiente natural. Segundo Orsi e colaboradores (2004), após 56 coletas em um ano com 1553 exemplares, foi descrito que a espécie *A. altiparanae* apresenta um comprimento total médio que varia de 10-15 cm e massa corpórea média de 10-20 g. Em vista da conservação dos peixes nativos de importância ecológica, a obtenção dos espécimes em condições controladas de cultivo, como o caso do presente estudo, permite a possibilidade de avaliar efeitos das substâncias testadas em laboratório de modo a verificar as respostas fisiológicas das espécies (CAIRNS; PRATT, 1990; MARTINEZ-HARO *et al.*, 2015).

5.2 Parâmetros físico-químicos da água e dos fármacos

Os parâmetros físico-químicos da água utilizada nos bioensaios de decaimento, RFT, CL_{50} demonstraram, em todos os casos, que as variáveis analisadas foram adequadas para a execução dos experimentos seguindo os protocolos experimentais já conduzidos por Kida e colaboradores (2016), Pinheiro e colaboradores (2019) e Abdalla e colaboradores (2019).

O DCF, como um fármaco comumente encontrado em ambientes impactados pela ação antrópica tem apresentado um caráter persistente nos ambientes aquáticos (BONNEFILLE *et al.*, 2018), sendo colocado na *Watch list* 2013/39/EU da União Europeia para o monitoramento ambiental (RIBEIRO *et al.*, 2015). No presente estudo, o DCF apresentou um baixo decaimento nas primeiras 24 horas, 5% do valor inicial, baseado

na concentração nominal (1 $mg.L^{-1}$). Estes resultados são corroborados com trabalhos feitos com ibuprofeno que demonstraram o decaimento 6% deste fármaco em 48 h, quando fêmeas adultas de *Oryzias latipes* foram expostas a 100 $mg.L^{-1}$ (HAN et al., 2010). Em relação ao DCF foi observado um lento decaimento em 48 h, com valores de concentração similares aos valores nominais em estudo com adultos *Oryzias latipes* (LEE et al., 2011). Todavia, em uma investigação envolvendo exposição aguda ao DCF com peixes juvenis da espécie *Rhamdia quelen* foi relatado uma degradação rápida das concentrações na faixa dos microgramas (μgL^{-1}) resultando em um decaimento de 50% em 12 horas (GHELFI et al., 2016).

Os diferentes resultados encontrados, tanto no presente estudo quanto na literatura, reforçam a constante necessidade de se avaliar a dinâmica físico-química de tais compostos. O DCF, em sua maioria, é metabolizado pelo sistema de biotransformação em humanos formando 4'-hydroxydiclofenaco (4'-OH-DCF) e 5-hydroxydiclofenaco (5-OH-DCF) (LONAPPAN et al., 2016), sendo tais metabólitos também encontrados em peixes e provavelmente descartados através dos fluídos biológicos dos mesmos (KALLIO et al., 2010). Neste sentido, possivelmente, algumas alterações observadas na dinâmica de tais compostos tem a influência da fisiologia do animal exposto. Apesar das características do DCF descritas na literatura, o composto apresenta uma grande variação nas concentrações e, portanto, faz-se necessário a avaliação da dinâmica deste anti-inflamatório através da análise de decaimento do composto no sistema empregado para estudos toxicológicos (VIENO; SILLANPÄÄ, 2014).

Além do DCF, o presente estudo avaliou o decaimento da CAF isolada (sem e com animais), sendo também avaliada na mistura (DCF+CAF). Em todos os casos a degradação foi de 5% do valor inicial baseado na concentração nominal estipulada de 1 $mg.L^{-1}$ em 24 horas. A CAF é descrita na literatura como um fármaco persistente em ambientes marinhos e de água doce (VERENITCH; MAZUMDER, 2008). É uma das substâncias mais encontradas em corpos hídricos como estações de tratamento de água, rios, lagos e águas subterrâneas, sendo esta utilizada como um importante marcador antropogênico para estudos dos impactos das atividades humanas (BUERGE *et al.,* 2003). A dinâmica da CAF em estudos de microcosmos com mistura com diferentes fármacos é descrita como pouco persistente como uma meia vida de 1 dia

(LAM et al., 2004), no entanto, outras investigações demonstram que a CAF não é afetada por fatores fotocatalíticos (MARQUES *et al.*, 2013).

Em muitos trabalhos científicos, a dinâmica dos compostos farmacêuticos em ambiente aquático é relatada como um importante fator a ser avaliado nos estudos toxicológicos, devido às características físico-químicas das substâncias que podem ser alteradas pelos parâmetros do meio na qual se encontram (MURRAY; THOMAS; BODOUR, 2010). Os fatores como temperatura, pH, luminosidade e microbiota são variáveis que podem interferir no processo de decaimento de alguns fármacos e, desta forma, causar alterações nas concentrações reais das substâncias estudadas (GETOFF, 2002). Todas essas condições foram previamente controladas ao longo dos experimentos de modo a não influenciar os resultados obtidos. Além disso foi realizado o teste de decaimento com aquários sem e com animais a fim de observar se os fármacos apresentavam alguma diferença na concentração ao longo da exposição. No entanto, não houve diferença no decaimento entre os aquários, com e sem peixes para ambos os fármacos. Estas informações são importantes, pois em geral, grande parte das revisões que abordam o tema dos contaminantes de preocupação emergente classifica tais substâncias como persistentes em muitos ambientes e, desta maneira, tornam um fator problemático na eliminação e tratamento de águas residuais em estações de tratamento de efluentes (LAM *et al.*, 2004; MACHADO *et al.*, 2016).

5.3 Mortalidade de *Astyanax altiparanae* frente ao diclofenaco e a cafeína

Os efeitos toxicológicos de muitos fármacos dependem de vários fatores como a espécie, o parâmetro usado para análise, o tempo de exposição o que podem influenciar diretamente nos resultados de mortalidade para cada organismo exposto (HAAP; TRIEBSKORN; KÖHLER, 2008). No presente estudo, a concentração média letal (CL_{50}) de DCF observada para *A. altiparanae* foi de 30,8 $mg.L^{-1}$ no tempo de 96h. Este resultado se encontra na faixa de concentração letal em miligramas (mg) descritas na literatura para diferentes espécies. Os estudos utilizando organismos aquáticos como peixes têm apresentado resultados na faixa dos miligramas, 70,98 $mg.L^{-1}$ para juvenis *Cyprinus carpio* em 96h (ISLAS-FLORES et al., 2013; SAUCEDO-VENCE *et al.*, 2015), 167 $mg.L^{-1}$ para

juvenis *Danio rerio* em 96h (PRASKOVA *et al.*, 2011), 10 $mg.L^{-1}$ para adultos *Oryzias latipes* (NASSEF *et al.*, 2009).

A CL_{50} de CAF encontrada para *A. altiparanae* foi de 95,9 $mg.L^{-1}$, este resultado é um dos primeiros testes de mortalidade para CAF descritos na literatura para espécies tropicais no Brasil. As informações sobre a concentração letal da CAF na literatura são escassas. Moore e colaboradores (2008) reportaram CL_{50} de 100 $mg.L^{-1}$ para *Pimephales promelas*, valores similares aos encontrados para *A. altiparanae*. Apesar das concentrações da CAF em ambiente natural serem na faixa de microgramas (MONTAGNER *et al.*, 2018), a CAF tem demonstrando efeitos em diferentes classes de organismos aquáticos como anfíbios, moluscos e peixes (CRUZ *et al.*, 2016; LI *et al.*, 2012; SAKAMOTO *et al*., 1993), sendo um composto bastante utilizado como marcador de atividades antropogênicas em ambientes impactados, o que torna relevante avaliar os seus efeitos (BUERGE *et al.*, 2003).

