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

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

RESUMO

A contaminação dos ecossistemas aquáticos por poluentes sintéticos produzidos pelas atividades humanas tem impactado o equilíbrio ambiental global. O crescimento e envelhecimento populacional tem aumentado o consumo de compostos farmacêuticos, como diclofenaco (DCF) e cafeína (CAF), hegemonicamente presentes e persistentes nos ambientes aquáticos. A preocupação emergente de tais compostos se baseia nos efeitos sobre a fisiologia reprodutiva de organismos aquáticos, bem como a ocorrência dos mesmos na forma de misturas. 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 social, sendo um dos modelos biológicos mais utilizados em estudos ecotoxicológicos. Inicialmente foi analisado o decaimento (concentração real) de DCF e CAF, que foi de 5% do valor inicial no período de 24 horas e em seguida foi realizada o teste de detecção de alcance, do inglês *Range Finding Test* (RFT). A concentração média letal (CL_{50}) do DCF e CAF encontrados para o modelo biológico 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 (3,08 $mg.L^{-1}$) 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 redução da concentração de testoterona (T) quando expostos ao DCF e não foram observadas diferenças na concentração plasmática de 11 cetotestosternoa (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 concentração espermática. Os animais também não apresentaram alterações histológicas no fígado e nos testículos durante a exposição aguda. O presente estudo demonstrou que os fármacos isolados afetaram a concentração de esteroides gonadais em machos de *A. altiparanae*, mas quando expostos em conjunto este efeito não foi observado. O DCF e a CAF tanto isolados quanto misturados em uma exposição aguda não foram capazes de induzir a expressão gênica de *vtg*, além de não alterar a concentração espermática e modificar a estrutura

do fígado e testículos. Considerando a presença de misturas nos ambientes 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 dos fármacos, na fisiologia reprodutiva de peixes, podem ser ocultos pelas misturas.

Abstract

The contamination of the aquatic ecosystems caused by anthropogenic pollutants has enhanced the disturbance of the environment balance in a global scale. The overgrowing population and ageing increase the pharmaceuticals consumption, like diclofenac (DCF) and caffeine (CAF) characterized by the ubiquitous presence and persistence in the aquatic environments. The emerging concern behind these compounds is based on the pharmaceuticals mixtures that occur in the environment and the effects of these substances in the reproductive physiology of 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 mgL^{-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 mgL^{-1} e 30,8 mgL^{-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 (3,08 $mg.L^{-1}$) 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 impact hormone profile. 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.

1. Introdução

1.1 Considerações sobre os estudos na problemática da poluição ambiental

Durante os recentes séculos, o crescimento da civilização humana foi possibilitado, principalmente, pelo desenvolvimento de novas tecnologias a fim de suprir as necessidades básicas de sobrevivência dos seres humanos. Esta realidade foi observada com o culminar da revolução industrial no final do século XIX possibilitando o aumento na produção dos bens de consumo industriais e domésticos que, por sua vez, permitiram o crescimento exponencial da população humana mundial (COHEN, 1995). 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 biliões à 12 biliões de indivíduos (GERLAND *et al*., 2014).

O crescimento populacional acentuado implica no aumento das atividades humanas extrativistas de matéria primas, produção de bens e o constante descarte inadequado de resíduos que acarretam em uma constante inserção de substâncias desconhecidas no meio ambiente levando a um processo de poluição do solo, da água e do ar (ISLAM; TANAKA, 2004). Neste contexto, estudos científicos salientam que o crescimento no consumo 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 compostos tóxicos encontrados no ambiente alteram o equilíbrio dinâmico das populações naturais, induzindo a processos de bioacumulação e biomagnificação na cadeia trófica, ampliando os efeitos deletérios de tais substâncias em longo prazo em diversos níveis biológicos e, consequentemente, levando à redução da biodiversidade das espécies (VAN DER OOST; BEYER; VERMEULEN, 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, *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 dos efeitos toxicológicos de compostos de origem antropogênica no equilíbrio ecológico dos diferentes níveis de organização biológica, tem como base a utilização de diferentes biomarcadores que englobam o nível molecular, bioquímico, histológico, sistêmico e populacional (ZAGATTO; BERTOLETTI, 2008). Neste sentido, a ecotoxicologia oferece as ferramentas necessárias para avaliar os impactos da poluição na biota e, posteriormente, o desenvolvimento de políticas ambientais de forma a proteger e mitigar os potenciais danos de xenobióticos à saúde humana e ambiental (CHAPMAN, 1995).

No contexto dos estudos toxicológicos diferentes métodos são aplicados a fim de avaliar os riscos de determinadas substâncias para a biota e comumente são utilizados biomarcadores que podem ser classificados em exposição e efeito. Os biomarcadores de exposição contemplam a utilização de moléculas que respondem especificamente a um tipo e 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).

