



**UNIVERSIDADE FEDERAL DA FRONTEIRA SUL  
CAMPUS ERECHIM  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA AMBIENTAL  
CURSO DE MESTRADO EM CIENCIA E TECNOLOGIA AMBIENTAL**

**LURIAN FENSKE**

**HORMÔNIO ESTROGÊNIO NA ÁGUA PROVOCA ALTERAÇÕES  
COMPORTAMENTAL E DESREGULAÇÃO ENDÓCRINA EM ZEBRAFISH**

**ERECHIM  
2017**

**LURIAN FENSKE**

**HORMÔNIO ESTROGÊNIO NA ÁGUA PROVOCA ALTERAÇÕES  
COMPORTAMENTAL E DESREGULAÇÃO ENDÓCRINA EM ZEBRAFISH**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia Ambiental da Universidade Federal da Fronteira Sul – UFFS como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciência e Tecnologia Ambiental, sob a orientação da Prof<sup>a</sup> Dra Rosilene Rodrigues Kaizer Perin.

ERECHIM  
2017

## UNIVERSIDADE FEDERAL DA FRONTEIRA SUL

Rua General Osório, 413D  
CEP: 89802-210  
Caixa Postal 181  
Bairro Jardim Itália  
Chapecó - SC  
Brasil

Fenske, Lurian  
HORMÔNIO ESTROGÊNIO NA ÁGUA PROVOCA ALTERAÇÕES  
COMPORTAMENTAL E DESREGULAÇÃO ENDÓCRINA EM ZEBRAFISH/  
Lurian Fenske. -- 2017.  
45 f.:il.

Orientadora: Rosilene Rodrigues Kaizer Perin.  
Co-orientador: Leonardo José Gil Barcellos.  
Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal da  
Fronteira Sul, Programa de Pós-Graduação em Mestrado em  
Ciência e Tecnologia Ambiental - PPGCTA, Erechim, RS ,  
2017.

1. 17-alfa-etinilestradiol. 2. Comportamento. 3.  
Danio rerio. 4. Metabolismo. I. Perin, Rosilene  
Rodrigues Kaizer, orient. II. Barcellos, Leonardo José  
Gil, co-orient. III. Universidade Federal da Fronteira  
Sul. IV. Título.

**LURIAN FENSKE**

**HORMÔNIO ESTROGÊNIO NA ÁGUA PROVOCA ALTERAÇÕES  
COMPORTAMENTAL E DESREGULAÇÃO ENDÓCRINA EM ZEBRAFISH**

Dissertação apresentada ao programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia Ambiental, da Universidade Federal da Fronteira Sul – UFFS. Para obtenção do título de Mestre em Ciência e Tecnologia Ambiental, defendido em banca examinadora em \_\_\_\_/07/2017

Orientador (a): Prof. Dr. Rosilene Rodrigues Kaizer Perin

Aprovado em: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

**BANCA EXAMINADORA**

---

Prof. Dr. Ana Maria Seibel – Unochapecó

---

Prof. Dr. Gessi Koakoski – UPF

---

Prof. Dr. Leonardo José Gil Barcellos – UPF

---

Dr. Rosilene Rodrigues Kaizer Perin – UFFS/IFRS

Erechim/RS, Julho de 2017

*Ao meus pais Adir e Mary Fenske.*

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço primeiramente a Deus, por mais esta benção em minha vida.

Agradeço aos meus pais Adir e Mary, por todo amor, educação e incentivo nesta caminhada, sem vocês ao meu lado eu não conseguiria concluir esta etapa.

Ao meu amor, Rafael Dall'Acqua, o qual sempre esteve comigo, agradeço por todo seu amor, companheirismo, dedicação e compreensão.

A minha família, Suélen, Volmar, Junior, Franciele, ao pequeno Pedro Antero, Edegar, Rita e Bruna, que sempre estiveram junto comigo.

A minha orientadora Rosilene, pela oportunidade, ensinamentos e por estar sempre presente.

Aos meus Coorientadores Helen e Leonardo, por todo suporte concedido.

Aos colegas de Laboratório, Eduarda, Jéssica, Ana Paula e Nicole por dedicarem parte de seu tempo ao meu estudo.

Aos professores, por todos os ensinamentos durante esta etapa.

Enfim, aos meus amigos, colegas e a todos que me ajudaram de todas as formas possíveis, meu muito obrigado!

Apesar de tudo, vou viver sorrindo!  
(autor desconhecido)

## RESUMO

O uso de fármacos no dia a dia aumentou e dentre eles encontra-se os contraceptivos orais, os quais são hormônios sintéticos ingeridos diariamente por milhões de mulheres no mundo todo. Tendo em vista a problemática ambiental relacionada ao descarte de hormônios sintéticos não completamente metabolizados em águas residuárias, pode ocorrer a biomagnificação do toxicante devido ao fato dos hormônios retornarem ao meio em sua forma original atingindo organismos aquáticos, podendo chegar ao homem. Buscamos então avaliar os possíveis efeitos da exposição aguda e crônica através do comportamento tipo social, ansiedade, e agressividade, além de possíveis efeitos ao sistema endócrino, usando o peixe-zebra como organismo modelo. Podemos concluir que os resultados obtidos são alarmantes, uma vez que o hormônio 17-alfa-etinilestradiol é prejudicial ao modelo experimental utilizado, tanto ao seu sistema endócrino, tanto ao comportamento. Na exposição crônica ocorreu alteração no comportamento tipo social, ansiedade, além de torná-lo mais agressivo. Ocorreram também, alterações no sistema endócrino, alterando níveis de Estradiol e Testosterona. Com isso entendemos que estes resultados mostram prejuízo ao organismo tanto em relação ao comportamento da espécie, como em seu sistema endócrino. A presença do 17-alfa-etinilestradiol no meio hídrico apresenta um impacto negativo no comportamento do organismo analisado, podendo colocar em risco, não só o organismo estudado, bem como várias espécies e populações em desenvolvimento. Podendo assim causar um severo impacto ecológico ao sistema exposto a este hormônio.

Palavras-chave: 17-alfa-etinilestradiol, *Danio rerio*, Comportamento, Hormônios.

## **ABSTRACT/RESUMÉN**

Nowadays drug use has increased, among them are oral contraceptives, which are synthetic hormones ingested daily by millions of women worldwide. Considering the environmental problem related to the disposal of non-metabolized synthetic hormones in waste water, a biomagnification can occur at the toxicant due to the fact that the hormones return to the environment in its original form reaching aquatic organisms, and may reach the man. The objective was to evaluate the possible effects of acute and chronic exposure via social behavior type, anxiety, and aggression, and possible effects on the endocrine system, using the zebrafish as a model organism. We can conclude that the results obtained are alarming, since the 17-alpha-ethinyl estradiol hormone is detrimental to the experimental model used, both to its endocrine system and behavior. In chronic exposure occurred change in social behavior type, anxiety, and make it more aggressive. There were also changes in the endocrine system, altering levels of estradiol and testosterone. Thus we believe that these results show damage to the organism both in relation to the behavior of the specie, as its endocrine system. The presence of 17-alpha-ethynylestradiol in the water has a negative impact on the behavior of the organism analyzed. Potentially putting at risk not only the organism studied, as well as various species and populations developing. This can cause a severe ecological impact on the system exposed to this hormone.

Keywords: 17-alpha-ethinyl, *Danio rerio*, Behavior, Hormone.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Possíveis destinos (rotas) dos fármacos no meio ambiente.....	18
Figura 2 - Metabolismo de transformação de EE2.....	21
Figura 3 - Protocolo Preferência social.....	26
Figura 4 - Protocolo Agressividade.....	27
Figura 5 - Protocolo Tanque Novo.....	27
Figura 6 - Comportamento social de peixes expostos agudamente.....	29
Figura 7- Comportamento social de peixes expostos cronicamente.....	30
Figura 8- Agressividade de peixes expostos agudamente (30s).....	30
Figura 9 - Agressividade de peixes expostos agudamente (10min).....	31
Figura 10 - Agressividade de peixes expostos cronicamente (30s).....	31
Figura 11 - Agressividade de peixes expostos cronicamente (10min).....	32
Figura 12 - Parâmetros locomotores de peixes expostos agudamente.....	33
Figura 13 - Parâmetros locomotores de peixes expostos cronicamente.....	33
Figura 14- Concentrações de Cortisol de corpo inteiro.....	34
Figura 15- Concentrações de Estradiol e de Testosterona de corpo inteiro.....	34

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Principais características físico-químicas de 17-alfa-etinilestradiol.....	20
Tabela 2- Concentrações (ng/l <sup>-1</sup> ) de 17-alfa-etinilestradiol.....	22

## LISTA DE QUADROS

Quadro 1- Tipos de tratamentos de efluentes.....	17
Quadro 2- Resultado dos parâmetros analisados.....	35

## LISTA DE ABREVIATURAS

°C – Graus Celsius

CRH- hormônio liberador de corticotrofina

Des – Desreguladores Endócrinos

E2– 17-beta-estradiol

EE2 –17-alfa-etinilestradiol

ERs– Receptores de estrogênio

ETEs – Estação de Tratamento de Esgoto

ng/L– nanogramas por litro

µg/L – microgramas por litro

% – porcentagem

m – metros

m/s – metros por segundos

min – minutos

s – segundos

g/mol – gramas por mol

SNC– Sistema Nervoso Central

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO.....</b>	<b>15</b>
	<b>1.1 REVISÃO DE LITERATURA .....</b>	<b>16</b>
	<b>1.2 Objetivo geral.....</b>	<b>25</b>
	<b>1.3 Objetivos específicos.....</b>	<b>25</b>
<b>2</b>	<b>MATERIAIS E MÉTODOS.....</b>	<b>26</b>
<b>3</b>	<b>RESULTADOS.....</b>	<b>29</b>
<b>4</b>	<b>DISCUSSÕES.....</b>	<b>36</b>
<b>5</b>	<b>CONSIDERAÇÕES FINAIS.....</b>	<b>40</b>
<b>6</b>	<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>41</b>

## 1 INTRODUÇÃO

Águas residuárias urbanas têm sido identificadas como uma importante fonte de estrogênios para o ambiente aquático (DEBLONDE et al., 2011). Isso pode estar relacionado ao fato de que alguns produtos farmacêuticos não são completamente metabolizados após o consumo humanos e animal e são excretados na sua forma original ou organicamente complexa (WESIERSKA, 2006).

Quando presente no meio de forma inadequada, o estrogênio é considerado um desregulador endócrino, e este encontra-se cada vez mais presente no dia a dia dos humanos, este hormônio promove mecanismos genômicos que apresentam longo período de latência, induzindo alterações à longo prazo na função celular, assim cresce a importância de estudar seu potencial e também em saber como este fármaco, afeta adversamente o sistema de organismos aquáticos (GAYER et al., 2000). Em 1976 e 1977 Kelly e colaboradores, mostraram que o estradiol poderia alterar a atividade neuronal dentro de segundos, o que é considerado muito rápido para ser associado ao mecanismo genômico clássico.

