

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

IZONETE CRISTINA GUILOSKI

EFEITOS BIOQUÍMICOS, GENÉTICOS, HEMATOLÓGICOS, MORFOLÓGICOS E
REPRODUTIVOS DOS MICROPOLUENTES DICLOFENACO E PARACETAMOL
EM *Rhamdia quelen* (PISCES, TELEOSTEI)

CURITIBA
2014

IZONETE CRISTINA GUILOSKI

EFEITOS BIOQUÍMICOS, GENÉTICOS, HEMATOLÓGICOS, MORFOLÓGICOS E
REPRODUTIVOS DOS MICROPOLUENTES DICLOFENACO E PARACETAMOL
EM *Rhamdia quelen* (PISCES, TELEOSTEI)

Tese apresentada como requisito parcial à obtenção do grau de Doutor em Farmacologia, no Programa de Pós Graduação em Farmacologia, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná.

Orientadora: Profa. Dra. Helena Cristina da Silva de Assis

CURITIBA
2014



Ministério da Educação
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
Setor de Ciências Biológicas
Programa de Pós-Graduação em Farmacologia



PARECER

A Comissão Examinadora da Tese de Doutorado intitulada “Efeitos bioquímicos, genéticos, hematológicos, morfológicos e reprodutivos dos micropoluentes diclofenaco e paracetamol em *Rhamdia quelen* (Pisces, Teleostei)”, de autoria da pós-graduanda **IZONETE CRISTINA GUILOSKI**, sob orientação da Prof.^a Dr.^a Helena Cristina da Silva de Assis e banca composta por: Prof.^a Dr.^a Helena Cristina da Silva de Assis (Presidente – Farmacologia – UFPR), Prof. Dr. Eduardo Alves de Almeida (Química e Ciências Ambientais – UNESP), Prof.^a Dr.^a Fabíola Xochilt Valdez Domingos (Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia – INPA), Prof.^a Dr.^a Margarete Casagrande Lass Erbe (Engenharia Química – UFPR), e Prof.^a Dr.^a Viviane Prodocimo (Fisiologia – UFPR), reuniu-se e de acordo com o Regimento Interno do Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, a pós-graduanda foi APROVADA. Para a devida publicação o trabalho deverá sofrer as modificações sugeridas, que serão conferidas pela sua orientadora. Em Curitiba, 22 de julho de 2014.

Helene C. de S. de Assis

Prof.^a Dr.^a Helena Cristina da Silva de Assis (Presidente – Farmacologia – UFPR)

Eduardo Alves de Almeida

Prof. Dr. Eduardo Alves de Almeida (Química e Ciências Ambientais – UNESP)

Fabíola Xochilt V. Domingos

Prof.^a Dr.^a Fabíola Xochilt V. Domingos (Inst. Nac. de Pesquisas da Amazônia – INPA)

Margarete Casagrande Lass Erbe

Prof.^a Dr.^a Margarete Casagrande Lass Erbe (Engenharia Química – UFPR)

Viviane Prodocimo

Prof.^a Dr.^a Viviane Prodocimo (Fisiologia – UFPR)

AGRADECIMENTOS

A Deus por me dar força diante das dificuldades e pelas dádivas.

A minha família, pelo amor, companhia e ajuda sempre.

A Profa. Dra. Helena Cristina da Silva de Assis, minha “mãe científica” e exemplo de ética e profissionalismo, por todos os ensinamentos, paciência e por dedicar seu tempo em me orientar.

Ao João Luiz Coelho Ribas, pela amizade, conversas, ajuda nos experimentos e sugestões, além da análise hematológica.

À Letícia da Silva Pereira pela amizade, conversas e ajuda há tantos anos.

À Gisele Oliveira e Suelen Boschen pela ajuda nas análises de neurotransmissores.

Ao Prof. Dr. Luis Fernando Fávoro pela disponibilidade e ajuda com análise da morfologia das gônadas.

À Profa. Dra. Silvana Maris Cirio pela colaboração com a análise histopatológica de fígado e rim.

Ao Laércio Piancini e à Ana Carolina Dagostim pela colaboração com a análise genética.

Ao Emerson Luiz Botelho pela ajuda com a padronização da dosagem de hormônios.

À Caroline Gomes por ser sempre tão prestativa.

À Alessandra, ao Israel e a CAPES pelo uso do *scanner* de lâminas.

À Juliana Chiesse, pela amizade e ajuda com a histologia.

Ao Cesar Silva pelas conversas, risadas e ensinamentos de biomarcadores bioquímicos.

Ao pessoal do laboratório de Toxicologia Ambiental, pelo auxílio com as análises, conversas e momentos compartilhados: Ana Paula Neves, Ariane Ghelfi, Camila Matos, Ana Bueno Krawczyk, Franciele Lima Bettim, Sabrina Calado.

Às amigas e amigos da Pós-Graduação em Farmacologia, pelas conversas, trocas de experiência e momentos compartilhados.

À Silvia Nardi Cordazzo Genari, minha amiga, pela força, carinho, momentos compartilhados, pela ajuda desde a Especialização com os reagentes e cálculos. Te adoro, você é muiiiiiiiiiito especial na minha vida!

À Patrícia Potty pela ajuda com os documentos da Pós e pela disponibilidade sempre.

À Ely de Fátima pelo auxílio no departamento.

Ao Srs. Sebastião e Luiz pela simpatia e bom humor com que recebem todos que passam pela portaria do Setor de Ciências Biológicas.

Ao pessoal da limpeza por tornar o ambiente mais agradável.

Aos professores do Departamento de Farmacologia pelos ensinamentos, formação e convivência há tantos anos.

Aos professores que compuseram a banca examinadora, Dr. Eduardo Alves de Almeida, Dra. Fabíola Xochilt Valdez Domingos, Dra. Margarete Casagrande Lass Erbe, Dra. Viviane Prodocimo, pelas valiosas contribuições para a melhoria do trabalho.

A todos os professores que tive, pelos ensinamentos, incentivo e contribuição na formação do ser humano que sou hoje.

À Universidade Federal do Paraná, minha segunda casa, local que tanto amo e me orgulho de ter entrado, muito obrigada pela formação.

Aos peixes que possibilitam a realização deste trabalho.

A todos que de alguma forma colaboraram para a realização deste trabalho.

A CAPES pelo apoio financeiro.

“Há uma força motriz mais poderosa que o vapor, a eletricidade e a energia atômica: a vontade!”

Albert Einstein

RESUMO

A presença de fármacos de uso humano e veterinário no ambiente aquático e seu impacto para os humanos e o ecossistema são temas emergentes em saúde ambiental. Os anti-inflamatórios não-esteroidais (AINES) fazem parte dos medicamentos mais utilizados no mundo e entre eles está o diclofenaco e o paracetamol, que representam uma porção significativa dos fármacos encontrados no ambiente aquático. Este trabalho avaliou em peixes *Rhamdia quelen* (jundiá) os efeitos bioquímicos, genéticos, hematológicos, morfológicos e reprodutivos desses fármacos por via hídrica, em um bioensaio semi-estático durante 21 dias. Peixes machos foram expostos a concentrações encontradas no ambiente, de diclofenaco (0; 0,2; 2 e 20 µg/L) e paracetamol (0; 0,25 e 2,5 µg/L). Os resultados mostraram que no fígado o diclofenaco reduziu a atividade da catalase (CAT) e da etoxiresorufina-O-deetilase (EROD) na exposição a 2 µg/L e da superóxido dismutase (SOD) em todos os grupos expostos. Os níveis de glutathiona reduzida (GSH) e a atividade da glutathiona S-transferase (GST) aumentaram em todas as concentrações testadas. A lipoperoxidação (LPO) foi reduzida nos grupos expostos a 0,2 e 20 µg/L de diclofenaco. Na gônada, a concentração de 0,2 µg/L foi a que causou maiores alterações como redução das atividades da SOD, glutathiona peroxidase (GPx) e da GST e na LPO. O diclofenaco não causou danos genéticos. No sangue, o diclofenaco elevou os valores de eritrócitos, trombócitos e leucócitos circulantes. As alterações morfológicas observadas no tecido hepático foram degeneração hidrópica e congestão de sanguínea nas concentrações de 2 e 20 µg/L e redução do índice hepatossomático (IHS) em 0,2 µg/L. No tecido renal ocorreu congestão sanguínea e glomerular em todas as concentrações e degeneração hidrópica discreta na concentração de 20 µg/L de diclofenaco. Ocorreu redução de dopamina (DA) na concentração de 2 µg/L e de DOPAC na exposição à todas as concentrações de diclofenaco. A exposição ao paracetamol causou ao fígado, carbonilação de proteínas e elevação da atividade da SOD no grupo exposto a 2,5 µg/L e redução da atividade da EROD e GST nas duas concentrações. Além de danos ao DNA na concentração de 0,25 µg/L. Também houve redução da hemoglobina e do hematócrito na exposição a 0,25 µg/L de paracetamol e aumento de leucócitos e trombócitos circulantes nas duas concentrações. As alterações morfológicas encontradas no tecido hepático dos animais expostos ao paracetamol foram congestão sanguínea e infiltração leucocitária. Houve elevação de IHS no grupo exposto a 0,25 µg/L. No rim, as alterações observadas foram degeneração hidrópica e congestão glomerular, além de peri-nefrite na exposição à concentração de 2,5 µg/L. O paracetamol reduziu os níveis de testosterona nos grupos expostos. Além de elevar os níveis de estradiol e inibir a espermatogênese na exposição à concentração de 2,5 µg/L. Os níveis de serotonina e DA aumentaram na exposição a 0,25 µg/L e de 5-HIAA na concentração de 2,5 µg/L. Os resultados demonstraram que o diclofenaco e o paracetamol, em concentrações ambientalmente relevantes, causaram estresse oxidativo, danos hepáticos, renais, alterações hematológicas e principalmente, o paracetamol desregulou o eixo hipotálamo-pituitária-gônada de *Rhamdia quelen*.

Palavras-chave: Diclofenaco. Paracetamol. Fármacos. Peixes. Biomarcadores.

ABSTRACT

The presence of pharmaceuticals of human and veterinary use in the aquatic environment and its impact on humans and the ecosystem are emerging issues in environmental health. The nonsteroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) are the most pharmaceuticals used in the world and among them is diclofenac and paracetamol, which represent a significant portion of the drugs found in the aquatic environment. This study evaluated the potential biochemical, genetic, hematological, morphological and reproductive effects of these drugs by hydric exposure, in a semi-static bioassay for 21 days. Males fish of *Rhamdia quelen* (jundia) were exposed to environmental concentrations of diclofenac (0, 0.2, 2 and 20 µg/L) and paracetamol (0, 0.25 and 2.5 µg/L). The results showed that in the liver diclofenac reduced the catalase (CAT) and ethoxyresorufin- O- deethylase (EROD) activities in exposure to 2 µg/L and superoxide dismutase (SOD) in all exposed groups. The levels of reduced glutathione (GSH) and glutathione S-transferase (GST) activity increased at all concentrations tested. Lipid peroxidation (LPO) was reduced in the groups exposed to 0.2 and 20 µg/L of diclofenac. In the gonad, the concentration of 0.2 µg/L caused major changes as inhibition of SOD, glutathione peroxidase (GPx) and GST activities and LPO. Diclofenac did not cause genetic damage. In blood, diclofenac increased values of erythrocytes, thrombocytes and leukocytes circulating. The morphological changes observed in liver tissue were hydropic degeneration and blood congestion at concentrations of 2 and 20 µg/L and reduced hepatosomatic index (HSI) in 0.2 µg/L. In kidney tissue occurred blood and glomerular congestion at all concentrations and mild hydropic degeneration in the concentration of 20 µg/L of diclofenac. There was a reduction of dopamine (DA) in the concentration of 2 µg/L and DOPAC in exposure to all concentrations of diclofenac. Exposure to paracetamol caused to the liver, protein carbonyls and increased SOD activity at the exposed to 2.5 µg/L and inhibition of EROD and GST activities in both concentrations. In addition, DNA damage at the concentration of 0.25 µg/L. There were also reduction in hemoglobin and hematocrit at the exposure to 0.25 µg/L of paracetamol and increased leukocytes and thrombocytes circulating in both concentrations. Morphological changes in the liver tissue of animals exposed to paracetamol were blood congestion and leucocytes infiltration. There was an increase in the IHS exposed to 0.25 µg/L. In the kidney, the changes observed were hydropic degeneration and glomerular congestion, as well as perinephritis in the exposure concentration of 2.5 µg/L. Paracetamol reduced testosterone levels in exposed groups. Besides increasing estradiol levels and inhibit spermatogenesis in the exposure concentration of 2.5 µg/L. The levels of serotonin and DA increased at the exposure to 0.25 µg/L and 5-HIAA concentration at the 2.5 µg/L concentration. The results showed that diclofenac and paracetamol in environmentally relevant concentrations, caused oxidative stress, liver and renal damage, hematologic changes and mainly paracetamol deregulated the hypothalamic-pituitary-gonadal axis in *Rhamdia quelen*.

Keywords: Diclofenac. Paracetamol. Pharmaceuticals. Fish. Biomarkers.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1- POSSÍVEIS ROTAS DE FÁRMACOS NO AMBIENTE.....	19
FIGURA 2 - CLASSES TERAPÊUTICAS DETECTADAS NO AMBIENTE AQUÁTICO.....	22
FIGURA 3 - FORMULA ESTRUTURAL DO DICLOFENACO DE SÓDIO.....	23
FIGURA 4 - FORMULA ESTRUTURAL DO PARACETAMOL.....	25
FIGURA 5 – METABOLISMO DO PARACETAMOL.....	26
FIGURA 6 – EIXO HIPOTÁLAMO-PITUITÁRIA-GÔNADA (HPG).....	31
FIGURA 7 - EXEMPLAR DE <i>Rhamdia quelen</i>	44
FIGURA 8 – COLHEITA DE SANGUE DE <i>Rhamdia quelen</i>	47
FIGURA 9 – GÔNADA E FÍGADO DE <i>Rhamdia quelen</i>	48
FIGURA 10 – RIM POSTERIOR DE <i>Rhamdia quelen</i>	48
FIGURA 11 – CÉREBRO DE <i>Rhamdia quelen</i>	48
FIGURA 12 – FREQUÊNCIA DE MICRONÚCLEOS E ESCORES DE DANOS GENÉTICOS OBTIDOS POR MEIO DO ENSAIO COMETA EM ERITRÓCITOS DE <i>Rhamdia quelen</i> EXPOSTOS AO DICLOFENACO.....	59
FIGURA 13 – ÍNDICE HEPATOSSOMÁTICO (IHS) DE <i>Rhamdia quelen</i> EXPOSTOS AO DICLOFENACO.....	60
FIGURA 14 - ESCORES DE DANOS GENÉTICOS OBTIDOS POR MEIO DO ENSAIO COMETA EM HEPATÓCITOS DE <i>Rhamdia quelen</i> EXPOSTOS AO DICLOFENACO.....	60
FIGURA 15 - BIOMARCADORES BIOQUÍMICOS RELACIONADOS À BIOTRANSFORMAÇÃO EM FÍGADO DE <i>Rhamdia quelen</i> EXPOSTOS AO DICLOFENACO.....	61
FIGURA 16 - BIOMARCADORES BIOQUÍMICOS EM FÍGADO DE <i>Rhamdia</i> <i>quelen</i> EXPOSTOS AO DICLOFENACO.....	62
FIGURA 17 - BIOMARCADORES BIOQUÍMICOS EM GÔNADA DE <i>Rhamdia</i> <i>quelen</i> EXPOSTOS AO DICLOFENACO.....	63
FIGURA 18 - HISTOPATOLOGIA DO TECIDO HEPÁTICO DE <i>Rhamdia</i> <i>quelen</i> CONTROLE E EXPOSTOS AO DICLOFENACO.....	64

FIGURA 19 - ESCORES DE DANOS GENÉTICOS OBTIDOS POR MEIO DO ENSAIO COMETA EM CÉLULAS DE RIM POSTERIOR DE <i>Rhamdia quelen</i> EXPOSTOS AO DICLOFENACO.....	65
FIGURA 20 - HISTOPATOLOGIA DO TECIDO RENAL POSTERIOR DE <i>Rhamdia quelen</i> CONTROLE E EXPOSTOS AO DICLOFENACO.....	66
FIGURA 21 - NÍVEIS DE DOPAMINA, DOPAC, RELAÇÃO DOPAC/DA EM CEREBELO DE <i>Rhamdia quelen</i> EXPOSTOS AO DICLOFENACO.....	67
FIGURA 22 - NÍVEIS DE SEROTONINA, 5-HIAA, RELAÇÃO 5-HIAA/5-HT EM CEREBELO DE <i>Rhamdia quelen</i> EXPOSTOS AO DICLOFENACO.....	68
FIGURA 23 – NÍVEIS DE TESTOSTERONA E ESTRADIOL EM PLASMA DE <i>Rhamdia quelen</i> EXPOSTOS AO DICLOFENACO.....	69
FIGURA 24 – ÍNDICE GONADOSSOMÁTICO (IGS) DE <i>Rhamdia quelen</i> EXPOSTOS AO DICLOFENACO.....	69
FIGURA 25 - HISTOLOGIA DOS TESTÍCULOS DE <i>Rhamdia quelen</i> CONTROLE E EXPOSTOS AO DICLOFENACO.....	70
FIGURA 26 – FREQUÊNCIA DE MICRONÚCLEOS E ESCORES DE DANOS GENÉTICOS OBTIDOS POR MEIO DO ENSAIO COMETA EM ERITRÓCITOS DE <i>Rhamdia quelen</i> EXPOSTOS AO PARACETAMOL.....	72
FIGURA 27 – ÍNDICE HEPATOSSOMÁTICO (IHS) DE <i>Rhamdia quelen</i> EXPOSTOS AO PARACETAMOL.....	72
FIGURA 28 - ESCORES DE DANOS GENÉTICOS OBTIDOS POR MEIO DO ENSAIO COMETA EM HEPATÓCITOS DE <i>Rhamdia quelen</i> EXPOSTOS AO PARACETAMOL.....	73
FIGURA 29 - BIOMARCADORES BIOQUÍMICOS RELACIONADOS À BIOTRANSFORMAÇÃO EM FÍGADO DE <i>Rhamdia quelen</i> EXPOSTOS AO PARACETAMOL.....	73
FIGURA 30 - BIOMARCADORES BIOQUÍMICOS EM FÍGADO DE <i>Rhamdia quelen</i> EXPOSTOS AO PARACETAMOL.....	74
FIGURA 31 - BIOMARCADORES BIOQUÍMICOS EM GÔNADA DE <i>Rhamdia quelen</i> EXPOSTOS AO PARACETAMOL.....	75
FIGURA 32 - HISTOPATOLOGIA DO TECIDO HEPÁTICO DE <i>Rhamdia quelen</i> CONTROLE E EXPOSTOS AO PARACETAMOL.....	76

FIGURA 33 - ESCORES DE DANOS GENÉTICOS OBTIDOS POR MEIO DO ENSAIO COMETA EM CÉLULAS DE RIM POSTERIOR DE <i>Rhamdia quelen</i> EXPOSTOS AO PARACETAMOL.....	77
FIGURA 34 - HISTOPATOLOGIA DO TECIDO RENAL POSTERIOR DE <i>Rhamdia quelen</i> CONTROLE E EXPOSTOS AO PARACETAMOL.....	78
FIGURA 35 - NÍVEIS DE DOPAMINA, DOPAC, RELAÇÃO DOPAC/DA EM CEREBELO DE <i>Rhamdia quelen</i> EXPOSTOS AO PARACETAMOL.....	79
FIGURA 36 - NÍVEIS DE SEROTONINA, 5-HIAA, RELAÇÃO 5-HIAA/5-HT EM CEREBELO DE <i>Rhamdia quelen</i> EXPOSTOS AO PARACETAMOL.....	80
FIGURA 37 – NÍVEIS DE TESTOSTERONA E ESTRADIOL EM PLASMA DE <i>Rhamdia quelen</i> EXPOSTOS AO PARACETAMOL	81
FIGURA 38 – ÍNDICE GONADOSSOMÁTICO (IGS) DE <i>Rhamdia quelen</i> EXPOSTOS AO PARACETAMOL.....	81
FIGURA 39 - HISTOLOGIA DOS TESTÍCULOS DE <i>Rhamdia quelen</i> EXPOSTOS AO PARACETAMOL.....	82

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - PARÂMETROS HEMATOLÓGICOS DE <i>Rhamdia quelen</i> APÓS EXPOSIÇÃO AO DICLOFENACO E GRUPO CONTROLE.....	59
TABELA 2 - ALTERAÇÕES MORFOLÓGICAS EM TECIDO HEPÁTICO DE <i>Rhamdia quelen</i> APÓS EXPOSIÇÃO AO DICLOFENACO.....	65
TABELA 3 - ALTERAÇÕES MORFOLÓGICAS EM TECIDO RENAL POSTERIOR DE <i>Rhamdia quelen</i> APÓS EXPOSIÇÃO AO DICLOFENACO.....	66
TABELA 4 - PARÂMETROS HEMATOLÓGICOS DE <i>Rhamdia quelen</i> APÓS EXPOSIÇÃO AO PARACETAMOL E GRUPO CONTROLE.....	71
TABELA 5 - ALTERAÇÕES MORFOLÓGICAS EM TECIDO HEPÁTICO DE <i>Rhamdia quelen</i> APÓS EXPOSIÇÃO AO PARACETAMOL.....	77
TABELA 6 - ALTERAÇÕES MORFOLÓGICAS EM TECIDO RENAL POSTERIOR DE <i>Rhamdia quelen</i> APÓS EXPOSIÇÃO AO PARACETAMOL.....	78

LISTA DE SIGLAS

AINES	-	Anti-inflamatórios não-esteroidais
ALFAC	-	Álcool, formol, ácido acético.
AMP	-	Adenosina 3,5 - monofosfato
ANVISA	-	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
BHT	-	Hidroxitolueno butilado
CAT	-	Catalase
CDNB	-	1-cloro-2,4-nitrobenzeno
CHCM	-	Concentração de hemoglobina corpuscular média
CONAMA	-	Conselho Nacional do Meio Ambiente
COX	-	Ciclo-oxigenase
CYP450	-	Citocromo P450
DA	-	Dopamina
DDT	-	Diclorodifeniltricloroetano
DNPH	-	2,4-dinitrofenilhidrazina
DOPAC	-	3,4-dihidroxifenilacético
DTNB	-	Ácido 5,5'-ditio-bis-2-nitrobenzóico
E2	-	17 β -estradiol
EDTA	-	Ácido etileno-diamino-tetra-acético
EE2	-	17 α -etinilestradiol
EROD	-	Etoxiresorufina O-deetilase
FSH	-	Hormônio folículo estimulante
GC/MS	-	Cromatografia gasosa / espectrometria de massa
GPx	-	Glutaciona peroxidase
GnRH	-	Hormônio liberador de gonadotrofinas
GR	-	Glutaciona redutase
GSH	-	Glutaciona reduzida
GSSG	-	Glutaciona oxidada
GST	-	Glutaciona S-transferase
Hb	-	Hemoglobina
HCM	-	Hemoglobina corpuscular média
HPG	-	Eixo hipotálamo-pituitária-gônada
HPLC	-	Cromatografia líquida de alta performance

Ht	-	Hematócrito
IGS	-	Índice gonadossomático
IHS	-	Índice hepatossomático
LH	-	Hormônio luteinizante
LPO	-	Lipoperoxidação
MNP	-	Micronúcleo písceo
NA	-	Noradrenalina
NADPH	-	Fosfato de dinucleotídeo de nicotinamida e adenina
NAPQI	-	N-acetil-p-benzoquinona imina
PAS	-	Ácido Periódico de Schiff
PCBs	-	Bisfenilas policloradas
PCO	-	Carbonilação de proteínas
POA	-	Processos oxidativos avançados
RDC	-	Resolução de Diretoria Colegiada
ROS	-	Espécies reativas de oxigênio
SOD	-	Superóxido dismutase
TCA	-	Ácido tricloroacético
TRIS	-	2-amino-2-hidroximetil-propano-1,3-diol
UDP	-	Uridina-5-difosfo
USEPA	-	Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos
VCM	-	Volume corpuscular médio
17- α -OH-P	-	17 α -hidroxi-4-pregnen-3-ona
17 α -20 β -P	-	17 α -20 β -dihidroxi-4-pregnen-3-ona
5-HIAA	-	Ácido 5-hidroxiindolacético
5-HT	-	5-hidroxitriptamina, serotonina

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	16
2. REVISÃO DA LITERATURA.....	18
2.1 FÁRMACOS NO AMBIENTE.....	18
2.1.1 Drogas anti-inflamatórias não-esteroidais.....	21
2.1.1.1 Diclofenaco.....	23
2.1.1.2 Paracetamol (Acetaminofeno).....	25
2.2 DESREGULADORES ENDÓCRINOS.....	27
2.3 REGULAÇÃO DO SISTEMA REPRODUTIVO DE PEIXES.....	30
2.4 BIOMARCADORES.....	33
2.4.1 Biomarcadores hematológicos.....	34
2.4.2 Biomarcadores bioquímicos.....	35
2.4.3 Biomarcadores genéticos.....	38
2.4.4 Biomarcadores morfológicos.....	40
3. HIPÓTESE.....	42
4. OBJETIVOS.....	43
4.1 OBJETIVO GERAL.....	43
4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	43
5. MATERIAL E MÉTODOS.....	44
5.1 FÁRMACOS.....	44
5.2. ANIMAL EXPERIMENTAL: <i>Rhamdia quelen</i>	44
5.3 OBTENÇÃO, MANUTENÇÃO DOS ANIMAIS DESENHO EXPERIMENTAL.....	46
5.4 BIOMARCADORES HEMATOLÓGICOS.....	49
5.5 DOSAGENS HORMONAIS.....	49
5.6 BIOMARCADORES GENÉTICOS.....	50
5.7 BIOMARCADORES BIOQUÍMICOS.....	51
5.7.1 Atividade da etoxiresorufina O-deetilase (EROD).....	51
5.7.2 Atividade da glutathione S-transferase (GST).....	51
5.7.3 Atividade da superóxido dismutase (SOD).....	52
5.7.4 Atividade da catalase (CAT).....	52

5.7.5 Atividade da glutathiona peroxidase (GPX).....	53
5.7.6 Lipoperoxidação (LPO).....	53
5.7.7 Concentração de glutathiona reduzida (GSH).....	54
5.7.8 Concentração de proteínas carboniladas (PCO).....	54
5.7.9 Concentração de proteínas totais.....	55
5.8 BIOMARCADORES MORFOLÓGICOS.....	55
5.9 NÍVEIS DE NEUROTRANSMISSORES.....	56
5.10 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	57
6. RESULTADOS	58
6.1 CONDIÇÕES EXPERIMENTAIS.....	58
6.2 DICLOFENACO.....	58
6.3 PARACETAMOL.....	71
7. DISCUSSÃO	83
7.1 DICLOFENACO.....	83
7.2 PARACETAMOL.....	89
8. CONCLUSÕES.....	95
REFERÊNCIAS.....	96

INTRODUÇÃO

A qualidade da água é um dos determinantes fundamentais da saúde pública e auxilia ou complementa o progresso econômico e o desenvolvimento sustentável de um país. Países desenvolvidos em seus programas de qualidade da água têm combatido a contaminação por micro-organismos e compostos tóxicos. A detecção de fármacos e produtos de higiene pessoal no ambiente aquático tem sido um assunto emergente em saúde ambiental e tem causado preocupação em vários países. Os fármacos são considerados micropoluentes, pois são detectados no ambiente em concentrações que variam de ng/L a µg/L. A insuficiente remoção dos fármacos pelos sistemas de tratamento de efluente e subsequente eliminação dos efluentes contribui para a ocorrência de fármacos em águas superficiais (RAHMAN *et al.*, 2009).

Resíduos de fármacos constituem uma fonte de exposição crônica da vida selvagem em sítios de descarga de efluentes (ASHTON *et al.*, 2004). Ao contrário dos pesticidas e metais pesados que ocorrem em concentrações altas nos corpos de água contaminados, os fármacos ocorrem em concentrações extremamente baixas dificultando assim sua detecção e quantificação (BILA e DEZOTTI, 2003). Apesar das baixas concentrações liberadas no ambiente aquático seu potencial impacto para o ambiente não pode ser ignorado (KAWABATA *et al.*, 2012). Os fármacos têm seu modo de ação específico que os faz ser efetivos na terapêutica em baixas concentrações e como são substâncias biologicamente ativas podem desencadear efeitos em organismos aquáticos que possuam sistemas enzimáticos compatíveis com os mamíferos. No entanto, pouca informação está disponível sobre os efeitos crônicos que os organismos aquáticos expostos a fármacos durante todo seu ciclo de vida podem ter (FENT *et al.*, 2006). Como o potencial ecotoxicológico de resíduos de fármacos é quase desconhecido, faz-se necessário avaliar os riscos destes resíduos farmacêuticos, pois a presença de fármacos pode comprometer a qualidade dos recursos hídricos, alterando a biodiversidade e o equilíbrio de ecossistemas aquáticos (BOUND e VOULVOULIS, 2004).

Apesar da existência de uma grande variedade de classes de fármacos usados na terapêutica humana e veterinária, alguns se destacam devido aos

seus volumes de consumo, toxicidade e persistência no ambiente, entre esses estão os analgésicos e anti-inflamatórios (CHRISTEN *et al.*, 2010).

Devido ampla ocorrência dos anti-inflamatórios não-esteroidais (AINES) no ambiente aquático, o seu potencial de impacto ecológico tem sido um assunto preocupante (FLIPPIN *et al.*, 2007; CHRISTENSEN *et al.*, 2009). Os AINES inibem a enzima COX que influencia a síntese de eicosanóides os quais atuam várias funções fisiológicas (HAYASHI *et al.*, 2008).

Com base nestas informações, os fármacos escolhidos para a realização deste trabalho foram o diclofenaco e o paracetamol, visando avaliar os efeitos bioquímicos, genéticos, hematológicos, morfológicos e reprodutivos destes durante uma exposição subcrônica por via hídrica.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1 FÁRMACOS NO AMBIENTE

A presença de fármacos no ambiente tem sido um tópico recente de estudo. A primeira evidência de presença de fármacos no ambiente aquático foi na década de 1970, nos Estados Unidos com a detecção do ácido clofíbrico (fármaco redutor de lipídios no sangue) em efluente de estação de tratamento de esgoto, mas apenas em 1990 os fármacos começaram a receber atenção com o desenvolvimento de novas técnicas analíticas (BERETTA *et al.*, 2014).

Os fármacos têm aumentado sua importância como contaminantes ambientais devido à sua difusão nos ecossistemas aquáticos. Sendo designados para a medicina humana e veterinária, eles podem trazer preocupações devido aos seus potenciais efeitos adversos aos organismos aquáticos, em particular, com relação à desregulação hormonal a qual pode ter consequências em nível populacional (FENT *et al.*, 2006; SILVA DE ASSIS *et al.*, 2013).

O descarte de fármacos vencidos ou sobras é feito atualmente por grande parte da população no lixo comum ou na rede de esgoto. A forma adequada de descarte de medicamentos tem sido uma preocupação constante da sociedade em diversos países. No Brasil, o assunto é abordado em normas gerais ou específicas para determinados setores da cadeia de produção farmacêutica, como a RDC nº 306/2004 da ANVISA e Resolução nº 358/2005 do CONAMA (Gerenciamento e Destinação Final de Resíduos dos Serviços de Saúde) e a RDC n.º 17/2010 da ANVISA (Boas Práticas de Fabricação de Medicamentos) (BALBINO e BALBINO, 2011). A política nacional de resíduos sólidos criou a Logística Reversa também para os fármacos determinando a coleta e a restituição dos resíduos ao setor empresarial cujo objetivo final é evitar a contaminação ambiental devido ao descarte inadequado.

Toneladas de fármacos são descartadas através do lixo doméstico, ralo de pias e banheiros, efluentes hospitalares e industriais resultando em

contaminação de rios, lagos e estuários (FIGURA 1). Os fármacos veterinários podem entrar no ambiente aquático via aplicação manual ou via aplicação direta em aquicultura (FENT *et al.*, 2006). Ao contrário de alguns poluentes convencionais (como os pesticidas, detergentes e combustíveis) que tendem a diminuir no ambiente devido a restrições legais, os fármacos devem aumentar sua ocorrência no ambiente devido ao aumento da população e seus efeitos benéficos aos seres humanos (TAMBOSI *et al.*, 2010). Fármacos foram detectados em compartimentos aquáticos, tais como afluentes (GÓMEZ *et al.*, 2007), efluentes (AL AUKIDY *et al.*, 2012) de estações de tratamento de esgoto (VERENITCH *et al.*, 2006), águas superficiais (rios, lagos, córregos, estuários, entre outros) (KIM *et al.*, 2009), água do mar (WILLE *et al.*, 2010), as águas subterrâneas (PENG *et al.*, 2014) e água de beber (VULLIET *et al.*, 2011).

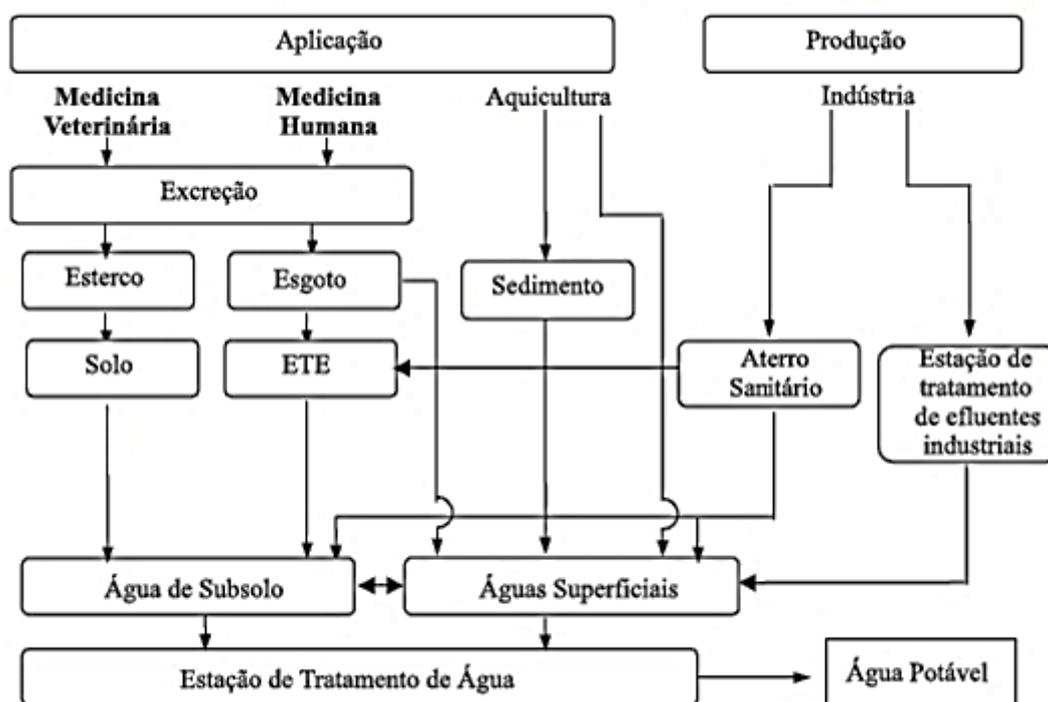


FIGURA 1. Possíveis Rotas de Fármacos no Ambiente.
FONTE: Bila e Dezotti (2003).

A preocupação ambiental não é apenas com os volumes de produção de certos fármacos, mas com a sua persistência no ambiente e sua atividade biológica (por exemplo, alta toxicidade, alta potência para efeitos em funções

biológicas chave como a reprodução). Concentrações ambientalmente relevantes de 17β -estradiol (E2) e do sintético 17α -etinilestradiol (EE2) levaram à indução da vitelogenina, alterações histopatológicas das gônadas e redução da fecundidade e sucesso reprodutivo em peixes (BRIAN *et al.*, 2007). A potência *in vivo* do E2 é de cerca de 10-50 vezes maior que o EE2, provavelmente, devido ao seu menor metabolismo (THORPE *et al.*, 2003). A exposição do peixe *Pimephales promelas* durante um ano a concentração de 3,2 ng/L de EE2 induziu a vitelogenina (SCHWINDT *et al.*, 2014); 0,1-15 ng/L de EE2 alterou a diferenciação sexual em embriões de *Pimephales promelas* expostos durante desde a eclosão até a fase adulta (VAN AERLE *et al.*, 2002). Uma longa exposição a 5 ng/L levou a uma redução da fertilização da geração F1 em peixes *Danio rerio* (NASH *et al.*, 2004).

Além dos hormônios sexuais, substâncias naturais e industrializadas são capazes de desregular o sistema endócrino e reprodutor por mimetizar a ação dos hormônios devido a sua ligação em receptores estrogênicos (DAMSTRA *et al.*, 2004).