Em geral, a toxicidade dos compostos pode variar com as diferentes espécies devido à fisiologia do organismo, estágio de desenvolvimento e método de exposição (FINNEY, 1985). Nesta perspectiva, os ensaios toxicológicos utilizam métodos básicos como o teste de concentração letal (CL_{50}), para avaliar a mortalidade do grupo amostral (ZAGATTO; BERTOLETTI, 2008). Nas diretrizes 93/67/EEC da União Europeia, as substâncias podem ser classificadas como muito tóxicas, com CL_{50} menor que 1 $mg.L^{-1}$, tóxicas para organismos aquáticos (1 a 10 $mg.L^{-1}$) e perigosas para organismos aquáticos (11 – 100 $mg.L^{-1}$). Nesta classificação, tanto o DCF quanto a CAF podem ser considerados como perigosos para os organismos aquáticos. A mortalidade observada no final do período de exposição do ensaio agudo nos grupos DCF e DCF+CAF reforça o grau de toxicidade dos diferentes compostos como fora observado no teste de concentração média letal. O DCF presente nos diferentes grupos apresenta uma toxicidade para os indivíduos mesmo para concentrações subletais utilizadas durante o ensaio de exposição aguda.

5.4 Efeitos dos fármacos no perfil hormonal de machos *Astyanax altiparane*

As alterações no perfil hormonal causadas pelos anti-inflamatórios, como as observadas no presente estudo, vêm sendo investigadas em diferentes espécies e níveis biológicos. A interferência do ibuprofeno na redução nas concentrações plasmáticas do andrógeno T foi observada em machos de *Danio rerio* expostos a 10 e 100 $\mu g.L^{-1}$ por 14 dias (JI *et al.*, 2013). O mesmo efeito de redução da T foi observado em machos de *Hoplias malabaricus* expostos por via trófica às concentrações de 2.0 e 20.0 µg/kg (GUILOSKI *et al.*, 2015). Além das exposições *in vivo*, as alterações na redução das concentrações de T também foram observadas *in vitro* utilizando células *H295R* expostas a 20 $mg.L^{-1}$ de ibuprofeno (HAN et al., 2010).

Considerando-se o andrógeno 11-KT, em *D. rerio* expostos a 500 $\mu g.L^{-1}$ de ibuprofeno por 7 dias a concentração de 11-KT não foi alterada significativamente quando comparada ao controle (MORTHORST et al., 2013), mesmo resultado obtido na exposição de *A. altiparanae* ao DCF. No entanto, é importante destacar a tendência à redução dos níveis plasmáticos deste andrógeno nos machos de *A. altiparanae* expostos ao DCF, isolado ou combinado à CAF, sendo esta tendência referendada pelo valor de P obtido na análise estatística (P=0,059), muito próximo ao limite de significância. Na literatura é descrito que os andrógenos (T e 11-KT), sintetizados pelas células de Leydig pela ação dos hormônios hipofisários como o FSH, possuem funções essenciais na modulação da espermatogênese e espermiogênese, induzindo o crescimento e maturação dos testículos e o desenvolvimento e diferenciação das espermatogônias (SG) em espermatozoides (SZ) (NAGAHAMA, 1994; SCHULZ *et al.*, 2010). Além dos andrógenos, o estrógeno E_2 também desempenha um papel essencial na renovação das células germinativas presentes no epitélio seminífero dos peixes induzindo as células de Sertoli a produzir fatores de renovação celular que auxiliam no processo de mitose das espermatogônias (SCHULZ *et al.*, 2010).

No presente estudo, os machos expostos aos fármacos apresentaram uma redução da concentração de E_2 dos no grupo DCF quando comparado ao grupo CTL. Estudos com concentrações na faixa de microgramas com machos de *D. rerio,* expostos a 1 e 10 $\mu g.L^{-1}$ de ibuprofeno demonstraram um aumento do E_2, um efeito contrário ao observado nos machos de *A. altiparanae* no presente estudo. Adicionalmente, não

foram observadas alterações na concentração deste estrógeno quando machos de *D. rerio* foram expostos ao DCF (JI *et al.*, 2013). O aumento da concentração de E_2 também foi observado *in vitro* para células adrenocorticais tumorais *H295R* de humanos expostas ao ibuprofeno nas concentrações de 2 e 20 $mg.L^{-1}$ (HAN *et al.*, 2010). Por outro lado, foi demonstrada a capacidade da inibição de receptores estrogênicos em cultura de células T47D expostas por dois dias ao DCF (63,09 µM) e ibuprofeno (311,3 µM) e os autores relataram uma redução na resposta agonista do E_2 na presença dos diferentes anti-inflamatórios, demonstrando a atividade antiestrogênica dos mesmos (EZECHIÁŠ *et al.,* 2016). Tais estudos *in vitro* poderiam elucidar a possível resposta do perfil hormonal do presente estudo onde houve uma redução dos hormônios esteroides dos machos expostos aos fármacos.

Estes dados deixam evidente que apesar das respostas similares dos efeitos dos anti-inflamatórios sobre a concentração de andrógenos, nas diferentes espécies, estes compostos farmacêuticos possuem diferentes efeitos sobre a concentração dos estrógenos, tanto em estudos *in vivo* como *in vitro*. O mecanismo de alteração que estes fármacos desencadeiam nos esteroides vem sendo investigado em estudos *in vitro,* e os resultados vêm demonstrando uma capacidade inibitória destes compostos farmacêuticos na atividade das enzimas da via esterodoigênica responsáveis pela síntese dos esteroides gonadais (FERNANDES; SCHNELL; PORTE, 2011).

Em um estudo *in vitro* utilizando testículos de *Cyprinus carpio* foi observada a redução de 56% da atividade da aromatase CYP17 quando exposta ao DCF (FERNANDES; SCHNELL; PORTE, 2011). Esta enzima é responsável pela conversão da 17α-hidroxiprogesterona (17P4) em androstenediona (AD) que posteriormente é o substrato para a produção de testosterona (T) através da atividade da 17β-hidroxiesteroide desidrogenase (17β-HSD). Estas respostas da via esteroidogênica aos anti-inflamatórios foram também descritas em nível molecular em machos *D. rerio* expostos a 10 $\mu g.L^{-1}$ de ibuprofeno que apresentaram redução da expressão gênica de *17βhsd* e *cyp17* (JI *et al.*, 2013)

Sabe-se que os hormônios esteroides também exercem um papel fundamental no controle dos hormônios hipofisários FSH e LH através de um mecanismo de retroalimentação negativo e positivo, modulando as respostas endógenas do eixo HHG

em peixes (ZOHAR et al., 2010), assim como nos demais vertebrados. Os efeitos biológicos relatados na atividade enzimática das aromatases que levaram às variações hormonais descritas anteriormente podem explicar as alterações de genes de gonadotropinas da hipófise já que a concentração hormonal retroalimenta as respostas fisiológicas do eixo HHG. Estas alterações foram observadas em adultos da espécie *Oreochromis niloticus* expostos às concentrações de 1 e 100 $\mu g.L^{-1}$ de DCF, na qual se observou uma redução da expressão de genes LH, mas não de FSH (GRÖNER et al., 2017). A modulação na expressão dos genes hipofisários também foi elucidada em *D. rerio* expostos ao ibuprofeno nas concentrações de 1 e 10 $\mu g.L^{-1}$ nas quais os machos apresentaram uma hiporegulação dos genes *fshβ* e *lhβ* (JI et al., 2013).