Estes hormônios estrogênicos foram detectados em afluentes e efluentes de Estação de Tratamento de esgotos em muitos países, entre os quais, o etinilestradiol sendo de origem sintética, foi encontrado em concentrações variando de 0,2 a 273 ng/l<sup>1</sup> em efluentes, dependendo do local pesquisado e do tipo de tratamento empregado (AZEVEDO, 2011).

Atualmente, foi observada a presença de três subtipos de receptores de estrogênio ER nos peixes teleósteos zebrafish (*Danio rerio*) (HAWKINS et al., 2000), Portanto, o peixe-zebra será utilizado no presente estudo como organismo modelo, devido a sua rápida capacidade reprodutiva, ao seu genoma sequenciado e aos seus processos definidos de desenvolvimento (SUN et al., 2015). Dessa forma, buscamos avaliar os efeitos da exposição aguda e crônica através de parâmetros comportamentais como ansiedade, comportamento social e agressividade, além de resposta a estresse, analisando o nível de hormônio cortisol, testosterona e estradiol em Zebrafish, expostos a diferentes níveis de estrogênio sintético, 17-alfa-etinilestradiol.

## REVISÃO DE LITERATURA

### Águas residuárias

A problemática ambiental sobre águas residuárias vem crescendo e sendo tema de muitos debates, os centros urbanos sempre foram os principais focos poluidores e contaminadores dos recursos hídricos, assim tendo como base que cerca de 35% da população brasileira não possui rede de esgoto coletada, com isso em média 65% dos municípios tem acesso a esgoto tratado, o esgoto bruto por si, é considerado a maior fonte de poluição das águas superficiais, sendo que o efeito contaminante destas águas brasileiras tem sido bastante discutido na literatura atual (IBGE- Pnad,2015 e ARCHELA, 2003).

Os recursos hídricos, que possibilitam a vida humana, transformam-se nos receptores de toda a espécie de descarte das atividades humanas, com isso, várias substâncias têm sido encontradas em águas residuais, e assim consideradas como contaminantes emergentes, tendo como exemplo deles agrotóxicos, fármacos, produtos de higiene pessoal, protetores solares, drogas ilícitas, alquifenóis, estrogênios, entre outros (RICHARDSON E TERNES,2011). Muitas atividades contribuem para a disponibilidade destas substâncias químicas no ambiente, porém o descarte de esgotos e efluentes de Estações de Tratamento de Esgoto (ETEs) vem sendo considerados as principais vias de aportes dos contaminantes no sistema aquático (RAIMUNDO, 2011).

As características dos efluentes são as que definem qual tipo de tratamento cada efluente terá que passar, os pré tratamentos são divididos em três tipos, os quais estão descritos no quadro 1.

Em média a composição do esgoto sanitário é de 99% de água e apenas 1% de sólidos, sendo que cerca de 75% desses sólidos são constituídos de matéria orgânica em processo de decomposição. Em relação à remoção de compostos orgânicos, o processo envolve várias etapas, como: remoção de sólidos grosseiros, adsorção em sólidos suspensos, sedimentação ou coagulação, biodegradação aeróbica ou anaeróbica, degradação química por processo de hidrólise ou nitrificação e a desinfecção (VON, 2005 e RAIMUNDO, 2011).

<b>Processos Físicos</b>	<b>Processos Químicos</b>	<b>Processos Biológicos</b>
Têm por finalidade separar as substâncias em suspensão no esgoto. Incluem-se: remoção dos sólidos grosseiros, remoção dos sólidos decantáveis e remoção dos sólidos flutuantes.	Há a utilização de produtos químicos e são raramente adotados isoladamente. Os processos químicos comumente adotados são: floculação, precipitação química, elutriação, oxidação química, cloração e neutralização ou correção do pH	Procuram reproduzir, em dispositivos racionalmente projetados. Os principais processos biológicos de tratamento são: oxidação biológica (lodos ativados, filtros biológicos, valas de oxidação e lagoas de estabilização) digestão de lodo (aeróbia e anaeróbia, fossas sépticas).

**Quadro 1-** Tipos de Tratamento de Efluentes (Fonte: Adaptado de ARCHELA, 2003).

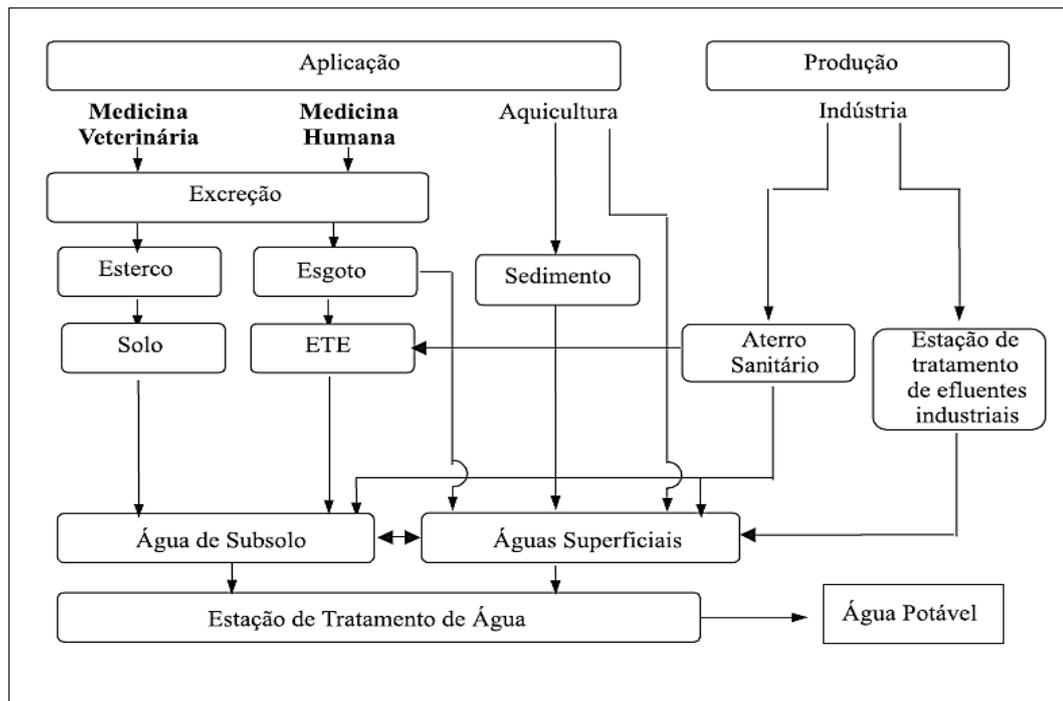
Mesmo passando por tratamento, o efluente lançado no meio pode ainda conter resquícios de algum contaminante. Há relatos da presença de fármacos e várias outras substâncias encontradas em águas residuais (AMÉRICO et al, 2012; BARCELÓ, 2007).

Atualmente, o interesse pelo monitoramento de fármacos no ambiente, vem crescendo, devido ao fato de que muitas das substâncias encontradas nos efluentes de ETEs e águas naturais estão sendo encontradas em concentrações na faixa de  $\mu\text{g/L}$  e  $\text{ng/L}$  (BILA e DEZOTI, 2003).

Em relação aos possíveis destinos dos fármacos individuais, no meio ambiente, estes podem ser divididos em três possíveis destinos:

- Pode ser biodegradável, ou seja, mineralizado a gás carbônico e água, como por exemplo, o ácido acetilsalicílico;
- Pode passar por algum processo metabólico ou ser degradado parcialmente, como às penicilinas;
- Pode ser persistente como o clofibrato, que é um antilipêmicos. Pouco se conhece sobre as rotas dos fármacos no meio (BILA e DEZOTI, 2003).

Ainda não se pode afirmar o destino correto dos fármacos após seu descarte, a Figura 1 apresenta possíveis caminhos destes compostos no meio ambiente.



**Figura 1-** Possíveis destinos (rotas) dos fármacos no meio ambiente. Fonte: BILA E DEZOTI, 2003

Na Alemanha, por exemplo, foram identificados 18 antibióticos em efluentes de ETEs e águas superficiais por Hirsch et al.,(1999), além de estudos realizados por Ternes et al., (1998) onde detectou níveis de estrogênios em concentrações na base de ng/L em efluentes de ETEs.

O estrogênio faz parte da lista desenvolvida pela Comissão das Comunidades Europeias (CEC), o qual classifica o Estrogênio como um Desregulador Endócrino (DEs), (BILA, 2007). Um conjunto de desreguladores tem sido detectado em águas subterrâneas, águas superficiais e estações de tratamento de esgoto, demonstrando assim a importância de uma melhor compreensão sobre o destino deles no ambiente. (FERREIRA, 2012).

Os DEs são capazes de desregular a reprodução e o desenvolvimento dos organismos aquáticos, como também, induzir características femininas aos organismos machos (SUMPTER e JOBLING, 2013). Em humanos são capazes de provocar o desenvolvimento de várias doenças como a redução da fertilidade, o câncer de mama, útero e próstata, alteração nas glândulas da tireoide e redução de fertilidade masculina (TERNES, 1998 e BILA 2007).

## Hormônios

Os hormônios estão diretamente ligados com a vida humana e animal, hormônios são substâncias químicas (mensageiras) fabricadas pelo sistema endócrino e que, lançadas na corrente sanguínea, coordenam o funcionamento do organismo como um todo (BIRKETT e LESTER, 2003).

A função do hormônio é executar uma ação reguladora, seja ela indutora ou inibidora, em órgãos ou regiões do corpo, sendo responsáveis por atividades de órgãos completos, níveis de sais, açúcares e líquidos no sangue, o uso e armazenamento de energia, o crescimento e o desenvolvimento de um determinado organismo, sua reprodução além de suas características sexuais (GHISELLI e JARDIM, 2007).

Com relação ao estresse, este se dá com o aumento da produção de (GC), mais precisamente cortisol, o qual também faz parte da família dos hormônios humanos, sendo produzido pelo córtex da supra-renal e que busca habilitar o organismo a responder ao estressor, salienta-se que a ansiedade está presente nos diferentes estados de estresse (MARTINS e SILVA, 2007).

Se tratando de hormônios, o hipotálamo tem uma função essencial no organismo, onde controla a adenohipófise na liberação dos hormônios gonadotróficos (LH e FSH), tireotrófico (TSH), adrenocorticotrófico (ACTH) e somatotrófico (GH), que regulam, respectivamente, as funções das gônadas, da tireóide, da supra-renal e o crescimento corporal (JONHSON 2003).

## Estrogênios

Estudos afirmam que está cada vez mais comum a presença dos chamados desreguladores endócrinos nas ETEs e em águas superficiais e subterrâneas, isso por causa de sua remoção ser apenas parcial (FERREIRA, 2012). A *U.S. Environmental Protection Agency* define os desreguladores endócrinos ambientais como sendo qualquer agente exógeno que interfere com a síntese, secreção, transporte, ação, ligação ou eliminação dos hormônios naturais no corpo e que são responsáveis pela manutenção da homeostase, reprodução, desenvolvimento e/ou comportamento (USEPA, 1998).

