

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA  
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMACOLOGIA**

**EFEITOS DE RESÍDUOS DE PSICOFÁRMACOS NA  
ÁGUA SOBRE O DESENVOLVIMENTO INICIAL DE  
ZEBRAFISH**

**DISSERTAÇÃO DE MESTRADO**

**Fabiana Kalichak**

**Santa Maria, RS, Brasil  
2015**

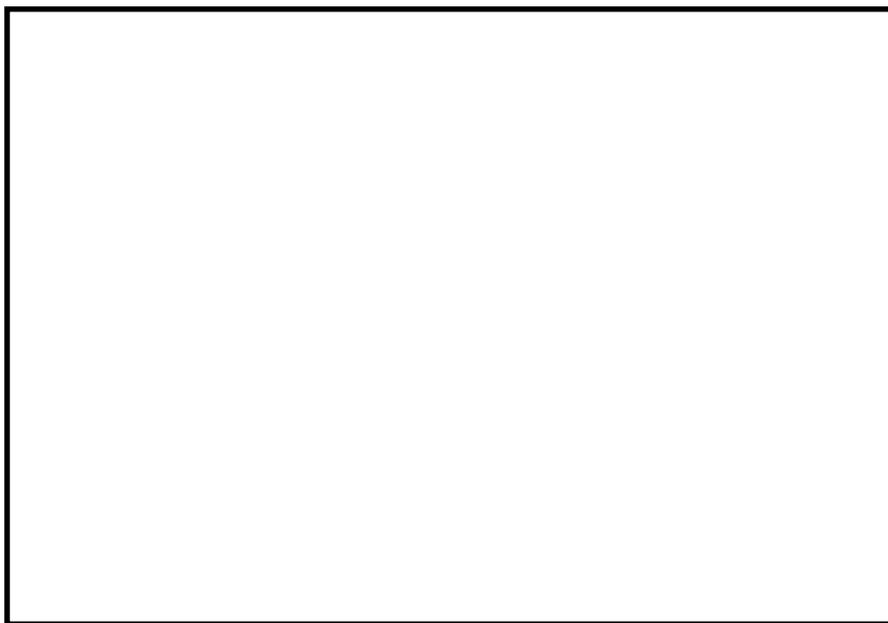
# **EFEITOS DE RESÍDUOS DE PSICOFÁRMACOS NA ÁGUA SOBRE O DESENVOLVIMENTO INICIAL DE ZEBRAFISH**

**Fabiana Kalichak**

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, Área de Concentração em Farmacologia Aplicada à Produção Animal, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Farmacologia.**

**Orientador: Prof. Dr. Leonardo José Gil de Barcellos**

**Santa Maria, RS, Brasil  
2015**



Ficha catalográfica elaborada por  
Nome do(a) bibliotecário(a) e número do CRB  
Biblioteca Central da UFSM

---

©2015

Todos os direitos autorais reservados a Fabiana Kalichak. A reprodução de partes ou do todo deste trabalho só poderá ser feita mediante citação da fonte.

Endereço: Rua Doze, n.2010, Bairro da Luz, Santa Maria, RS. CEP: 97110-680

Fone: (0xx) 55 32225678; Fax (0xx) 32251144; E=mail: [ufesme@ct.ufsm.br](mailto:ufesme@ct.ufsm.br)

**Universidade Federal de Santa Maria  
Centro de Ciências da Saúde  
Programa de Pós-Graduação em Farmacologia**

**A Comissão Examinadora, abaixo assinada,  
aprova a Dissertação de Mestrado**

**EFEITOS DE RESÍDUOS DE PSICOFÁRMACOS NA ÁGUA SOBRE O  
DESENVOLVIMENTO INICIAL DE ZEBRAFISH**

elaborada por  
**Fabiana Kalichak**

como requisito parcial para obtenção do grau de  
**Mestre em Farmacologia**

**COMISSÃO EXAMINADORA:**

---

**Prof. Leonardo José Gil de Barcellos, Dr.**  
(Orientador)

---

**Prof. Angelo Luis Stapassoli Piato, Dr.**

---

**Prof. Luiz Carlos Kreutz, Dr.**

Santa Maria, julho de 2015.

"But I don't want to go among mad people," Alice remarked.

"Oh, you can't help that," said the Cat.

"We're all mad here. I'm mad. You're mad."

"How do you know I'm mad?" said Alice.

"You must be," said the Cat, "or you wouldn't have come here."

Lewis Carroll, Alice in Wonderland

# RESUMO

Dissertação de Mestrado

Programa de Pós-Graduação em Farmacologia

Universidade Federal de Santa Maria

## EFEITOS DE RESÍDUOS DE PSICOFÁRMACOS NA ÁGUA SOBRE O DESENVOLVIMENTO INICIAL DE ZEBRAFISH

AUTOR: Fabiana Kalichak

ORIENTADOR: Prof. Dr. Leonardo José Gil Barcellos

Data e Local da Apresentação: Passo Fundo, julho de 2015.

O uso crescente e contínuo de fármacos pela população humana faz dos agentes farmacológicos potentes “poluentes emergentes” e são frequentemente encontrados em ambientes aquáticos. A consequência destes achados ainda não é esclarecida, e pouco se sabe sobre os efeitos desses compostos sobre o ambiente e a saúde das espécies expostas. A excreção desses componentes ainda em sua forma ativa e o descarte inadequado dos mesmos estão entre as principais causas de contaminação ambiental. O uso de embriões e larvas de zebrafish (*Danio rerio*) como modelo experimental para ensaios toxicológicos vem mostrando uma série de benefícios quando comparados à utilização de outros modelos animais, já que representam um modelo de baixo custo, fácil manejo e reprodução. Além disso o desenvolvimento extracorpóreo e a transparência embrionária fazem do zebrafish uma alternativa ideal para determinação de potenciais de letalidade, subletalidade e teratogenicidade. O objetivo do estudo foi avaliar os efeitos provocados pela exposição aos psicofármacos diazepam, fluoxetina e risperidona sobre embriões e larvas de zebrafish, levando em consideração os parâmetros sobrevivência, eclosão, frequência cardíaca e comprimento total. Os embriões foram expostos a diferentes concentrações de cada fármaco, utilizando como base as concentrações já encontradas no ambiente aquático e descritas na literatura. A risperidona, a fluoxetina e o diazepam afetam o desenvolvimento inicial do zebrafish, o primeiro fármaco promovendo maior efeito, provocando alterações nos quatro parâmetros avaliados. Quando colocados em um contexto ambiental, os efeitos encontrados podem interferir os níveis populacionais e manutenção da espécie em ambiente natural.

**Palavras-chave:** contaminação ambiental, fluoxetina, diazepam, risperidona,, toxicologia.

## **ABSTRACT**

Master Course Dissertation

Graduation Program in Pharmacology

Universidade Federal de Santa Maria

### **EFFECTS ON WATER WASTE PSYCHOTROPIC ON THE INITIAL DEVELOPMENT ZEBRAFISH**

AUTHOR: Fabiana Kalichak

ADVISER: Leonardo José Gil Barcellos

Defense Place and Date: Passo Fundo, July, 2015.

The growing and continuous use of drugs by the human population transformed the pharmacological agents in "emerging pollutants" are often found in aquatic environments. The consequences of this finding are still unclear, and little is known about the effects of these compounds on the environment and the health of exposed species. The excretion of these components still in its active form and the improper disposal thereof are among the main causes of environmental contamination. The use of embryos and larvae of zebrafish (*Danio rerio*) as an experimental model for toxicological testing has shown a number of benefits when compared to other animal models, as they represent a low cost model, easily handled, fast reproduction. In addition the extracorporeal development and embryonic transparency of zebrafish make it an ideal alternative to determine of potential lethality and teratogenicity of different molecules. The aim of the study was to evaluate the effects caused by exposure to the psychiatric drugs diazepam, fluoxetine and risperidone on embryos and larvae of zebrafish, taking into account survival parameters, hatching, heart rate and overall length. The embryos were exposed to different concentrations of each drug, taking into account concentrations already found in the aquatic environment and described in the literature. Risperidone, fluoxetine and diazepam affect the early development of zebrafish, the first drug having greater effect, causing changes in all evaluated parameters. When placed in an environmental context, the effects can interfere with population levels and survival of the species in natural environment.

Keywords: environmentalcontamination ,fluoxetine , diazepam , risperidone,toxicology.

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Fármacos e concentrações utilizadas durante o experimento.....	21
Tabela 2 -Fármaco e respectiva concentração de efeito em relação aos parâmetros avaliados .....	37

## LISTA DE FIGURAS

Figura 01–Casal de zebrafish .....	20
Figura 02–Embrião de zebrafish em diferentes fases do desenvolvimento .....	24
Figura 03–Número de larvas eclodidas expostas ao diazepam .....	25
Figura 04–Número de larvas viáveis expostas ao diazepam .....	26
Figura 05–Frequência cardíaca de embriões expostos a diazepam .....	27
Figura 06–Comprimento das larvas expostas ao diazepam.....	28
Figura 07–Número de larvas eclodidas expostas a fluoxetina .....	29
Figura 08–Número de larvas viáveis expostas a fluoxetina .....	30
Figura 09–Frequência cardíaca de embriões expostos a fluoxetina .....	31
Figura 10–Comprimento das larvas expostas a fluoxetina.....	32
Figura 11–Número de larvas eclodidas expostas a risperidona.....	33
Figura 12–Número de larvas viáveis expostas a risperidona .....	34
Figura 13–Frequência cardíaca de embriões expostos a risperidona.....	35
Figura 14–Comprimento das larvas expostas a risperidona .....	36
Figura 15–Efeitos da exposição a psicofármacos em nível de população .....	43

## LISTA DE SIGLAS

5-HT<sub>2A</sub> – receptor 5-hidroxitrotamina (serotonina) tipo 2A

°C – graus celcius

µg - microgramas

D2 – receptor dopamina tipo 2

dpf – dias pós-fertilização

DZP - diazepam

FLU - fluoxetina

GABA – ácido gama-aminobutírico

hpf – horas pós-fertilização

mg - miligramas

ml - mililitro

ng - nanogramas

pH – potencial hidrogeniônico

RISP - risperidona

SNC – sistema nervoso central

## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA .....	12
1.1. Questão Ambiental.....	12
1.2. Diazepam.....	13
1.3. Fluoxetina.....	14
1.4. Risperidona .....	14
1.5. Modelo Experimental.....	15
2. OBJETIVOS.....	18
2.1. Objetivo Geral .....	18
2.2. Objetivos Específicos.....	18
3. MATERIAIS E MÉTODOS .....	19
3.1. Aspectos Éticos.....	19
3.2. Animais .....	19
3.3. Reprodução.....	19
3.4. Seleção de Ovos .....	20
3.5. Manutenção de embriões e larvas .....	21
3.6. Fármacos Utilizados.....	21
3.7. Avaliação dos embriões .....	22
3.7.1. Mortalidade .....	22
3.7.2. Eclosão .....	22
3.7.3. Frequência cardíaca .....	22
3.7.4. Comprimento Total .....	23
3.8. Análise estatística .....	23
4. RESULTADOS .....	24
4.1. Descrição dos embriões e larvas do zebrafish.....	24
4.2. Diazepam.....	25
4.3. Fluoxetina.....	28
4.4. Risperidona .....	32
5. DISCUSSÃO.....	37

5.1. Risperidona .....	38
5.2. Diazepam .....	39
5.3. Fluoxetina.....	40
6. CONCLUSÃO .....	44
7. REFERÊNCIAS .....	45
8. ANEXOS.....	49

# 1. INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA

## 1.1. Questão Ambiental

A contaminação de ecossistemas aquáticos por resíduos de fármacos e agentes químicos liberados é um tema polêmico e de preocupação crescente. Pouco se sabe sobre as consequências da presença destes poluentes emergentes e seus reais efeitos sobre o ambiente e a saúde humana e o aumento contínuo dos níveis presentes no ambiente alertou a comunidade científica (DEBLONDE et al., 2011; OGGIER et al., 2010).

Após a administração, os fármacos são metabolizados e excretados, em grande parte em sua forma inalterada, e ainda podem sofrer novas alterações devido a fatores biológicos ou químicos. Estudos tem demonstrado a ocorrência destes compostos em baixos níveis (ng - µg/L) em água de efluentes, de superfície, solos e sedimentos, e são um alerta para o alto risco de toxicidade e persistência em organismos não alvos (BOYD et al., 2003; DEBLONDE et al., 2011). Como resultados, múltiplas pesquisas foram iniciadas para examinar os possíveis efeitos em espécies não alvo a fim de proteger a “saúde” ambiental e minimizar os riscos de exposição (OGGIER et al., 2010).

