



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

**JÉSSICA REIS DE OLIVEIRA SOFIATTI**

**EFEITOS NEUROENDÓCRINOS E COMPORTAMENTAIS DO HORMÔNIO  
ESTROGÊNIO EM ZEBRAFISH**

**ERECHIM  
2018**

**JÉSSICA REIS DE OLIVEIRA SOFIATTI**

**EFEITOS NEUROENDÓCRINOS E COMPORTAMENTAIS DO  
HORMÔNIO ESTROGÊNIO 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  
2018

## UNIVERSIDADE FEDERAL DA FRONTEIRA SUL

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

### Bibliotecas da Universidade Federal da Fronteira Sul - UFFS

Sofiatti, Jéssica Reis de Oliveira  
EFEITOS NEUROENDÓCRINOS E COMPORTAMENTAIS DO HORMÔNIO  
ESTROGÊNIO EM ZEBRAFISH / Jéssica Reis de Oliveira  
Sofiatti. -- 2019.  
69 f.:il.

Orientadora: Doutora Rosilene Rodrigues Kaizer Perin.  
Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal da  
Fronteira Sul, Programa de Pós-Graduação em Ciência e  
Tecnologia Ambiental-PPGCTA, Erechim, RS, 2019.

1. 17alfa-etinilestradiol. 2. Acetilcolinesterase. 3.  
Comportamento. 4. Cortisol. I. Perin, Rosilene Rodrigues  
Kaizer, orient. II. Universidade Federal da Fronteira  
Sul. III. Título.

**JÉSSICA REIS DE OLIVEIRA SOFIATTI**

**EFEITO DO HORMÔNIO ESTROGÊNIO SOBRE O SISTEMA NEUROENDÓCRINO  
E COMPORTAMENTAL DE 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 17/12/2018.

Orientador (a): Prof<sup>a</sup>. Dra. Rosilene Rodrigues Kaizer Perin

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

BANCA EXAMINADORA

---

Prof<sup>a</sup>. Dra. Rosilene Rodrigues Kaizer Perin – UFFS/IFRS

---

Prof. Dr. Leonardo José Gil Barcellos – UPF

---

Prof<sup>a</sup>. Dra. Gessi Koakoski – UPF

ERECHIM/RS, dezembro de 2018

*A Deus, ao meu amor Cleber e a minha  
família, com muito carinho.*

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço a Deus, por me permitir chegar até aqui, conquistar essa vitória, guiar meus passos durante o percurso e por todas as bênçãos que me proporcionou até agora, em especial a que carrego em meu ventre.

Ao meu marido Cleber, que me apoiou e incentivou sem hesitar, sempre com paciência e carinho comigo em todos os momentos, bons e difíceis. Obrigada amor por não desistir de mim, por todo carinho, compreensão e amor. Suas palavras, seus abraços e suas orações me guiaram até aqui. Eu te amo!

Aos meus pais pela vida, por todo amor e por todo apoio que sempre me deram e sei que sempre darão. E a minha linda irmã por me escutar, entender e sempre dizer palavras que me estimularam a continuar, mesmo longe você foi essencial.

Dedico a vocês esse trabalho, pois não teria conseguido sem o incentivo, compreensão e amor de vocês.

Agradeço a minha orientadora Rosilene, pela oportunidade, por acreditar em mim, por toda a paciência e compreensão. Obrigada profe por cada palavra de apoio, de fé e por ter sido sempre carinhosa e paciente comigo.

Aos meus queridos colegas de laboratório. Eduarda por me ajudar desde antes de começar. Wagner por todo incentivo, sou muito grata por tudo que você me ajudou a construir. A Ana Paula, a Ani, a Bianca, a Carla, a Giovana, a Nathália, a Renata, ao Maicon, ao Ariel, a Bianca Machado e a Lurian obrigada por estarem firmes e fiéis em nossas maratonas de experimentos, e por toda ajuda que sempre me deram, agradeço a todos de coração.

A todos meus familiares, amigos e colegas, obrigada por tudo, e principalmente, por entenderem minha ausência em alguns momentos.

A UFFS, ao IFRS e a UPF por permitirem a realização dos experimentos desse estudo e a todos os professores que contribuíram com seus ensinamentos.

A todos que me ajudaram de todas as formas possíveis, muito obrigada!

“Sejam fortes e corajosos. Não tenham medo nem fiquem apavorados [...], pois o Senhor, o seu Deus, vai com vocês; nunca os deixará, nunca os abandonará”.

Deuteronômio 31:6

## RESUMO

O hormônio estrogênio é considerado um desregulador endócrino cada vez mais presente no cotidiano dos humanos, encontrados em concentrações entre 3 e 54 ng/L em mananciais no Brasil, assim como outros fármacos, podem não ser completamente metabolizados pelos organismos e serem excretados na sua forma original ou organicamente complexa para águas residuárias. Considerando que menos da metade da população brasileira possui rede de esgoto coletada, e menor parcela tem acesso a esgoto tratado além do 17 $\alpha$ -etinilestradiol ser de difícil remoção buscamos avaliar se o hormônio sintético 17 $\alpha$ -etinilestradiol afeta o eixo neuroendócrino de estresse e o comportamento, usando o Zebrafish adulto como organismo modelo, sob concentrações de 0,05, 0,5, 5, 50 e 75 ng/L em relação ao controle avaliando ainda a meia vida desse composto e sua bioacumulação nos tecidos animais. Para isso avaliamos a atividade da enzima acetilcolinesterase, quantificamos os níveis de cortisol no corpo inteiro dos peixes, avaliamos o comportamento social, o comportamento do tipo agressividade e os parâmetros locomotores para analisar a ansiedade dos animais expostos. Observamos que a exposição ao hormônio sintético feminino 17 $\alpha$ -etinilestradiol, mesmo em baixas concentrações, afetou parâmetros comportamentais e neuroendócrinos do organismo modelo estudado sendo ainda mais expressivas essas alterações em organismos submetidos a estresse. Considerando a presença nas águas do hormônio e a presença de estresse no ambiente concluímos que o 17 $\alpha$ -etinilestradiol afeta o sistema nervoso central e o sistema endócrino o que fica evidenciado pelas alterações comportamentais tornando a espécie mais suscetível a predação, podem promover efeitos negativos na reprodução e comprometer a manutenção da espécie no ecossistema.

Palavras-chave: 17 $\alpha$ -etinilestradiol. Acetilcolinesterase. Comportamento. Cortisol.

## ABSTRACT/RESUMÉN

The estrogen hormone is considered an endocrine disrupter, and is more present than ever in the daily life of humans, in Brazil, this hormone is found in concentrations between 3 and 54 ng/L in water sources, just like some drugs, estrogen may not be fully metabolized by organisms and may be excreted either in their original or organically complex form to water residue systems. Considering that less than half of the Brazilian population has a sewage network, and a smaller portion has access to treated sewage, the estrogen 17 $\alpha$ -ethinylestradiol, used in oral contraceptives, is very difficult to remove from the water we sought to evaluate whether the synthetic hormone 17 $\alpha$ -ethinylestradiol affects the neuroendocrine axis of stress and behavior using adult Zebrafish as a model organism at concentrations of 0.05, 0.5, 5, 50 and 75 ng / L in relation to the control evaluating the half-life of this compound and its bioaccumulation in animal tissues. For this, we evaluated the activity of the enzyme acetylcholinesterase, quantified the cortisol levels in the whole body of the fish, evaluated the social behavior, the behavior of the aggressive type and the locomotor parameters to analyze the anxiety of the exposed animals. We note that exposure to the synthetic hormone 17 $\alpha$ -ethinylestradiol, even at low concentrations, affected behavioral and neuroendocrine variables of the model organism being even more expressive in organisms submitted to stress. Considering the presence of the hormone in the water, it is concluded that 17 $\alpha$ -ethinylestradiol affects the central nervous system and the endocrine system, which is evidenced by the behavior alterations, making the species more susceptible to predation, promoting negative effects on reproduction and jeopardizing the species in the ecosystem.

Keywords: 17 $\alpha$ -ethinylestradiol. Acetylcholinesterase. Behavior. Cortisol.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Colesterol como precursor da síntese de esteroides..	26
Figura 2: Zebrafish	29
Figura 3: Protocolo Preferência social.....	33
Figura 4: Protocolo Agressividade.....	34
Figura 5: Protocolo Tanque Novo.....	35
Figura 6: Comportamento social de peixes expostos agudamente a diferentes concentrações de 17 $\alpha$ -etinilestradiol e submetidos à estresse .....	41
Figura 7: Comportamento social de peixes expostos cronicamente a diferentes concentrações de 17 $\alpha$ -etinilestradiol e submetidos à estresse.....	43
Figura 8: Agressividade de peixes expostos agudamente a diferentes concentrações de 17 $\alpha$ -etinilestradiol e submetidos à estresse (30s).....	43
Figura 9: Agressividade de peixes expostos agudamente a diferentes concentrações de 17 $\alpha$ -etinilestradiol e submetidos à estresse (10 min).....	44
Figura 10: Agressividade de peixes expostos cronicamente a diferentes concentrações de 17 $\alpha$ -etinilestradiol e submetidos à estresse (30s).....	44
Figura 11: Agressividade de peixes expostos cronicamente a diferentes concentrações de 17 $\alpha$ -etinilestradiol e submetidos à estresse (10 min).....	45
Figura 12: Parâmetros locomotores de peixes expostos agudamente a diferentes concentrações de 17 $\alpha$ -etinilestradiol e submetidos à estresse.....	47
Figura 13: Parâmetros locomotores de peixes expostos cronicamente a diferentes concentrações de 17 $\alpha$ -etinilestradiol e submetidos à estresse.....	49
Figura 14: Concentrações de Cortisol de corpo inteiro em peixes expostos a diferentes concentrações de 17 $\alpha$ -etinilestradiol.....	49
Figura 15: Atividade da enzima AChE de peixes expostos agudamente a diferentes concentrações de 17 $\alpha$ -etinilestradiol.....	50
Figura 16: Atividade da enzima AChE de peixes expostos cronicamente a diferentes concentrações de 17 $\alpha$ -etinilestradiol.....	51
Figura 17: Níveis de 17 $\alpha$ -etinilestradiol encontrados na água e no tecido de peixes expostos.....	52

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Processos do tratamento de efluentes líquidos .....	22
Tabela 2: Resultados dos parâmetros analisados.....	53

## LISTA DE ABREVIATURAS

°C – Graus Celsius  
DEs – Desreguladores Endócrinos  
EE2 –17 $\alpha$ -etinilestradiol  
ng/L – nanogramas por litro  
 $\mu$ g/L – microgramas por litro  
% – porcentagem  
m – metros  
min – minutos  
s – segundos  
g/mol – gramas por mol  
AChE - acetilcolinesterase  
SNC – Sistema Nervoso Central  
ACN - acetonitrila  
STE – Sistema de Tratamento de Esgoto  
ACh- acetilcolina  
L – litros  
pH- potencial de hidrogênio  
mg/L – miligramas por litro  
mL – mililitros  
PBS – tampão fosfato-salina  
TFK – tampão fosfato de potássio  
mM – milimolar  
 $\mu$ L – microlitros  
DTNB -ácido 2,2'-dinitro-5,5'-ditiodibenzoico  
vol – volume  
nm – nanômetro  
g – grama  
rpm – rotações por minuto  
mL/min – mililitros por minuto  
ppm – partes por milhão  
PSA - *primary secondary amine*  
D-SPE - *Dispersive Solid Phase Extraction*