O desenvolvimento de métodos sensíveis, tais como: cromatografia gasosa (GC) com espectrometria de massa (MS), cromatografia negativa por ionização química com espectrometria de massa e cromatografia líquida de alta performance (HPLC) com espectrometria de massa que permitem a detecção e quantificação de drogas em várias amostras ambientais, permitiu esclarecer as classes terapêuticas de maior relevância em contaminação ambiental. De acordo com os dados presentes na literatura, essas classes são: drogas anti-inflamatórias não-esteroidais (16%), antibióticos (15%), agentes redutores de lipídios no sangue (12%), e hormônios sexuais sintéticos (9%) (SANTOS *et al.*, 2010).

Estudos demonstram que os fármacos e seus metabólitos estão presentes em ambientes aquáticos em várias partes do mundo, como Alemanha (TERNES e HIRSCH, 2000), Brasil (STUMPF, 1999; TERNES *et al.*, 1999; SODRÉ *et al.*, 2010), Canadá (KLEYWEGT *et al.*, 2011), Espanha (BUENO *et al.*, 2012), Holanda (JOHNSON *et al.*, 2000), Inglaterra (DESBROW *et al.*, 1998), Itália (JOHNSON *et al.*, 2000), Suécia (BUSER *et al.*, 1999), Estados Unidos (FOCAZIO *et al.*, 2008) e Reino Unido (KASPRZYK-HORDERN *et al.*, 2008).

No Brasil ainda existem poucas informações sobre a ocorrência de fármacos no meio ambiente. Dentre os fármacos encontrados nos Estados do Rio de Janeiro, São Paulo e Bahia, destacam-se: ácido clofíbrico, benzafibrato, cetoprofeno, cafeína, ibuprofeno, atenolol, carbamazepina, eritromicina, diclofenaco, diazepam, naproxeno, 17α -etinilestradiol e genfibrozil (STUMPF, 1999; TERNES *et al.*, 1999; SODRÉ *et al.*, 2010). É importante salientar que no Brasil há uma maior expectativa de ocorrência de fármacos em águas residuais devido à carência de tratamento de esgotos no país (MELO *et al.*, 2009).

A baixa eficiência na remoção de fármacos pelos processos convencionais de tratamento físico e químico incentivou a busca por novas metodologias capazes de promover a mineralização destes compostos ou ao menos reduzir os efeitos adversos ao meio ambiente. Os processos de oxidação avançada (POA) são caracterizados por reações de oxidação química através do radical hidroxila, espécie extremamente reativa e pouco seletiva e isso faz com que atue na oxidação de uma grande variedade de substâncias. Os radicais hidroxila são formados a partir de oxidantes como H_2O_2 ou O_3 , sendo que a eficiência do processo pode ser aumentada pela combinação com radiação ultravioleta (UV) ou catalisadores (íons metálicos, semicondutores). Alguns POA são: fotólise de peróxido de hidrogênio (UV/ H_2O_2); ozonização (O_3), fotocatalise heterogênea (TiO_2 /UV), Fenton (Fe^{2+} / H_2O_2) e foto-Fenton (Fe^{3+} / H_2O_2 /UV; Fe^{2+} / H_2O_2 /solar). No entanto, ainda são escassas as informações sobre os produtos de degradação formados e a toxicidade destes, informações estas fundamentais para garantir a efetividade e segurança da aplicação de tais processos no tratamento de efluentes contendo resíduos de fármacos (MELO *et al.*, 2009).

2.1.1 Drogas anti-inflamatórias não-esteroidais

Os anti-inflamatórios não esteroidais (AINES) destacam-se entre os fármacos por sua grande ocorrência nos corpos de água. Santos *et al.* (2010) fizeram uma revisão de 134 artigos científicos, no período de 1997 a 2009, e demonstraram que os AINES correspondem a classe de fármacos mais

detectada no ambiente aquático (FIGURA 2). Os AINES são ácidos fracos que agem por inibição reversível ou irreversível de uma ou ambas as formas da enzima ciclo-oxigenase (COX), COX-1 e COX-2, envolvidas na síntese de diferentes prostaglandinas do ácido araquidônico. Os AINES são comumente usados para tratar inflamação e dor e aliviar a febre, e algumas vezes são utilizados para tratamento crônico de doenças reumáticas (KHALAF, 2009). O tratamento de longa duração com AINES em humanos tem sido associado com um aumento do risco de úlcera gástrica e hemorragia (SANTOS *et al.*, 2012).

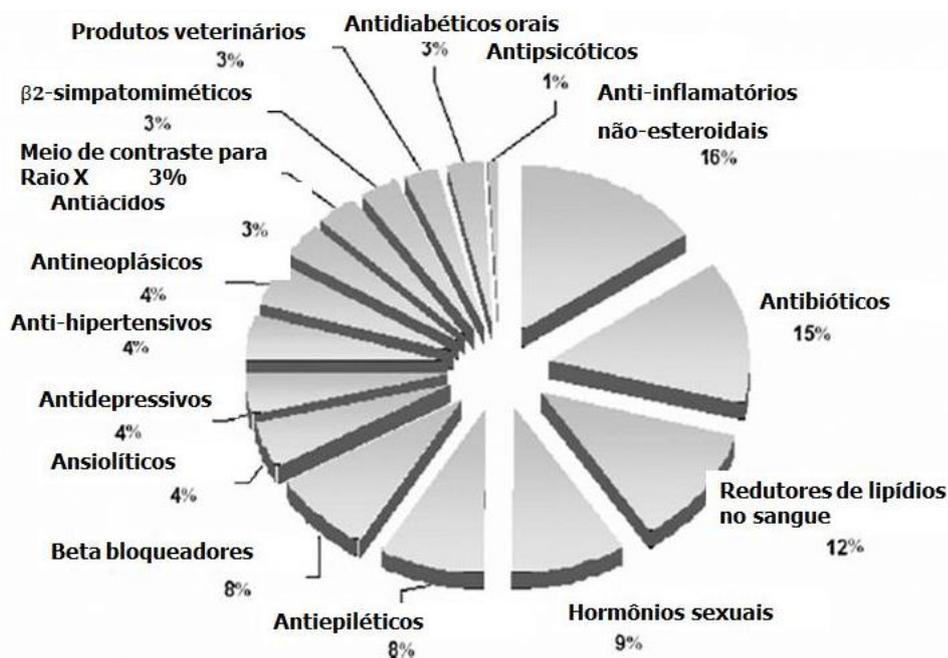


FIGURA 2. Classes terapêuticas detectadas no ambiente aquático, expresso em porcentagem relativa. Adaptado de Santos *et al.* (2010).

Prostaglandinas possuem uma variedade de funções fisiológicas de acordo com a célula e a molécula-alvo. Elas são conhecidas por estarem envolvidas em processos como a inflamação e a dor, regulação do fluxo sanguíneo renal, processos de coagulação e síntese de mucosa gástrica (FENT *et al.*, 2006).

Um COX similar a COX-2 humana tem sido encontrada em peixes (SANTOS *et al.*, 2010). Uma COX-1 e COX-2 homóloga a COX humana foi clonada do ovário de truta (ROBERTS *et al.*, 2000) e recentemente, a COX-2 de tubarão foi clonada no peixe *Squalus acanthias*, tendo 68 e 64% de

homologia a COX-1 e COX-2 de humanos, respectivamente (YANG e CARLSON, 2004).

Os AINES ibuprofeno, naproxeno, paracetamol e diclofenaco são frequentemente encontrados em esgotos e águas superficiais. Algumas vezes altos níveis de até 24,6 µg/L ou 85 µg/L de ibuprofeno foram detectados em efluentes de estações de tratamento de esgoto no Canadá (METCALFE *et al.*, 2003). O diclofenaco foi encontrado em efluentes em concentrações que variam de 0,001 a 2,2 µg/L (SANTOS *et al.*, 2010).

2.1.1.1 Diclofenaco

O diclofenaco (Voltaren[®], Cataflam[®]) é um AINE, derivado do ácido fenilacético (FIGURA 3), com ação analgésica e anti-inflamatória, não sendo usado como antipirético, embora tenha esta ação. Apresenta-se nas formas químicas de sal sódico e potássico e de complexo com colestiramina (ALDEKOA *et al.*, 2013).

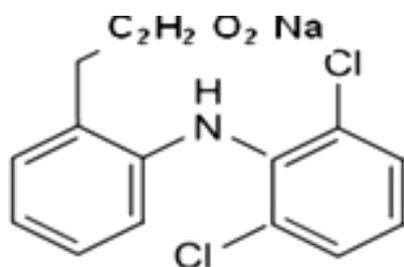


FIGURA 3. Fórmula estrutural do diclofenaco de sódio. Garcia Peña *et al.* (2009).

O diclofenaco é uma das substâncias utilizadas pelos humanos mais encontrada no ambiente aquático. É estimado que aproximadamente 940 toneladas de diclofenaco sejam consumidas anualmente em todo o mundo (ZHANG *et al.*, 2008). Na cidade de Curitiba, o diclofenaco foi detectado na água dos rios Atuba, Barigui, Belém e Iguaçu e Iraí chegando a concentrações de 0,285 µg/L (KRAMER, 2013).

De acordo com diversos estudos, em humanos, a eliminação de 90% de diclofenaco acontece 3-4 horas após o seu consumo. Várias formas

conjugadas derivam de diclofenaco, e o metabólito mais significativo é o 4-hidroxidiclofenaco, que representa 40-50% da dose excretada na urina e bile (ALDEKOA *et al.*, 2013). Após o uso terapêutico, apenas 15% do diclofenaco é excretado de forma inalterada, sendo a maior parte eliminada após biotransformação e excreção via renal (SCHWAIGER *et al.*, 2004).

As propriedades terapêuticas do diclofenaco são baseadas na inibição da síntese de prostaglandinas. Além da mediação da dor, as prostaglandinas estão envolvidas na regulação da circulação sanguínea, permeabilidade vascular e função renal. Alguns dos efeitos adversos do diclofenaco, como a nefropatia, se devem à inibição da síntese de prostaglandinas. Outros efeitos como ulceração gastrointestinal e hepatotoxicidade idiossincrática sugere-se que se deve a danos oxidativos (SANCHEZ *et al.*, 2002). Na Índia, entre 1992 e 2007, as populações de três espécies de abutres – abutre-de-dorso-branco (*Gyps bengalensis*), abutre-de-bico-longo (*Gyps indicus*) e abutre-de-bico-estreito (*Gyps tenuirostris*) – diminuíram entre 97,5% e 99,9% devido à ingestão de carcaças de animais tratados com diclofenaco. Análises dos abutres determinaram que a morte dos animais foi causada por falência renal causada pelo diclofenaco (OAKS *et al.*, 2004).

Um estudo demonstrou efeitos histopatológicos crônicos em rins e brânquias de truta arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*) após 28 dias de exposição à concentração de 5 µg/L de diclofenaco (HOEGGER *et al.*, 2005). Além disso, ensaios com trutas arco-íris expostas a diferentes concentrações de diclofenaco relataram o acúmulo deste composto nos músculos, brânquias, rins e fígado dos animais (SCHWAIGER *et al.*, 2004).

A fitotoxicidade do diclofenaco e de seus produtos de fotodegradação foi demonstrada em algas clorófitas, *Scenedesmus vacuolatus*, demonstrando que não só o fármaco é perigoso para o ambiente, mas também os produtos das reações químicas que ocorrem com ele no ambiente (SCHMITT-JANSEN *et al.*, 2007). Também foram verificados efeitos teratogênicos em embriões de ratos expostos a altas doses de diclofenaco (CHAN *et al.*, 2001).

2.1.1.2 Paracetamol (Acetaminofeno)

Paracetamol ou Acetaminofeno (Tylenol[®]) (FIGURA 4) é um analgésico-antipirético pertencente aos AINES, derivado do *p*-aminofenol. Possui ação antipirética alta, analgésica média e anti-inflamatória baixa.

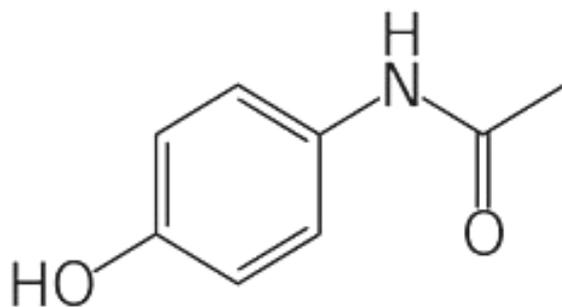


FIGURA 4. Fórmula estrutural do paracetamol. Fonte: <http://pt.dreamstime.com/photos-images/f%C3%B3rmula-estrutural-do-paracetamol-acetaminophen.html>

Em humanos, o paracetamol é bem absorvido no trato gastrintestinal, alcançando o pico plasmático após 40 a 60 minutos. A biodisponibilidade é de cerca de 60% a 95%. A ligação a proteínas é de 10 a 30% e é capaz de atravessar a barreira placentária e hematoencefálica. A principal via de biotransformação (mais de 90% da quantidade absorvida) é a hepática, que ocorre por: conjugação com ácido glicurônico (40% a 67%), sulfatação (20% a 46%, principalmente em crianças) e oxidação (5% a 15%). A conjugação e a sulfatação são processos saturáveis e que produzem metabólitos atóxicos que são eliminados pela urina, já a via oxidativa produz um metabólito reativo altamente tóxico, N-acetil-*p*-benzoquinona imina (NAPQI) (FIGURA 5) (SEBBEN *et al.*, 2010).

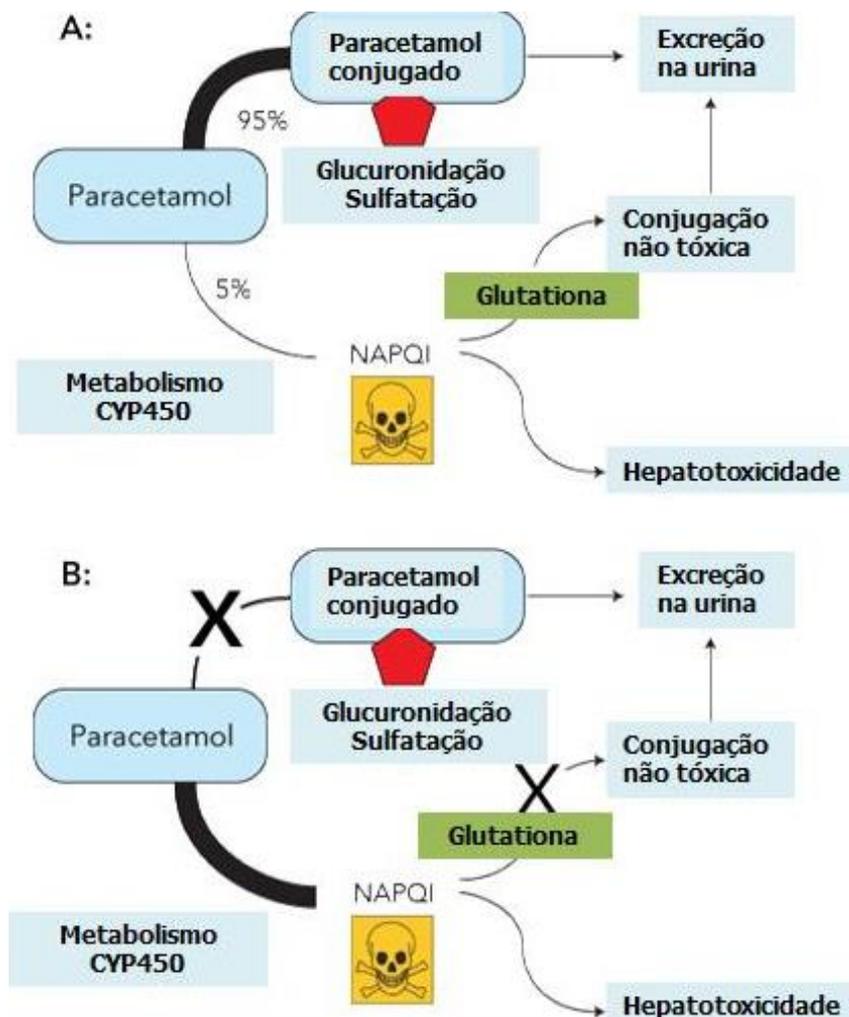


FIGURA 5. Metabolismo do paracetamol. Adaptado de Lubel *et al.* (2007).

O mecanismo exato de ação do paracetamol ainda não é conhecido. Há evidências de uma série de mecanismos centrais, incluindo os efeitos na produção de prostaglandinas, na neurotransmissão serotoninérgica, em opióides, no óxido nítrico (NO), e em canabinóides (SHARMA e MEHTA, 2013).

Atualmente é o analgésico mais utilizado, principalmente em pediatria, substituindo o uso de salicilatos para evitar a síndrome de Reye. Pode ser comercializado sem prescrição médica e está disponível sozinho ou associado a outros fármacos, como nos antigripais, por exemplo. Em 2000, na Inglaterra, ele ficou no topo das três drogas mais prescritas totalizando mais de 400 toneladas. Na China, o volume de paracetamol exportado só em 2001 foi maior que 15 toneladas (SEBASTINE e WAKEMAN, 2003). Devido ao seu volume de produção e prescrição ele tem sido encontrado, frequentemente, no meio

ambiente, principalmente no ambiente aquático. Apesar da alta eficiência de remoção (99%), este composto foi detectado nos efluentes (GÓMEZ *et al.*, 2007). De fato, o paracetamol não é uma droga segura, ele pode causar necrose hepática, nefrotoxicidade, e até a morte em humanos e animais experimentais em doses elevadas. O seu metabólito N-acetil-p-benzoquinonimina é um composto químico ativo e sua estrutura indica que ele é capaz de fazer parte em reações de radicais livres trazendo consequências desfavoráveis para organismos alvos e não-alvos (AN *et al.*, 2009).

O paracetamol é excretado principalmente na forma conjugada. Durante o tratamento de águas residuais a reação de conjugação é degradada, levando a liberação do composto original (KASPRZYK-HORDERN *et al.*, 2008). Este fármaco foi detectado na água dos rios Atuba, Barigui, Belém e Iguaçu e Iraí na cidade de Curitiba chegando a concentrações de 0,367 µg/L (KRAMER, 2013). O monitoramento durante um ano em uma estação de tratamento de esgoto para verificar a ocorrência e persistência de fármacos, na Espanha, encontrou concentrações de paracetamol variando de 0,22 a 4,3 µg/L nos efluentes (GÓMEZ *et al.*, 2007).

2.2 DESREGULADORES ENDÓCRINOS

A constatação dos efeitos deletérios, causados em várias populações da fauna selvagem e até no próprio homem, foi o ponto de partida para o desenvolvimento mundial de inúmeras pesquisas em busca dos designados desreguladores endócrinos. Desregulador endócrino é o termo associado a toda substância ou mistura de substâncias exógenas, capazes de assumir idêntica função de um hormônio natural nos seres vivos ou inibir o funcionamento normal do mesmo, alterando as funções do sistema endócrino e conseqüentemente, prejudicando a saúde do organismo, da sua progênie ou de uma (sub)população. A Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos da América (USEPA) define desreguladores endócrinos como “agentes exógenos que interferem na produção, transporte, metabolismo, processos de interação, ação, degradação ou eliminação dos hormônios naturais” (USEPA, 2002).

Nos Estados Unidos, a associação entre contaminação química do meio ambiente e alterações reprodutivas existe desde 1947. Nesta época, ornitologistas associaram o declínio da população de águia americana com alterações comportamentais no acasalamento. Desde então, um número crescente de relatos de contaminação de rios com bisfenilas policlorados (PCBs) na região dos Grandes Lagos (década de 60), diclodifeniltricloroetano - DDT (Lago Ontário, década de 70) e dioxinas (Lago Apopka, década de 80) foi relacionado a problemas reprodutivos e no desenvolvimento de animais (MARKEY *et al.*, 2002).

Estas substâncias são na sua maioria poluentes químicos e derivados de químicos antropogênicos que constituem diversos tipos de resíduos industriais, agrícolas ou domésticos. Os efeitos dos desreguladores endócrinos manifestam-se, genericamente, ao nível do sistema endócrino, causando efeitos adversos à saúde, alterações no comportamento, crescimento, desenvolvimento, metabolismo e anomalias na função reprodutiva e na homeostase. Em geral os efeitos relacionados ao sistema reprodutivo humano, tais como baixa motilidade dos espermatozoides, infertilidade, endometriose, hipospádia (má formação genital masculina) entre outros são os mais frequentes. No entanto, o sistema endócrino é complexo e envolve processos que ocorrem em diferentes níveis de organização biológica, isto é, nos órgãos, tecidos, células e moléculas. Tendo este amplo cenário de efeitos sobre o sistema endócrino, deve-se levar em consideração não somente os efeitos reprodutivos, mas também efeitos sobre a homeostase do organismo como um todo (EERTMANS *et al.*, 2003).

Em geral os desreguladores endócrinos são compostos muito estáveis e, portanto persistentes; muitas vezes lipofílicos e semi-voláteis, o que facilita a rápida e vasta dispersão ambiental (NILSSON, 2000).

Adicionalmente, o ciclo reprodutivo dos organismos aquáticos, com um desenvolvimento não protegido na fase embrionária e nos primeiros estágios de vida no ambiente, torna-os particularmente suscetíveis aos produtos químicos presentes na água (EERTMANS *et al.*, 2003).

As substâncias causadoras de disfunções endócrinas são classificadas como hormônios naturais ou como substâncias artificiais. Os hormônios naturais incluem aqueles que ocorrem naturalmente no corpo humano e dos

animais, como o estrogênio, a progesterona e a testosterona, e os fitoestrogênios (genisteína, sitosterol e coumestrol), substâncias contidas em algumas plantas, como os brotos de alfafa e as sementes de soja, que apresentam uma atividade semelhante aos estrogênios quando ingeridas por humanos. As substâncias artificiais contemplam os hormônios sintéticos, incluindo os hormônios idênticos aos hormônios naturais, como os contraceptivos orais, as terapias hormonais de substituição e alguns aditivos utilizados na alimentação animal, e substâncias químicas artificiais, concebidas para utilizações na indústria como em alguns produtos de limpeza, na agricultura e nos bens de consumo. Incluem também as substâncias químicas que são subprodutos de processos industriais, como as dioxinas, que interferem com o sistema endócrino dos seres humanos e dos animais (SAFE, 2004).

Alguns medicamentos como o diclofenaco, ibuprofeno e gemfibrozil, já foram investigados quanto ao efeito de desreguladores endócrinos. O ibuprofeno, por exemplo, alterou parâmetros reprodutivos como frequência de desova, número de ovos, fecundidade, razão de fertilização, níveis hormonais e maturação das gônadas em peixes expostos (FLIPPIN *et al.*, 2007; AL-QUTOB *et al.*, 2009; HAN *et al.*, 2010). Muitas substâncias químicas são suspeitas de desregular o sistema endócrino. Entretanto, apenas uma fração destas deve passar por um processo de triagem antes da liberação para comercialização, pois as substâncias priorizadas são as que interagem com receptores hormonais (ZOELLER *et al.*, 2012).

Os desreguladores endócrinos induzem em alguns organismos ovíparos todas as alterações metabólicas relacionadas à vitelogênese: aumento da massa do fígado, aumento da concentração de vitelogenina e cálcio no plasma, reserva energética no fígado e desenvolvimento das gônadas, com seu consequente aumento de massa (FUNKESTEIN *et al.*, 2000). Em peixes, eles incluem: mudanças nas concentrações hormonais (hormônios sexuais e hormônios tireoidianos), desenvolvimento anormal das gônadas, baixa viabilidade dos gametas, alterações na atividade de enzimas como a aromatase (a qual converte testosterona a estradiol) e níveis de vitelogenina (proteína sintetizada pelo fígado de fêmeas ovíparas em resposta ao hormônio endógeno 17β -estradiol) (PORTE *et al.*, 2006).

Os xenobióticos podem reduzir o sucesso reprodutivo em peixes pela interação direta com as células germinativas (ARMSTRONG, 1990). Devido a sua ampla especificidade de substrato, as isoenzimas do CYP450 podem acelerar o *clearance* de testosterona e afetar os níveis de estradiol em peixes expostos a contaminantes. MacArdle *et al.* (2000) investigaram alterações de parâmetros reprodutivos em peixes (*Fundulus heteroclitus* e *Morone saxatilis*) expostos durante 21 dias a águas residuais de tratamento de esgoto em uma área da América do Norte. Eles encontraram a atividade do CYP1A (citocromo P4501A) aumentada nos organismos expostos ao esgoto.

2.3 REGULAÇÃO DO SISTEMA REPRODUTIVO DE PEIXES

Vários parâmetros relacionados à reprodução dos peixes podem ser utilizados como biomarcadores de contaminação ambiental. Por isso, é importante conhecer os mecanismos e estruturas envolvidas na reprodução destes animais. A reprodução em peixes ocorre sob o comando do eixo Hipotálamo-Pituitária-Gônada (HPG) (FIGURA 6). O hipotálamo localiza-se na base do cérebro e produz, entre outros, o hormônio liberador de gonadotrofinas (GnRH) e a dopamina (DA). O GnRH estimula a liberação das gonadotrofinas pela pituitária, enquanto a DA inibe a liberação dessas gonadotrofinas. Nos teleósteos, existem duas gonadotrofinas: hormônio folículo estimulante (FSH) e hormônio luteinizante (LH). O FSH estimula o crescimento gonadal, a gametogênese e a entrada de vitelogenina no ovócito em fêmeas. Em machos, o FSH é responsável, via células de Sertoli, pela proliferação das espermatogônias que é a primeira fase da espermatogênese e ativa os receptores presentes nas células de Leydig, estimulando a síntese e secreção de andrógenos. O LH é importante para a maturação final do ovócito e desova. Nos machos o LH atua na fase de liberação do sêmen. As gonadotrofinas estimulam a maturação gonadal e a liberação de hormônios esteroides pelas gônadas. Os hormônios esteroides e os hipofisários determinam o desenvolvimento de vários caracteres sexuais, maturação dos tecidos somáticos (ductos gonadais), na gametogênese e influenciam no cortejo.

Quando os hormônios gonadais aumentam seu nível no plasma, exercem um efeito inibitório sobre a liberação de gonadotrofinas. Aparentemente, esses efeitos inibitórios dos esteroides sobre as gonadotrofinas devem-se ao efeito estimulatório dos esteroides sobre a liberação de DA, ou por meio de uma secreção de GnRH (BALDISSEROTTO, 2013).

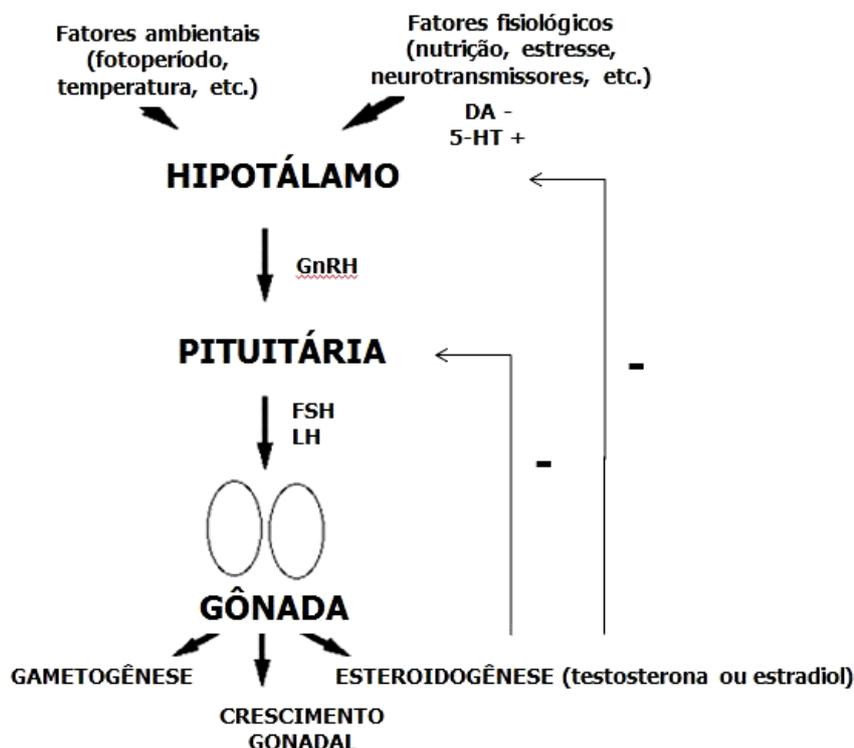


FIGURA 6. Eixo Hipotálamo-Pituitária-Gônada (HPG). Adaptado de <http://www.colorado.edu/intphys/iphy4480tsai/Lecture9.html>. Colorado (2014).

Os testículos contêm as células germinativas, que atuam em sincronia ou em diferentes estágios de desenvolvimento: as células de Sertoli, que são responsáveis pela sustentação e nutrição das células germinativas, e também as células de Leydig, cuja função é produzir esteroides necessários para a espermatogênese e o desenvolvimento de características secundárias. Nos testículos há a produção dos seguintes hormônios: testosterona, 11-ketotestosterona e androstenodiona. Além disso, os testículos de alguns peixes podem também produzir progesterona, 17 α -hidroxi-4-pregnen-3-ona (17 α -OH-P), 17 α -20 β -dihidroxi-4-pregnen-3-ona (17 α -20 β -P), 11-diesticorticosterona e pequenas quantidades de estrogênio (BALDISSEROTTO, 2013).

Há uma comunicação permanente e sincronizada entre o cérebro, a

pituitária e as gônadas. Os hormônios esteroidais, produzidos pelas gônadas, são usados pelo cérebro e pela pituitária como indicadores de *status* sexual. Eles modulam a atividade dos sistemas neuronais influenciando o eixo reprodutivo, pois afetam a expressão de neuropeptídios e neurotransmissores, assim como de seus receptores na pituitária e no cérebro (ZOHAR *et al.*, 2010). Os contaminantes ambientais podem afetar os níveis de hormônios esteroidais e assim, causar prejuízo à reprodução dos animais. Ji *et al.* (2013) estudaram o efeitos de concentrações ambientalmente relevantes de cinco AINES em peixes *Danio rerio* e observaram que o ibuprofeno alterou os níveis hormonais e reduziu o número de ovos eclodidos, alterando assim a geração futura.

Os esteroides podem influenciar no aumento ou redução das secreções da pituitária, por controlar fatores que afetam estas secreções, como os neurotransmissores (YARAHMADI *et al.*, 2013).

Alguns neurotransmissores podem ter importantes implicações em diferentes sistemas, desde hormonais, motores, até comportamentos indispensáveis à sobrevivência e perpetuação da espécie. O eixo HPG também pode ser modulado pelo sistema monoaminérgico. Enquanto a DA pode inibir a liberação do LH, outros neurotransmissores como a noradrenalina (NA) e serotonina (5-HT; 5-hidroxitriptamina) estimulam a liberação de LH, diretamente ou através do GnRH (HACHFI *et al.*, 2012). Estressores ambientais podem afetar rapidamente os níveis de monoaminas e a neurotransmissão em teleósteos e outros vertebrados não mamíferos (SHAW *et al.*, 2009).

Em muitos teleósteos, a dopamina inibe a liberação de gonadotrofinas por meio de um mecanismo que, provavelmente tem diferente significado adaptativo, dependendo da espécie. A dopamina é conhecida por exercer uma vasta gama de efeitos no cérebro de vertebrados e por atuar sobre diversas funções da pituitária, como a secreção de prolactina em mamíferos. A distribuição de DA no cérebro de peixes tem sido extensamente estudada utilizando diferentes técnicas que mostram a existência de um sistema dopaminérgico bem desenvolvido. As fibras dos neurônios dopaminérgicos estão distribuídas no telencéfalo, área pré-óptica e região hipotalâmica. Os receptores de dopamina são acoplados à proteína G. Existem duas classes principais de receptores de DA, estimulatório (D1) ou inibitório (D2) da enzima adenilato ciclase, cada um contendo vários subtipos (ZOHAR *et al.*, 2010).

Muitas pesquisas precisam ainda ser realizadas para caracterizar bioquimicamente e farmacologicamente os subtipos de receptores de serotonina em cérebro de peixes. Os receptores serotoninérgicos são classificados em 5-HT1 (1A, 1B, 1C, 1E), 5-HT2 (2A, 2B), 5-HT4, 5-HT6 e 5-HT7, e são acoplados à proteína G e o receptor 5-HT3 é um receptor do tipo canal iônico (KHAN e DESCHAUX, 1997). A 5-HT estimula a liberação de LH e os antagonistas do receptor 5-HT2 bloqueiam este efeito estimulatório *in vitro* (TRUDEAU *et al.*, 2005).

Dada a importância fisiológica dos neurotransmissores como moléculas de sinalização do sistema nervoso, a mensuração destes tem um potencial significativo como uma ferramenta na avaliação ecotoxicológica (ROSSI, 2013). Mensurar os níveis de neurotransmissores no cérebro de peixes pode levar à melhor compreensão dos efeitos comportamentais e fisiológicos causados pelos poluentes durante a reprodução (HACHFI *et al.*, 2012). Ainda não se sabe os efeitos que contaminantes como os AINES diclofenaco e paracetamol podem exercer sobre os neurotransmissores de peixes e em consequência, sobre a reprodução destes animais, por isso, há necessidade de estudos que avaliem estes parâmetros.

2.4 BIOMARCADORES

As respostas biológicas a poluentes ambientais que podem ser mensuradas indicando a presença, o efeito e em alguns casos o grau de contaminação são denominadas biomarcadores. O biomarcador compreende uma resposta biológica que pode ser mensurada por diversos métodos como, por exemplo, a expressão de uma proteína ou alguma atividade catalítica, uma alteração morfológica em nível tecidual, celular e até molecular (WALKER *et al.*, 1996).

Os efeitos iniciais causados pelos poluentes são observados nos níveis organizacionais bioquímicos e moleculares. Nesse estágio de contaminação as alterações causadas pelos poluentes podem ser reversíveis, de forma que medidas preventivas possam ser tomadas evitando um comprometimento

maior do ambiente. Desta forma, deve ser utilizado o maior número de biomarcadores, como os bioquímicos, genéticos, hematológicos, fisiológicos e morfológicos, com o objetivo de indicar diferentes respostas à presença de estressores distintos (HUGGETT *et al.*, 1992).

2.4.1 Biomarcadores hematológicos

Muitos parâmetros hematológicos em peixes são biomarcadores de efeito potenciais, como enzimas, hematócrito, hemoglobina, proteínas e glicose, que podem ser sensíveis a certos poluentes (VAN DER OOST *et al.*, 2003).

Os estudos hematológicos das diferentes espécies de peixe são de interesse ecológico e fisiológico uma vez que auxiliam na compreensão da relação entre as características sanguíneas, a filogenia, a atividade física e a adaptabilidade dos peixes no ambiente. Os valores hematológicos podem ser influenciados não apenas pelo crescimento, mas também pelas condições ecofisiológicas (TAVARES-DIAS e MORAES, 2004). Assim, a fisiologia do sangue é utilizada cada vez mais frequentemente como um índice do *status* da saúde geral de diversas espécies de peixes (OLIVEIRA-RIBEIRO *et al.*, 2006). As alterações nas variáveis hematológicas são usadas na determinação de efeitos de estressores externos (KORI-SIAKPERE *et al.*, 2006). Devido ao contato direto com o meio aquático, as características hematológicas dos peixes estão relacionadas com a resposta do animal ao ambiente (TAVARES-DIAS *et al.*, 2008).

Em relação ao efeito dos AINES sobre os parâmetros hematológicos de animais aquáticos não há trabalhos na literatura relatando as alterações que estes fármacos podem causar. Por isso, são necessários mais estudos que possibilitem maior conhecimento destes efeitos.

2.4.2 Biomarcadores bioquímicos

Os biomarcadores bioquímicos refletem o *status* saudável do organismo nos níveis mais baixos de organização (celular e molecular) e por apresentarem rápida resposta ao estresse e possuírem grande importância toxicológica, estes biomarcadores podem ser utilizados como indicadores precoces de alterações ambientais (HUGGETT *et al.*, 1992).

O Brasil, a exemplo de países europeus e norte-americanos, vem desenvolvendo estudos para padronizar biomarcadores para as espécies nativas, os quais, posteriormente poderão ser utilizados em programas de monitoramento ambiental (KLEMZ e SILVA DE ASSIS, 2005). Por isso, destaca-se a importância de estudar os efeitos de contaminantes emergentes como os fármacos sobre os biomarcadores bioquímicos de espécies como o *Rhamdia quelen*, nativa da América do Sul.

A transformação metabólica (biotransformação) dos compostos químicos nos organismos é fundamental para alterar a atividade biológica do composto e, conseqüentemente, cessar ou potencializar a interação entre o elemento químico e a célula. A biotransformação inclui numerosos sistemas enzimáticos diferentes, os quais atuam em diversos tipos de substratos. Os principais grupos de enzimas envolvidos nas reações iniciais de biotransformação (fase I) são as monooxigenases flavoproteínas e heme proteínas. As enzimas do CYP450 são heme proteínas que metabolizam os compostos da forma lipofílica a hidrofílica. Essas reações são a fase inicial de desintoxicação e excreção, mas muitas vezes liberam metabólitos reativos ou tóxicos (STEGEMAN e HAHN, 1994). Nos vertebrados, o CYP450 é encontrado, principalmente, no retículo endoplasmático e nas mitocôndrias do fígado, rim, cérebro, intestino delgado, assim como em outros órgãos (BUCHELI e FENT, 1995).