Com a destinação incorreta destes compostos, a ineficiência do tratamento de esgoto, o consumo crescente de fármacos e o aumento da expectativa média de vida da população o achado destes componentes farmacêuticos encontrados na água ao longo dos anos vem sendo cada vez mais relatados, e os níveis encontrados devem ser ainda maiores no futuro (GALUS et al., 2013; CALISTO e ESTEVES, 2009). Além disso, não são definidos níveis máximos de concentração desses compostos na água para consumo (CALISTO e ESTEVES, 2009). Ainda, pouco se sabe sobre a extensão da ocorrência ambiental, transporte e destino final de muitos destes produtos químicos que são utilizados para estimular uma resposta fisiológica em humanos, plantas e animais (KOLPIN et al., 2002; ABREU et al., 2014).

Vários fármacos destinados ao tratamento de patologias psiquiátricas são encontrados no ambiente aquático em diversas partes do mundo. Compostos com

atividade ansiolítica, sedativa, hipnótica ou antidepressiva estão sendo cada vez mais utilizados, sendo as substâncias mais prescritas atualmente (GALUS et al., 2013; DEBLONDE et al., 2011). Como consequência, resíduos oriundos destes psicofármacos são encontrados com grande frequência no ambiente, mas os efeitos sob os organismos vivos ainda são pouco compreendidos (ABREU et al., 2014; CALISTO e ESTEVES, 2009).

Produtos farmacêuticos que entram em sistemas aquáticos apresentam níveis altamente variáveis e, raramente, atingem níveis letais (KOHLETT et al., 2012). Porém, existe atualmente uma preocupação crescente de que a liberação contínua destes contaminantes farmacêuticos possa afetar negativamente os organismos aquáticos que habitam esses ecossistemas (LISTER et al., 2009). Os efeitos desses resíduos de fármacos, mesmo em baixas concentrações, podem ser observados sobre a reprodução e comportamento atingindo de forma bastante impactante um contexto ecológico (KOHLETT et al., 2012; GALUS et al., 2013).

## **1.2. Diazepam**

Os benzodiazepínicos estão entre os fármacos mais consumidos no mundo todo, e por isso, são descritos como poluentes emergentes com grande potencial de contaminação (CALISTO e ESTEVES, 2009; KOSJEK et al., 2012; OGGIER, 2010). Como principal mecanismo de ação, esses componentes interagem por ligações alostéricas com o neurotransmissor ácido  $\gamma$ -aminobutírico (GABA), em especial receptores do subtipo GABA<sub>A</sub>. Como resultado desta ligação, os benzodiazepínicos aumentam os efeitos inibitórios do neurotransmissor GABA (BRUNTON et al., 2012).

O diazepam, um dos fármacos mais conhecidos entre o grupo, é indicado ao tratamento da ansiedade e sedação. Seu uso é bastante comum em tratamentos veterinários pelos seus efeitos como indução anestésica, sedativo e estimulante do apetite (CALISTO e ESTEVES, 2009). Sua longa ação é caracterizada pelos seus metabólitos ativos, que tem meias-vidas longas (KOSJEK et al., 2012).

Assim como a grande parte dos fármacos psiquiátricos, os benzodiazepínicos são geralmente excretados na urina, sendo primeiro metabolizados no fígado formando glucoronídeos conjugados, forma farmacologicamente inativa (CALISTO e ESTEVES, 2009). Apesar da inatividade farmacológica, quando liberados no

ambiente, os metabólitos podem sofrer ação bacteriana e então reconvertidos ao composto ativo (Ibid.). Concentrações equivalentes a 0,88µg/L de diazepam já foram encontradas em efluentes de estações de tratamento (TERNES et al., 2001). Na Alemanha, níveis de até 0,04µg/L foram registrados na superfície da água (VAN DER VER et al., 2004).

### **1.3. Fluoxetina**

Dentre outros poluentes emergentes encontrados com frequência no ambiente destaca-se a fluoxetina, fármaco pertencente a classe dos inibidores seletivos de recaptção de serotonina. Tem como principal objetivo modular os níveis do neurotransmissor serotonina na fenda sináptica. Primariamente indicada para depressão, a fluoxetina passou também a ser recomendada no tratamento de casos de transtorno obsessivo-compulsivo, pânico e ansiedade (BROOKS et al., 2003).

Segundo Kohler et al. (2012) muitos efeitos podem ser encontrados na exposição sub-letal de organismos aos inibidores seletivos de recaptção de serotonina, onde são citados prejuízos nas fases de acasalamento, cortejo, comportamento defensivo e anti-predatório, além de efeitos adversos em órgãos e sistemas cardiovascular, digestivo e endócrino.

Níveis muito altos de fluoxetina foram encontrados em bio-sólidos originados de estações de tratamento. No Canadá, esses registros variaram entre 100 a 4700µg/kg. O uso destes sedimentos sólidos na agricultura é comum, um caminho significativo para entrada destes componentes químicos no ambiente (XIA et al., 2005 apud CALISTO e ESTEVES, 2009). Níveis de fluoxetina foram identificados em águas já tratadas, revelando uma ineficiência em remover esses compostos no tratamento da água para beber. Até hoje, uma das maiores concentrações já encontradas de fluoxetina em níveis de contaminação ambiental foi de 0.999µg/L em efluentes de estações de tratamento de águas residuais (CALISTO e ESTEVES, 2009; METCALFE et al., 2003).

### **1.4. Risperidona**

Como um terceiro grupo de psicofármacos poluentes, os antipsicóticos são utilizados essencialmente para o controle de psicoses e manias, principalmente em pacientes esquizofrênicos ou portadores de transtorno bipolar (BRUNTON et al., 2012). Classificados como típicos ou atípicos (de acordo com seu mecanismo de ação), os antipsicóticos são fármacos cada vez mais utilizados na medicina psiquiátrica (LEE et al., 2011).

A risperidona, um antipsicótico atípico, é bastante empregada no tratamento de psicoses delirantes, como a esquizofrenia, o transtorno bipolar, a psicose depressiva, transtorno obsessivo compulsivo e ainda para o controle da irritabilidade de pacientes autistas (LEE et al., 2011; PRIETO et al., 2014). Ao contrário dos antipsicóticos típicos, a risperidona liga-se principalmente nos receptores 5-HT<sub>2A</sub>, atuando como agonistas inversos e diminuindo a produção de trifosfato de inositol intracelular. Também se liga receptores dopaminérgicos D<sub>2</sub>, diminuindo a ação da dopamina na fenda sináptica, inibindo os efeitos causadores da psicose (BRUNTON et al., 2012).

A risperidona foi encontrada nas concentrações de 0,0003 µg/L na água já pronta para consumo (CALISTO & ESTEVES, 2009).

Efluentes de estações de tratamento de águas residuais são considerados as maiores fontes de contaminação do ambiente aquático, por estar continuamente introduzindo fármacos no ambiente (BOYD et al., 2003). Na realidade, estas estações de tratamento não foram especificamente destinadas a remover estes compostos da água (KOLPIN et al., 2002; KOHLERT et al., 2012) e os processos de tratamento convencional (coagulação, floculação e sedimentação) não são métodos eficazes para este objetivo (BOYD et al., 2003; GALUS et al., 2013).

### **1.5. Modelo Experimental**

Em modelos experimentais convencionais, quando se tem por objetivo determinar a toxicidade de substâncias durante as fases de desenvolvimento, as fêmeas grávidas, geralmente ratos ou coelhos, são expostas aos compostos em teste e seus efeitos tóxicos são avaliados nos fetos. Estes testes de toxicidade convencionais não só exigem o uso de números elevados de animais durante o experimento, mas também tempo e recursos para a conclusão de um longo ciclo

reprodutivo, além de tornar difícil a determinação da concentração precisa a qual o embrião foi exposto (DEMICCO et al., 2010). Além disso, as mães devem ser sacrificadas para permitir a inspeção do desenvolvimento embrionário, motivo de grande preocupação ética (IRONS et al., 2010).

Como modelo organismo experimental, o zebrafish (*Daniorerio*) oferece muitos benefícios em comparação aos modelos mamíferos, como baixas exigências econômicas de criação, tamanho pequeno (aprox. 3cm) e alta fecundidade. O desenvolvimento extracorpóreo e a transparência embrionária fazem do zebrafish um modelo experimental ideal para os testes de toxicidade durante as primeiras fases de desenvolvimento, sendo utilizado para determinação de potenciais de letalidade, subletalidade, teratogenicidade e distúrbios de comportamento em diferentes componentes (WIXON, 2000; DEMICCO et al., 2010, TRUONG et al., 2011). O teste em seus embriões tem recebido uma atenção cada vez maior da comunidade científica com sua utilização para rotina de testes de efluentes, regulamentação de produtos químicos e toxicidade aguda (KAIS et al., 2013). Além disso, o modelo vem sendo utilizado para testes de alto rendimento com vários compostos, testes de segurança com fármacos, avaliação de riscos ambientais e toxicidade durante o desenvolvimento (ALI et al., 2014).

São inúmeras as vantagens da utilização de larvas e embriões de zebrafish como modelo animal de pesquisa. Quando comparados a técnicas *in vitro*, tais como a cultura celular, vantagens como custo e tempo podem ser bastante semelhantes, além de proporcionar uma melhor previsão da resposta biológica como organismo (TROUNG et. al., 2011). A ampla homologia genética entre o zebrafish e outras espécies de vertebrados (incluindo roedores e humanos), e ainda sua semelhança em estrutura e padrão cerebral e função de muitos sistemas neurais e fisiológicos (eixo regulatório de estresse) são descritos com bastante frequência pela comunidade acadêmica (ALI et al., 2014).

Levando em consideração a ampla utilização de embriões e larvas do zebrafish na pesquisa biomédica e toxicológica, tivemos como objetivo neste estudo levantar as vantagens e desvantagens da utilização do modelo, bem como padronizar a técnica da exposição de embriões ainda não utilizada em nosso laboratório. Além disso, objetivamos avaliar os riscos da exposição em estágio precoces da vida as possíveis alterações fisiológicas decorrentes da exposição aos fármacos diazepam, fluoxetina e risperidona em concentrações

consideradas ambientais. Os embriões foram expostos a partir das 3hpf a 95hpf e avaliados em intervalos mínimos e máximos de 8 ou 12h.

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1. Objetivo Geral**

Avaliar efeitos de diferentes concentrações de psicofármacos na água sobre o desenvolvimento embrionário/larval de zebrafish.

### **2.2. Objetivos Específicos**

1) Avaliar os efeitos de 5 concentrações de fluoxetina sobre a mortalidade, eclosão, frequência cardíaca, comprimento total de embriões e larvas de zebrafish.

2) Avaliar os efeitos de 5 concentrações de diazepam sobre a mortalidade, eclosão, frequência cardíaca, comprimento total de embriões e larvas de zebrafish.

3) Avaliar os efeitos de 6 concentrações de risperidona sobre a mortalidade, eclosão, frequência cardíaca, comprimento total de embriões e larvas de zebrafish.

4) Implantar e padronizar métodos de avaliação de ovos e larvas de zebrafish junto ao laboratório.

### **3. MATERIAIS E MÉTODOS**

#### **3.1. Aspectos Éticos**

Todos os procedimentos experimentais foram aprovados pela comissão de ética da Universidade de Passo Fundo, sob o número de 7/2013 e reúne as diretrizes do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA; <http://www.cobea.org.br>) (em anexo).

#### **3.2. Animais**

Para a obtenção dos ovos foram utilizados peixes-zebra adultos do tipo selvagem, originários das instalações do laboratório, e mantidos em aquários de vidro em condições ideais para o seu desenvolvimento e manutenção (28°C., pH 7-8, oxigênio 6.5±0.4 mg/L). Os peixes foram alimentados duas vezes ao dia com ração comercial (Alcon Brasil, AlconPet, Brasil) e mantidos em iluminação ambiente. A limpeza e remoção de sujidades e fezes foram realizadas diariamente, com renovação da água de aproximadamente 10% do volume total do aquário.

#### **3.3. Reprodução**

Para reprodução, grupos de 10 peixes foram selecionados dos aquários de manutenção de maneira aleatória, e então classificados de acordo com o sexo, sendo colocados em grupos em iguais proporções (1:1) com base no exame visual externo (machos mais esguios e de coloração mais escura e fêmeas de abdômen mais inchado devido ao número de ovos produzidos)(Figura 1) (WESTERFIELD, 2000; LAMMER et al., 2009). Posteriormente foram colocados em tanques especiais para reprodução, de fundo gradeado, com encaixe em recipiente maior preenchido com água. Após a desova, os ovos passam pelo fundo gradeado e ficam protegidos da predação pelos reprodutores.