Os hormônios são classificados em três grupos principais: hormônios sexuais femininos ou ovarianos (estrógenos e progesterona); hormônios sexuais masculinos

ou testiculares (andrógenos, como a testosterona) e hormônios da gravidez (progesterona, estrógenos, gonadotropina coriônica humana, somatomatropina humana), além dos hormônios sintéticos que podem ser introduzidos em ambos grupos (AZEVEDO, 2011).

Dentre os hormônios sintéticos o estrogênio 17-alfa-etinilestradiol (EE2), é o principal componente estrogênico utilizado em formulações de contraceptivos orais, é um dos medicamentos mais consumidos no mundo (CUNHA et al., 2016).

O etinilestradiol é um estrógeno sintético bioativo, que possui fórmula molecular C<sub>20</sub>H<sub>24</sub>O<sub>2</sub>, massa molar 296,41g/mol e solubilidade em água à 200°C de 483µg/L, conforme mostra na Tabela 1 (GHISELLI & JARDIM, 2007).

**Tabela 1** Principais características físico-químicas de 17-alfa-etinilestradiol

PARÂMETRO	17-alfa-ETINILESTRADIOL
Nome	17 $\alpha$ -Etil-1,3,5(10)-estratriene-3,17 $\beta$ -diol
Número CAS	57-63-6
Fórmula Molecular	C <sub>20</sub> H <sub>24</sub> O <sub>2</sub>
Massa Molar (g mol <sup>-1</sup> )	296,4
Ponto de Ebulição (°C)	182-183
Massa Específica (mg/L <sup>-1</sup> ) (a 20°C)	4,8
Pressão de Vapor (mmHg)	4,5.10 <sup>-11</sup>
logKow (coeficiente de participação octanol-água)	3,9
Koc (coeficiente de sorção)	4770
Meia-vida (horas)	33 $\pm$ 13

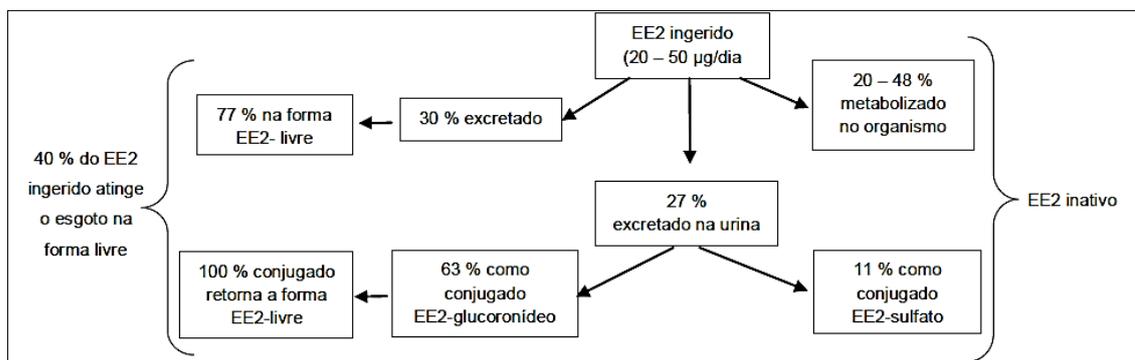
Fonte: AZEVEDO (2011) e CUNHA (2014).

Tendo em vista que o 17-alfa-etinilestradiol é um hormônio sintético, o qual é ingerido principalmente na forma de contraceptivos orais, sua presença no meio hídrico se dá por duas principais vias: pela excreção e pelo descarte (HEBERER, 2002). Sua forma de excreção é por meio da urina e fezes, na sua forma conjugada, de sulfatos e glicuronídeos (CANO et al., 1997).

O estrogênio, após ser excretado ou descartado, é então lançado em esgotos, os quais sucessivamente são lançados em ambientes aquáticos *in natura* ou na

forma de efluentes tratados em ETEs (WU et al., 2014). Vários autores ressaltam que as tecnologias convencionais aplicadas no tratamento de esgotos, são limitadas com relação à remoção do estrogênio (CUNHA et al., 2016).

Há uma grande preocupação com o destino do 17-alfa-etinilestradiol no ambiente, sendo que as pílulas comercializadas têm entre 20 e 50 µg de EE2 as quais são ingeridas em doses diárias. Destas entre 20 a 48% são metabolizadas no organismo e o restante é eliminado em forma original ou conjugada conforme mostra a figura 2.



**Figura 2-** Metabolismo de transformação de EE2 (RAIMUNDO,2011)

Os hormônios esteroides são de origem lipídica, onde o colesterol é o precursor das cinco classes de hormônios esteroides, que são estruturalmente relacionados (SIMPSON, 1979). A síntese de todos os hormônios esteroides inicia-se com a conversão do colesterol em pregnenolona. Os hormônios estrogênios desempenham um papel fundamental em vários processos biológicos durante o desenvolvimento e a vida adulta de vertebrados (NILSSON et al., 2001).

O estrogênio por si desempenha um papel fundamental na sinalização e consequente promoção de alterações na função celular (KUIPER et al., 1996). Sendo assim, estes hormônios estrogênicos foram detectados em afluentes e efluentes de ETE's em muitos países, entre os quais, o etinilestradiol, com concentrações variando de 0,2 a 273 ng/L<sup>-1</sup> em efluentes, dependendo do local pesquisado e do tipo de tratamento empregado (AZEVEDO, 2011).

Raimundo (2011) realizou estudo que trata sobre hormônios encontrados em águas residuárias, e conforme mostra especificamente na Tabela 2, o EE2 foi encontrado em mananciais, em concentrações entre 0,4 e 54 ng/L<sup>-1</sup> e em água tratada entre 0,15 e 0,5 ng/L<sup>-1</sup>.

**Tabela 2-** Concentrações (ng/L<sup>-1</sup>) de 17-alfa-etinilestradiol determinados em mananciais e água tratada de diferentes países

<b>Substância</b>	<b>Concentração média ng/L</b>	<b>Faixa de concentração o ng/L</b>	<b>País (cidade)</b>	<b>Referência</b>
<b>Concentrações encontradas em água tratada</b>				
17α-etinilestradiol	0,35	0,15-0,5	Alemanhã	(Kuch e Ballschmiter,2001)
<b>Concentrações encontradas em mananciais</b>				
17α-etinilestradiol		0,4	Holanda	(Verliefde et al., 2007)
17α-etinilestradiol	1,4	1,4	EUA	(Benotti et al., 2009)
17α-etinilestradiol		(3-54)	Brasil	(Moreira et al., 2009)

Fonte: Raimundo, 2011.

Há também estudos relacionados ao Brasil, em que Stumpf e colaboradores, em 1999 encontrou estrogênios naturais e sintéticos em ETE na Penha/RJ. Dentre todas as taxas de remoção apresentadas neste estudo, no esgoto bruto as taxas de remoção para o estrogênio 17-alfa-etinilestradiol, foram de 64% para o efluente do filtro biológico e 78% para o efluente do tanque de lodo ativado.

Como os estrogênios não são completamente metabolizados e nos efluentes tratados sua remoção não é completa, de alguma forma ele pode acabar retornando para o sistema, assim atingindo diferentes organismos. Estudos mostram que a exposição de organismos a estes compostos pode levar a feminização de peixes, alteração no desenvolvimento de moluscos e anfíbios, disfunções no metabolismo da testosterona em Daphnias e desenvolvimento anormal em órgãos em diferentes organismos aquáticos (BILA, 2007 e RAIMUNDO, 2011).

Em peixes os estrogênios têm sido classificados como os maiores responsáveis em provocar alterações endócrinas, além de desregular a reprodução e o desenvolvimento dos organismos (FAWELL et al., 2001, CUNHA et al., 2016, FOX, 2001).

## Organismo Modelo

O peixe-zebra (*Danio rerio*) também conhecido como Zebrafish, é um pequeno teleósteo de água doce, membro da família *Cyprinidae* (*Teleostei*), que apresenta uma fisiologia relativamente simples, podendo ser considerado um intermediário entre os seres humanos, os vermes e moscas, por exemplo, o que o torna apropriado para a pesquisa na área da genética, na farmacologia e na toxicologia (MAXIMINO et al, 2011).

Nativo da Índia, o peixe-zebra é uma espécie promissora no estudo de doenças e efeito de drogas e vem emergindo como uma importante espécie no estudo biomédico, principalmente nas áreas ligadas ao funcionamento do sistema nervoso (PIATO et al, 2010 e STEWART et al, 2014). Dentre as muitas vantagens da utilização do Zebrafish, estão inclusas a homologia fisiológica e genética alta em relação aos mamíferos (STEWART et al, 2014). A manipulação experimental também é considerada vantajosa em função das fêmeas reproduzirem o ano todo, e os animais poderem ser controlados e mantidos em grande número e baixos custos (SPENCE et al., 2008)

Seus hábitos são tipicamente diurnos, quando mostram seus maiores níveis de atividade durante o período da manhã, eles dormem com frequência, embora não exclusivamente durante a noite. Este claro processo circadiano de atividade, é responsável por governar tanto seus processos fisiológicos, quanto os bioquímicos ou comportamentais (DAMMSKI et al., 2011).

Com relação a sua genética, de acordo com HOWE K. et al., (2013) os genes do Peixe Zebra são altamente conservados e seu genoma é semelhante ao humano em 70 a 80%. O peixe Zebra também apresenta sistemas neurotransmissores semelhantes aos dos mamíferos, respondendo de uma forma previsível a alguns fármacos, devido a isso, muitos testes de estresse, medo e ansiedade têm utilizado o peixe-zebra como modelo (MAXIMINO et al, 2011).

Um fator importante também está ligado ao fato de que esse peixe possui como principal glicocorticoide o cortisol, que está envolvido na resposta ao estresse, ou seja, quando exposto a uma grande variedade de fatores de estresse os seus níveis de cortisol aumentam (DAL SANTO et al, 2013).

O Peixe zebra é uma das perspectivas atuais sobre o uso de espécies alternativas em relação a descobertas sobre a saúde humana e os impactos dos desastres ecológicos (PERKINS et al., 2013).

## **1.1 OBJETIVO GERAL**

Avaliar efeitos da exposição a diferentes concentrações de estrogênio sobre parâmetros comportamentais e endócrinos de Zebrafish.

## **1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

Avaliar efeitos da exposição ao estrogênio sobre o comportamento tipo ansiedade, comportamento social e agressividade;

Avaliar efeitos da exposição ao estrogênio sobre níveis de cortisol;

Avaliar efeitos da exposição ao estrogênio sobre os esteroides sexuais Testosterona e Estradiol.