Tendo em vista as atuais projeções populacionais e os impactos ambientais e sociais observados, coloca-se a necessidade de constantes discussões políticas ambientais e econômicas, além de estudos ambientais por todo o mundo a fim de promover soluções eficazes para o desenvolvimento sustentável das comunidades (WATTS; ADGER; AGNOLUCCI, 2015).

1.2. O cenário atual dos contaminantes de preocupação emergentes

Na literatura, os dados resultantes das pesquisas sobre a temática da contaminação ambiental em diferentes matrizes demonstram que grande parte dos resíduos que chegam as 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. Nas investigações tem sido elucidado a presença de metais (FLOREA; BÜSSELBERG, 2006), hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (PAHs) (LIANG *et al*., 2007), pesticidas (PEREIRA et al., 2015), microplásticos (WAGNER *et al*., 2014) e compostos farmacêuticos (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 desequilíbrios na fisiologia 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 e de efeitos desconhecidos sobre a saúde ambiental e com a falta políticas regulatórias (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 desconhecidos (PEREIRA *et al*., 2015). Os contaminantes emergentes em sua grande maioria são grupos de substâncias que incluem pesticidas aplicados na agricultura, fitalatos utilizados em

produtos plásticos e compostos farmacêuticos aplicados nos tratamentos de doenças humanas e de animais domésticos (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 encontrados mais de 50 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 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 de resíduos sólidos hopitalares que contenham medicamentos são apenas contemplados pela resolução CONAMA 358/2005 e,portanto, não há uma legislação específica do discarte 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 já que não são estabelecidos limites para estes compostos nos ambientes aquáticos (QUADRA et al., 2017).

Além do crescimento populacional já referido na problemática da contaminação ambiental, 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).

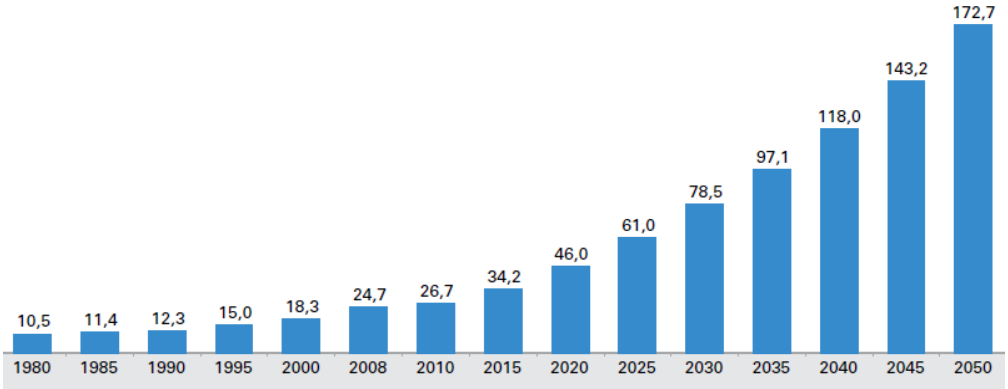

Figura 1. Razão entre o número de idosos com mais de 65 anos para cada 100 jovens com menos de 14 anos. Fonte IBGE (2008).

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). Um estudo recente 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; WESTON; CAMINADA, 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; KAY; BROWN, 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), histopatologias no rim de peixes (NÄSLUND *et al.*, 2017). Além do DCF, outros antiinflamatórios não esteroidais, como o ibuprofeno, alterou o tempo de reprodução de peixes reduzindo o número de eventos de desova, quando expostos às concentrações 0,1 mgL^{-1} por 6 semanas (FLIPPIN; HUGGETT; FORAN, 2007).

Além do diclofenaco, a cafeína (CAF), um estimulante do sistema nervoso central, é também encontrada em águas superficiais (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) e, pode ser um indicador de atividade estrogênica (Montagner *et al.* 2014).

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 (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 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 e com algumas exceções apresentam similarmente um controle fisiológico da reprodução composto 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 (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). Os estímulos são recebidos pelo hipotálamo, onde em corpos celulares de neurônios é sintetizado o hormônio liberador de gonadotropinas (GnRH), e 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 modula os receptores de estradiol (ER) do fígado induzindo a expressão do gene *vtg* e, posteriormente, a síntese de Vtg para ser incorparada pelos oócito das fêmeas (LUBZENS *et al.*, 2010).

Os estímulos externos são integrados e as respostas internas do eixo HHG apresentam ainda uma 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).

