

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA
CENTRO DE CIÊNCIAS NATURAIS E EXATAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS:
BIOQUÍMICA TOXICOLÓGICA**

Ingrid Kich da Silva

**ESTUDO DA TOXICIDADE DO CLIOQUINOL SOBRE O
DESENVOLVIMENTO EMBRIONÁRIO DO PEIXE-ZEBRA.**

Santa Maria, RS
2019

Ingrid Kich da Silva

**ESTUDO DA TOXICIDADE DO CLIOQUINOL SOBRE O DESENVOLVIMENTO
EMBRIONÁRIO DO PEIXE-ZEBRA.**

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica Toxicológica da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para a obtenção do título de **Mestre em Ciências Biológicas: Bioquímica Toxicológica.**

Orientador: Professor Dr. Jeferson Luis Franco

Santa Maria, RS
2019

da Silva, Ingrid Kich
ESTUDO DA TOXICIDADE DO CLIOQUINOL SOBRE O
DESENVOLVIMENTO EMBRIONÁRIO DO PEIXE-ZEBRA. / Ingrid
Kich da Silva.- 2019.
43 p.; 30 cm

Orientador: Jeferson Luis Franco
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa
Maria, Centro de Ciências Naturais e Exatas, Programa de
Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica
Toxicológica, RS, 2019

1. Clioquinol 2. Peixe-zebra 3. Toxicidade 4.
Desenvolvimento embrionário I. Luis Franco, Jeferson II.
Título.

sistema de geração automática de ficha catalográfica da uesm. dados fornecidos pelo autor(s). sob supervisão da direção da divisão de processos técnicos da biblioteca central. bibliotecária responsável paula schoenfeldt ratta cxa 10/1726.

Ingrid Kich da Silva

**ESTUDO DA TOXICIDADE DO CLIOQUINOL SOBRE O
DESENVOLVIMENTO EMBRIONÁRIO DO PEIXE-ZEBRA.**

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica Toxicológica da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para a obtenção do título de **Mestre em Ciências Biológicas: Bioquímica Toxicológica.**

Aprovado em 30 de agosto de 2019:



Jeferson Luis Franco, Dr. (UFSM)

Presidente/Orientador



Denis Broock Rosemberg, Dr. (UFSM)



Rafael Trevisan, Dr. (Duke University)

Santa Maria, RS

2019

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho a aqueles que sempre me apoiaram e incentivaram a nunca desistir, sempre me estimulando a dar o melhor de mim em tudo, meu namorado André, minha mãe Jaqueline Kich e minha avó Ely Maria Kich. A vitória deste trabalho eu dedico a vocês com todo o meu amor.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, gostaria de agradecer ao meu orientador, professor Dr. Jeferson, pela oportunidade e por toda paciência, compreensão, ensinamentos e confiança. Obrigada por todas as vezes que esteve disposto a discutir o trabalho comigo e me ajudar com as minhas dúvidas e indagações. Os seus conselhos, orientação científica e incentivo foram fundamentais para que este trabalho fosse concluído.

Gostaria de agradecer aos meus colegas de trabalho do GPOSCEL que me acolheram e me ajudaram para que eu me ambientasse em São Gabriel e também me ensinaram quase tudo o que eu sei sobre o organismo modelo *Zebrafish*.

Agradeço a minha migs revolts Andrezza Bond que sempre fez de tudo para encurtar a distância Santa Maria x São Gabriel, por se matricular nas mesmas disciplinas para sermos coleguinhas, por sempre cuidar e se preocupar comigo, pela força e pelo apoio em tudo durante esses dois anos de mestrado.

Este parágrafo eu gostaria de oferecer ao meu namorado André. Não sei se consigo descrever em algumas palavras a importância do teu apoio, compreensão e cuidado durante esses dois anos. Você foi quem nunca me deixou desistir, sempre esteve ao meu lado, sempre torcendo e comemorando cada vitória, cada experimento que deu certo, aguentou meus lamentos quando deu errado, me ajudou a controlar minhas crises de ansiedade, ficou do meu lado nas madrugadas dos finais de semana que eu precisei ficar estudando, me assistiu ensaiar as apresentações, enfim. Obrigada por tudo o que fez e faz sempre por mim, por todos os cuidados e por nunca me deixar desistir.

Gostaria de agradecer a minha família, em especial minha mãe Jaqueline, minha avó Ely, minha tia Juliana e minha prima Karen que também foram muito importantes durante esse processo, que sempre acreditaram e torceram por mim para que tudo desse certo e chegássemos aqui hoje.

Por fim, agradeço ao CNPq pelo apoio financeira e á UFSM por toda educação técnico-científica e por todo conhecimento adquirido durante esses anos.

*“Direi ao senhor: Ele é o meu Deus,
o meu refúgio, a minha fortaleza e nele confiarei.”*

Salmos 91:2

RESUMO
ESTUDO DA TOXICIDADE DO CLIOQUINOL SOBRE O DESENVOLVIMENTO
EMBRIONÁRIO DO PEIXE-ZEBRA.

AUTORA: Ingrid Kich da Silva

ORIENTADOR: Prof. Dr. Jeferson Luis Franco

O Clioquinol (CQ) pertence à classe dos agentes anti-infecciosos e antimicrobianos. Nos anos 70, o CQ foi retirado do mercado devido a relatos de neurotoxicidade em pacientes no Japão, e por estar associado à manifestação de uma síndrome neurodegenerativa (SMON). Apesar da exclusão do fármaco para tratamentos via oral, as formulações tópicas para tratamento de infecções fúngicas e parasitárias continuaram disponíveis. Atualmente, o CQ está disponível como antibiótico tópico sob o nome comercial Vioformio®. Dada a potencial reintrodução de formulações orais do CQ para novas indicações, uma melhor compreensão de sua toxicidade se faz necessária. Este estudo pretende aprofundar o conhecimento sobre a potencial toxicidade induzida pelo CQ avaliando seus efeitos sobre o desenvolvimento embrionário do peixe-zebra (*Danio rerio*). Os embriões foram expostos às concentrações de 0,5, 1,0, 1,5 e 2,0 µg/ml do CQ, durante 168 horas, avaliando-se ao final dos tratamentos parâmetros fisiológicos, morfológicos e comportamentais. Verificou-se que o CQ exibe um amplo espectro de toxicidade e que provoca 100% de mortalidade já nas primeiras 48 horas nas concentrações de 1,5 e 2,0 µg/ml. Além disso, observamos um atraso na taxa de eclosão avaliada após 72 horas da exposição à concentração de 1 µg/ml, além disso, nas concentrações de 0,5 e 1,0 µg/ml foram observados quatro principais tipos de anormalidades morfológicas. O comportamento exploratório das larvas também foi examinado em 7 dpf para determinar se a exposição ao CQ poderia alterar a locomoção e orientação das larvas. Os ensaios de comportamento foram avaliados somente na concentração de 0,1 µg/ml, na qual as alterações morfológicas não foram severas em relação às demais concentrações testadas. A exposição ao CQ nesta concentração foi capaz de alterar o padrão de natação das larvas, e com isso sugerimos que alterações locomotoras apresentadas pelas larvas podem estar associadas a danos causados pelo CQ durante o desenvolvimento embrio-larval. Em suma, este estudo demonstra de forma inédita a potencial embriotoxicidade induzida pelo CQ em peixe-zebra.

Palavras-chave: Antimicrobiano; Zebrafish; Embriologia; Efeito tóxico;

ABSTRACT
STUDY OF CLIOQUINOL TOXICITY ON EMBRYONIC DEVELOPMENT OF
ZEBRAFISH.

AUTHOR: Ingrid Kich da Silva

ADVISOR: Prof. Dr. Jeferson Luis Franco

Clioquinol (CQ) belongs to the class of anti-infective and antimicrobial agents. In the 1970s, CQ was withdrawn from the market due to reports of neurotoxicity in patients in Japan, and being associated with the manifestation of a neurodegenerative syndrome (SMON). Despite the exclusion of the drug for oral treatments, topical formulations for treating fungal and parasitic infections remained available. CQ is currently available as a topical antibiotic under the tradename Vioformi®. Given the potential reintroduction of oral QC formulations for novel indications, a better understanding of its toxicity is needed. This study intends to enhance our knowledge about the potential toxicity caused by CQ evaluating its effects on the embryonic development of zebrafish (*Danio rerio*). The embryos were exposed the concentrations of 0.1, 0.5, 1.0, 1.5 and 2.0 µg/ml of the CQ for 168 hours, evaluating the physiological, morphological and behavioral parameters. It was found that CQ exhibits a wide spectrum of toxicity and causes 100% mortality in the first 48 hours at concentrations of 1.5 and 2.0 µg/ml therefore; these concentrations were excluded from further evaluations. We observed a delay in hatching rate evaluated after 72 hours of exposure to 1 µg/ml; in addition, at the concentrations of 0.5 and 1.0 µg/ml, four main types of morphological abnormalities were observed. The exploratory behavior of the larvae was also examined in 7 dpf (days after fertilization) to determine if the exposure to CQ could alter the locomotion and orientation of the larvae. The behavior was evaluated only at the lowest CQ concentration tested in which the morphological alterations were not severe. Exposure of larva to CQ 0.1 µg/ml resulted in altered swimming patterns and it is suggested that the observed locomotor alterations may be associated with damage caused by CQ. In summary, this study is the first to demonstrate the potential embryotoxicity induced by CQ in zebrafish.