Como o sistema P450 metaboliza tanto substâncias endógenas (ácido araquidônico, outros eicosanóides, bilirrubina e melatonina) como exógenas, a interação entre xenobióticos e processos fisiológicos é possível (RIFKIND, 2006).

Na Fase II de biotransformação, as enzimas mais estudadas são as glutathione S-transferases (GST), UDP-glucuronosiltransferases e

sulfotransferases (HUGGETT *et al.*, 1992). Enzimas de Fase II podem ser utilizadas como biomarcadores tanto de exposição como de efeito, por serem alteradas por vários xenobióticos.

A GST está presente no citosol de muitas células catalisando a conjugação da GSH com compostos de núcleo eletrofílico e também atua na eliminação de radicais de oxigênio e intermediários reativos (RIOL *et al.*, 2000). Além disso, atua no transporte intracelular e na biossíntese de leucotrienos (VAN DER OOST *et al.*, 2003).

Muitos contaminantes ambientais (ou seus metabólitos) podem exercer efeitos tóxicos levando ao estresse oxidativo (WINSTON e DI GIULIO, 1991). A toxicidade do oxigênio ocorre devido ao dano causado por espécies reativas de oxigênio (ROS) citotóxicas. Os produtos da redução do oxigênio molecular podem reagir com macromoléculas celulares ocasionando a inativação enzimática, peroxidação lipídica, dano ao DNA e morte celular. A atividade de enzimas antioxidantes, as quais defendem o organismo contra ROS, são criticamente importantes na desintoxicação (VAN DER OOST *et al.*, 2003).

A superóxido dismutase (SOD) é uma metaloenzima essencial ao sistema de defesa antioxidante, pois catalisa a dismutação do radical superóxido (O_2^-), formando peróxido de hidrogênio. O peróxido de hidrogênio (H_2O_2), por sua vez, será degradado pela catalase ou pela glutathione peroxidase. Existem três formas conhecidas de SOD, a Cu, Zn-SOD, presente no citoplasma de eucariontes, a Mn-SOD, presente em bactérias e mitocôndrias e a Fe-SOD, presente apenas em bactérias (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 2007).

A enzima glutathione peroxidase (GPx) é normalmente encontrada nas mitocôndrias e é utilizada para reduzir diversos tipos de peróxidos, inclusive hidroperóxidos levando-os aos seus correspondentes álcoois, empregando a glutathione (GSH) como cofator e gerando glutathione oxidada (GSSG) como produto (HAYES *et al.*, 1997; HALLIWELL e GUTTERIDGE, 2007). A GPx tem sido utilizada como uma importante ferramenta de indicação de estresse oxidativo, uma vez que não somente atua na redução de peróxido de hidrogênio, como ocorre com a CAT, mas também a uma gama maior de peróxidos, ampliando a avaliação de exposição a poluentes ambientais (MOURENTE, 2002; VAN DER OOST *et al.*, 2003).

A catalase é uma enzima antioxidante que catalisa a decomposição do peróxido de hidrogênio em oxigênio e água. É encontrada em todas as células aeróbicas, em altos níveis no fígado, rim e eritrócitos, e baixos níveis no tecido conjuntivo e cérebro (CHEN, 2003). Quando há um estresse oxidativo, muitos ânions peróxidos são liberados e são transformados em peróxidos de hidrogênio que em seguida são decompostos pela catalase (GUL *et al.*, 2003). Além disso, é capaz de reduzir o risco da formação do radical hidroxil a partir da H_2O_2 via reação de Fenton, catalisada por íons de cobre e ferro (NORDBERG e ARNÉR, 2001).

A glutathiona reduzida (GSH) é um tripeptídeo (γ -glutamil-cisteinil-glicina) que desempenha função fundamental na proteção das células contra danos oxidativos causados por oxidantes, atuando como sequestradora de radicais; na homeostase tiólica; na manutenção do balanço redox da célula e para defesa contra agentes eletrofílicos, como os xenobióticos (MEISTER, 1995). Faz parte dos sistemas antioxidantes não enzimáticos, que reduz hidroperóxidos, e é responsável por sequestrar ROS e proteger membranas do estresse oxidativo (CHANG *et al.*, 2003). É utilizada por enzimas como glutathiona peroxidase e glutathiona S-transferase (MEISTER, 1995).

A lipoperoxidação (LPO) em uma célula causa a perda da integridade da membrana celular e pode tornar o ambiente favorável ao ataque do DNA além de alterar o processo de transporte, a transdução de sinais mediada por receptores e o gradiente de íons e metabólitos (HIGUCHI, 2003). Durante a lipoperoxidação os grupos hidroperóxidos ligam-se aos sítios hidrofóbicos dos ácidos graxos insaturados, levando à perturbação nas interações lipídicas e, conseqüentemente, a alterações estruturais das biomembranas e lipoproteínas; e também, à formação de radicais livres, que podem induzir a modificação secundária de outros constituintes da membrana (GIROTTI, 2002).

As proteínas podem ser modificadas por reações envolvendo espécies reativas de oxigênio. Entre essas reações, a carbonilação tem atraído grande atenção devido à sua natureza irreversível e irreparável. Proteínas carboniladas são marcadas para a proteólise pelo proteassoma, mas podem escapar da degradação e formar agregados de alto peso molecular, que se acumulam com o tempo. Tais agregados podem tornar-se citotóxicos e têm sido associados com um grande número de doenças relacionadas com a idade,

incluindo a doença de Parkinson, Alzheimer, e câncer. Entre as causas da carbonilação de proteínas estão a redução do sistema de defesa antioxidante, o aumento da produção de ROS, a redução da capacidade de remoção de proteínas oxidadas ou aumento da susceptibilidade de proteínas para o ataque oxidativo. As enzimas clássicas envolvidas na desintoxicação de ROS como a superóxido dismutase, catalases e peroxidases, são os principais membros da defesa celular também contra a carbonilação de proteínas (NYSTRÖM, 2005).

Os compostos tóxicos são combatidos pelas defesas antioxidantes não enzimáticas (vitaminas C, A e E e GSH), e defesas antioxidantes enzimáticas (SOD, CAT, GPx e GST). Uma prevalência de processos pró-oxidantes leva a um aumento de danos oxidativos, situação esta denominada estresse oxidativo. Dentre esses danos estão a lipoperoxidação, oxidação de proteínas e o dano ao DNA (LIVINGSTONE, 2001).

2.4.3 Biomarcadores genéticos

A detecção e a quantificação de efeitos genotóxicos decorrentes da exposição aos poluentes podem ser feitas por meio de biomarcadores de exposição e efeito como o Ensaio Cometa e o teste do Micronúcleo Písceo (VAN DER OOST *et al.*, 2003). O dano de DNA é constantemente induzido e reparado em animais. Assim, quando danos genéticos permanecem, a homeostase celular foi alterada (RAMSDORF *et al.*, 2009).

Uma das técnicas mais utilizadas para detecção de genotoxicidade é o ensaio Cometa, devido à sua capacidade de detectar lesões mutagênicas (KAMMANN *et al.*, 2001). O ensaio Cometa (*Single Cell Gel Electrophoresis*) é uma técnica rápida e eficiente quando usada para quantificar as lesões e para detectar os efeitos do reparo no DNA em células. O teste consiste em fazer passar uma corrente elétrica pelas células lisadas da amostra em análise, embebidas em gel de agarose de baixo ponto de fusão, sobre lâminas para microscopia (GREEN *et al.*, 1992; BETTI *et al.*, 1994). As células são englobadas em gel e espalhadas sobre uma lâmina e submetidas a uma corrente elétrica que promove uma migração dos segmentos de DNA livres,

resultantes de quebras, para fora do núcleo. Após a eletroforese, as células que apresentam núcleo redondo são identificadas como normais, sem dano detectável no DNA. Já as células lesadas são identificadas visualmente por uma espécie de cauda, similar a um cometa, formada pelos fragmentos de DNA que foram “arrastados” pela corrente elétrica da eletroforese.

O Ensaio Cometa pode ser aplicado em células em divisão ou não, e células de tecidos que são alvo de substâncias mutagênicas e carcinogênicas. As células sanguíneas são mais comumente utilizadas para a realização do teste porque são de fácil obtenção e não é necessário fazer dissociação celular. No entanto, outros tecidos podem ser utilizados, pois alguns poluentes causam efeitos genotóxicos tecido-específicos. Os tecidos mais investigados são o fígado (principal órgão de metabolismo), brânquias (devido ao contínuo contato com a água) e rins (anterior=órgão hematopoiético e posterior= órgão excretor dos peixes) (BELPAEME *et al.*, 1998). O ensaio Cometa tem sido utilizado na genética médica e toxicológica, medicina ambiental, biomonitoramento ambiental, radiação biológica, processos de reparo de DNA (LEITE *et al.*, 2014).

Além do Ensaio Cometa, outra técnica usada para avaliar genotoxicidade é o Teste do Micronúcleo Píscico, o qual investiga danos cromossômicos. O teste do micronúcleo foi proposto por Heddle (1973) e Schmid (1975) para avaliar danos cromossômicos *in vivo* em populações de células em divisão, como as da medula óssea. Foram identificados, primeiramente, em eritrócitos da medula óssea de ratos e chamados de corpúsculos de Howell-Jolly (KIRSCH-VOLDERS *et al.*, 2003). Micronúcleos são formados pela condensação de fragmentos de cromossomos ou cromossomos inteiros que não foram incluídos no núcleo principal. Podem ser induzidos por agentes que causam quebras no DNA ou interferem com a formação do fuso (AL-SABTI e METCALFE, 1995).

O ensaio foi adaptado para células de peixes por Hoffmann e Raat (1982). Micronúcleos em peixes podem ser visualizados em diferentes tipos de células: eritrócitos, células branquiais, renais e hepáticas. O uso de eritrócitos é mais utilizado porque evita preparações complexas e a eutanásia dos animais. O teste de micronúcleo em eritrócitos de peixe foi validado em laboratório com diferentes espécies após exposição a um grande número de agentes

genotóxicos. Além disso, é frequentemente aplicado para avaliação de genotoxicidade em água doce e ambiente marinho. A frequência de micronúcleos em espécies água doce demonstrou ser um biomarcador sensível para detectar danos genotóxicos induzidos por descargas urbanas ou industriais e a contaminação por diferentes poluentes como derivados do petróleo, metais pesados e pesticidas (BOLOGNESI e HAYASHI, 2011). No entanto, ainda há carência de informação sobre o efeito genotóxico de contaminantes emergentes, como os fármacos, em animais aquáticos.

2.4.4 Biomarcadores morfológicos

A análise morfológica permite revelar quais os órgãos mais afetados e assim, identificar a sensibilidade do organismo em relação aos contaminantes. Injúrias teciduais agudas são vistas quando os níveis de contaminantes são altos. Quando a concentração do agente tóxico gera injúria celular, mas não a morte, alterações adaptativas podem ser observadas nas células afetadas – é o caso das exposições crônicas (VAN DER OOST *et al.*, 2003). A histopatologia de fígado e rim merece destaque na avaliação dos efeitos de poluentes, uma vez que estes órgãos metabolizam e excretam o poluente, respectivamente.

O fígado dos peixes é mais susceptível à ação de poluentes do que o dos mamíferos graças à lentidão do fluxo sanguíneo em relação ao débito cardíaco. Além disso, o fluxo biliar é cerca de 50 vezes mais lento que o de mamíferos, tornando mais lenta a depuração de produtos tóxicos. Então os poluentes que chegam ao fígado pela corrente sanguínea exercerão seus efeitos nos hepatócitos por maior tempo do que o fariam em mamíferos. Foi também sugerido que em peixes as substâncias tóxicas possam causar transtornos hepáticos em concentrações mais baixas do que as necessárias para mamíferos (CAMPOS *et al.*, 2008).

O rim é um dos órgãos mais afetados por poluentes, pois atua na excreção destes. Nos teleósteos, o rim localiza-se dorsalmente, junto à coluna vertebral e é dividido em rim anterior (ou cefálico ou cranial), que contém na

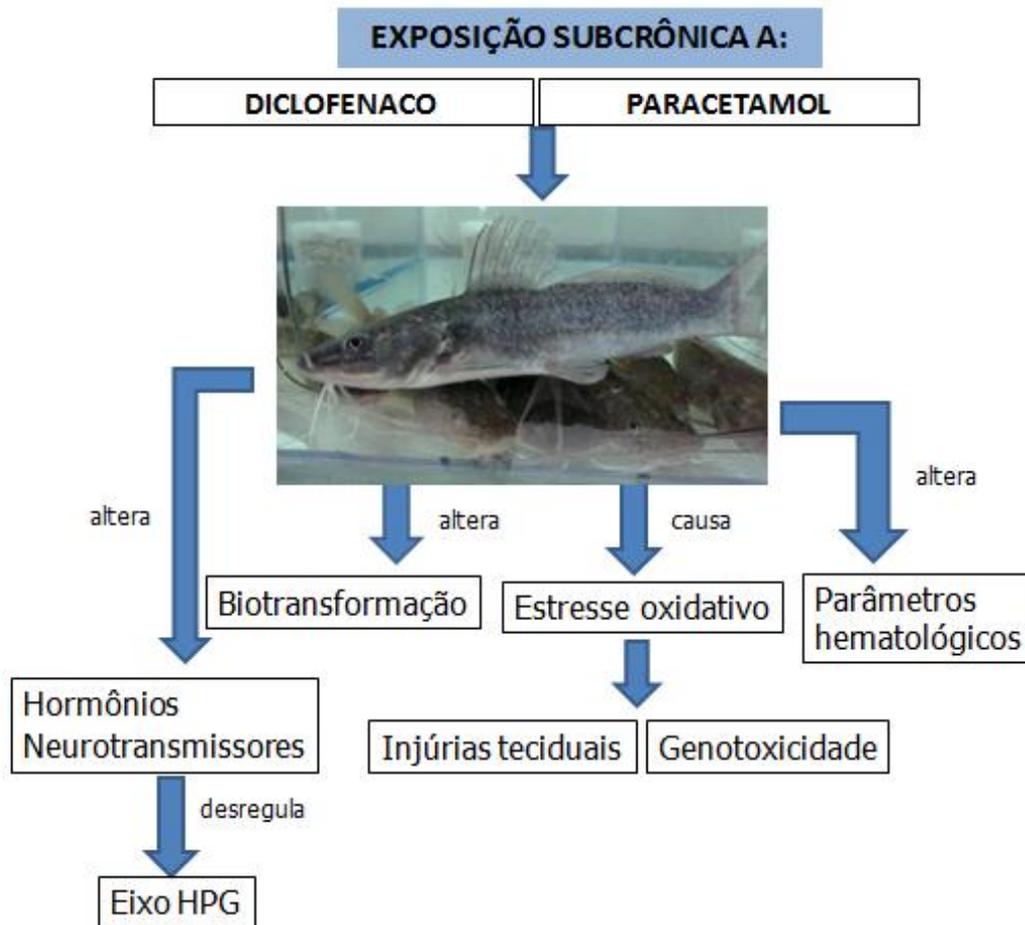
grande maioria dos peixes, tecido hematopoiético e função endócrina e rim posterior que possui as unidades filtrantes e os diversos túbulos (KOBELKOWSKY e KOBELKOWSKY, 2013).

Como recebe grande fluxo sanguíneo, o rim posterior pode ser considerado órgão alvo para agentes químicos e assume posição de destaque quando se deseja avaliar os efeitos tóxicos de xenobióticos por ser um órgão de excreção. Possui inúmeros néfrons, sua unidade funcional excretória. Cada néfron é composto por um túbulo renal e um corpúsculo renal; este último é composto por um glomérulo envolto por uma cápsula de Bowmann. As regiões do túbulo são túbulo proximal e distal e ducto coletor (BANERJEE e BHATTACHARYA, 1994). Alterações morfológicas no rim podem ocorrer em razão da introdução de poluentes na água e podem ser utilizadas como parâmetros para o monitoramento ambiental (SILVA e MARTINEZ, 2007).

Os efeitos dos contaminantes emergentes, diclofenaco e paracetamol, sobre tecidos de peixe foram investigados apenas em trutas (SCHWAIGER *et al.*, 2004; TRIEBSKORN *et al.*, 2004, HOEGER *et al.*, 2005, MEHINTO *et al.*, 2010, MEMMERT *et al.*, 2013). Portanto, há carência de informações sobre os efeitos destes fármacos nos tecidos de outras espécies aquáticas.

A utilização de biomarcadores em mais de um nível de organização biológica possibilita a obtenção de diferentes respostas que podem ser comparadas, obtendo-se assim, resultados mais consistentes sobre os efeitos dos contaminantes ambientais (JESUS e CARVALHO, 2008).

3. HIPÓTESE



4. OBJETIVOS

4.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar os efeitos bioquímicos, genéticos, hematológicos, morfológicos e reprodutivos resultantes da exposição subcrônica a concentrações ambientalmente relevantes de diclofenaco e paracetamol em *Rhamdia quelen*.

4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar os níveis de estradiol e testosterona após a exposição subcrônica ao diclofenaco e paracetamol.
- Avaliar os níveis de neurotransmissores relacionados à reprodução após a exposição subcrônica ao diclofenaco e ao paracetamol.
- Analisar os índices hepato e gonadossomáticos após a exposição subcrônica ao diclofenaco e paracetamol.
- Avaliar os parâmetros hematológicos após a exposição subcrônica ao diclofenaco e paracetamol.
- Avaliar danos ao DNA após a exposição subcrônica ao diclofenaco e paracetamol.
- Avaliar a biotransformação e o sistema antioxidante após a exposição subcrônica ao diclofenaco e paracetamol.
- Avaliar a morfologia de fígado, rim e gônadas após a exposição subcrônica ao diclofenaco e paracetamol.

5. MATERIAL E MÉTODOS

5.1 FÁRMACOS

Paracetamol (Acetaminophen, A5000) e Diclofenaco de sódio (D6899) foram obtidos de Sigma Aldrich.

5.2. ANIMAL EXPERIMENTAL: *Rhamdia quelen*

O peixe *Rhamdia quelen* (QUOY e GAIMARD, 1824, Siluriformes, Heptapteridae) (FIGURA 7), conhecido popularmente como jundiá, é uma espécie de água doce, endêmica da América do Sul (BARCELLOS *et al.*, 2003), ocorrendo do sul do México ao centro da Argentina (SILFVERGRIP, 1996).



FIGURA 7. Exemplo de *Rhamdia quelen* de 20 cm.
FONTE: A autora (2013).

Esta espécie é onívora com preferência por peixes, crustáceos, insetos, restos vegetais, e detritos orgânicos (MEURER e ZANIBONI FILHO, 1997). O

comprimento das fêmeas é de aproximadamente 66,5 cm e dos machos de 52 cm (WEIS, 1980).

Alcança a maturidade sexual já no primeiro ano de vida. Os machos iniciam o processo de maturação gonadal com 13,4 cm e as fêmeas com 16,5cm. A partir de 17 cm todos os indivíduos estão potencialmente aptos para reprodução (NARAHARA *et al.*, 1985). Não apresenta cuidado parental com os ovos ou com as larvas, e as desovas ocorrem em águas calmas e claras com fundo rochoso. Seu desenvolvimento embrionário é rápido, com desenvolvimento larval entre três e cinco dias (GOMES *et al.*, 2000).

Esta espécie nativa apresenta grande importância econômica na Região Sul, pois é amplamente utilizada em viveiros de piscicultura (BOMBARDELLI *et al.*, 2006). Por ser de fácil domesticação e adaptação às condições de cultivo, atrai a atenção de pesquisadores e produtores e isto vêm permitindo sua inclusão na lista de espécies de peixes criadas comercialmente no Brasil (CARNEIRO e MIKOS, 2005).

O jundiá tem sido amplamente estudado em diversos aspectos, como sua ecologia (CARNEIRO e MIKOS, 2005; GOMIERO *et al.*, 2007), fisiologia (BARCELLOS *et al.*, 2002; HIGUCHI *et al.*, 2011) e suas respostas à exposição a agrotóxicos (DE MENEZES *et al.*, 2011; MELA *et al.*, 2013), metais (WITECK *et al.*, 2011; PRETTO *et al.*, 2010) e anti-inflamatórios (PAMPLONA *et al.*, 2011; GHELFI, 2014). Estes trabalhos demonstram que o jundiá é uma espécie sensível ao efeito de contaminantes, pois os trabalhos citados avaliaram diversos biomarcadores como: alterações bioquímicas e estresse oxidativo, neurotoxicidade, danos genéticos, alterações morfológicas em fígado, rim e brânquias, alterações em parâmetros hematológicos e fisiológicos e parâmetros reprodutivos (motilidade espermática, fertilização e eclosão de ovos) e o jundiá demonstrou ser sensível à toxicidade causada pelos contaminantes analisados.

5.3 OBTENÇÃO, MANUTENÇÃO DOS ANIMAIS E DESENHO EXPERIMENTAL

Machos adultos da espécie *Rhamdia quelen* (jundiá; $19,8 \pm 0,4$ cm e $81,4 \pm 4,6$ g para o experimento com diclofenaco; $25,9 \pm 0,7$ cm e $154,7 \pm 13,2$ g para o experimento com paracetamol) foram adquiridos do Patronato Santo Antônio- Piscicultura da Pontifícia Universidade Católica do Paraná e transportados ao Laboratório de Toxicologia Ambiental do Departamento de Farmacologia da UFPR sendo mantidos durante 30 dias em aquários estoques de 120 L para aclimatação, com fotoperíodo de 12 h claro: 12 h escuro, aeração constante e temperatura da água de 28 ± 2 °C. Os parâmetros de qualidade da água como pH, amônia e saturação de oxigênio foram avaliados durante o experimento. Este projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da Universidade Federal do Paraná sob o nº 652.

Após aclimatação, os jundiás foram dispostos em aquários de 100 L contendo 10 animais, que compuseram cada grupo do experimento. Um grupo controle sem adição de fármaco à água foi mantido durante todo o período experimental. Os demais grupos foram expostos às concentrações de 0,2; 2 e 20 µg/L de diclofenaco, sendo a concentração de 2 µg/L correspondente à detectada no ambiente aquático (efluentes de estações de tratamento de esgoto) segundo Santos *et al.*, (2010). As concentrações de 0,25 e 2,5 µg/L de paracetamol foram utilizadas, sendo a concentração de 2,5 µg/L encontrada no ambiente aquático (efluentes de estações de tratamento de esgoto) segundo Fent *et al.* (2006) e Gómez *et al.*, (2007). Um terço da água dos aquários foi renovada a cada 24 h e a concentração do fármaco reposta a cada 12 h para completar a concentração total. O procedimento de reposição do fármaco foi baseado em estudo anterior de degradação do diclofenaco realizado em condições controladas de laboratório como presença de luz, aeração da água e temperatura de 25°C (GHELFI, 2014) Neste estudo, observou-se uma degradação de 50% do fármaco a cada 12 h. O procedimento de reposição do fármaco a cada 12 h também foi realizado na exposição ao paracetamol. Além disso, a reposição teve o objetivo de simular a condição real de liberação contínua de poluentes como ocorre na liberação de esgoto.

Os animais foram alimentados diariamente com ração comercial. Após os 21 dias de exposição os animais foram anestesiados em água contendo benzocaína 1% e o de sangue foi colhido (FIGURA 8) com seringa heparinizada por punção da veia caudal, para as análises hematológicas, ensaio cometa, teste do micronúcleo Pisco e dosagens hormonais. Os peixes foram então, eutanasiados por secção medular. O comprimento total, o peso do peixe, o peso do fígado e das gônadas foram aferidos.

O índice hepatossomático foi calculado por: peso do fígado / peso do corpo X 100 e o índice gonadossomático foi calculado por peso da gônada / peso do corpo X 100.



FIGURA 8. Colheita de sangue de *Rhamdia quelen*.
FONTE: A autora (2013).

Os fígados e as gônadas (FIGURA 9) retirados foram armazenados em freezer -80°C para as análises bioquímicas. Um fragmento do rim posterior (FIGURA 10), do fígado e das gônadas foi retirado para a análise histológica e fixado em solução ALFAC (álcool 80%, formol e ácido acético glacial). Um filamento de fígado e rim posterior foi adicionado a tubos de 2 mL contendo 1 mL de soro fetal bovino e mantido protegido da luz para o ensaio cometa. O cérebro foi dissecado (FIGURA 11) e o cerebelo foi utilizado para dosagem de neurotransmissores.

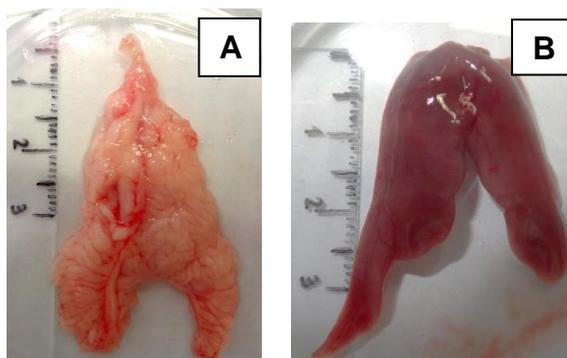


FIGURA 9. Gônadas (A) e Fígado (B) de *Rhamdia quelen*.
FONTE: A autora (2013).

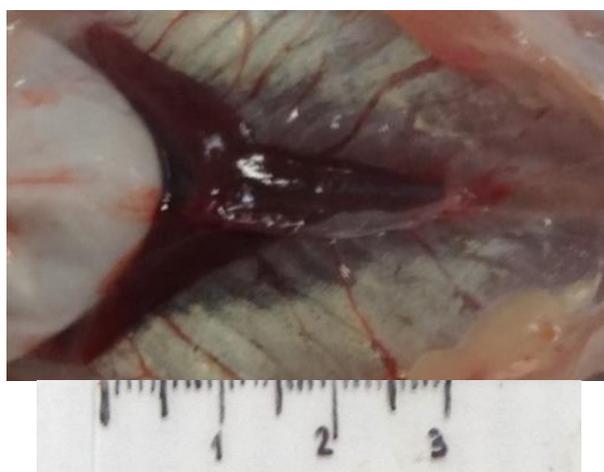


FIGURA 10. Rim posterior de *Rhamdia quelen*.
FONTE: A autora (2013).



FIGURA 11. Cérebro de *Rhamdia quelen*.
FONTE: A autora (2013).

5.4 BIOMARCADORES HEMATOLÓGICOS

Foram realizadas contagens total e diferencial de células sanguíneas, de acordo com metodologias e nomenclaturas descritas por Tavares-Dias *et al.* (1999; 2000).

A contagem de eritrócitos (Er) sob microscópio ótico em câmara de Neubauer foi realizada diluindo o sangue em formol citrato (OLIVEIRA-JUNIOR *et al.*, 2009). A taxa de hemoglobina (Hb) foi determinada com o auxílio do espectrofotômetro, segundo o método de cianometahemoglobina (5 mL de reagente de Drabkin + 20 µL de sangue) (COLLIER, 1944 e DRABKIN, 1946). O hematócrito (Ht) foi realizado por centrifugação em microcentrífuga do sangue total (5 min, 12.000 rpm) em tubos capilares (HINE, 1992). Os índices eritrocitários volume corpuscular médio - VCM ($(Ht / Er) \times 10$), hemoglobina corpuscular média - HCM ($(Hb / Er) \times 10$) e concentração de hemoglobina corpuscular média - CHCM ($(Hb / Ht) \times 100$) foram calculados utilizando os valores de eritrócitos, hemoglobina e hematócrito, segundo Wintrobe (1934).

Conjuntamente com a colheita de sangue, foram confeccionadas extensões sanguíneas, que depois de coradas com May-Grunwald- Giemsa-Wright segundo Tavares-Dias e Moraes (2004), foram classificadas em trombócitos e leucócitos. A contagem diferencial de leucócitos foi realizada em 100 células (TAVARES-DIAS *et al.*, 1999, 2002).

5.5 DOSAGENS HORMONAIS

O sangue foi centrifugado por 5 min a 2.000 x g para a separação do plasma e estocado em freezer -20°C até as análises. A testosterona e o estradiol foram analisados utilizando a metodologia *microparticle enzyme immunoassay* (Abbot AxSYM reagent pack; fabricante Abbot, IL, USA). Os resultados foram expressos em ng/dL e pg/mL, respectivamente.

5.6 BIOMARCADORES GENÉTICOS

O ensaio cometa foi realizado de acordo com Speit e Hartmann (1999). Para o ensaio cometa com eritrócitos, uma gota de sangue foi misturada a 1 mL de soro fetal bovino. O fígado e o rim posterior foram colocados em tubos contendo 2 mL de soro fetal bovino e depois o tecido foi homogeneizado à 15.000 rpm (Tecnal – TE-103). O material foi armazenado em refrigerador por 24 horas antes da montagem das lâminas. A confecção das lâminas foi realizada com 10 µL de suspensão celular misturada a 120 µL de agarose de baixo ponto de fusão, essa mistura foi então disposta sobre uma lâmina de microscopia, previamente coberta com uma fina camada de agarose 1,5%. Então, cobriu-se com uma lamínula e ficou sob refrigeração por 15 minutos. Após esse tempo, a lamínula foi retirada e as lâminas foram colocadas em solução de lise por 24 horas a 4 °C. As lâminas foram transferidas para a cuba de eletroforese, onde ficaram por 20 minutos imersas em tampão de eletroforese (300 mM NaOH /1 mM EDTA) com pH > 13 para que ocorresse o desenrolamento parcial do DNA. A eletroforese foi realizada a 300 mA, 25 V por 25 minutos e depois as lâminas foram neutralizadas em 0,4 M de Tris, pH 7,5; fixadas em etanol absoluto por 5 minutos e coradas com 20 µL de brometo de etídeo (10 µg/mL). Os cometas foram classificados usando-se um microscópio de epifluorescência Zeiss. Para cada peixe foram analisados 100 nucleoides (KOBAYASHI *et al.*, 1995), usando a classificação visual baseada na migração de fragmentos de DNA da seguinte forma: classe 0 (sem dano aparente), classe 1 (dano pequeno), classe 2 (dano médio), classe 3 (dano extenso) e classe 4 (dano máximo). Os escores foram calculados pela multiplicação do número de nucleoides encontrados em cada classe pelo número da classe.

Para se verificar a frequência de micronúcleos, foi empregada a técnica descrita por Hooftman e Raat (1982). Uma gota de sangue foi colocada sobre uma lâmina de microscopia e imediatamente foi realizado o esfregaço, resultando em uma lâmina para cada animal. As lâminas foram deixadas em temperatura ambiente por 24 horas para secagem e depois fixadas em etanol absoluto por 30 minutos. Depois de secas, as lâminas foram coradas em

Giemsa 10% diluída em tampão fosfato, pH 6,8. De cada lâmina foram analisadas 2000 células sob magnificação de 1.000 vezes.

5.7 BIOMARCADORES BIOQUÍMICOS

As amostras de tecidos, foram descongeladas em gelo moído e pesados, sendo homogeneizados na proporção 1:10 (m/V) em tampão fosfato 0,1 M pH 7,0 com auxílio de micro-homogeneizador. O homogeneizado foi centrifugado por 30 minutos a 15.000 x g a 4°C, obtendo-se assim o sobrenadante, do qual foram retiradas alíquotas para medir a atividade da superóxido dismutase, catalase, glutathione peroxidase, etoxiresorufina-O-deetilase, glutathione S-transferase, a concentração de glutathione reduzida, a concentração de proteínas carboniladas, a lipoperoxidação e a concentração de proteína.

5.7.1 Atividade da etoxiresorufina-O-deetilase (EROD)

A análise da EROD foi realizada segundo o método de Burke e Mayer (1974). Em microplaca de fluorescência foi adicionado 50 µL de amostra e 200 µL de solução reação (Tampão Tris /NaCl 0,1 M pH 7,5, 7-etoxiresorufina 2,6 µM) e incubados por cinco minutos. Após foram acrescentados 10 µL NADPH 2,6 mM. A leitura foi realizada em fluorímetro de comprimento de onda 530 nm excitação e 590 nm emissão por 10 min a 27 °C.

5.7.2 Atividade da glutathione S-transferase (GST)

O método foi proposto por Keen *et al.* (1976), e seu princípio é a conjugação do CDNB com a GSH pela ação da GST, formando um tioéter que pode ser monitorado pelo aumento da absorbância.

O sobrenadante foi diluído em tampão fosfato de potássio 0,1M, pH 6,5. Em microplaca foram pipetados 20 μ L de amostra, seguido de 180 μ L da solução reação, composta por CDNB (1-cloro-2,4-dinitrobenzeno) 3,0 mM e GSH (glutathiona reduzida) 3,0 mM. A leitura foi realizada em espectrofotômetro SYNERGY HT, a 340 nm e a atividade expressa em $\text{nmol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mgproteína}^{-1}$.

5.7.3 Atividade da superóxido dismutase (SOD)

Para a análise da atividade da SOD foi utilizado o método proposto por Gao *et al.* (1998) e baseia-se na capacidade da SOD em inibir a auto-oxidação do pirogalol. O sobrenadante foi diluído de 1:10 (ou 10% V/V) em tampão fosfato de potássio 0,1M, pH 7,0. Em um microtubo foram adicionados 885 μ L de tampão (Tris-base 1M / EDTA 5 mM pH 8,0) a 40 μ L de amostra. Após agitação em vórtex, 50 μ L de pirogalol 15 mM foram adicionados e a solução foi incubada por 30 minutos. A reação foi interrompida com 25 μ L de HCl 1N. Em microplaca foram adicionados 300 μ L por poço e a leitura foi realizada em espectrofotômetro SYNERGY HT a 440 nm. Foi realizado concomitantemente, um controle por amostra com adição dos reagentes, mas sem incubação sendo este valor igual a 100%. A quantidade de SOD que inibiu a reação em 50% (IC50) equivale a 1 unidade (U) de SOD. Os resultados foram expressos em U de SOD/mg de proteína.

5.7.4 Atividade da catalase (CAT)

A atividade da CAT foi avaliada segundo o método proposto por Aebi (1984), que se baseia no consumo do peróxido de hidrogênio exógeno pela catalase, gerando oxigênio e água, o que pode ser mensurado por espectrofotometria.

O sobrenadante foi diluído na proporção de 1:5 (ou 5% V/V) em tampão fosfato 0,1M, pH 7,0. Em microplaca foram pipetados 5 μ L de amostra seguido

de 295 μL de solução reação (Tampão Tris –base 1M / EDTA 5 mM pH 8,0, peróxido de hidrogênio 20 mM e água MilliQ). A leitura foi realizada em espectrofotômetro SYNERGY HT com comprimento de onda a 240 nm e a atividade expressa em $\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mgproteína}^{-1}$.

5.7.5 Atividade da glutathiona peroxidase (GPx)

O análise da atividade da GPx foi realizada através do método de Paglia e Valentine (1967) e baseia-se na medida do decréscimo de absorbância a 340 nm, promovido durante a redução da GSSG, catalisada pela glutathiona redutase (GR), em presença de NADPH. A velocidade de oxidação do NADPH é proporcional à velocidade de produção de GSSG a partir de GSH, em presença de peróxido, catalisada pela GPx. A atividade desta enzima foi mensurada utilizando-se 10 μL do sobrenadante e 130 μL do meio de reação (tampão fosfato de sódio 0,1 M, pH 7,0; 2 mM de azida sódica; 0,2 mM de β -NADPH, 1,54 U/ml de GR e 2 mM de GSH). As amostras foram pipetadas em microplaca e após 2 minutos, 60 μL de peróxido de hidrogênio (1,5 mM) foi adicionado. A leitura foi realizada em espectrofotômetro SYNERGY HT, a 340 nm e a atividade expressa em $\text{nmol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mgproteína}^{-1}$.

5.7.6 Lipoperoxidação (LPO)

A análise da LPO foi realizada através da avaliação da concentração de hidroperóxidos pelo ensaio FOX (*Ferrous Oxidation / Xylenol Orange Method*), proposto por Jiang *et al.* (1992).

O sobrenadante das amostras foi ressuspendido em metanol na proporção 1:2 (v/v) e centrifugado 10 minutos a 10.000 x g a 4°C. Em seguida 100 μL do sobrenadante foi pipetado em microtubos e incubado com 900 μL da solução reação (laranja de xilenol 100 μM , H_2SO_4 25 mM, BHT 4 μM , sulfato ferroso amoniacal 250 μM , metanol 90%) por 30 min. A leitura foi realizada a

570 nm em espectrofotômetro SYNERGY HT. Os resultados foram expressos em μmol de hidroperóxidos. mgproteína^{-1} .