## 2. MATERIAIS E MÉTODOS

### Nota ética

Os procedimentos experimentais têm parecer favorável da Comissão de Ética no Uso de Animais do Instituto Federal do Rio Grande do Sul (CEUA/IFRS) conforme protocolo nº 7018231115.

### Animais

Foram utilizados 410 peixes adultos (150-180 dias) de ambos os sexos (50/50) do tipo selvagem de Zebrafish (*Danio rerio*) adquiridos em fornecedor de peixes ornamentais. Os peixes foram mantidos sob fotoperíodo natural (14 horas de luz/ 10 horas escuro). A densidade foi de aproximadamente 1 peixe para cada 2 L. A temperatura da água foi mantida em torno de 27°C; pH próximo à 7,0, oxigênio dissolvido em  $6,5 \pm 0,4$  mg / L e amônia total a  $<0,01$  mg / L.

### Tempos de exposição

Utilizou-se o hormônio 17-alfa-etinilestradiol (SIGMA-Aldrich) em 5 concentrações, e os animais foram divididos em 6 grupos (n=12), 0 (controle), 0,5 , 1,5 , 5 , 50 e 75 ng/L. Estas concentrações foram estabelecidas baseadas em Raimundo 2011, onde realizamos adaptações na primeira concentração encontrada na literatura, seguindo uma sequência numérica crescente.

Os tempos de exposição ao 17-alfa-etinilestradiol foram de 1 hora (exposição aguda) e 15 dias (exposição crônica).

### Protocolo de extração Cortisol, Estradiol e Testosterona

Após exposição crônica ao hormônio sintético, os peixes foram capturados, imediatamente congelados em Nitrogênio líquido durante 10 a 30s, e armazenados à -20°C até a extração do cortisol. Objetivando evitar uma possível resposta de estresse induzida por manipulação, o tempo decorrido entre a captura e o abate foi inferior a 10 s. A análise hormonal foi realizada após a exposição crônica. A extração do cortisol do corpo inteiro foi realizada conforme Sink, 2013.

A concentração de cortisol de corpo inteiro (extrato ressuspendido em 1 mL de tampão PBS) foi determinada em cada amostra pelo teste de ELISA, (Kit Cortisol Elisa DBC- *Diagnostic Biochem Canada Inc*). As concentrações de testosterona e

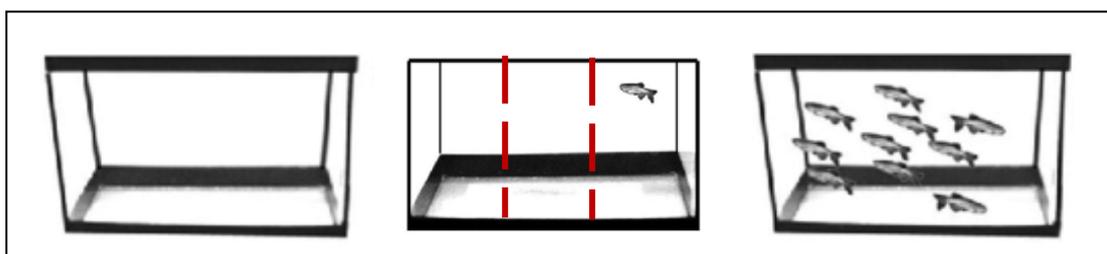
Estradiol foram determinadas a partir do mesmo extrato por meio dos kits de Testosterona Livre SYM e Estradiol SYM (*Symbiosis Diagnóstica Ltda*).

### Avaliação comportamental

Em todos os testes comportamentais, os peixes foram filmados por uma câmera Logitech C525 e os vídeos analisados usando ANYmaze® software (Stoelting CO, EUA). Para os três testes, utilizaram-se aquários de teste (20x20x25 cm; largura x altura x profundidade) contendo 7 litros de água variando a configuração conforme o teste.

### Teste de preferência Social

No teste que avalia o comportamento social, os peixes foram transferidos individualmente para o aquário de teste posicionado entre dois aquários com o mesmo tamanho, um sem peixes e o outro contendo um grupo de 15 peixes da mesma espécie. Entre cada um dos 3 aquários barreira opaca foi posicionada para impedir a visualização durante o período de 30 s após a transferência do peixe para o aquário teste. Após esse período, as barreiras foram removidas e o comportamento do peixe filmado durante 10 s. Para a análise dos vídeos, o aquário de teste foi virtualmente dividido em três segmentos. O primeiro segmento era o mais próximo do aquário contendo o cardume de indivíduos da mesma espécie, enquanto o terceiro segmento correspondia ao lado do aquário vazio. Neste teste avaliou-se o número de entradas, número de cruzamentos e tempo de permanência em cada segmento (GIACOMINI et al., 2016).



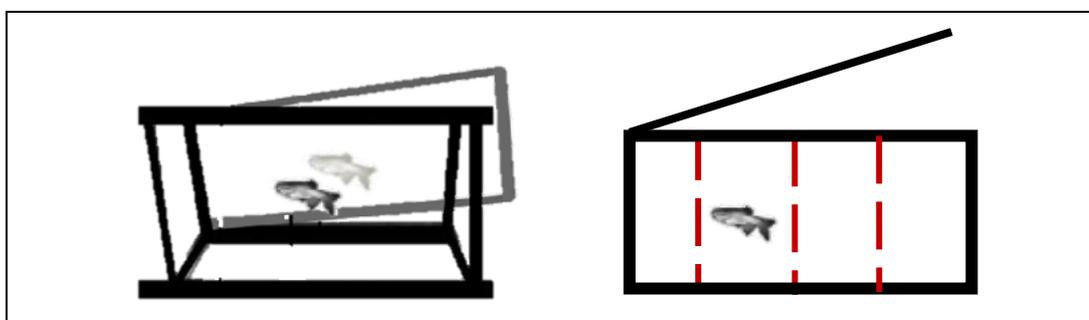
**Figura 3-** Protocolo Preferência social Adaptado de Siebel, A. M. et al., 2015

### Agressividade

Para avaliar o comportamento de agressividade foi utilizado o teste de agressividade induzida por espelho (MIA, Mirror induced aggressiveness, Gerlai,

2000). Utilizamos um aquário teste de 20x20x25 (largura x altura x profundidade), contendo 7 litros de água, e um espelho (45x40cm), posicionado ao lado do aquário em um ângulo de 22,5°, de modo que o lado direito do aquário estava mais próximo do espelho e o lado esquerdo mais afastado, a fim de reproduzir uma imagem próxima ou afastada do peixe.

A interação do peixe com a sua própria imagem foi registada durante 60 s após dois períodos de aclimatização (30 s e 10 min). Para analisar os vídeos, o aquário foi virtualmente dividido em quatro segmentos do mesmo tamanho, sendo o segmento 1 o mais próximo do espelho e o 4 o mais distante. Quantificou-se o número de entradas em cada segmento e o tempo de permanência em cada um deles (GIACOMINI et al., 2016).

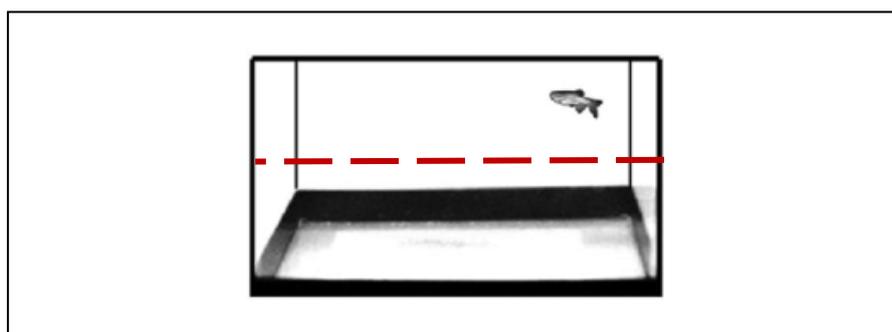


**Figura 4-** Protocolo Agressividade Adaptado de Siebel, A. M. et al., 2015

#### Teste do Tanque Novo

Este teste avalia aspectos locomotores e o comportamento exploratório e tipansiedade frente a um novo ambiente. Os peixes foram transferidos individualmente para o aquário teste, e em seguida filmados por 6 min. Para análise dos vídeos, o aquário foi virtualmente dividido em dois segmentos horizontais iguais (fundo e topo).

Os parâmetros analisados foram: tempo relativo no topo do tanque (%), número de transições ao topo e distância total percorrida (m) (Giacomini et al., 2016).



**Figura 5-** Protocolo Tanque Novo Adaptado de Siebel, A. M. et al., 2015

## Análise estatística

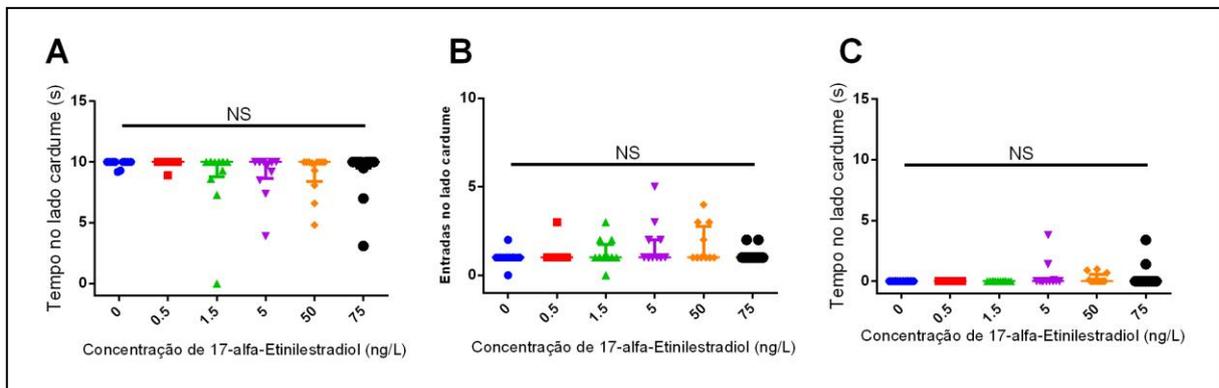
As análises estatísticas foram procedidas utilizando-se o programa de estatística *GraphPad Prism* (GraphPad Software, San Diego, CA, EUA). Os testes utilizados estão especificados junto aos resultados.