Os compostos farmacêuticos, em sua grande maioria, dispõe de mecanismos de ação específicos devido à natureza química para o qual foram sintetizados (VASQUEZ et al., 2014). As funções farmacológicas dos anti-inflamatórios são atribuídas especificamente à inibição enzimática das enzimas COX, responsáveis pela produção de prostaglandinas (SCHOLER et al., 1986). No entanto, as COX são enzimas conservadas e expressas em diferentes organismos aquáticos, sendo que efeitos tem sido relatados como a redução de prostaglandinas (PE_2) em peixes expostos ao ibuprofeno (HAN et al., 2010; MORTHORST et al., 2013) e também em estudos envolvendo o DCF (HOEGER et al., 2005). Este mecanismo observado também em peixes pode ser uma influência nas alterações encontradas na esteroidogênese neste trabalho com os fármacos DCF e CAF, já que prostaglandinas como PE_2 são relatadas como importantes moléculas na modulação de vias fisiológicas ligadas a reprodução como a esteroidogênese (VAN DER KRAAK; CHANG, 1990).Além disso, foi descrito na literatura que anti-inflamatórios são capazes de modular a biossíntese de prostaglandinas em moluscos marinhos (COURANT et al., 2017).

No presente estudo, também foram avaliados os efeitos da CAF em variáveis fisiológicas reprodutivas de machos de *A. altiparanae* e os resultados mostram que os animais expostos a este fármaco apresentaram uma redução na concentração plasmática de E_2 quando comparados aos animais do grupo CTL. Na literatura são poucos os estudos que avaliam os potenciais efeitos da CAF na fisiologia reprodutiva de peixes, mesmo sendo um composto presente na grande parte dos ambientes aquáticos

(PEREIRA et al., 2016) e que é utilizado como marcador das atividades antropogênicas (BUERGE et al., 2003). Desta forma, o presente trabalho apresenta resultados pioneiros dos efeitos da CAF no perfil plasmático dos esteroides em peixes tropicais.

A CAF é um fármaco pertencente a classe das metilxantinas, é um estimulante do sistema nervoso, sendo descrito como um possível antagonista de receptores de adenosina (RIBEIRO; SEBASTIÃO, 2010). Poucos trabalhos descrevem os efeitos da CAF na mortalidade de peixes (MOORE et al., 2008), mas a maioria se concentra nos seus efeitos sobre a fisiologia do sistema nervoso (RIBEIRO; SEBASTIÃO; DE MENDONÇA, 2002). Mesmo frente à escassez de dados na literatura para os possíveis efeitos da CAF no eixo HHG de organismos aquáticos, alguns autores descrevem a CAF como um possível indicador de correlação de estrogenicidade na água contaminada por compostos estrogênicos, no estudo foi avaliado a capacidade indicativa foi obtida através do método de bioluminescência com receptores de leveduras (BLYES) do inglês *Bioluminescente yeast estrogen receptor assay* havendo uma correlação positiva das amostras contendo a cafeína com a atividade estrogênica na BLYES (MONTAGNER et al., 2014). Todavia, pelo nosso conhecimento, não foram descritos trabalhos na literatura que expliquem tal atividade da cafeína em hormônios esteroides de peixes.

5.5 Expressão da vitelogenina A (*vtgA*) em machos de *Astyanax altiparanae*

É bem descrito na literatura que a expressão gênica da *vtg* e a presença da Vtg plasmática são importantes ferramentas de avaliação nos efeitos de xenobióticos na reprodução de peixes podendo caracterizar a potencial atividade de modulação na endocrinologia dos organismos (KIME, 1999; SUMPTER; JOBLING, 1995). Neste contexto, a Vtg é considerada um biomarcador de exposição utilizado comumente nos estudos com desreguladores endócrinos (HOOK; GALLAGHER; BATLEY, 2014). O gene da *vtg* é encontrado tanto em machos quanto em fêmeas, porém a síntese de Vtg ocorre naturalmente em fêmeas sendo incorporada no citoplasma dos oócitos durante a vitelogênese (LUBZENS *et al*., 2010). Neste contexto, a expressão gênica de *vtg* e/ou a presença de Vtg plasmática em machos sinalizam a possibilidade do xenobiótico em estudo apresentar uma atividade estrogênica já que pode mimetizar moléculas endógenas, como o E2, responsável pela indução da expressão de *vtg* e do processo da vitelogênese (HANSEN et al., 1998; SUMPTER; JOBLING, 1995). Alguns trabalhos com

peixes descrevem que tanto o DCF quanto a CAF tem um potencial de induzir a expressão de *vtg* em machos, no entanto, no presente estudo, a expressão da *vtgA* não se alterou nos animais expostos aos fármacos.

Os dados de expressão de *vtgA* encontrados em *A. altiparanae* são corroborados com as concentrações de esteroides, haja vista que os fármacos não tiveram ação estrogênica. Hong e colaboradores (2007) reportaram aumento da expressão gênica da *vtg* em machos de *Oryzias latipes* após exposição de 8 mg L^{-1} de DCF por 4 dias. Em machos de *Oreochromis niloticus*, expostos ao DCF também foi observado um aumento da expressão da *vtg*, mas neste caso com concentrações de 1 µg L^{-1} (GRÖNER *et al.,* 2017). Além da expressão gênica da *vtg* foi observado aumento na concentração de Vtg plasmática em machos *O. latipes* expostos a 1 mg L^{-1} de ibuprofeno (HAN et al., 2010), mas para concentrações de 1 e 10 mg L^{-1} de DCF não foram observadas variações para mesma espécie (LEE *et al*., 2011). A CAF também tem sido reportada como indutora na síntese de Vtg, que aumentou no plasma de machos da espécie *Carassius auratus* quando expostos por 7 dias na concentração de 2mg L^{-1} (LI *et al.*, 2012).

5.6 Histologia dos testículos e fígado e índices somáticos

No presente estudo, os índices somáticos foram analisados, bem como a estrutura do tecido hepático e testicular dos machos expostos ao DCF e CAF. No caso dos índices IVS e IHS dos grupos DCF, CAF e DCF+CAF não foram observadas diferenças quando comparado ao CTL, contudo, foi observado um aumento no IGS nos animais do grupo DCF+CAF quando comparados com os animais do grupo controle. Os índices somáticos são utilizados normalmente como parâmetros biométricos para avaliar o estágio de desenvolvimento de determinados tecidos a fim de obter informações sobre as condições fisiológicas do organismo estudado (BOLGER; CONNOLLY, 1989). No caso da reprodução de organismos aquáticos, os índices têm sido ferramentas comumente aplicadas nos estudos ecotoxicológicos fornecendo informações adicionais sobre as respostas fisiológicas dos indivíduos frente aos xenobióticos (CARNEVALI *et al*., 2018; KIME, 1995). Na literatura foram observados efeitos de alguns compostos farmacêuticos nos índices somáticos dos organismos aquáticos estudados. Guiloski e colaboradores (2015) observaram uma diminuição no IHS, mas não no IGS em machos de *H. malabaricus* expostos ao DCF de maneira trófica, em concentrações de 2.0 e 20.0 µg/kg.