Keywords: Antimicrobial; Zebrafish; Embryology; Embryotoxicity;

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Estrutura química do Clioquinol;.....	14
Figura 2: Estágios de desenvolvimento embrio-larval de peixe-zebra.....	17
Figura 3: Peixe-Zebra adulto	18
Figura 4: Ciclo de desenvolvimento do peixe-zebra	19
Figura 5: Esquema de procedimento de exposição dos embriões	21

LISTA DE ABREVIATURAS

CQ – Clioquinol;

Dpf – Dias pós-fertilização;

FET- Teste em embriões de peixes (Do inglês *Fish Embryo Test*);

Hpf – Horas pós-fertilização;

OECD- Organização para a Cooperação e Desenvolvimento Económico;

SMON - Neuropatia mielo-óptica subaguda; (Do inglês *Subacute Myelo-Optic Neuropathy*);

SUMÁRIO

1	APRESENTAÇÃO	13
2	INTRODUÇÃO	14
2.1	CLIOQUINOL E SEUS EFEITOS BIOLÓGICOS CONHECIDOS.....	14
2.2	PEIXE-ZEBRA COMO ORGANISMO MODELO	15
2.3	TESTE DE TOXICIDADE AGUDA EM EMBRIÕES DE PEIXES (FET) COMO POTENCIAL ALTERNATIVA PARA ESTUDO DE TOXICIDADE EM PEIXE-ZEBRA.....	20
3	OBJETIVOS.....	22
3.1	OBJETIVO GERAL	22
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	22
4	MANUSCRITO 1	23
1.	Introduction	25
2.	Materials and methods.....	26
2.1	Zebrafish husbandry and egg collection	26
2.2	Treatments	27
2.3	Survival curve, hatching rate and morphology	27
2.4	Behavioral analyzes	28
2.5	Statistical analysis.....	28
3	Results	28
4	Discussion.....	33
5	References.....	35
5	CONCLUSÃO	38
6	PERSPECTIVAS	39
7	REFERÊNCIAS	40

1 APRESENTAÇÃO

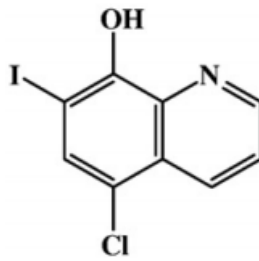
A presente dissertação está estruturada na seguinte forma: primeiramente é apresentada a **introdução** que inclui uma revisão da literatura sobre os temas abordados no estudo e seus **objetivos**. A seguir, as **metodologias**, **resultados** e a **discussão**, que contém uma análise integrada dos resultados obtidos, estão apresentados no item *manuscrito* na qual refere-se ao estudo desenvolvido que está submetido a publicação. Por fim, a **conclusão** e as **perspectivas** apresentam possibilidades de novos estudos a partir dos resultados obtidos. As **referências bibliográficas** apresentadas no final da dissertação referem-se às citações que aparecem no item introdução.

2 INTRODUÇÃO

2.1 CLIOQUINOL E SEUS EFEITOS BIOLÓGICOS CONHECIDOS

O Clioquinol (5-cloro-7-iodo-quinolin-8-ol) (CQ) (figura 1), é um derivado halogenado da 8-hidroxiquinolina de peso molecular 305,499 g/mol, que pertence à classe dos agentes quimioterápicos e à família dos compostos farmacêuticos chamados de anti-infecciosos que são agentes antimicrobianos que previnem infecções ou a sua propagação, através da eliminação ou inibição da multiplicação de um micro-organismo. (GHALKHANI et al., 2011).

Figura 1: Estrutura química do Clioquinol;



Fonte: <https://www.sigmaaldrich.com/>

O CQ foi inicialmente produzido como antisséptico em meados de 1934, comercializado como antibiótico para tratamento de doenças intestinais como diarreia crônica inespecífica, diarreia do viajante, entre outras (FLEESON et al., 2017). Nos anos 1950-1970, foi utilizado como um agente anti-parasitário oral para o tratamento e prevenção da amebíase intestinal, mas seu mecanismo de ação como antimicrobiano era desconhecido (GHALKHANI et al., 2011; YASSIN et al., 2000). Nos anos 70, formulações orais do CQ foram retiradas do mercado devido a relatos de neurotoxicidade em pacientes japoneses e por existir uma relação entre uma síndrome neurodegenerativa, conhecida como neuropatia mielo-óptica subaguda (SMON), e a administração do CQ (MAO; SCHIMMER, 2008; YASSIN et al., 2000). No entanto, as formulações tópicas para tratamento de infecções fúngicas e parasitárias continuaram disponíveis.

Sabe-se que esta síndrome, SMON, envolve o início subagudo de distúrbios motores e sensoriais de membros inferiores e deficiência visual, mas ainda existem muitas controvérsias quanto a sua associação ao uso do CQ (OLIVERI; VECCHIO, 2016). Estudos da análise epidemiológica contrariaram os dados que relacionavam a SMON e o uso oral do CQ ou a

uma fórmula diferente do medicamento usado no Japão uma vez que, nos outros países a taxa de incidência da doença era quase nula, e associaram o aparecimento da síndrome a uma deficiência de vitamina B12 (MAO; SCHIMMER, 2008; MEADE, 1975; NAKAE, 1973). Outro estudo demonstra que o tratamento crônico com o CQ poderia alterar a homeostase tecidual de vitamina B12 no cérebro de camundongos tratados com o CQ (YASSIN et al., 2000). Além de seu uso como antimicrobiano, formulações orais do CQ e alguns análogos, tem mostrado potencial efeito para o tratamento de patologias não infecciosas como, por exemplo, a doença de Alzheimer (HUNG; BARNHAM, 2012), e doença de Parkinson (FINKELSTEIN et al., 2016; LEI et al., 2015).

Apesar da eficácia demonstrada no tratamento das doenças de Alzheimer e Parkinson, os mecanismos envolvidos nos possíveis efeitos neuroprotetores de formulações orais do CQ permanecem ainda pouco claros. Uma vez que pesquisas terapêuticas com formulações orais têm sido bastante exploradas, o seu uso sistêmico recebeu nova atenção. Atualmente, o CQ está disponível como antibiótico tópico sob o nome comercial Vioformio® (WEHBE et al., 2017). O Viofórmio tem como substâncias ativas o clioquinol e a hidrocortisona, e cada grama de creme contém 30 mg de CQ e 10 mg de hidrocortisona. Sua administração ocorre através da pele, após aplicação tópica, e sua eliminação ocorre pela via urinária.

Dado o potencial de reintrodução de formulações orais para novas indicações, precisamos de uma maior compreensão de sua toxicidade, bem como avaliações biológicas e toxicológicas do CQ. Além disso, embora sua atividade antifúngica já seja bastante conhecida, ainda não existem estudos consistentes sobre o modo de ação e o grau de toxicidade deste fármaco.

2.2 PEIXE-ZEBRA COMO ORGANISMO MODELO

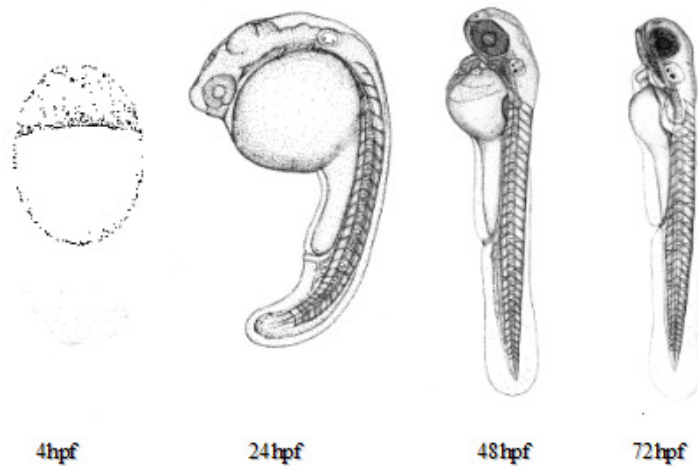
O peixe-zebra, *Danio rerio* (Teleostei, Cyprinidae) é uma espécie de peixe teleósteo (3-4cm) de água doce, nativo do sul e sudeste asiático, originário das partes baixas dos principais rios da Índia, Bangladesh e Nepal, regiões que apresentam clima tropical. É conhecido popularmente no mundo como zebrafish, e no Brasil como paulistinha. Foi introduzido nas pesquisas científicas como modelo animal por George Streisinger em 1981 (DAMMSKI et al., 2011; GRUNWALD, 2002).

O peixe-zebra surgiu como organismo modelo para estudos de descoberta de novas drogas e biossegurança e porque desenvolvem a maioria dos órgãos encontrados em mamíferos, incluindo os dos sistemas nervoso, digestivo, reprodutivo, imunológico, excretor e cardiovascular (BAMBINO; CHU, 2017). A combinação entre seus mais variados aspectos

biológicos faz deste um dos mais importantes modelos de organismos vertebrados para pesquisas biológicas. Caracteriza-se por ser um modelo animal que vem se destacando no ponto de vista científico em todas as suas fases de desenvolvimento, tanto usado para pesquisas sobre o potencial farmacológico de novas drogas, como na toxicologia de contaminantes ambientais, embriologia, biologia do comportamento, entre várias outras (COSTA-SILVA et al., 2018; CRETON, 2011; DAMMSKI et al., 2011; LI et al., 2018).

O peixe-zebra, assim como outros peixes, passa pelos estágios larval, juvenil e adulto, se desenvolve rapidamente a partir de um zigoto de uma célula que fica no topo de uma grande célula de vitelo. A figura 2 demonstra os diferentes estágios de desenvolvimento do peixe-zebra, o ovo recém-fertilizado, as 4 hpf, através da conclusão do primeiro ciclo zigótico. Aproximadamente as 6 hpf inicia o processo de formação da gástrula e neste período ocorre a diferenciação celular do tecido que é responsável pela origem do sistema nervoso, movendo-se para as mais distintas regiões do embrião, e ainda acontecem os movimentos morfogenéticos de involução, convergência e extensão, até o final da epibolia. Ao final deste período, aproximadamente as 10 hpf ocorre a formação do tubo neural e subdivisão do mesmo em regiões que darão origem as divisões cerebrais. O período de farínghula ocorre entre 24 e 48 hpf, nesta fase é possível observar os primeiros movimentos espontâneos que ocorrem ainda dentro do córion (membrana que reveste o embrião), o eixo do corpo se endireita a partir de sua curvatura inicial sobre o saco vitelínico. Os precursores de todos os principais órgãos do peixe-zebra aparecem dentro de 36 horas após a fecundação. A eclosão dos embriões, por sua vez, acontece entre 48 e 72 hpf, neste período acontece a conclusão da morfogênese e o início do desenvolvimento de cartilagem na cabeça, a eclosão ocorre de forma assíncrona. Aproximadamente as 72 hpf as larvas começam a nadar, a bexiga natatória infla gradualmente e iniciam os comportamentos de procura de alimentos e evasão ativa (KIMMEL C., BALLARD W., KIMMEL S., ULLMAN B., 1995).