HPLC - sistema de cromatografia líquida de alta eficiência

DAD - detector de arranjo diodo

EC - *Extract Pouch*

D. P. – desvio padrão

E. P.- erro padrão

## LISTA DE SIGLAS

CONAMA – Conselho Nacional de Meio Ambiente

IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística

CEUA – Comissão de Ética no Uso de Animais

IFRS – Instituto Federal do Rio Grande do Sul

EPA – Agência de Proteção Ambiental

CNRH – Conselho Nacional de Recursos Hídricos

QuEChERS – *Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged, Safe*

AOAC - *Association of Official Analytical Chemists*

## LISTA DE SIMBOLOS

<	Menor
>	Maior
$\alpha$	Alfa
$\pm$	Mais ou menos

## SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO .....	18
1.1 OBJETIVO GERAL .....	20
1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	21
2. REVISÃO DE LITERATURA .....	22
2.1 ÁGUAS RESIDUÁRIAS.....	22
2.2 ETINILESTRADIOL .....	24
2.3 CORTISOL .....	27
2.4 ZEBRAFISH ( <i>Danio rerio</i> ) .....	28
2.5 ACETILCOLINESTERASE.....	30
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	31
3.1 NOTA ÉTICA.....	31
3.2 ANIMAIS.....	32
3.3 TEMPOS DE EXPOSIÇÃO E CONCENTRAÇÕES .....	32
3.4 AVALIAÇÃO COMPORTAMENTAL.....	33
3.4.1 Teste de preferência Social.....	33
3.4.2 Agressividade.....	34
3.4.3 Teste do Tanque Novo - Ansiedade .....	34
3.5 PROTOCOLO DE EXTRAÇÃO CORTISOL.....	35
3.6 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE DE AChE .....	35
3.7 DETERMINAÇÃO DA PROTEÍNA .....	36
3.8 METODOLOGIA HPLC .....	36
3.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA .....	38
4 RESULTADOS .....	39
4.1 COMPORTAMENTO SOCIAL.....	39
4.1.1 Exposição aguda.....	39
4.1.2 Exposição Crônica .....	41
4.2 AGRESSIVIDADE .....	43
4.2.1 Exposição aguda– tempo 30 s .....	43
4.2.2 Exposição aguda– tempo 10 min .....	43
4.2.3 Exposição crônica– tempo 30 s.....	44
4.2.4 Exposição crônica– tempo 10 min.....	45
4.3 TESTE DO TANQUE NOVO .....	45

4.3.1 Exposição aguda.....	45
4.3.2 Exposição crônica .....	47
4.4 HORMÔNIO CORTISOL .....	49
4.5 ACETILCOLINESTERASE.....	49
4.5.1 Exposição aguda.....	50
4.5.2 Exposição crônica .....	50
4.6 DETERMINAÇÃO DE 17 $\alpha$ -ETINILESTRADIOL .....	51
4.7 COMPILAÇÃO DOS RESULTADOS.....	52
5 DISCUSSÃO .....	54
6 CONSIDERAÇÕES FINAIS .....	59
REFERÊNCIAS.....	60

## 1 INTRODUÇÃO

O uso sustentável da água, as mudanças climáticas, o uso do solo e a ação antrópica são ameaças constantes à qualidade da água, que é um recurso natural passível dos mais diversos tipos de poluição. O aumento da poluição das águas superficiais e subterrâneas por produtos químicos causam efeitos à saúde humana, e a vida saudável da biota aquática (FERNANDES et al., 2011).

Os fármacos estão entre os contaminantes mais detectados nos ecossistemas aquáticos e seu risco potencial para a biota aquática é preocupante (DE FARIAS et al., 2019). Isso pode estar relacionado ao fato de que alguns produtos farmacêuticos não são completamente metabolizados após o consumo humano, e são excretados na sua forma original ou organicamente complexa (WESIERSKA-GADEK, 2006), tornando as águas residuárias municipais uma importante fonte de estrogênios para o ambiente aquático (DEBLONDE et al., 2011).

Diferente de outros contaminantes, os de origem farmacológica apresentam respostas benéficas aos seres humanos, mas podem interferir em organismos não-alvo com efeitos desconhecidos (DE FARIAS et al., 2019). Diversos produtos químicos estrogênicos produzidos naturalmente ou artificialmente são encontrados no ambiente nos últimos anos. Dentre estes destaca-se o hormônio sintético 17 $\alpha$ -etinilestradiol, utilizado em anticoncepcionais, e comumente encontrado em águas residuais e efluentes, onde sua presença acarreta efeitos danosos ao sistema endócrino como, por exemplo, a feminilização de peixes selvagens (ÖRN et al., 2016, HU et al., 2017 e LIANG et al., 2017).

Inúmeras estratégias podem ser empregadas para diagnosticar e monitorar a extensão da contaminação em ambientes aquáticos, incluindo avaliação de biomarcadores em organismos expostos, e análises químicas de diferentes matrizes de água para identificar e quantificar a presença de substâncias químicas específicas (DE LIMA et al., 2013).

Quando presente em águas residuais, o 17 $\alpha$ -etinilestradiol e os demais estrogênios são considerados disruptores endócrinos (DEs) (BILA e DEZOTTI, 2007). Segundo a *Environmental Protection Agency* (EPA) os disruptores endócrinos são substâncias que causam efeitos adversos em humanos e animais selvagens, interferindo no sistema endócrino, podendo causar malformações de

desenvolvimento, interferir na reprodução, aumentar o risco de câncer e distúrbios na função do sistema imunológico e nervoso.

A avaliação dos efeitos do estrogênio sobre o sistema nervoso de vertebrados no ambiente aquático é necessário visto o crescente consumo de hormônios sintéticos, como o 17 $\alpha$ -etinilestradiol. Na verdade, há estudos que relatam que dependendo da idade, do estado de saúde, da dieta ou gravidez os organismos excretam de 2 a 65  $\mu$ g de estradiol/dia de hormônios esteroides no ambiente a partir da urina e fezes (GHISELLI et al., 2007).

O sistema nervoso colinérgico é um dos mais estudados quando se fala em avaliação de efeitos de agentes neurotóxicos (OLIVEIRA, 2017). Isto se deve ao fato, do sistema nervoso colinérgico estar relacionado a funções de aprendizado, memória, movimento, atuando através de uma estreita relação capaz de regular a concentração de acetilcolina (ACh), através da hidrólise deste neurotransmissor pela enzima acetilcolinesterase (AChE) (TONIN, 2014). Assim, a inibição da acetilcolinesterase é avaliada em diferentes organismos aquáticos para medir a exposição dos organismos a pesticidas presentes neste ambiente (DE LIMA et al., 2013).

Os estudos de toxicologia e de sistemas neurológicos têm utilizado Zebrafish, como organismo modelo (BEST E ALDERTON, 2008). O Zebrafish (*Danio rerio*), peixe ornamental popularmente conhecido no Brasil como Paulistinha, tem sido amplamente utilizado como um modelo experimental para estudar várias doenças humanas (OLIVEIRA et al., 2013). O Zebrafish é um modelo inovador e crítico para a pesquisa em neurociência, biologia sensorial, fisiologia do estresse e síndromes comportamentais (ABREU et al., 2017). É um vertebrado de baixo custo, quando comparado a roedores, que se reproduz e desenvolve rapidamente, sendo um modelo interessante que expressa fenômenos comportamentais desde o início da vida até a fase adulta (SIEBEL, 2013). Vivem em cardumes e apresentam sociabilidade, onde distúrbios nestes comportamentos podem ser facilmente visualizados aumentando sua importância em estudos relacionados ao sistema nervoso (MESHALKINA et al., 2017).

Estudos recentes reforçaram o uso do modelo de Zebrafish para pesquisa de estresse sendo a determinação do cortisol no corpo inteiro um indicador de estresse, aumentos nos níveis de cortisol durante o estresse podem levar à hiperglicemia, que atuaria no fornecimento de energia para ações defensivas (BARCELLOS et al., 2007

e ABREU et al., 2014). Então efeitos dos poluentes na resposta ao estresse dos peixes podem afetar sua sobrevivência, já que as drogas podem interferir nessa resposta ao estresse (ABREU et al., 2014; ABREU, 2017).

Em estudo anterior avaliamos os efeitos da exposição aguda e crônica no comportamento tipo social, ansiedade, e agressividade, além de efeitos ao sistema endócrino com o mesmo organismo modelo. Nesse estudo concluiu-se que o hormônio  $17\alpha$ -etinilestradiol é prejudicial ao Zebrafish, pois após exposição aguda o hormônio causou efeito ansiogênico nos animais, e após exposição crônica o efeito foi ansiolítico, os peixes apresentaram menor interação social, além de torná-lo mais agressivo e afetando seu sistema endócrino pelo aumento dos níveis de Estradiol e Testosterona evidenciando que a presença do  $17\alpha$ -etinilestradiol no meio hídrico apresenta um impacto negativo no comportamento do animal colocando a espécie em risco (FENSKE, 2017). Porém, não houve avaliação do efeito da exposição aguda e crônica ao  $17\alpha$ -etinilestradiol sobre os parâmetros comportamentais e hormonais de Zebrafish submetidos a um fator estressante.

A utilização do modelo experimental Zebrafish fundamenta-se na sua similaridade de genoma com o genoma humano (HOWE et al., 2013), das suas respostas neurológicas e comportamentais, e na sua representação da biota aquática. Assim, os efeitos investigados no Zebrafish podem manifestar-se nos mais diversos seres vivos, considerando que cada indivíduo reage de maneira diferente a estímulos ambientais. Dessa forma, buscamos avaliar os efeitos da exposição aguda e crônica do  $17\alpha$ -etinilestradiol sobre o sistema neuroendócrino de Zebrafish em condições normais (sem estresse) e com estresse, através da análise da atividade da enzima acetilcolinesterase e parâmetros comportamentais como ansiedade, comportamento social e agressividade. Adicionalmente, foram avaliadas as respostas ao estresse químico e ambiental através da determinação do nível de hormônio cortisol nos peixes expostos a diferentes concentrações de  $17\alpha$ -etinilestradiol.

## 1.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar se o hormônio sintético  $17\alpha$ -etinilestradiol afeta o eixo neuroendócrino de estresse e o comportamento do Zebrafish adulto.

## 1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Avaliar efeitos da exposição ao estrogênio sobre a atividade da enzima acetilcolinesterase em Zebrafish estressados e não estressados;

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

Avaliar efeitos da exposição ao estrogênio sobre níveis de cortisol em Zebrafish estressados e não estressados;

Avaliar as concentrações de estrogênio no tecido do animal e na água após exposição crônica ao 17 $\alpha$ -etinilestradiol.

## 2. REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 ÁGUAS RESIDUÁRIAS

Com o crescimento das cidades são necessárias estratégias públicas e privadas para acompanhar a demanda de água, alimentos, transportes e distribuição. É exemplo disto, as resoluções do Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA) e do Conselho Nacional de Recursos Hídricos (CNRH) que tratam das principais regulamentações para o enquadramento na Lei nº 9.433, estabelece como um de seus objetivos assegurar à atual e às futuras gerações a necessária disponibilidade de água, em padrões de qualidade adequados aos respectivos usos. Entre elas a Resolução CONAMA nº 357/2005, que dispõe sobre a classificação dos corpos de água e diretrizes para o seu enquadramento, bem como estabelece as condições e padrões de lançamento de efluentes. Assim, como a Resolução CONAMA nº 397/2008, que altera o art. 34 da 357. E ainda a Resolução CNRH nº 91/2008, que estabelece os procedimentos gerais para o enquadramento dos corpos d'água superficiais e subterrâneos e, por fim, a Resolução CONAMA nº 396/2008, que estabelece o enquadramento das águas subterrâneas.

Contudo, o aumento de resíduos sólidos e líquidos, devido ao aumento do consumo e da população, torna-se um grande problema a ser solucionado. Para tais fins surgem os Sistemas de Tratamento de Esgoto (STE), com o objetivo de devolver à natureza efluentes que sejam inócuos, e não gerem prejuízos ao ecossistema (BRITO, 2006).

Uma característica importante dos dias atuais é que aproximadamente sete décadas após o máximo desenvolvimento de grandes cidades brasileiras, aproximadamente 35% destas não possuem nem sequer sistemas de coleta de esgoto doméstico, sendo, portanto, o esgoto o principal poluente das águas superficiais (IBGE Pnad, 2015).

Os recursos hídricos assumem o papel de receptores de qualquer resíduo proveniente de atividades antrópicas, principalmente pelo descarte de esgotos e efluentes de estações de tratamento (RAIMUNDO, 2011). Os recursos hídricos transformam-se em descartes das atividades humanas, isso faz com que sejam encontradas várias substâncias contaminantes, causando preocupações sobre o impacto aos recursos hídricos, pela ampla ocorrência e capacidade de causar riscos

à saúde humana e ao ambiente, mesmo em pequenas quantidades (RICHARDSON e TERNES, 2011).

Para o tratamento correto dos efluentes devem ser consideradas suas características e sua composição (ARCHELA et al., 2003), estes devem passar por vários tratamentos conforme Tabela 1.