### 3 RESULTADOS

#### 3.1 Comportamento Social

##### Exposição aguda

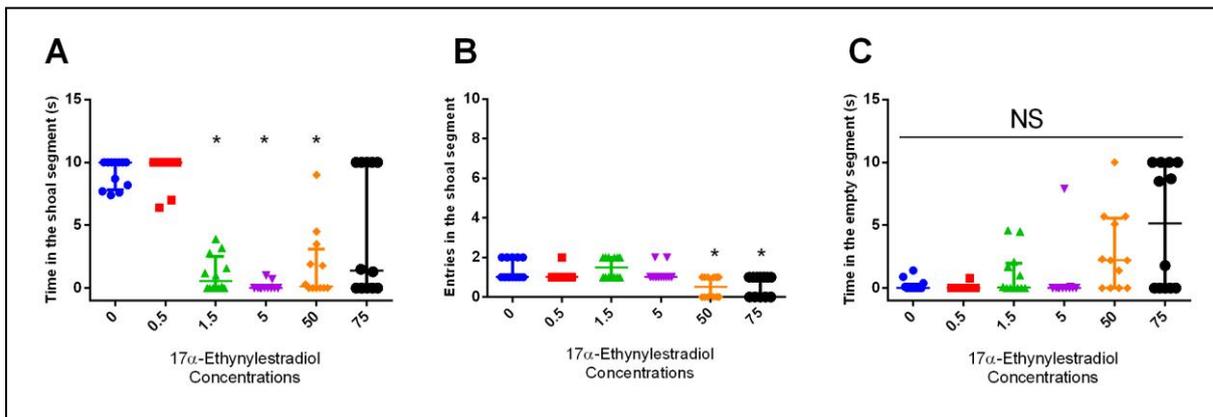
A exposição aguda ao 17-alfa-etinilestradiol não alterou o comportamento (figura 6), não alterando significativamente o tempo de permanência no segmento 1 (A), entradas no segmento 1 (B) e tempo no segmento do aquário vazio (C).



**Figura 6-** Comportamento social de peixes expostos agudamente à diferentes concentrações de 17-alfa-etinil estradiol. (A) tempo de permanência no segmento do cardume, (B) entradas no segmento do cardume, (C) tempo de permanência no segmento vazio. Dados expressos em mediana  $\pm$  intervalo interquartil analisados pelo teste de Kruskal-Wallis. (n=12).

##### Exposição Crônica

A exposição crônica prejudicou o comportamento social de peixes expostos as concentrações de 1,5, 5 e 50 ng/L de 17-alfa-etinilestradiol em relação ao controle não exposto. As entradas no segmento próximo ao cardume reduziram nos peixes expostos a 50 e 75 ng/L em relação ao controle (Figura 7).

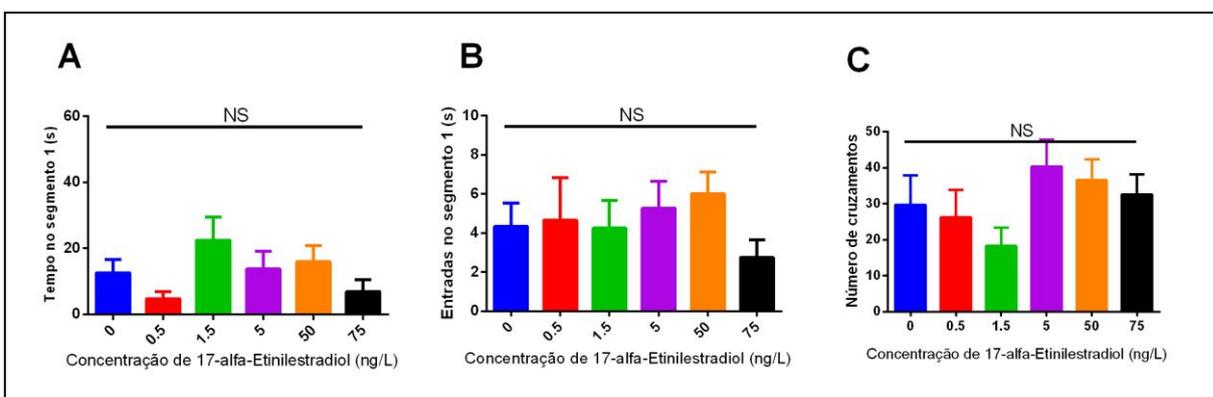


**Figura 7-** Comportamento social de peixes expostos cronicamente à diferentes concentrações de 17-alfa-etinil estradiol. (A) tempo de permanência no segmento do cardume, (B) entradas no segmento do cardume, (C) tempo de permanência no segmento vazio. Dados expressos em mediana  $\pm$  intervalo interquartil analisados pelo teste de Kruskal-Wallis (\*  $P < 0,05$ ). (n=12).

### 3.2 Agressividade

Exposição Aguda – tempo 30 s

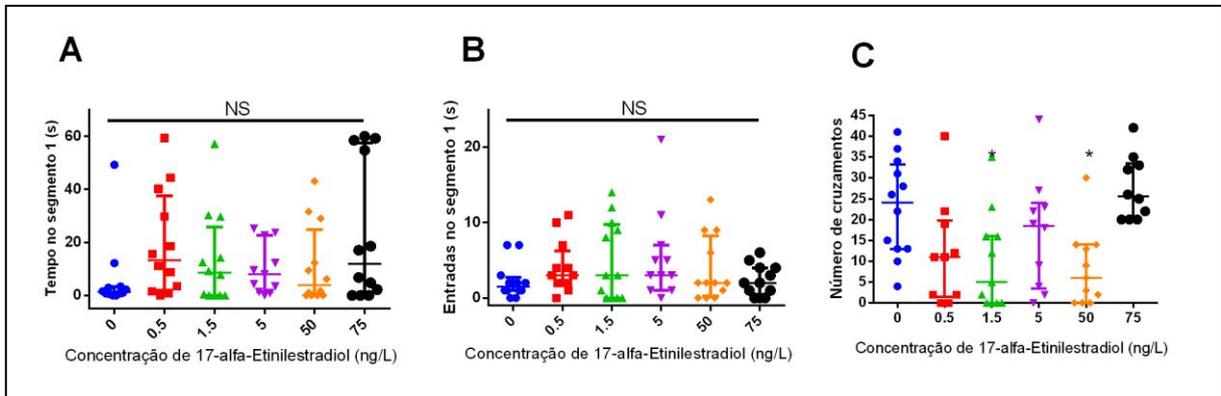
A exposição aguda não alterou o comportamento dos peixes no tempo 30s (Figura 8).



**Figura 8-** Agressividade de peixes expostos agudamente a diferentes concentrações de 17-alfa-etinil estradiol (período 30s). (A) tempo de permanência no segmento 1, (B) entradas no segmento 1 e (C) número total de cruzamentos. Dados expressos em médio  $\pm$  erro padrão da média analisados por Anova de uma via seguida pelo teste de Tukey. (n=12).

### Exposição Aguda - dez minutos

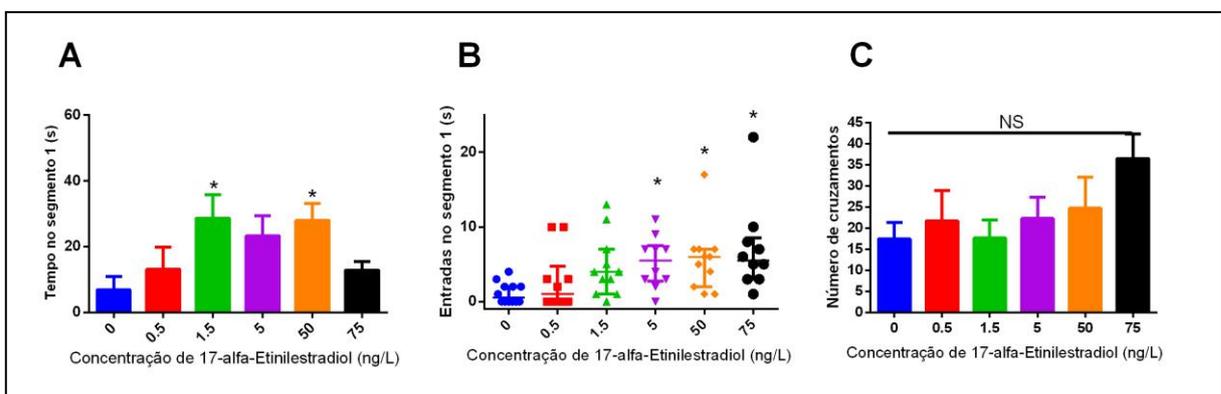
Após dez minutos, apenas os peixes expostos a 1,5 e 50 ng/L estavam menos ativos apresentando valores inferiores no parâmetro cruzamentos totais (Figura 9).



**Figura 9-** Agressividade de peixes expostos agudamente à diferentes concentrações de 17-alfa-etinil estradiol (período 10 minutos). (A) tempo de permanência no segmento 1, (B) entradas no segmento 1 e (C) número total de cruzamentos. Dados expressos em mediana  $\pm$  intervalo interquartis analisados pelo teste de Kruskal-Wallis (\*  $P < 0,05$ ). (n=12).

### Exposição Crônica – 30 segundos

A exposição crônica ao 17-alfa-Etinilestradiol no período 30s aumentou a agressividade dos peixes nas concentrações de 1,5, 50 ng/L evidenciado pelo aumento do tempo no segmento 1 (próximo ao espelho) e aumento nas entradas nesse segmento (Figura 10A e 10B). Não houve diferença no total de cruzamentos. (Figura 10C).

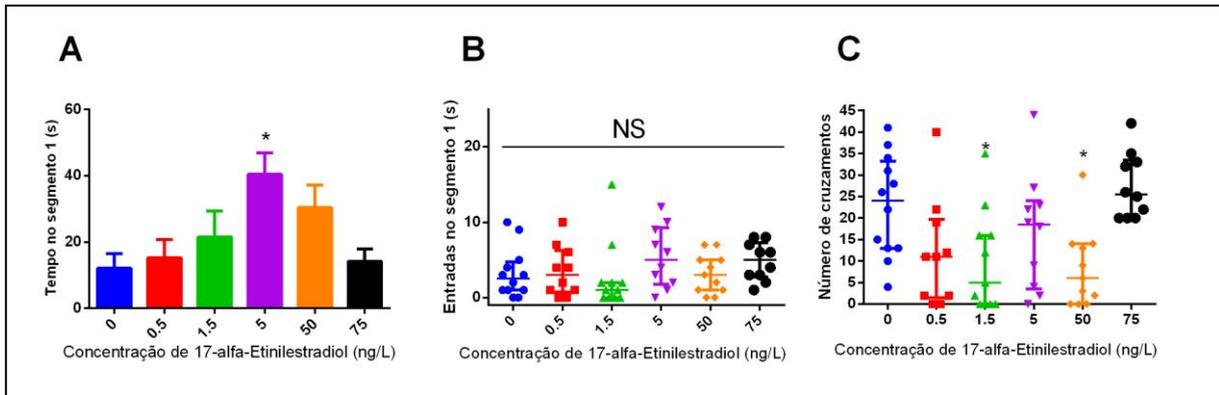


**Figura 10-** Agressividade de peixes expostos cronicamente à diferentes concentrações de 17-alfa-etinil estradiol (período 30s). (A) tempo de permanência no segmento 1, (B) entradas no segmento 1 e (C) número total de cruzamentos. Dados expressos em média  $\pm$  erro padrão da média analisados por Anova de uma via

seguida pelo teste de Tukey (A e C) e em mediana  $\pm$  intervalo interquartil analisados pelo teste de Kruskal-Wallis (B). (\*  $P < 0,05$ ) (n=12).