Figura 2: Estágios de desenvolvimento embrio-larval de peixe-zebra.



Fonte: Adaptado e modificado (KIMMEL C., BALLARD W., KIMMEL S., ULLMAN B., 1995);

Durante o estágio embrio-larval, as larvas de peixe-zebra apresentam um tamanho relativamente pequeno (4-5 mm), fácil absorção de compostos adicionados diretamente à água, fácil manejo e manutenção, todos estes aspectos aperfeiçoam o uso das drogas de estudo e também possibilitam uma menor produção de resíduos (GOLDSMITH, 2004; D’COSTA; SHEPHERD, 2009). Vertebrados inferiores, como embriões, larvas e adultos (figura 3) de *Danio rerio* (*zebrafish*) têm sido bastante utilizados como modelo de toxicidade e teratogênese. O desenvolvimento do *zebrafish* é rápido, uma vez que a maioria dos órgãos é formada durante o desenvolvimento precoce do embrião (RACZ et al., 2017). Essa é uma vantagem interessante, porque os embriões de *zebrafish* até 5 dias pós- fertilização não são considerados animais e, portanto, experimentos realizados durante esta etapa de desenvolvimento não requerem regulamentos éticos (RACZ et al., 2017; SCORZONI et al., 2017).

Figura 3: Peixe-Zebra adulto. As fêmeas adultas de peixe-zebra (indivíduo superior) podem ser facilmente diferenciadas dos machos (indivíduo inferior) por suas barrigas estendidas e pela falta de tonalidade avermelhada ao longo das linhas longitudinais prateadas;



Fonte:(BRAUNBECK et al., 2005);

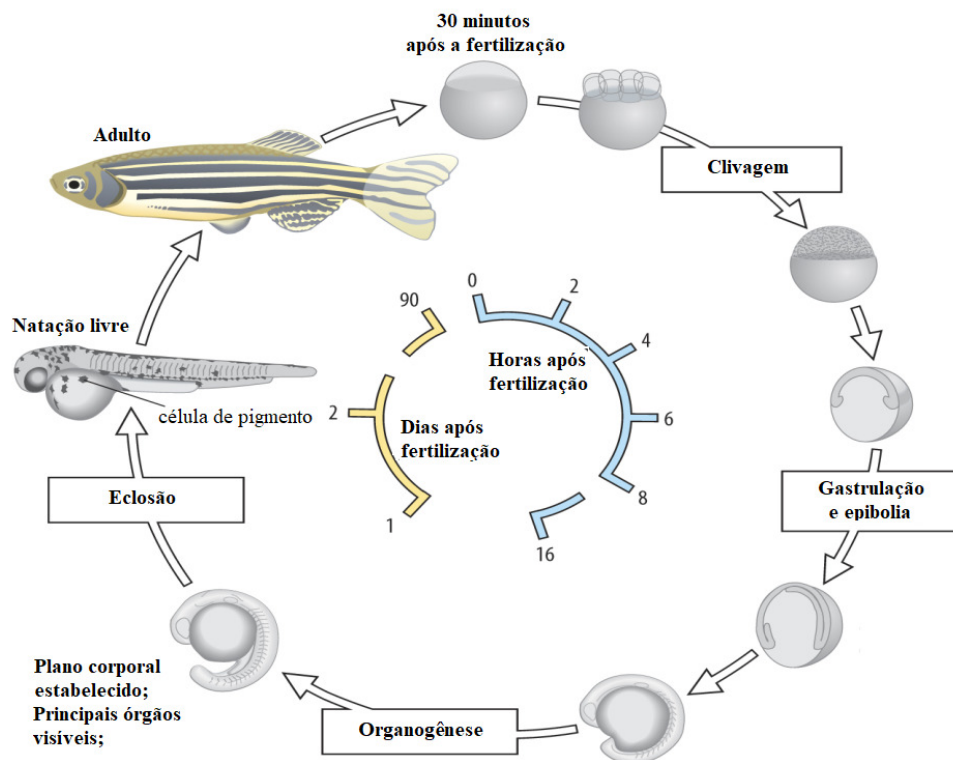
O fato dos embriões serem transparentes torna possível a visualização de diferentes estágios de desenvolvimento (figura 3), bem como a realização de “*endpoints*” morfológicos, fisiológicos e comportamentais. Sua transparência também nos permite também observar desfechos morfológicos tão rapidamente quanto as primeiras 24 hpf (COSTA-SILVA et al., 2018; KIMMEL C., BALLARD W., KIMMEL S., ULLMAN B., 1995).

O estudo do genoma do peixe-zebra foi concluído em 2013 e demonstrou que 71% dos genes que codificam proteínas no genoma humano são relacionados a genes encontrados no genoma do peixe-zebra, sendo 84% destes conhecidos por serem associados a doenças humanas (HOWE et al., 2013).

Recentemente, o peixe-zebra também surgiu como sistema modelo para estudar o comportamento. Mesmo que a maioria dos estudos esteja focada no comportamento do peixe-zebra adulto, alguns comportamentos se desenvolvem precocemente e podem ser observados durante a primeira semana de desenvolvimento (CRETON, 2011). O perfil comportamental é muito útil para modelar os efeitos sobre a atividade cerebral, e tem sido usado recentemente para identificar os supressores fenotípicos do autismo em um modelo genético de

hiperatividade do peixe-zebra (HOFFMAN et al., 2016). As larvas de peixe-zebra são ideais para análises do comportamento de vertebrados e seu comportamento pode ser monitorado em placas com múltiplos poços, e permite uma triagem sistemática dos genes, fármacos e substâncias tóxicas que possam influenciar o comportamento (CRETON, 2011). Diversos estudos têm demonstrado que o peixe zebra adulto apresenta um repertório comportamental bastante complexo, onde a exposição a agentes estressores pode evocar medo ou comportamento tipo-ansiedade facilmente quantificáveis através de exploração reduzida, aumento da escototaxia (aversão a ambientes claros), geotaxia (resposta de mergulho), tigmotaxia (preferência pela periferia do tanque), congelamento (imobilidade junto a aumento da frequência respiratória), movimentos erráticos (repentinas mudanças bruscas de velocidade e direção do nado), preferência por coespecíficos e/ou agressividade (BLASER; ROSEMBERG, 2012; KALUEFF et al., 2013; ROSEMBERG et al., 2011; EGAN, et al., 2010).

Figura 4: Ciclo de desenvolvimento do peixe-zebra. Após o acasalamento a fecundação é externa, a fêmea libera os ovos que são imediatamente fecundados pelo macho. O animal se desenvolve rapidamente a partir de um zigoto de uma célula que fica no topo de uma grande célula de vitelo. A gastrulação começa aproximadamente 6 horas após a fertilização, eclodindo aos 2 dias como uma larva de natação livre. O peixe-zebra atinge a maturidade sexual por volta dos 3 meses de idade e pode viver até 5 anos



Fonte: Adaptado e traduzido (D' COSTA; SHEPHERD, 2009);

O uso de organismos modelos tradicionais para o estudo de ação de fármacos é considerado uma estratégia bastante eficaz. No entanto, vários estudos recentes têm buscado desenvolver métodos para estudos em grande escala utilizando organismo modelo como o peixe-zebra (BRUNI; LAKHANI; KOKEL, 2014). Devido as diversas vantagens apresentadas, o desenvolvimento embrio-larval do peixe-zebra apresenta suficiente relevância.

2.3 TESTE DE TOXICIDADE AGUDA EM EMBRIÕES DE PEIXES (FET) COMO POTENCIAL ALTERNATIVA PARA ESTUDO DE TOXICIDADE EM PEIXE-ZEBRA

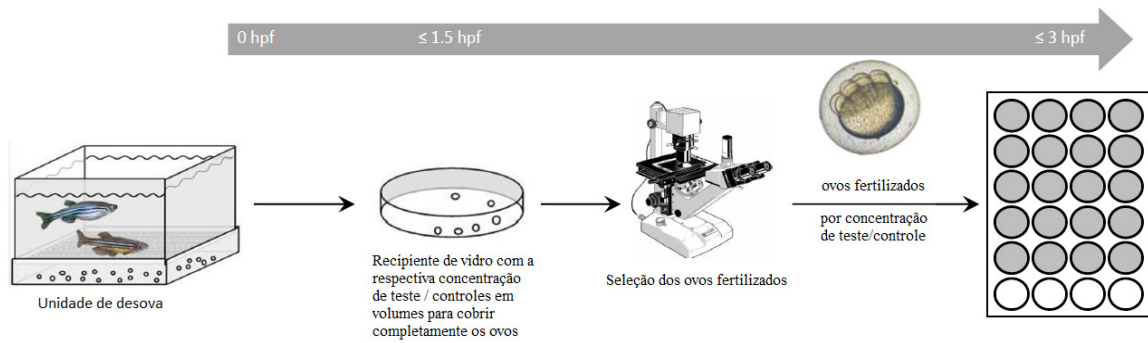
Em maio de 2013, o teste de toxicidade aguda em embriões de peixe (FET) foi aprovado pelo Grupo de Trabalho dos Coordenadores Nacionais (WNT) do Programa de Orientação de Testes da OECD e publicado como diretriz de teste da OECD 236 em julho de 2013 (OECD 2013). O teste de toxicidade aguda em embriões de peixes (*Fish Embryo Test – FET*) foi desenvolvido para determinar a toxicidade aguda de produtos e compostos químicos em estágios embrionários de peixes (OECD, 2013).

Nas estratégias convencionais que envolvem ensaio de ecotoxicidade para o ambiente aquático, os peixes são um componente indispensável (LAMMER et al., 2009). O teste de efluentes com embriões de peixe-zebra foi padronizado em nível internacional (BRAUNBECK et al., 2015), e uma versão modificada foi submetida pela Agência Federal Alemã de Meio Ambiente (UBA) como uma diretriz preliminar para uma alternativa aos testes químicos com peixes (THOMAS BRAUNBECK; EVA LAMMER, 2005). Os embriões de peixe-zebra são considerados modelos alternativos no contexto da legislação europeia (LAMMER et al., 2009; OECD, 2013). O FET tem sido um componente obrigatório na rotina de testes de efluentes na Alemanha desde 2005 e já é utilizado como padrão em nível internacional (LAMMER et al., 2009).