O acasalamento, desova e fertilização ocorrem dentro de 30 minutos após o início da luz da manhã. Imediatamente após o processo, o recipiente de fundo

gradeado é retirado, juntamente com os peixes adultos. Os ovos foram coletados por sifonamento, o mais cedo possível após a fertilização, e a exposição iniciada em não mais de 3 horas pós fertilização (hpf) como recomendado por Lammer et al. (2009).



Figura 01 – Casal de *zebrafish*. Notar que o macho (B) apresenta corpo esguio e alongado e ainda nadadeira caudal e região abdominal com coloração mais escura/amarelada quando comparado a fêmea (A). Fotos da autora.

### 3.4. Seleção de Ovos

Após coleta, os embriões foram colocados em becker de vidro e lavados com auxílio de uma peneira para remoção de fezes e debris. Foram então classificados um a um por meio de microscópio óptico binocular, com ampliação mínima de 25x. Ovos fecundados são caracterizados por um espaço perivitelino totalmente transparente rodeado pela membrana do ovo, o qual já tenha formado o pólo animal. Ovos não fecundados, não saudáveis ou mortos podem ser identificados pela falta de formação de blastômeros, e em fases posteriores, pela sua não-transparência.

Para o estudo, apenas os ovos fertilizados entre as 3 primeiras horas após fertilização e que apresentaram desenvolvimento de até 128 células foram utilizados, já que após esta fase, os ovos fertilizados podem ser equivocadamente não distinguidos dos ovos não fertilizados devido a sua não transparência. Ovos com anomalias evidentes (assimétricos, que apresentem formação de vesículas ou membranas danificadas) foram descartados (LAMMER et al., 2009; KIMMEL et al., 1995).

### 3.5. Manutenção de embriões e larvas

Após lavagem e classificação, os embriões foram mantidos em placas para cultura celular com 24 poços (5ml/poço) e distribuídos em grupos de 10 embriões por poço. Para cada concentração utilizada, foram utilizados 6 poços (n=6) e controles. As placas foram tampadas (para evitar evaporação excessiva de água e fármacos) e mantidas em banho maria para manutenção de temperatura (28°C). A água utilizada para manter os embriões foi retirada de sistema para manutenção de zebrafish, o qual possui sistema de filtragem biológica (bio-balls), química (carvão ativado) e esterilização por luz ultravioleta.

### 3.6. Fármacos Utilizados

Para o estudo, foram utilizados os psicofármacos diazepam, fluoxetina e risperidona. A escolha das concentrações em que os embriões seriam expostos, foram baseadas em dados encontrados na literatura.

O diazepam (União Química, injetável, 5mg/ml), encontrado no ambiente na concentração de 0,88µg/L (Ternes et al., 2010) e a fluoxetina (Daforin EMS, solução oral, 20mg/ml), encontrada em níveis de até 0,99µg/L (VAN DER VERet al., 2004) foram utilizados em 5 diferentes concentrações, a verificada no ambiente, e duas concentrações maiores e menores.

No experimento em que se utilizou a risperidona (Risperdal® Janssen, solução oral, 1mg/ml), selecionamos como base a concentração verificada no ambiente de 0,0003µg/L segundo Calisto e Esteves (2008) e Borova et al. (2014). Devido a baixa concentração, optou-se por utilizar neste estudo 5 concentrações acima da ambiental.

Tabela 1 – Fármacos e concentrações (em µg/L) utilizadas durante o experimento.

Fármaco	Concentração utilizada						Referência*
<b>Diazepam</b>	0,008	0,088	<b>0,88*</b>	8,8	88		Ternes et al. (2001)
<b>Fluoxetina</b>	0,009	0,099	<b>0,99*</b>	9,9	99		Van Der Veret al. (2004)
<b>Risperidona</b>	<b>0,0003*</b>	0,003	0,03	0,33	3,3	33	Calisto & Esteves (2009) Borova et al. (2014)

\*Concentrações encontradas no ambiente segundo referências.

### **3.7. Avaliação dos embriões**

Os embriões foram avaliados periodicamente durante os 5 primeiros dias de desenvolvimento em 3, 11, 26, 34, 49, 57, 72, 80, 95 horas pós fertilização (hpf). Os parâmetros avaliados: mortalidade, eclosão, frequência cardíaca e comprimento total.

#### **3.7.1. Mortalidade**

Foram considerados indivíduos mortos os embriões que apresentaram não transparência, coagulados, ausência da formação de sômites ou ausência de movimento cardíaco e circulação sanguínea. A ausência de resposta reflexa ao estímulo e exterior ou toque com agulha, ou ainda a não eclosão do ovo após 72h foram considerados também como parâmetros para avaliação de letalidade. Foi feita a contagem de sobreviventes em cada momento de avaliação e os resultados registrados.

#### **3.7.2. Eclosão**

Foram considerados eclodidos os embriões ou larvas que conseguem romper o córion, ou membrana externa do ovo. A exposição da toda, ou maioria da cauda para fora do ovo já o classifica como eclodido. Para realização da análise foi avaliada a proporção de indivíduos eclodidos em relação aos sobreviventes (%).

#### **3.7.3. Frequência cardíaca**

Avaliada em 49hpf em todos os grupos. Esta fase foi escolhida já que todos os embriões apresentam atividade cardíaca e pouca atividade locomotora. Foram avaliados 4 embriões por poço, selecionados de maneira aleatória, obtendo uma média para cada grupo. A contagem dos batimentos cardíacos foi realizada em um 1 minuto por visualização direta utilizando microscópio ótico modelo Zeiss com câmera acoplada marca AxioCamErc 5s e software Axio Vs40 versão 4.8.2.0 (2006-2010).

#### **3.7.4. Comprimento Total**

As larvas foram medidas em 95hpf com auxílio de microscópio estereoscópico Zeiss Stemi 508 com câmera acoplada AxioCam Erc5s e software para análise Zeiss. Para obtenção da média, foram selecionadas de maneira aleatória 4 larvas por poço.

#### **3.8. Análise estatística**

Os dados de eclosão de cada concentração foram comparados utilizando ANOVA de duas vias considerando como variáveis independentes: concentração da droga x tempo, seguida de análise de Bonferroni (post-hoc). Os dados de frequência cardíaca e comprimento total foram comparados por ANOVA de uma via seguida de Dunnett. A curva de sobrevivência foi estimada utilizando análise de Kaplan-Meier. A média  $\pm$  desvio padrão de cada grupo foi calculada utilizando os valores obtidos em cada grupo de tratamento e analisados com o GraphPad InStat 3.0 (GraphPad Software, San Diego, Califórnia, USA). A significância estatística foi aceita quando  $p \leq 0,05$ .

## 4. RESULTADOS

### 4.1. Descrição dos embriões e larvas do zebrafish

Os embriões se apresentaram transparentes durante os seus primeiros estágios de desenvolvimento e resistentes a manipulação diária principalmente nas fases não-eclodidas. Esses fatores facilitadores na avaliação do desenvolvimento fazem do embrião do zebrafish um modelo prático para testes de toxicidade que comprovaram sua empregabilidade como rotina na avaliação de substâncias e seus efeitos durante as fases embrionárias. Os principais cuidados aplicados durante a utilização do modelo foram utilização de meio/água livre de microrganismos (fungos e parasitas) evitando a infecção da parede dos ovos e possíveis alterações do seu desenvolvimento, bem como a manutenção e estabilidade da temperatura e controle de qualidade da água.

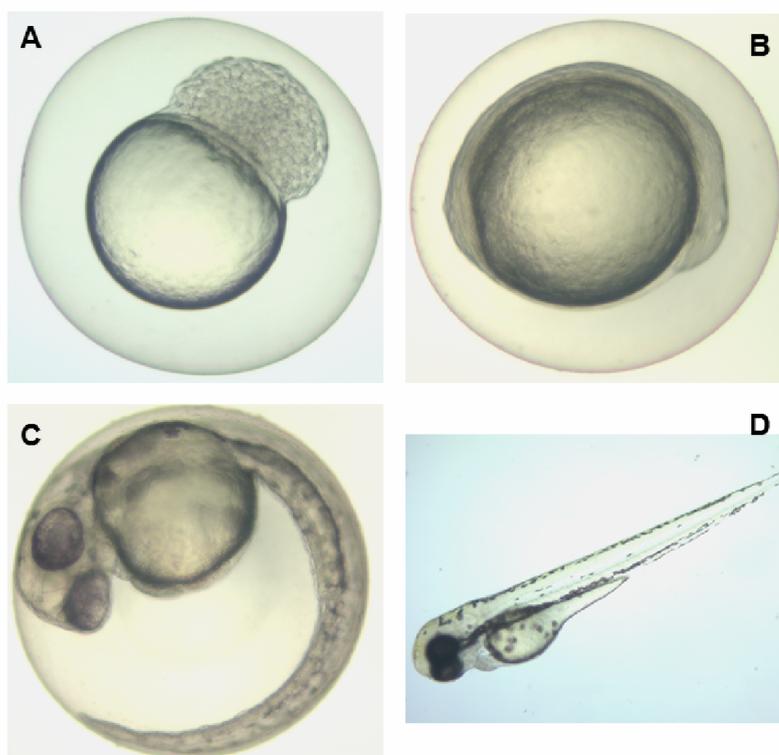


Figura 02 – O embrião do *zebrafish* em diferentes fases do desenvolvimento. **A:** Forma embrionária em 3hpf. Considerado a última fase do período de blástula. **B:** Forma de gástrula em 10hpf. **C:** Embrião com aprox. 24hpf. Estruturas como olhos, coração e coluna vertebral já podem ser observados. Nesta fase já se deram início aos batimentos cardíacos e contração muscular e os

embriões já conseguem se movimentar no interior do ovo. **D**: Embrião já eclodido em 32hpf. Fotografias referentes ao grupo controle.

## 4.2. Diazepam

O Diazepam (diaz) não afetou a eclosão das larvas em nenhuma das concentrações avaliadas (Figura 03).

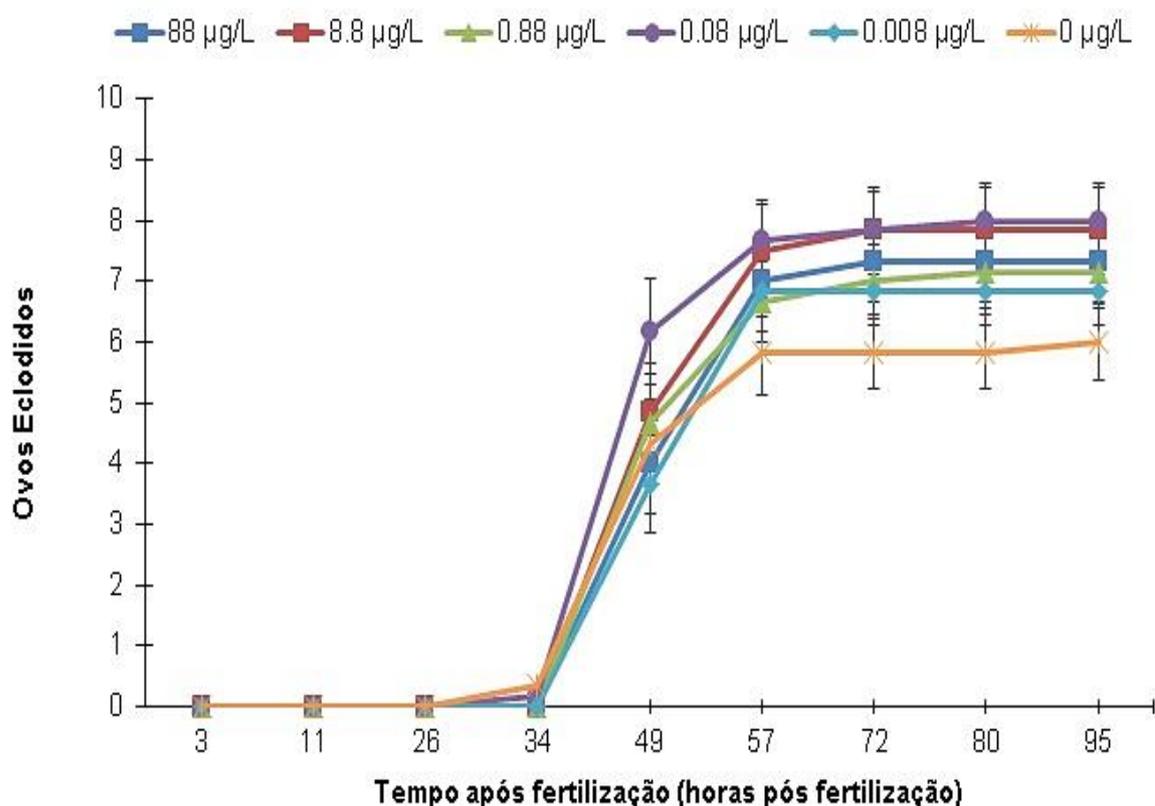


Figura 03 - Número de larvas expostas a diferentes concentrações de diazepam eclodidas em relação ao tempo após fertilização. Não foi verificada interação “concentração\*tempo” ( $F_{40,270} = 0,7846$ ,  $P = 0,8214$ ), mas sim efeito isolado do tempo ( $F_{8,270} = 296,5$ ,  $P < 0,0001$ ) e efeito da concentração ( $F_{5,270} = 5,125$ ,  $P = 0,0002$ ). Como o efeito do tempo é esperado, foi procedida a comparação entre as concentrações em cada tempo. Não houve diferença estatística entre os grupos (ANOVA de duas vias).