Tabela 1: Processos do tratamento de efluentes líquidos

<b>Nível</b>	<b>Remoção</b>	<b>Mecanismo do processo</b>
Preliminar	Sólidos grosseiros em suspensão	Físico
Primário	Sólidos sedimentáveis em suspensão e parte da matéria orgânica	Físico
Secundário	Remoção de matéria orgânica e nutrientes	Biológico
Terciário	Remoção de poluentes, nutrientes, organismos patogênicos, compostos não biodegradáveis e metais pesados	Químico

Fonte: VON SPERLING, 1996.

Aproximadamente 75% dos sólidos presentes no esgoto doméstico são constituídos de matéria orgânica em processo de decomposição. Para remover esses compostos são necessárias várias etapas de tratamento, como: gradeamento ou peneiramento, floculação ou coagulação, sedimentação, biodegradação aeróbica ou anaeróbica, degradação química por processo de hidrólise ou nitrificação e, por último, desinfecção química (VON SPERLING, 2005 e RAIMUNDO, 2011).

No entanto, todo esse tratamento não é eficaz na remoção de micropoluentes emergentes, devido à estrutura química dos compostos presentes nesses resíduos (SILVA, 2011). Por isso, o interesse pelo monitoramento de fármacos vem crescendo, por eles serem encontrados nos efluentes e águas naturais em concentrações de ng/L e µg/L (BILA e DEZOTI, 2003 e TEIXEIRA et al., 2010).

Ainda se conhece pouco sobre o caminho dos fármacos no ambiente (BILA e DEZOTI, 2003). Sabe-se que os fármacos podem contaminar a água de duas formas, como fonte pontual ou difusa. Na primeira, envolvem-se os efluentes de estações de tratamento de águas residuais, efluentes industriais, efluentes de

atividade agrícola, e na segunda, se enquadra a infiltração de solo de compostos da agricultura e da indústria, recargas de aquíferos com água contaminada, fossas sépticas, espalhamento de lodo oriundo do tratamento de efluentes (FERREIRA, 2012).

O Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA) determina a qualidade da água para seus diversos usos diretos ou indiretos por meio da Resolução N° 357 de 2005, complementada pela resolução N° 430 de 2011, que dispõem sobre a classificação dos corpos de água e diretrizes ambientais, além de estabelecer condições e padrões de lançamentos de efluentes e outras orientações gerais.

Torna-se cada vez mais comum a presença dos chamados desreguladores endócrinos (DEs) nas águas superficiais e subterrâneas, devido a sua remoção ser ineficiente (Ferreira, 2012). Esses compostos são persistentes, e podem sofrer biomagnificação e prejudicar organismos aquáticos sensíveis a baixas concentrações (SILVA et al., 2018). Os desreguladores endócrinos possuem diferentes mecanismos de ação, e por não serem encontrados isoladamente, podem ocorrer interações no ambiente, principalmente devido à sua origem lipídica (AMÉRICO et al., 2012).

Esses desreguladores endócrinos são substâncias exógenas causadoras de efeitos adversos à saúde, alterando o funcionamento do sistema endócrino, por interferirem na sua síntese, na secreção, no transporte, no metabolismo e na excreção de hormônios desregulando a reprodução e o desenvolvimento dos organismos, podendo ainda induzir características femininas em machos e ocasionar desequilíbrios populacionais em ambientes aquáticos (VERBINNEN e NUNES, 2010, SILVA et al., 2018).

A cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) é uma técnica amplamente utilizada na detecção de hormônios esteroides (HUANG et al., 2008). Os compostos em fase líquida são separados através de colunas cromatográficas constituídas de materiais apolares e fase líquida móvel polar, onde após a dissociação dos analitos na coluna, são detectados através da alteração no índice de refração, por absorção no UV/visível num comprimento de onda adequado para os compostos em análise (RANGEL, 2010 e DIAS, 2017).

## 2.2 ETINILESTRADIOL

Os hormônios são substâncias químicas sintetizadas pelo sistema endócrino e lançadas na corrente sanguínea que coordenam o funcionamento do organismo. Sua função é reguladora, seja indutora ou inibidora, sendo responsáveis por atividades de órgãos complexos, regulação de níveis de sais e açúcares no sangue, e o uso e armazenamento de energia, bem como, crescimento e desenvolvimento do organismo e reprodução das características sexuais primárias e secundárias (BIRKETT e LESTER, 2003 e GHISELLI e JARDIM, 2007).

Os hormônios podem ser classificados em peptídicos ou proteicos como a prolactina; derivados de aminoácidos como os tireoidianos, e os esteróides, como a testosterona e o estradiol (DEVLIN, 2007). A função dos hormônios esteróides envolve o controle do metabolismo, desenvolvimento de características sexuais, crescimento e ação anti-inflamatória (PEREIRA e MIGUEL, 2017).

Dentre os hormônios esteróides podem-se destacar os hormônios sexuais femininos (estrógenos e progesterona); hormônios sexuais masculinos (andrógenos, como a testosterona) e hormônios da gravidez (progesterona, estrógenos, gonadotropina coriônica humana, somatotropina humana) (AZEVEDO, 2011). Os hormônios esteróides são sintetizados nos ovários, testículos e córtex adrenal a partir do colesterol (DELVIN, 2007, PEREIRA e MIGUEL, 2017) e sua síntese inicia-se com a conversão do colesterol em pregnenolona (NILSSON et al., 2001) (Figura 1). Além disso, o colesterol é o esteroide mais abundante nos animais, sendo um importante componente das membranas nas células eucarióticas (PEREIRA e MIGUEL, 2017).

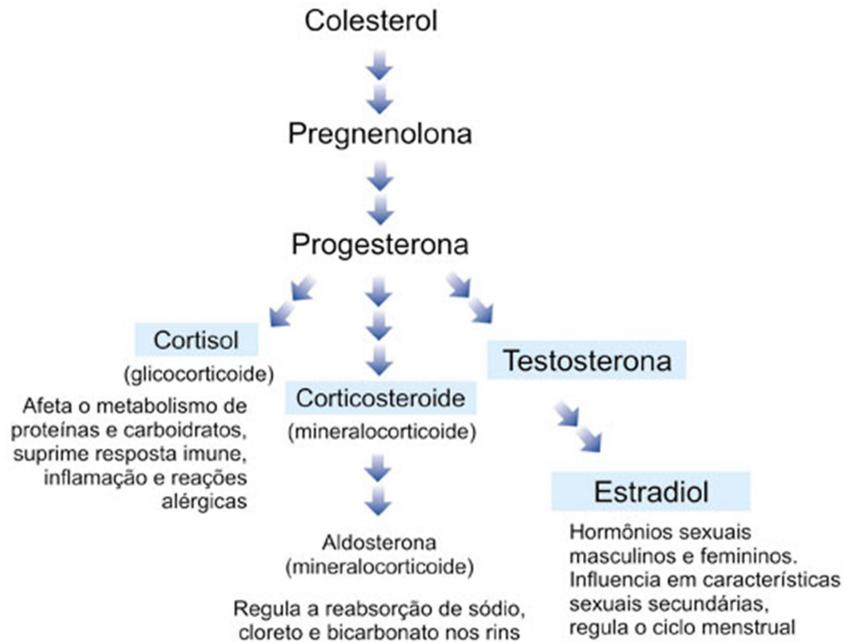


Figura 1: Colesterol como precursor da síntese de esteroides. Fonte: [http://www.moreirajr.com.br/images/revistas/48/722/deficiencia\\_f4.jpg](http://www.moreirajr.com.br/images/revistas/48/722/deficiencia_f4.jpg).

Estudos sugerem a presença de estrogênios esteroides nos ambientes aquáticos, sendo o  $17\alpha$ -etinilestradiol muito utilizado como anticoncepcional feminino (CAILLEAUD et al., 2011). Este hormônio é um estrogênio sintético, responsável por alterações endócrinas da biota aquática e é considerado o hormônio mais consumido no mundo. (DOYLE et al., 2013, e SILVA, et al., 2018). Quando presente em efluentes esse hormônio é considerado responsável por diversos efeitos disruptores como redução do tamanho das gônadas, feminilização de peixes machos e problemas no desenvolvimento do sistema imune (DOYLE et al., 2013, SILVA et al. 2018).

No mundo todo, estrogênios naturais e sintéticos, incluindo estradiol, estrona, estriol e  $17\alpha$ -etinilestradiol foram detectados em efluentes de estação de tratamento de esgoto em níveis de 0,2 a 42 ng/L (CAILLEAUD et al., 2011, DOYLE et al., 2013). Por isso, há preocupação em desenvolver estudos ecotoxicológicos para investigar os efeitos deste hormônio no ambiente (CUNHA et al., 2017).

O etinilestradiol é um hormônio sintético derivado do estradiol e ambos são excretados por humanos e animais na urina e nas fezes, estima-se que 4,5 e 6  $\mu\text{g}$  por dia de etinilestradiol sejam excretados diariamente por pessoa (BARREIROS et al., 2016). O estrogênio após ser excretado ou descartado é lançado no esgoto, que por sua vez, é lançado em ambiente aquático *in natura* ou na forma de efluentes tratados (WU et al., 2014). Este problema tem maior importância devido à resistência

do hormônio à degradação e, assim, o seu transporte no ambiente é facilitado (SODRÉ et al., 2007, CUNHA et al., 2017 e RATHNER et al., 2017).

Em estudo publicado em 2011, Raimundo descreveu que o 17 $\alpha$ -etinilestradiol é encontrado em concentrações médias de 0,35 ng/L em água tratada na Alemanha, já em mananciais ele citou que foram encontradas concentrações na faixa de 0,4ng/L a 1,4 ng/L nos EUA, e para o Brasil os níveis encontrados variaram entre de 3 a 54 ng/L. Em 2013, Doyle e colaboradores descreveram que o 17  $\alpha$ -etinilestradiol é um dos estrogênios ambientais mais potentes, derivado do hormônio natural estradiol e foi encontrado em concentrações de até 30,8 ng/L na China, 4,7 ng/L nos EUA, 4,5 ng/L na Suécia e 7 ng/L no Reino Unido.

A preocupação com o destino do 17 $\alpha$ -etinilestradiol no ambiente dá-se devido ao consumo de pílulas anticoncepcionais, que contém entre 20 e 50 microgramas em doses diárias. Considerando o baixo percentual de metabolização pelos organismos, cerca de 40% do 17 $\alpha$ -etinilestradiol não metabolizado atinge o esgoto de forma livre (RAIMUNDO,2011).

Para estudos ecotoxicológicos busca-se a utilização de organismos bioindicadores, pois esses representam mudanças induzidas por fármacos no ambiente e fornecem informações sobre a saúde do ecossistema (CARVALHO et al., 2012). No caso dos peixes da espécie Zebrafish é considerada uma referência internacional, isso devido às suas características, principalmente com relação ao seu genoma que se assemelha demais aos vertebrados (MUNHOZ BENITES et al., 2014), este peixe é amplamente utilizado por serem eficientes para investigar os efeitos e mecanismos de ação em estudos relacionados a desreguladores endócrinos (TOKARZ et al., 2013). Os bioindicadores são utilizados para avaliar as respostas quando os organismos são expostos a poluentes, sendo estas respostas bioquímicas, fisiológicas e histológicas conhecidas como biomarcadores (MUNHOZ BENITES et al., 2014).

### 2.3 CORTISOL

Dentre os hormônios esteróis destaca-se ainda o cortisol, cujas funções relacionam-se à adaptação ao estresse do córtex adrenal por várias expressões fenotípicas celulares, regulação do metabolismo de proteínas, carboidratos e

lipídios, além de efeitos imunossupressores (DELVIN, 2007) e sua síntese inicia-se com a conversão do colesterol em pregnenolona (Figura 1).

O estresse pode ser definido com uma cascata de eventos fisiológicos desencadeados pela presença de uma ameaça onde o organismo busca recuperar a homeostase (BARTON, 2002). Conhecido como hormônio do estresse a síntese do cortisol inicia por uma estimulação de agentes estressores, o estresse estimula o hipotálamo a sintetizar o hormônio liberador da corticotropina, que estimula a glândula pituitária a sintetizar o hormônio adrenocorticotrófico, e este alcança glândulas supra-renais através da corrente sanguínea e induzindo a síntese do cortisol (WENDELAAR BONGA, 1997; BARTON, 2002).

O cortisol regula o equilíbrio hidromineral e o metabolismo energético e normalmente aumenta durante a exposição a estressores agudos ou crônicos. (BARCELLOS et al., 2007).