Atualmente, o FET é a abordagem alternativa mais promissora para o teste clássico de toxicidade aguda em peixe. O FET também representa um refinamento no sentido do princípio dos 3Rs. O esquema de procedimento de exposição dos embriões (figura 4) demonstra como é feita a exposição e seleção dos ovos de peixe-zebra recém-fertilizados que serão expostos ao produto químico ou compostos de interesse da pesquisa, por um período de 96 horas. A cada 24 horas, quatro observações são registradas como indicadores de letalidade: coagulação de ovos fertilizados, falta de formação de somitos, falta de deslocamento da cauda

e falta de batimento cardíaco. A toxicidade aguda é determinada com base em um resultado positivo em qualquer uma das quatro observações registradas.

Figura 5: Esquema de procedimento de exposição dos embriões (da esquerda para a direita): produção de ovos, recolha dos ovos, pré-exposição em recipiente de vidro, seleção de ovos fertilizados com microscópio e distribuição de ovos fertilizados em placas de 24 poços;



Fonte: Adaptado e traduzido. (OECD, 2013);

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a potencial embriotoxicidade induzida por CQ em peixe-zebra (*Danio rerio*).

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

3.2.1 Manuscrito

- Determinar as concentrações potencialmente tóxicas do CQ em peixe-zebra através de curva de sobrevivência;

- Avaliar possíveis alterações fisiológicas e morfológicas como parâmetros de toxicidade durante o desenvolvimento embrionário de peixe-zebra;

- Avaliar possíveis alterações comportamentais como marcadores de toxicidade frente à exposição de peixe-zebra ao CQ.

4 MANUSCRITO 1

Exposure of zebrafish to Clioquinol (CQ) reveals embryological and developmental toxicity

Ingrid Kich da Silva^b, Mauro Eugênio Medina Nunes^b, Saulo Fernandes de Andrade^c,
Alexandre Fuentesfria^c, Thaís Posser^a, Jeferson Luis Franco^{a,b*};

^aOxidative Stress and Cell Signaling Research Group, Interdisciplinary Center for Biotechnology Research – CIPBIOTEC, Campus São Gabriel, Universidade Federal do Pampa, São Gabriel, Brazil.

^bDepartment of Molecular Biology and Biochemistry, Graduate Program in Biological Sciences: Toxicological Biochemistry, Federal University of Santa Maria. 1000 Roraima Avenue, Santa Maria, Brazil.

^cFaculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil

*Corresponding author: **Jeferson Luis Franco, PhD**; Campus São Gabriel, Federal University of Pampa, e-mail: jefersonfranco@gmail.com; jefersonfranco@unipampa.edu.br

Abstract:

Clioquinol (CQ) belongs to the 8-hydroxyquinoline family of antimicrobial agents. In the 1970s, CQ was withdrawn from the market due to reports of neurotoxicity in humans. Despite the exclusion of the drug for oral treatments, topical formulations for treating fungal and parasitic infections remained available. Given the potential reintroduction of oral CQ formulations for novel indications, a better understanding of its toxicity is needed. This study aimed to investigate the potential toxicity caused by CQ on the embryonic development of zebrafish. The embryos were exposed to concentrations of 0.1, 0.5, 1.0, 1.5 and 2.0 µg/ml of the CQ for 168 hours, evaluating the physiological, morphological and behavioral parameters. It was found that CQ exhibits toxicity and causes 100% mortality in the first 48 hours at concentrations of 1.5 and 2.0 µg/ml. We observed a delay in hatching rate evaluated after 72 hours of exposure to 1 µg/ml; in addition, at the lower concentrations morphological abnormalities were observed. The exploratory behavior was also examined in 7 dpf (days after fertilization) to determine if the exposure to CQ could alter the locomotion and orientation of the larvae. The behavior was evaluated only at the lowest CQ concentration tested in which the morphological alterations were not severe. Exposure of larva to CQ 0.1 µg/ml resulted in altered swimming patterns and it is suggested that the observed locomotor alterations may be associated with damage caused by CQ. In summary, this study is the first to demonstrate the potential embryotoxicity induced by CQ in zebrafish.

Keywords: Antimicrobial; 8-hydroxyquinoline; Embryology; Embryotoxicity;

1. Introduction

Clioquinol (5-chloro-7-iodo-quinolin-8-ol) (CQ) is a halogenated derivative of 8-hydroxyquinoline with molecular weight 305.499 g/mol, belonging to a class of chemotherapeutic agents and to the family of pharmaceutical compounds called antimicrobial agents, that prevent infections or their spread by eliminating or inhibiting the multiplication of microorganisms (Ghalkhani *et al.* 2011). CQ was initially produced as an antiseptic in 1934, marketed as an antibiotic for the treatment of intestinal diseases such as chronic non-specific diarrhea, traveler's diarrhea, among others (Bareggi and Cornelli 2012). In the 1950s and 1970s, it was used as an oral anti-parasitic agent for the treatment and prevention of intestinal amebiasis, but its mechanism of action as an antimicrobial was unknown (Yassin *et al.* 2000, Ghalkhani *et al.* 2011). In the 1970s oral CQ was withdrawn from the market due to reports of neurotoxicity in Japanese patients and a relationship between a neurodegenerative syndrome known as subacute myelo-optic neuropathy (SMON) and the administration of CQ (Yassin *et al.* 2000, Mao and Schimmer 2008). However, topical formulations for the treatment of fungal and parasitic infections remained available.

Currently, CQ is available as a topical antibiotic under the trade name Vioform[®] (Wehbe *et al.* 2017). In addition to its antimicrobial use, CQ and some analogues have shown potential effect for the treatment of non-infectious diseases such as Alzheimer's disease (Hung and Barnham 2012), and Parkinson's disease (Lei *et al.* 2015, Finkelstein *et al.* 2016). Despite the efficacy demonstrated in the treatment of some diseases, the mechanisms involved in the neuroprotective effects of *in vivo* CQ remain unclear. Since therapeutic research with CQ has been extensively explored, its systemic use has received new attention. Given the potential for reintroduction of oral formulations to new indications, a better understanding of its toxicology, as well as biological and toxicological evaluations of CQ itself and its analogues are needed. In addition, although the antifungal activity of CQ is already known, consistent studies on the mode of action and degree of toxicity of this drug are not yet available.

Zebrafish (*Danio rerio*) have emerged as powerful models for drug discovery and biosafety studies because they develop most of the organs found in mammals, including the nervous, digestive, reproductive, immune, excretory, and cardiovascular systems (Bambino and Chu 2017). The combination of excellent embryology and the powers of genetic manipulation make this species one of the most important models of vertebrate organisms for biological research. It is characterized by being an animal model with outstanding advantages, in all its phases of development, for research on the pharmacological potential of new drugs, as

in the toxicology of environmental contaminants, embryology, behavioral biology, among others (Creton 2011, Dammski *et al.* 2011, Costa-Silva *et al.* 2018, Li *et al.* 2018). The fact that the embryos are transparent makes it possible to visualize their development, as well as the evaluation of different *endpoints* such as mortality, heart rate, somites formation, hatching rate (Kimmel C., Ballard W., Kimmel S., Ullman B. 1995, Dennis and Silva 2018).

Recently, zebrafish has also emerged as a model system for studying behavior, even though most studies are focused on the behavior of adult zebrafish, some behaviors develop early and can be observed during the first week of development (Creton 2011). The behavioral profile is very useful for modeling effects on brain activity (Hoffman *et al.* 2016), that may be influenced by exposure to drugs and toxic substances (Colwill and Creton 2011). The use of traditional models for the study of drug action is considered a very effective strategy. However, several recent studies have sought to develop methods for large-scale studies using models such as zebrafish (Bruni *et al.* 2014). Due to the several advantages presented, the aim of this study was to evaluate the effects of embryonic CQ exposure during embryo-larval zebrafish development.

2. *Materials and methods*

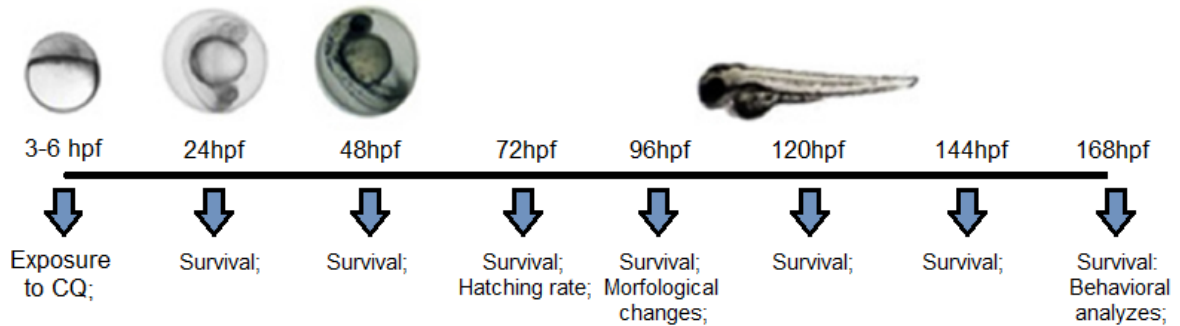
2.1 **Zebrafish husbandry and egg collection**

The zebrafish husbandry was approved and regulated by the institution's ethics committee (protocol 003-2016). Briefly, adult zebrafish, wild type, were purchased from a local supplier and maintained under suitable conditions in a Zebtec[®] recirculation system, following parameters considered essential for a good quality of life: pH 7.2 ± 0.5 , $400 \pm 50 \mu\text{S}$ conductivity, $28 \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$), photoperiod of 14 hours light and 10 hours dark, feeding with commercial flocculated feed and live food (*Artemia salina*) four times a day, according to previously established protocols (WESTERFIELD, 2000).