O Diazepam em todas as concentrações testadas alterou o número de larvas vivas (Figura 04).

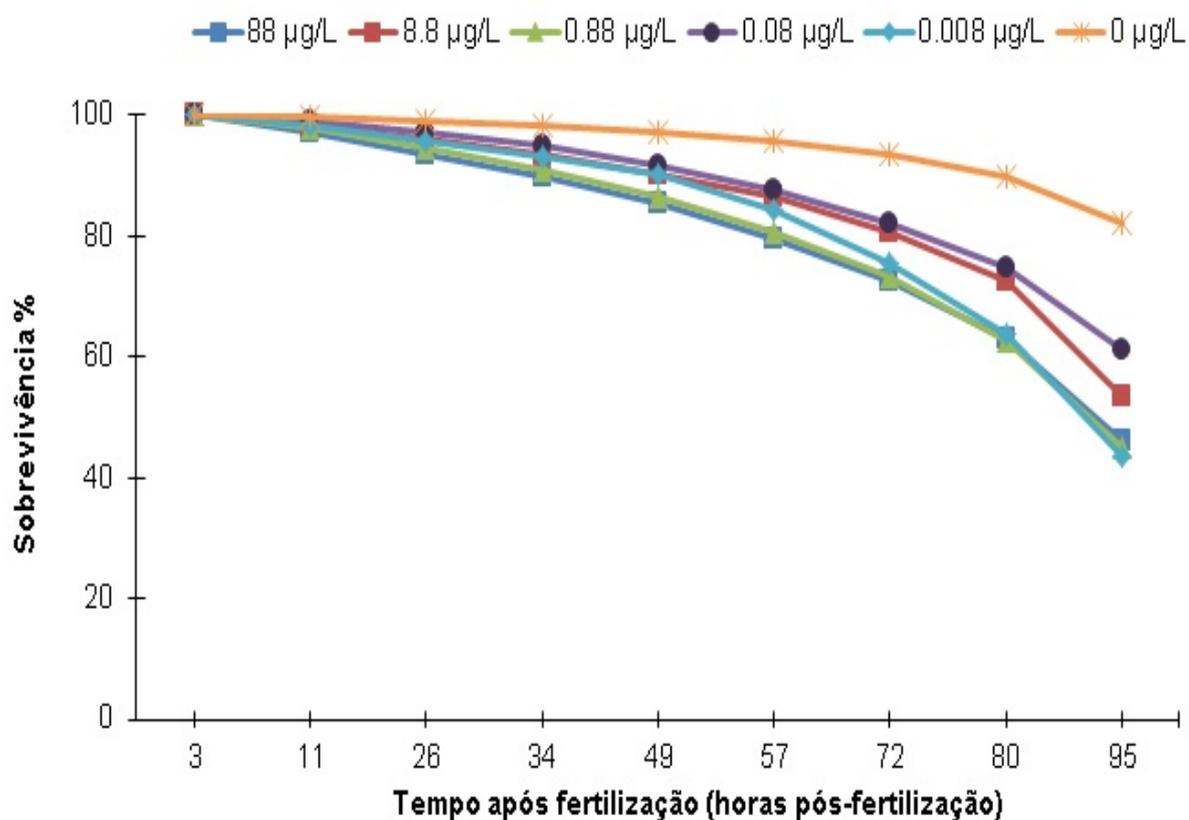


Figura 04 - Numero de larvas viáveis (%) expostas adiferentes concentrações de diazepam segundo método de análise de sobrevivência de Kaplan-Meier. Todas as concentrações de diazepam resultaram em taxas de sobrevivência de 43 a 60% enquanto o grupo controle apresentou taxa de sobrevivência mais que 82%.

Em relação a frequência cardíaca (FC), todas as concentrações, exceto 8,8 µg/L (FC = 138) provocaram redução ( $p < 0,05$ ) em relação a FC dos controles (FC = 141bpm)(Figura 05).

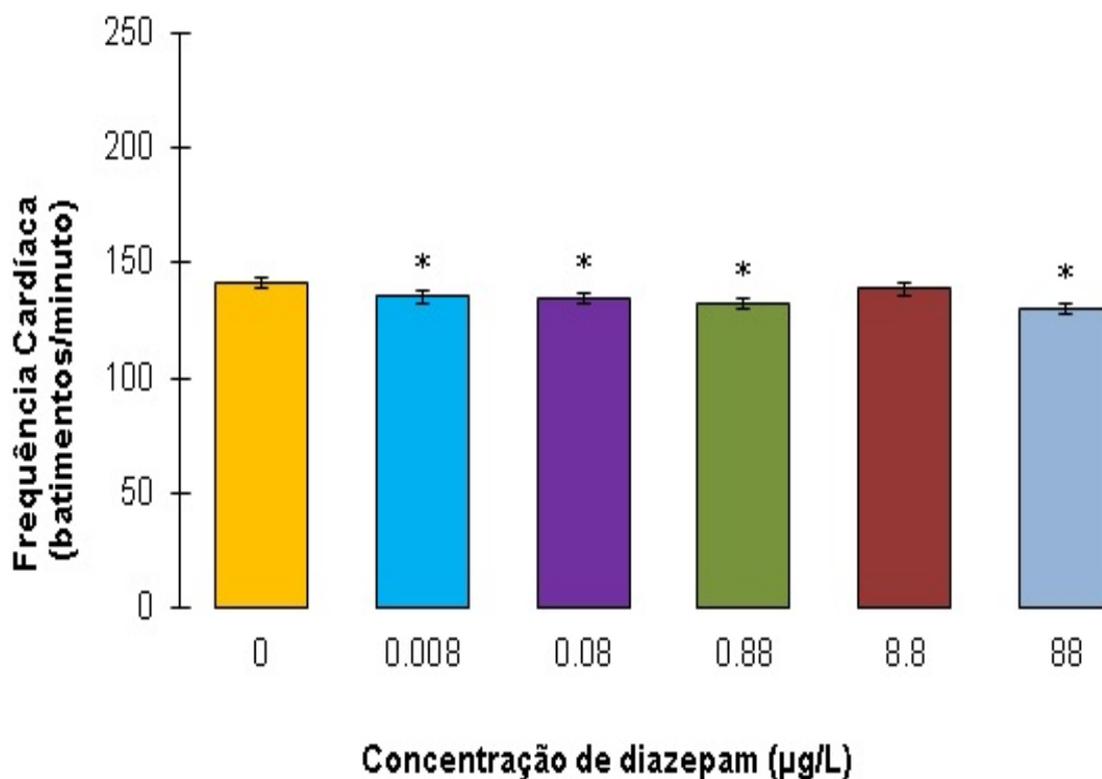


Figura 05 -Frequência cardíaca média em batimentos por minuto em embriões com aprox. 49hpf. expostos a diferentes concentrações de diazepam.Asteriscos indicam diferença em relação ao controle. (ANOVA de uma via seguida de Dunnet [ $F_{5,30} = 18,421$ ,  $P < 0.0001$ ]).

Quanto ao tamanho da larva, após 95 horas pós-fertilização, larvas expostas a 0,008µg/L, 0,08µg/L e 88µg/L (1,93 a 1,96mm) de diazepam eram maiores quando comparadas ao grupo controle(1,89mm)(Figura 06).

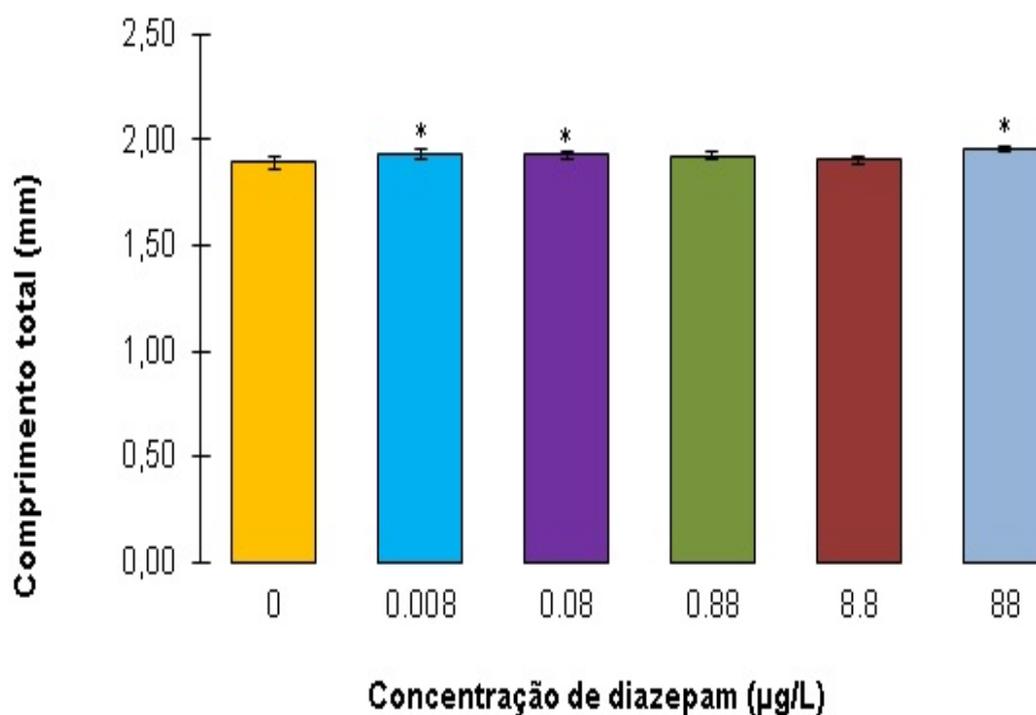


Figura 06 – Comprimento das larvas (95hpf) em relação a concentração de diazepam. Asteriscos indicam diferença em relação ao controle. (ANOVA de uma via seguida de Dunnet [ $F_{5,170} = 6,529$ ,  $P = 0.0003$ ]) ( $n=6$ ).

### 4.3. Fluoxetina

A fluoxetina (FLU) na concentração de  $0.99\mu\text{g/L}$  afetou a eclosão dos ovos com valores superiores ao controle nos momentos 49 e 57hpf (Figura 07).