O cortisol é o indicador mais utilizado para avaliar o estresse em organismos aquáticos, e o déficit de respostas aos eventos diminui a taxa de sobrevivência do animal e o torna mais suscetível ameaçando a homeostase do organismo (WENDELAAR BONGA, 1997).

#### 2.4 ZEBRAFISH (*Danio rerio*)

O peixe-zebra, também conhecido como Zebrafish (*Danio rerio*), é um pequeno teleósteo de água doce nativo da Índia. É um peixe ornamental chamado popularmente no Brasil como Paulistinha que pertence à família Cyprinidae (Teleostei), consolidado como organismo modelo para o estudo biomédico e na busca por entendimento sobre doenças e efeito de drogas, principalmente quando estas estão relacionadas ao sistema nervoso (PIATO et al., 2011, STEWART et al., 2014, MESHALKINA et al., 2017b.). Ainda, também tem sido amplamente utilizado como modelo para estudar a base da epilepsia (SIEBEL et al., 2011).



Figura 2: Zebrafish Fonte:<https://www.unochapeco.edu.br/>

Além da alta conservação do genoma com a espécie humana, que compreende entre 70 a 80%, essa espécie ainda possui inúmeros sistemas de neurotransmissores (HOWE et al., 2013). O fato do Zebrafish apresentar sistema neurotransmissor bastante semelhante ao de mamíferos, permite investigar o efeito neurotóxico e comportamental de diferentes exposições a fármacos (MAXIMINO et al, 2011, HOWE et al., 2013 e Müller et al., 2017).

Além disso, o Zebrafish é um típico peixe de aquário bem conhecido pela maioria das pessoas. Ele é muito utilizado na pesquisa de toxicologia por ser barato, resistente, pequeno, fácil de cuidar em grande número, de fácil adaptação em condições adequadas de fotoperíodo (MU et al., 2017). Além de apresentar fertilização externa com alta fertilidade, desenvolvimento acelerado e tratabilidade genética (MESHALKINA et al., 2017a e DEMIN et al., 2018).

Este modelo apresenta outras qualidades que facilitam seu uso em estudos toxicológicos, que podem demonstrar, por exemplo, alteração em seu comportamento quando expostos a determinado toxicante, desde o início da vida até a idade adulta (KALUEFF et al., 2013). As vantagens do Zebrafish como o organismo modelo possibilitam seu uso em vários campos de pesquisa: neuroquímica, comportamento, desenvolvimento, toxicologia e genética são alguns exemplos. Apesar de ser um modelo relativamente novo, o aumento de metodologias desenvolvidas ou adaptadas ao Zebrafish podem impulsionar ainda mais o seu uso (REOLON et al., 2017).

*Danio rerio* é uma espécie que mantém hábitos diurnos e mostram maior atividade durante a manhã. Este ciclo circadiano é responsável por seus processos fisiológicos, comportamentais e/ou bioquímicos (DAMMSKI et al., 2011). Além disso,

o Zebrafish é uma espécie com comportamentos sociais complexos e uma tendência natural de formar cardumes, e apresenta estratégias de forrageamento, comportamento antipredatório e acasalamento (MÜLLER et al., 2017 e REOLON et al., 2017). A sociabilidade é essencial no comportamento do Zebrafish por expressar fortes preferências, eles vivem em grupos mistos com hierarquias estruturadas, facilitando a identificação de distúrbios no comportamento social e valorizando ainda mais esse modelo para análises que envolvam esse comportamento (ENGESZER et al., 2007, SAVERINO e GERLAI 2008 e KALUEFF et al., 2014a).

O comportamento de agressividade do Zebrafish pode ser avaliado pela elevação e abertura da boca, nado circular e mudanças na cor do corpo do animal, destacando-se nesse ponto o teste com exposição ao espelho, onde se avalia a proximidade do animal com o espelho e sua movimentação no aquário de teste (KALUEFF et al., 2013).

Essa espécie exibe ainda um comportamento agressivo para estabelecer hierarquias, disputar territórios e companheiros aumentando o nível de cortisol de todo o corpo após algum desafio (REOLON et al., 2017). Sempre que se expõem a fatores de estresse seus níveis de cortisol aumentam, isso acontece porque este peixe possui como principal glicocorticoide o cortisol, hormônio envolvido na resposta ao estresse (DAL SANTO et al., 2013, KALUEFF et al., 2014b).

O Zebrafish é, portanto, um organismo modelo proeminente para avaliar os efeitos neuroquímicos e comportamentais, e se torna um modelo com boas perspectivas sobre o uso de espécies alternativas em relação a estudos farmacológicos, e toxicológicos, além de impactos causados por desastres ecológicos (PERKINS et al., 2013), e seu valor se potencializa por suas características dos sistemas neuroendócrinos e neurotransmissores (MESHALKINA et al., 2017ab).

## 2.5 ACETILCOLINESTERASE

A acetilcolinesterase (AChE) é fundamental para o funcionamento do sistema nervoso, e sua função é hidrolisar e inativar a acetilcolina (ACh) para regular sua concentração na sinapse, quando o impulso nervoso é transmitido de uma célula para a outra (SOREQ e SEIDMAN, 2001, DE LIMA et al., 2013).

Alguns dos impulsos nervosos que controlam diversas funções no sistema nervoso central e periférico são modulados pela atividade da AChE, tais como os batimentos cardíacos, a dilatação dos vasos sanguíneos, a contração dos músculos, controle motor, cognição e aprendizagem, que também depende da atuação da AChE (PETRONILHO, 2011). A toxicidade de fármacos além de outros fatores como dietas e exposição a metais podem influenciar a atividade da enzima (ZATTA et al., 2002, KAIZER et al., 2004; SEIBT et al., 2009). O neurotransmissor ACh é formado a partir da síntese de acetil-CoA pela enzima acetil-CoA-sintase e de colina formada a partir de aminoácido (serina ou fosfatidilcolina) no axônio terminal, armazenado em vesículas pré-sinápticas (BRAGA, 2018). Deste modo, quando um impulso nervoso chega ao axônio terminal, o neurônio libera a ACh para a região sináptica, que é atraída pelos receptores colinérgicos localizados no neurônio pós-sináptico interagindo com estes, e regenerando o impulso nervoso no neurônio pós-sináptico, prosseguindo a transmissão (PETRONILHO, 2011). Após o neurotransmissor ACh realizar seu papel, é degradado pela enzima AChE na fenda sináptica, liberando os produtos acetato e colina, que são recaptados ao terminal pré-sináptico (SOREQ e SEIDMAN, 2001). Assim, a estabilidade e atividade da ACh na fenda sináptica são reguladas por hidrólise, catalisada pela AChE (LIMA, 2008).

Considerando a importância da enzima AChE no sistema nervoso, que é responsável pelo aprendizado, memória, organização do movimento e controle do fluxo sanguíneo cerebral, a inibição desta enzima causa acúmulo de acetilcolina nas fendas sinápticas causando prejuízos aos organismos como convulsões, déficit cognitivo e perda memória (ZATTA et al., 2002, EVRON et al., 2007). Por isso, a acetilcolinesterase (AChE) é uma enzima chave do sistema colinérgico, atuando na hidrólise do neurotransmissor ACh e assegurando a transmissão normal dos sinais nervosos no organismo, e sua inibição pode causar hiperatividade, perda de coordenação, convulsões, paralisia e outros tipos de alterações comportamentais (ZHANG et al., 2017).

### **3 MATERIAL E MÉTODOS**

#### **3.1 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 (ANEXO A).

### 3.2 ANIMAIS

A partir de uma população de aproximadamente 1100 peixes adultos adquiridos (150-180 dias) de ambos os sexos (50/50) do tipo selvagem de Zebrafish (*Danio rerio*) (ANEXO B), os quais foram adquiridos em fornecedor de peixes ornamentais e aclimatados durante sete dias em aquários de 50L. Os peixes foram mantidos sob fotoperíodo natural (14 horas de luz/10 horas escuro). A densidade foi de aproximadamente 2 peixes/L. A temperatura da água foi mantida entre 26 e 28°C; pH próximo à 7,0, oxigênio dissolvido em  $6,5 \pm 0,4$  mg / L e amônia total a  $<0,01$  mg / L. A alimentação foi controlada, onde os peixes receberam ração indicada para a espécie uma vez ao dia às 9h da manhã, nesse mesmo horário foram realizadas as exposições.

### 3.3 TEMPOS DE EXPOSIÇÃO E CONCENTRAÇÕES

Foram estabelecidas 6 concentrações do hormônio  $17\alpha$ -etinilestradiol (SIGMA-Aldrich) onde, 0 (controle), 0,05, 0,5, 5,0 , 50 e 75 ng/L e os animais foram divididos em 6 grupos (n=18), totalizando 108 animais por repetição, considerando ambos os períodos de exposição, aguda e crônica. As concentrações foram estabelecidas (com adaptações) com base na literatura (Raimundo, 2011).

Para a exposição aguda, os animais foram mantidos no aquário de teste com a presença do hormônio durante 1 hora. Na exposição crônica os peixes foram mantidos no aquário com as determinadas concentrações durante 15 dias, foi necessária a exposição ao hormônio a cada 24 horas para manter a concentração desejada, devido à meia-vida deste composto.

Para ambas as exposições (aguda e crônica) um grupo de animais (50%) foi submetido a estresse com perseguição por redinha durante os dois minutos finais da exposição (ABREU et al., 2014), os outros 50% foram mantidos sem estresse intencional. Imediatamente após o término do período de exposição o peixe foi

submetido à eutanásia e os tecidos foram dissecados e posteriormente homogeneizados no tampão adequado para cada técnica.

### 3.4 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 6 litros de água variando a configuração conforme o teste.

#### 3.4.1 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 uma 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 de habituação, 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).

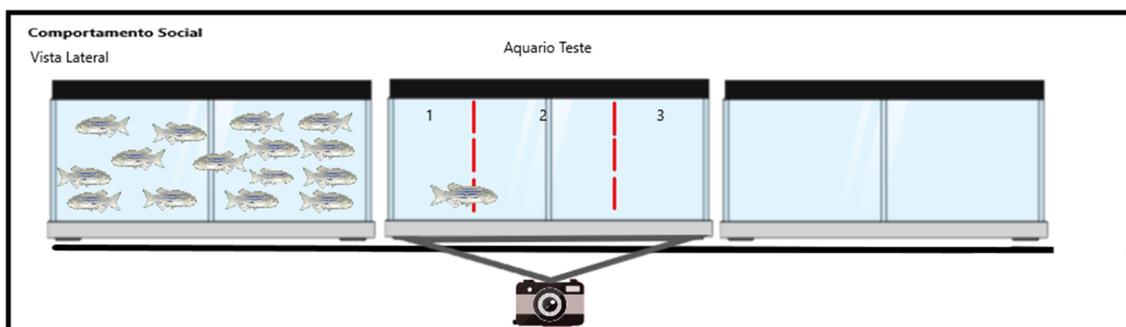


Figura 3: Protocolo Preferência social.

### 3.4.2 Agressividade

Para avaliar o comportamento de agressividade foi utilizado o teste de agressividade induzida por espelho (GERLAI, 2000). Utilizamos um aquário teste de 20x20x25 (largura x altura x profundidade), contendo 7 litros de água, e um espelho (45x40 cm), 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 filmada 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).

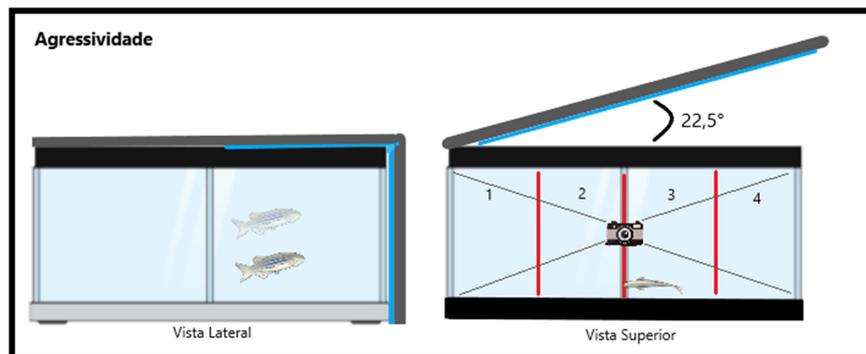


Figura 4: Protocolo Agressividade.

### 3.4.3 Teste do Tanque Novo - Ansiedade

Este teste avalia aspectos locomotores e o comportamento exploratório e tipo-ansiedade frente a um novo ambiente (ABREU, 2017). 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 três segmentos horizontais iguais (superior, médio e inferior). Os parâmetros analisados foram: tempo relativo no topo do tanque (s), número de transições ao topo e distância total percorrida (m) (GIACOMINI et al., 2016).