5.7.7 Concentração de glutathiona reduzida (GSH)

A análise da concentração de GSH baseou-se no método proposto por Sedlak e Lindsay (1968). A cada 200 μL de sobrenadante foram adicionados 50 μL de ácido tricloroacético (TCA) a 50% para precipitação proteica. Em seguida, a amostra foi centrifugada a 10.000 x g por 10 min a 4°C. Para as leituras, foram adicionados 50 μL do sobrenadante da amostra e 230 μL de tampão (Tris-base 400 mM, pH 8,9) a uma microplaca. Como branco, será utilizado 230 μL do tampão Tris-base a 400 mM mais 50 μL de TCA a 10%. Finalmente, 20 μL de DTNB (ácido 5,5'-ditio-bis-2-nitrobenzóico) 2,5 mM (em metanol a 25%, tampão Tris-base 400 mM, pH 8,9) foram acrescentados. A leitura foi realizada a 415 nm em espectrofotômetro SYNERGY HT. Os resultados foram expressos em μmol GSH. mgproteína^{-1} . A determinação da concentração de GSH foi realizada por comparação com uma curva-padrão de GSH (0; 8,14; 16,27; 32,54; 65,08; 130,16 e 260,32 μM GSH).

5.7.8 Concentração de proteínas carboniladas (PCO)

O conteúdo de proteínas carboniladas foi determinada pelo método de Levine *et al.* (1994) que se baseia na reação da 2,4-dinitrofenilhidrazina (DNPH) com proteínas carboniladas/oxidadas (apenas do tipo aldeído e cetona) formando dinitrofenilhidrazonas que podem ser detectadas a 358-370. Carbonilas com grupos funcionais ácidos carboxílicos, amidas e ésteres não podem ser detectadas por DNPH.

Um volume de 100 μL de sobrenadante foi transferido para um tubo de 2 mL e misturado a 500 μL solução de DNPH (10 mM de 2,4-dinitrofenilhidrazina em 2 M de HCl). Para o branco HCl 2 M (sem adição de DNPH) foi utilizado. As

amostras foram incubadas a 30 °C por 90 minutos. Após, as proteínas foram precipitadas com 500 µL de ácido tricloroacético 28% e centrifugação a 9.000 x g por 10 min. Os pellets de proteínas foram lavados duas vezes por suspensão em etanol/acetato de etila (1:1) seguida por centrifugação. As proteínas foram solubilizadas em cloreto de guanidina 6 M e os tubos foram centrifugados a 9.000 x g por 3 min para remover materiais insolúveis. O conteúdo de proteínas carboniladas foi determinado espectrofotometricamente a 363 nm.

5.7.9 Concentração de proteínas totais

Para a quantificação da proteína nas amostras foi utilizado o método de Bradford (1976), com curva padrão de soro de albumina bovina.

5.8 BIOMARCADORES MORFOLÓGICOS

Para a análise histopatológica foram utilizados os tecidos de fígado, rim e gônadas. As gônadas foram fixadas em solução ALFAC (álcool 80%, formol e ácido acético glacial) por 20 horas e fígado e rim posterior por 16 horas. Posteriormente, foram desidratados em alcoóis (70%, 80%, 90% e 100%), diafanizados em xilol e incluídas em Paraplast[®]. Então, foram cortadas em micrótomo manual na espessura de 5 µm (fígado e rim) e 7 µm (gônadas) e corados com hematoxilina-eosina (HE). O Paraplast[®] foi removido das lâminas com xilol, as lâminas foram hidratadas em uma série decrescente de álcool etílico e por último em água destilada e as lâminas imersas em hematoxilina (corante básico) por 1 min e em eosina (corante ácido) por 40 s. As lâminas foram lavadas em água corrente por 10 min e em água destilada, desidratadas e série crescente de álcool etílico, diafanizadas em xilol e montadas com resina Entellan[®]. Posteriormente, as lâminas foram analisadas em microscopia de luz para descrição de lesões patológicas por meio da metodologia descrita por Schwaiger *et al.* (1997). Sob objetiva de 40x, foram observados 10 campos por corte e a intensidade das lesões classificada conforme descrição abaixo:

- Lesão discreta (1): 2-3 campos com lesão focal
- Lesão moderada (2): até 6 campos com lesão focal
- Lesão severa (3): todos os campos com lesão focal ou generalizada.

Para fígado e gônadas também foram realizadas as colorações de Sudan Black B e do ácido Periódico de Schiff (PAS) com objetivo de visualizar depósitos de lipídios e carboidratos, respectivamente.

Para a coloração de Sudan Black B, fígado e gônadas passaram por uma etapa de crioproteção sendo imersos em solução de sacarose 10% por 24 h, de sacarose 20% por 24 h e sacarose 30% por 24h. Após este período, os tecidos foram emblocados em resina *Tissue-Tek® O.C.T™ Compound and Cryomolds®* e cortados em criostato na espessura de 10 µm. Os cortes foram aderidos em lâminas gelatinizadas. Para a coloração, as lâminas foram imersas em álcool 70% por 1 min e coradas com Sudan Black B por 20 min. Após lavagem em água destilada para a remoção do corante, as lâminas foram contra-coradas com hematoxilina por 40 s. Foram então montadas em glicerina e seladas com esmalte. O Sudan Black B cora lipídios, gorduras neutras, fosfolipídios e ésteres.

Para a coloração PAS, os cortes obtidos em micrótomo foram aderidos às lâminas com auxílio de albumina. As lâminas foram hidratadas em uma série decrescente de álcool etílico e por último em água destilada. Foram então, imersas em ácido Periódico 0,5%, lavadas em água e imersas em reativo de Schiff por 20 min. Foram então lavadas em água sulfurosa por 5 min e contra-coradas com hematoxilina por 40 s. A seguir, procedeu-se a lavagem em água corrente e água destilada, as lâminas foram desidratadas em uma série crescente de álcool etílico, diafanizadas em xilol e montadas com resina Entellan®. O PAS é importante na citoquímica de carboidratos, pois ácido periódico oxida compostos com grupos hidroxilas livres vicinais que combinam com o reativo de Schiff obtendo a coloração rósea.

5.9 NÍVEIS DE NEUROTRANSMISSORES

Níveis endógenos dos neurotransmissores dopamina (DA), serotonina

(5-HT), 3,4-dihidroxiifenilacético (DOPAC, o principal metabólito da dopamina), ácido 5-hidroxiindolacético (5-HIAA, o principal metabólito da serotonina) foram analisados por HPLC de fase reversa com detecção eletroquímica. As amostras de cérebro foram homogeneizadas com ultrassom (Sonics, Newtown, CT, USA) em 0,1 M ácido perclórico. Após centrifugação a 10.000 x *g* por 20 min, 20 µL do sobrenadante foi injetado no cromatógrafo. A coluna de fase reversa utilizada foi a Synergi Fusion-RP C-18 (150 x 4,60 mm, 4 µm tamanho de partícula; Phenomenex), e eletrodos de trabalho (5011A célula analítica, ESA), E1=+100 and E2=+450 mV. A fase móvel utilizada para a análise foi constituída de: ácido cítrico 20 g; EDTA 40 mg; ácido octanossulfônico 200 mg; 900 mL água de miliQ; metanol 10%; pH 4,0; fluxo de 1,0 mL/min. Os cromatogramas dos neurotransmissores foram integrados e analisados pelo software *LC Solutions* (Shimadzu). As razões DOPAC/DA e 5-HIAA/5-HT foram calculadas para avaliar a atividade dopaminérgica e serotoninérgica, respectivamente.

5.10 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A normalidade dos dados foi testada pelo teste de Kolmogorov–Smirnov. Os resultados dos experimentos foram analisados estatisticamente pelo programa *GraphPad Prism* 5.00. Quando os dados obedeceram aos critérios de normalidade utilizou-se ANOVA de uma via para determinar se havia diferença entre os grupos, seguida de Prova de Tukey para demonstrar as diferenças entre os grupos. Os resultados foram expressos em média ± erro padrão da média com $p < 0,05$. Quando os dados não obedeceram aos critérios de normalidade utilizou-se o Teste não paramétrico de Kruskal Wallis, para verificar se havia diferença entre os grupos, seguido de teste de Dunn e os dados foram expressos em mediana e o intervalo interquartil (percentil 25 e 75).

6. RESULTADOS

6.1 CONDIÇÕES EXPERIMENTAIS

Não houve mortalidade durante a exposição em nenhum dos grupos. Os animais não apresentaram alterações na mobilidade e nem injúrias externas. Os valores dos parâmetros de qualidade da água foram: pH ($7,2 \pm 0,2$ unidades), amônia ($<0,1$ mg/L) e temperatura ($25 \pm 2^\circ\text{C}$).

6.2 DICLOFENACO

O diclofenaco aumentou o número de eritrócitos em todas as concentrações testadas e o hematócrito nas concentrações de 0,2 e 2 $\mu\text{g/L}$. A hemoglobina aumentou na concentração 0,2 $\mu\text{g/L}$ e reduziu na concentração de 20 $\mu\text{g/L}$. O MCHC foi reduzido em todas as concentrações e o HCM foi reduzido em 2 e 20 $\mu\text{g/L}$. O VCM não foi alterado. Houve uma elevação nos leucócitos totais, linfócitos e trombócitos nos grupos expostos ao diclofenaco e uma redução de neutrófilos. Os monócitos diminuíram em 0,2 $\mu\text{g/L}$ e aumentaram na concentração de 2 $\mu\text{g/L}$. Não foram observados eosinófilos e basófilos (TABELA 1).

TABELA 1. PARÂMETROS HEMATOLÓGICOS DE *Rhamdia quelen* APÓS EXPOSIÇÃO AO DICLOFENACO E GRUPO CONTROLE

	Concentração de Diclofenaco			
	Controle	0,2 µg/L	2 µg/L	20 µg/L
Eritrócitos (10 ⁶ /µL)	1,7 ± 0,1 ^a	2,3 ± 0,1 ^b	2,2 ± 0,1 ^b	2,1 ± 0,1 ^b
Hemoglobina (g/dL)	6,4 ± 0,3 ^a	7,8 ± 0,3 ^b	6,4 ± 0,3 ^a	5,1 ± 0,2 ^c
Hematócrito (%)	28,0 ± 1,5 ^a	41,3 ± 2,2 ^b	36,0 ± 1,5 ^b	30,3 ± 1,8 ^a
VCM (fL)	165,0 ± 8,8 ^a	182,5 ± 11,1 ^a	161,9 ± 6,4 ^a	144,1 ± 9,7 ^a
HCM (pg)	37,8 ± 2,4 ^a	34,4 ± 1,7 ^a	28,6 ± 1,1 ^b	24,0 ± 0,7 ^b
CHCM (g/dL)	23,9 ± 2,0 ^a	18,4 ± 0,5 ^b	17,9 ± 0,9 ^b	15,5 ± 0,5 ^b
Trombócitos (10 ³ /µL)	58,1 ± 3,8 ^a	78,5 ± 4,6 ^b	99,9 ± 1,9 ^c	96,5 ± 2,4 ^c
Leucócitos (10 ³ /µL)	125,1 ± 2,5 ^a	136,4 ± 4,6 ^b	158,0 ± 1,9 ^c	154,5 ± 2,4 ^c
Monócitos (10 ³ /µL)	12,4 ± 0,9 ^a	8,0 ± 0,2 ^b	25,9 ± 1,3 ^c	11,9 ± 1,2 ^a
Linfócitos (10 ³ /µL)	108,3 ± 2,4 ^a	125,4 ± 4,2 ^b	130,3 ± 4,4 ^b	139,2 ± 2,9 ^b
Neutrófilos (10 ³ /µL)	9,5 ± 0,7 ^a	6,7 ± 0,5 ^b	7,0 ± 0,2 ^b	6,6 ± 0,5 ^b

Resultados expressos em média ± erro padrão. Letras minúsculas diferentes indicam diferença significativa ($p < 0,05$) entre os grupos. ANOVA de uma via seguida do Teste de Tukey. N=10.

Na análise genética, não houve diferença entre o controle e os grupos expostos ao diclofenaco na frequência de micronúcleos e nos danos ao DNA dos eritrócitos (FIGURA 12).

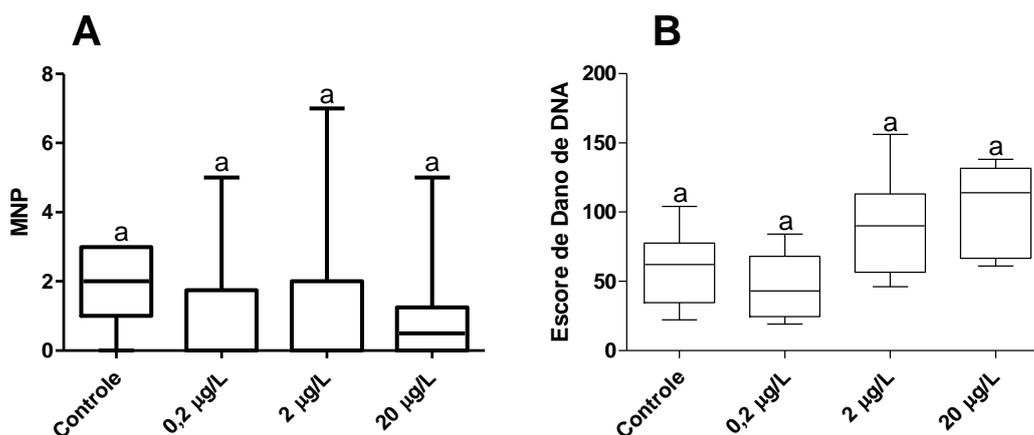


FIGURA 12. Frequência de micronúcleos (A) e escores de danos genéticos obtidos por meio do Ensaio Cometa (B) em eritrócitos de *Rhamdia quelen* expostos ao diclofenaco durante 21 dias, por via hídrica. Os resultados são expressos em mediana e o intervalo interquartil (percentis 25 e 75). Kruskal Wallis seguido de teste de Dunn. N=10.

No fígado, a concentração de 0,2 µg/L de diclofenaco reduziu o IHS de *Rhamdia quelen* em comparação ao controle (FIGURA 13).

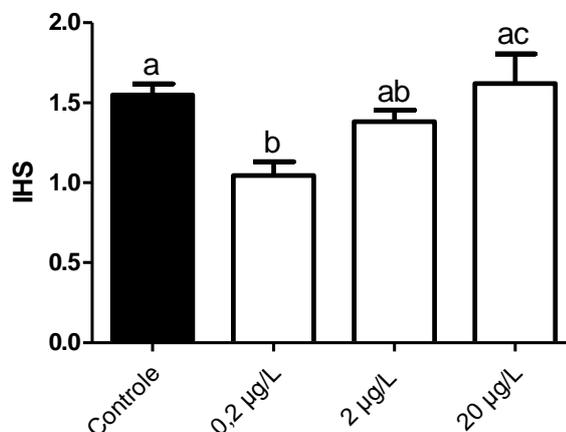


FIGURA 13. Índice hepatossomático (IHS) de *Rhamdia quelen* expostos ao diclofenaco durante 21 dias, por via hídrica. Os resultados são expressos em média ± erro padrão. Letras minúsculas diferentes indicam diferença significativa ($p < 0,05$) na comparação entre grupos. ANOVA de uma via seguida do teste de Tukey. N=10.

Nos hepatócitos, não houve danos ao DNA nos animais expostos ao diclofenaco (FIGURA 14).

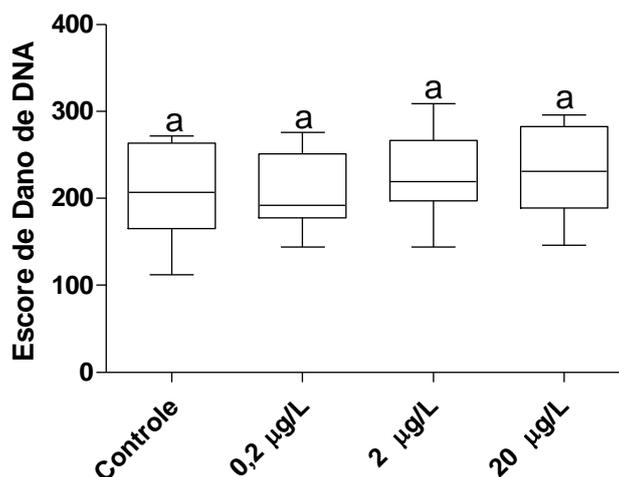


FIGURA 14. Escores de danos genéticos obtidos por meio do Ensaio Cometa em hepatócitos de *Rhamdia quelen* expostos ao diclofenaco por 21 dias, por via hídrica. Os resultados são expressos em mediana e o intervalo interquartil (percentis 25 e 75). Kruskal Wallis seguido do teste de Dunn. N=10.

Em relação à biotransformação hepática, a atividade da EROD foi reduzida na concentração de 2 $\mu\text{g/L}$ e a atividade da GST aumentou em todas as concentrações testadas (FIGURA 15).

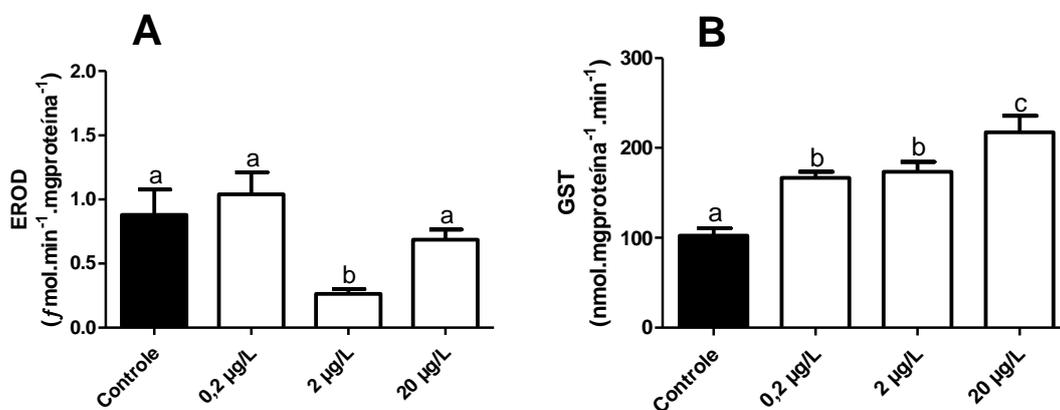


FIGURA 15. Biomarcadores bioquímicos relacionados à biotransformação em fígado de *Rhamdia quelen* expostos ao diclofenaco durante 21 dias, por via hídrica. Atividade da Etoxiresorufina-O-deetilase (A) e Glutathiona S-transferase (B). Os resultados são expressos em média \pm erro padrão. Letras minúsculas diferentes indicam diferença significativa ($p < 0,05$) entre os grupos. ANOVA de uma via seguida do teste de Tukey. N=10.

O diclofenaco causou uma redução da SOD no fígado em todas as concentrações. A CAT foi reduzida na concentração de 2 $\mu\text{g/L}$. Houve um aumento dos níveis de GSH em todas as concentrações testadas. A LPO foi reduzida (0,2 e 20 $\mu\text{g/L}$). A GPx não foi alterada e o diclofenaco não causou carbonilação de proteínas no fígado (FIGURA 16).

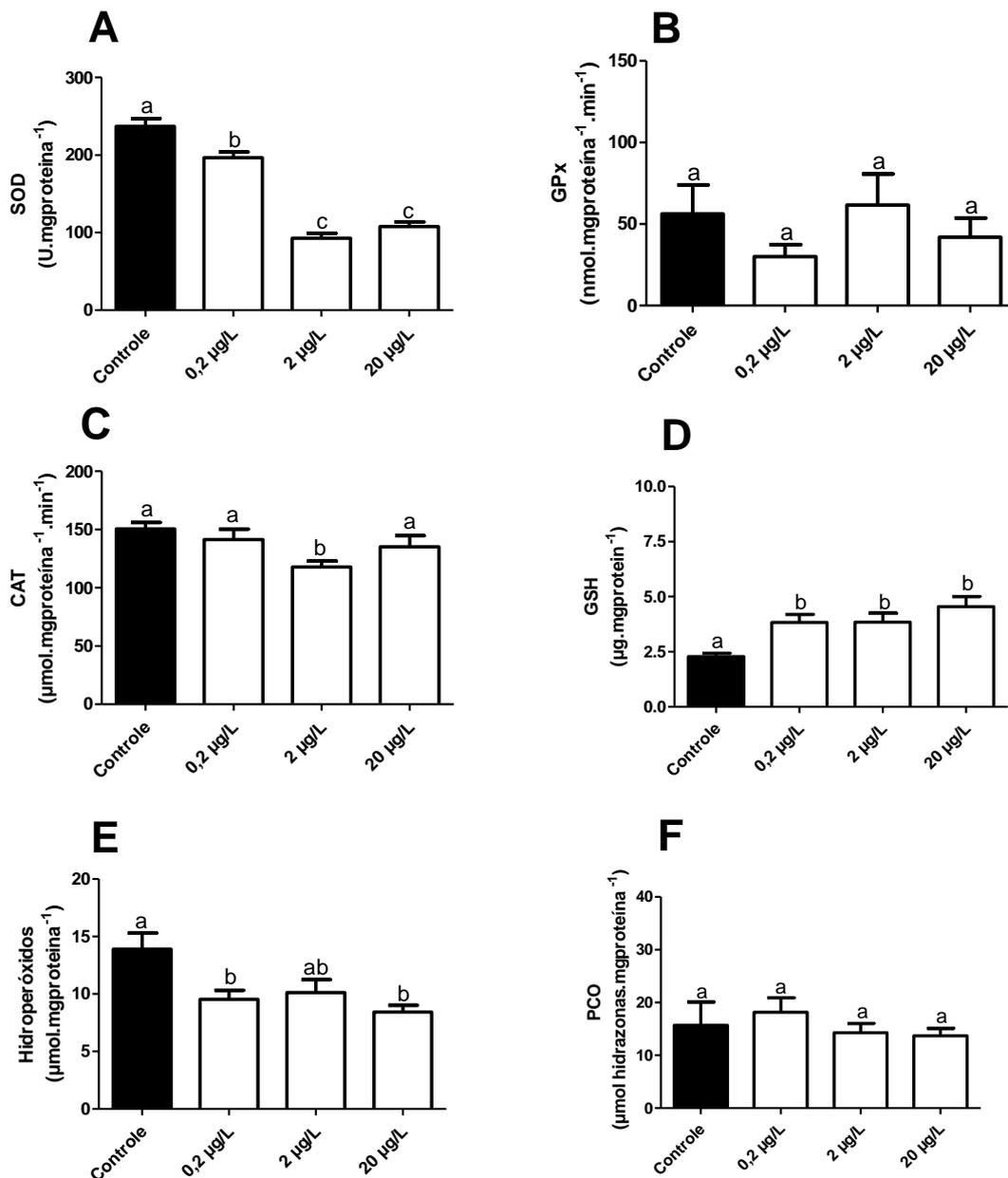


FIGURA 16. Biomarcadores bioquímicos em fígado de *Rhamdia quelen* expostos ao diclofenaco durante 21 dias, por via hídrica. Atividade da Superóxido dismutase (A), Glutaciona peroxidase (B), Catalase (C), Concentração de Glutaciona reduzida (D), Lipoperoxidação (E), Carbonilação de proteínas (F). Os resultados são expressos em média \pm erro padrão. Letras minúsculas diferentes indicam diferença significativa ($p < 0,05$) entre os grupos. ANOVA de uma via seguida do teste de Tukey. N=10

Nas gônadas, o diclofenaco diminuiu a atividade da enzima SOD em todas as concentrações. Na concentração 0,2 µg/L, a atividade das enzimas GPx e GST e a LPO foram reduzidas. A concentração de GSH não foi alterada (FIGURA 17). As enzimas CAT e EROD também foram analisadas, mas não tiveram atividade detectável neste tecido.

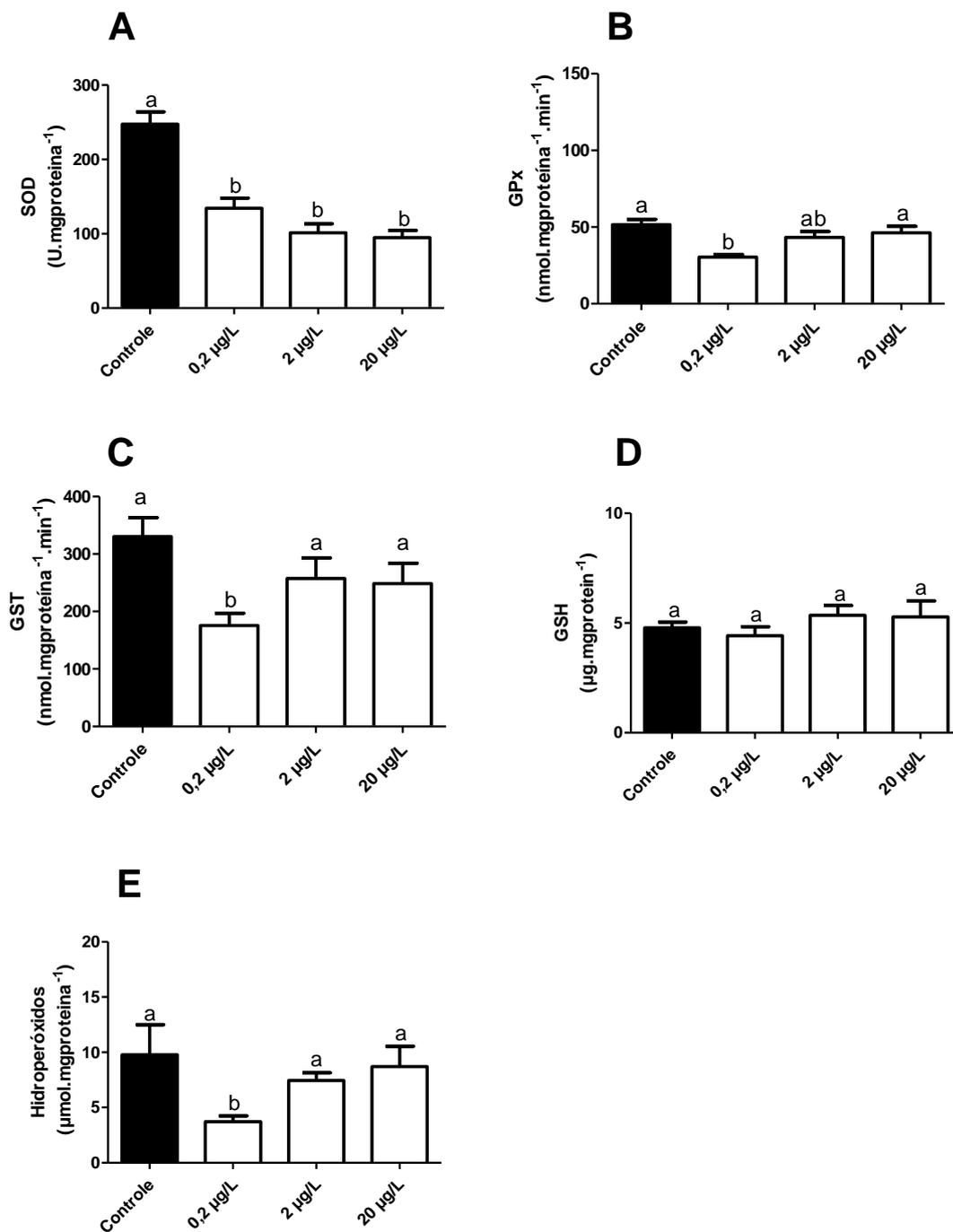


FIGURA 17. Biomarcadores bioquímicos em gônada de *Rhamdia quelen* expostos ao diclofenaco durante 21 dias, por via hídrica. Atividade da Superóxido dismutase (A), Glutaciona peroxidase (B), Glutaciona S-transferase (C), Concentração de Glutaciona reduzida (D), Lipoperoxidação (E). Os resultados são expressos em média \pm erro padrão. Letras minúsculas diferentes indicam diferença significativa ($p < 0,05$) entre os grupos. ANOVA de uma via seguida do teste de Tukey. N=10.

Na análise histopatológica do fígado, os animais do grupo controle não tiveram alterações, sendo que os hepatócitos apresentavam núcleos grandes localizados na região central ou basal da célula e nucléolos evidentes. O

diclofenaco causou alterações morfológicas em fígado de *Rhamdia quelen*. Foi observado degeneração hidrópica, nos graus moderado e severo, na maior concentração e congestão sanguínea (discreta a severa) nas concentrações 2 e 20 $\mu\text{g/L}$ (FIGURA 18; TABELA 2). Na coloração de Sudan Black B, não foi observado acúmulo de lipídios e na coloração de PAS também não foi observado acúmulo de carboidratos (dados não mostrados) no fígado.

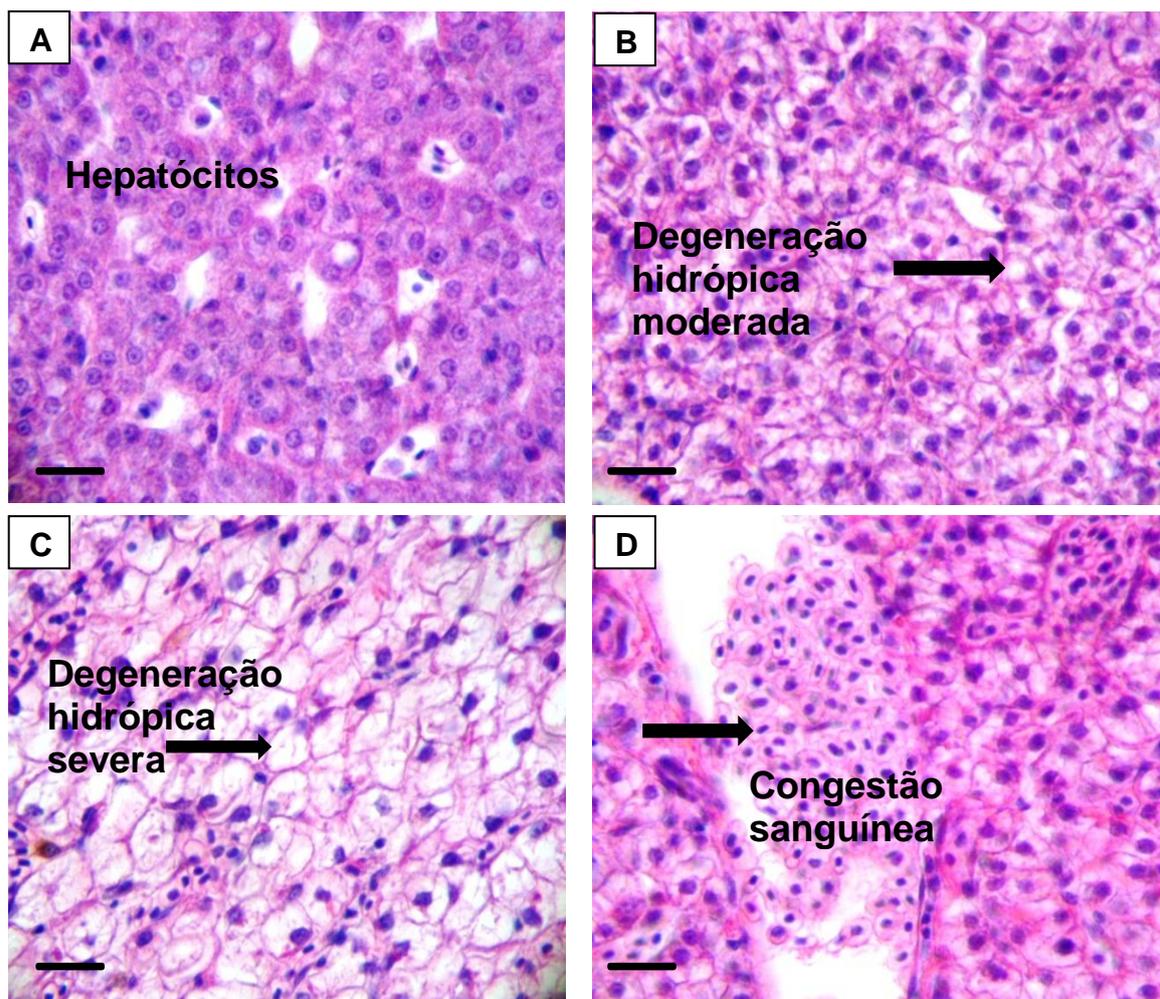


FIGURA 18. Histopatologia do tecido hepático de *Rhamdia quelen*. (A) Tecido hepático de peixe Controle. (B) Degeneração hidrópica moderada em tecido hepático de peixe exposto a 20 $\mu\text{g/L}$ de diclofenaco. (C) Degeneração hidrópica severa em tecido hepático de peixe exposto a 20 $\mu\text{g/L}$ de diclofenaco. (D) Congestão sanguínea em tecido hepático de peixe exposto a 20 $\mu\text{g/L}$ de diclofenaco. Flechas indicam as injúrias. Hematoxilina-Eosina. Escala = 10 μm . N=5.

TABELA 2. ALTERAÇÕES MORFOLÓGICAS EM TECIDO HEPÁTICO DE *Rhamdia quelen* APÓS EXPOSIÇÃO AO DICLOFENACO. N=5.

	Concentração de Diclofenaco			
	Controle	0,2 µg/L	2 µg/L	20 µg/L
Congestão sanguínea	0	0	1-2	2-3
Degeneração hidrópica	0	0	0	2-3

Nota: 0= Normal; 1= Discreta; 2= Moderada; 3= Severa.

No rim posterior, não houve danos ao DNA das células (FIGURA 19), porém foram observadas alterações morfológicas nos rins dos animais expostos ao diclofenaco. As alterações observadas foram degeneração hidrópica discreta na maior concentração de diclofenaco, congestão glomerular moderada na concentração 0,2 µg/L e de grau discreto nas maiores concentrações e congestão moderada em todas as concentrações (TABELA 3; FIGURA 20).

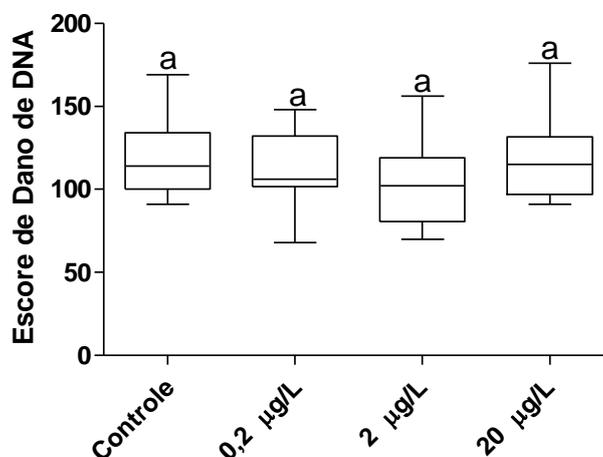


FIGURA 19. Escores de danos genéticos obtidos por meio do Ensaio Cometa em células de rim posterior de *Rhamdia quelen* expostos ao diclofenaco durante 21 dias, por via hídrica. Os resultados são expressos em mediana e intervalo interquartil (percentis 25 e 75). Kruskal Wallis seguido do teste de Dunn. N=10.

