

## RESSALVA

Atendendo solicitação do(a) autor(a), o texto completo desta dissertação será disponibilizado somente a partir de 23/12/2023.

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP**

**CENTRO DE AQUICULTURA DA UNESP**

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

**Davi Araújo Fernandes**

**Jaboticabal – São Paulo**

**2021**

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP**

**CENTRO DE AQUICULTURA DA UNESP**

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

**Davi Araújo Fernandes**

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

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

**Jaboticabal – São Paulo**

**2021**

F363e Fernandes, Davi Araújo

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

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

84 f. : fotos

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

Orientadora: Talita Sarah Mazzoni

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

Microplásticos. I. Título.

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

Essa ficha não pode ser modificada.

### CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

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

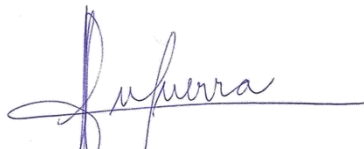
**AUTOR:** DAVI ARAÚJO FERNANDES

**ORIENTADORA:** TALITA SARAH MAZZONI

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



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



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



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

Jaboticabal, 23 de dezembro de 2021

## **DEDICATÓRIA**

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

## AGRADECIMENTOS

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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



## **APOIO FINANCEIRO**

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

## RESUMO

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

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

## ABSTRACT

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

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

## SUMÁRIO

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

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

# 1. INTRODUÇÃO

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

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

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

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

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

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

## 8. CONCLUSÃO

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



## 9. REFERÊNCIAS

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

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

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

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

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

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

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

- Pulsford, A. L., Ryan, K. P., & Nott, J. A. (1992). Metals and melanomacrophages in flounder, *Platichthys flesus*, spleen and kidney. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*, 72(2), 483-498.
- Qiang, L., & Cheng, J. (2019). Exposure to microplastics decreases swimming competence in larval zebrafish (*Danio rerio*). *Ecotoxicology and environmental safety*, 176, 226-233.
- Qiang, L., & Cheng, J. (2021). Exposure to polystyrene microplastics impairs gonads of zebrafish (*Danio rerio*). *Chemosphere*, 263, 128161.
- Quagio-Grassiotto, I., Grier, H. J., Mazzoni, T. S., Nóbrega, R. H., & Amorim, J. P. (2011). Activity of the ovarian germinal epithelium on the follicle formation and the oocyte development in the freshwater catfish *Pimelodus maculatus* (Teleostei: Ostariophysi: Siluriformes). *Journal of Morphology*, 272, 1290-1306.
- Quintero-Hunter, I., Grier, H., & Muscato, M. (1991). Enhancement of histological detail using metanil yellow as counterstain in periodic acid Schiff's hematoxylin staining of glycol methacrylate tissue sections. *Biotechnic & Histochemistry*, 66(4), 169-172.
- Rankin, J. C. & Jensen, F. B. (1993). *Fish Ecophysiology*. London: Chapman & hall. 421 p.
- Retama, I., Jonathan, M.P., Shruti, V.C., Velumani, S., Sarkar, S.K., Roy, P.D., Rodriguez Espinosa, P.F. (2016). Microplastics in tourist beaches of Huatulco Bay, Pacific coast of southern Mexico. *Marine Pollution Bulletin*. 113: 530–535.
- Rochman, C. M., Hoh, E., Kurobe, T., & Teh, S. J. (2013). Ingested plastic transfers hazardous chemicals to fish and induces hepatic stress. *Scientific Reports*, 3(1), 1-7.
- Sayed, A. H., & Younes, H. A. (2017). Melanomacrophage centers in *Clarias gariepinus* as an immunological biomarker for toxicity of silver nanoparticles. *Journal of Microscopy and Ultrastructure*, 5(2), 97-104.
- Schulz, R. W., & Henk, J. (1999). Puberty in male fish: concepts and recent developments with special reference to the African catfish (*Clarias gariepinus*). *Aquaculture*, 177(1-4), 5-12.
- Schulz, R. W., de França, L. R., Lareyre, J. J., LeGac, F., Chiarini-Garcia, H., Nobrega, R. H., & Miura, T. (2010). Spermatogenesis in fish. *General and Comparative Endocrinology*, 165(3), 390-411.
- Schulz, R. W., & Henk, J. (1999). Puberty in male fish: concepts and recent developments with special reference to the African catfish (*Clarias gariepinus*). *Aquaculture*, 177(1-4), 5-12.
- Schulz, R. W., & Miura, T. (2002). Spermatogenesis and its endocrine regulation. *Fish Physiology and Biochemistry*, 26(1), 43-56.
- Selman, K., & Wallace, R. A. (1989). Cellular aspects of oocyte growth in teleosts. *Zoological Science*, 6(2), p211-231.



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

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

## **10. ANEXO**

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

## CERTIFICADO

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

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

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

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

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

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

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

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

Botucatu, 07 de abril de 2020

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

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