Fêmeas de *O. latipes* expostas a 10 mg.L^{-1} de DCF por 3 meses apresentaram aumento no IGS (LEE *et al*., 2011), mas este aumento não foi observado em fêmeas de *D.rerio* expostas ao ibuprofeno nas concentrações de 506 ug/L (MORTHORST et *al.*, 2013).

As alterações nos índices somáticos em alguns estudos com fármacos são acompanhadas por variações na concentração de esteroides gonadais, na expressão gênica de *vtg* e modificações patológicas no fígado e gônadas (JI *et al.*, 2013). Contudo, a exposição ao DFC e CAF não desencadeou tais respostas nos índices IVS, IHS e IGS, nos animais estudados no presente estudo, embora tenha sido observado um aumento no IGS nos animais do grupo DCF+CAF. Os dados dos índices demostraram que os animais expostos não apresentaram modificações significativas na estrutura dos tecidos hepático e testicular, fato que foi observado na histologia. O tecido hepático participa em inúmeros processos metabólicos na fisiologia dos peixes incluindo a fisiologia reprodutiva. As células hepáticas são responsáveis pela produção da Vtg, uma fosfolipoglicoproteina que em fêmeas é transportada pela corrente sanguínea até aos ovários onde é incorporada pelos folículos ovarianos (LUBZENS et al., 2010). As células de Leydig do tecido testicular são responsáveis pela produção de hormônios esteroides, que, por sua vez modulam os processos de espermatogênese e espermiogênese (SCHULZ *et al.*, 2010).

Nas análises histológicas não foram encontradas patologias com a exposição dos machos aos fármacos. Apesar das variações no perfil hormonal dos indivíduos, estas não desencadearam modificações estruturais nos tecidos estudados. Considerando que a histologia é uma ferramenta de monitoramento ambiental para os impactos de xenobióticos em fígado, brânquias, rins (STENTIFORD *et al.*, 2003) e em gônadas (BLAZER, 2002), faz-se necessária a sua utilização a fim de complementar os dados de biomarcadores de efeito aplicados no presente estudo. Recentemente foi considerada a possibilidade das histopatologias no tecido hepático afetarem a atividade endócrina em peixes, deste modo, alterando respostas de biomarcadores de efeito e de exposição como a Vtg (BAUMANN *et al.*, 2019). Todavia, a investigação não sustentou a hipótese inicial sendo portanto refutada, e os autores concluíram que dificilmente alterações histopatológicas apresentem uma correlação com a capacidade do tecido hepático em sintetizar vitelogenina.

5.7 Concentração espermática

No presente estudo, a concentração espermática não foi alterada tanto nos machos expostos aos fármacos DCF e CAF isoladamente quanto em conjunto. Na literatura é descrito que fármacos podem alterar a concentração de espermatozoides, como em machos de *Pimephales promelas* que expostos a 1 $mg.L^{-1}$ de ácido clofíbrico por 21 dias demonstraram redução na concentração espermática. A atividade antiandrogênica de fármacos em receptores de andrógenos (EZECHIÁŠ *et al.*, 2016) e alterações na expressão gênica de LH *(GRÖNER et al.,* 2017; JI *et al.*, 2013) tem sido estudada, no entanto, não sustenta os resultados da concentração espermática no presente estudo, ainda que os relatos na literatura descrevam que substâncias com um potencial antiandrogênico demonstram efeitos sobre a concentração espermática (BAYLEY; JUNGE; BAATRUP, 2002).

5.8 Misturas dos fármacos diclofenaco e cafeína

Os fármacos DCF e CAF aplicados de maneira conjunta demonstraram efeitos distintos quando comparado aos fármacos isolados. A exposição à mistura (DCF+CAF) não alterou as concentrações plasmáticas dos andrógenos T e 11-KT quando comparadas às concentrações do grupo CTL. Adicionalmente, não foram observadas alterações na concentração de E_2 nos animais do grupo DCF+CAF quando comparados aos animais do grupo CTL. Estes resultados refutam a hipótese inicial de que tais substâncias em conjunto apresentariam um efeito sinérgico, ou seja, um efeito tóxico potencializado pela mistura de ambas as substâncias alterando a concentração dos esteroides gonadais e e a expressão gênica da *vtg* e, consequentemente, desregulando o eixo HHG.

Sabe-se que as misturas evidenciam diferentes respostas fisiológicas nos organismos expostos, podendo reduzir, potencializar ou bloquear os efeitos de certas combinações de substâncias (ZAGATTO; BERTOLETTI, 2008). Os primeiros trabalhos descritos na literatura com os efeitos da mistura de fármacos (diclofenaco, ibuprofeno) foram aplicados em *Daphnia,* nos quais foi destacado o conceito de adição de concentração com o aumento de toxicidade e a necessidade de estudos envolvendo misturas de fármacos (CLEUVERS, 2004). Todavia, estudos recentes com misturas de

diferentes fármacos tem demonstrado variações nas respostas fisiológicas dos organismos em diferentes estágios de desenvolvimento. No caso de juvenis, fêmeas *Oncorhynchus mykiss* expostas à mistura de fármacos (paracetamol, carbamazepina, diclofenaco, irbesartana and naproxen) em concentrações ambientalmente relevantes, por 42 dias, demonstraram aumento na concentração de 11-KT e E_2, mas ausência de alterações na concentração de Vtg plasmática (SCHMITZ *et al.*, 2018). Similarmente, larvas de *D.rerio* expostas à concentrações ambientais de misturas de fármacos (cafeína, ibuprofeno, carbamazepina e tamoxifeno) não apresentaram alteração na expressão do gene *vtg*. No presente estudo não foram observadas alterações na expressão gênica da *vtgA* nos animais do grupo DCF+CAF , bem como dos grupos DCF e CAF isolados, quando comparado com o grupo CTL.

Os efeitos de misturas de xenobióticos na fisiologia reprodutiva de machos *A. altiparanae* já fora elucidado por Kida e colaboradores (2016) no qual os organismos foram expostos a combinação de metais (alumínio e manganês). O estudo observou que as misturas alteram as respostas dos hormônios, mas sem uma variação padrão, contrariamente às exposições isoladas que aumentaram a concentração dos andrógenos T e 11-KT. Na exposição aos fármacos DCF e CAF isolados, os machos *A. altiparanae* apresentaram uma redução na concentração plasmática da T e do E_2, ainda assim tal redução não foi observada na mistura como descrito nos experimentos com metais.

Nesta perspectiva, deve-se destacar que a ausência de efeitos no perfil normal dos machos expostos a mistura sugere que há um possível efeito antagônico dos fármacos quando administrados conjuntamente em comparação com a exposição ao DCF e CAF de maneira isolada. Segundo Groten e colaboradores (1999) o conceito de interação entre duas substâncias pode ser descrito para efeitos de aumento (sinergismo, potencialização, supra aditivo) ou para redução de efeito (antagonismo, subaditivo, inibição). Os autores ainda salientam que essas alterações podem ocorrer no metabolismo do animal, visto que, a toxicidade das substâncias pode variar consoante com as interações que se estabelecem com as vias metabólicas dos diferentes processos fisiológicos.