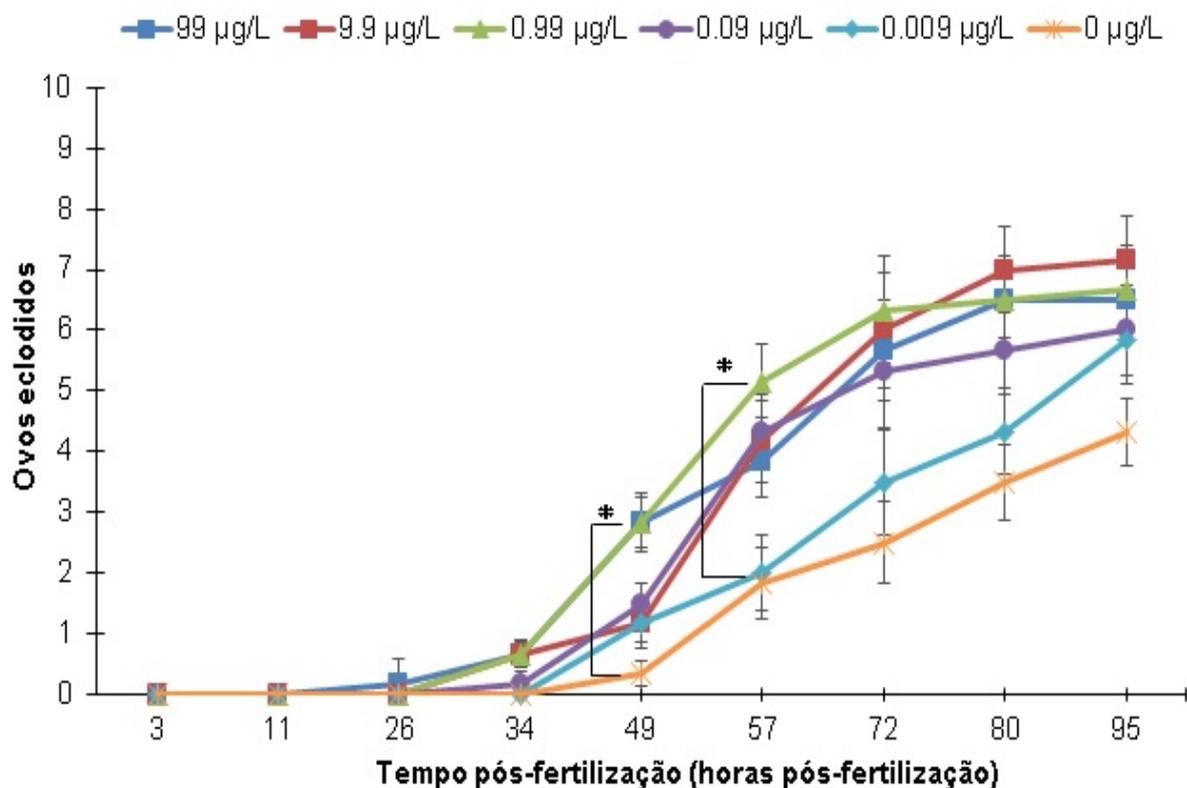


Figura 07 - Numero de ovos eclodidos durante a exposição a diferentes concentrações de fluoxetina em relação ao tempo após fertilização. Foi verificada interação “concentração\*tempo” ( $F_{40,270} = 1,937$ ,  $P = 0,0012$ ) e também efeito isolado do tempo ( $F_{8,270} = 156,9$ ,  $P < 0,0001$ ) e efeito da concentração ( $F_{5,270} = 16,73$ ,  $P < 0,0001$ ). O asterisco indica diferença entre as concentrações no tempo específico pelo teste de Bonferroni (ANOVA de duas vias).

A FLU afetou a sobrevivência das larvas (Figura 08).

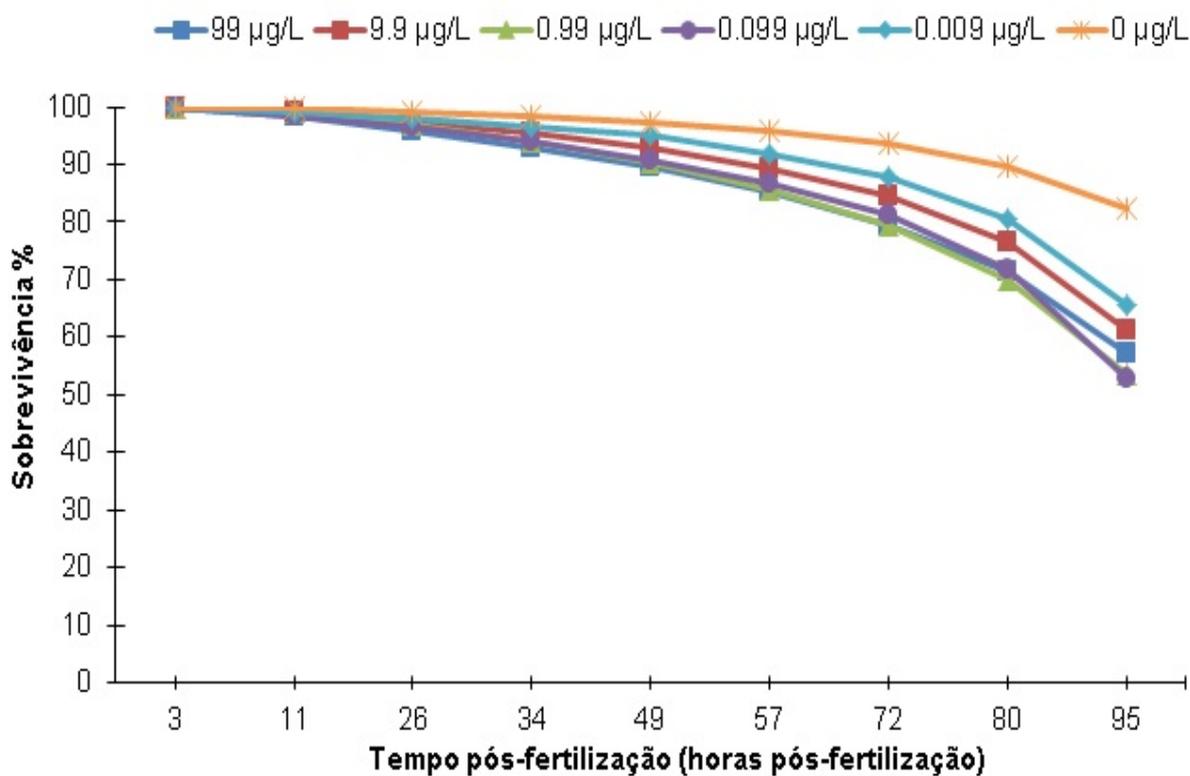


Figura 08 –Curva de sobrevivência de Kaplan-Meier em diferentes concentrações, nove tempo após fertilização. Todas as concentrações utilizadas demonstraram curvas significativamente diferentes quando comparadas ao grupo controle ( $P < 0.001$ ).

A frequência cardíaca (FC) da larvas expostas a 99µg/L (FC =159bpm) de FLU foi menor ( $p < 0,05$ ) que o controle (FC = 176bpm) (Figura 09).

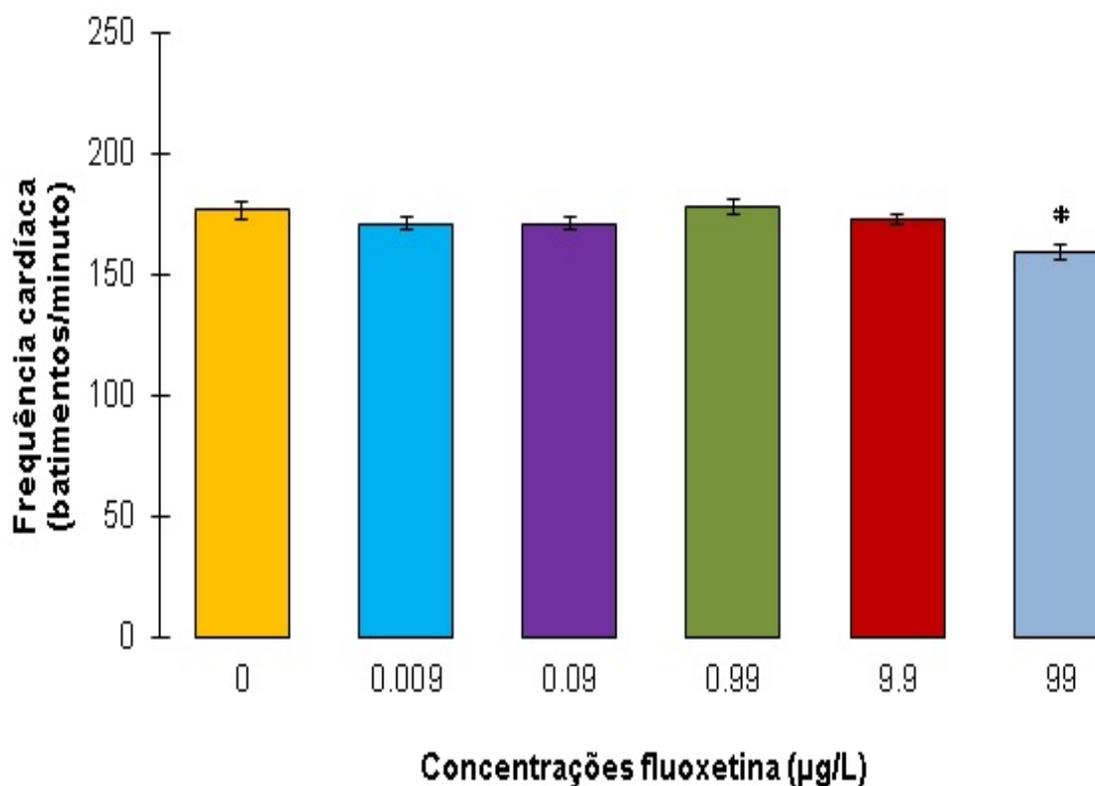


Figura 09 – Frequência cardíaca em batimentos por minuto no momento 49hpf em relação a diferentes concentrações de fluoxetina. Asterisco indica a diferença estatística que pode ser observada na concentração de 99µg/L em relação ao grupo controle (ANOVA de uma via seguida de Dunnett [ $F_{5,30} = 18,421$ ,  $P < 0.0001$ ]) ( $n=6$ ).

Em relação ao comprimento total das larvas avaliadas com fluoxetina, o grupo exposto a maior concentração (99µg/L) apresentou menor comprimento quando comparado ao grupo controle (Figura 10).

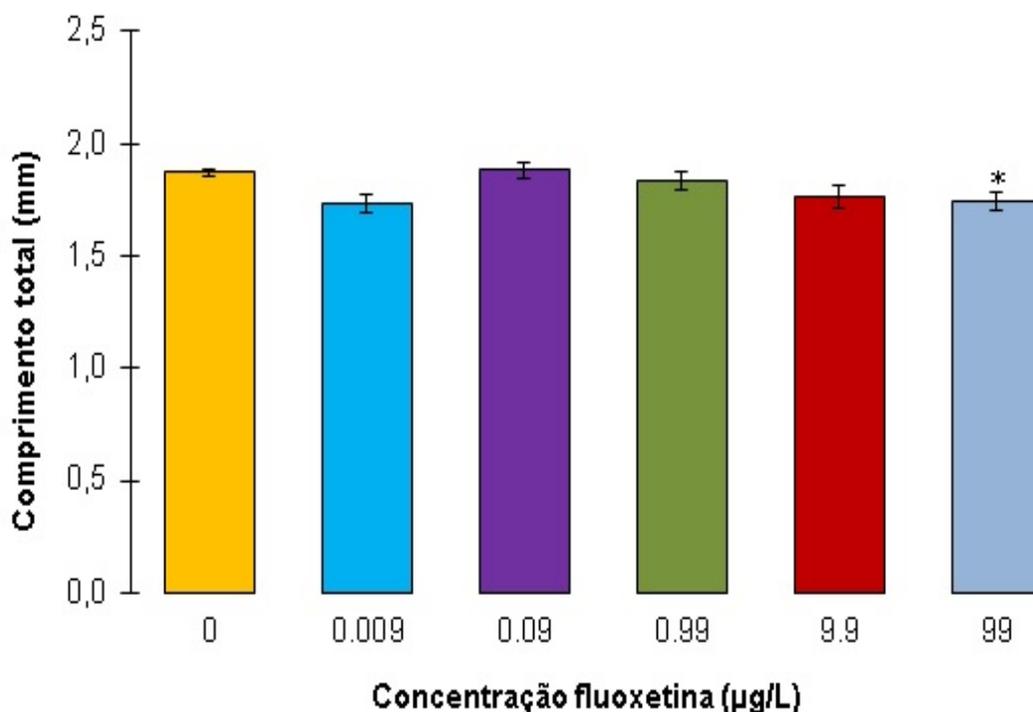


Figura 10 – Comprimento total de larvas avaliadas em 95hpf expostas a diferentes concentrações de fluoxetina. Asteriscos indicam diferença em relação ao controle (ANOVA de uma via seguida de Dunnet [ $F_{5,171} = 3,091$ ,  $P = 0.0107$ ]).

#### 4.4. Risperidona

A partir do momento 57hpf, a risperidona, na concentração de 0,33µg/L provocou diminuição na taxa de eclosão em comparação à concentração de 0,0033µg/L, ambas não diferindo do controle e das demais concentrações. A variabilidade encontrada no momento 95 horas pós-fertilização impediu a detecção de diferença estatística, entretanto os valores destes momentos são praticamente idênticos aos 3 momentos anteriores (57, 72 e 80 horas pós-fertilização) (Figura 11).