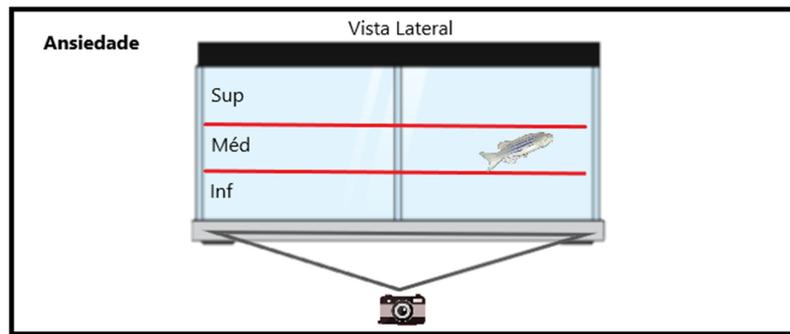


Figura 5: Protocolo Tanque Novo.

### 3.5 PROTOCOLO DE EXTRAÇÃO CORTISOL

Após exposição crônica ao hormônio sintético, os peixes foram capturados, imediatamente congelados em Nitrogênio líquido durante 10 a 30s, os cérebros foram dissecados e restante do corpo foi armazenado à  $-80^{\circ}\text{C}$  até a extração do cortisol. A extração do cortisol do corpo inteiro, exceto o tecido cerebral, foi realizada conforme Sink (2007 e 2008), com adaptações. Os tecidos foram homogeneizadas e suspensos em 3 mL de tampão PBS. Uma alíquota de 1 mL foi colocada em um novo tubo de ensaio e a amostra foi novamente suspensa em éter etílico e congelado em nitrogênio líquido. Após o congelamento o sobrenadante foi colocado em um tubo de ensaio e deixado descansar até a completa evaporação do éter. O extrato foi suspenso em 200  $\mu\text{L}$  de tampão PBS e armazenado a  $-20^{\circ}\text{C}$  até a análise Elisa (REOLON et al., 2017). A concentração de cortisol de corpo inteiro foi determinada em cada amostra pelo teste de ELISA, (Kit Cortisol Elisa DBC-*DiagnosticBiochem Canada Inc*), para os peixes submetidos ao estresse da captura pela rede nos 2 minutos finais dos testes comportamentais, e sem estresse. Foi utilizado 0,5g de tecido por amostra, e 6 amostras por concentração.

### 3.6 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE DE AChE

Para as análises de determinação da enzima AChE os cérebros dos peixes expostos foram imediatamente removidos do crânio após a eutanásia dos animais. Os *pools* com três cérebros foram homogeneizados em gelo 60 vol de tampão TFK (11 mM) num homogeneizador. A taxa de hidrólise de acetilcolina (8 mM, 30  $\mu\text{L}$ ) foi determinada num volume final de 150  $\mu\text{L}$  de sistema (TFK 11 mM, pH 7,0 e DTNB

0,22 mM) e 105 µL água MilliQ, utilizando método anteriormente descrito por Ellman et al., (1961), com adaptações. Antes da adição do substrato, amostras contendo proteína (15 µL) foram pré-incubadas durante 5 min à 25°C. Após foram feitas leituras de absorção num comprimento de onda de 412 nm durante 5 minutos (com intervalos de 30 segundos). A reação que ocorre compreende a reação do substrato sintético acetiltiocolina com o reagente DTNB, que é um ácido reduzido a tio-nitrobenzóico, que permite a formação da coloração amarela. A atividade da acetilcolinesterase foi expressa µmolAcSCh/h/mg de proteína. Todos os ensaios foram realizados em triplicata.

### 3.7 DETERMINAÇÃO DA PROTEÍNA

A proteína foi determinada conforme método já estabelecido por Bradford (1976), usando o azul de *Coomassie* como reagente de cor e albumina de soro bovino como padrão.

### 3.8 METODOLOGIA HPLC

O padrão de estrogênio utilizado (17α-etinilestradiol), com pureza mínima de 98%, foi obtido da Sigma-Aldrich. O solvente orgânico utilizado foi acetonitrila (ACN) com grau cromatográfico 99,9% obtido da Êxodo Científica. Da Argilent, foram obtidos os cartuchos de extração em fase sólida do tipo *QuEChERS* (*Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged, Safe*) da série EC (*Extract Pouch*), *AOAC Method*. Os *QuEChERS* utilizados foram do tipo 5982-0755 (50 mL) contendo 6 g de Sulfato de Magnésio e 1,5 g de Acetato de Sódio. Foi utilizado o meio Dispersivo (D-SPE) 5982-4950 (15 mL), contendo 50mg de PSA, 150 mg de C<sub>18</sub>EC 900 mg de Sulfato de Sódio. Todas as vidrarias utilizadas, que não estéreis, foram lavadas com detergente comum, enxaguadas em água corrente e água destilada e por fim autoclavadas.

Foram extraídos os analitos estrogênicos de origem lipídica presentes nas águas em que os peixes ficaram expostos por 15 dias (exposição crônica) e também no tecido dos peixes, para tal, foram divididos três grupos de análise: um em que os peixes expostos às diferentes concentrações foram analisados, tendo como controle peixes que não foram expostos; o segundo grupo ficou com a água dos aquários em

que os peixes foram expostos, e um terceiro grupo em que somente aquários com água, sem a presença de peixes, foram expostos.

Foram utilizados 15 mL de ambas as águas e 15 g de tecido de peixe. Para a extração em tecido, os peixes foram pesados (aproximadamente 7 peixes), triturados e posteriormente seguiram para a extração. As águas seguiram para a extração logo após a coleta.

As amostras foram transferidas para um tubo de Falcon (50 mL), onde logo foi adicionado 15 mL de solvente ACN para a extração e agitou-se por 1 minuto em Vortex. Depois foram adicionados os sais do *QuEChERS*, agitados em Vortex com posterior centrifugação por 5 minutos à 4000 rpm.

Transferiu-se o sobrenadante (6 mL ACN + analitos), depois foram adicionados os sais do D-SPE e o Falcon foi agitado em Vortex mais uma vez por um minuto. Posteriormente centrifugou-se por 5 minutos à 4000 rpm. Depois deste processo foram transferidos 2 mL do sobrenadante para *Vials* destinados a cromatografia.

As análises cromatográficas foram realizadas em um sistema de cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), foi utilizado um cromatógrafo da marca Shimadzu composto por duas bombas quaternárias, *auto sampler*, modelo 20A e detector de arranjo diodo (DAD) modelo SPD-M20A. Todos os módulos foram controlados pelo *Software Lab Solutions*, e a coluna utilizada foi a C<sub>18</sub> (ODS) fase reversa (150mm x 4,5 mm).

As amostras de água, tecido e uma amostra de água ultrapura (branco) foram submetidas à extração, utilizando a mesma metodologia onde 20µL foram injetados nas condições cromatográficas, composta de ACN/H<sub>2</sub>O (65/35) na fase móvel, no módulo isocrático com fluxo de 0,7 mL/min. O tempo de corrida foi de 10min mantidos à 25°C, com injeção de 20 µL de amostra e o tempo de retenção de 3,85 min.

A quantificação foi realizada por padronização externa e a curva padrão foi construída com 7 pontos, cujas concentrações variaram de 2 a 26 ppm de 17α-etinilestradiol em ACN, foi obtido um R<sup>2</sup> de 0,99997 com a equação da reta  $y = 6463,28x + 319,728$ .

A identificação ocorreu através de leituras obtidas a 280 nm em CALE-DAD frente ao tempo de retenção dos analitos.

### 3.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA

As análises estatísticas da atividade de AChE, níveis de cortisol e análise da água foram submetidos à análise de variância de uma via (ANOVA- *oneway*) com *post hoc* de Dunnett's. O teste de HPLC para determinação do 17 $\alpha$ -etinilestradiol foi usado análise de variância de uma via com teste *pos hoc* Tukey. A análise comportamental foi submetida a teste estatístico de Kruskal-Wallis (não paramétrico).

## 4 RESULTADOS

Avaliamos o efeito do hormônio sintético 17 $\alpha$ -etinilestradiol sobre o comportamento do Zebrafish, sobre a atividade da enzima acetilcolinesterase e níveis de cortisol. Aqui observamos que o 17 $\alpha$ -etinilestradiol reduziu o comportamento social dos animais expostos, aumentou a agressividade após a exposição aguda e ativou uma resposta ansiogênica após exposição crônica. Após exposição crônica os níveis de cortisol aumentaram e a atividade da enzima AChE alterou significativamente aumentando após exposição a 5 ng/L de 17 $\alpha$ -etinilestradiol e diminuindo após a exposição a 0,5, 50 e 75 ng/L do toxicante . Além disso, determinamos a presença de 17 $\alpha$ -etinilestradiol nos tecidos dos Zebrafish após exposição crônica, demonstrando o caráter de bioacumulador deste hormônio sintético.

### 4.1 COMPORTAMENTO SOCIAL

#### 4.1.1 Exposição aguda

A exposição aguda ao 17 $\alpha$ -etinilestradiol após estresse por perseguição de 2 min interferiu no comportamento (Figura 6), diminuindo o tempo de permanência dos animais expostos a 0,05 ng/L de 17 $\alpha$ -etinilestradiol na zona de interação com os animais co-específicos não submetidos a tratamento (A), e o número de entradas no segmento mais próximo ao cardume para as concentrações de 0,05 e 75 ng/L (B).

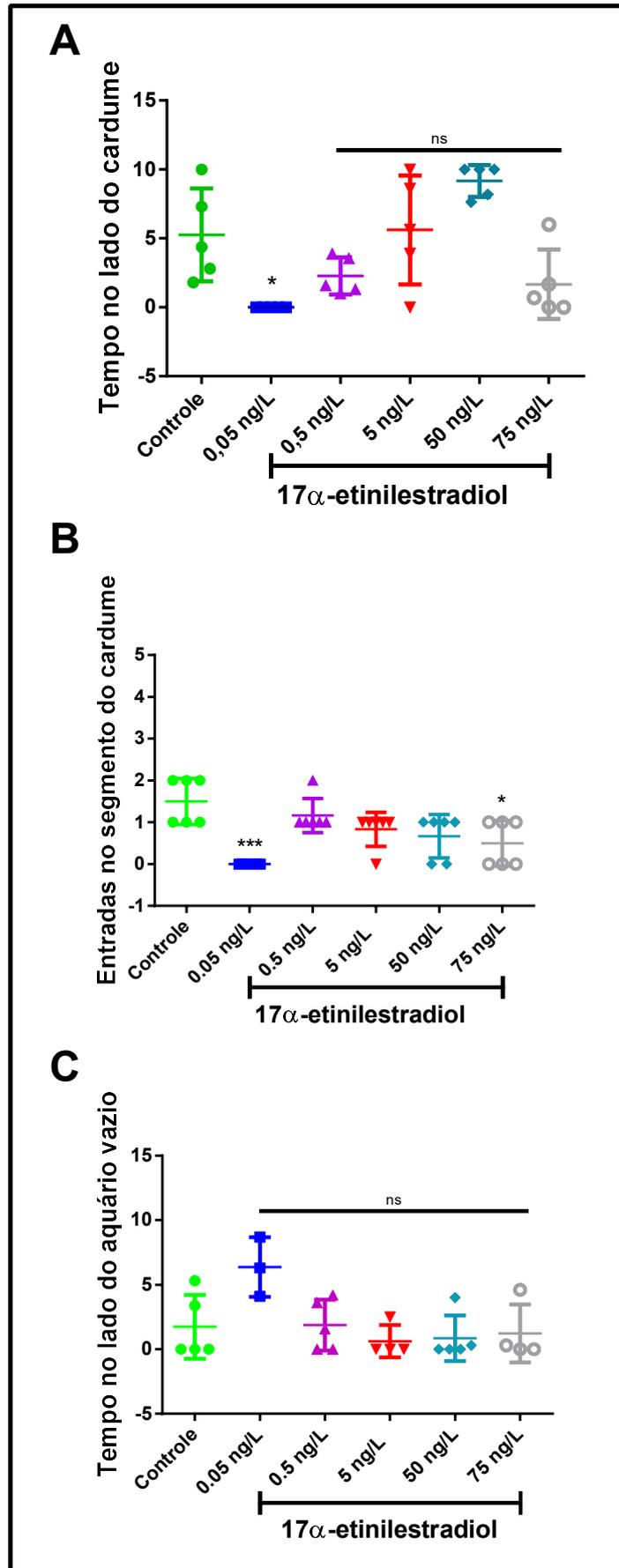


Figura 6: Comportamento social de peixes expostos agudamente a diferentes concentrações de 17 $\alpha$ -etinilestradiol e submetidos à estresse. (A) tempo de permanência no segmento do cardume, (B) entradas no segmento do cardume, (C) tempo de permanência no segmento vazio. Dados expressos em média  $\pm$  E.P., com n=6, analisados por ANOVA de um critério com teste *pos hoc* de Dunnett's, onde \*p<0,05, \*\*\*p<0,001.