Male and female with a 2:1 ratio were paired overnight. In the next morning, the reproduction was induced. Prior to exposure, fertilized eggs from natural crosses were examined under a 2 hpf stereomicroscope. Embryos with normal zygomatic stage were selected. After reproduction, maintenance and selection, the embryos were kept in a BOD (Biochemical Oxygen Demand) incubator at $28 \text{ }^\circ\text{C}$ until exposure and after the experiment.

2.2 Treatments

Figure 1: Timeline of exposure and subsequent experiments.



CQ (CAS Number: 130-26-7) was purchased by Sigma Aldrich. A stock solution of the QC was prepared in dimethylsulfoxide (DMSO) and diluted in Zebtec[®] water (maximum concentration of 0.005% DMSO) to the subsequent exposures. Embryos (3 hpf) were exposed to CQ in 24-well plates at reached 168 hpf randomly distributed at the concentrations of 0, 0.1, 0.5, 1, 1.5 and 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$. Each well contained 2.5ml of solution and 5 embryos. Briefly, figure 1 show the experimental timeline of CQ exposure and subsequent experiments. . Toxicological assays were based on the OECD guidelines for the testing of chemicals 236 – Fish Embryo Acute Toxicity (FET) Test (OECD 2013), with some modifications.

2.3 Survival curve, hatching rate and morphology

Embryos exposed to CQ were monitored daily during the whole exposure period, the survival curve of the embryos was analyzed according to the individuals' unviability by observation of egg coagulation and absence of heart beat. One of the parameters considered for the acceptability of the assay is control survival with dilution water of $\geq 90\%$ (OECD 2013).

The hatching rate was evaluated at 72 hpf and quantified based on the percentage of living individuals. The morphology was analyzed at 96 hpf, in this period the embryo begins its swimming process, therefore, a 3% methyl cellulose solution was used to decrease its movement. Parameters such as body size, eye area, pericardial edema area, area of yolk sac edema and distortion of the body axis were evaluated. All parameters described herein were evaluated according to previously published protocols (WESTERFIELD, 2000). The images were obtained on a Carl Zeiss Stemi 2000-C stereomicroscope coupled to a HD Lite 1080 P, 1.25 \times zoom and analyzed using the Image J software. The biomarkers results were applied into the “integrated biomaker response” (IBR) (Beliaeff, BENOIT; Burgeot 2002). For IBR

calculation, the ratio between morphological changes among groups following described by Sanchez et al. (2013).

2.4 Behavioral analyzes

The exploratory behavior of the larvae was based on Colwill and Creton (2011) and evaluated at 7 dpf. Only the larvae that resisted until the final exposure period and did not undergo severe morphological changes were submitted to the behavioral tests.. Each larva was individually placed in a well of a 24-well cell culture plate containing 2 mL of water per well, and the total distance traveled, absolute body turn angle, the max speed and immobile episodes of each animal were evaluated. The immobile episode was characterized by total loss of movement for two seconds. After a 60-s habituation, the sessions were filmed and recorded for five minutes for later analysis using ANY-Maze software (Stoelting Co., Wood Dale, IL, USA), which is able to track the swimming activity of the animals at a rate of 15 positions per second.

2.5 Statistical analysis

The data will be submitted to the D'Agostino & Pearson, Shapiro-Wilk and Kolmogorov Smirnov normality tests. The results obtained were expressed as mean \pm standard error (S.E.M.). Non-parametric data were analyzed using the Mann Whitney test. The parametric data were analyzed by the One-Way (ANOVA) and post-Tukey test, considering the significant results when $p \leq 0.05$. All analyzes were performed using GraphPad Prism 7.0@ software.

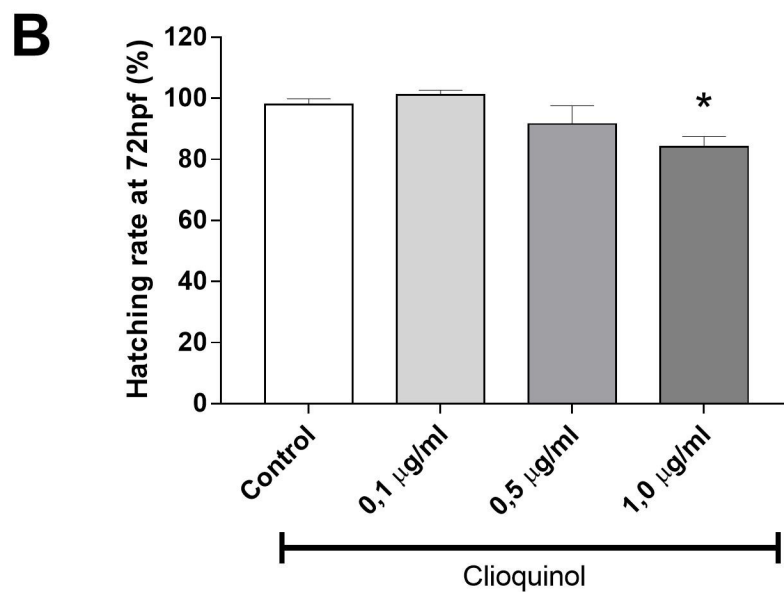
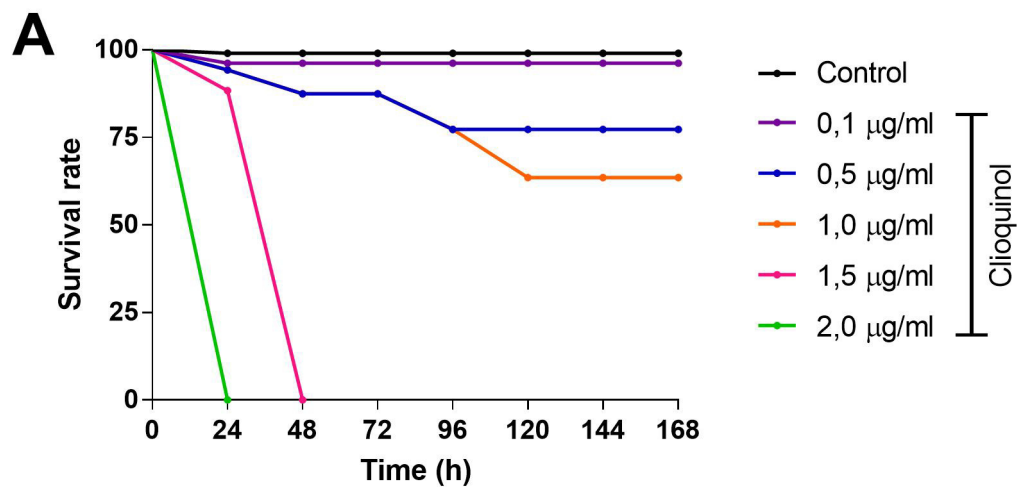
3 Results

3.1 EXPOSURE TO CQ INCREASES MORTALITY BUT NOT AFFECTS THE EMBRYOS ECLOSION.

Initially, to evaluate the potential toxicity of CQ in the embryonic development of zebrafish, we analyzed some common developmental phenotypes, including survival and hatching rates. It was possible to observe that the lethality was dose and time-dependent. Concentrations of 1.5 $\mu\text{g/ml}$ and 2.0 $\mu\text{g/ml}$ caused 100% mortality in a maximum of 48 hours of treatment (Fig. 2). The embryo hatch was not significantly changes in embryos exposed to CQ up to 1.0 $\mu\text{g/mL}$ (Fig. 2B). Concentrations of 1.5 and 2.0 $\mu\text{g/mL}$ did not survive at 72 hpf

and, therefore, was not possible to evaluate the hatch rate in these groups. Therefore, due to the high toxicity the concentrations of 1.5 and 2.0 $\mu\text{g/mL}$ were excluded from the study.

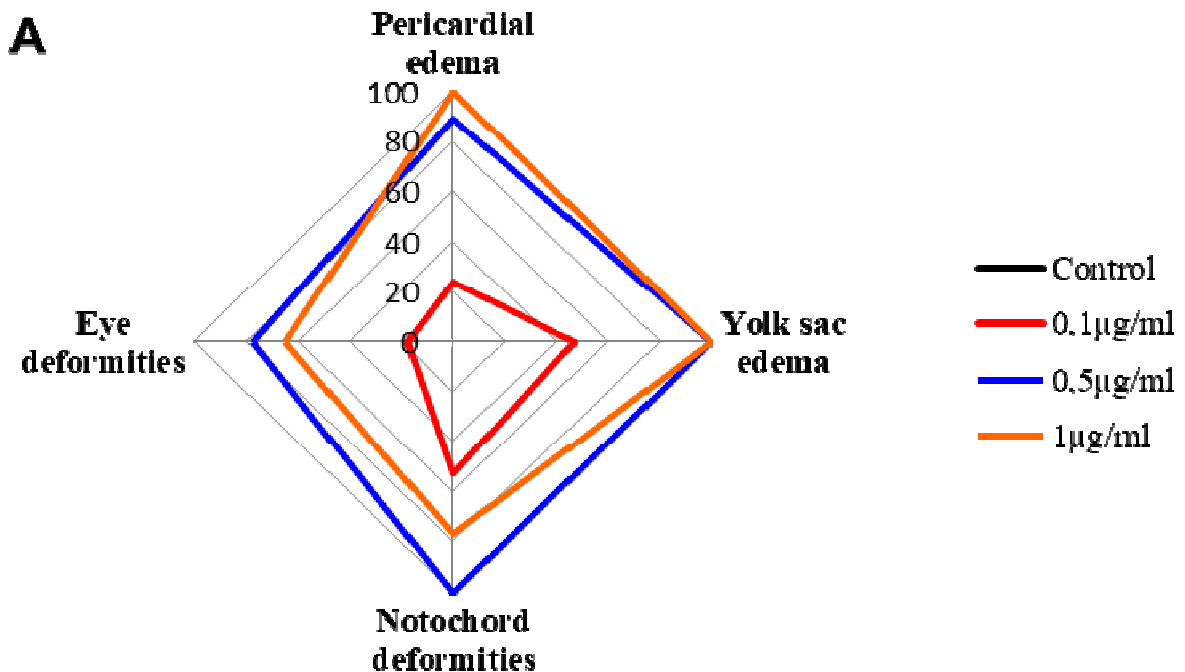
Figure 1 - Survival and hatching rate of embryos treated with different concentrations of CQ; a) Survival curve generated by software package. The colors for the different concentrations exposed to the Control and Clioquinol groups are distributed as indicated in the legend; b) Evaluation of the hatching rate of exposed embryos at 72 hours. Data were submitted to the One-way ANOVA statistical test. Data are expressed as mean \pm SEM.