Os fármacos como o DCF e a CAF são substâncias que dispõe de mecanismos de ação específicos na fisiologia dos animais. Por um lado, o DCF é um anti-inflamatório não esteroidal (AINE) inibidor das COXs responsáveis pela conversão do ácido araquidônico em prostaglandinas sendo estas responsáveis pelos processos inflamatórios e de resposta imune nos tecidos (SCHOLER et al., 1986). Por outro lado a CAF atua como um estimulante do sistema nervoso e antagonista de receptores de adenosina (RIBEIRO; SEBASTIÃO, 2010). O grau de toxicidade de ambos os fármacos, observado nos ensaios de mortalidade com *A. altiparanae*, demonstra que é necessário uma menor concentração de DCF do que CAF para levar 50% dos indivíduos a óbito. Em vista disso, o resultado pressupõe que em um primeiro momento, a farmacologia do composto pode influenciar na variabilidade da toxicidade do mesmo interferindo no metabolismo e nas respostas fisiológicas às misturas.

Apesar de na literatura ser descrito o potencial de desregulação endócrina do DCF (GRÖNER; ZIKOVÁ; KLOAS, 2015) e CAF (LI et al., 2012) através da alteração na expressão de *vtg*, os resultados não sustentam esta resposta na espécie estudada. Adicionalmente, não houve alterações na estrutura dos tecidos quando expostos aos fármacos isoladamente e na forma de mistura, deixando evidente que é importante salientar que os sucessivos estudos com as misturas de substâncias farmacêuticas resultam em diferentes resultados nas avaliações toxicológicas, o que pode ser decorrente da carência de dados e/ou falta de padronizações em protocolos experimentais. A maior parte dos estudos apresentam efeitos dos fármacos aplicados isoladamente, assim sendo, as misturas apresentam um potencial a ser analisado para futuras avaliações de risco ambiental (VASQUEZ *et al*., 2014).

6. Conclusões

Com base nos resultados obtidos a hipótese do presente estudo foi refutada. Apesar dos efeitos dos fármacos na concentração plasmática de esteroides nos machos de *A altiparanae*, o efeito de sinergia por uma possível combinação de fármacos (DCF+CAF) não foi observado. Deste modo, destaca-se as seguintes conclusões:

-Considerando-se a mortalidade, concluímos que a toxicicidade do DCF é mais elevada do que da CAF em *Astyanax altiparanae;*

-A exposição aguda ao DCF e à CAF, de forma isolada, reduziu a concentração plasmática de E_2 nos machos de *A. altiparanae*;

-A exposição aguda ao DCF reduziu a concentração plasmática da testosterona nos machos de *A. altiparanae;*

-A mistura de ambos os fármacos não alterou o perfil hormonal dos esteroides nos machos de *A. altiparanae*, sugerindo um efeito antagônico quando ambos foram misturados;

-A expressão gênica da *vtgA* não foi alterada nos grupos expostos aos fármacos, sugerindo que nas condições experimentais deste trabalho estes fármacos não possuem ação estrogênica;

7. Referências bibliográficas

ABDALLA, R. P. et al. Exposure to aluminum, aluminum + manganese and acid pH triggers different antioxidant responses in gills and liver of *Astyanax altiparanae* (Teleostei: Characiformes: Characidae) males. **Comparative Biochemistry and Physiology Part - C: Toxicology and Pharmacology**, v. 215, p. 33–40, jan. 2019.

AGUIRRE-MARTÍNEZ, G. V.; DELVALLS, A. T.; LAURA MARTÍN-DÍAZ, M. Yes, caffeine, ibuprofen, carbamazepine, novobiocin and tamoxifen have an effect on *Corbicula fluminea* (Müller, 1774). **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 120, p. 142–154, 2015.

ANKLEY, G. T. et al. Endocrine disrupting chemicals in fish: Developing exposure indicators and predictive models of effects based on mechanism of action. **Aquatic Toxicology**, v. 92, n. 3, p. 168–178, 2009.

ARNOLD, K. E. et al. Medicating the environment: Assessing risks of pharmaceuticals to wildlife and ecosystems. **Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 369, n. 1656, 2014.

AUS DER BEEK, T. et al. Pharmaceuticals in the environment-Global occurrences and perspectives. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 35, n. 4, p. 823–835, 2016.

BAUMANN, L. et al. Does hepatotoxicity interfere with endocrine activity in zebrafish (*Danio rerio*)? **Chemosphere**, p. 124589, 2019.

BAYLEY, M.; JUNGE, M.; BAATRUP, E. Exposure of juvenile guppies to three antiandrogens causes demasculinization and a reduced sperm count in adult males. **Aquatic Toxicology**, v. 56, n. 4, p. 227–239, mar. 2002.

BECHMANN, R. K. Use of life tables and lc50 tests to evaluate chronic and acute toxicity effects of copper on the marine copepod tisbe furcata (baird). **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 13, n. 9, p. 1509–1517, 1994.

BLAZER, V. S. **Histopathological assessment of gonadal tissue in wild fishesFish Physiology and Biochemistry**, 2002.

BOLGER, T.; CONNOLLY, P. L. The selection of suitable indices for the measurement and analysis of fish condition. **Journal of Fish Biology**, v. 34, n. 2, p. 171–182, 1989.

BONNEFILLE, B. et al. Diclofenac in the marine environment: A review of its occurrence and effects. **Marine Pollution Bulletin**, v. 131, p. 496–506, 2018.

BRAMBILA-SOUZA, G. et al. Thermal manipulation and GnRHa therapy applied to the reproduction of lambari-do-rabo-amarelo, *Astyanax altiparanae* females (Characiformes: Characidae)during the non-breeding season. **General and Comparative Endocrinology**, v. 279, p. 120–128, 2019.

BUERGE, I. J. et al. Caffeine, an anthropogenic marker for wastewater contamination of surface waters. **Environmental Science and Technology**, v. 37, n. 4, p. 691–700, 2003.

CAIRNS, J.; PRATT, J. R. The scientific basis of bioassays. **Environmental bioassay techniques and their application. Proc. conference, Lancaster, 1988**, p. 5–20, 1990.

CARNEVALI, O. et al. Endocrine-disrupting chemicals in aquatic environment: what are the risks for fish gametes? **Fish Physiology and Biochemistry**, p. 1–16, 2018.

CHAPMAN, P. M. Integrating toxicology and ecology: Putting the "eco" into ecotoxicology. **Marine Pollution Bulletin**, v. 44, n. 1, p. 7–15, 2002.

CLEUVERS, M. Aquatic ecotoxicity of pharmaceuticals including the assessment of combination effects. **Toxicology Letters**, v. 142, n. 3, p. 185–194, 2003.

CLEUVERS, M. Mixture toxicity of the anti-inflammatory drugs diclofenac, ibuprofen, naproxen, and acetylsalicylic acid. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 59, n. 3, p. 309–315, 2004.

COHEN, J. E. Population growth and earth's human carrying capacity. **Science**, v. 269, p. 341–346, 1995.

COLE, M. et al. Microplastics as contaminants in the marine environment: A review. **Marine Pollution Bulletin**, v. 62, n. 12, p. 2588–2597, dez. 2011.

COURANT, F. et al. Exposure of marine mussels to diclofenac: modulation of prostaglandin biosynthesis. **Environmental Science and Pollution Research**, p. 1–8, 2017.

CRUZ, D. et al. Caffeine impacts in the clam Ruditapes philippinarum: Alterations on energy reserves, metabolic activity and oxidative stress biomarkers. **Chemosphere**, v. 160, p. 95–103, 2016.

DEBLONDE, T.; COSSU-LEGUILLE, C. Emerging pollutants in wastewater: A review of the literature. **International Journal of Hygiene and Environmental Health**, v. 214, n. 6, p. 442–448, 2011.