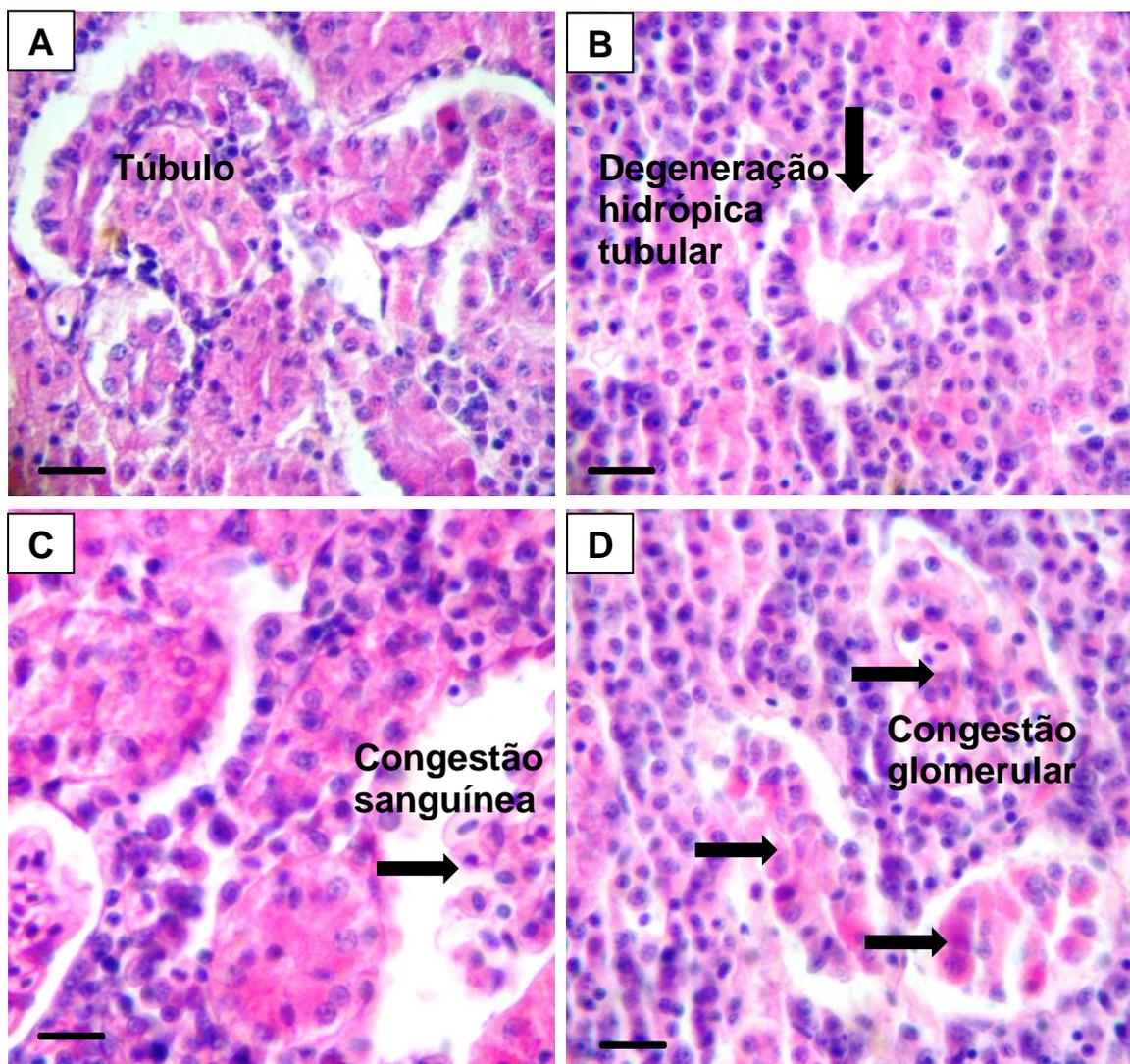


FIGURA 20. Histopatologia do tecido renal posterior de *Rhamdia quelen*. (A) Tecido renal de peixe Controle. (B) Degeneração hidrópica discreta em tecido renal de peixe exposto a 20 $\mu\text{g/L}$ de diclofenaco. (C) Congestão sanguínea em tecido renal de peixe exposto a 20 $\mu\text{g/L}$ de diclofenaco. (D) Congestão glomerular em tecido renal de peixe exposto a 0,2 $\mu\text{g/L}$ de diclofenaco. Flechas indicam as injúrias. Hematoxilina-Eosina. Escala = 10 μm . N=5.

TABELA 3. ALTERAÇÕES MORFOLÓGICAS EM TECIDO RENAL POSTERIOR DE *Rhamdia quelen* APÓS EXPOSIÇÃO AO DICLOFENACO. N=5.

	Concentração de Diclofenaco			
	Controle	0,2 $\mu\text{g/L}$	2 $\mu\text{g/L}$	20 $\mu\text{g/L}$
Congestão sanguínea	0	2	2	2
Degeneração hidrópica	0	0	0	1
Congestão glomerular	0	2	1	1

Nota: 0= Normal; 1= Discreta; 2= Moderada; 3= Severa.

No cerebelo, os níveis de dopamina foram reduzidos na concentração 2 $\mu\text{g/L}$ e houve redução dos níveis de seu metabólito DOPAC nos animais expostos a todas as concentrações de diclofenaco. A razão DOPAC/DA foi reduzida nas concentrações 0,2 e 20 $\mu\text{g/L}$ (FIGURA 21).

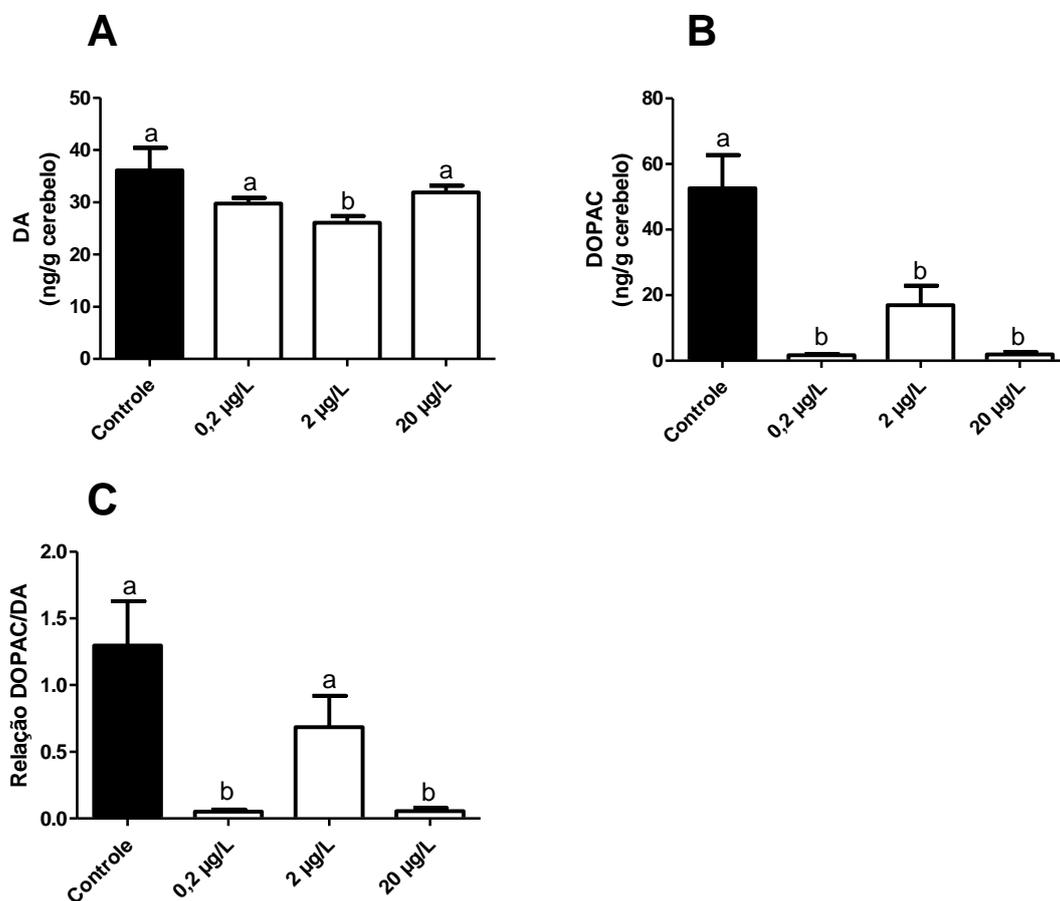


FIGURA 21. Níveis de dopamina (A), metabólito da dopamina, DOPAC (B), Relação DOPAC/DA (C) em cerebelo de *Rhamdia quelen* expostos ao diclofenaco durante 21 dias, por via hídrica. Os resultados são expressos em média \pm erro padrão. Letras minúsculas diferentes indicam diferença significativa ($p < 0,05$) entre os grupos. ANOVA de uma via seguida do teste de Tukey. N=10.

A serotonina e seu metabólito 5-HIA não foram alterados em nenhum dos grupos expostos ao diclofenaco. Também não houve alteração da razão 5-HIA/5-HT nos animais expostos ao diclofenaco (FIGURA 22).

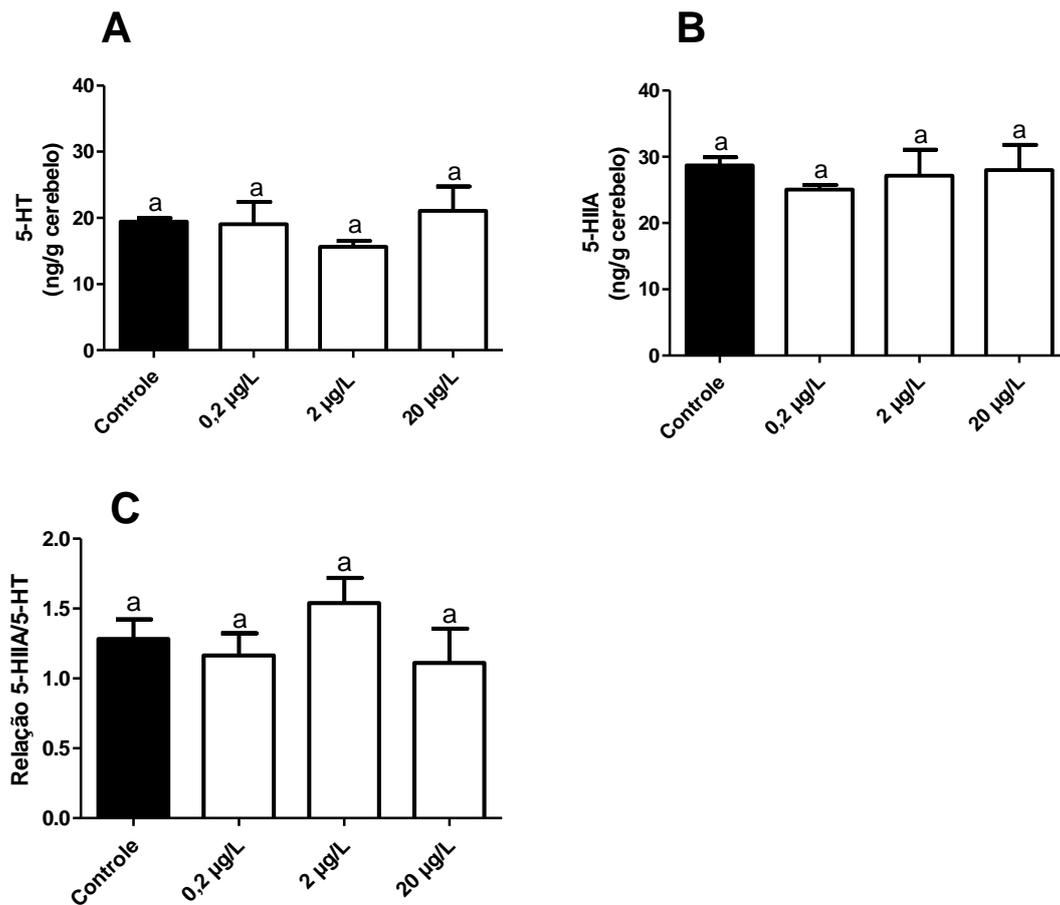


FIGURA 22. Níveis de serotonina (A), metabólito da serotonina, 5-HIAA (B), Relação 5-HIAA/5-HT (C) em cerebello de *Rhamdia quelen* expostos ao diclofenaco durante 21 dias, por via hídrica. Os resultados são expressos em média \pm erro padrão. Letras minúsculas diferentes indicam diferença significativa ($p < 0,05$) entre os grupos. ANOVA de uma via seguida do teste de Tukey. N=10.

Os níveis de testosterona e estradiol plasmáticos não foram alterados nos animais expostos ao diclofenaco (FIGURA 23).

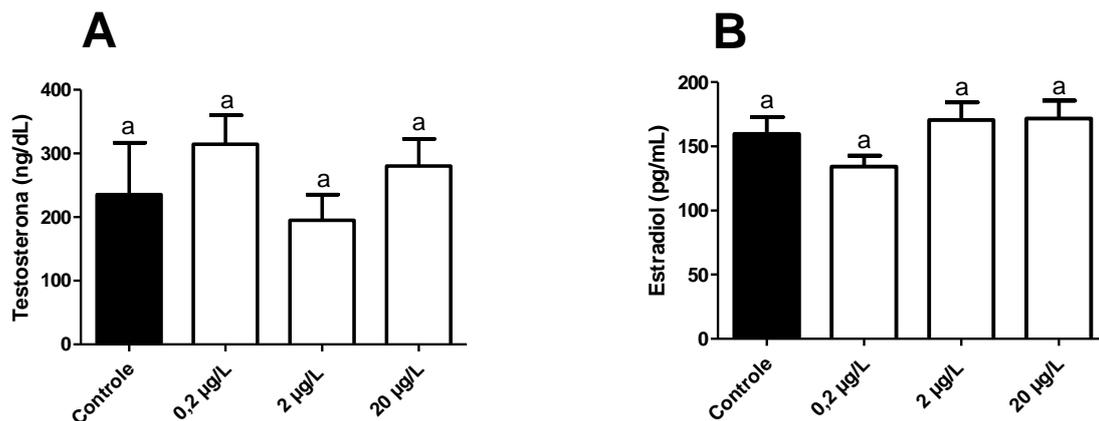


FIGURA 23. Níveis de testosterona (A) e estradiol (B) em plasma de *Rhamdia quelen* expostos ao diclofenaco durante 21 dias, por via hídrica. Os resultados são expressos em média \pm erro padrão. ANOVA de uma via seguida de teste de Tukey. N=10.

O índice gonadossomático de *Rhamdia quelen* não foi alterado nos animais expostos ao diclofenaco em comparação ao controle (FIGURA 24).

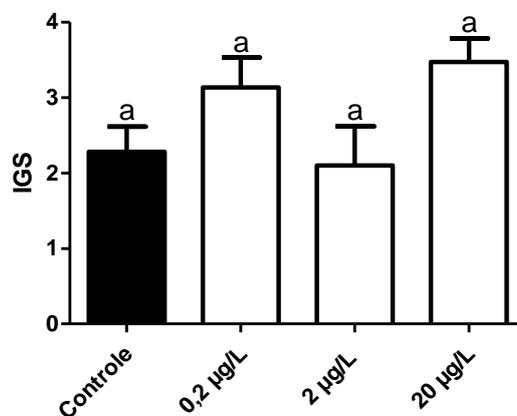


FIGURA 24. Índice gonadossomático (IGS) de *Rhamdia quelen* expostos ao diclofenaco durante 21 dias, por via hídrica. Os resultados são expressos em média \pm erro padrão. ANOVA de uma via seguida do teste de Tukey. N=10.

Macroscopicamente os testículos tinham cor branca e apresentavam-se com as franjas (características da espécie) bem desenvolvidas e com vascularização superficial evidente. Os resultados da análise do tecido gonadal (FIGURA 25) mostraram um padrão histológico preservado nos grupos expostos em comparação ao grupo controle, sem alterações morfológicas. Os

testículos apresentaram-se tubulares, sendo que os septos que delimitam os túbulos são constituídos de tecido conjuntivo. Dentro dos túbulos houve predominância de espermatozoides nos grupos expostos demonstrando que o diclofenaco não prejudicou a espermatogênese. Além disso, a predominância de espermatozoides demonstrou que os testículos estavam maduros. Outras células observadas foram espermátides e células de Sertoli na periferia dos túbulos aos septos. Não foi observado acúmulo de lipídios e carboidratos (dados não mostrados) nos testículos.

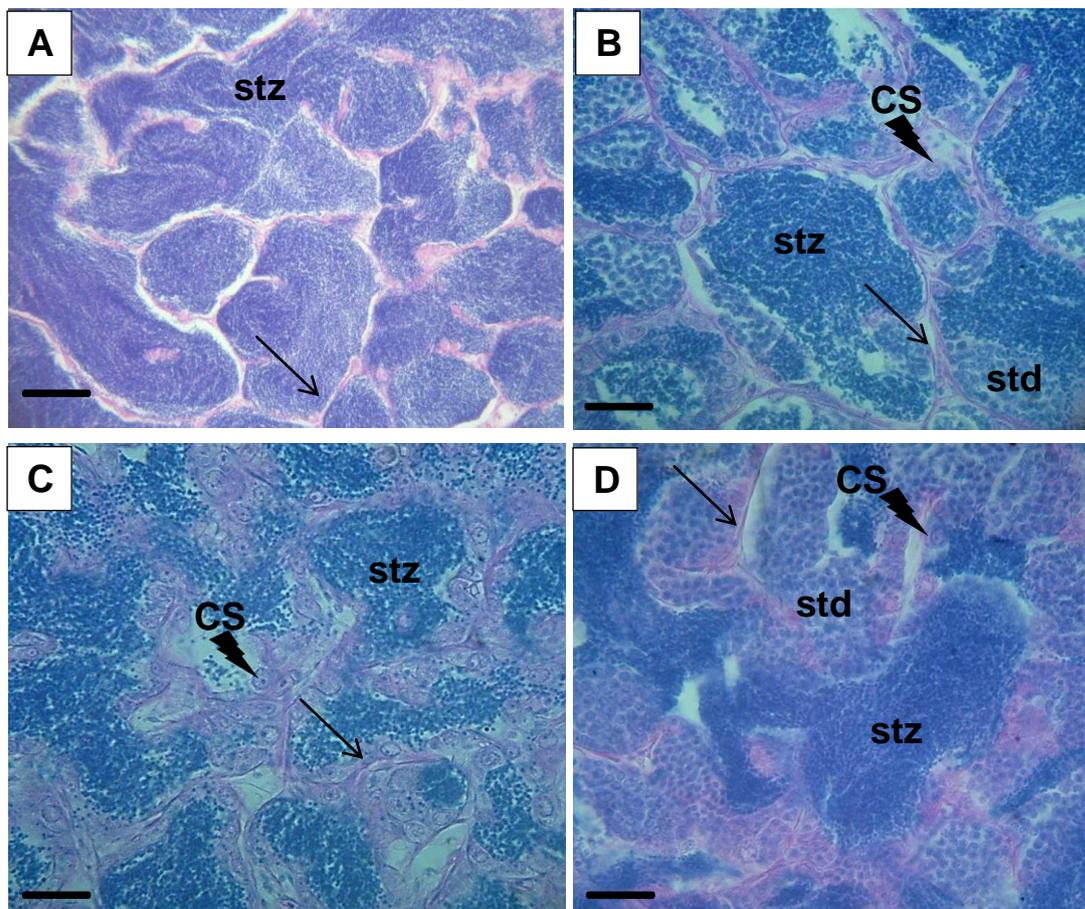


FIGURA 25. Histologia dos testículos de *Rhamdia quelen* controle e expostos ao diclofenaco. A= Controle; B = 0,2 µg/L Diclofenaco; C = 2 µg/L Diclofenaco; D = 20 µg/L Diclofenaco. Espermátides = **std**; Espermatozoides = **stz**; Células de Sertoli = **CS**; Septo delimitando os túbulos = \longrightarrow . Hematoxilina-Eosina. Escala = 45 µm. N= 5.

6.3 PARACETAMOL

O paracetamol não alterou o número de eritrócitos, porém reduziu a hemoglobina na concentração de 0,25 µg/L e o hematócrito nas duas concentrações testadas. O VCM foi reduzido, porém o CHCM foi aumentado na concentração de 2,5 µg/L. O HCM não foi alterado. Houve um aumento no número de leucócitos totais e neutrófilos nas duas concentrações e trombócitos nos peixes expostos a 0,25 µg/L de paracetamol. Os linfócitos foram reduzidos a 0,25 µg/L. O número de monócitos não foi alterado e não foram observados eosinófilos e basófilos frente à exposição ao paracetamol (TABELA 4).

TABELA 4: PARÂMETROS HEMATOLÓGICOS DE *Rhamdia quelen* APÓS EXPOSIÇÃO AO PARACETAMOL E GRUPO CONTROLE

	Controle	Concentração Paracetamol	
		0,25 µg/L	2,5 µg/L
Eritrócitos (10 ⁶ / µL)	2,0 ± 0,1 ^a	1,7 ± 0,1 ^a	2,0 ± 0,1 ^a
Hemoglobina (g/dL)	6,3 ± 0,3 ^a	4,7 ± 0,2 ^b	6,5 ± 0,6 ^a
Hematócrito (%)	43,8 ± 1,4 ^a	31,7 ± 1,5 ^b	33,0 ± 2,4 ^a
VCM (fL)	223,1 ± 10,6 ^a	193,8 ± 11,0 ^a	167,0 ± 9,0 ^b
HCM (pg)	31,9 ± 1,5 ^a	28,8 ± 1,7 ^a	32,4 ± 1,9 ^a
CHCM (g/dL)	14,4 ± 0,6 ^a	14,9 ± 0,6 ^a	20,0 ± 1,7 ^b
Trombócitos (10 ³ / µL)	57,4 ± 2,4 ^a	50,9 ± 3,5 ^a	83,0 ± 7,8 ^b
Leucócitos (10 ³ / µL)	135,6 ± 3,7 ^a	174,1 ± 6,9 ^b	172,6 ± 11,5 ^b
Monócitos (10 ³ / µL)	13,1 ± 1,8 ^a	15,5 ± 2,0 ^a	18,6 ± 2,0 ^a
Linfócitos (10 ³ / µL)	115,2 ± 2,3 ^a	91,4 ± 5,2 ^b	115,0 ± 9,4 ^a
Neutrófilos (10 ³ / µL)	7,3 ± 1,1 ^a	67,3 ± 5,6 ^b	39,0 ± 4,8 ^c

Resultados expressos em média ± erro padrão. Letras minúsculas diferentes indicam diferença significativa ($p < 0,05$) entre os grupos. ANOVA de uma via seguida do Teste de Tukey. N=10.

Na análise genética, não houve diferença em relação ao controle na frequência de micronúcleos e nem danos ao DNA dos eritrócitos (FIGURA 26).

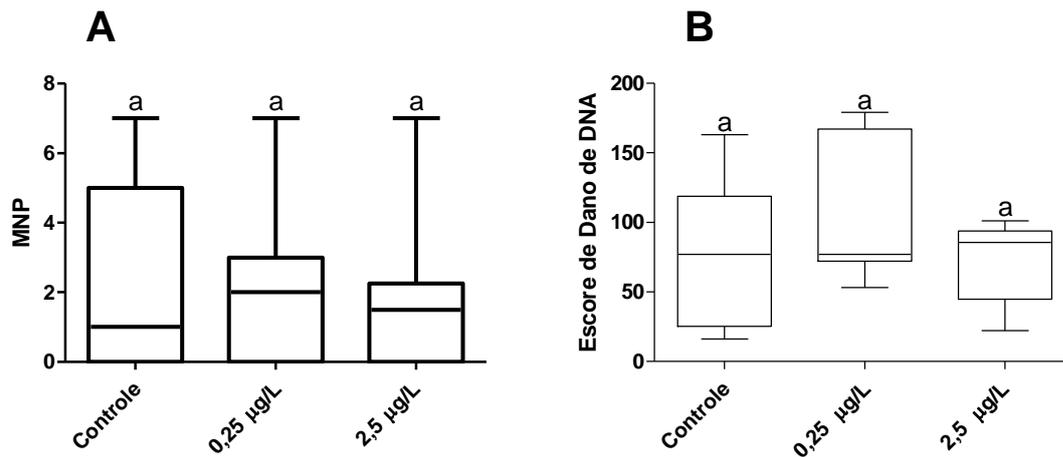


FIGURA 26. Frequência de micronúcleos (A) e escores de danos genéticos obtidos por meio do Ensaio Cometa (B) em eritrócitos de *Rhamdia quelen* expostos ao paracetamol durante 21 dias, por via hídrica. Os resultados são expressos em mediana e intervalo interquartil (percentis 25 e 75). Kruskal Wallis seguido do teste de Dunn. N=10.

No fígado, o paracetamol causou um aumento do IHS na concentração de 0,25 µg/L (FIGURA 27).

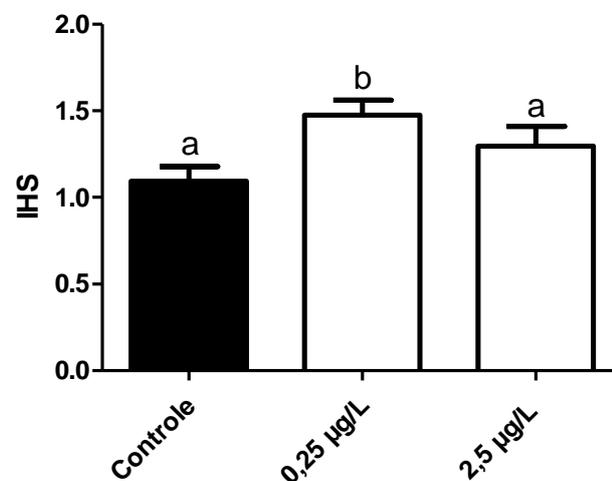


FIGURA 27. Índice hepatossomático (IHS) de *Rhamdia quelen* expostos ao paracetamol durante 21 dias, por via hídrica. Os resultados são expressos em média \pm erro padrão. Letras minúsculas diferentes indicam diferença significativa ($p < 0,05$) entre os grupos. ANOVA de uma via seguida do teste de Tukey. N=10.

O paracetamol também causou dano ao DNA dos hepatócitos na concentração de 0,25 µg/L (FIGURA 28).

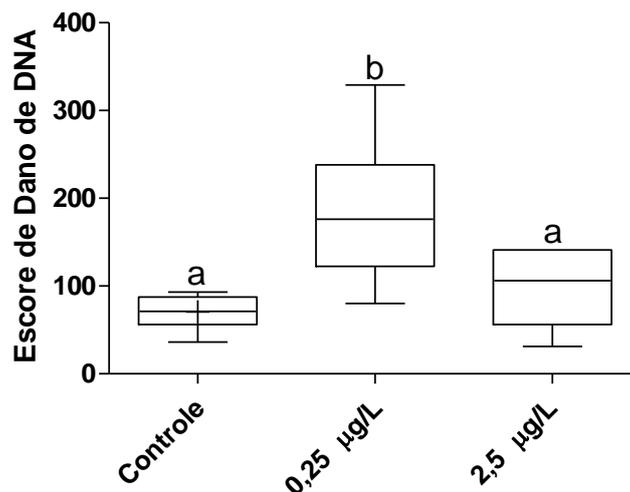


FIGURA 28. Escores de danos genéticos obtidos por meio do Ensaio Cometa em hepatócitos de *Rhamdia quelen* expostos ao paracetamol durante 21 dias, por via hídrica. Letras minúsculas diferentes indicam diferença significativa ($p < 0,05$) entre os grupos. Os resultados são expressos em mediana e intervalo interquartil (percentis 25 e 75). Kruskal Wallis seguido do teste de Dunn. $N=10$.

O paracetamol também reduziu a atividade das enzimas de biotransformação EROD e GST nos animais expostos (FIGURA 29).

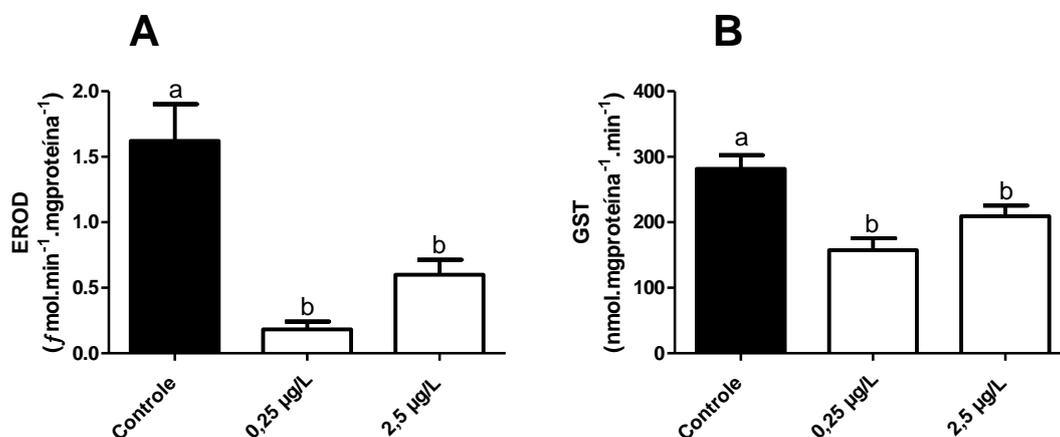


FIGURA 29. Biomarcadores bioquímicos relacionados à biotransformação em fígado de *Rhamdia quelen* expostos ao paracetamol durante 21 dias, por via hídrica. Atividade da Etoxiresorufina-O-deetilase (A) e Glutationa S-transferase (B). Os resultados são expressos em média \pm erro padrão. Letras minúsculas diferentes indicam diferença significativa ($p < 0,05$) entre os grupos. ANOVA de uma via seguida do teste de Tukey. $N=10$.

Em relação aos biomarcadores bioquímicos avaliados no fígado, o paracetamol causou carbonilação de proteínas nos peixes expostos às duas

concentrações. Além disso, aumentou a atividade da SOD na concentração de 2,5 $\mu\text{g/L}$ em comparação ao controle. A atividade da GPx e da CAT, a concentração de GSH e a LPO não foram alteradas nos animais expostos ao paracetamol (FIGURA 30).

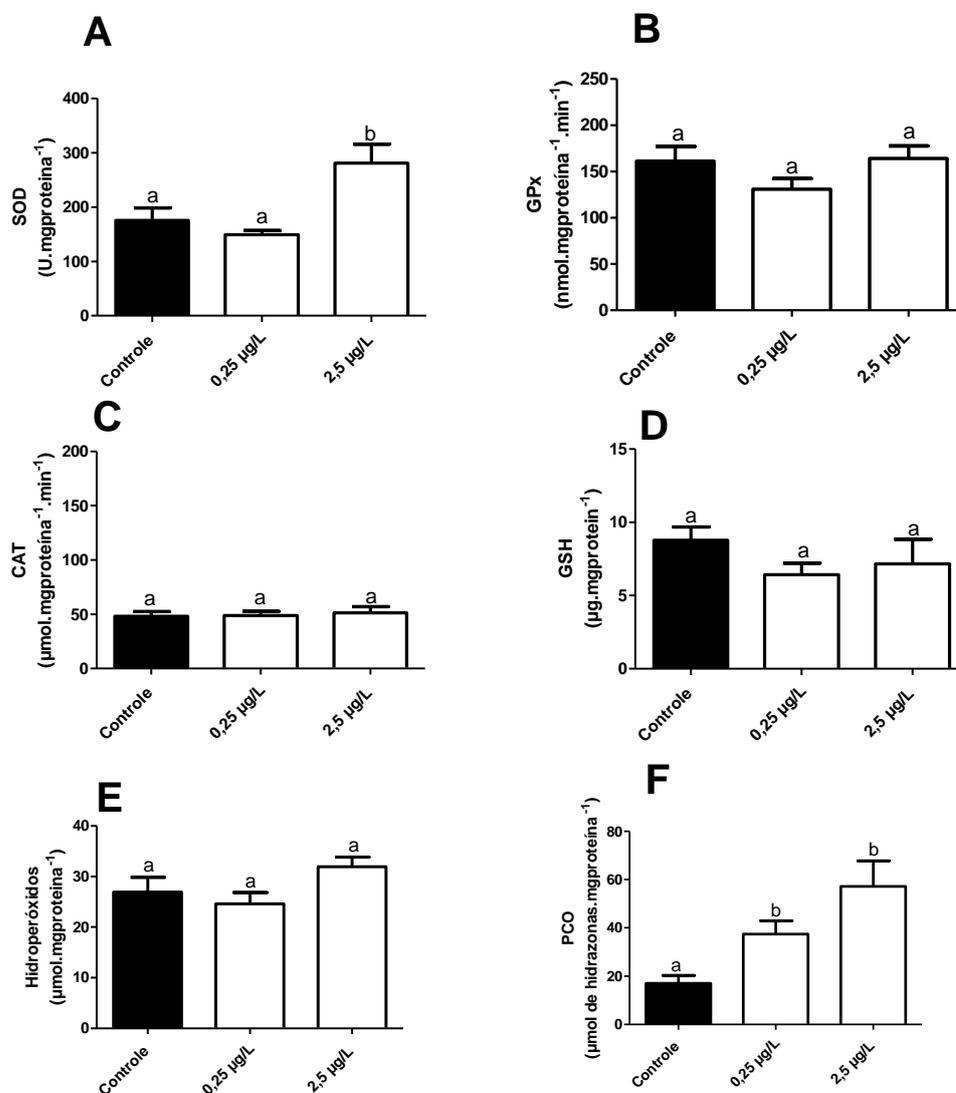


FIGURA 30. Biomarcadores bioquímicos em fígado de *Rhamdia quelen* expostos ao paracetamol durante 21 dias, por via hídrica. Atividade da Superóxido dismutase (A), Glutaciona peroxidase (B), Catalase (C), Concentração de Glutaciona reduzida (D), Lipoperoxidação (E), Carbonilação de proteínas (F). Os resultados são expressos em média \pm erro padrão. Letras minúsculas diferentes indicam diferença significativa ($p < 0,05$) entre os grupos. ANOVA de uma via seguida do teste de Tukey. N=10.

A análise de biomarcadores bioquímicos em gônada (FIGURA 31), demonstrou que o paracetamol não alterou a atividade das enzimas SOD, GPx e GST e nem a concentração de GSH e a LPO. As enzimas CAT e EROD também foram analisadas, mas não tiveram atividade detectável neste tecido.

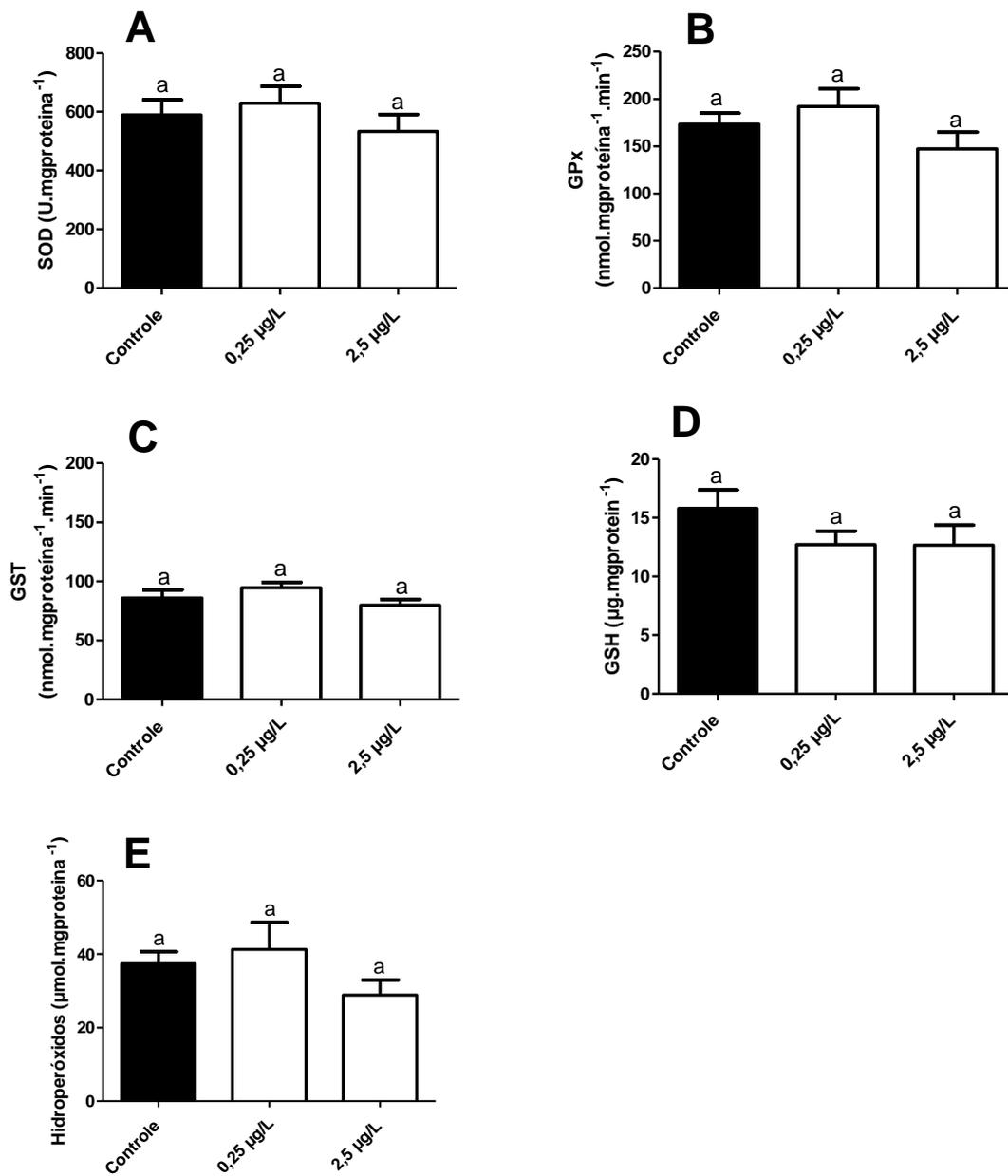


FIGURA 31. Biomarcadores bioquímicos em gônada de *Rhamdia quelen* expostos ao paracetamol durante 21 dias, por via hídrica. Atividade da Superóxido dismutase (A), Glutaciona peroxidase (B), Glutaciona S-transferase (C), Glutaciona reduzida (D), Lipoperoxidação (E). Os resultados são expressos em média \pm erro padrão. ANOVA de uma via seguida do teste de Tukey. N=10.

Na avaliação histopatológica do fígado, os animais do grupo controle demonstraram estrutura do tecido hepático sem alterações, porém as duas concentrações de paracetamol causaram alterações morfológicas no fígado de *Rhamdia quelen*. Foram observadas congestão sanguínea e infiltração leucocitária periférica e multifocal de grau discreto nos animais expostos (FIGURA 32; TABELA 5).