#### 4.1.2 Exposição Crônica

A exposição crônica alterou o comportamento social de peixes expostos as concentrações de 5,0, 50 e 75 ng/L de 17 $\alpha$ -etinilestradiol (Figura 7), em relação ao controle não exposto. A interação social testada pelo tempo de permanência no segmento 1, mais próximo ao cardume, diminuiu significativamente nos peixes expostos a 50 e 75 ng/L, em relação ao controle (A).

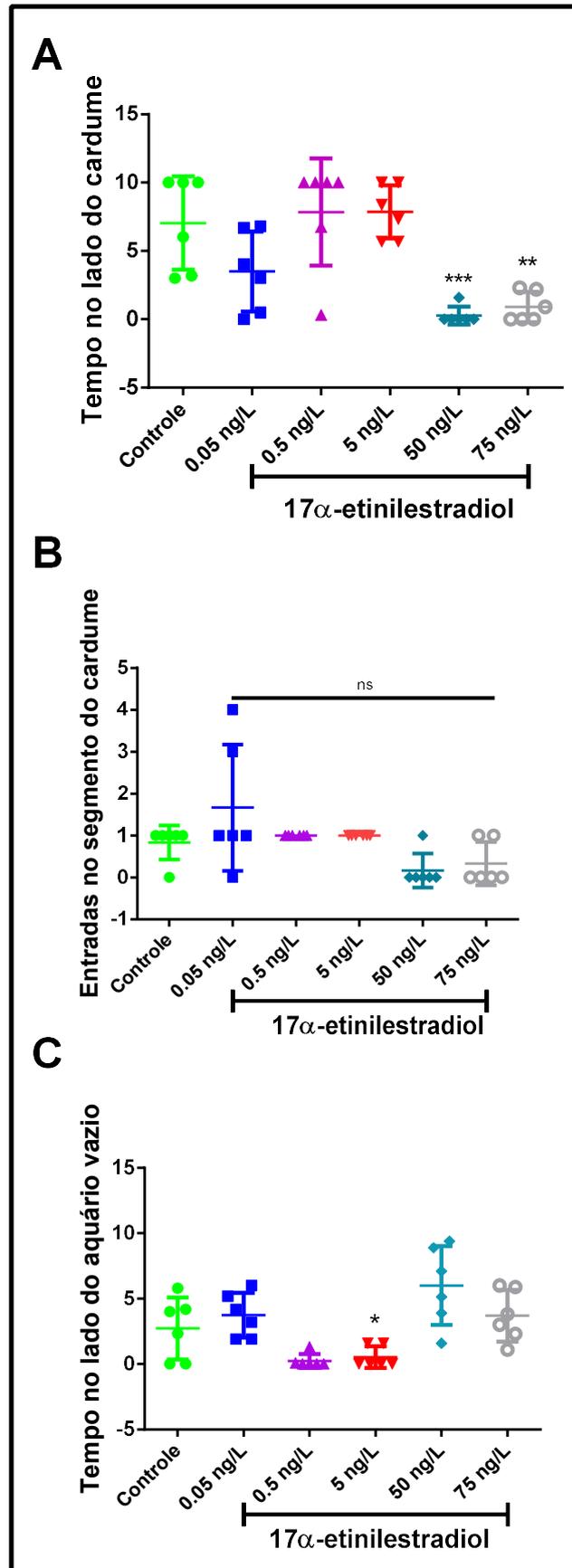


Figura 7: Comportamento social de peixes expostos cronicamente a diferentes concentrações de  $17\alpha$ -etinilestradiol e submetidos à estresse. (A) tempo de permanência no segmento do cardume, (B) entradas no segmento do cardume, (C) tempo de permanência no segmento vazio. Dados expressos em média  $\pm$  E.P., com  $n=6$ , analisados por ANOVA de um critério com teste *pos hoc* de Dunnett's, onde  $*p<0,05$ ,  $**p<0,01$ ,  $***p<0,001$ .

## 4.2 AGRESSIVIDADE

### 4.2.1 Exposição aguda– tempo 30 s

A exposição aguda ao  $17\alpha$ -etinilestradiol não alterou o comportamento de agressividade dos peixes após ambientação de 30 s (Figura 8).

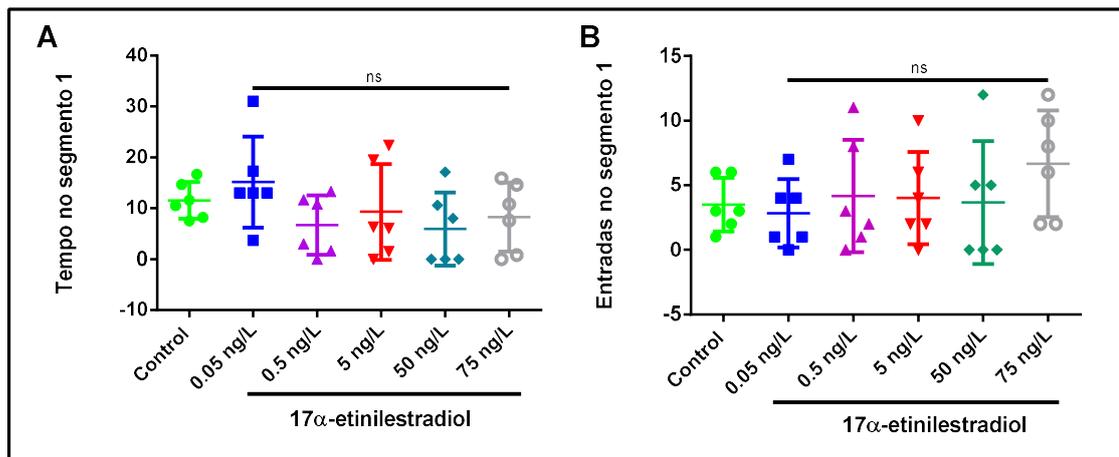


Figura 8: Agressividade de peixes expostos agudamente a diferentes concentrações de  $17\alpha$ -etinilestradiol e submetidos à estresse (ambientação de 30s). (A) tempo de permanência no segmento 1, (B) entradas no segmento. Dados expressos em média  $\pm$  E.P., com  $n=6$ , analisados por ANOVA.

### 4.2.2 Exposição aguda– tempo 10 min

Após dez minutos de ambientação, os peixes expostos agudamente a 5,0 e 75 ng/L apresentaram alteração de comportamento com relação ao controle (Figura 9). Onde os peixes expostos a 5,0 ng/L de  $17\alpha$ -etinilestradiol apresentaram um aumento do tempo no segmento 1, mais próximo do espelho (A), e os expostos a 75

ng/L de  $17\alpha$ -etinilestradiol apresentaram um aumento no número de vezes que entraram no mesmo segmento (B).

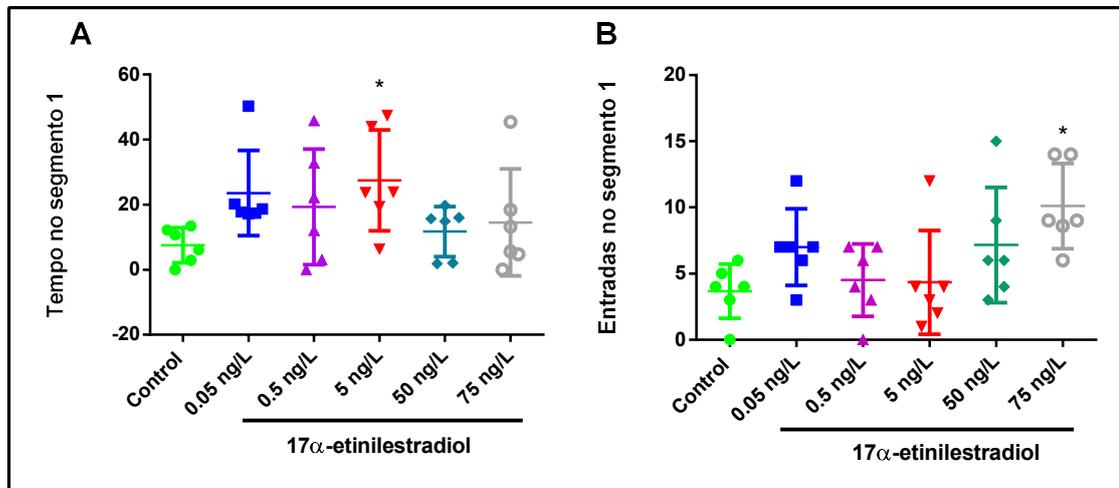


Figura 9: Agressividade de peixes expostos agudamente a diferentes concentrações de  $17\alpha$ -etinilestradiol e submetidos à estresse (ambientação de 10 min). (A) tempo de permanência no segmento 1, (B) entradas no segmento 1. Dados expressos em média  $\pm$  E.P., com n=6, analisados por ANOVA de um critério com teste *pos hoc* de Dunnett's, onde \* $p < 0,05$ .

#### 4.2.3 Exposição crônica– tempo 30 s

A exposição crônica ao  $17\alpha$ -etinilestradiol não alterou significativamente o comportamento agressivo dos peixes após ambientação de 30 s (Figura 10).

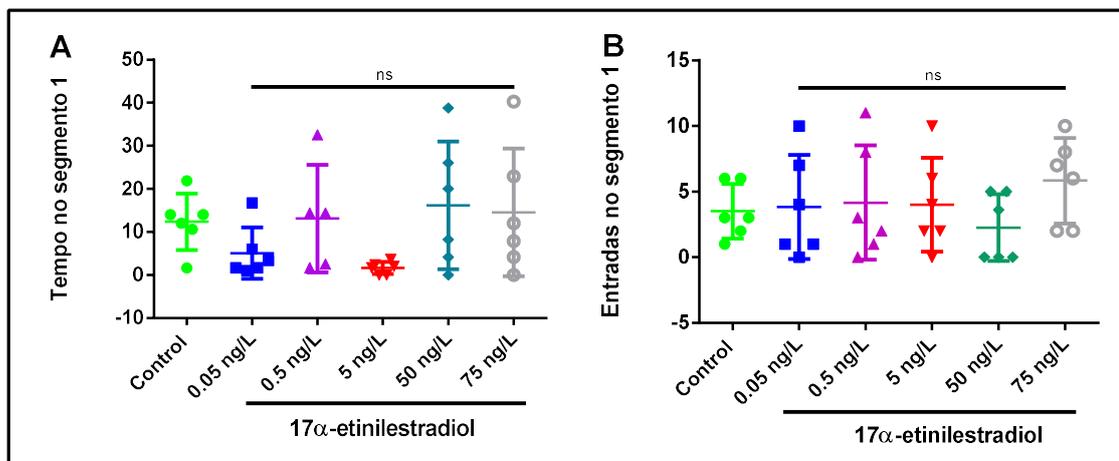


Figura 10: Agressividade de peixes expostos cronicamente a diferentes concentrações de  $17\alpha$ -etinilestradiol e submetidos à estresse (ambientação de 30s). (A) tempo de permanência no segmento 1, (B) entradas no segmento 1. Dados

expressos em média  $\pm$  E.P., com  $n=6$ , analisados por ANOVA de um critério com teste *pos hoc* de Dunnett's.

#### 4.2.4 Exposição crônica– tempo 10 min

A exposição crônica, após dez minutos de ambientação não houve alteração no comportamento de agressividade dos peixes expostos (Figura 11).