#### Exposição Crônica - dez minutos

A exposição crônica após dez minutos aumentou a agressividade dos peixes na concentração de 5 ng/L ( Figura 11).

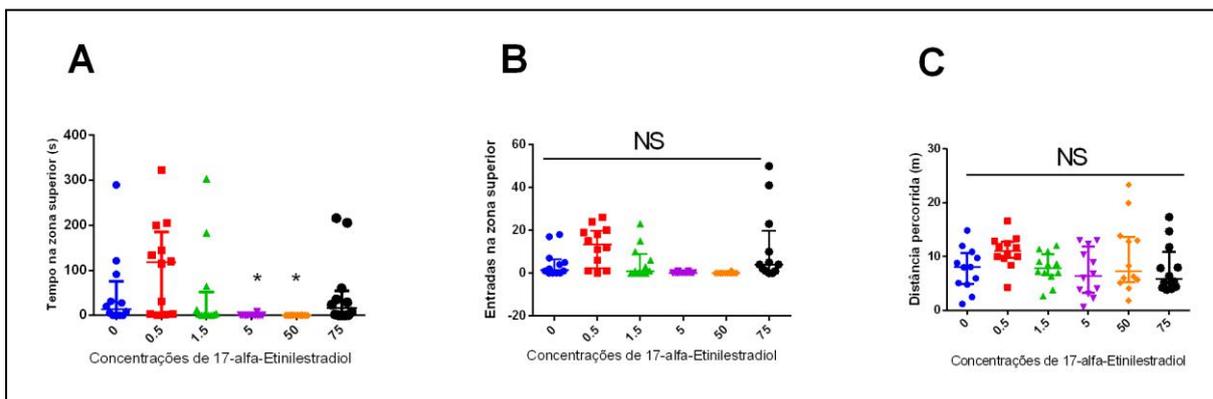


**Figura 11-** Agressividade de peixes expostos cronicamente à diferentes concentrações de 17-alfa-etinilestradiol (período 10 minutos). (A) tempo de permanência no segmento 1, (B) entradas no segmento 1 e (C) número total de cruzamentos. Dados expressos em média  $\pm$  erro padrão da média analisados por Anova de uma via seguida pelo teste de Tukey (A e C) e em mediana  $\pm$  intervalo interquartil analisados pelo teste de Kruskal-Wallis (B). (\*  $P < 0,05$ ). (n=12).

### 3.3 Teste do tanque novo

#### Exposição Aguda

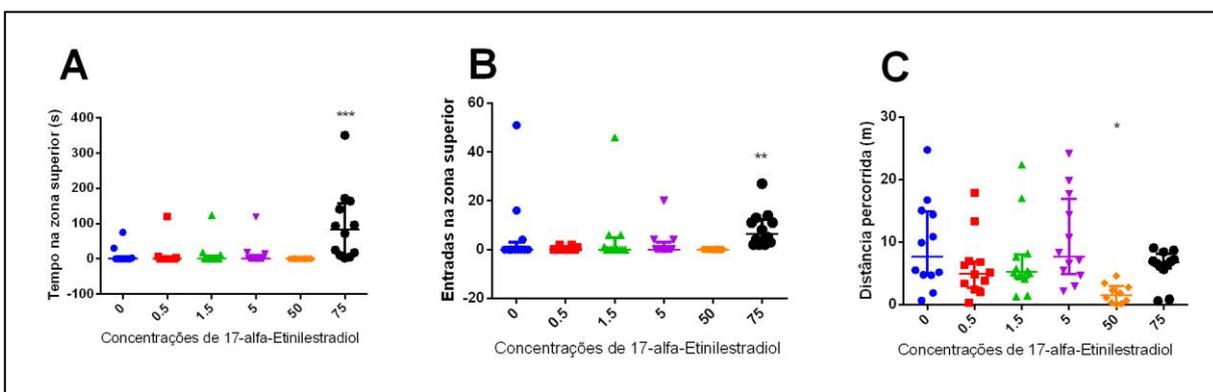
Os peixes expostos agudamente ao 17-alfa-etinilestradiol nas concentrações 5 e 50 ng/L de 17-alfa-Ethinylestradiol, diminuiram drasticamente o tempo no segmento superior do aquário, quando comparadas aos peixes não expostos (Figura 12A). Não foram detectadas diferenças estatísticas no número de transições ao topo e na distância percorrida (Figura 12B e 12C).



**Figura 12-** Parâmetros locomotores de peixes expostos agudamente à diferentes concentrações de 17-alfa-etinil estradiol. (A) tempo de permanência no topo do aquário, (B) entradas no topo e (C) distância percorrida. Dados expressos em mediana  $\pm$  intervalo interquartis analisados pelo teste de Kruskal-Wallis (B). (\*  $P < 0,05$ ). (n=12).

### Exposição Crônica

A exposição crônica a 75 ng/L de provocou um significativo aumento no tempo de permanência no topo do aquário (Figura 13A). O grupo exposto a essa concentração também apresentou maior número de transições ao topo do que o grupo controle (Figura 13B e 13C).

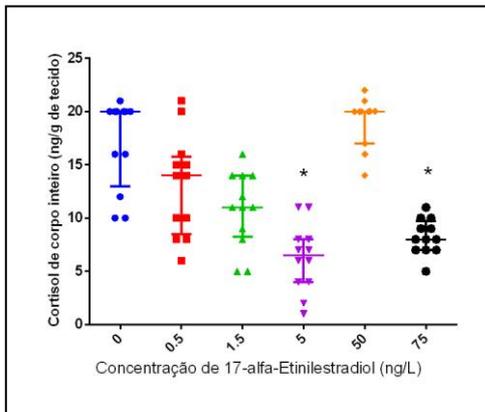


**Figura 13-** Teste de Ansiedade na exposição crônica. Peixes expostos cronicamente à diferentes concentrações de 17-alfa-etinil estradiol. (A) tempo de permanência no topo do aquário, (B) entradas no topo e (C) distância percorrida. Dados expressos em mediana  $\pm$  intervalo interquartis analisados pelo teste de Kruskal-Wallis (B). (\*  $P < 0,05$ , \*\*  $P < 0,01$ , \*\*\*  $P < 0,001$ ) (n=12).

### 3.4 Parâmetros endócrinos

#### Cortisol

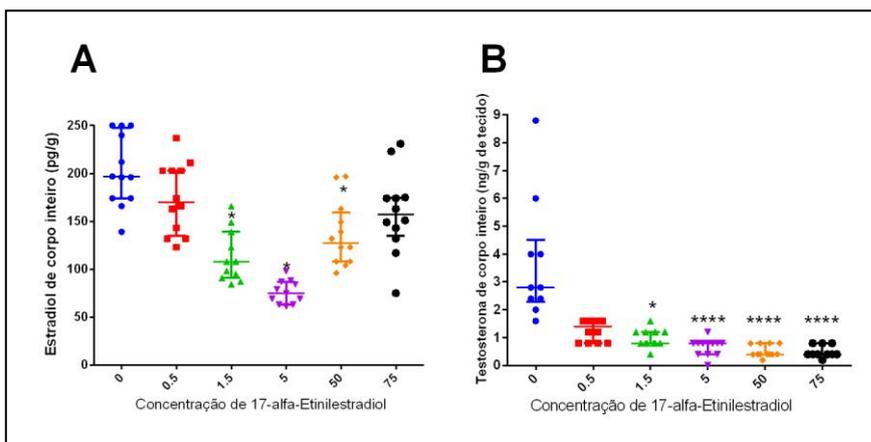
A exposição ao 17-alfa-etinilestradiol promoveu uma diminuição no nível de cortisol nas concentrações 5 e 75 ng/L em relação ao grupo controle (Figura 14).



**Figura 14-** Concentrações de Cortisol de corpo inteiro em peixes expostos à diferentes concentrações de 17-alfa-etinil estradiol. Dados expressos em mediana  $\pm$  intervalo interquartil analisados pelo teste de Kruskal-Wallis (\*  $P < 0,05$ ). (n=12).

#### Estradiol e Testosterona

Peixes expostos às concentrações 1,5, 5 e 50 ng/L de 17-alfa-Etinilestradiol, apresentaram valores inferiores de Estradiol (Figura 15A). Em relação à testosterona, as concentrações foram drasticamente reduzidas após exposição crônica ao 17-alfa-etinilestradiol nas concentrações 1,5, 5, 50 e 75 ng/L quando comparadas ao controle.



**Figura 15-** Concentrações de Estradiol (A) e de Testosterona (B) de corpo inteiro em peixes expostos à diferentes concentrações de 17-alfa-etinil estradiol. Dados expressos em mediana  $\pm$  intervalo interquartil analisados pelo teste de Kruskal-Wallis (\*  $P < 0,05$ , \*\*\*\*  $P < 0,0001$ ). (n=12).

#### 4. Combinação dos resultados

Para melhor interpretação dos resultados está exposto a seguir o quadro 2, o qual se resume os resultados que obtivemos com o trabalho, podendo perceber os efeitos principalmente em relação a exposição crônica.

<b>Exposição Aguda</b>					
	0,5	1,5	5	50	75
Comportamento social	-	-	-	-	-
Agressividade 30 seg	-	-	-	-	-
Agressividade 10 min	-	-	-	-	-
Ansiedade	-	-	↑	↑	-

<b>Exposição Crônica</b>					
	0,5	1,5	5	50	75
Comportamento Social	-	↓	↓	↓	-
Agressividade 30 seg	-	↑	↑	-	-
Agressividade 10 min	-	-	↑	-	-
Ansiedade	-	-	-	-	↓
Cortisol	-	-	↓	-	↓
Estradiol	-	↓	↓	↓	-
Testosterona	-	↓	↓	↓	↓

Legenda: ↑ Aumenta parâmetro analisado      ↓ Diminui parâmetro analisado

Quadro 2: Resultado dos parâmetros analisados

## 4 DISCUSSÃO

Aqui nós mostramos que a presença do hormônio sintético 17-alfa-etinilestradiol, mesmo em baixas concentrações, provoca alterações comportamentais e endócrinas em peixes. Esses resultados são alarmantes tanto no que concerne às possíveis modificações que esse toxicante pode provocar no ambiente, quanto para humanos, uma vez que o zebrafish é um modelo animal com alto poder translacional.

Percebemos que a exposição ao hormônio sintético alterou o comportamento do organismo modelo estudado, principalmente na análise crônica, promovendo alterações em todos os parâmetros analisados, conforme mostra o quadro 2. O comportamento é considerado uma resposta a uma atividade integrada do sistema nervoso, sistema imunológico e o sistema endócrino, permitindo assim que o corpo se envolva de forma defensiva, ativa e adaptável às situações e ao ambiente (PIATO et al, 2011).