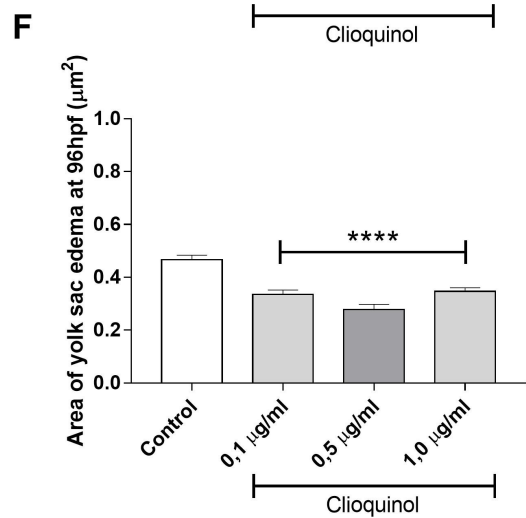
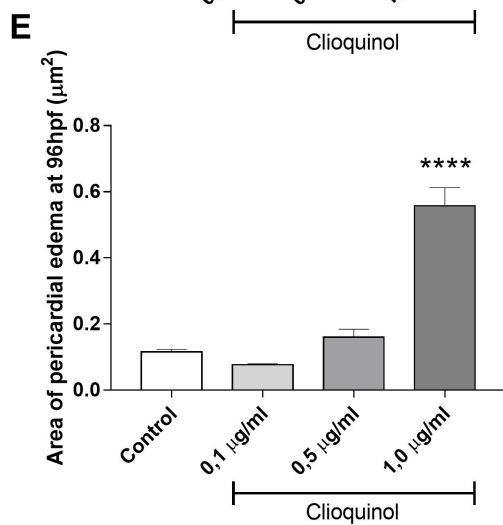
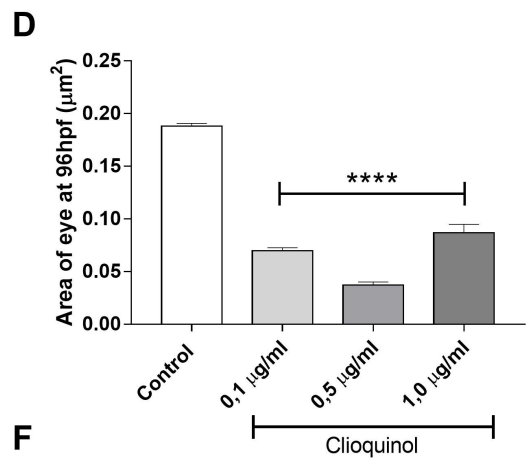
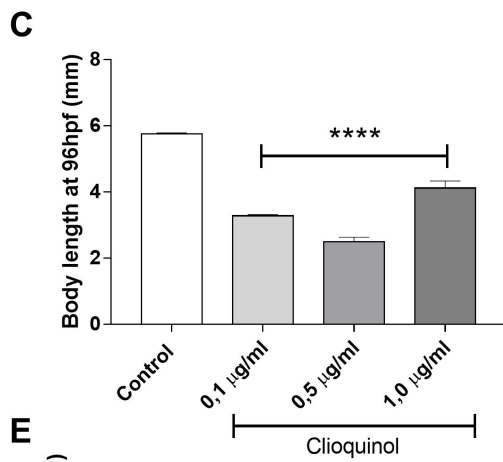


3.2 MORPHOLOGICAL ABNORMALITIES INDUCED BY CLIOQUINOL

For evaluation of toxicity of CQ towards zebrafish morphogenesis, four major types of abnormalities (body size, eye size, pericardial edema, yolk sac edema) at 4dpf were recorded and plotted, respectively. It was possible to observe the incidence of different types of malformations simultaneously in zebrafish larvae. All CQ concentrations tested induced morphological changes being the highest concentrations capable to induce severe malformations (Fig. 3). Exposed groups presented a significant reduction in body size (Fig. 3C) and eye area (Fig. 3D), respectively ($p < 0.0001$). A significant increase ($p < 0.0001$) in the area of pericardial edema (Fig. 3E) was observed at the concentration of $1.0 \mu\text{g/ml}$ and an increase in the area of vitelline spleen edema (Fig. 3F) was significant at concentrations 0.1 , 0.5 and $1.0 \mu\text{g/ml}$ ($p < 0.0001$). IBR values for each *endpoint* of morphological change in each exposed group in relation to control are shown in Fig. 3A. The results demonstrated a dose-dependent relation between CQ concentration and morphological changes rate.

Figure 2 - Effect of CQ on zebrafish morphogenesis. (A) Integrated biomarkers response analysis showing the overlapping occurrence of the notochord deformities with eye deformities, pericardial edema and yolk sac edema; (B) Representative images of morphological changes observed in 4 dpf zebrafish embryos at different concentrations of CQ; (C) body size, (D) eye size, (E) area of pericardial edema; (F) area of the yolk sac edema; (C, D, E, F) Data are expressed as mean \pm SEM. **** $p < 0.0001$.

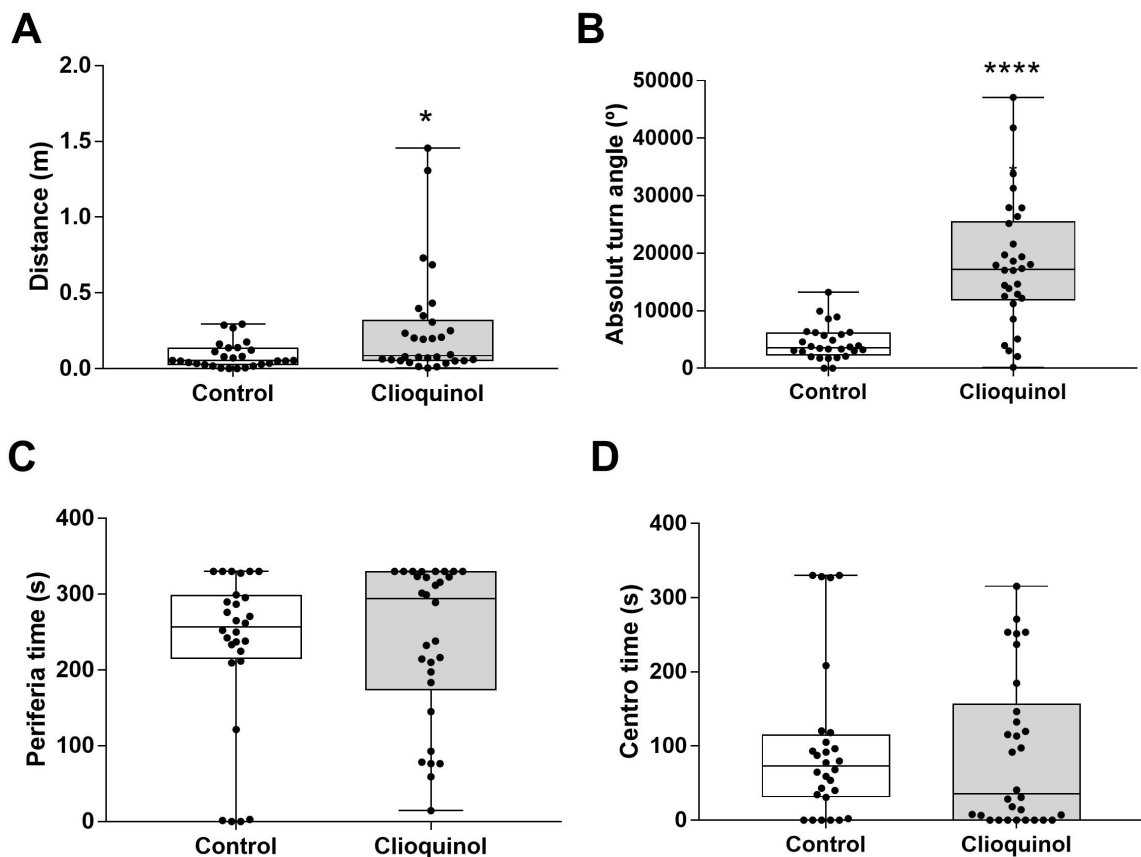


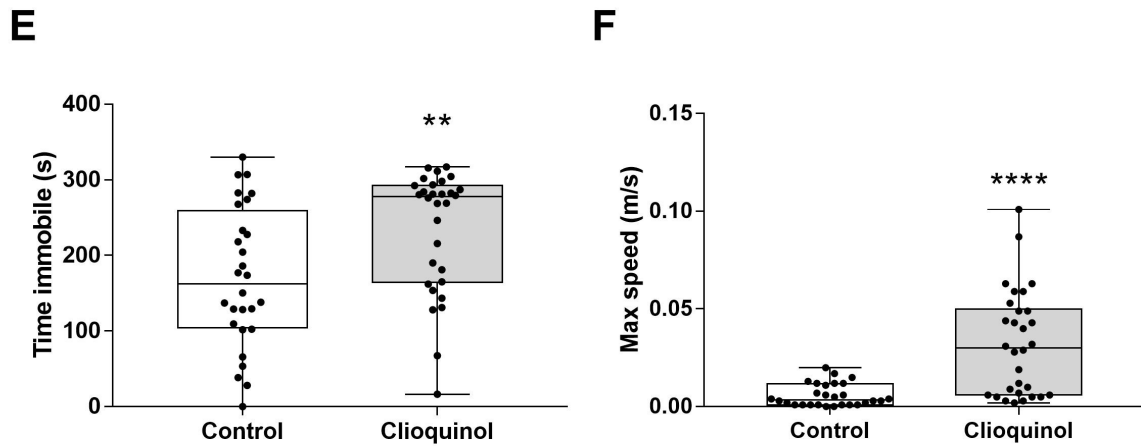


3.3 CLIOQUINOL CAUSES INJURY IN ZEBRAFISH BEHAVIORAL PARAMETERS

Taking into consideration that exposure to CQ 0.1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ did not result in severe morphological abnormalities such as notochord distortion, only this concentration was used for behavioral analysis. The animals exposed to 0.1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ CQ presented a significant increase ($p < 0.05$) in the displacement distance traveled (Fig. 4A), absolute increase angle parameter (Fig 4B. < 0.0001), immobile time (Fig. 4E) ($p < 0.01$) and maximum velocity (Fig. 4F) ($p < 0.0001$), all compared to the control group. The time of permanence in the center and periphery of the animals exposed to the CQ showed no significant differences when compared to the control group.