EFOSA, N. J. et al. Diclofenac can exhibit estrogenic modes of action in male *Xenopus laevis*, and affects the hypothalamus-pituitary-gonad axis and mating vocalizations. **Chemosphere**, v. 173, p. 69–77, 2017.

EZECHIÁŠ, M. et al. Widely used pharmaceuticals present in the environment revealed as in vitro antagonists for human estrogen and androgen receptors. **Chemosphere**, v. 152, p. 284–291, 2016.

FENT, K.; WESTON, A. A. .; CAMINADA, D. Ecotoxicology of human pharmaceuticals. **Aquatic Toxicology**, v. 76, n. 2, p. 122–159, 2006.

FERNANDES, D.; SCHNELL, S.; PORTE, C. Can pharmaceuticals interfere with the synthesis of active androgens in male fish? An in vitro study. **Marine Pollution Bulletin**, v. 62, n. 10, p. 2250–2253, out. 2011.

FINNEY, D. J. Probit Analysis. **The Statistician**, v. 78, n. 3, p. 388–390, 1952.

FINNEY, D. J. The median lethal dose and its estimation. **Archives of Toxicology**, v. 56, n. 4, p. 215–218, 1985.

FLEEGER, J. W.; CARMAN, K. R.; NISBET, R. M. Indirect effects of contaminants in aquatic

ecosystems. **Science of the Total Environment**, v. 317, n. 1–3, p. 207–233, 2003.

FLIPPIN, J. L.; HUGGETT, D.; FORAN, C. M. Changes in the timing of reproduction following chronic exposure to ibuprofen in Japanese medaka, *Oryzias latipes*. **Aquatic Toxicology**, v. 81, n. 1, p. 73–78, 2007.

FLOREA, A. M.; BÜSSELBERG, D. **Occurrence, use and potential toxic effects of metals and metal compoundsBioMetals**, 2006.

FORNER-PIQUER, I. et al. Endocrine disruptors in the diet of male *Sparus aurata*: Modulation of the endocannabinoid system at the hepatic and central level by Di-isononyl phthalate and Bisphenol A. **Environment International**, v. 119, p. 54–65, 2018.

GERLAND, P. et al. World population stabilization unlikely this century. **Science**, v. 346, n. 6206, p. 229–234, 2014.

GETOFF, N. Factors influencing the efficiency of radiation-induced degradation of water pollutants. **Radiation Physics and Chemistry**, v. 65, n. 4–5, p. 437–446, 2002.

GHELFI, A. et al. Evaluation of Biochemical, Genetic and Hematological Biomarkers in a Commercial Catfish *Rhamdia quelen* Exposed to Diclofenac. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 96, n. 1, p. 49–54, 2016.

GOMES, A. D. et al. Fatty Acid Composition of Tropical Fish Depends on Reservoir Trophic Status and Fish Feeding Habit. **Lipids**, v. 51, p. 1193–1206, 2016.

GONÇALVES, L. U. et al. The fatty acid compositions of total, neutral and polar lipids in wild and farmed lambari (*Astyanax altiparanae*) (Garutti & Britski, 2000) broodstock. **Aquaculture Research**, v. 45, n. 2, p. 195–203, 2014.

GRÖNER, F. et al. Chronic diclofenac exposure affects gill integrity and pituitary gene expression and displays estrogenic activity in nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). **Chemosphere**, v. 166, p. 473–481, 2017.

GRÖNER, F.; ZIKOVÁ, A.; KLOAS, W. Effects of the pharmaceuticals diclofenac and metoprolol on gene expression levels of enzymes of biotransformation, excretion pathways and estrogenicity in primary hepatocytes of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). **Comparative Biochemistry and Physiology Part - C: Toxicology and Pharmacology**, v. 167, p. 51–57, 1 jan. 2015.

GROTEN, J. P. et al. Mixtures. In: **Toxicology**. Academic Press, 1999. p. 257–270.

GUILOSKI, I. C. et al. Effects of trophic exposure to dexamethasone and diclofenac in freshwater fish. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 114, p. 204–211, 2015.

HAAP, T.; TRIEBSKORN, R.; KÖHLER, H. R. Acute effects of diclofenac and DMSO to *Daphnia magna*: Immobilisation and hsp70-induction. **Chemosphere**, v. 73, n. 3, p. 353–359, set. 2008.

HALLING-SORENSEN, B. et al. Occurence, fate and effects of pharmaceuticals substance in the environment - A review. **Chemosphere**, v. 36, n. 2, p. 357–393, 1998.

HAN, S. et al. Endocrine disruption and consequences of chronic exposure to ibuprofen in Japanese medaka (*Oryzias latipes*) and freshwater cladocerans *Daphnia magna* and

Moina macrocopa. **Aquatic Toxicology**, v. 98, n. 3, p. 256–264, 2010.

HANSEN, P. D. et al. Vitellogenin - A biomarker for endocrine disruptors. **TrAC - Trends in Analytical Chemistry**, v. 17, n. 7, p. 448–451, 1998.

HEBERER, T. Occurrence, fate, and removal of pharmaceutical residues in the aquatic environment: a review of recent research data. **Toxicology letters**, v. 131, p. 5–17, 2002.

HOEGER, B. et al. Water-borne diclofenac affects kidney and gill integrity and selected immune parameters in brown trout (*Salmo trutta f. fario*). **Aquatic Toxicology**, v. 75, n. 1, p. 53–64, 2005.

HONG, H. N. et al. Analysis of the effects diclofenac has on Japanese medaka (*Oryzias latipes*) using real-time PCR. **Chemosphere**, v. 67, n. 11, p. 2115–21, 2007.

HOOK, S. E.; GALLAGHER, E. P.; BATLEY, G. E. The role of biomarkers in the assessment of aquatic ecosystem health. **Integrated Environmental Assessment and Management**, v. 10, n. 3, p. 327–341, 2014.

HUGHES, S. R.; KAY, P.; BROWN, L. E. **Global synthesis and critical evaluation of pharmaceutical data sets collected from river systemsEnvironmental Science and Technology**, 2013.

ISLAM, M. S.; TANAKA, M. Impacts of pollution on coastal and marine ecosystems including coastal and marine fisheries and approach for management: A review and synthesis. **Marine Pollution Bulletin**, v. 48, n. 7–8, p. 624–649, 2004.

ISLAS-FLORES, H. et al. Diclofenac-induced oxidative stress in brain, liver, gill and blood of common carp (*Cyprinus carpio*). **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 92, p. 32–38, 2013.

JI, K. et al. Effects of non-steroidal anti-inflammatory drugs on hormones and genes of the hypothalamic-pituitary-gonad axis, and reproduction of zebrafish. **Journal of Hazardous Materials**, v. 254–255, n. 1, p. 242–251, 2013.

JOHNSON-RESTREPO, B. et al. Polycyclic aromatic hydrocarbons and their hydroxylated metabolites in fish bile and sediments from coastal waters of Colombia. **Environmental pollution (Barking, Essex : 1987)**, v. 151, n. 3, p. 452–9, fev. 2008.

KALLIO, J. M. et al. Metabolites of the aquatic pollutant diclofenac in fish bile. **Environmental Science and Technology**, v. 44, n. 19, p. 7213–7219, 2010.

KAVLOCK, R. J. et al. **Research needs for the risk assessment of health and environmental effects of endocrine disrupters: A report of the U.S. EPA-sponsored workshopEnvironmental Health Perspectives**, 1996.