Referente ao comportamento de agressividade em resposta à exposição crônica ao toxicante ocorreu um aumento nesse parâmetro nos peixes expostos às concentrações de 1,5 e 50 ng/L nos 30s de ambientação. Ainda na avaliação da exposição crônica após 10 minutos de habituação houve um aumento na agressividade na concentração de 5 ng/L, o que evidencia que o peixe tornou-se mais agressivo após maior período de latência. A maioria das espécies usa a agressão para estabelecer hierarquias de dominância com os indivíduos, os níveis de agressividade estão relacionados também a propriedade de território, tamanho do território e sucesso reprodutivo (ARAÚJO, 2012; GERLAI, 2000).

Neste estudo percebemos uma redução no comportamento social na exposição crônica no grupo 1.5, 5 e 50 ng/L, considerando o tempo em que o animal avaliado permaneceu no segmento próximo ao cardume, representando prejuízo no comportamento social na exposição crônica. Peixes-zebra são espécies de cardume que exibem comportamento social desde o início da vida (GERLAI, 2003), esta espécie possui uma tendência natural a nadar perto de indivíduos da mesma espécie, o que é importante para minimizar o risco de predação (KALUEFF, 2016). Considerando a importância da aglomeração em cardume, há relatos atribuindo a diminuição deste comportamento em peixes-zebra expostos de forma aguda à fluoxetina e diazepam, lembrando que essa falta de interação pode levar à

vulnerabilidade que afeta a reprodução e sobrevivência (GIACOMINI et al., 2016). Giacomini e seus colaboradores (2016) relatam que os peixes expostos ao estresse agudo reduzem o comportamento social e aumentam a agressividade. Assim evidenciando que o estresse pode alterar a expressão do hormônio liberador de corticotrofina (CRH) no hipocampo e amígdala, bem como de neurotransmissores e neuropeptídeos relacionados ao estresse, interação social e agressividade em seres humanos (BACKSTRÖM, T. et al, 2013).

Com relação ao teste Tanque Novo, o comportamento tipo ansiedade na exposição aguda afetou o organismo nas concentrações 5 e 50 ng/L, promovendo uma resposta ansiogênica. Ao contrário da exposição crônica, onde o 17-alfa-etinilestradiol tem potencial ansiolítico em relação ao organismo, uma vez que o tempo de permanência no segmento topo nos grupos 50 e 75 ng/L aumentaram consideravelmente. O peixe Zebra possui alta homologia genética (HOWE, 2013), além de relação aos traços de ansiedade (PIATO et al., 2011). Há relação da ansiedade com outros fármacos, sendo que drogas ansiolíticas, tais como buspirona e fluoxetina aumentaram o tempo no topo do tanque, além de diminuir a latência para sair do fundo do aquário (PAGNUSSAD, 2011). Comumente o peixe-zebra possui um padrão normal de comportamento frente ao tanque novo, se este comportamento for afetado, como mostra nosso estudo, representa risco à espécie, em relação à predação da espécie (KISYL, et al., 2017).

O comportamento em cardume proporciona benefícios em relação à sobrevivência da espécie, incluindo acesso ao alimento, aos coespecíficos e a defesa contra predadores (LEDESMA; MCROBERT, 2008). A presença de fármacos na água pode ter ação sobre o comportamento da espécie, se tornando uma séria ameaça ao ambiente aquático (CALISTO; DOMINGUES; ESTEVES, 2011). Com isso, a presença do 17-alfa-etinilestradiol no meio hídrico apresenta um impacto negativo no comportamento do organismo analisado, podendo colocar em risco, não só o organismo estudado, bem como várias espécies e populações em desenvolvimento (CUNHA et al., 2016).

Já está bem estabelecida a relação entre os níveis de cortisol, medidos em sangue de peixe e tecidos, e a resposta a vários estímulos ambientais (Barcellos et al., 2004). Sobre a desregulação endócrina, com relação ao cortisol, ocorreu uma diminuição no nível de cortisol nas concentrações 5 e 75 ng/L. Parker et al. (2012) verificaram que peixes-zebra isolados apresentaram redução no comportamento tipo

ansiedade e nos níveis de cortisol em relação aos peixes agrupados, resultado semelhante ao nosso estudo. Giacomini et al., (2016) mostra que a exposição aguda à fluoxetina ou diazepam exerce efeito tipo ansiolítico. O comportamento tipo ansiedade após o estresse agudo pode estar relacionado com o bloqueio da resposta de cortisol (ABREU et al., 2014). No presente estudo, podemos evidenciar a relação entre a diminuição do nível de cortisol com o resultado ansiolítico observado, onde o peixe se torna menos ansioso após a exposição crônica ao 17-alfa-etinilestradiol, uma vez que processos intracelulares e neurológicos são modulados pelo cortisol (BERNE, 2010).

Já em relação ao Estradiol as concentrações 1,5, 5 e 50 ng/L promoveram uma redução nos níveis do hormônio comparados ao controle. O Etinilestradiol e os estrógenos, na rota oral, são convertidos predominantemente em estrona, cuja atividade biológica é menor que o estradiol. Talvez isso explique o fato de haver reduzido os níveis de estradiol na análise realizada (ISOTTON, 2008). Para Testosterona a substância 17-alfa-etinilestradiol representou uma diminuição em quatro das cinco concentrações avaliadas, sendo elas 1.5, 5, 50 e 75 ng/L em relação ao grupo controle. Em humanos, o uso do Etinilestradiol por via oral promove também impacto hepático significativo, onde pode propiciar vasoconstrição e retenção de sódio e água, assim como o aumento da síntese da globulina carregadora dos hormônios sexuais, o qual modula as taxas de testosterona podendo assim determinar a diminuição da oferta de androgênios circulantes no plasma (STRUFALDI, 2012; ZADRAN et al., 2009).

Em relação ao estresse, as respostas comportamentais e endócrinas, podem sofrer influência do agrupamento ou do isolamento (PARKER et al., 2012). Nos ecossistemas aquáticos, a resposta ao estresse é importante para a reprodução, osmorregulação, e evitar predadores (WENDELAAR BONGA, 1997). Estudos mostram que há presença generalizada de 17-alfa-etinilestradiol no ambiente aquático o que pode representar uma tendência de bioconcentração no tecido gonadal, fato que vem sendo associado com efeitos sobre o desempenho reprodutivo em peixes (ACEVEZS, 2016). Assim, sabendo que no ambiente natural, esses peixes vivem em cardumes (GIACOMINI et al, 2015), evidenciamos que se o comportamento tipo social estiver afetado, bem como se houver um aumento de agressividade, esta espécie pode ter dificuldades para sobreviver ao ambiente.

Os efeitos da contaminação ambiental por desreguladores endócrinos constitui tópico internacionalmente importante que implica diretamente na qualidade de vida dos seres humanos, na preservação da biota e na proteção dos recursos hídricos (AMÉRICO, 2012). Como foi constatado no estudo a alteração comportamental pode influenciar no meio de reprodução, predação e instinto de sobrevivência, podendo causar um vasto impacto ecológico.

Dessa forma, sabemos que o 17-alfa-Etinilestradiol afetou parâmetros comportamentais e endócrinos na espécie estudada, portanto, é de suma importância maximizar os cuidados quanto à contaminação do ambiente aquático, e promover eficientes tratamentos de efluentes, uma vez que as águas residuais não tratadas corretamente são as principais vias de contaminação, podendo então impactar diretamente o equilíbrio dos ecossistemas.

## 5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O estudo realizado avaliou os efeitos do hormônio 17-alfa-etinilestradiol, o qual está presente no dia a dia dos humanos e conseqüentemente no meio ambiente, o que nos traz resultados surpreendentes, uma vez que mesmo em pequenas concentrações (ng/L), este fármaco tem conseqüências na espécie estudada, a qual foi utilizada para demonstrar o efeito ambiental, e conseqüentemente, para se pensar um possível efeito de biomagnificação considerando sua origem lipídica, podendo assim atingir outros organismos e até mesmo humanos.

A substância estudada afeta tanto o sistema endócrino através das sínteses dos hormônios, quanto o comportamento avaliado. A exposição crônica (15 dias) foi a que mais resultou em conseqüências para o organismo a qual afetou todos os parâmetros avaliados.

Nos resultados obtidos em exposição crônica, podemos associar a resposta ansiolítica com a diminuição do nível de cortisol, além da agressividade ter aumentado nesta exposição, bem como ocorreu uma diminuição no comportamento social.

Conclui-se, portanto que o 17-alfa-etinilestradiol, afeta além do sistema endócrino, o comportamento, pela ação do hormônio esteroide convergir para o desenvolvimento do sistema nervoso, tendo reflexos em relação à espécie, tornando-a mais susceptível à predação bem como ter efeitos negativos no comportamento reprodutivo, comprometendo a manutenção de espécies mais sensíveis.

## 7 REFERÊNCIAS

ABREU, M.S. et al. Diazepam and fluoxetine decrease the stress response in zebrafish. **PLoS ONE**, v.9, e103232, 2014.

ACEVES, M.A.B. et al., Estrogen regulation of gene expression in the teleost fish immune system. **Fish & Shellfish Immunology**, p.42-49, 2016.

AMÉRICO, J. H. P.; ISIQUE, W. D.; MINILLO. A.; CARVALHO, S. L.; TORRES, N. H. Fármacos em uma estação de tratamento de esgoto na região Centro-oeste do Brasil e os riscos aos recursos hídricos. **Revista Brasileira de Recursos Hídricos**, v.17, n.3, p.61-67, 2012.

ARAÚJO, F. G. **Ácidos Graxos Dietéticos em Parâmetros Reprodutivos de Fêmeas de Zebrafish (Danio rerio)**. Tese de Doutorado (Programa de Pós-Graduação em Zootecnia), Universidade Federal de Lavras, Minas Gerais, 2012, 105p.

ARCHELA, E. et al. Considerações sobre a geração de efluentes líquidos em centros urbanos. **Geografia**. v.12, n. 1, p. 517-525, 2003.

AMÉRICO, J. H. P. et al., Desreguladores endócrinos no ambiente e seus efeitos na biota e saúde humana. **Pesticidas: ecotoxicol. e meio ambiente**, v. 22, p. 17-34, 2012.

AZEVEDO, M. G. C. O. **Estudo da potencialidade de aplicação da fotocatalise heterogênea na degradação de 17  $\alpha$ -etinilestradiol em água**. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia Ambiental), Centro de Ciências e Tecnologias, Universidade Estadual da Paraíba, Paraíba 2011.

BACKSTRÖM, T. et al. CRF and urotensin I effects on aggression and anxiety-like behavior in rainbow trout. **J. Exp. Biol.**, v. 214, p. 907–914, 2011.

BARCELLOS, L.J.G. et al. Can Zebrafish *Danio rerio* learn about predation risk? The effect of a previous experience on the cortisol response in subsequent encounters with a predator. *Journal of Fish Biology*, v. 76, p. 1032-1038, 2010.

BARCELÓ, D. Pharmaceutical-residue analysis. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 26, n. 6, p. 454-455, 2007.