Figure 3: Exploratory behavior of zebrafish larvae. Distance (A), absolute turn angle (B), time at the periphery (C), time at the center (D), immobile time (E) and maximum speed attained (F) were evaluated at 7 dpf in control and 0.1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ CQ treated larvae. Data were expressed as the mean \pm standard error mean. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, **** $p < 0.0001$.





4 Discussion

In this study, the toxic effects of CQ were examined in terms of mortality, hatch rate, morphology and behavioral changes. The concentrations used were initially based on the concentration of CQ in the commercially available formulations. A survival curve was performed at concentrations ranging from 0.1 to 2.0 $\mu\text{g/ml}$. The survival of the embryos exposed to the concentrations of 1.5 and 2.0 $\mu\text{g/ml}$ was totally affected in a maximum of 48 hours, that is, at 48 hours of exposure 100% of the embryos exposed to these concentrations did not survive, indicating its high toxicity to zebrafish embryos.

Hatching is an important “*endpoint*” in the life cycle of fish and can be used as a powerful tool in developmental toxicology (referência). Embryo hatching may also be related to body movements (Hallare *et al.* 2005), which are necessary to break the egg envelope and may be associated with loss of muscle capacity due to abnormal formation of the body (Costa-Silva *et al.* 2018). Others have also reported that delays in hatching rate can be considered a signal of stress response in zebrafish embryos (CHENG *et al.*, 2007). The occurrence of delays or failures due to drugs or environmental toxicants may cause hatching inhibition, chorionase and/or behavioral defects generally related to attenuation of spontaneous muscle movements of the embryos (Haendel *et al.* 2004). In our study, a significant delay in the hatching rate resulting from exposure of the CQ at 1 $\mu\text{g/ml}$ was observed, indicating a clear sign of toxicity towards this biological phenomenon.

In functional inspection and organ development, measures of pericardial edema are important toxicological targets in assessing cardiac function (DE LUCA *et al.*, 2014). The significant increase in pericardial edema, at the concentration of 1.0 $\mu\text{g/ml}$ (Fig. 3E), suggests

cardiotoxic properties of CQ. At the same time, a significant decrease in yolk sac and body size was observed in all concentrations tested. In addition, deformities in eye size and notocotic deformities were also observed. Some or all of these deformities occurred simultaneously in larvae. Basal signs of toxicity identified in zebrafish larvae in the literature, such as Henry et al. (1997), Elonen et al (1998), Bisthoven (1999) or Keil et al. (2002) consisted of edema (cranial, pericardial and abdominal), hemorrhages, tail curvature and deformities in the head and spinal cord (marked scoliosis). Most of these signs were also observed in the present work.

Locomotor behaviors play a key role in zebrafish feeding, social and defensive activities throughout its life span (Colwill and Creton 2011). In addition, studies recommend the use of 6 or 7 dpf larvae to examine the effects of drug treatments, for example on locomotor activity, highlighting the importance of considering maturational and experimental effects on zebrafish larval behavior (Creton 2011). Behavioral changes are also known to reflect how an animal fits and responds to the environment and are the first line of defense when the animal is exposed to a harm (Scherer *et al.* 1992).. In this study, was demonstrated that the concentration of 0.1 µg/ml of CQ significantly increased the distance traveled, the maximum speed and the absolute turn angle of the larvae in relation to the control group. Differences in rotation angle may be directly related to changes in the larval swimming pattern (Colwill and Creton 2011). Exposure to CQ also decreased the time the larvae remained immobile, and at the same time, there was no significant difference in residence time in the peripheral and central areas. All together, our results indicate that embryonic exposure to CQ increase the locomotor behavior and not impair non-motor behaviors.

In general, ability of CQ to chelate and redistribute metals play an important role in neurotoxic effects, which are depending Zn, Cu, and Fe homeostasis (Bareggi and Cornelli 2012). These essential metals play key roles in embryonic, fetal, and postnatal development in higher eukaryotes (Kambe *et al.* 2008). Thereby, the concentrations test in this study was able to impair survival, morphological and behavioral aspects of early developmental stages of zebrafish. Besides that, CQ may act as a pro-oxidant leading redox unbalance (Benvenisti-Zarom *et al.* 2005), contributing to damaging effects of CQ exposure during developmental stages, once the sensitivity of developing organisms to environmental contaminants has been associated with cellular redox unbalance, which can impair normal development (Dennerly 2007) and can be suggested as potential mechanisms of toxicity in larval models.

Altogether, our results provide for the first time, a better understanding of the potential toxic effects of CQ on zebrafish embryogenesis. Notwithstanding, further studies are needed

to clarify biochemical mechanisms for a broad view of the impacts of CQ on the embryonic development of zebrafish.

5. Conflict of interest

Authors declare no conflict of interest.

6. Acknowledgements

Authors acknowledge UNIPAMPA and Brazilian agencies Capes / PROEX (23038.005848/2018-31), FAPERGS (PRONUPEQ, PRONEX, PQG) and CNPq for financial support. JLF is a CNPq (310861/2014-4) research fellowship recipient.

7. References

- Bambino, K. and Chu, J., 2017. *Zebrafish in Toxicology and Environmental Health*. 1st ed. Current Topics in Developmental Biology. Elsevier Inc.
- Bareggi, S.R. and Cornelli, U., 2012. Clioquinol: Review of its mechanisms of action and clinical uses in neurodegenerative Disorders. *CNS Neuroscience and Therapeutics*, 18 (1), 41–46.
- Beliaeff, BENOIT;Burgeot, T., 2002. INTEGRATED BIOMARKER RESPONSE: A USEFUL TOOL FOR ECOLOGICAL RISK ASSESSMENT. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 21 (6), 1316–1322.
- Benvenisti-Zarom, L., Chen, J., and Regan, R.F., 2005. The oxidative neurotoxicity of clioquinol. *Neuropharmacology*, 49 (5), 687–694.
- Bruni, G., Lakhani, P., and Kokel, D., 2014. Discovering novel neuroactive drugs through high-throughput behavior-based chemical screening in the zebrafish. *Frontiers in Pharmacology*, 5 JUN (July), 1–14.
- Colwill, R.M. and Creton, R., 2011. Locomotor behaviors in zebrafish (*Danio rerio*) larvae. *Behavioural Processes*, 86 (2), 222–229.
- Costa-Silva, D.G. da, Leandro, L.P., Vieira, P. de B., de Carvalho, N.R., Lopes, A.R., Schimith, L.E., Nunes, M.E.M., de Mello, R.S., Martins, I.K., de Paula, A.A., Cañedo, A.D., Moreira, J.C.F., Posser, T., and Franco, J.L., 2018. N-acetylcysteine inhibits

- Mancozeb-induced impairments to the normal development of zebrafish embryos. *Neurotoxicology and Teratology*, 68 (April), 1–12.
- Creton, R.M.C. and R., 2011. Imaging escape and avoidance behavior in zebrafish larvae Ruth. *Neurosciense*, 22 (1), 63–73.
- Dammski, A.P., Müller, B.R., Gaya, C., and Daiane Regonato, 2011. Zebrafish - Manual de criação em biotério. *Zebrafish*, 107.
- Dennerly, P.A., 2007. Effects of oxidative stress on embryonic development. *Birth Defects Research Part C - Embryo Today: Reviews*, 81 (3), 155–162.
- Dennis, P. and Silva, C., 2018. NEUROTOXICIDADE E EMBRIOTOXICIDADE INDUZIDAS PELOS AGENTES TÓXICOS EM PEIXE-ZEBRA (*Danio rerio*).
- Finkelstein, D.I., Hare, D.J., Billings, J.L., Sedjahtera, A., Nurjono, M., Arthofer, E., George, S., Culvenor, J.G., Bush, A.I., and Adlard, P.A., 2016. Clioquinol Improves Cognitive, Motor Function, and Microanatomy of the Alpha-Synuclein hA53T Transgenic Mice. *ACS Chemical Neuroscience*, 7 (1), 119–129.
- Ghalkhani, M., Fernandes, I.P.G., Oliveira, S.C.B., Shahrokhian, S., and Oliveira-Brett, A.M., 2011. Anodic behavior of clioquinol at a glassy carbon electrode. *Bioelectrochemistry*, 80 (2), 175–181.
- Haendel, M.A., Tilton, F., Bailey, G.S., and Tanguay, R.L., 2004. Developmental toxicity of the dithiocarbamate pesticide sodium metam in Zebrafish. *Toxicological Sciences*, 81 (2), 390–400.
- Hallare, A. V., Kosmehl, T., Schulze, T., Hollert, H., Köhler, H.R., and Triebkorn, R., 2005. Assessing contamination levels of Laguna Lake sediments (Philippines) using a contact assay with zebrafish (*Danio rerio*) embryos. *Science of the Total Environment*, 347 (1–3), 254–271.
- Hoffman, E.J., Turner, K.J., Fernandez, J.M., Cifuentes, D., Ghosh, M., Ijaz, S., Jain, R.A., Kubo, F., Bill, B.R., Granato, M., Barresi, M.J.F., Wilson, S.W., Rihel, J., State, M.W., and Giraldez, A.J., 2016. Estrogens Suppress a Behavioral Phenotype in Zebrafish Mutants of the Autism Risk Gene, CNTNAP2. *HHS Public Access*, 89 (4), 725–733.
- Hung, L.W. and Barnham, K.J., 2012. Modulating metals as a therapeutic strategy for