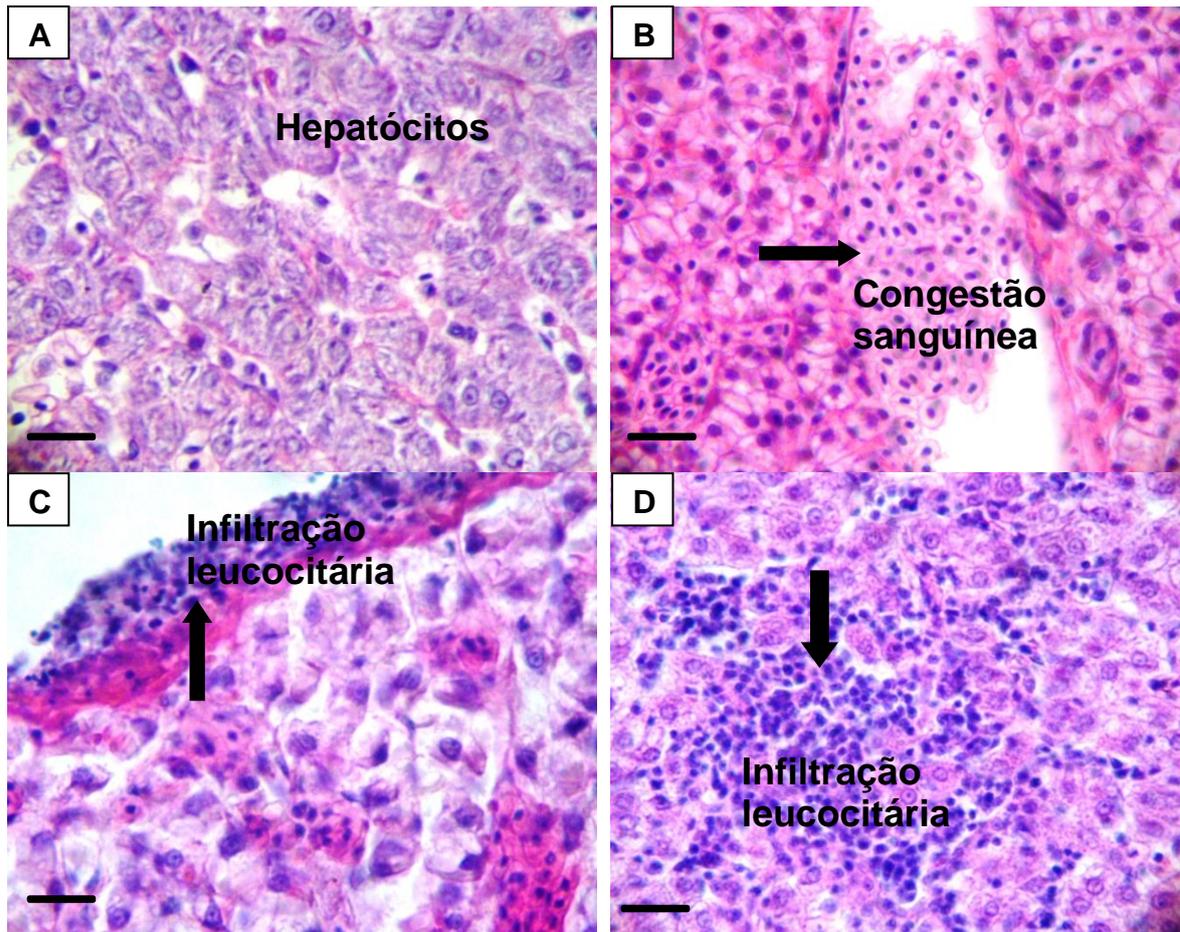


FIGURA 32. Histopatologia do tecido hepático de *Rhamdia quelen*. (A) Tecido hepático de peixe Controle. (B) Congestão sanguínea em tecido hepático de peixe exposto a 2,5 $\mu\text{g/L}$ de paracetamol. (C) Infiltração leucocitária periférica em tecido hepático de peixe exposto a 2,5 $\mu\text{g/L}$ de paracetamol. (D) Infiltração leucocitária multifocal em tecido hepático de peixe exposto a 2,5 $\mu\text{g/L}$ de paracetamol. Flechas indicam as injúrias. Hematoxilina-Eosina. Escala = 10 μm . N=5.

TABELA 5. ALTERAÇÕES MORFOLÓGICAS EM TECIDO HEPÁTICO DE *Rhamdia quelen* APÓS EXPOSIÇÃO AO PARACETAMOL. N=5.

	Concentração de paracetamol		
	Controle	0,25 µ/L	2,5 µg/L
Congestão sanguínea	0	1	1
Infiltração leucocitária	0	1	1

Nota: 0= Normal; 1= Discreta; 2= Moderada; 3= Severa.

O dano genético foi mensurado no rim posterior e não houve alteração nos grupos expostos ao paracetamol em comparação com o controle (FIGURA 33).

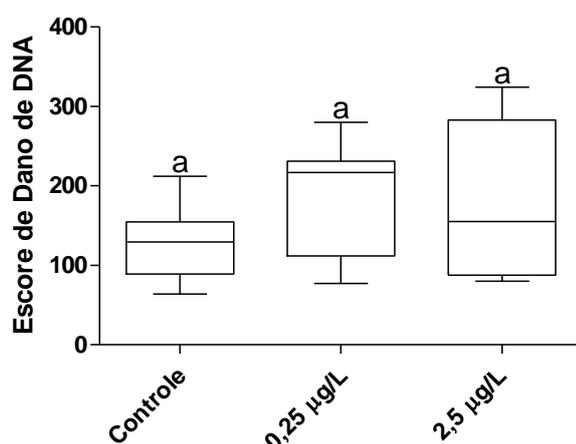


FIGURA 33. Escores de danos genéticos obtidos por meio do Ensaio Cometa em rim posterior de *Rhamdia quelen* expostos ao paracetamol durante 21 dias, por via hídrica. Os resultados são expressos em mediana e intervalo interquartil (percentis 25 e 75). Kruskal Wallis seguido do teste de Dunn. N=10.

O tecido renal posterior dos peixes do grupo controle não apresentou alterações na estrutura dos glomérulos e dos túbulos. Nos animais expostos foram observadas injúrias como degeneração hidrópica e congestão glomerular discreta na concentração de 0,25 µg/L e grau moderado destas alterações na concentração de 2,5 µg/L de paracetamol. Os animais expostos à concentração de 2,5 µg/L de paracetamol apresentaram Peri-nefrite de grau discreto (FIGURA 34; TABELA 6).

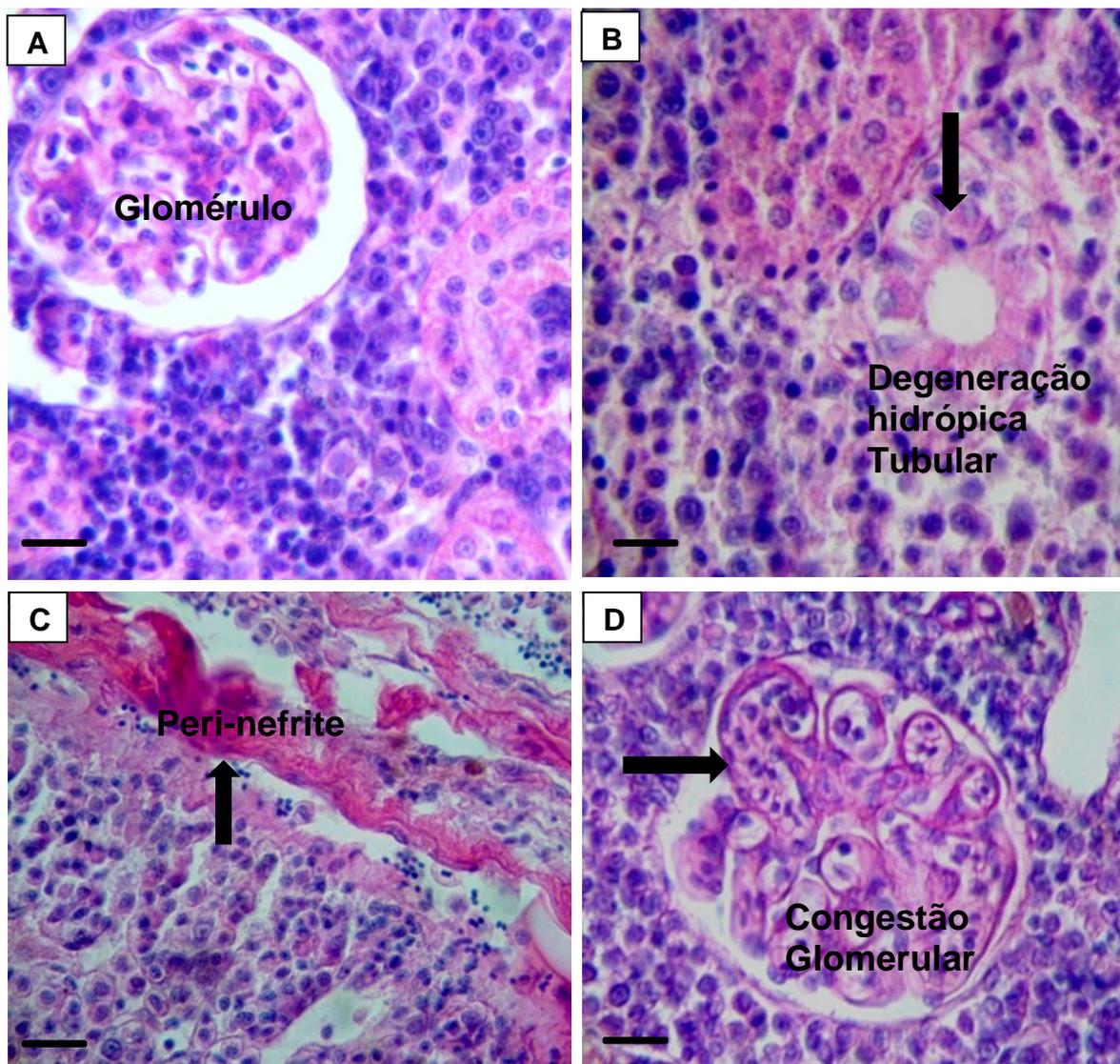


FIGURA 34. Histopatologia do tecido renal posterior de *Rhamdia quelen*. (A) Tecido renal de peixe Controle. (B) Degeneração hidrópica tubular em tecido renal de peixe exposto a 2,5 µg/L de paracetamol. (C) Peri-nefrite em tecido renal de peixe exposto a 2,5 µg/L de paracetamol. (D) Congestão glomerular em tecido renal de peixe exposto a 2,5 µg/L de paracetamol. Flechas indicam as injúrias. Hematoxilina-Eosina. Escala = 10 µm. N=5.

TABELA 6. ALTERAÇÕES MORFOLÓGICAS EM TECIDO RENAL POSTERIOR DE *Rhamdia quelen* APÓS EXPOSIÇÃO AO PARACETAMOL. N=5.

	Concentração de paracetamol		
	Controle	0,25 µ/L	2,5 µg/L
Congestão glomerular	0	1	2
Degeneração hidrópica tubular	0	1	2
Peri-nefrite	0	0	1

Nota: 0= Normal; 1= Discreta; 2= Moderada; 3= Severa.

Na concentração 0,25 $\mu\text{g/L}$ o paracetamol elevou o neurotransmissor dopamina, no entanto, não houve alterações em DOPAC e na relação DOPAC/DA nos animais expostos ao paracetamol (FIGURA 35).

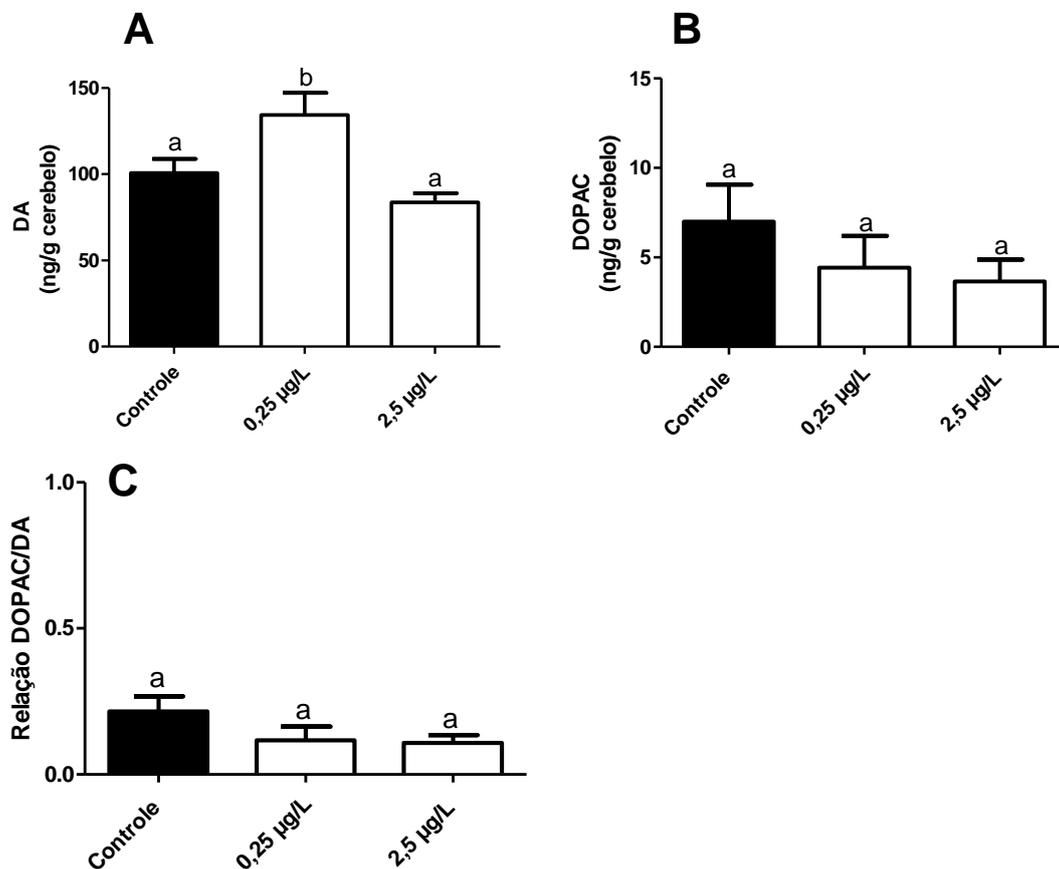


FIGURA 35. Níveis de dopamina (A), metabólito da dopamina, DOPAC (B), Relação DOPAC/DA (C) em cerebelo de *Rhamdia quelen* expostos ao paracetamol durante 21 dias, por via hídrica. Os resultados são expressos em média \pm erro padrão. Letras minúsculas diferentes indicam diferença significativa ($p < 0,05$) entre os grupos. ANOVA de uma via seguida do teste de Tukey. N=10.

O paracetamol aumentou os níveis de serotonina nos animais expostos à concentração de 0,25 $\mu\text{g/L}$. O metabólito da serotonina (5-HIAA) e a relação 5-HIAA/5-HT foram elevados nos animais expostos à concentração de 2,5 $\mu\text{g/L}$ de paracetamol (FIGURA 36).

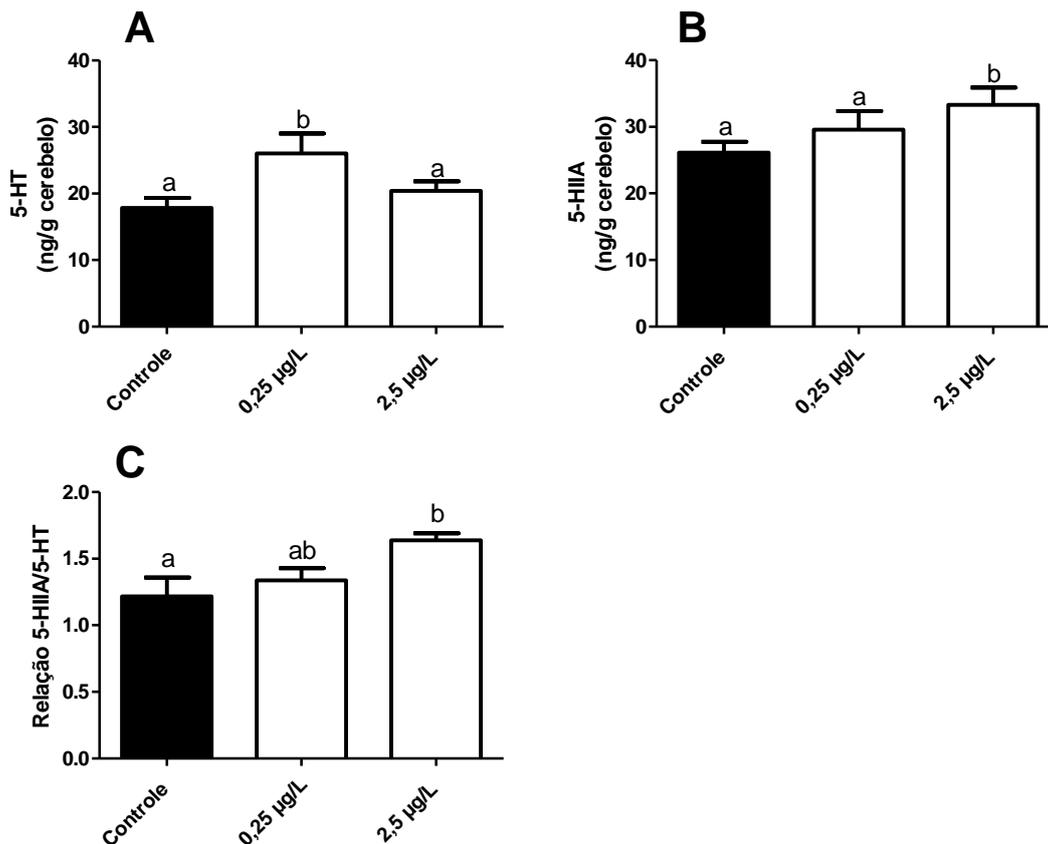


FIGURA 36. Níveis de serotonina (A), metabólito da serotonina, 5-HIAA (B), Relação 5-HIAA/5-HT (C) em cerebelo de *Rhamdia quelen* expostos ao paracetamol durante 21 dias, por via hídrica. Os resultados são expressos em média \pm erro padrão. Letras minúsculas diferentes indicam diferença significativa ($p < 0,05$) entre os grupos. ANOVA de uma via seguida do teste de Tukey. N=10.

Os níveis de testosterona foram reduzidos nos peixes expostos ao paracetamol e houve um aumento nos níveis de estradiol na exposição à concentração de 2,5 $\mu\text{g/L}$ (FIGURA 37).

O paracetamol não alterou o índice gonadossomático dos animais expostos (FIGURA 38).

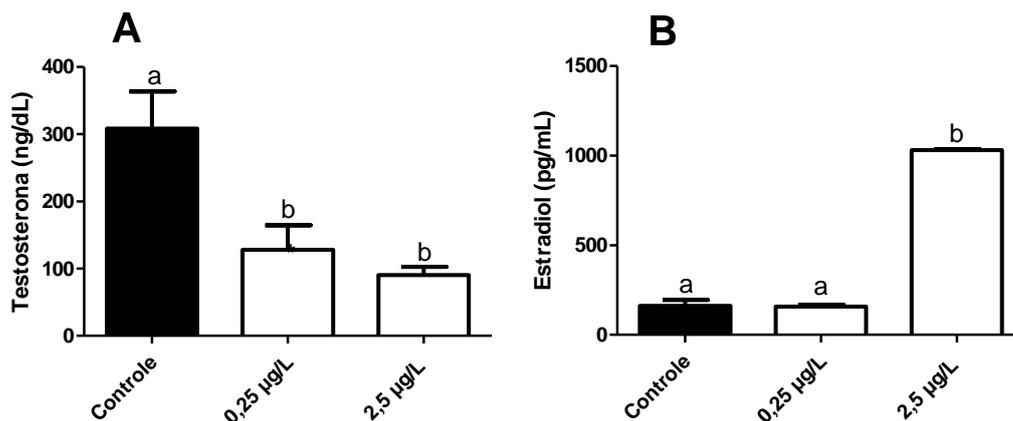


FIGURA 37. Níveis de testosterona (A) e estradiol (B) em plasma de *Rhamdia quelen* expostos ao paracetamol durante 21 dias, por via hídrica. Os resultados são expressos em média \pm erro padrão. Letras minúsculas diferentes indicam diferença significativa ($p < 0,05$) entre os grupos. ANOVA de uma via seguida do teste de Tukey. N=10.

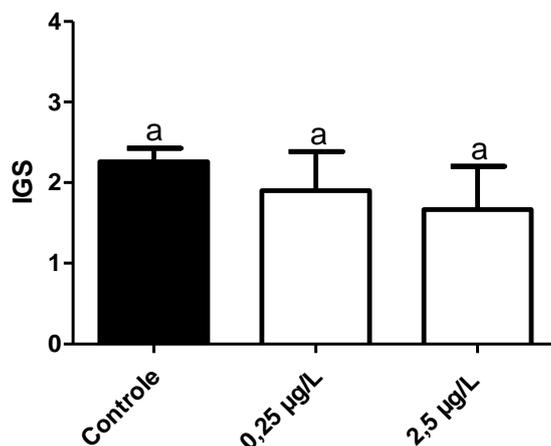


FIGURA 38. Índice gonadosomático (IGS) de *Rhamdia quelen* expostos ao paracetamol durante 21 dias, por via hídrica. Os resultados são expressos em média \pm erro padrão. ANOVA de uma via seguida do teste de Tukey. N=10.

A análise morfológica do tecido gonadal (FIGURA 39) mostrou que no grupo controle os animais estavam em maturação com a presença de células em diferentes fases de desenvolvimento, inclusive espermatozoides. No grupo exposto a 0,25 $\mu\text{g/L}$ foram observadas espermatogônias e espermátides, mas não ocorreram espermatozoides. No grupo exposto a 2,5 $\mu\text{g/L}$ de paracetamol observou-se uma inibição da espermatogênese, pois os peixes estavam com o testículo imaturo, predominando espermatogônias. Não ocorreu deposição de lipídios e carboidratos (dados não mostrados) no tecido gonadal dos grupos.

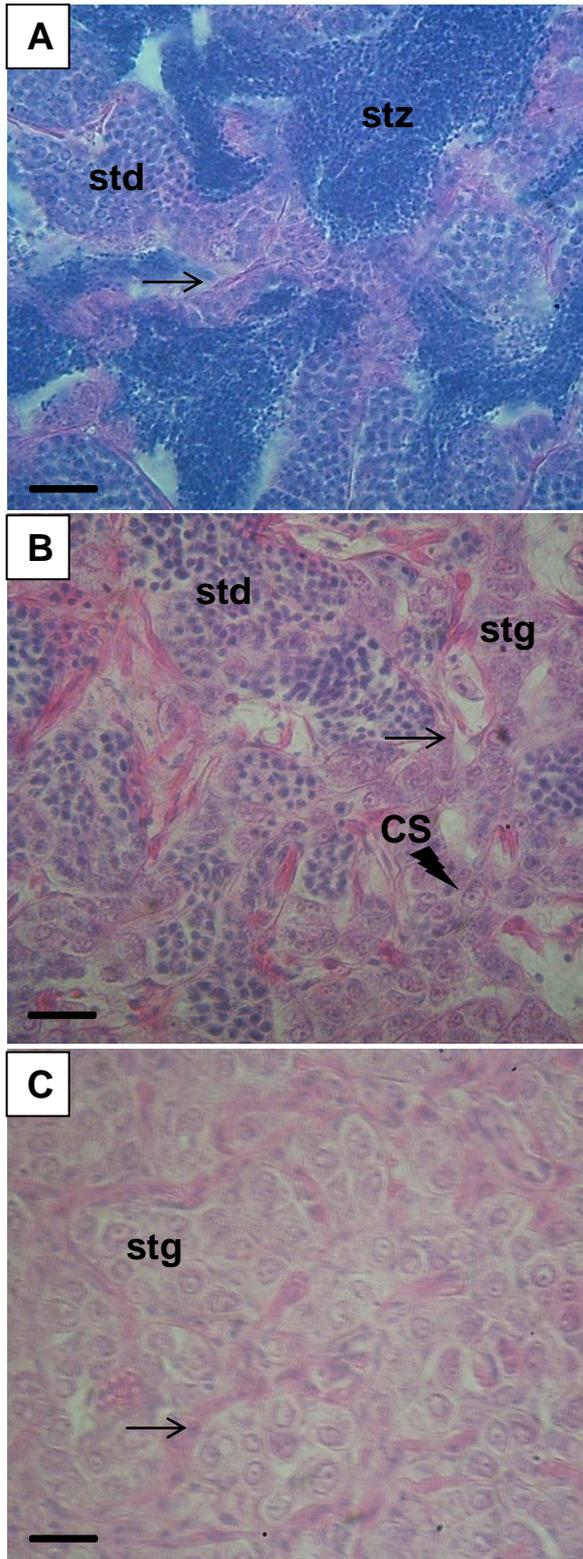


FIGURA 39. Histologia dos testículos de *Rhamdia quelen* controle e expostos ao paracetamol. A= Controle; B = 0,25 µg/L de Paracetamol; C = 2,5 µg/L de paracetamol. Espermatogônias = **stg**; Espermátides = **std**; Espermatozoides = **stz**; Células de Sertoli = **CS**; Septo delimitando os túbulos = —→. Hematoxilina-Eosina. Escala = 45 µm. N=5.

7. DISCUSSÃO

7.1 DICLOFENACO

O diclofenaco causou alterações importantes nos parâmetros hematológicos de *Rhamdia quelen*. Houve aumento do número de eritrócitos sugerindo uma necessidade maior de oxigênio pelas células, o que é corroborado pelo aumento do hematócrito nas concentrações 0,2 e 2 µg/L e da hemoglobina na concentração de 0,2 µg/L. Embora na concentração de 20 µg/L tenha ocorrido uma redução da hemoglobina, do HCM e do CHCM e um possível quadro de anemia. Além disso, o aumento do número de eritrócitos pode ter ocorrido pela presença de células jovens no sangue devido a uma ativação da eritropoiese (GALEB *et al.*, 2013).

Em relação aos leucócitos totais, houve um aumento destas células na exposição ao diclofenaco, bem como um aumento de linfócitos. Os leucócitos mostram um aumento em sua atividade em resposta a um agente tóxico ou estresse fisiológico (MARIAPPAN *et al.*, 2011). Em contrapartida, ocorreu uma redução dos neutrófilos em todas as concentrações e dos monócitos na menor concentração de diclofenaco, demonstrando que apesar do aumento do número de leucócitos e linfócitos, a redução dos neutrófilos pode determinar uma incapacidade de reação frente a infecções bacterianas, deixando o organismo mais susceptível. As pirazolonas que também pertencem aos anti-inflamatórios não-esteroidais causaram redução de monócitos em ratos (MARIAPPAN *et al.*, 2011). No entanto, na concentração de 2 µg/L o diclofenaco aumentou os monócitos em *Rhamdia quelen*.

O número de trombócitos também foi elevado na exposição ao diclofenaco. Os trombócitos são comparáveis às plaquetas de mamíferos e tem um importante papel na coagulação, a qual previne as hemorragias. Os trombócitos também são considerados células de defesa e atuam prevenindo infecções (PEREIRA *et al.*, 2012). Este aumento pode ser em decorrência do estresse causado por um xenobiótico e isto pode ter ocorrido na exposição ao diclofenaco.

Em relação à análise genética, não houve dano ao DNA e nem alteração na frequência de micronúcleos nos eritrócitos de *Rhamdia quelen*. Em outros

tecidos importantes para metabolismo e excreção, como o fígado e rim, respectivamente, o diclofenaco também não causou danos ao DNA. Não há dados na literatura sobre a participação do diclofenaco em danos ao DNA de peixes, no entanto, um ensaio com linhagem celular DT40 de galinha, indicou que este fármaco induz danos ao DNA, alterando a replicação e levando a quebras cromossômicas nestas células (LIU *et al.*, 2012).

Também ocorreu uma redução no tamanho do fígado (IHS) na menor concentração de diclofenaco. A exposição de trutas arco-íris ao diclofenaco causou uma depleção de glicogênio nos hepatócitos (TRIEBSKORN *et al.*, 2004), o que poderia causar redução do IHS. O crescimento dos hepatócitos pode ser afetado pela alteração na função destas células quando expostas a AINES (FLIPPIN *et al.*, 2007). Na exposição durante 3 meses às concentrações de 1 a 10.000 µg/L de diclofenaco, a espécie *Orizyas latipes*, o medaka japonês, não teve alteração no índice hepatossomático, apenas no índice gonadossomático das fêmeas (LEE *et al.*, 2011).

No fígado, o diclofenaco causou redução em algumas enzimas antioxidantes. As enzimas reduzidas foram SOD em todas as concentrações de diclofenaco e a CAT na concentração de 0,2 µg/L, mas a GPx não foi alterada. No entanto, o AINE ibuprofeno aumentou a GPx em peixes expostos a concentrações de 0,05; 1; 8 e 25 mg/L (BARTOSKOVA *et al.*, 2013). AINES atuam terapeuticamente através da inibição das ciclo-oxigenase e este mecanismo causa injúria mitocondrial envolvendo a geração de espécies reativas de oxigênio (EROs), as quais causam estresse oxidativo (QUINN *et al.*, 2011).

Em outros organismos, como invertebrados, por exemplo, e por meio de exposição aguda foram observados resultados contrários aos obtidos neste trabalho. Bivalves expostos à concentração de 1 e 1.000 µg/L de diclofenaco durante 96 h, tiveram aumento da LPO (QUINN *et al.*, 2011) e anfípodas *Hyalella azteca* sofreram estresse oxidativo pelo aumento da LPO e da enzima SOD quando expostos a sedimentos artificiais contendo diclofenaco (OVIEDO-GÓMEZ *et al.*, 2010).

Neste estudo o diclofenaco reduziu a LPO, isto pode ter ocorrido porque com o aumento tanto da concentração de GSH como da atividade da GST, as quais atuam na defesa antioxidante, ocorreu uma inibição do dano aos lipídios

da membrana. Além disso, como a GSH é utilizada pela GST nas reações de conjugação, o aumento na atividade da GST deve ter requerido um maior consumo de GSH e com isso, uma maior síntese desta molécula antioxidante. GSH pode agir como um agente redutor e reagir com compostos eletrofílicos e espécies oxidantes antes que elas interajam com macromoléculas como o DNA e as proteínas (POMPELLA *et al.*, 2003).

Um biomarcador de contaminação por metais, a metalotioneína, que possui grupamento cisteína como a GSH, teve sua expressão induzida na exposição de bivalves ao diclofenaco (QUINN *et al.*, 2011). O efeito protetor causado pelo diclofenaco através da redução da LPO pode explicar porque não ocorreu carbonilação de proteínas e nem danos ao DNA. Além disso, o aumento na enzima da Fase II da biotransformação GST pode ter evitado danos ao DNA. Stepanova *et al.* (2013) encontraram um aumento na atividade da GST em carpas juvenis expostas a altas concentrações de diclofenaco (3 mg/L). A atividade da GST de peixes *Danio rerio* expostos a 40, 120 e 250 mg/L do AINE ácido acetilsalicílico também foi aumentada (ZIVNA *et al.*, 2013).

A EROD, enzima da fase I da biotransformação, foi reduzida pelo diclofenaco. Em um estudo com hepatócitos de truta-arco-íris, o diclofenaco também causou redução da atividade da EROD (LAVILLE *et al.*, 2004). Embora o mecanismo de inibição da CYP1A não seja conhecido para o diclofenaco a redução da EROD também foi reportada em hepatócitos de rato (PAPPAS *et al.*, 1998).

Nas gônadas, o diclofenaco reduziu a atividade das enzimas SOD, em todas as concentrações testadas, e GPx e GST na concentração de 0,2 µg/L. Estas enzimas são importantes na defesa contra o estresse oxidativo. A redução das atividades das enzimas pode-se dar por ligação dos metabólitos do diclofenaco a estas proteínas e, conseqüentemente, inibição de suas atividades. Além das enzimas houve uma redução na LPO em gônadas também na concentração de 0,2 µg/L.

Não há estudos de estresse oxidativo em gônadas de peixe expostos a AINES e existem poucos estudos sobre estresse oxidativo causado por fármacos em peixes. No entanto, acredita-se que baixas concentrações de AINES podem proteger contra o estresse oxidativo (PETERSEN *et al.*, 2005).

Em um estudo com embriões de *Danio rerio* expostos a 0,03 µg/L de diclofenaco durante 90 min houve redução da LPO (FEITO *et al.*, 2012). Peixes juvenis também de *Danio rerio* expostos a concentrações subletais de 5, 15, 30 e 60 mg/L de diclofenaco por 28 dias também tiveram redução da LPO (PRASKOVA *et al.*, 2014). Estes resultados demonstram que, tanto na exposição aguda como subcrônica, o diclofenaco inibe a LPO, protegendo as membranas celulares. A concentração de GSH não foi alterada e isto pode ter ocorrido porque com a redução da atividade da GST, não houve a conjugação de GSH com compostos eletrofílicos.

Na histopatologia do fígado foi observado degeneração hidrópica, nos graus moderado e severo, na maior concentração e congestão sanguínea nas concentrações 2 e 20 µg/L.

Outros estudos não encontraram lesões significativas no fígado de peixes expostos ao diclofenaco (SCHWAIGER *et al.*, 2004; MEHINTO *et al.*, 2010; MEMMERT *et al.*, 2013). Apenas Hoeger *et al.* (2005) encontraram focos de células inflamatórias no fígado de trutas expostas ao diclofenaco.

As diferenças entre as injúrias encontradas neste trabalho e outros trabalhos com diclofenaco são provavelmente, decorrentes de uma susceptibilidade e maior sensibilidade da espécie *Rhamdia quelen* ao diclofenaco. Embora as injúrias encontradas sejam reversíveis com a retirada do contaminante, em uma situação realística onde há aporte constante de resíduos de fármacos no meio aquático pode ocorrer um agravamento das lesões.

Para o diclofenaco os dados histopatológicos do rim tem grande importância, em decorrência da quase extinção de espécies de abutre que se alimentaram de carcaças de animais tratados com diclofenaco e morreram em decorrência de falência renal (MEMMERT *et al.*, 2013). A nefrotoxicidade causada pelo diclofenaco é decorrente, principalmente da inibição da síntese de prostaglandinas e subsequente mudança nos mecanismos fisiológicos regulados por elas como: tônus e permeabilidade vascular e regulação iônica (HOEGGER *et al.*, 2005).

Neste trabalho, as alterações causadas pela exposição subcrônica ao diclofenaco em *Rhamdia quelen* foram congestão sanguínea moderada em todas as concentrações, congestão glomerular moderada na menor

concentração e degeneração hidrópica discreta na maior concentração. A congestão sanguínea deve-se à obstrução do fluxo sanguíneo em uma área e com isso ocorre o acúmulo de sangue na circulação venosa. Dentre as causas estão obstrução física dos vasos ou falha no fluxo normal. A degeneração hidrópica se trata da retenção de água intracitoplasmática por deficiência de ATP, levando ao colapso da bomba de sódio, a qual é responsável pelo equilíbrio de entrada e saída de água da célula. A intensidade da lesão é determinada pela coloração do citoplasma da célula, assim, quanto mais claro o citoplasma, maior é a quantidade de água intracitoplasmática, o que pode propiciar a ruptura da célula e conseqüentemente levar à necrose do tecido (SALAMAT E ZARIE, 2012). As alterações encontradas diferem de outros estudos utilizando o diclofenaco.

Schwaiger *et al.* (2004) encontraram degeneração hialina severa das células do epitélio tubular e nefrite em truta arco-íris expostas a 5 µg/L durante 28 dias.

Hoeger *et al.* (2005) encontrou em rim de truta, exposta por 21 dias ao diclofenaco, fluido proteináceo intersticial e necrose tubular.

Mehinto *et al.* (2010) em uma exposição de trutas também durante 21 dias encontraram necrose tubular, perda do espaço de Bowman e surgimento de novos néfrons.

As alterações encontradas em tecido renal de *Rhamdia quelen* são reversíveis e menos severas que as ocorridas em trutas expostas ao diclofenaco, demonstrando uma diferença na resposta ao fármaco entre espécies de peixe.

No cérebro, a serotonina e seu metabólito 5-HIA não foram alterados. O diclofenaco causou redução nos níveis de dopamina em *Rhamdia quelen* expostos a 2 µg/L e redução dos níveis de seu metabólito DOPAC em todas as concentrações de diclofenaco, portanto, esperava-se um efeito estimulatório sobre o eixo HPG, mas não houve alteração nos níveis de hormônios esteroides e nem de serotonina. A razão DOPAC/DA diminuiu tanto em 0,2 µg/L como em 20 µg/L, mas não em 2 µg/L, sugerindo que a redução da razão metabólito/neurotransmissor foi devido à diminuição do metabolismo de DA. A relação metabólito/neurotransmissor é um parâmetro eficaz para verificar a atividade do sistema monoaminérgico. Desta forma, a redução da razão

DOPAC/DA pode ser explicada pela redução tanto da síntese como da metabolização de DA.