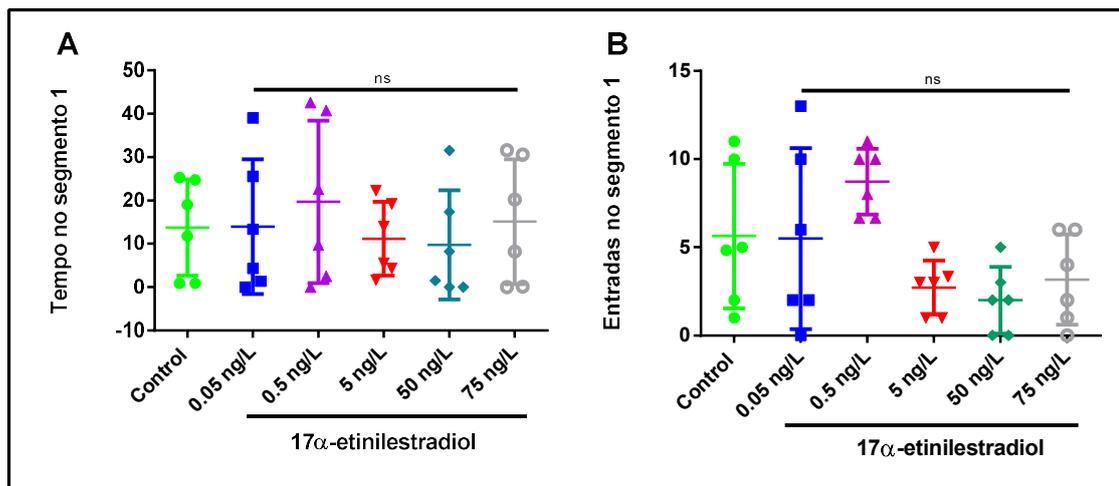


Figura 11: Agressividade de peixes expostos cronicamente a diferentes concentrações de 17α-etinilestradiol e submetidos à estresse (ambientação de 10 min). (A) tempo de permanência no segmento 1, (B) entradas no segmento 1. Dados expressos em média  $\pm$  E.P., com  $n=6$ , analisados por ANOVA de um critério com teste *pos hoc* de Dunnett's.

### 4.3 TESTE DO TANQUE NOVO

#### 4.3.1 Exposição aguda

Os peixes estressados e expostos agudamente ao 17α-etinilestradiol não tiveram mudanças significativas em relação ao controle no teste de tanque novo, que determina o comportamento tipo ansiedade (Figura 12).

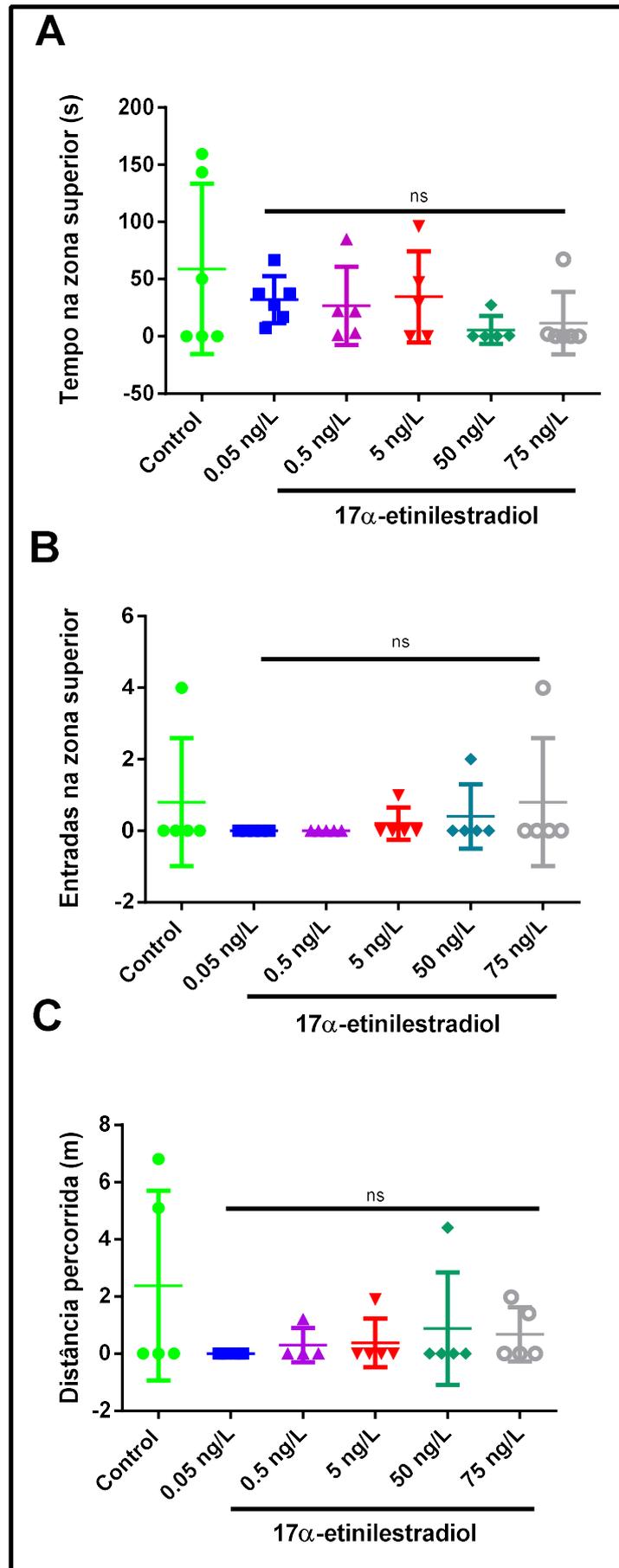


Figura 12: Parâmetros locomotores de peixes expostos agudamente a diferentes concentrações de 17 $\alpha$ -etinilestradiol e submetidos à estresse. (A) tempo de permanência no topo do aquário (s), (B) entradas na zona superior e (C) distância percorrida (m). Dados expressos em média  $\pm$  E.P., com n=6, analisados por ANOVA de um critério com teste *pos hoc* de Dunnett's.

#### 4.3.2 Exposição crônica

A exposição crônica a 0,05 ng/L de 17 $\alpha$ -etinilestradiol provocou uma diminuição significativa no tempo de permanência e o número de entradas na zona superior do aquário (Figura 13 A, B) demonstrando um efeito ansiogênico do hormônio sintético ao organismo. Não houve alteração significativa na distância percorrida pelos animais nas diferentes concentrações do toxicante (Figura 13 C).

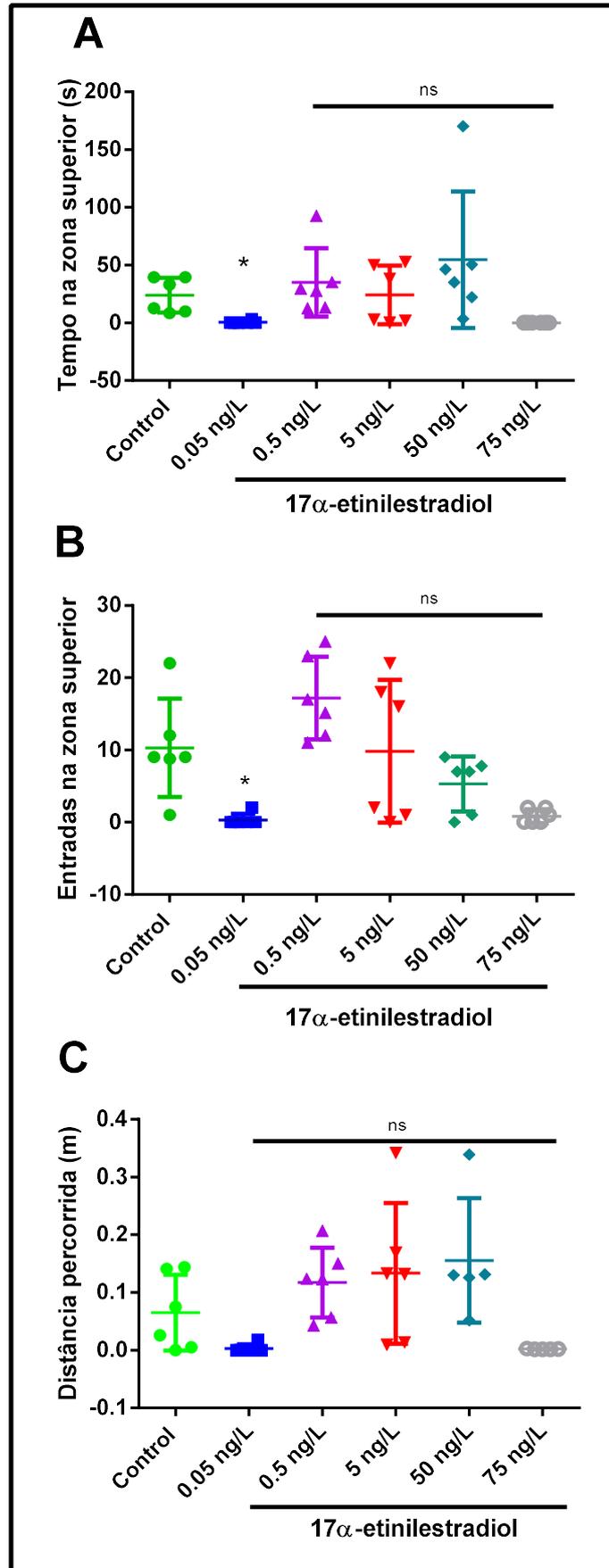


Figura 13: Parâmetros locomotores de peixes expostos cronicamente a diferentes concentrações de  $17\alpha$ -etinilestradiol e submetidos à estresse. (A) tempo de permanência no topo do aquário (s), (B) entradas na zona superior e (C) distância percorrida (m). Dados expressos em média  $\pm$  E.P., com  $n=6$ , analisados por ANOVA de um critério com teste *pos hoc* de Dunnett's, onde  $*p < 0,05$ .

#### 4.4 HORMÔNIO CORTISOL

A exposição crônica ao  $17\alpha$ -etinilestradiol não alterou o nível de cortisol dos peixes sem estresse por perseguição de 2 min (Figura 14 A). Para os animais submetidos a estresse, o nível de cortisol aumentou em todas as concentrações, sendo que as de 0,05, 5,0, 50 e 75 ng/L aumentaram significativamente em relação ao grupo controle. Por outro lado, a concentração de 0,5 ng/L de  $17\alpha$ -etinilestradiol bloqueou a resposta esperada, comportamento previsível de um toxicante considerado disruptor endócrino.

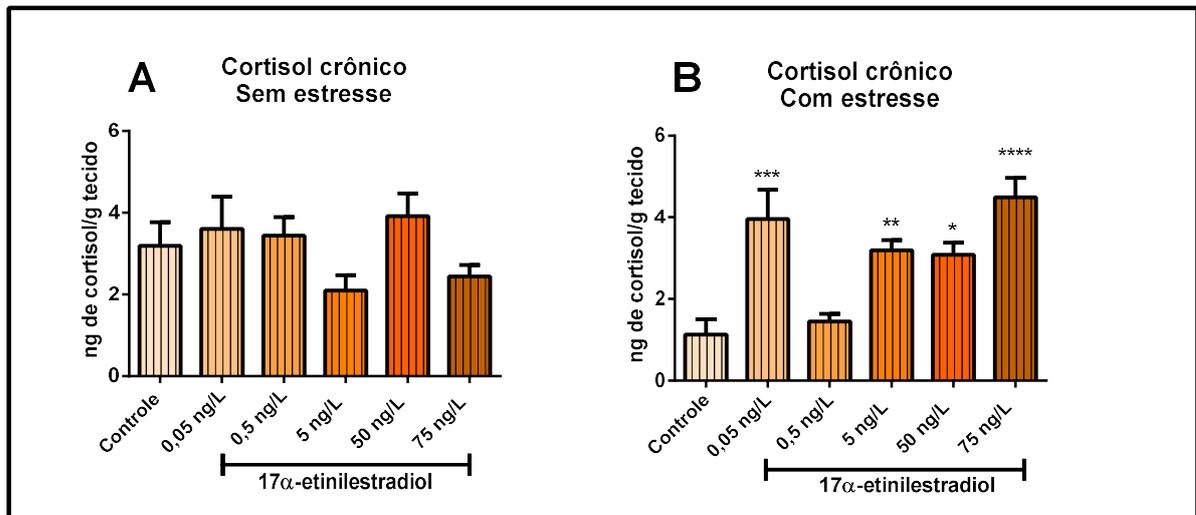


Figura 14: Concentrações de Cortisol de corpo inteiro em peixes expostos a diferentes concentrações de  $17\alpha$ -etinilestradiol. (A) sem fator estressante e (B) com fator estressante. Dados expressos em média  $\pm$  E.P., com  $n=18$ , intervalo interquartil analisados por ANOVA de uma via com teste *pos hoc* de Dunnett's, onde  $*p < 0,05$ ,  $**p < 0,01$ ,  $***p < 0,001$ ,  $****p < 0,0001$ .