- Alzheimer's disease. *Future Medicinal Chemistry*, 4 (8), 955–969.
- Kambe, T., Weaver, B.P., and Andrews, G.K., 2008. The genetics of essential metal homeostasis during development. *Genesis*, 46 (4), 214–228.
- Kimmel C., Ballard W., Kimmel S., Ullman B., and S.T., 1995. Stages of Embryonic Development of the Zebrafish. *Dev Dyn*, 203, 255–310.
- Lei, P., Ayton, S., Appukuttan, A.T., Volitakis, I., Adlard, P.A., Finkelstein, D.I., and Bush, A.I., 2015. Clioquinol rescues Parkinsonism and dementia phenotypes of the tau knockout mouse. *Neurobiology of Disease*, 81, 168–175.
- Li, H., Cao, F., Zhao, F., Yang, Y., Teng, M., Wang, C., and Qiu, L., 2018. Developmental toxicity, oxidative stress and immunotoxicity induced by three strobilurins (pyraclostrobin, trifloxystrobin and picoxystrobin) in zebrafish embryos. *Chemosphere*, 207, 781–790.
- Mao, X. and Schimmer, A.D., 2008. The toxicology of Clioquinol. *Toxicology*, 182, 1–6.
- OECD, 2013. Fish Embryo Toxicity Test (FET test). *Organization for Economic Co-Operation and Development.*, (July), 1–22.
- Scherer, P.E., Manning-Kriegt, U.C., Jen6, P., Schatz, G., and Biocenter, M.H., 1992. Identification of a 45-kDa protein at the protein import site of the yeast mitochondrial inner membrane (crinking/transkocatlon Intermedlate/submtochondadl veddes). *Cell Biology*, 89 (December), 11930–11934.
- Wehbe, M., Malhotra, A.K., Anantha, M., Lo, C., Dragowska, W.H., Dos Santos, N., and Bally, M.B., 2017. Development of a copper-clioquinol formulation suitable for intravenous use. *Drug Delivery and Translational Research*, 8 (1), 239–251.
- Yassin, M.S., Ekblom, J., Xilinas, M., Gottfries, C.G., and Oreland, L., 2000. Changes in uptake of vitamin B12 and trace metals in brains of mice treated with clioquinol. *Journal of the Neurological Sciences*, 173 (1), 40–44.

5 CONCLUSÃO

Nosso estudo demonstrou, de forma inédita que o CQ é capaz de causar alterações fisiológicas, morfológicas e comportamentais, dependentes de concentração, sobre o desenvolvimento embrio-larval de peixe-zebra. Os parâmetros avaliados se mostraram ferramentas robustas para avaliação toxicológica de compostos no modelo experimental usado. Finalmente, nossos resultados afirmam a toxicidade do CQ frente ao desenvolvimento embrionário do peixe-zebra alertando para os riscos inerentes ao uso deste composto em formulações farmacológicas.

6 PERSPECTIVAS

Este trabalho demonstrou a embriotoxicidade do CQ em peixe-zebra através de investigações fisiológicas, morfológicas e comportamentais. Neste sentido, torna-se relevante a investigação de mecanismos bioquímicos e moleculares pelos quais este composto exerce sua toxicidade. Temos como meta a subsequente avaliação de alterações causadas pelo CQ á processos pró-apoptóticos, assim como a avaliação de marcadores de fisiologia mitocondrial e alterações redox induzidas pela exposição ao CQ em peixe-zebra.

7 REFERÊNCIAS

- BAMBINO, K.; CHU, J. Zebrafish in Toxicology and Environmental Health. 1. ed. [s.l.] Elsevier Inc., 2017. v. 124
- BLASER, R. E.; ROSEMBERG, D. B. Measures of anxiety in zebrafish (*Danio rerio*): Dissociation of black/white preference and novel tank test. PLoS ONE, v. 7, n. 5, p. 1–8, 2012.
- BRAUNBECK, T. et al. <Altex_2_2005_87_102_Braunbeck.pdf>. Altex, v. 22, n. 2, p. 87–102, 2005.
- BRAUNBECK, T. et al. The fish embryo test (FET): origin , applications , and future. p. 16247–16261, 2015.
- BRUNI, G.; LAKHANI, P.; KOKEL, D. Discovering novel neuroactive drugs through high-throughput behavior-based chemical screening in the zebrafish. Frontiers in Pharmacology, v. 5 JUN, n. July, p. 1–14, 2014.
- COSTA-SILVA, D. G. DA et al. N-acetylcysteine inhibits Mancozeb-induced impairments to the normal development of zebrafish embryos. Neurotoxicology and Teratology, v. 68, n. April, p. 1–12, 2018.
- CRETON, R. M. C. AND R. Imaging escape and avoidance behavior in zebrafish larvae Ruth. Neuroscience, v. 22, n. 1, p. 63–73, 2011.
- D’COSTA, A.; SHEPHERD, I. T. Zebrafish Development and Genetics: Introducing Undergraduates to Developmental Biology and Genetics in a Large Introductory Laboratory Class. Zebrafish, v. 6, n. 2, p. 169–177, 2009.
- DAMMSKI, A. P. et al. Zebrafish - Manual de criação em biotério. Zebrafish, p. 107, 2011.
- FINKELSTEIN, D. I. et al. Clioquinol Improves Cognitive, Motor Function, and Microanatomy of the Alpha-Synuclein hA53T Transgenic Mice. ACS Chemical Neuroscience, v. 7, n. 1, p. 119–129, 2016.
- FLEESON, W. et al. OS EFEITOS DO ROUNDUP® (GLIFOSATO [N-(FOSFONOMETIL) GLICINA]) NO DESENVOLVIMENTO EMBRIONÁRIO E METABOLISMO ENERGÉTICO DO PEIXE ZEBRA (*Danio rerio*). Journal of Personality and Social

Psychology, v. 1, n. 1, p. 1188–1197, 2017.

GHALKHANI, M. et al. Anodic behavior of clioquinol at a glassy carbon electrode. *Bioelectrochemistry*, v. 80, n. 2, p. 175–181, 2011.

GRUNWALD, D. J. Headwaters of the zebrafish — emergence of a new model vertebrate. *Nature Reviews Genetics*, v. 3, n. 9, p. 717–724, 2002.

HOFFMAN, E. J. et al. Estrogens Suppress a Behavioral Phenotype in Zebrafish Mutants of the Autism Risk Gene, *CNTNAP2*. *HHS Public Access*, v. 89, n. 4, p. 725–733, 2016.

HOWE, K. et al. The zebrafish reference genome sequence and its relationship to the human genome. *Nature*, v. 496, n. 7446, p. 498–503, 2013.

HUNG, L. W.; BARNHAM, K. J. Modulating metals as a therapeutic strategy for Alzheimer's disease. *Future Medicinal Chemistry*, v. 4, n. 8, p. 955–969, 2012.

KALUEFF, A. V. et al. Towards a comprehensive catalog of zebrafish behavior 1.0 and beyond. *Zebrafish*, v. 10, n. 1, p. 70–86, 2013.

KIMMEL C., BALLARD W., KIMMEL S., ULLMAN B., Y S. T. Stages of Embryonic Development of the Zebrafish. *Dev Dyn*, v. 203, p. 255–310, 1995.

LAMMER, E. et al. 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 - C Toxicology and Pharmacology*, v. 149, n. 2, p. 196–209, 2009.

LEI, P. et al. Clioquinol rescues Parkinsonism and dementia phenotypes of the tau knockout mouse. *Neurobiology of Disease*, v. 81, p. 168–175, 2015.

LI, H. et al. Developmental toxicity, oxidative stress and immunotoxicity induced by three strobilurins (pyraclostrobin, trifloxystrobin and picoxystrobin) in zebrafish embryos. *Chemosphere*, v. 207, p. 781–790, 2018.

MAO, X.; SCHIMMER, A. D. The toxicology of Clioquinol. *Chemosphere*, v. 182, p. 1–6, 2008.

MEADE, T. W. Subacute myelo optic neuropathy and clioquinol. An epidemiological case history for diagnosis. *British Journal of Preventive and Social Medicine*, v. 29, n. 3, p. 157–169, 1975.

NAKAE, K. S. Y. Relation Between Subacute Myelo-Optic neuropathy (SMON) and Clioquinol: Nationwide Survey. *The Lancet*, n. table II, p. 171–173, 1973.

OECD. Fish Embryo Toxicity Test (FET test). Organization for Economic Co-Operation and Development., n. July, p. 1–22, 2013.

OLIVERI, V.; VECCHIO, G. 8-Hydroxyquinolines in medicinal chemistry: A structural perspective. *European Journal of Medicinal Chemistry*, v. 120, p. 252–274, 2016.

RACZ, P.I., et al. Application of *Caenorhabditis elegans* (nematode) and *Danio rerio* embryo (zebrafish) as model systems to screen for developmental and reproductive toxicity of Piperazine compounds. *Toxicology in vitro : an international journal published in association with BIBRA*. 44:11-16, 2017.

ROSEMBERG, D. B. et al. Differences in spatio-temporal behavior of zebrafish in the open tank paradigm after a short-period confinement into dark and bright environments. *PLoS ONE*, v. 6, n. 5, 2011.

RUPERT J. EGAN, CARISA L. BERGNER, PETER C. HART, JONATHAN M. CACHAT, P. R. et al. Understanding behavioral and physiological phenotypes of stress and anxiety in zebrafish. *Behavioural Brain Research*, v. 205, n. 1, p. 38–44, 2010.

THOMAS BRAUNBECK; EVA LAMMER. *Fish embryo toxicity assays*. 2005.

WEHBE, M. et al. Development of a copper-clioquinol formulation suitable for intravenous use. *Drug Delivery and Translational Research*, v. 8, n. 1, p. 239–251, 2017.

YASSIN, M. S. et al. Changes in uptake of vitamin B12 and trace metals in brains of mice treated with clioquinol. *Journal of the Neurological Sciences*, v. 173, n. 1, p. 40–44, 2000.