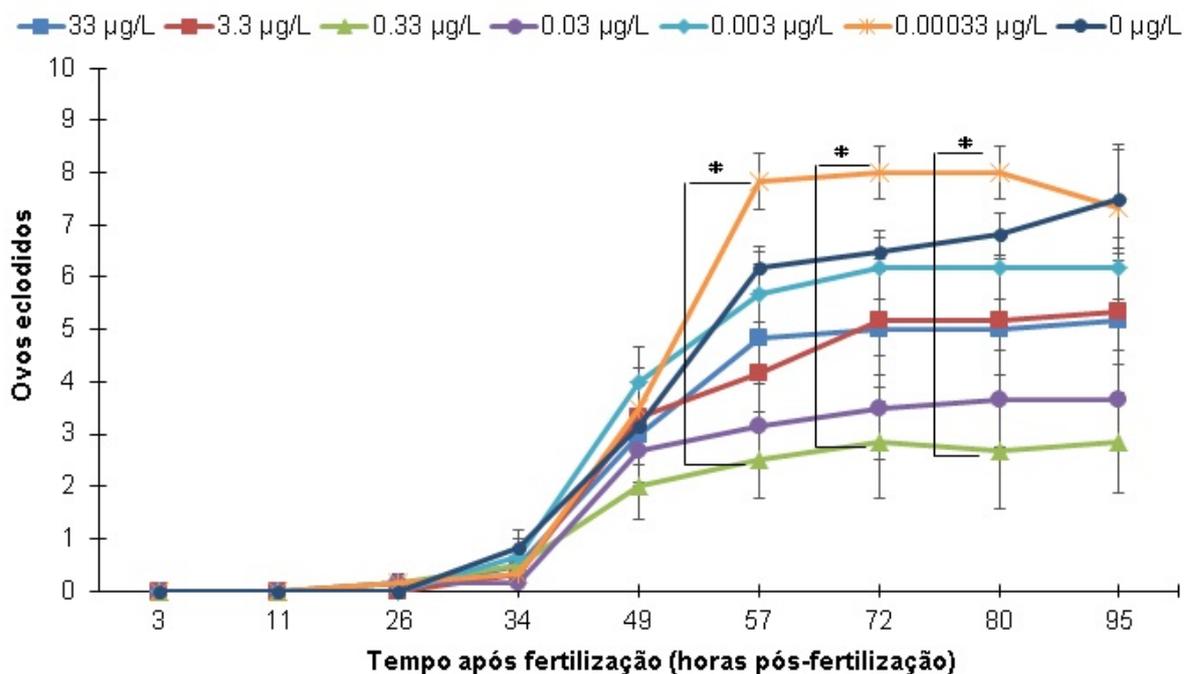


Figura 11 – Número de embriões expostos a diferentes concentrações de risperidona eclodidos em relação ao tempo após fertilização. Foi verificada interação “concentração\*tempo” ( $F_{48,315} = 1,882$ ,  $P = 0,0008$ ) e também efeito isolado do tempo ( $F_{8,315} = 101,9$ ,  $P < 0,0001$ ) e efeito da concentração ( $F_{5,315} = 14,55$ ,  $P < 0,0001$ ). O asterisco indica diferença entre as concentrações no tempo específico pelo teste de Bonferroni. (ANOVA de duas vias) ( $n=6$ ).

Após a eclosão a Risp provoca marcados efeitos na sobrevivência das larvas. Nos momentos 72, 80 e 95 hpf a RISP na concentração de 0,33µg/L piora a sobrevivência em relação ao controle e a concentração de 0,00033 µg/L e controle (Figura 12).

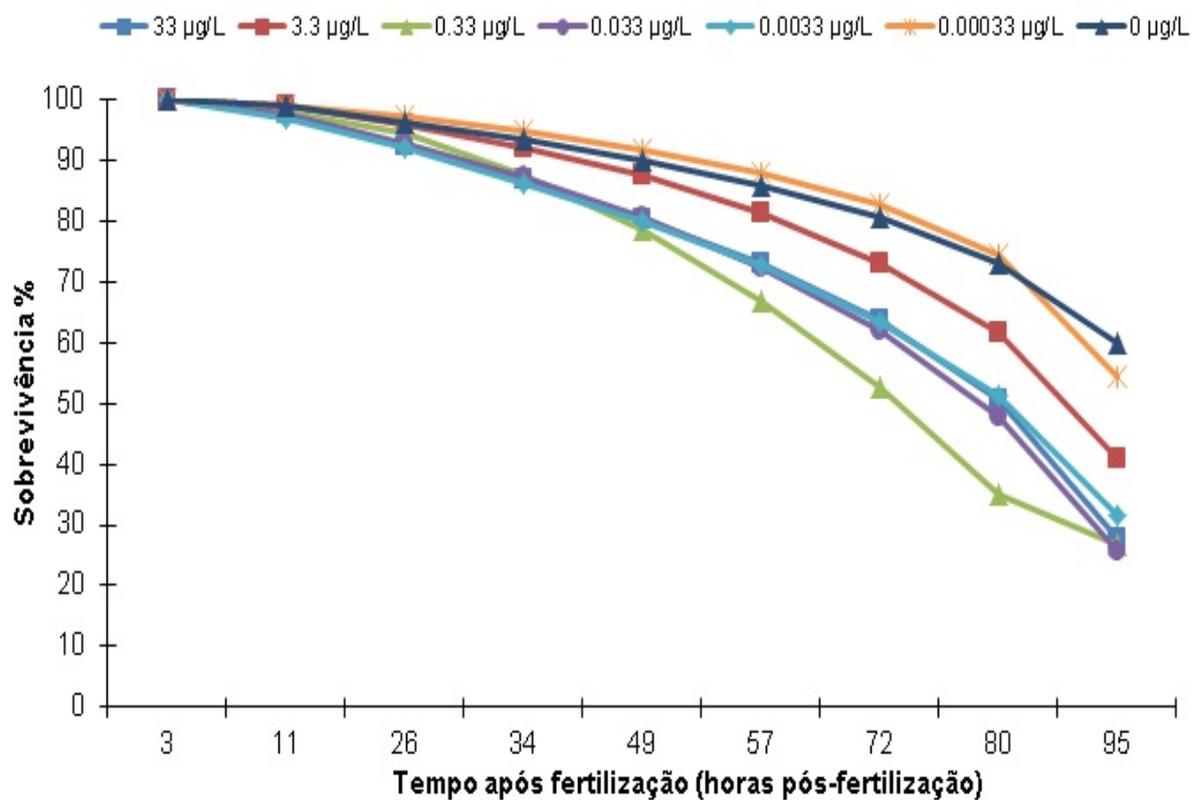


Figura 12 – Curva de sobrevivência de Kaplan-Meier para embriões e larvas de zebrafish expostos a diferentes concentrações e risperidona em nove momentos pós-fertilização. As curvas apresentaram diferença estatística ( $P < 0.0001$ ),

Em relação a FC, a Risp na concentração de  $0,33\mu\text{g/L}$  ( $\text{FC} = 158\text{bpm}$ ) provocou redução em relação ao controle ( $\text{FC} = 197\text{bpm}$ ) (Figura 13).

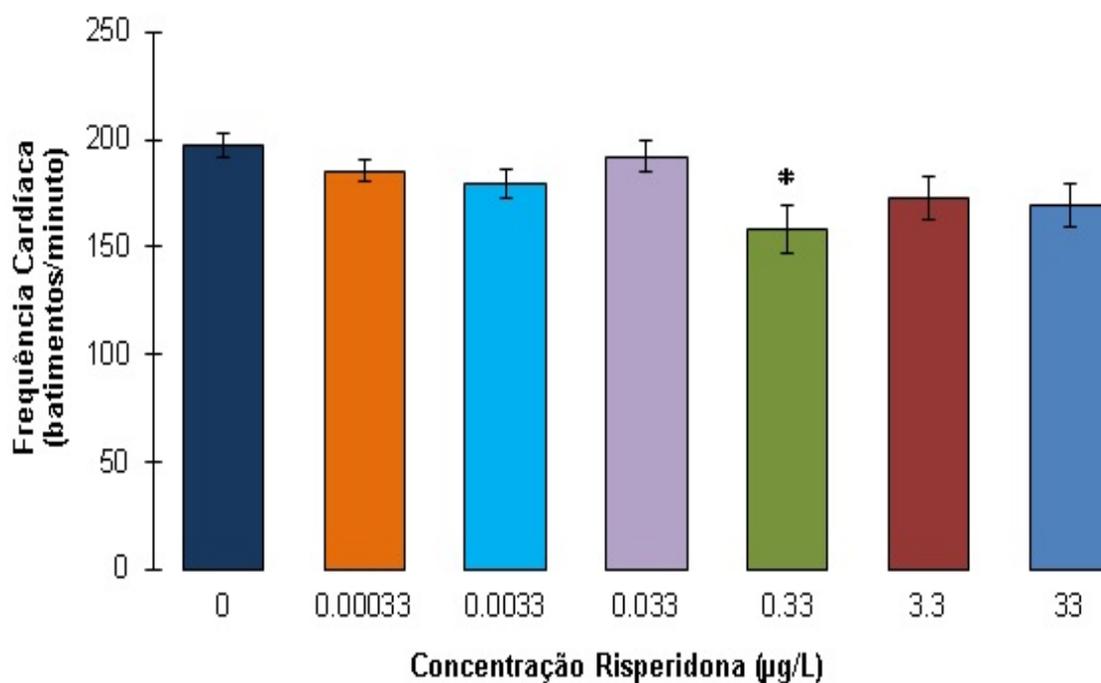


Figura 13 – Frequência cardíaca em batimentos por minuto no momento 49hpf em relação a diferentes concentrações de risperidona. Diferença estatística pode ser observada na concentração de 0.33µg/L em relação ao grupo controle. Nas demais concentrações não foram observadas diferenças significativas. (ANOVA de uma via seguida de Dunnet [ $F_{6,154} = 2,718$ ,  $P = 0.0156$ ]).

Em relação ao tamanho, larvas expostas às concentração de 0,033µg/L são menores ( $p < 0,05$ ) comparadas as larvas do grupo controle (Figura 14).

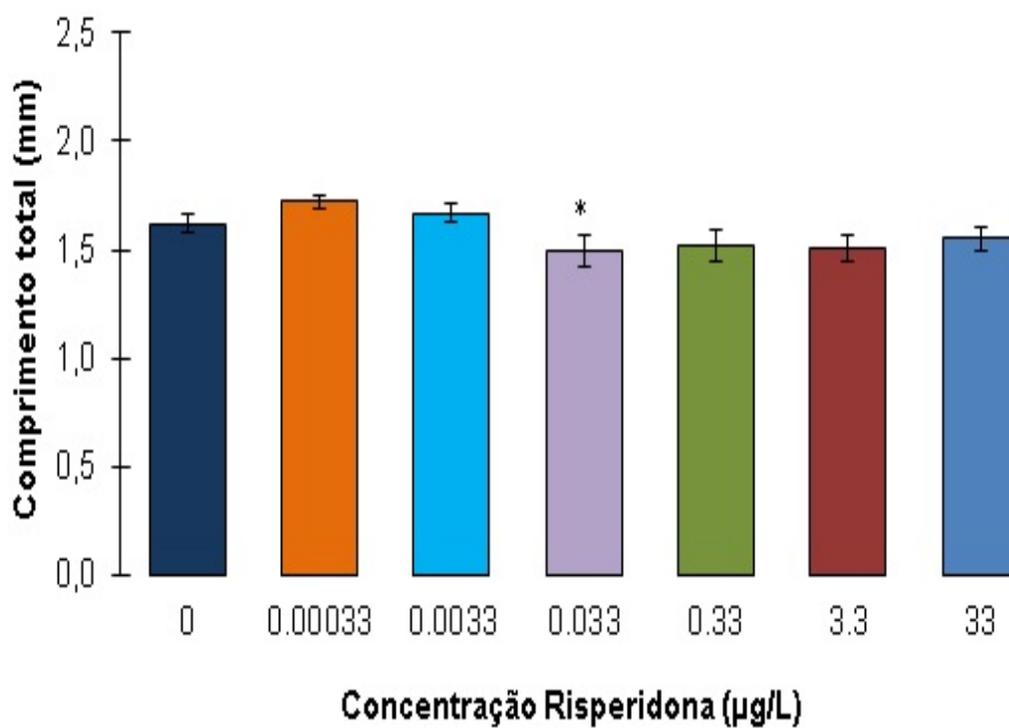


Figura 14 – Comprimento total de larvas (95hpf) expostas a diferentes concentrações de risperidona. Asteriscos indicam diferença em relação ao controle. (ANOVA de uma via seguida de Dunnet [ $F_{6,154} = 3,438$ ,  $P = 0.0300$ ]) (n=6).

## 5. DISCUSSÃO

Nós mostramos que a presença de diazepam, fluoxetina e risperidonana água pode afetar o desenvolvimento inicial do zebrafish, mesmo em baixas concentrações. Os fármacos testados exerceram efeitos em três ou mais dos parâmetros avaliados, sendo a risperidona, aparentemente, a droga com o maior efeito, uma vez que provocou alterações nos quatro parâmetros avaliados, conforme demonstrado na tabela abaixo:

Tabela 2 – Fármaco e respectiva concentração( $\mu\text{g/L}$ ) de efeito em relação aos parâmetros avaliados.