KIDA, B. M. S.; ABDALLA, R. P.; MOREIRA, R. G. Effects of acidic water, aluminum, and manganese on testicular steroidogenesis in *Astyanax altiparanae*. **Fish Physiology and Biochemistry**, v. 42, n. 5, p. 1347–1356, 2016.

KIME, D. E. The effects of pollution on reproduction in fish. **Reviews in Fish Biology and Fisheries**, v. 5, n. 1, p. 52–95, 1995.

KIME, D. E. A strategy for assessing the effects of xenobiotics on fish reproduction.

Science of the Total Environment, v. 225, n. 1–2, p. 3–11, 1999.

LAM, M. W. et al. Aquatic persistence of eight pharmaceuticals in a microcosm study. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 23, n. 6, p. 1431–1440, 2004.

LEE, J. et al. Chronic exposure to diclofenac on two freshwater cladocerans and Japanese medaka. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 74, n. 5, p. 1216–1225, 2011.

LEVAVI-SIVAN, B. et al. Perspectives on fish gonadotropins and their receptors. **General and Comparative Endocrinology**, v. 165, n. 3, p. 412–437, 2010.

LI, Z. et al. Single and combined effects of selected pharmaceuticals at sublethal concentrations on multiple biomarkers in *Carassius auratus*. **Ecotoxicology**, v. 21, n. 2, p. 353–361, 2012.

LIANG, Y. et al. Distribution patterns of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in the sediments and fish at Mai Po Marshes Nature Reserve, Hong Kong. **Water research**, v. 41, n. 6, p. 1303–11, mar. 2007.

LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN, T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2-ΔΔCT method. **Methods**, v. 25, n. 4, p. 402–408, 2001.

LLINÀS, A. et al. Diclofenac solubility: Independent determination of the intrinsic solubility of three crystal forms. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 50, n. 5, p. 979–983, 2007.

LONAPPAN, L. et al. Diclofenac and its transformation products: Environmental occurrence and toxicity - A review. **Environment International**, v. 96, p. 127–138, 2016.

LUBZENS, E. et al. Oogenesis in teleosts: How fish eggs are formed. **General and Comparative Endocrinology**, v. 165, n. 3, p. 367–389, 2010.

LUCENA, C. A. S.; SOARES, H. G. **Review of species of the Astyanax bimaculatus "caudal peduncle spot" subgroup sensu Garutti & Langeani (Characiformes, Characidae) from the rio la Plata and rio São Francisco drainages and coastal systems of southern Brazil and UruguayZootaxa** Magnolia Press, , 28 jan. 2016.

LUO, Y. et al. A review on the occurrence of micropollutants in the aquatic environment and their fate and removal during wastewater treatment. **Science of the Total Environment, The**, v. 473–474, p. 619–641, 2014.

MACHADO, K. C. et al. A preliminary nationwide survey of the presence of emerging contaminants in drinking and source waters in Brazil. **Science of the Total Environment**, v. 572, p. 138–146, 2016.

MARQUES, R. R. N. et al. Photocatalytic degradation of caffeine: Developing solutions for emerging pollutants. **Catalysis Today**, v. 209, p. 108–115, 2013.

MARTINEZ-HARO, M. et al. A review on the ecological quality status assessment in aquatic systems using community based indicators and ecotoxicological tools: What might be the added value of their combination? **Ecological Indicators**, v. 48, p. 8–16, 2015.

MONTAGNER, C. et al. Ten Years-Snapshot of the Occurrence of Emerging Contaminants

in Drinking, Surface and Ground Waters and Wastewaters from São Paulo State, Brazil. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 30, n. 3, p. 614–632, 2018.

MONTAGNER, C. C. et al. Caffeine as an indicator of estrogenic activity in source waters. **Environmental Science: Processes & Impacts**, v. 16, n. 8, p. 1866–1869, 2014.

MOORE, M. T. et al. Assessing caffeine as an emerging environmental concern using conventional approaches. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 54, n. 1, p. 31–35, 2008.

MORTHORST, J. E. et al. Ibuprofen reduces zebrafish PGE2 levels but steroid hormone levels and reproductive parameters are not affected. **Comparative Biochemistry and Physiology - C Toxicology and Pharmacology**, v. 157, n. 2, p. 251–257, 2013.

MURRAY, K. E.; THOMAS, S. M.; BODOUR, A. A. Prioritizing research for trace pollutants and emerging contaminants in the freshwater environment. **Environmental Pollution**, v. 158, n. 12, p. 3462–3471, 2010.

MYLONAS, C. C.; FOSTIER, A.; ZANUY, S. Broodstock management and hormonal manipulations of fish reproduction. **General and Comparative Endocrinology**, 2010.

NAGAHAMA, Y. Endocrine regulation of gametogenesis in fish. **International Journal of Developmental Biology**, v. 38, n. 2, p. 217–229, 1994.

NÄSLUND, J. et al. Diclofenac affects kidney histology in the three-spined stickleback (*Gasterosteus aculeatus*) at low µg/L concentrations. **Aquatic Toxicology**, v. 189, p. 87–96, ago. 2017.

NASSEF, M. et al. Pharmaceuticals and personal care products toxicity to Japanese medaka fish (*Oryzias latipes*). **Journal of the Faculty of Agriculture, Kyushu University**, v. 54, n. 2, p. 407–411, 2009.

NCR. **RESOLUÇÃO NORMATIVA Nº 44 DO CONSELHO NACIONAL DE CONTROLE DE EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL**. 2019

ORSI, M. L.; CARVALHO, E. D.; FORESTI, F. Biologia populacional de *Astyanax altiparanae* Garutti & Britski (Teleostei, Characidae) do médio Rio Paranapanema, Paraná, Brasil. **Revista Brasileira de Zoologia**, v. 21, n. 1998, p. 207–218, 2004.

OVERTURF, M. D. et al. Pharmaceuticals and personal care products: A critical review of the impacts on fish reproduction. **Critical Reviews in Toxicology**, v. 45, n. 6, p. 469–491, 2015.

PAL, A. et al. Impacts of emerging organic contaminants on freshwater resources: Review of recent occurrences, sources, fate and effects. **Science of the Total Environment**, v. 408, n. 24, p. 6062–6069, 2010.

PANDEY, P. K. et al. Evaluation of DNA damage and physiological responses in Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* (Linnaeus, 1758) exposed to sub-lethal diclofenac (DCF). **Aquatic Toxicology**, v. 186, p. 205–214, 2017.

PEREIRA, C. D. S. et al. Occurrence of pharmaceuticals and cocaine in a Brazilian coastal zone. **Science of the Total Environment**, v. 548–549, p. 148–154, abr. 2016.

PEREIRA, L. C. et al. A perspective on the potential risks of emerging contaminants to human and environmental health. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 22, n. 18, p. 13800–13823, 2015.

PINHEIRO, J. P. S. et al. Water temperature and acid pH influence the cytotoxic and genotoxic effects of aluminum in the freshwater teleost *Astyanax altiparanae* (Teleostei: Characidae). **Chemosphere**, p. 266–274, 2019.

PRASKOVA, E. et al. Assessment of diclofenac LC50 reference values in juvenile and embryonic stages of the zebrafish (*Danio rerio*). **Polish Journal of Veterinary Sciences**, v. 14, n. 4, p. 545–549, 2011.

QUADRA, G. R. et al. Do pharmaceuticals reach and affect the aquatic ecosystems in Brazil? A critical review of current studies in a developing country. **Environmental Science and Pollution Research**, p. 1–19, 2017.