Poucos estudos têm sido publicados sobre o efeito de poluentes ambientais no cérebro de peixes e os mecanismos de neuromodulação não são totalmente esclarecidos. Apesar disso, podem-se citar algumas possibilidades para os resultados encontrados. A redução de dopamina pode ter ocorrido por uma ação do diclofenaco sobre a tirosina hidroxilase reduzindo a conversão de tirosina em dopamina ou ainda por um aumento na razão de absorção e consumo deste neurotransmissor, ou seja, de um aumento na atividade dopaminérgica (YARAHMADI *et al.*, 2013).

Quando verificados os hormônios esteroides, o diclofenaco não alterou os níveis de testosterona e estradiol no plasma de machos de *Rhamdia quelen*. Também na espécie *Danio rerio*, machos e fêmeas expostos a 10 e 100 µg/L de diclofenaco durante 14 dias não tiveram alterações nos níveis de hormônios esteroidais, embora outro AINE, como o ibuprofeno tenha causado desregulação endócrina, elevando os níveis de estradiol e testosterona em fêmeas e reduzindo os níveis de testosterona em machos (JI *et al.*, 2013). Os AINES, como o diclofenaco, exercem seus efeitos clínicos por inibição da COX em seres humanos e animais. Assim espera-se que com a inibição da COX, as prostaglandinas, como a prostaglandina E₂, a qual é envolvida na biossíntese de estrogênios (BRUEGGEMEIER *et al.*, 2005), sejam reduzidas e isto afete os níveis de estrogênios. No entanto, neste trabalho isto não ocorreu, pois os níveis de estradiol não foram alterados.

O índice gonadossomático e a morfologia das gônadas de peixes machos expostos ao diclofenaco não foram alterados. Os testículos mostraram um padrão morfológico preservado. Os grupos expostos apresentaram estrutura em túbulos, preenchidos com espermatozoides, demonstrando que não houve prejuízo na espermatogênese. Estes resultados podem ser devido aos níveis de testosterona e estradiol não terem sofrido alterações nos animais expostos ao diclofenaco.

O diclofenaco causou alteração no IGS em fêmeas de *Orizyas latipes* quando expostas cronicamente às concentrações de 1 a 10000 µg/L de diclofenaco, mas não alterou o IGS dos machos (LEE *et al.*, 2011). Apesar de ter ocorrido uma redução nos níveis de DA nos animais expostos a 2 µg/L de

diclofenaco, isto não foi suficiente para desregular o eixo HPG em *Rhamdia quelen*.

7.2 PARACETAMOL

O paracetamol reduziu a hemoglobina e o hematócrito na concentração 0,25 µg/L. Além de reduzir o VCM e elevar o CHCM na concentração de 2,5 µg/L, porém não alterou o número de eritrócitos e nem o HCM. A redução de hemoglobina, hematócrito e VCM, além da elevação de CHCM são fatores indicativos de anemia. Há recomendações de evitar AINES em pacientes com quadros de anemia, pois se acredita que estes fármacos podem causar deficiência de ferro (GODDARD *et al.*, 2000). Porém este efeito não foi observado em *Rhamdia quelen* nas concentrações utilizadas.

Na concentração de 0,25 µg/L houve um aumento no número de trombócitos, indicando um mecanismo de defesa frente ao paracetamol. O paracetamol também aumentou os leucócitos totais nos peixes expostos devido ao aumento no número de neutrófilos. Infecções e intoxicações levam ao aumento de leucócitos em peixes (ATAMANALP *et al.*, 2011). No entanto, ocorreu redução do número de linfócitos, provavelmente, devido ao estresse causado pelo contaminante paracetamol.

No fígado, o paracetamol causou um aumento do IHS na concentração de 0,25 µg/L. O índice hepatossomático pode refletir a demanda de energia metabólica e estado nutricional de curto prazo e pode ser considerado um indicador de saúde geral do organismo, pois é sensível a contaminantes ambientais. Porter e Janz (2003) também observaram aumento da IHS em peixes machos (*Lepomis megalotis*) expostos a efluentes tratados de esgoto municipal. De acordo com os autores, o aumento do tamanho do fígado pode ser atribuído ao processo de remoção de substâncias tóxicas e isto pode ter ocorrido com os animais expostos ao paracetamol.

O metabolismo de paracetamol leva a produção de espécies reativas de oxigênio porque este fármaco é convertido a sua forma tóxica N-acetil-p-benzoquinona-imina (NAPQI) que é um composto eletrofílico. Além disso,

NAPQI pode aumentar a formação de espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio como ânion superóxido, radical hidroxila e peróxido de hidrogênio e peroxinitrila (YEN *et al.*, 2007).

O aumento na formação de espécies reativas gerado pelo paracetamol é evidenciado pela indução da SOD e pela carbonilação de proteínas nos peixes expostos a 2,5 µg/L. Como as enzimas GPx e CAT não foram alteradas, possivelmente, o peróxido de hidrogênio gerado pela SOD não foi convertido à água e permaneceu na célula causando a carbonilação de proteínas nos peixes expostos a 0,25 e 2,5 µg/L de paracetamol e danos ao DNA dos hepatócitos nos animais expostos a concentração de 0,25 µg/L de paracetamol.

O paracetamol é conhecido por induzir danos ao fígado de humanos e animais em altas doses, os quais levam a elevação de enzimas hepáticas (KUMAR *et al.*, 2004). O metabólito do paracetamol, NAPQI, é conjugado com GSH por enzimas de fase II como a GST. O excesso de formação de NAPQI leva a depleção de GSH e resulta em ligação covalente de NAPQI a macromoléculas celulares no fígado levando à injúria hepática (YANPALLEWAR *et al.*, 2003).

Neste estudo o paracetamol não alterou a concentração de GSH. A preservação dos estoques de GSH é responsável pela proteção contra a hepatotoxicidade induzida por paracetamol (AHMED e KHATER, 2001). Como resultado de não ter ocorrido depleção de GSH também não ocorreu dano aos lipídios, porém outras moléculas como proteínas e DNA foram afetadas pelas espécies reativas geradas pelo paracetamol.

As enzimas EROD e GST foram reduzidas pelo paracetamol demonstrando que a biotransformação por estas vias foi afetada. O mecanismo de inibição de enzimas de biotransformação é desconhecido, mas sugere-se que ocorra por uma inibição pelos xenobióticos da transcrição de genes específicos resultando em redução dos níveis de RNAm destas enzimas e por consequência, em suas baixas atividades (SILVA *et al.*, 2011). Isto pode acarretar numa permanência maior do fármaco no organismo e consequentemente uma duração de efeito mais prolongado (FAKURAZI *et al.*, 2008). A elevação dos níveis de estradiol na concentração de 2,5 µg/L, é um dos mecanismos que pode levar à redução na atividade da EROD (KIRBY *et al.*, 2007).

Nas gônadas, os biomarcadores bioquímicos analisados (SOD, GPx, GST, GSH e LPO) não foram alterados. Na literatura não há dados sobre o efeito do paracetamol em relação ao estresse oxidativo em gônadas de peixes. No entanto, em fígado de ratos e camundongos já foi relatado que o paracetamol causa estresse oxidativo (ARNAIZ *et al.*, 1995; ZOUBAIR *et al.*, 2013), o que também foi observado neste estudo, visto que houve um carbonilação de proteínas e aumento da atividade da SOD.

Embora não tenham ocorrido alterações na frequência de micronúcleos e dano ao DNA de eritrócitos e células renais, o paracetamol causou danos ao DNA das células hepáticas na concentração de 0,25 µg/L, demonstrando seu efeito tóxico sobre o fígado.

Em um ensaio *in vitro* utilizando hemócitos de bivalves o paracetamol, comparado a outros AINES, demonstrou maior potencial genotóxico (PAROLINI *et al.*, 2010).

Lewerenz *et al.* (2003) observaram também quebras do DNA de hepatócitos de rato em cultura. No entanto, dados indicam que o paracetamol causa lesões cromossômicas *in vitro* em células de mamífero em altas concentrações, indicando que os efeitos similares ocorrem *in vivo* em doses elevadas.

Em uma revisão de Bergman *et al.* (1996), três mecanismos para a genotoxicidade induzida por paracetamol são descritos: (1) inibição de ribonucleotídeo redutase; (2) aumento dos níveis de cálcio citosólico; (3) dano ao DNA causado pela NAPQI depois de depleção de glutathione. A indução de micronúcleo em células da medula óssea de rato foi observada na exposição a altas concentrações de paracetamol (DUNN *et al.*, 1987).

O paracetamol pode causar hepatotoxicidade no homem e em animais experimentais quando em sobredosagem (LEE, 2004). Neste estudo, os peixes expostos a concentrações ambientais de paracetamol tiveram congestão sanguínea e infiltração leucocitária periférica e multifocal em grau discreto. A infiltração leucocitária causada pelo paracetamol em *Rhamdia quelen* pode ser causada pelo acúmulo do metabólito NAPQI, o qual se liga às proteínas dos hepatócitos e causa lesões de forma direta (SHIVASHRI *et al.*, 2012).

Em hepatócitos de truta expostos ao paracetamol foi observado núcleo picnótico e degeneração hidrópica. Na exposição aguda, via oral, a 500 mg/Kg

de paracetamol foi observada congestão no tecido hepático de *Oreochromis mossambicus* (KAVITHA *et al.*, 2011).

As lesões observadas em fígado são de grau discreto, porém acrescidas do dano de DNA e proteínas carboniladas/oxidadas demonstra que a exposição durante 21 dias ao paracetamol, mesmo em baixas concentrações, foi suficiente para causar injúrias ao tecido hepático.

AINES podem induzir lesões renais agudas e crônicas, como por exemplo, nefrite intersticial aguda. No entanto, o número de casos relatados é baixo. Há evidências de que a nefrite intersticial resulta principalmente de uma resposta de hipersensibilidade retardada a AINES, e síndrome nefrótica resulta de alterações na permeabilidade glomerular mediadas por prostaglandinas e hormônios. A toxicidade parece ocorrer devido aos metabólitos destes fármacos desempenharem um papel fundamental na indução de fibrose intersticial, o que pode ser facilitado por uma produção sustentada de alguns fatores de crescimento e citocinas (KLEINKNECHT, 1995).

Neste estudo, o paracetamol causou peri-nefrite de grau discreto na maior concentração, além de congestão glomerular e degeneração hidrópica tubular com aumento da severidade das lesões de acordo com a concentração. Não há dados na literatura sobre os efeitos do paracetamol nos tecido renal de peixes adultos e os dados deste trabalho são pioneiros em demonstrar que o paracetamol pode causar injúria a este tecido apresentando um potencial nefrotóxico. Peng *et al.* (2010) avaliou a nefrotoxicidade de diferentes concentrações de paracetamol utilizando embriões de *Danio rerio* e observou que o paracetamol induziu danos no glomérulo, tubo pronéfrico e ducto pronéfrico.

A administração aguda de paracetamol pode causar uma elevação nos níveis de serotonina no córtex cerebral (DOGRUL *et al.*, 2012). De acordo com Trudeau *et al.* (2005), a serotonina tem relevância direta para o potencial de desregulador-endócrino dos fármacos encontrados no ambiente. Em contraste ao efeito inibitório da dopamina sobre o eixo Hipotálamo-Pituitária-Gônada, a serotonina tem um efeito estimulatório sobre a liberação de gonadotrofinas.

Neste trabalho, o paracetamol aumentou os níveis dos neurotransmissores DA e 5-HT na concentração de 0,25 µg/L, aumentou o metabólito da serotonina, 5-HIAA e elevou a razão 5-HIAA/5-HT na concentração

de 2,5 µg/L. Pini *et al.* (1997) sugerem que o paracetamol atua em receptores opióides liberando 5-HT e isto é responsável por seu efeito analgésico. Além disso, pode atuar em muitos neurotransmissores e catecolaminas que desempenham um papel importante na reprodução (HACHFI *et al.*, 2012).

Em relação aos níveis de hormônios esteroidais, foi observada uma redução dos níveis de testosterona nas duas concentrações de paracetamol e aumento dos níveis de estradiol na concentração de 2,5 µg/L, demonstrando um efeito anti-androgênico. Este efeito pode comprometer a reprodução da espécie por afetar a produção de células germinativas.

Outros AINES como o ibuprofeno e ácido mefenâmico causaram estrogenicidade em peixes *Danio rerio* com alterações endócrinas mais pronunciadas nos peixes machos (JI *et al.*, 2013).

Em um estudo com células de testículo humano expostas ao paracetamol, Albert *et al.* (2013) reportaram redução nos níveis de testosterona, embora não tenha sido observada alteração na morfologia testicular.

O IGS não foi alterado pelo paracetamol. Embora haja relatos que outros AINES possam reduzir o peso das gônadas devido à inibição do crescimento gonadal e alterar a reprodução sendo considerados xenoestrógenos (JI *et al.*, 2013).

A morfologia gonadal mostrou que a espermiogênese foi afetada, pois não foram encontrados espermatozoides nos animais expostos a 2,5 µg/L, apenas espermatogônias. Como os animais apresentavam peso e comprimento similar sugere-se que em decorrência da redução de testosterona e aumento dos níveis de estradiol na concentração de 2,5 µg/L a espermiogênese foi afetada.

Em humanos, o paracetamol causou redução de testosterona em células de testículo, mas nenhuma alteração da morfologia testicular foi observada (ALBERT *et al.*, 2013).

Tanto o diclofenaco quanto o paracetamol causaram alterações importantes em *Rhamdia quelen*, mesmo quando os animais foram expostos às menores concentrações destes fármacos. A redução do índice hepatossomático e das atividades da GST e GPx e da LPO em gônadas ocorreu apenas na exposição à menor concentração de diclofenaco (0,2 µg/L).

Nesta concentração, assim como nas demais testadas, ocorreu também redução da atividade da SOD e da LPO, aumento de GSH e da atividade da GST, em fígado, injúrias renais de grau moderado, redução de DOPAC e da relação DOPAC/DA. Efeitos nos animais expostos à menor concentração (0,25 µg/L) de paracetamol também foram observados. Houve redução da hemoglobina e do hematócrito, além de redução no número de linfócitos, aumento do índice hepatossomático e danos ao DNA das células hepáticas e aumento dos neurotransmissores DA e 5-HT. Em ambas as concentrações de paracetamol ocorreram aumento de leucócitos e linfócitos, redução de testosterona, carbonilação de proteínas no fígado, redução da biotransformação e injúrias hepáticas de grau discreto. Com base, nestes dados verifica-se o risco da exposição de organismos aquáticos, como os peixes, à AINES mesmo em baixas concentrações, pois estes podem afetar parâmetros fisiológicos da espécie e causar alterações que prejudicam até mesmo a reprodução, a qual é necessária para a continuação da espécie.

8. CONCLUSÕES

A exposição subcrônica a concentrações ecologicamente relevantes de diclofenaco e paracetamol causou efeitos importantes em *Rhamdia quelen*.

O diclofenaco afetou as defesas antioxidantes em fígado e gônada de *Rhamdia quelen*, elevou a quantidade de células de defesa e causou anemia, causou também injúrias aos tecidos hepático e renal. Porém, não causou genotoxicidade e não afetou os parâmetros reprodutivos. Estes resultados demonstraram que o diclofenaco, enquanto micropolvente, afetou principalmente os parâmetros hematológicos e os tecidos hepático e renal na espécie estudada.

O paracetamol afetou o fígado causando estresse oxidativo, genotoxicidade e injúrias teciduais, causou alterações hematológicas e injúrias renais. Além de interferir em parâmetros reprodutivos como os neurotransmissores, hormônios esteroides e morfologia testicular. Os resultados mostraram que houve uma desregulação do eixo hipotálamo-pituitária-gônada, pois foi observado um efeito anti-androgênico do paracetamol nos animais expostos e com isso, este fármaco merece atenção em relação ao seu potencial efeito desregulador endócrino. O fígado e o rim também foram órgãos-alvo para a toxicidade causada por este fármaco, mesmo em concentrações encontradas no ambiente aquático.

Como estes fármacos são amplamente detectados no ambiente e em função dos efeitos causados por eles na espécie *Rhamdia quelen*, a exposição contínua a estes micropoluentes pode comprometer outras espécies e alterar o ecossistema no qual elas estão inseridas.

REFERÊNCIAS

AEBI, H. Catalase in vitro. **Methods Enzymology**, v. 105, p. 121-126, 1984.

AHMED, M. B.; KHATER, M. R. Evaluation of the protective potential of *Ambrosia maritima* extract on acetaminophen-induced liver damage. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 75, n. 2, p. 169-174, 2001.

AL AUKIDY, M.; VERLICCHI, P.; JELIC, A.; PETROVIC, M.; BARCELÒ, D. Monitoring release of pharmaceutical compounds: Occurrence and environmental risk assessment of two WWTP effluents and their receiving bodies in the Po Valley, Italy. **Science of the Total Environment**, v. 438, p. 15-25, 2012.

ALBERT, O.; DESDOITS-LETHIMONIER, C.; LESNÉ, L.; LEGRAND, A.; GUILLÉ, F.; BENSALAH, K.; JÉGOU, B. Paracetamol, aspirin and indomethacin display endocrine disrupting properties in the adult human testis in vitro. **Human Reproduction**, v. 28, n. 7, p. 1890-1898, 2013.

ALDEKOA, J.; MEDICI, C.; OSORIO, V.; PÉREZ, S.; MARCÉ, R.; BARCELÓ, D.; FRANCÉS, F. Modelling the emerging pollutant diclofenac with the GREAT-ER model: Application to the Llobregat River Basin. **Journal of Hazardous Materials**, v. 263, p. 207-213, 2013.

AL-QUTOB, M. A.; NASHASHIBI, T. S.; AL-QUTOB, M. The effects of COX-Inhibitors (Diclofenac and Ibuprofen) on growth rate, mortality and sex reversal in Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus*). **AAFL Bioflux**, v. 2, n. 4, p. 381-390, 2009.

AL-SABTI, K.; METCALFE, C. D. Fish micronuclei for assessing genotoxicity in water. **Mutation Research/Genetic Toxicology**, v. 343, n. 2, p. 121-135, 1995.

AN, J.; ZHOU, Q.; SUN, F.; ZHANG, L. Ecotoxicological effects of paracetamol on seed germination and seedling development of wheat (*Triticum aestivum* L.). **Journal of Hazardous Materials**, v. 169, n. 1, p. 751-757, 2009.

ARNAIZ, S. L.; LLESUY, S.; CUTRÍN, J. C.; BOVERIS, A. Oxidative stress by acute acetaminophen administration in mouse liver. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 19, n. 3, p. 303-310, 1995.

ASHTON, D.; HILTON, M.; THOMAS, K. V. Investigating the environmental transport of human pharmaceuticals to streams in the United Kingdom. **Science of the Total Environment**, v. 333, n. 1, p. 167-184, 2004.

ATAMANALP, M.; AKSAKAL, E.; KOCAMAN, E. M.; UÇAR, A.; TÜRKEZ, H. The alterations in the hematological parameters of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*, exposed to cobalt chloride. **Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi**, v. 17, p. 73-76, 2011.

BALBINO, E. C.; BALBINO, M. L. C. O descarte de medicamentos no Brasil: Um olhar socioeconômico e ambiental do lixo farmacêutico. In: **Âmbito Jurídico**, Rio Grande, XIV, n. 86, mar 2011. Disponível em: http://www.ambitojuridico.com.br/site/index.php?artigo_id=9187&n_link=revista_artigos_leitura>. Acesso em maio 2014.

BALDISSEROTTO, B. **Fisiologia de peixes aplicada à piscicultura**. Santa Maria: Editora da UFSM, 2013. 352p.

BANERJEE, S.; BHATTACHARYA, S. Histopathology of kidney of *Channa punctatus* exposed to chronic non lethal level of Elsan, mercury, and ammonia. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 29, n. 3, p. 265-275, 1994.

BARCELLOS, L. J. G.; WASSERMANN, G. F.; SCOTT, A. P.; WOEHL, V. M.; QUEVEDO, R. M.; ITTZÉS, I.; LULHIER, F. Plasma steroid concentrations in relation to the reproductive cycle of cultured male *Rhamdia quelen*. **Journal of Fish Biology**, v. 61, n. 3, p. 751-763, 2002.

BARCELLOS, L. J.; KREUTZ, L. C.; DE SOUZA, C.; RODRIGUES, L. B.; FIOREZE, I.; QUEVEDO, R. M.; TERRA, S. Haematological and biochemical characteristics of male jundia (*Rhamdia quelen* Quoy & Gaimard Pimelodidae): changes after acute stress. **Aquaculture Research**, v. 34, n. 15, p. 1465-1470, 2003.

BARTOSKOVA, M.; DOBSIKOVA, R.; STANCOVA, V.; ZIVNA, D.; BLAHOVA, J.; MARSALEK, P.; FAGGIO, C. Evaluation of ibuprofen toxicity for zebrafish (*Danio rerio*) targeting on selected biomarkers of oxidative stress. **Neuroendocrinology Letters**, v. 34, n. 2, p. 102-108, 2013.

BELPAEME, K.; COOREMAN, K.; KIRSCH-VOLDERS, M.; BELPAEME, K.; COOREMAN, K.; KIRSCH-VOLDERS, M. Development and validation of the in vivo alkaline comet assay for detecting genomic damage in marine flatfish. **Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 415, n. 3, p. 167-184, 1998.

BERETTA, M.; BRITTO, V.; TAVARES, T. M.; DA SILVA, S. M. T.; PLETSCHE, A. L. Occurrence of pharmaceutical and personal care products (PPCPs) in marine sediments in the Todos os Santos Bay and the north coast of Salvador, Bahia, Brazil. **Journal of Soils and Sediments**, v. 14, n. 7, p. 1278-1286, 2014.

BERGMAN, K.; MÜLLER, L.; TEIGEN, S. W. The genotoxicity and carcinogenicity of paracetamol: a regulatory (re) view. **Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis**, v. 349, n. 2, p. 263-288, 1996.

BETTI, C.; DAVINI, T.; GIANNESI, L.; LOPRIENO, N.; BARALE, R. Microgel electrophoresis assay (comet test) and SCE analysis in human lymphocytes from 100 normal subjects. **Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis**, v. 307, n. 1, p. 323-333, 1994.

BILA, D. M.; DEZOTTI, M. Fármacos no meio ambiente. **Química Nova**, v. 26, n. 4, p. 523-530, 2003.

BOMBARDELLI, R. A.; MÖRSCHBÄCHER, E. F.; CAMPAGNOLO, R.; SANCHES, E. A.; SYPERRECK, M. A. Dose inseminante para fertilização artificial de ovócitos de jundiá cinza, *Rhamdia quelen* (Quoy & Gaimardm, 1824). **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 35, n. 4, p. 1251-1257, 2006.

BOLOGNESI, C.; HAYASHI, M. Micronucleus assay in aquatic animals. **Mutagenesis**, v. 26, n. 1, p. 205-213, 2011.

BOUND, J. P.; VOULVOULIS, N. Pharmaceuticals in the aquatic environment—a comparison of risk assessment strategies. **Chemosphere**, v. 56, n. 11, p. 1143-1155, 2004.

BRADFORD, M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, n. 1, p. 248-254, 1976.

BRIAN, J. V.; HARRIS, C. A.; SCHOLZE, M.; KORTENKAMP, A.; BOOY, P.; LAMOREE, M.; POJANA, G.; JONKERS, N.; MARCOMINI, A.; SUMPTER, J. P. Evidence of estrogenic mixture effects on the reproductive performance of fish. **Environmental Science & Technology**, v. 41, n. 1, p. 337-344, 2007.

BRUEGGEMEIER, R. W., DÍAZ-CRUZ, E. S., LI, P. K., SUGIMOTO, Y., LIN, Y. C., & SHAPIRO, C. L. Translational studies on aromatase, cyclooxygenases, and enzyme inhibitors in breast cancer. **The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology**, v. 95, n. 1, p. 129-136, 2005.

BUCHELI, T. D.; FENT, K. Induction of cytochrome P450 as a biomarker for environmental contamination in aquatic ecosystems. **Critical Reviews in Environmental Science and Technology**, v. 25, n. 3, p. 201-268, 1995.

BUENO, M. J.; GOMEZ, M. J.; HERRERA, S.; HERNANDO, M. D.; AGÜERA, A.; FERNÁNDEZ-ALBA, A. R. Occurrence and persistence of organic emerging contaminants and priority pollutants in five sewage treatment plants of Spain: two years pilot survey monitoring. **Environmental Pollution**, v. 164, p. 267-273, 2012.

BURKE, M. D.; MAYER, R. T. Ethoxyresorufin: direct fluorimetric assay of a microsomal O-dealkylation which is preferentially inducible by 3-methylcholanthrene. **Drug Metabolism and Disposition**, v. 2, n. 6, p. 583-588, 1974.

BUSER, H.R.; POIGER, T.; MÜLLER, M. D. Occurrence and environmental behavior of the chiral pharmaceutical drug ibuprofen in surface waters and in wastewater. **Environmental Science & Technology**, v. 33, n. 15, p. 2529-2535, 1999.

CAMPOS, C. M.; DE MORAES, J.; MORAES, F. R. Histopatologia de fígado, rim e baço de *Piaractus mesopotamicus*, *Prochilodus lineatus* e *Pseudoplatystoma fasciatum* parasitados por myxosporídios, capturados no Rio Aquidauana, Mato Grosso do Sul, Brasil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 17, n. 4, p. 200-205, 2008.

CARNEIRO, P.C.F.; MIKOS, J.D. Frequência alimentar e crescimento de alevinos de jundiá, *Rhamdia quelen*. **Ciência Rural**, v. 35, n. 1, p. 187-191, 2005.

CHAN, L. Y.; CHIU, P. Y.; SIU, S. S. N.; LAU, T. K. A study of diclofenac-induced teratogenicity during organogenesis using a whole rat embryo culture model. **Human Reproduction**, v. 16, n. 11, p. 2390-2393, 2001.

CHANG, T.C.; HUANG, M. L.; HSU, W.L.; HWANG, J.M.; HSU, L.Y. Synthesis and biological evaluation of ebselen and its acyclic derivatives. **Chemical and Pharmaceutical Bulletin**, v. 51, n. 12, p. 1413-1416, 2003.

CHEN, X.; LIANG, H.; REMMEN, H.V.; VIJG, J.; RICHARDSON, A. Catalase transgenic mice: characterization and sensitivity to oxidative stress. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 422, n. 2, p. 197-210, 2004.

COLLIER, H. B. Standardization of blood haemoglobin determinations. **Canadian Medical Association Journal**, v. 50, n. 6, p. 550, 1944.

CHRISTEN, V.; HICKMANN, S.; RECHENBERG, B.; FENT, K. Highly active human pharmaceuticals in aquatic systems: a concept for their identification based on their mode of action. **Aquatic Toxicology**, v. 96, n. 3, p. 167-181, 2010.

CHRISTENSEN, A. M.; MARKUSSEN, B.; BAUN, A.; HALLING-SØRENSEN, B. Probabilistic environmental risk characterization of pharmaceuticals in sewage treatment plant discharges. **Chemosphere**, v. 77, n. 3, p. 351-358, 2009.

COLORADO, UNIVERSITY OF COLORADO BOUNDER. **Brain and pituitary gland**. Disponível em: <<http://www.colorado.edu/intphys/iphy4480tsai/Lecture9.html>>. Acesso em: 07/08/2014.

DAMSTRA, T.; BARLOW, S.; BERGMAN, A.; KAVLOCK, R.; VAN DER KRAAK, G. Global assessment of the state-of-the-science of endocrine disruptors. **Geneva: World Health Organization**, 2002.

DAUGHTON, C. G.; TERNES, T. A. Pharmaceuticals and personal care products in the environment: agents of subtle change? **Environmental Health Perspectives**, v. 107, n. 6, p. 907, 1999.

DE MENEZES, C. C.; LORO, V. L.; DA FONSECA, M. B.; CATTANEO, R.; PRETTO, A.; MIRON, D. D. S.; SANTI, A. Oxidative parameters of *Rhamdia quelen* in response to commercial herbicide containing clomazone and recovery pattern. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 100, n. 2, p. 145-150, 2011.

DESBROW, C. E. J. R.; ROUTLEDGE, E. J.; BRIGHTY, G. C.; SUMPTER, J. P.; WALDOCK, M. Identification of estrogenic chemicals in STW effluent. 1. Chemical fractionation and in vitro biological screening. **Environmental Science & Technology**, v. 32, n. 11, p. 1549-1558, 1998.

DOGRUL, A.; SEYREK, M.; AKGUL, E. O.; CAYCI, T.; KAHRAMAN, S.; BOLAY, H. Systemic paracetamol-induced analgesic and antihyperalgesic effects through activation of descending serotonergic pathways involving spinal 5-HT₇ receptors. **European Journal of Pharmacology**, v. 677, n. 1, p. 93-101, 2012.

DRABKIN, D. L. Spectrophotometric studies XIV. The crystallographic and optical properties of the hemoglobin of man in comparison with those of other species. **Journal of Biological Chemistry**, v. 164, n. 2, p. 703-723, 1946.

DUNN, T. L.; GARDINER, R. A.; SEYMOUR, G. J.; LAVIN, M. F. Genotoxicity of analgesic compounds assessed by an *in vitro* micronucleus assay. **Mutation Research/Genetic Toxicology**, v. 189, n. 3, p. 299-306, 1987.

EERTMANS, F.; DHOOGHE, W.; STUYVAERT, S.; COMHAIRE, F. Endocrine disruptors: effects on male fertility and screening tools for their assessment. **Toxicology in Vitro**, v. 17, n. 5, p. 515-524, 2003.

FAKURAZI, S.; HAIRUSZAH, I.; NANTHINI, U. *Moringa oleifera* Lam prevents acetaminophen induced liver injury through restoration of glutathione level. **Food and Chemical Toxicology**, v. 46, n. 8, p. 2611-2615, 2008.

FEITO, R.; VALCÁRCEL, Y.; CATALÁ, M. Biomarker assessment of toxicity with miniaturised bioassays: diclofenac as a case study. **Ecotoxicology**, v. 21, n. 1, p. 289-296, 2012.

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

- 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.
- FOCAZIO, M. J.; KOLPIN, D. W.; BARNES, K. K.; FURLONG, E. T.; MEYER, M. T.; ZAUGG, S. D.; THURMAN, M. E. A national reconnaissance for pharmaceuticals and other organic wastewater contaminants in the United States—II) Untreated drinking water sources. **Science of the Total Environment**, v. 402, n. 2, p. 201-216, 2008.
- FUNKENSTEIN, B.; BOWMAN, C. J.; DENSLOW, N. D.; CARDINALI, M.; CARNEVALI, O. Contrasting effects of estrogen on transthyretin and vitellogenin expression in males of the marine fish, *Sparus aurata*. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 167, n. 1, p. 33-41, 2000.
- GALEB, L. D. A. G.; GANECO, L. N.; FREDIANELLI, A. C.; WAGNER, R.; FAM, A. L. P. D. A.; ROCHA, D. C. C.; PIMPÃO, C. T. Acute intoxication by deltamethrin in jundia: emphasis on clinical, biochemical and haematological effects. **Embrapa Pesca e Aquicultura-Artigo em periódico indexado (ALICE)**, 2013.
- GAO, R.; YUAN, Z.; ZHAO, Z.; GAO, X. Mechanism of pyrogallol autoxidation and determination of superoxide dismutase enzyme activity. **Bioelectrochemistry and Bioenergetics**, v. 45, n. 1, p. 41-45, 1998.
- GHELFI, A. **Efeitos toxicológicos do diclofenaco em peixes *Rhamdia quelen***. Dissertação de Mestrado. Programa de Pós-Graduação em Ecologia. Universidade Federal do Paraná, 2014.
- GIROTTI, A. W. Introduction to serial reviews on regulatory and cytoprotective aspects of lipid hydroperoxide metabolism. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 33, n. 2, p. 153, 2002.
- GODDARD, A. F.; MCINTYRE, A. S.; SCOTT, B. B. Guidelines for the management of iron deficiency anaemia. **Gut**, v. 46, n. 4, p. iv1-iv5, 2000.
- GOMES, L.C.; GOLOMBIESKI, J.; CHIPPARI-GOMES, A.R.; BALDISSEROTTO, B. Biology of *Rhamdia quelen* (Teleostei, Pemelodidae). **Ciência Rural**, v. 30, n. 1, p. 179-185, 2000.
- GÓMEZ, M. J.; MARTÍNEZ BUENO, M. J.; LACORTE, S.; FERNÁNDEZ-ALBA, A. R.; AGÜERA, A. Pilot survey monitoring pharmaceuticals and related compounds in a sewage treatment plant located on the Mediterranean coast. **Chemosphere**, v. 66, n. 6, p. 993-1002, 2007.
- GOMIERO, L. M.; SOUZA, U. P.; BRAGA, F. M. S. Reprodução e alimentação de *Rhamdia quelen* (Quoy & Gaimard, 1824) em rios do Núcleo Santa Virgínia, Parque Estadual da Serra do Mar, São Paulo, SP. **Biota Neotropica**, v. 7, n. 3, p. 127-133, 2007.

GREEN, M. H. L.; LOWE, J. E.; HARCOURT, S. A.; AKINLUYI, P.; ROWE, T.; COLE, J.; ARLETT, C. F. UV-C sensitivity of unstimulated and stimulated human lymphocytes from normal and xeroderma pigmentosum donors in the comet assay: a potential diagnostic technique. **Mutation Research/DNA Repair**, v. 273, n. 2, p. 137-144, 1992.

GUL, S.; BELGE-KURUTAS, E.; YILDIZ, E.; SAHAN, A.I.; DORAN, F. Pollution correlated modifications of liver antioxidant systems and histopathology of fish (Cyprinidae) living in Seyhan Dam Lake, Turkey. **Environment International**, v. 30, n. 5, p. 605-609, 2004.

HACHFI, L.; COUVRAY, S.; SIMIDE, R.; TARNOWSKA, K.; PIERRE, S.; GAILLARD, S.; PRÉVOT-D'ALVISE, N. Impact of Endocrine Disrupting Chemicals [EDCs] on Hypothalamic-Pituitary-Gonad-Liver [HPGL] Axis in Fish. **World**, v. 4, n. 1, p. 14-30, 2012.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C. Cellular responses to oxidative stress: adaptation, damage, repair, senescence and death. **Free Radicals in Biology and Medicine**, v. 4, 2007.

HAN, S.; CHOI, K.; KIM, J.; JI, K.; JIM, S.; AHN, B.; YUN, J.; CHOI, K.; KHIM, J. S.; ZHANG, X.; GIESY, J. P. 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.

HAYASHI, Y.; HECKMANN, L. H.; CALLAGHAN, A.; SIBLY, R. M. Reproduction recovery of the crustacean *Daphnia magna* after chronic exposure to ibuprofen. **Ecotoxicology**, v. 17, n. 4, p. 246-251, 2008.

HAYES, M.A.; TIMMINS, A.C.; YAU, E.H.; PALAZZO, M.; WATSON, D.; HINDS, C. J. Oxygen transport patterns in patients with sepsis syndrome or septic shock: influence of treatment and relationship to outcome. **Critical Care Medicine**, v. 25, n. 6, p. 926-936, 1997.

HEDDLE, J. A.; SALAMONE, M. F. The Micronucleus Assay. I. In Vivo. In: **Short-term Tests for Chemical Carcinogens**. Springer New York, p. 243-249, 1981.

HIGUCHI, Y. Chromosomal DNA fragmentation in apoptosis and necrosis induced by oxidative stress. **Biochemical Pharmacology**, v. 66, n. 8, p. 1527-1535, 2003.

HIGUCHI, L. H.; FEIDEN, A.; MALUF, M. L. F.; DALLAGNOL, J. M.; ZAMINHAN, M.; BOSCOLO, W. R. Avaliação eritrocitária e bioquímica de jundiás (*Rhamdia quelen*) submetidos à dieta com diferentes níveis protéicos e energéticos. **Ciência Animal Brasileira**, v. 12, n. 1, p. 70-75, 2011.

HINE, P. M. The granulocytes of fish. **Fish Shellfish Immunology**, v. 2, p. 79-98, 1992.

HOEGER, B.; KÖLLNER, B.; DIETRICH, D. R.; HITZFELD, B. 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.

HOOFTMAN, R. N.; DE RAAT, W. K. Induction of nuclear anomalies (micronuclei) in the peripheral blood erythrocytes of the eastern mudminnow *Umbra pygmaea* by ethyl methanesulphonate. **Mutation Research Letters**, v. 104, n. 1, p. 147-152, 1982.