	<b>RISP</b>	<b>DZP</b>	<b>FLU</b>
<b>Sobrevivência</b>	↓todas	↓todas	↓todas
<b>Eclosão</b>	↓0,33	-	↑0,99
<b>Frequência Cardíaca</b>	↓0,33	↓todas, exceto 8,8	↓99
<b>Comprimento Total</b>	↓0,033	↑0,008, 0,08 e 88	↓99

As alterações verificadas demonstram que a exposição de embriões e larvas de zebrafisha psicofármacos pode provocar efeitos sob a população exposta, mesmo quando as concentrações dos contaminantes são encontradas muito abaixo da concentração utilizada como terapêutica na prática clínica.

A seleção dos parâmetros avaliados foi baseada na facilidade e aplicabilidade da avaliação, tipo de equipamento exigido e relevância de seu impacto sobre a questão de manutenção e sobrevivência da espécie em seu ambiente natural.

Uma diminuição da viabilidade dos embriões/larvas expostas aos psicofármacos ou ainda, uma alteração no processo de eclosão, pode causar impactos sob toda a população de uma espécie em seu ambiente natural. Alterações como a diminuição ou aumento da taxa de eclosão podem estar relacionadas a efeitos sob a atividade locomotora da larva dentro do ovo (rompimento mecânico), dissolução enzimática ou ruptura osmótica (SCHROOTS et al., 1983). Se a larva não conseguir romper a tempo a barreira do córion, ficará impossibilitada de continuar seu crescimento e encontrar alimento para garantir sua sobrevivência, já que o saco

vitelínico garante sua nutrição durante apenas os primeiros 5 dias de vida (WEIS, 2014).

Referente a frequência cardíaca, as alterações podem estar diretamente relacionadas a uma queda da atividade locomotora e metabólica, seguida de uma diminuição da resposta ao ambiente e conseqüente aumento no risco da predação e mortalidade (WEIS, 2014). Modificações relacionadas ao comprimento total podem estar vinculadas a deformidades de cauda ou medula espinhal.

Estudos realizados em peixes demonstram que a serotonina, dopamina, acetilcolina e GABA estão entre os principais neurotransmissores que podem estar relacionados a mudanças durante o desenvolvimento, alterando locomoção, eclosão, agressão, capacidade de aprendizado e comportamento alimentar (WEIS et al., 2001; SCHOOTS et al., 1983).

Por todos esses fatores, o estudo sobre exposição aos psicofármacos é importante para avaliação dos impactos desses compostos durante a fase crítica de desenvolvimento inicial dos peixes.

### **5.1. Risperidona**

A risperidona provocou alterações nos quatro parâmetros avaliados em nosso estudo. Poucas informações foram encontradas a respeito dos efeitos da risperidona em peixes expostos a concentrações ambientais e por isso, pouco se sabe sobre os riscos da exposição a este tipo de psicofármaco.

A risperidona provocou diminuição da frequência cardíaca nos embriões na concentração de 0.33µg/L. Este efeito pode ser explicado pela ação dos antipsicóticos atípicos nos receptores dopaminérgicos e é coerente quando comparado a estudos feitos com outras drogas do mesmo grupo. A bradicardia e o bloqueio átrio-ventricular em embriões de zebrafish provocada pela clozapina já foi descrita por Akande et al. (2010). Em humanos, a administração de antipsicóticos atípicos pode provocar alterações nos canais de potássio pelo bloqueio do gene hERG (human ether-a-go-go related gene), ocasionando o prolongamento das ondas QT ou síndrome do QT longo, arritmias e morte cardíaca súbita (AKANDE et al., 2010 apud AMES et al., 2002).

O mecanismo de ação da risperidona e seus efeitos durante o desenvolvimento embrionário no zebrafish ainda não estão totalmente esclarecidos. Os resultados verificados no nosso estudo mostraram que, mesmo em baixas concentrações, já verificadas em ambiente natural (CALISTO & ESTEVES, 2009; BOROVA et al., 2014), a risperidona exerce efeitos tóxicos para os embriões da espécie.

## **5.2. Diazepam**

O diazepam interferiu na sobrevivência das larvas, diminuiu frequência cardíaca e aumentou o comprimento corporal total mesmo em baixas concentrações. Esses resultados diferem dos encontrados por Oggieret al. (2010), o qual os embriões de zebrafish, quando expostos a concentração de 273 µg/L de diazepam, não apresentaram nenhum tipo de alteração. De fato, Oggieret al. (2010) demonstraram alteração de locomoção, visão e efeito ansiolítico em zebrafish, somente em concentrações superiores, entre 1,25 e 5 mg/L.

Larvas de zebrafish quando expostas ao diazepam e submetidas a análise de comportamento exibem menos ansiedade quando comparadas a larvas expostas a fluoxetina ou cafeína, mesmo em fases jovens (6 dpf) (RICHENDRFER et al., 2011; STEENBERGEN et al., 2011). Esses achados sugerem que mesmo durante os estágios iniciais de desenvolvimento, as larvas de zebrafish são responsivas ao diazepam.

Não temos hipóteses claras para explicar o aumento da mortalidade dos embriões e larvas de zebrafish expostas ao diazepam. Em aves, Guneyet al. (1999) demonstraram que o diazepam exerceu efeito sob o desenvolvimento embrionário, inibindo o crescimento normal do tubo neural (estrutura embrionária que dará origem ao cérebro e medula espinhal). Alterações como essas, podem ter ocorrido nos embriões de zebrafish, explicando a interferência do diazepam no desenvolvimento embrionário sugerindo potencial tóxico para os embriões e larvas expostos a este tipo de contaminante.

### 5.3. Fluoxetina

A fluoxetina diminuiu a frequência cardíaca e o comprimento total das larvas na maior concentração utilizada (99µg/L). Referente a eclosão, o grupo exposto a fluoxetina na concentração de 0,99µg/L apresentou aceleração quando comparados a outros grupos testados.

A serotonina tem demonstrado desempenhar um papel na regulação do desenvolvimento cerebral e medula espinhal, antes do tempo em que torna-se um neurotransmissor ativo do sistema nervoso central. O aparecimento precoce da serotonina coaduna com a noção que ela atua como um fator de crescimento ou como “molécula sinal” para o desenvolvimento de múltiplos mecanismos que incluem a neurogênese, o crescimento axonal, estabelecimento da densidade terminal e ainda sinaptogênese (AZMITIA, 2001). Estes processos são fundamentais para o desenvolvimento comportamental normal (AIRHART et al., 2007).

Sendo a fluoxetina um clássico inibidor de recaptção de serotonina, sua ação resulta em neurotransmissão serotoninérgica aumentada e prolongada. Os efeitos resultantes da exposição aos inibidores da recaptção da serotonina devem ser considerados, já que a serotonina regula diversas funções de natureza crítica no organismo, e é capaz de alterar apetite, sistema imunológico e comportamento dos animais (BROOKS et al., 2003; KOHLERT et al., 2012, AIRHART et al. 2007). Larvas de zebrafish em 72 hpf quando expostas a fluoxetina, apresentam alterações na transcrição de diversos genes que por sua vez regulam vários processos biológicos (PARK et al., 2012).

Peixes da espécie *Oryzias latipes* quando expostos a concentração de 0.1 a 5.0µg/L de fluoxetina, não demonstraram alterações sobre fecundidade e eclosão em nenhum tratamento, porém, algumas anormalidades foram observadas como edema, curvatura espinhal, desenvolvimento incompleto e não responsividade a estímulos (BROOKS et al., 2003). Estes dados são semelhantes aos encontrados em nosso experimento, visto que a fluoxetina demonstrou ser capaz de diminuir a frequência cardíaca e comprimento total das larvas na maior concentração utilizada (99µg/L).

Outros efeitos relacionados ao comportamento de espécies aquáticas expostas á fluoxetina foram constatados (AIRHART et al., 2007; KOHLERT et al., 2012; BROOKS et al., 2003). Dados referentes a interferência sobre

eixos neuroendócrinos, como o eixo hipotálamo-hipofise-adrenal (ABREU et al. 2014) e hipotálamo-hipofise-gonadal (BROOKS et al., 2003) já foram relatados.

De maneira geral, mesmo em concentrações baixas, as drogas exerceram efeitos sobre os embriões e larvas de zebrafish. Os resultados demonstram um efeito hormético em alguns parâmetros e fármacos testados, os quais as concentrações utilizadas no experimento não tem efeito dose-dependentes. A hormese é um conceito toxicológico referente a agentes que podem provocar efeitos em baixas concentrações, porém esses efeitos não são mais percebidos ou são inibidos em concentrações mais altas (CALABRESE & BALDWIN, 2001).

O teste de toxicidade aguda realizado com embriões e larvas de zebrafish, é uma alternativa promissora para avaliação de impactos ambientais (LAMMER et al, 2009). As vantagens dos testes em embriões de peixes são evidentes, incluindo a necessidade de pequenas quantidades das substâncias, menor período de exposição, e a necessidade apenas de reprodutores em fase adulta para a produção dos ovos para os testes (LAMMER et al., 2009; ALI et al., 2014). No caso do zebrafish, as fêmeas da espécie podem produzir centenas de ovos por semana, que possuem rápida embriogênese (6 dias), ciclo curto entre gerações (2 a 3 meses), embriões transparentes e o baixo custo de produção (LEE et al., 2011; TRUONG et. al., 2011). Além disso, os embriões e larvas podem ser examinados em placas de poços múltiplos que nos permite avaliar uma série de alterações tanto morfológicas quanto comportamentais mesmo em fases precoces de desenvolvimento (RICHENDRFER et al., 2012). Seu desenvolvimento externo e transparente permite a avaliação não invasiva durante toda a duração da exposição utilizando microscópio simples (TROUNG et al., 2011).

Quanto ao modelo animal, algumas desvantagens devem ser levadas em consideração quando utilizamos embriões e larvas de zebrafish para avaliações toxicológicas. Ao compará-los aos seres humanos e mamíferos por exemplo, devem ser consideradas diferenças importantes. Os peixes são animais ectodérmicos, e apresentam a falta de septo cardíaco, ausência de articulações sinoviais, pulmões e outras estruturas em comparação aos mamíferos. Outra desvantagem na utilização de embriões é sua permanência no interior do córion (membrana extraembrionária que o recobre até 48hpf). O córion pode representar uma barreira a qual dificulta a difusão do composto testado sob o embrião (ALI et al., 2014).

Avaliações de exposições tóxicas em animais nas primeiras horas de desenvolvimento são muito importantes, uma vez que representam uma das principais fases críticas de desenvolvimento (WEIS, 2014). Segundo Ali et. al. (2014) a fase de gástrula (entre 5 a 10hpf) é uma das mais críticas etapas do desenvolvimento embrionário, e alterações nesta fase podem alterar diretamente o desenvolvimento do organismo animal avaliado. A exposição de até no máximo 120hpf é a duração ideal para um teste de toxicidade para o desenvolvimento, principalmente devido a capacidade do modelo de obter seus nutrientes a partir do seu saco vitelínico, até cinco dias, não necessitando da introdução de novos fatores, como alimentação (TROUNG et. al., 2011; AIRHART et al., 2007).

Levando em consideração a delicada fase do desenvolvimento e sua característica altamente coordenada, requerendo comunicações específicas célula a célula, a exposição a uma substância que perturbe essa interação, pode ocasionar alterações importantes, ou ainda, muitas vezes, interromper totalmente o desenvolvimento. As alterações podem ser malformações morfológicas, alterações comportamentais ou morte dos embriões (TROUNG et. al., 2011).

Mesmo sem os mecanismos pelos quais cada fármaco exerceu seus efeitos sobre os embriões e larvas de zebrafish, como demonstrado na figura 15, os três fármacos avaliados têm potencial de impacto direto sobre o nível populacional da espécie. Alterações relacionadas a taxa de eclosão podem diminuir a viabilidade embrionária, aumentar a mortalidade e conseqüentemente diminuir o número de larvas. Os parâmetros tamanho das larvas e frequência cardíaca também podem estar relacionados ao aumento de deformidades e diminuição da atividade e resposta a estímulos externos, aumentando o risco de predação ou incapacitando o indivíduo a busca por ambiente favorável ou alimentação e também impactando diretamente o número de indivíduos que podem chegar a fase de vida adulta (WEIS, 2014).