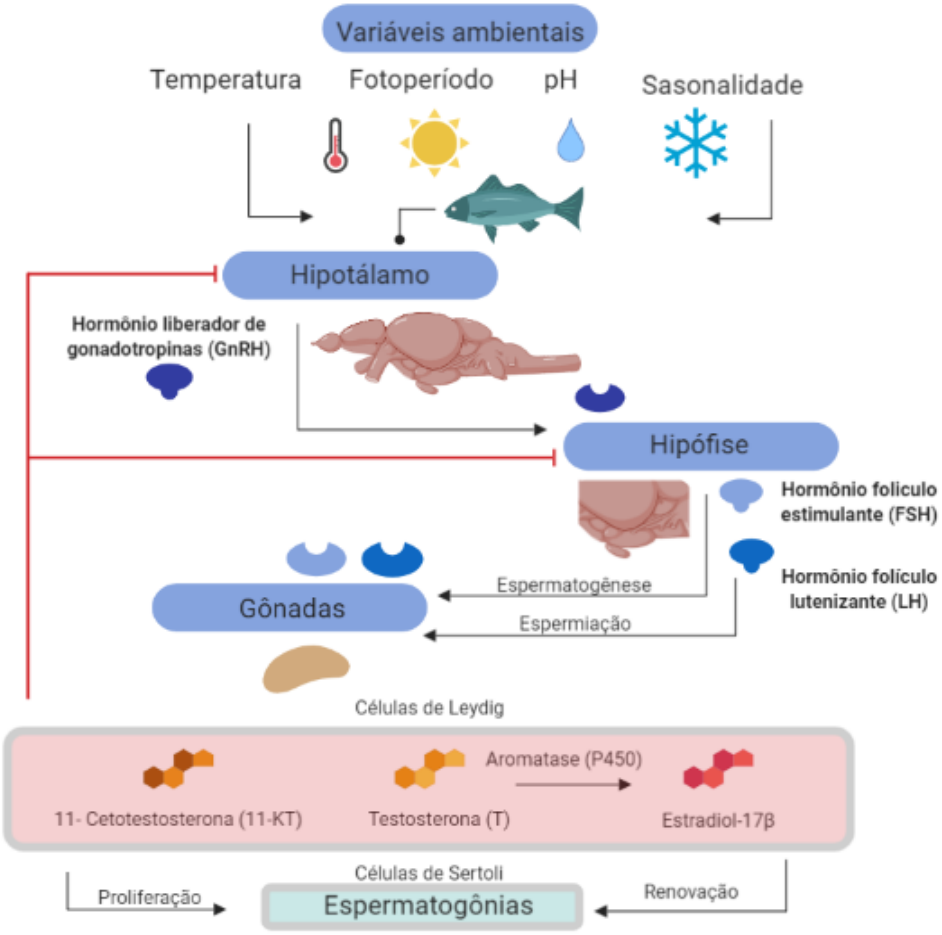

Figura 2. Esquema ilustrativo do funcionamento do eixo hipotálamo-hipófise-gônadal (HHG) em teleósteos machos. Adaptado de (MYLONAS; FOSTIER; ZANUY, 2010; ZOHAR *et al*., 2010).

Apesar das respostas do eixo as variáveis abióticas naturais, o controle HHG pode sofrer alterações devido a fatores exógenos como os xenobióticos resultantes das

atividades antropogênicas. A revisão de Kime (1995) já destacava muitos dos efeitos da poluição sobre variados parâmetros reprodutivos em peixes, desde alterações hormonais de andrógenos e estrógenos até as modificações estruturais nas gônadas.

Os impactos na reprodução causados por tais substâncias cunhou 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 no nível molecular, em receptores, no metabolismo, na síntese hormonal, na estrutura dos tecidos 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 ainda não foi aceita na 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). Especialmente os animais do sexo masculino 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.

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.

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. Ecotoxicology and pollution—Key issues. **Marine Pollution Bulletin**, v. 31, n. 4–12, p. 167–177, abr. 1995.

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.

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.

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.

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.

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**. [s.l: s.n.]. 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.

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.

JESUS, Lázaro Wender Oliveira de. **Gonadotropinas e seus receptores em *Astyanax altiparanae* (Teleostei, Characiformes)**: caracterização molecular e expressão espaço-temporal durante o ciclo reprodutivo em cativeiro. 2016. Tese (Doutorado em Biologia Celular e Tecidual) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2016. doi:10.11606/T.42.2016.tde-08112016-154911. Acesso em: 2019-09-16

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. 492–530, 3 jul. 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.

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**. [s.l.] 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 specie*s (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.

WATTS, N.; ADGER, W. N.; AGNOLUCCI, P. **Health and climate change: Policy responses to protect public healthEnvironnement, Risques et Sante**, 2015.

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.