BERNE, R. M.; KOEPPEN. S, B. A. **Berne & Levy physiology**. Philadelphia, PA: Mosby/Elsevier, 2010.

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

BILA, D. M.; DEZOTTI, M. Desreguladores endócrinos no meio ambiente: efeitos e consequências. **Química Nova**. v. 30, n.3, p.651- 666, 2007.

BIRKETT, J. W. e LESTER, J. N. Endocrine Disrupters in Wastewater and Sludge Treatment Processes. **IWA Publishing**, 1ed, 294p. 2003.

CALISTO, V.; DOMINGUES, M.R.M; ESTEVES, V.I. Photodegradation of Psychiatric pharmaceuticals in aquatic environments – Kinetics and photodegradation products. **Water Research**, v. 45, p. 6097- 6106, 2011.

CANO, A.; ROURA, A. C.; CORTIT, L. I. **Farmacología de los anticonceptivos hormonales orales**. Manual de anticoncepción hormonal oral. Zaragoza: Sociedad Española de Contracepción, p. 75-99, 1997.

CEC - **Commission of the European communities**. Community strategy for endocrine disrupters: a range of substances suspected of interfering with the hormone systems of humans and wildlife. Communication from the commission to the council and the European parliament, Brussels, 1999.

CUNHA, D. L. **Avaliação do padrão de consumo do 17 $\alpha$ -etinilestradiol no município de Santa Maria Madalena – RJ**. Dissertação (Mestrado em Ciências na área de Saúde Pública e Meio Ambiente) Escola Nacional de Saúde Pública Sergio Arouca, Rio de Janeiro, 2014.

CUNHA, D. L. et al. Regulamentação do estrogênio sintético 17 $\alpha$ -etinilestradiol em matrizes aquáticas na Europa, Estados Unidos e Brasil. **Caderno de Saúde Pública**, v.32, n.3, 2016.

DAL SANTO, G. et al. Acute restraint stress induces an imbalance in the oxidative status of the zebrafish brain. **Neuroscience Letters**, v. 558, p. 103-108, 2013.

DAMMSKI, A. P. et al. **Zebrafish-Manual de Criação em Biotério**. Universidade Federal do Paraná, Curitiba PR, 1<sup>o</sup> Edição, 2011.

DEBLONDE T.; COSSU, L. C.; HARTEMANN P. Emerging pollutants in wastewater: a review of the literature. **Int J Hyg Environ Health**, v.8, p.214, 2011.

FAWELL, J. K et al. Oestrogens and Oestrogenic Activity in Raw and Treated Water in Severn Trent Water. **Water Research**, v.35, p.1240-1244. 2001.

FERREIRA, A. P. et al. Ocorrência e detecção de desreguladores endócrinos em estações de tratamento de esgoto: complicações ao meio ambiente. **Revista brasileira de farmácia**, v. 93, n. 2, p. 255-264, 2012.

FOX G. A. Wildlife as sentinels of human health effects in the Great Lakes - St. Lawrence basin. **Environ Health Perspectives**, v. 109, p. 853-861, 2001.

GERLAI, R. et al. Drinks like a fish: zebra fish (*Danio rerio*) as a behavior genetic model to study alcohol effects. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 67, p. 773-782, 2000.

GERLAI, R. Zebra Fish: An Uncharted Behavior Genetic Model. **Behavior Genetics**, v. 33, p. 461-468, 2003.

- GEYER, H. J. et al. Bioaccumulation and occurrence of endocrine-disrupting chemicals (EDCS), persistent organic pollutants (POPS), and other organic compounds in fish and other organisms including humans. **Journals Bioaccumulation**, v.2, 2000.
- GIACOMINI, A. C. V. V. et al. My stress, our stress: Blunted cortisol response to stress in isolated housed zebrafish. **Physiology & Behavior**. v. 139, p. 182-187, 2015.
- GIACOMINI, A. V. V. et al. Fluoxetine and diazepam acutely modulate stress induced-behavior. **Behavioural Brain Research**, n.296 p.301–310, 2016
- GHISELLI, G. e JARDIM, W. F. Interferentes endócrinos no ambiente. **Química Nova**, v.30, n.3, p.695-706, 2007.
- HAWKINS, M.B. et al. Identification of a third distinct estrogen receptor and reclassification of estrogen receptors in teleosts. **Proc. Natl. Acad. Sci.** v. 97, p. 10751–10756, 2000.
- HEBERER T. Occurrence, fate, and removal of pharmaceutical residues in the aquatic environment: a review of recent research data. **Toxicol Lett**, v.131, p. 5-17, 2002.
- HIRSCH, R. et al. Occurrence of antibiotics in the aquatic environment. **Sci. Total Environ.** v.225, p. 109-118, 1999.
- HOWE K.; et al. The zebrafish reference genome sequence and its relationship to the human genome. **Nature**, v.496, p. 498–503, 2013.
- IBGE- Pesquisa Nacional de Amostras de Domicílios (Pnad), 2015.
- ISOTTON, A. L. et al., Influências da reposição de estrógenos e progestágenos na ação do hormônio de crescimento em mulheres com hipopituitarismo. **Arq Bras Endocrinol Metab.** v.52, n.5, p.901-916, 2008.
- JONHSON, L.R. **Essencial Medical Physiology**. Academic Press. 3ed, USA. 2003.
- KALUEFF, A. V. et al. Zebrafish neurobehavioral phenomics for aquatic neuropharmacology and toxicology research. **Aquatic Toxicolog.** v. 170, p. 297-309, 2016.
- KELLY, M.J.; MOSS, R.L.; DUDLEY, C.A. Differential sensitivity of preoptic-septal neurons to microelectrophoresed estrogen during the estrous cycle. **Brain Res.** v.114, p.152–157, 1976.
- KELLY, M.J.; MOSS, R.L.; DUDLEY, C.A.;. The effects of microelectrophoretically applied estrogen, cortisol and acetylcholine on medial preoptic-septal unit activity throughout the estrous cycle of the female rat. *Exp. Brain Res*, v.30, p.53–64, 1977
- KYSIL, E. V. et al., Comparative Analyses of Zebrafish Anxiety-Like Behavior Using Conflict-Based Novelty Tests. **Zebrafish**. v.14, n.3, 2017.

KUIPER, G.G. et al., Cloning of a novel receptor expressed in rat prostate and ovary. **Proc. Natl. Acad. Sci**, v.93, p. 5925–5930, 1996.

LEDESMA, J.M.; MCROBERT. Shoaling in juvenile guppies: The effects of body size and shoal size. **Behavioural Processes**, v. 77, p. 384–388, 2008.

MARTINS, C. C. e SILVA, D. Implicações do estresse sobre a saúde e a doença mental. **Arquivos Catarinenses de Medicina**, v. 36, n. 4, 2007.

MAXIMINO, C. et al. Pharmacological analysis of zebrafish (*Danio rerio*) scototaxis. **Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry**. v. 35, n. 2, p. 624-631, 2011.

NILSSON, S. et al., Mechanisms of estrogen action. **Physiol**. v.81, p.1535–1565, 2001.

PAGNUSSAT, N. **Efeito Estabilizador do Grupo em Comportamento Exploratório, Ansiedade, Cognição e Níveis de Cortisol em Peixe**. Dissertação (Mestrado em Biologia Celular e Molecular), Faculdade de Biociências da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2011, 44p.

PARKER, M.O.; MILLINGTON, M.E.; COMBE, F.J.; BRENNAN, C.H. Housing Conditions Differentially Affect Physiological and Behavioural Stress Responses of Zebrafish, as well as the Response to Anxiolytics. **PLoS ONE**, v.7, e34992, 2012.

PERKINS, E. J. et al. Current perspectives on the use of alternative species in human health and ecological hazard assessments. **Environmental Health Perspectives**. v.121, p. 1002-101, 2013.

PIATO, A. L. et al. Unpredictable chronic stress model in zebrafish (*Danio rerio*): Behavioral and physiological responses. **Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry**. v. 35, p. 561-567, 2011.

RAIMUNDO, C. C. M. **Contaminantes emergentes em água tratada e seus mananciais: sazonalidade, remoção e atividade estrogênica**. Dissertação (Doutorado em Química Analítica)- Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Química, Campinas, 2011.

RICHARSON, S. D.; TERNES, T. A. Water analysis: emerging contaminants and current issues, **Anal Chem**, v.83, p. 4614- 4648, 2011.

SIMPSON, E.R. Cholesterol side-chain cleavage cytochrome P450, and the control of steroidogenesis. **Endocrinology**, v.13, p.213-227, 1979.

SPENCE R. et al.. The behaviour and ecology of the zebrafish, *Danio rerio*. **Biol Rev Camb Philos Soc**. v.83, n.1, p.13-34, 2008.

STEWART, A. M et al. Zebrafish models for translational neuroscience research: from tank to bedside. **Tends In Neurosciences**. v. 37, n. 5, p. 264-278, 2014.

STRUFALDI, R. et al., Contracepção hormonal e sexualidade. **Revista Brasileira de Medicina**. v. 12. p. 19-12, 2012.

STUMPF, M. et al. Polar drug residues in sewage and natural waters in the state of Rio de Janeiro, Brazil. **Sci. Total Environ**. n.225, p.135-141, 1999.

SUMPTER, J. P.; JOBLING, S. The occurrence, causes and consequences of estrogens in the aquatic environment. **Environmental Toxicology and Chemistry**. v. 32, p. 249–251, 2013.

SUN, H. J. et al. Short-term exposure of arsenite disrupted thyroid endocrine system and altered gene transcription in the HPT axis in zebrafish. **Environmental Pollution**. v. 205, p. 145-152, 2015.

TERNES, T. A.; Occurrence of drugs in German sewage treatment plants and rivers. **Water Research**. v.32, p. 3245- 3260, 1998.

USEPA, United States Environmental Protection Agency. Field applications of in situ remediation technologies: chemical oxidation. Office of Solid Waste and Emergency Response, **Technology Innovation Office**. p. 1-31, 1998.

VON, S. M. **Introdução à Qualidade das Águas e Tratamento de Esgotos**. Belo Horizonte: Departamento de Engenharia Sanitária e Ambiental, UFMG. 3ed, 2005.

ZADRAN S. et al., 17-Beta-estradiol increases neuronal excitability through MAP kinase-induced calpain activation. **Proc Natl Acad Sci**. v.106, n.51, p.21936-21941, 2009;

WENDELAAR BONGA, S.E., 1997. The stress response in fish. **Physiol. Rev**. n77, p. 591–625, 1997.

WESIERSKA, G. J. Endocrine disruptor contaminants in water and their adverse effects in humans. **Ecohidrologia & Hidrobiologia**, v.6, n.1-4, p. 233-242, 2006.

WU, Q. Y. et al. Health risk induced by estrogens during unplanned indirect potable reuse of reclaimed water from domestic wastewater. **Huan Jing Ke Xue**, v. 35, p. 1041-1050, 2014.