Os impactos provocados pela exposição da população aquática a psicofármacos e o mecanismo de ação para o surgimento dos efeitos encontrados neste experimento ainda não estão esclarecidos. Porém, sabe-se que a presença de fármacos na água pode provocar mudanças drásticas de desenvolvimento morfológico, neuroendócrino, ou ainda comportamental (WEIS, 2014; TROUNG et al., 2011, ABREU e al., 2014). Essas modificações podem provocar alterações em nível de população, levando a conseqüências ainda desconhecidas ou pouco

compreendidas pela comunidade científica. Isso reforça a necessidade de estudos sobre possíveis impactos de poluentes ambientais no ambiente aquático, para que possam ser previstos ou evitados.



Figura 15 – A exposição aos psicofármacos pode provocar mudanças na manutenção de determinada espécie em seu ambiente natural. Os parâmetros avaliados pelo estudo estão direta ou indiretamente ligados aos efeitos em nível de população.

## 6. CONCLUSÃO

A presença de risperidona, diazepam e fluoxetina em algumas concentrações, afetam o desenvolvimento inicial do zebrafish. A risperidona foi a droga com o maior efeito, provocando alterações nos quatro parâmetros de desenvolvimento avaliados.

1) A risperidona na concentração de 0,33 µg/L provocou alterações nos parâmetros sobrevivência, eclosão e frequência cardíaca e na concentração de 0,033 µg/L efetuou diminuição do comprimento total.

2) A fluoxetina não afetou a viabilidade dos embriões, porém na concentração de 0,99 µg/L provocou aceleração na eclosão e na concentração 99 µg/L diminui a frequência cardíaca média e comprimento total das larvas

3) O diazepam diminuiu a sobrevivência na concentração de 0,008 µg/L, aumentou comprimento total nas concentrações de 0,008, 0,08 e 88 µg/L e diminui frequência cardíaca nas concentrações 0,008, 0,08, 0,8, 8,8 µg/L.

4) A utilização de embriões e larvas de zebrafish como análise de risco toxicológico é uma alternativa válida e aplicável em nosso laboratório e poderá ser utilizada para diferentes análises e testes de toxicidade, sendo amplamente aceita na comunidade científica.

## 7. REFERÊNCIAS

ABREU, M. S.; KOAKOSKI, G.; FERREIRA, D.; OLIVEIRA, T. A.; ROSA, J. G.; GUSSO, D.; GIACOMINI, A. C.; PIATO, A. L.; BARCELLOS, L. J. Diazepam and fluoxetine decrease the stress response in zebrafish **PlosOne** v. 9, i. 7, 2014.

AIRHART, M. J.; LEE, D. H.; WILSON, T. D.; MILLER, B. E.; MILLER, M. N.; SKALKO Movement disorders and neurochemical changes in zebrafish larvae after bath exposure to fluoxetine (PROZAC) **Neurotoxicology and Teratology** v. 29, p. 652-664, 2007.

AKANDE, M. G.; ORN, S.; NORRGREN, L. Evaluation of the toxic effects of clozapine in zebra fish (danio rerio) embryos with the fish embryo toxicity test **International Journal on Pharmaceutical and Biomedical Research** V. 1, p. 90-94, 2010.

ALI, S.; AALDERS, J.; RICHARDSON, M. K. Teratological effects of a panel of sixty water-soluble toxicants on zebrafish development **Zebrafish** v. 11, n. 2, p.129 – 141, 2014.

AZMITIA, E. C. Modern views on an ancient chemical: Serotonin effects on cell proliferation, maturation and apoptosis **Brain Research Bulletin** V. 56, n. 05, p. 413-424, 2001.

BOROVA, V. L.; MARAGOU, N. C.; GAGO-FERRERO, P.; PISTOS, C.; THOMAIDIS, N. S. Highly sensitive determination of 68 psychoactive pharmaceuticals, illicit drugs, and related human metabolites in wastewater by liquid chromatography – tandem mass spectrometry **Analytical and bioanalytical chemistry** v. 406, p. 4273-4285, 2014.

BOYD, G. R.; REEMTSMA, H.; GRIMM, D. A.; MITRA, S. Pharmaceuticals and personal care products (PPCPs) in surface and treated water of Louisiana, USA and Ontario, Canada **The Science of the Total Environment** v. 311, p. 135-149, 2003.

BROOKS, B. W.; FORAN, C. M.; RICHARDS, S. M.; WESTON, J.; TURNER, P. K.; STANLEY, J. K.; SOLOMON, K. R.; SLATTERY, M.; LA POINT, T. W. Aquatic ecotoxicology of fluoxetine **Toxicology Letters** v. 142, p.169-183, 2003.

BRUNTON L. L.; CHABNER, B. A.; KNOLLMAN, B. C. As bases farmacológicas da terapêutica de Goodman & Gilman **AMGH Editora** 12 ed. Porto Alegre, 2012.

CALABRESE, E. J; BALDWIN, L. A. The frequency of u-shaped dose responses in the toxicological literature **Toxicological Sciences** v. 62, p. 330-338, 2001.

CALISTO, V.; ESTEVES, V. Psychiatric pharmaceuticals in the environment **Chemosphere** v.77, p. 1257-1277, 2009.

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

DEMICCO, A.; COOPER, K. R.; RICHARDSON, J. R.; WHITE, L. A. Developmental neurotoxicity of pyrethroid insecticides in zebrafish embryos **Toxicological Science** v. 113, p.177-186, 2010.

GALUS, M.; JEYARANJAAN, J.; SMITH, E.; LI, H.; METCALFE, C.; WILSON, J. Y. Chronic effects of exposure to a pharmaceutical mixture and municipal wastewater in zebrafish **Aquatic Toxicology** v. 132-133, p. 212-222, 2013.

GUNEY, O.; SELÇUKI, M.; UNLU, A.; BAGDATOGLU, C. The effect of diazepam on the development of neural tube defects in early chick embryos **Turkish Neurosurgery** v. 9, p. 44-47, 1999.

IRONS, T. D.; MACPHAIL, R. C.; HUNTER, D. L.; PADILLA, S. Acute neuroactive drug exposures alter locomotor activity in larval zebrafish **Neurotoxicology and Teratology** v. 32, p. 84-90, 2010.

KAIS, B.; SCHNEIDER, K. E.; KEITER, S.; HENN, K.; ACKERMANN, C.; BRAUNBECK, T. DMSO modifies the permeability of the zebrafish (*Danio rerio*) chorion-Implications for the fish embryo test (FET) **Aquatic Toxicology** v. 140-141, p. 229-238, 2013.

KIMMEL, C. B.; BALLARD, W. W.; KIMMEL, S. R.; ULLMANN, B.; SCHILLING, T. F. Stages of embryonic development of the zebrafish **Developmental Dynamics** p. 253-310, 1995.

KOHLERT, J. G.; MANGAN, B. P.; KODRA, C.; DRAKO, L.; LONG, E.; SIMPSON, H. Decreased aggressive and locomotor behaviors in *Betta Splendens* after exposure to fluoxetine **Psychological Reports** v. 110, p. 51-62, 2012.

KOLPIN, D. W.; FURLONG, E. T.; MEYER, M. T.; THURMAN, E. M.; ZAUGG, S. D.; BARBER, L. B.; BUXTON, H. T. Pharmaceuticals, hormones and other organic wastewater contaminants in U.S. streams, 1999-2000: A national reconnaissance **Environment Science & Technology**. v. 36, p. 1202-1211, 2002.

KOSJEK, T.; PERKO, S.; ZUPANC, M.; ZANOSKI HREN, M.; DRAGICEVIC, T. L.; ZIGON, D.; KOMPARE, B.; HEATH, E. Environmental occurrence, fate and transformation of benzodiazepines in water treatment **Water Research** v. 46, p. 355-368, 2012.

LAMMER, E.; CARR, G. J.; WENDLER, K.; RAWLINGS, J. M.; BELANGER, S. E.; BRAUNBECK, TH. Is the fish embryo toxicity test (FET) with the zebrafish (*Danio rerio*) a potential alternative for the fish acute toxicity test? **Comparative Biochemistry and Physiology Part C** v.149, p. 196-209, 2009.

LEE, S. H.; KIM, H. R.; HAN, R. X.; OQANI, R. K.; JIN, D. I. Cardiovascular risk assessment of atypical antipsychotic drugs in a zebrafish model **Journal of Applied Toxicology** v.33, p.466-470, 2013.

LISTER, A.; REGAN, C.; ZWOL, J. V.; KRAAK, G. V. D. Inhibition of egg production in zebrafish by fluoxetine and municipal effluents: A mechanistic evaluation **Aquatic Toxicology** v. 95, p. 320-329, 2009.

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

OGGIER, D. M.; WEISBROD, C. J.; STOLLER, A. M.; ZENKER, A. K.; FENT, K. Effects of diazepam on gene expression. And link to physiological effects in different life stages in zebrafish *danio rerio* **Environment Science & Technology** v.44, p. 7685 – 7691, 2010.

PARK, J. W.; HEAH, T. P.; GOUFFON, J. S.; HENRY, T. B.; SAYLER, G. S. Global gene expression in larval zebrafish (*Danio rerio*) exposed to selective serotonin reuptake inhibitors (fluoxetine and sertraline) reveals unique expression. Profiles and potential biomarkers of exposure **Environmental Pollution** v. 167, p. 163-170, 2012.

PRIETO, M. J.; ZABALA, N. E. R.; MAROTTA, C. H.; GUTIERREZ, H. C.; ARÉVALO. R. A.; CHIARAMONI, N. S.; ALONSO, S. V. Optimization and *in vivo* toxicity evaluation of G4.5 pamam dendrimer-risperidone complexes **Plos One** 9(2)e90393. doi:10.1371/journal.pone.0090393, 2014.

RICHENDRFER, H.; PELKOWSKI, S. D.; COLWILL, R. M.; CRETON, R. On the edge: Pharmacological evidence for anxiety-related behavior in zebrafish larvae **Behavioural Brain Research** v. 228, p. 99-106, 2012.

SCHOOTS, A. F. M.; MEIJER, R. C.; DENUCÉ, J. M. Dopaminergic regulation of hatching in fish embryos **Developmental biology** V. 100, p. 59-63, 1983.

STEENBERGEN, P. J.; RICHARDSON, M. K.; CHAMPAGNE, D. L. Patterns of avoidance behaviours in the light/dark preference test in Young juvenile zebrafish: A pharmacological study **Behavioural Brain Research** v. 222, p. 15-25, 2011.

TERNES, T.; BONERZ, M.; SCHMIDT, T. Determination of neutral pharmaceuticals in wastewater and rivers by liquid chromatography – electrospray tandem mass spectrometry **Journal of Chromatography A** v. 938, p. 175-185, 2001.

TRUONG, L., HARPER, S. L., TANGUAY, R. L. Evaluation of embryotoxicity using the zebrafish model **Methods in Molecular Biology** v. 691, p. 271-279, 2011.

VAN DER VER, K; VAN DOGEN, W.; MAES, B. U. W.; ESMANS, E. L.; BLUST, R.; COEN, W. M. D. Determination of diazepam in aquatic samples by capillary liquid chromatography – electrospray tandem mass spectrometry *Chemosphere* v. 57, p. 967-973, 2004.

WEIS, J S.; SMITH, G.; ZHOU, T. ; SANTIAGO-BASS, C.; WEIS, A. P. Effects of contaminants on behavior: biochemical mechanisms and ecological consequences **Bioscience** v. 51, p. 209-217, 2001.

WEIS, J. S. Delayed behavioral effects of early life toxicant exposures in aquatic biota **Toxics** v. 2, p. 165-187, 2014.

WIXON, J. *Danio rerio*, the zebrafish **Featured Organism** v. 17, p. 225-231, 2000.

## 8. ANEXOS



UNIVERSIDADE DE PASSO FUNDO  
VICE-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO  
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS - CEUA

### PARECER Nº 007/2013

A Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade de Passo Fundo, em reunião no dia 28/06/13, analisou o projeto de pesquisa “**Efeito de ansiolíticos sobre a relação presa-predador em peixes zebra (*Daniorerio*)**”, registro na CEUA Nº 006/2012, de responsabilidade do pesquisador **Leonardo José Gil Barcellos**.

Em relação aos aspectos éticos, a Comissão considerou o projeto relevante e com relação custo-benefício adequada. O pesquisador e seus colaboradores estão comprometidos com a observância dos procedimentos para o uso científico de animais estabelecidos na Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008.

**Diante do exposto, a Comissão, de acordo com suas atribuições definidas na Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, manifesta-se pela aprovação do projeto de pesquisa na forma como foi proposto.**

O pesquisador deverá apresentar relatório à CEUA ao final do estudo.

**Situação: PROTOCOLO APROVADO**

Passo Fundo, 01 de julho de 2013.

Prof. Ana Cristina Vendrametto V. Giacomini  
Coordenadora – CEUA – UPF