HUGGETT, R. J.; KIMERIE, R. A.; MEHRIE JR., P. M.; BERGMAN, H. L. **Biomarkers: biochemical, physiological and histological markers of anthropogenic stress**. Boca Raton: Lewis Publishers, 1992.

JESUS, T.B.; CARVALHO, C.E.V. Utilização de biomarcadores em peixes como ferramenta para avaliação de contaminação ambiental por mercúrio (Hg). **Oecologia Brasiliensis**, v. 12, n. 7, 2008.

JI, K.; LIU, X.; LEE, S.; KANG, S.; KHO, Y.; GIESY, J. P.; CHOI, K. 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, p. 242-251, 2013.

JIANG, Z.-Y.; HUNT, J. V.; WOLFF, S. P. Ferrous ion oxidation in the presence of xylenol orange for detection of lipid hydroperoxide in low density lipoprotein. **Analytical Biochemistry**, v. 202, n. 2, p. 384-389, 1992.

JOHNSON, A. C.; BELFROID, A.; DI CORCIA, A. Estimating steroid oestrogen inputs into activated sludge treatment works and observations on their removal from the effluent. **Science of the Total Environment**, v. 256, n. 2, p. 163-173, 2000.

KAMMANN, U.; BUNKE, M.; STEINHART, H.; THEOBALD, N. A permanent fish cell line (EPC) for genotoxicity testing of marine sediments with the comet assay. **Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 498, n. 1, p. 67-77, 2001.

KASPRZYK-HORDERN, B.; DINSDALE, R. M.; GUWY, A. J. The occurrence of pharmaceuticals, personal care products, endocrine disruptors and illicit drugs in surface water in South Wales, UK. **Water Research**, v. 42, n. 13, p. 3498-3518, 2008.

KAVITHA, P.; RAMESH, R.; BUPESH, G.; STALIN, A.; SUBRAMANIAN, P. Hepatoprotective activity of *Tribulus terrestris* extract against acetaminophen-induced toxicity in a freshwater fish (*Oreochromis mossambicus*). **In Vitro Cellular & Developmental Biology-Animal**, v. 47, n. 10, p. 698-706, 2011.

- KAWABATA, K.; SUGIHARA, K.; SANOH, S.; KITAMURA, S.; OHTA, S. Ultraviolet-photoproduct of acetaminophen: Structure determination and evaluation of ecotoxicological effect. **Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry**, v. 249, p. 29-35, 2012.
- KEEN, J. H.; HABIG, W. H.; JAKOBY, W. B. Mechanism for the several activities of the glutathione S-transferases. **Journal of Biological Chemistry**, v. 251, n. 20, p. 6183-6188, 1976.
- KHAN, N.; DESCHAUX, P. Role of serotonin in fish immunomodulation. **Journal of Experimental Biology**, v. 200, n. 13, p. 1833-1838, 1997.
- KIM, J. W.; JANG, H. S.; KIM, J. G.; ISHIBASHI, H.; HIRANO, M.; NASU, K.; ARIZONO, K. Occurrence of pharmaceutical and personal care products (PPCPs) in surface water from Mankyung River, South Korea. **Journal of Health Science**, v. 55, n. 2, p. 249-258, 2009.
- KIRBY, M. F.; SMITH, A. J.; ROOKE, J.; NEALL, P.; SCOTT, A. P.; KATSIADAKI, I. Ethoxyresorufin-O-deethylase (EROD) and vitellogenin (VTG) in flounder (*Platichthys flesus*): System interaction, crosstalk and implications for monitoring. **Aquatic Toxicology**, v. 81, n. 3, p. 233-244, 2007.
- KIRSCH-VOLDERS, M.; SOFUNI, T.; AARDEMA, M.; ALBERTINI, S.; EASTMOND, D.; FENECH, M.; WAKATA, A. Report from the in vitro micronucleus assay working group. **Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 540, n. 2, p. 153-163, 2003.
- KLEYWEGT, S.; PILEGGI, V.; YANG, P.; HAO, C.; ZHAO, X.; ROCKS, C.; WHITEHEAD, B. Pharmaceuticals, hormones and bisphenol A in untreated source and finished drinking water in Ontario, Canada—occurrence and treatment efficiency. **Science of the Total Environment**, v. 409, n. 8, p. 1481-1488, 2011.
- KLEINKNECHT, D. Interstitial nephritis, the nephrotic syndrome, and chronic renal failure secondary to nonsteroidal anti-inflammatory drugs. In: **Seminars in Nephrology**, p. 228-235, 1995.
- KLEMZ, C.; SILVA DE ASSIS, H. C. Efeitos do endossulfano na atividade da acetilcolinesterase de cascudo (*Ancistrus multispinnis*, fish, Teleostei). **Revista Acadêmica, Curitiba**, v. 3, n. 4, p. 51-58, 2005.
- KOBAYASHI, H. A comparison between manual microscopic analysis and computerized image analysis in the single cell gel electrophoresis assay. **MM Community**, v. 3, p. 103-115, 1995.
- KOBELKOWSKY, A.; KOBELKOWSKY, A. Morphology and Dissection Technique of the Kidney of the Grey Snapper *Lutjanus griseus* (Teleostei: Lutjanidae). **International Journal of Morphology**, v. 31, n. 2, p. 553-561, 2013.

- KORI-SIAKPERE, O.; AKE, J. E. G.; AVWORO, U. M. Sublethal effects of cadmium on some selected haematological parameters of Heteroclaris (a hybrid of *Heterobranchus bidorsalis* and *Clarias gariepinus*). **International Journal Zoology Research**, v. 2, p. 77-83, 2006.
- KRAMER, R. D. **Bacia hidrográfica do Alto Iguaçu: caracterização física e química e determinação de diclofenaco, ibuprofeno e paracetamol.** Dissertação de Mestrado. Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia Ambiental. Universidade Tecnológica Federal do Paraná. 2013.
- KUMAR, G.; BANU, G. S.; PAPP, P. V.; SUNDARARAJAN, M.; PANDIAN, M. R. Hepatoprotective activity of *Trianthema portulacastrum* L. against paracetamol and thioacetamide intoxication in albino rats. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 92, n. 1, p. 37-40, 2004.
- LAVILLE, N.; AIT-AISSA, S.; GOMEZ, E.; CASELLAS, C.; PORCHER, J. M. Effects of human pharmaceuticals on cytotoxicity, EROD activity and ROS production in fish hepatocytes. **Toxicology**, v.196, n.1, p. 41-55, 2004.
- LEE, W. M. Acetaminophen and the US Acute Liver Failure Study Group: lowering the risks of hepatic failure. **Hepatology**, v. 40, n. 1, p. 6-9, 2004.
- LEE, J.; JI, K.; LIM, Y.; KIM, P.; CHOI, K. Chronic exposure to diclofenac on two freshwater cladocerans and Japanese medaka. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 74, n. 5, p. 1216-1225, 2011.
- LEITE, K.; VIEIRA, V. Z.; FLUMINHAN, A. Avaliação da genotoxicidade provocada por fatores ambientais em *Tradescantia pallida cv purpurea* através do ensaio cometa. **Periódico Eletrônico Fórum Ambiental da Alta Paulista**, v. 9, n. 11, 2014.
- LEVINE, R. L.; WILLIAMS, J. A.; STADTMAN, E. R.; SHACTER, E. Carbonyl assays for determination of oxidatively modified proteins. **Methods in Enzymology**, v. 233, p. 346-357, 1994.
- LEWERENZ, V.; HANELT, S.; NASTEVSKA, C.; EL-BAHAY, C.; RÖHRDANZ, E.; KAHL, R. Antioxidants protect primary rat hepatocyte cultures against acetaminophen-induced DNA strand breaks but not against acetaminophen-induced cytotoxicity. **Toxicology**, v. 191, n. 2, p. 179-187, 2003.
- LIU, X.; LEE, J.; JI, K.; TAKEDA, S.; CHOI, K. Potentials and mechanisms of genotoxicity of six pharmaceuticals frequently detected in freshwater environment. **Toxicology Letters**, v. 211, n. 1, p. 70-76, 2012.
- LIVINGSTONE, D. R. Contaminant-stimulated reactive oxygen species production and oxidative damage in aquatic organisms. **Marine Pollution Bulletin**, v. 42, n. 8, p. 656-666, 2001.
- LUBEL, J. S.; ANGUS, P. W.; GOW, P. J. Accidental paracetamol poisoning. **Medical Journal of Australia**, v. 186, n. 7, p. 371, 2007.

MACARDLE, M.; ELSKUS, A.; MCELROY, A.; LARSEN, B.; BENSON, W.; SCHLENK, D. Estrogenic and CYP1A response of mummichogs and sunshine bass to sewage effluent. **Marine Environmental Research**, v. 50, n. 1, p. 175-179, 2000.

MARIAPPAN, G.; SAHA, B. P.; SUTHARSON, L.; SINGH, A.; GARG, S.; PANDEY, L.; KUMAR, D. Analgesic, anti-inflammatory, antipyretic and toxicological evaluation of some newer 3-methyl pyrazolone derivatives. **Saudi Pharmaceutical Journal**, v. 19, n. 2, p. 115-122, 2011.

MARKEY, C. M.; RUBIN, B. S.; SOTO, A. M.; SONNENSCHNEIN, C. Endocrine disruptors: from Wingspread to environmental developmental biology. **The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology**, v. 83, n. 1, p. 235-244, 2002.

MEHINTO, A. C.; HILL, E. M.; TYLER, C. R. Uptake and biological effects of environmentally relevant concentrations of the nonsteroidal anti-inflammatory pharmaceutical diclofenac in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). **Environmental Science & Technology**, v. 44, n. 6, p. 2176-2182, 2010.

MEISTER, A. Glutathione metabolism and its selective modification. **Journal of Biology Chemistry**, v. 263, n. 33, p. 17205-17208, 1988.

MELA, M.; GUILOSKI, I. C.; DORIA, H. B.; RABITTO, I. S.; DA SILVA, C. A.; MARASCHI, A. C.; SILVA DE ASSIS, H. C. Risks of waterborne copper exposure to a cultivated freshwater Neotropical catfish (*Rhamdia quelen*). **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 88, p. 108-116, 2013.

MELO, S. A. S.; TROVÓ, A. G.; BAUTITZ, I. R.; NOGUEIRA, R. F. P. Degradação de fármacos residuais por processos oxidativos avançados. **Química Nova**, v. 32, n. 1, p. 188-197, 2009.

MEMMERT, U.; PEITHER, A.; BURRI, R.; WEBER, K.; SCHMIDT, T.; SUMPTER, J. P.; HARTMANN, A. Diclofenac: new data on chronic toxicity and bioconcentration in fish. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 32, n. 2, p. 442-452, 2013.

METCALFE, C. D.; MIAO, X. S.; KOENIG, B. G.; STRUGER, J. Distribution of acidic and neutral drugs in surface waters near sewage treatment plants in the lower Great Lakes, Canada. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 22, n. 12, p. 2881-2889, 2003.

MEURER, S.; ZANIBONI FILHO, E. Hábito alimentar do jundiá *Rhamdia quelen* (Pisces, Pimelodidae, Siluriformes), na Região do Alto do Rio Uruguai. **XII Encontro Brasileiro de Ictiologia, São Paulo-SP**, p. 29, 1997.

MOURENTE, G.; DÍAZ-SALVAGO, E.; BELL, J.G.; TOCHER, D.R. Increased activities of hepatic antioxidant defence enzymes in juvenile gilthead sea bream (*Sparus aurata* L.) fed dietary oxidised oil: attenuation by dietary vitamin E. **Aquaculture**, v. 214, n. 1, p. 343-361, 2002.

NARAHARA, M.Y., GODINHO, H.M., ROMAGOSA, E. Estrutura da população de *Rhamdia hilarii* (Valenciennes, 1840) (Osteichthyes, Siluriformes, Pimelodidae). **Boletim do Instituto de Pesca**, v. 12, n. 3, p. 123-137, 1985.

NASH, J. P.; KIME, D. E.; VAN DER VEN, L. T.; WESTERN, P. W.; BRION, F.; MAACK, G. Long-term exposure to environmental concentrations of the pharmaceutical ethynylestradiol causes reproductive failure in fish. **Environmental Health Perspectives**, p. 1725-1733, 2004.

NILSSON, R. Endocrine modulators in the food chain and environment. **Toxicologic Pathology**, v. 28, n. 3, p. 420-431, 2000.

NORDBERG, J.; ARNÉR, E. S. J. Reactive oxygen species, antioxidants and the mammalian thioredoxin system. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 31, n.11, p.1287-1311, 2001.

NYSTRÖM, T. Role of oxidative carbonylation in protein quality control and senescence. **The EMBO journal**, v. 24, n. 7, p. 1311-1317, 2005.

OAKS, J. L.; GILBERT, M.; VIRANI, M. Z.; WATSON, R. T.; METEYER, C. U.; RIDEOUT, B. A.; KHAN, A. A. Diclofenac residues as the cause of vulture population decline in Pakistan. **Nature**, v. 427, n. 6975, p. 630-633, 2004.

OLIVEIRA-JUNIOR, A. A.; TAVARES-DIAS, M.; MARCON, J. L. Biochemical and hematological reference ranges for Amazon freshwater turtle, *Podocnemis expansa* (Reptilia: Pelomedusidae), with morphologic assessment of blood cells. **Research in Veterinary Science**, v. 86, n. 1, p. 146-151, 2009.

OLIVEIRA RIBEIRO, C. A.; FILIPAK NETO, F.; MELA, M.; SILVA, P. H.; RANDI, M. A. F.; RABITTO, I. S.; PELLETIER, E. Hematological findings in neotropical fish *Hoplias malabaricus* exposed to subchronic and dietary doses of methylmercury, inorganic lead, and tributyltin chloride. **Environmental Research**, v. 101, n. 1, p. 74-80, 2006.

OVIEDO-GÓMEZ, D. G. C.; GALAR-MARTÍNEZ, M.; GARCÍA-MEDINA, S.; RAZO-ESTRADA, C.; GÓMEZ-OLIVÁN, L. M. Diclofenac-enriched artificial sediment induces oxidative stress in *Hyalella Azteca*. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 29, n. 1, p. 39-43, 2010.

PAGLIA, D. E.; VALENTINE, W. N. Studies on the quantitative and qualitative characterization of erythrocyte glutathione peroxidase. **The Journal of Laboratory and Clinical Medicine**, v. 70, n. 1, p. 158-169, 1967.

PAMPLONA, J. H.; OBA, E. T.; DA SILVA, T. A.; RAMOS, L. P.; RAMSDORF, W. A.; CESTARI, M. M.; SILVA DE ASSIS, H. C. Subchronic effects of dipyrone on the fish species *Rhamdia quelen*. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 74, n. 3, p. 342-349, 2011.

PAPPAS, P.; STEPHANOU, P.; VASILIOU, V.; MARSELOS, M. Anti-inflammatory agents and inducibility of hepatic drug metabolism. **European Journal of Drug Metabolism and Pharmacokinetics**, v. 23, n. 4, p. 457-460, 1998.

PAROLINI, M.; BINELLI, A.; COGNI, D.; PROVINI, A. Multi-biomarker approach for the evaluation of the cyto-genotoxicity of paracetamol on the zebra mussel (*Dreissena polymorpha*). **Chemosphere**, v. 79, n. 5, p. 489-498, 2010.

GARCÍA PEÑA, C. M.; PEREDA RODRÍGUEZ, D.; GONZÁLEZ CORTEZÓN, A.; MONTES DE OCA PORTO, Y.; CAÑIZARES ARENCIBIA, Y.; LEÓN GUERRERO, G. M. Determinación de diclofenaco de sodio por cromatografía líquida de alta resolución en un colirio al 0, 1%. **Revista Cubana de Farmacia**, v. 43, n. 3, 2009.

PENG, H. C.; WANG, Y. H.; WEN, C. C.; WANG, W. H.; CHENG, C. C.; CHEN, Y. H. Nephrotoxicity assessments of acetaminophen during zebrafish embryogenesis. **Comparative Biochemistry and Physiology C**, v. 151, n. 4, p. 480-486, 2010.

PENG, X.; OU, W.; WANG, C.; WANG, Z.; HUANG, Q.; JIN, J.; TAN, J. Occurrence and ecological potential of pharmaceuticals and personal care products in groundwater and reservoirs in the vicinity of municipal landfills in China. **Science of the Total Environment**, v. 490, p. 889-898, 2014.

PEREIRA, B. F.; DA SILVA ALVES, R. M.; PITOL, D. L.; SENHORINI, J. A.; CAETANO, F. H. Effects of exposition to polluted environments on blood cells of the fish *Prochilodus lineatus*. **Microscopy Research and Technique**, v. 75, n. 5, p. 571-575, 2012.

PETERSEN, M.; ZETTERBERG, J.; SJOSTRAND, A. Z.; PALSSON, J.-O.; KARLSSON. Potential protective effects of NSAIDs/ASA in oxidatively stressed human lens epithelial cells and intact mouse lenses in culture. **Ophthalmic Research**, v. 37, n. 6, p. 318-327, 2005.

PINI, L. A.; VITALE, G.; OTTANI, A.; SANDRINI, M. Naloxone-reversible antinociception by paracetamol in the rat. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 280, n. 2, p. 934-940, 1997.

POMPELLA, A.; VISVIKIS, A.; PAOLICCHI, A.; TATA, V. D.; CASINI, A. F. The changing faces of glutathione, a cellular protagonist. **Biochemical Pharmacology**, v. 66, n. 8, p. 1499-1503, 2003.

PORTE, C.; JANER, L. G.; ORTIZ-ZARRAGOITIA, L. C.; CAJARAVILLE, M. P.; FOSSI, M. C.; CANESI, L. Endocrine disruptors in marine organisms: approaches and perspectives. **Comparative Biochemistry and Physiology C**, v. 143, n. 3, p. 303-315, 2006.

PORTER, C. M.; JANZ, D. M. Treated municipal sewage discharge affects multiple levels of biological organization in fish. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 54, n. 2, p. 199-206, 2003.

PRASKOVA, E.; PLHALOVA, L.; CHROMCOVA, L.; STEPANOVA, S.; BEDANOVA, I.; BLAHOVA, J.; SVOBODOVA, Z. Effects of Subchronic Exposure of Diclofenac on Growth, Histopathological Changes, and Oxidative Stress in Zebrafish (*Danio rerio*). **The Scientific World Journal**, 2014.

PRETTO, A.; LORO, V. L.; MORSCH, V. M.; MORAES, B. S.; MENEZES, C.; CLASEN, B.; DRESSLER, V. Acetylcholinesterase activity, lipid peroxidation, and bioaccumulation in silver catfish (*Rhamdia quelen*) exposed to cadmium. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 58, n. 4, p. 1008-1014, 2010.

QUINN, B.; SCHMIDT, W.; O'ROURKE, K.; HERNAN, R. Effects of the pharmaceuticals gemfibrozil and diclofenac on biomarker expression in the zebra mussel (*Dreissena polymorpha*) and their comparison with standardised toxicity tests. **Chemosphere**, v. 84, n. 5, p. 657-663, 2011.

RAHMAN, M. F.; YANFUL, E. K.; JASIM, S. Y. Occurrences of endocrine disrupting compounds and pharmaceuticals in the aquatic environment and their removal from drinking water: Challenges in the context of the developing world. **Desalination**, v. 248, n. 1, p. 578-585, 2009.

RAMSDORF, W. A.; FERRARO, M. V. M.; OLIVEIRA-RIBEIRO, C. A.; COSTA, J. R. M.; CESTARI, M. M. Genotoxic evaluation of different doses of inorganic lead (PbII) in *Hoplias malabaricus*. **Environmental Monitoring and Assessment**, v. 158, n. 1-4, p. 77-85, 2009.

RIFKIND, A. B. CYP1A in TCDD toxicity and in physiology-with particular reference to CYP dependent arachidonic acid metabolism and other endogenous substrates. **Drug Metabolism Reviews**, v. 38, n. 1-2, p. 291-335, 2006.

RIOL, M. J.; VALINAS, N.; PEREZ LOPEZ, M. Glutathione S-transferases from rainbow trout liver and freshly isolated hepatocytes: purification and characterization. **Comparative Biochemistry Physiology C**, v. 128, p. 227-235, 2001.

ROBERTS, S. B.; LANGENAU, D. M.; GOETZ, F. W. Cloning and characterization of prostaglandin endoperoxide synthase-1 and-2 from the brook trout ovary. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 160, n. 1, p. 89-97, 2000.

ROSENFELD, G. Corante pancrômico para hematologia e citologia clínica. Nova combinação dos componentes do May-Grunwald e do Giemsa num só corante de emprego rápido. **Memorial do Instituto Butantan**, v. 20, p. 329-334, 1947.

ROSSI, S. C. **Estudo ecotoxicológico da exposição ao chumbo e à nanopartícula de dióxido de titânio em *Hoplias malabaricus***. Tese de Doutorado. Programa de Pós-Graduação em Farmacologia. Universidade Federal do Paraná, 2013.

SAFE, S. Endocrine disruptors and human health: is there a problem. **Toxicology**, v. 205, n. 1-2, p. 3-10, 2004.

SALAMAT, N.; ZARIE, M. Using of Fish Pathological Alterations to Assess Aquatic Pollution: A Review. **World Journal of Fish and Marine Sciences**, v. 4, n. 3, p. 223-231, 2012.

SANCHEZ, S.; ALARCON DE LA LASTRA, C.; ORTIZ, P.; MOLTIVA, V.; MARTIN, M.J. Gastrointestinal tolerability of metamizol, acetaminophen, and diclofenac in subchronic treatment in rats. **Digestive Diseases and Sciences**, v. 47, n. 12, p. 2791-2798, 2002.

SANTOS, L. H. M. L. M.; ARAÚJO, A. N.; FACHINI, A.; PENA, A.; DELERUEMATOS, C.; MONTENEGRO, M. C. B. S. M. Ecotoxicological aspects related to the presence of pharmaceuticals in the aquatic environment. **Journal of Hazardous Materials**, v. 175, n. 1, p. 45-95, 2010.

SANTOS, J. L. D.; MOREIRA, V.; CAMPOS, M. L.; CHELUCCI, R. C.; BARBIERI, K. P.; SOUTO, P. C. M. D. C.; CHIN, C. M. Pharmacological evaluation and preliminary pharmacokinetics studies of a new diclofenac prodrug without gastric ulceration effect. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 13, n. 11, p. 15305-15320, 2012.

SCHMID, W. The micronucleus test. **Mutation Research/Environmental Mutagenesis and Related Subjects**, v. 31, n. 1, p. 9-15, 1975.

SCHMITT-JANSEN, M.; BARTELS, P.; ADLER, N.; ALTENBURGER, R. Phytotoxicity assessment of diclofenac and its phototransformation products. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 387, n. 4, p. 1389-1396, 2007.

SCHWAIGER, J.; WANKE, R.; ADAM, S.; PAWERT, M.; HONNEN, W.; TRIEBSKORN, R. The use of histopathological indicators to evaluate contaminant-related stress in fish. **Journal of Aquatic Ecosystem Stress and Recovery**, v. 6, n. 1, p. 75-86, 1997.

SCHWAIGER, J.; FERLING, H.; MALLOW, U.; WINTERMAYR, H.; NEGELE, R. D. Toxic effects of the non-steroidal anti-inflammatory drug diclofenac: Part I: histopathological alterations and bioaccumulation in rainbow trout. **Aquatic Toxicology**, v. 68, n. 2, p. 141-150, 2004.

- SCHWINDT, A. R.; WINKELMAN, D. L.; KETELES, K.; MURPHY, M.; VAJDA, A. M. An environmental oestrogen disrupts fish population dynamics through direct and transgenerational effects on survival and fecundity. **Journal of Applied Ecology**, v. 51, n. 3, p. 582-591, 2014.
- SEBASTINE, I. M.; WAKEMAN, R. J. Consumption and environmental hazards of pharmaceutical substances in the UK. **Process Safety and Environmental Protection**, v. 81, n. 4, p. 229-235, 2003.
- SEBBEN, V. C.; LUGOCH, R. W.; SCHLINKER, C. S.; ARBO, M. D.; VIANNA, R. L. Validação de metodologia analítica e estudo de estabilidade para quantificação sérica de paracetamol. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 46, n. 2, p. 143-48, 2010.
- SEDLAK, J.; LINDSAY, R. H. Estimation of total, protein-bound, and nonprotein sulfhydryl groups in tissue with Ellman's reagent. **Analytical Biochemistry**, v. 25, p. 192-205, 1968.
- SHARMA, C. V.; MEHTA, V. Paracetamol: mechanisms and updates. **Continuing Education in Anaesthesia, Critical Care & Pain**, p. mkt049, 2013.
- SHAW, J. C.; KORZAN, W. J.; CARPENTER, R. E.; KURIS, A. M.; LAFFERTY, K. D.; SUMMERS, C. H.; ØVERLI, Ø. Parasite manipulation of brain monoamines in California killifish (*Fundulus parvipinnis*) by the trematode *Euhaplorchis californiensis*. **Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 276, n. 1659, p. 1137-1146, 2009.
- SHIVASHRI, C.; RAJARAJESHWARI, T.; RAJASEKAR, P. Hepatoprotective action of celery (*Apium graveolens*) leaves in acetaminophen-fed freshwater fish (*Pangasius sutchi*). **Fish Physiology and Biochemistry**, v. 39, n. 5, p. 1057-1069, 2013.
- SILVA, A. G.; MARTINEZ, C. B. R. Morphological changes in the kidney of a fish living in an urban stream. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 23, n. 2, p. 185-192, 2007.
- SILVA, C. A.; OBA, E. T.; RAMSDORF, W. A.; MAGALHÃES, V. F.; CESTARI, M. M.; OLIVEIRA RIBEIRO, C. A.; SILVA DE ASSIS, H. C. First report about saxitoxins in freshwater fish *Hoplias malabaricus* through trophic exposure. **Toxicon**, v. 57, n. 1, p. 141-147, 2011.
- SILVA DE ASSIS, H. C.; SIMMONS, D. B.; ZAMORA, J. M.; LADO, W. E.; AL-ANSARI, A. M.; SHERRY, J. P.; TRUDEAU, V. L. Estrogen-like Effects in Male Goldfish Co-exposed to Fluoxetine and 17 Alpha Ethinylestradiol. **Environmental Science and Technology**, v. 47, n. 10, p. 5372-5382, 2013.

SILFVERGRIP, A.M.C. **A sistematic revision of the neotropical catfish genus *Rhamdia* (Teleostei, Pimelodidae)**. Stockholm, Sweden, 1996. 156p. (PhD Thesis) - Department of Zoology, Stockholm University and Department of Vertebrate Zoology, Swedish Museum of Natural History, 1996.

SODRÉ, F. F.; LOCATELLI, M. A. F.; JARDIM, W. F. Occurrence of emerging contaminants in Brazilian drinking waters: a sewage-to-tap issue. **Water, Air, and Soil Pollution**, v. 206, n. 1-4, p. 57-67, 2010.

SPEIT, G.; HARTMANN, A. The comet assay (single-cell gel test). In: **DNA Repair Protocols**. Humana Press, p. 203-212, 1999.

STEGEMAN, J. J.; HAHN, M. E. Biochemistry and molecular biology of monooxygenases: current perspectives on forms, functions, and regulation of cytochrome P450 in aquatic species. **Aquatic Toxicology: Molecular, Biochemical, and Cellular Perspectives**, v. 87, p. 206, 1994.

STEPANOVA, S.; PRASKOVA, E.; CHROMCOVA, L.; PLHALOVA, L.; PROKES, M.; BLAHOVA, J.; SVOBODOVA, Z. The effects of diclofenac on early life stages of common carp (*Cyprinus carpio*). **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 35, n. 3, p. 454-460, 2013.

STUMPF, M.; TERNES, T. A.; WILKEN, R. D.; RODRIGUES, S. V.; BAUMANN, W. Polar drug residues in sewage and natural waters in the state of Rio de Janeiro, Brazil. **Science of the Total Environment**, v. 225, n. 1, p. 135-141, 1999.

TAMBOSI, J. L.; DE SENA, R. F.; FAVIER, M.; GEBHARDT, W.; JOSÉ, H. J.; SCHRÖDER, H. F.; MOREIRA, R. D. F. P. M. Removal of pharmaceutical compounds in membrane bioreactors (MBR) applying submerged membranes. **Desalination**, v. 261, n. 1, p. 148-156, 2010.

TAVARES-DIAS, M.; TENANI, R. A.; GIOLI, L. D.; FAUSTINO, C. D. Características hematológicas de teleósteos brasileiros. II. Parâmetros sanguíneos do *Piaractus mesopotamicus* Holmberg (Osteichthyes, Characidae) em policultivo intensivo. **Revista Brasileira de Zoologia**, v. 16, n. 2, p. 423-431, 1999.

TAVARES-DIAS, M.; SCHALCH, S. H.; MARTINS, M. L.; ONAKA, E. M.; MORAES, F. R. Haematological characteristics of Brazilian Teleosts: III. Parameters of the hybrid tambacu (*Piaractus mesopotamicus* Holmberg x *Colossoma macropomum* Cuvier)(Osteichthyes, Characidae). **Revista Brasileira de Zoologia**, v. 17, n. 4, p. 899-906, 2000.

TAVARES-DIAS, M.; MELO, J. F. B.; MORAES, G.; MORAES, F. R. D. Características hematológicas de teleósteos brasileiros: IV. Variáveis do jundiá *Rhamdia quelen* (Pimelodidae). **Ciência Rural**, v. 32, n. 4, p. 693-698, 2002.

TAVARES-DIAS, M.; MORAES, F. R. **Hematologia de peixes teleósteos**. Ed. Eletrônica e Arte Final. Ribeirão Preto. SP. 144 p, 2004.

TAVARES-DIAS, M.; MARTINS, M. L.; SCHALCH, S. H. C.; OKADA, E. M.; QUINTANA, C. I. F.; MORAES, J. R. E. D.; MORAES, F. R. D. Alterações hematológicas e histopatológicas em pacu, *Piaractus mesopotamicus* Holmberg, 1887 (Osteichthyes, Characidae). **Acta Scientiarum. Biological Sciences**, v. 24, p. 547-554, 2008.

TERNES, T. A.; STUMPF, M.; MUELLER, J.; HABERER, K.; WILKEN, R. D.; SERVOS, M. Behavior and occurrence of estrogens in municipal sewage treatment plants—I. Investigations in Germany, Canada and Brazil. **Science of the Total Environment**, v. 225, n. 1, p. 81-90, 1999.

TERNES, T. A.; HIRSCH, R. Occurrence and behavior of X-ray contrast media in sewage facilities and the aquatic environment. **Environmental Science & Technology**, v. 34, n. 13, p. 2741-2748, 2000.

THORPE, K. L.; CUMMINGS, R. I.; HUTCHINSON, T. H.; SCHOLZE, M.; BRIGHTY, G.; SUMPTER, J.P. Relative potencies and combination effects of steroidal estrogens in fish. **Environmental Science & Technology**, v. 37, n. 6, p. 1142-1149, 2003.

TRIEBSKORN, R.; CASPER, H.; HEYD, A.; EIKEMPER, R.; KÖHLER, H. R.; SCHWAIGER, J. Toxic effects of the non-steroidal anti-inflammatory drug diclofenac: Part II. Cytological effects in liver, kidney, gills and intestine of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). **Aquatic Toxicology**, v. 68, n. 2, p. 151-166, 2004.

TRUDEAU, V. L.; METCALFE, C. D.; MIMÉAULT, C.; MOON, T. W. Pharmaceuticals in the environment: Drugged fish? **Biochemistry and Molecular Biology of Fishes**, v. 6, p. 475-493, 2005.

USEPA (U. S. Environmental Protection Agency) EPA/68/W-01/023 **Fish Screening Assays for Endocrine Disruption**. Ohio, 2002.

VAN AERLE, R.; ROUNDS N.; HUTCHINSON, T.H.; MADDIX, S.; TYLER, C. R. Window of sensitivity for the estrogenic effects of ethinylestradiol in early life-stages of fathead minnow, *Pimephales promelas*. **Ecotoxicology**, v. 11, n. 6, p. 423-434, 2002.

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

VERENITCH, S. S.; LOWE, C. J.; MAZUMDER, A. Determination of acidic drugs and caffeine in municipal wastewaters and receiving waters by gas chromatography–ion trap tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1116, n. 1, p. 193-203, 2006.

VULLIET, E.; CREN-OLIVÉ, C.; GRENIER-LOUSTALOT, M. F. Occurrence of pharmaceuticals and hormones in drinking water treated from surface waters. **Environmental Chemistry Letters**, v. 9, n. 1, p. 103-114, 2011.

WALKER, C. M.; HOPKIN, S. P.; SIBLY, R. M.; PEAKALL, D. B. **Principles of Ecotoxicology**, Bristol, PA. Taylor & Francis, 1996.

WEIS, M.L.C. **Interpretação da idade e cálculo da curva de crescimento do jundiá, *Rhamdia quelen* (QUOY & GAIMARD, 1824) do banhado de Santa Catarina** - RS. Santa Maria - RS, 1980. 93 p. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) - Curso de Pós-graduação em Zootecnia, Universidade Federal de Santa Maria, 1980.

WILLE, K.; NOPPE, H.; VERHEYDEN, K.; BUSSCHE, J. V.; DE WULF, E.; VAN CAETER, P.; VANHAECKE, L. Validation and application of an LC-MS/MS method for the simultaneous quantification of 13 pharmaceuticals in seawater. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 397, n. 5, p. 1797-1808, 2010.

WINSTON, G. W.; DI GIULIO, R. T. Prooxidant and antioxidant mechanisms in aquatic organisms. **Aquatic Toxicology**, v. 19, n. 2, p. 137-161, 1991.

WINTROBE, M. M. Anemia: classification and treatment on the basis of differences in the average volume and hemoglobin content of the red corpuscles. **Archives of Internal Medicine**, v. 54, n. 2, p. 256-280, 1934.

WITECK, L.; BOMBARDELLI, R. A.; SANCHES, E. A.; OLIVEIRA, J. D. S. D.; BAGGIO, D. M.; SOUZA, B. E. D. Sperm motility, oocyte fertilization and egg hatching on Jundia catfish in cadmium contaminated water. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 40, n. 3, p. 477-481, 2011.

YANG, S.; CARLSON, K. Routine monitoring of antibiotics in water and wastewater with a radioimmunoassay technique. **Water Research**, v. 38, n. 14, p. 3155-3166, 2004.

YANPALLEWAR, S. U.; SEN, S.; TAPAS, S.; KUMAR, M.; RAJU, S. S.; ACHARYA, S. B. Effect of *Azadirachta indica* on paracetamol-induced hepatic damage in albino rats. **Phytomedicine**, v. 10, n. 5, p. 391-396, 2003.

YARAHMADI, Z.; MOVAHEDINIA, A.; SAVARI, A.; RASSOULI, M. B.; SAHRAEIAN, M. Can Naphthalene Exposure Stress Alter Brain Biogenic Amine Levels Before and during Vitellogenesis in *Liza klunzingeri* Fish? **Journal of Environmental & Analytical Toxicology**, v. 3, n. 178, 2161-0525, 2013.

YEN, F. L.; WU, T. H.; LIN, L. T.; LIN, C. C. Hepatoprotective and antioxidant effects of *Cuscuta chinensis* against acetaminophen-induced hepatotoxicity in rats. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 111, n. 1, p. 123-128, 2007.

ZHANG, Y.; GEIßEN, S. V.; GAL, C. Carbamazepine and diclofenac: removal in wastewater treatment plants and occurrence in water bodies. **Chemosphere**, v. 73, n. 8, p. 1151-1161, 2008.

ZIVNA, D.; PLHALOVA, L.; PRASKOVA, E.; STEPANOVA, S.; SIROKA, Z.; SEVCIKOVA, M.; SVOBODOVA, Z. Oxidative stress parameters in fish after subchronic exposure to acetylsalicylic acid. **Neuroendocrinology Letters**, v. 34, n. 2, p. 116-122, 2013.

ZOELLER, R. T.; BROWN, T. R.; DOAN, L. L.; GORE, A. C.; SKAKKEBAEK, N. E.; SOTO, A. M.; VOM SAAL, F. S. Endocrine-disrupting chemicals and public health protection: a statement of principles from The Endocrine Society. **Endocrinology**, v. 153, n. 9, p. 4097-4110, 2012.

ZOHAR, Y.; MUÑOZ-CUETO, J.A.; LAREYRE, J.J.; ELIZUR, A.;KAH O. Neuroendocrinology of reproduction in teleost fish. **General and Comparative Endocrinology**, v. 165, n. 3, p. 438-455, 2010.

ZOUBAIR; B. E. N. K. H. A. S. S. I.; AZZAHRA, L. F.; FOUZIA, H. M. I. M. I. D.; MOHAMMED, L. O. U. T. F. I.; BRAHIM, B. E. N. A. J. I.; NOUREDDINE, B. O. U. R. H. I. M. Evaluation of Acetaminophen Effect on Oxidative Stressed Mice by Peroxide Hydrogen. **Nature**, v. 1, n. 4, p. 75-79, 2013.