QUADRA, G. R. et al. Investigation of medicines consumption and disposal in Brazil: A study case in a developing country. **Science of the Total Environment**, v. 671, p. 505–509, mar. 2019.

QUINTERO-HUNTER, ILIANA; GRIER, H.; MUSCATO, M. QUINTERO-HUNTER, Iliana; GRIER, Harry; MUSCATO, Marilou. Enhancement of histological detail using metanil yellow as counterstain in periodic acid Schiff's hematoxylin staining of glycol methacrylate tissue sections. **Biotechnic & Histochemistry**, v. 66, p. 169–172, 1991.

REIS, R. E.; KULLANDER, S. O.; FERRARIS, C. J. **Checklist of the Freshwater Fishes of South and Central America**. Porto Alegre: EDIPUCRS, 2003.

RIBEIRO, A. R. et al. An overview on the advanced oxidation processes applied for the treatment of water pollutants defined in the recently launched Directive 2013/39/EU. **Environment International**, v. 75, p. 33–51, 2015.

RIBEIRO, J. A.; SEBASTIÃO, A. M. **Caffeine and adenosine**. Journal of Alzheimer's Disease. **Anais**...2010

RIBEIRO, J. A.; SEBASTIÃO, A. M.; DE MENDONÇA, A. Adenosine receptors in the nervous system: Pathophysiological implications. **Progress in Neurobiology**, v. 68, n. 6, p. 377–392, 2002.

SAKAMOTO, M. K. et al. Developmental toxicity of caffeine in the larvae of *Xenopus laevis*. **Teratology**, v. 47, n. 3, p. 189–201, 1993.

SANCHES, E. A. et al. Revista Brasileira de Zootecnia Estimativa da concentração espermática do sêmen de peixe pelo método de espermatócrito Sperm concentration estimate of fish semen using spermatocrit method. **Revista Brasileira De Zootecnia**, p. 1163–1167, 2011.

SANTOS-SILVA, T. G.; MONTAGNER, C. C.; MARTINEZ, C. B. R. Evaluation of caffeine effects on biochemical and genotoxic biomarkers in the neotropical freshwater teleost *Prochilodus lineatus*. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 58, n. November 2017, p. 237–242, 2018.

SAUCEDO-VENCE, K. et al. Short and long-term exposure to diclofenac alter oxidative

stress status in common carp *Cyprinus carpio*. **Ecotoxicology**, v. 24, n. 3, p. 527–539, 2015.

SCHMITZ, M. et al. Environmentally-relevant mixture of pharmaceutical drugs stimulates sex-steroid hormone production and modulates the expression of candidate genes in the ovary of juvenile female rainbow trout. **Aquatic Toxicology**, v. 205, p. 89–99, 2018.

SCHOLER, D. W. et al. Pharmacology of diclofenac sodium. **The American Journal of Medicine**, v. 80, n. 4 SUPPL. 2, p. 34–38, 1986.

SCHULZ, R. W. et al. Spermatogenesis in fish. **General and Comparative Endocrinology**, v. 165, n. 3, p. 390–411, 2010.

SCHULZ, R. W.; MIURA, T. **Spermatogenesis and its endocrine regulationFish Physiology and Biochemistry**, 2002.

SCHWARZENBACH, R. P. et al. **Global hydrological cycles and world water resourcesScience**, 25 ago. 2006.

SCOTT, G. R.; SLOMAN, K. A. The effects of environmental pollutants on complex fish behaviour: integrating behavioural and physiological indicators of toxicity. **Aquatic Toxicology**, v. 68, n. 4, p. 369–392, jul. 2004.

SINK, T. D.; LOCHMANN, R. T.; FECTEAU, K. A. Validation, use, and disadvantages of enzyme-linked immunosorbent assay kits for detection of cortisol in channel catfish, largemouth bass, red pacu, and golden shiners. **Fish Physiology and Biochemistry**, v. 34, n. 1, p. 95–101, 2008.

STENTIFORD, G. D. et al. Histopathological biomarkers in estuarine fish species for the assessment of biological effects of contaminants. **Marine Environmental Research**, v. 55, n. 2, p. 137–159, mar. 2003.

SUMPTER, J. P.; JOBLING, S. Vitellogenesis as a biomarker for estrogenic contamination of the aquatic environment. **Environmental Health Perspectives**, v. 103, n. SUPPL. 7, p. 173–178, 1995.

TOLUSSI, C. E. **Influência antrópica no ambiente aquático sobre os processos fisiológicos associados à maturação oocitária em peixes teleósteos**. Tese (Doutorado em Fisiologia Geral) - Instituto de Biociências Universidade de São Paulo, 2016.

TOLUSSI, C. E. et al. Environmental pollution affects molecular and biochemical responses during gonadal maturation of *Astyanax fasciatus* (Teleostei: Characiformes: Characidae). **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 147, p. 926–934, 2018.

VAN DER KRAAK, G.; CHANG, J. P. Arachidonic acid stimulates steroidogenesis in goldfish preovulatory ovarian follicles. **General and Comparative Endocrinology**, v. 77, n. 2, p. 221–228, 1990.

VAN DER OOST, R.; BEYER, J.; VERMEULEN, N. P. . Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: A review. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 13, n. 2, p. 57–149, 2003.

VASQUEZ, M. I. et al. Environmental side effects of pharmaceutical cocktails: What we

know and what we should know. **Journal of Hazardous Materials**, v. 279, p. 169–189, ago. 2014.

VAZZOLER, A. . E. A. M. **Biologia da Reprodução de peixes teleósteos: teoria e prática**. Maringá: EDUEM, 1996.

VERENITCH, S. S.; MAZUMDER, A. Development of a methodology utilizing gas chromatography ion-trap tandem mass spectrometry for the determination of low levels of caffeine in surface marine and freshwater samples. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 391, n. 7, p. 2635–2646, 2008.

VIENO, N.; SILLANPÄÄ, M. **Fate of diclofenac in municipal wastewater treatment plant - A reviewEnvironment International**, 2014.

VILELLA, F. S.; BECKER, F. G.; HARTZ, S. M. Diet of *Astyanax* species (Teleostei, Characidae) in an Atlantic Forest River in Southern Brazil. **Brazilian Archives Of Biology And Technology**, v. 45, n. 2, p. 223–232, 2002.

VÖRÖSMARTY, C. J. et al. Global threats to human water security and river biodiversity. **Nature**, v. 467, n. 7315, p. 555–561, 2010.

WAGNER, M. et al. Microplastics in freshwater ecosystems: what we know and what we need to know. **Environmental Sciences Europe**, v. 26, n. 1, p. 1–9, 1 dez. 2014.

WEBER, A. A. et al. Environmental exposure to oestrogenic endocrine disruptors mixtures reflecting on gonadal sex steroids and gametogenesis of the neotropical fish *Astyanax rivularis*. **General and Comparative Endocrinology**, v. 279, p. 99–108, ago. 2019.

WIKELSKI, M.; COOKE, S. J. Conservation physiology. **Trends in Ecology & Evolution**, v. 21, n. 1, p. 38–46, 2006.

ZAGATTO, P. A.; BERTOLETTI, E. **Ecotoxicologia aquática: princípios e aplicações**. São Carlos: Rima, 2008.

ZOHAR, Y. et al. Neuroendocrinology of reproduction in teleost fish. **General and Comparative Endocrinology**, v. 165, n. 3, p. 438–455, 2010.