#### 4.5 ACETILCOLINESTERASE

#### 4.5.1 Exposição aguda

Na exposição aguda sem estresse, pode-se observar que a atividade da enzima AChE aumentou significativamente no grupo que recebeu a concentração 5 ng/L quando comparado ao controle. Enquanto, a atividade da AChE diminuiu significativamente nos grupos que receberam as concentrações de 0,5 e 50 ng/L, ambos comparados ao controle (Figura 15 A). Já quando submetidos a estresse, houve uma diminuição significativa da atividade da AChE nas concentrações de 0,05, 0,5, 5,0 e 50 ng/L de 17 $\alpha$ -etinilestradiol em comparação ao grupo controle (Figura 15 B).

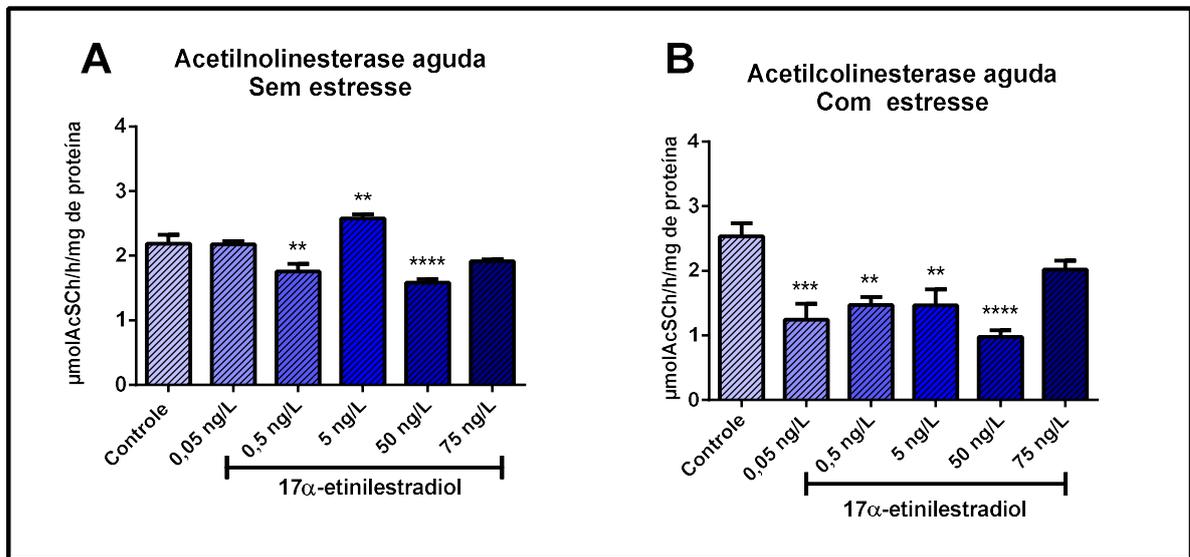


Figura 15: Atividade da enzima AChE de peixes expostos agudamente a diferentes concentrações de 17 $\alpha$ -etinilestradiol. (A) sem fator estressante e (B) com fator estressante. Onde (\*) expressa diferença significativa comparada ao grupo controle. Dados expressos em média  $\pm$  D.P., com n=18, intervalo interquartil analisados por ANOVA de um critério com teste *pos hoc* de Dunnett's, onde \*p<0,05, \*\*p<0,01, \*\*\*p<0,001, \*\*\*\*p<0,0001.

#### 4.5.2 Exposição crônica

Na exposição crônica sem estresse pode-se observar que a atividade da enzima AChE aumentou significativamente no grupo que recebeu a concentração 5 ng/L de 17 $\alpha$ -etinilestradiol, quando comparado ao controle. Por outro lado, a atividade da AChE diminuiu significativamente nos grupos que receberam as

concentrações de 0,5, 50 e 75 ng/L do toxicante, em comparação ao controle (Figura 16 A). Já quando submetidos a estresse, houve um aumento na atividade da enzima para as concentrações 0,5, 50 e 75 ng/L de 17 $\alpha$ -etinilestradiol, em comparação ao grupo controle (Figura 16 B).

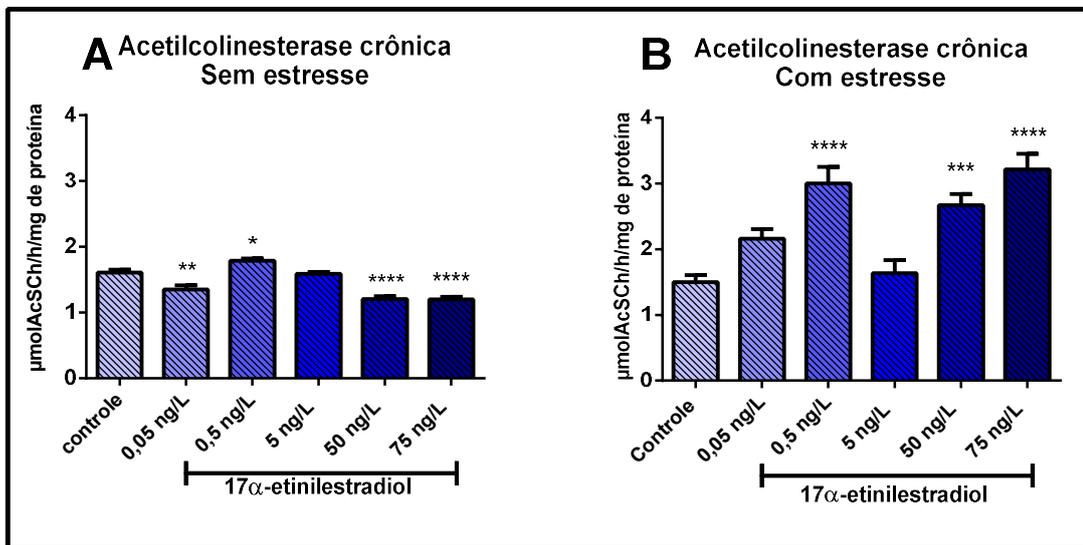


Figura 16: Atividade da enzima AChE de peixes expostos cronicamente a diferentes concentrações de 17 $\alpha$ -etinilestradiol. (A) sem fator estressante e (B) com fator estressante. Onde (\*) expressa diferença significativa comparada ao grupo controle. Dados expressos em média  $\pm$  D.P., com n=18, intervalo interquartil analisados por ANOVA de um critério com teste *pos hoc* de Dunnett's, onde \* p<0,05, \*\*p<0,01, \*\*\*p<0,001, \*\*\*\*p<0,0001.

#### 4.6 DETERMINAÇÃO DE 17 $\alpha$ -ETINILESTRADIOL

A Figura 17 mostra a concentração de 17 $\alpha$ -etinilestradiol encontrada na água exposta ao hormônio sintético sem a presença de animais no aquário, na água do aquário cujos animais foram expostos, e no tecido dos peixes, todos expostos cronicamente às concentrações de 17 $\alpha$ -etinilestradiol.

O gráfico evidencia que o hormônio apresenta uma meia-vida de 24 horas na água, como previsto na literatura (AZEVEDO, 2011), pois as concentrações encontradas na água dos aquários de teste foram muito próximas ou iguais à zero. Ainda na figura 17, é possível observar que a concentração de 17 $\alpha$ -etinilestradiol nos tecidos dos animais após exposição crônica, foi dose dependente.

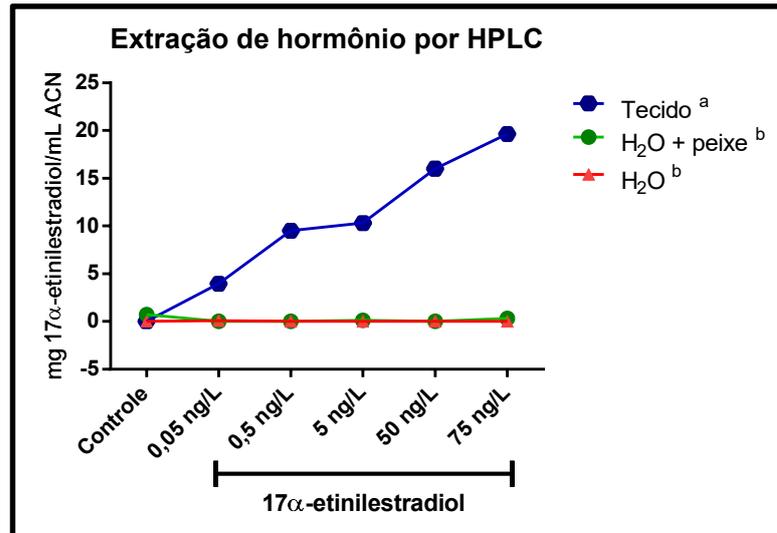


Figura 17: Níveis de 17 $\alpha$ -etinilestradiol encontrados na água e no tecido de peixes expostos. Dados expressos em média  $\pm$  D.P., com n=6, intervalo interquartis analisados por ANOVA de um critério, com teste *pos hoc* de Tukey, com  $p < 0,01$ .

#### 4.7 COMPILAÇÃO DOS RESULTADOS

A Tabela 2 resume os resultados obtidos neste trabalho para melhor interpretação melhorando a percepção dos efeitos encontrados. Onde a seta para cima, na cor verde representa aumento do parâmetro analisado e a seta para baixo, na cor vermelha representa diminuição do parâmetro analisado.

Tabela 2: Resultados dos parâmetros analisados.

<b>ANÁLISES COMPORTAMENTAIS COM ESTRESSE</b>						
<b>Exposição Aguda</b>						
	Controle	0,05	0,5	5	50	75
Comportamento Social	-	↓	-	-	-	↓
Agressividade - 30s	-	-	-	-	-	-
Agressividade - 10min	-	-	-	↑	-	↑
Ansiedade	-	-	-	-	-	-
<b>Exposição Crônica</b>						
	Controle	0,05	0,5	5	50	75
Comportamento Social	-	-	-	↑	↓	↓
Agressividade - 30s	-	-	-	-	-	-
Agressividade - 10min	-	-	-	-	-	-
Ansiedade	-	↑	-	-	-	-
<b>ANÁLISE CORTISOL CRÔNICA</b>						
	Controle	0,05	0,5	5	50	75
Sem estresse	-	-	-	-	-	-
Com estresse	-	↑	-	↑	↑	↑
<b>ANÁLISE AChE</b>						
<b>Exposição Aguda</b>						
	Controle	0,05	0,5	5	50	75
Sem estresse	-	-	↓	↑	↓	-
Com estresse	-	-	↓	↓	↓	↓
<b>Exposição Crônica</b>						
	Controle	0,05	0,5	5	50	75
Sem estresse	-	-	-	↑	↓	↓
Com estresse	-	-	↑	-	↑	↑
<b>Legenda</b>						
Aumento no parâmetro analisado		↑				
Diminuição no parâmetro analisado		↓				
Sem alteração		-				

## 5 DISCUSSÃO

O hormônio sintético  $17\alpha$ -etinilestradiol é considerado um desruptor endócrino e o estresse de sua exposição causa alterações nos organismos expostos. Para os parâmetros analisados em nosso trabalho, esperaria-se que essa exposição afetasse o comportamento diminuindo a interação social do animal com o cardume, aumentando a agressividade e a ansiedade. É comum que os níveis de cortisol aumentem devido ao estresse e que a atividade da enzima AChE se altere. A presença do  $17\alpha$ -etinilestradiol causa efeitos neuroendócrino no Zebrafish mesmo em baixas concentrações, como ocorreu em grupos de animais expostos quando comparado ao controle, e quando submetidos a estresse de perseguição os efeitos foram potencializados.

Os organismos expostos ao hormônio sintético e submetidos a estresse apresentaram alterações no comportamento. De fato, neste estudo procuramos avaliar os parâmetros comportamentais após uma situação de estresse, já que em trabalho anterior do grupo, Fenske (2017) observou-se que a exposição ao  $17\alpha$ -etinilestradiol afetou o comportamento de Zebrafish, porém sem nenhuma exposição à situação de estresse. Assim, podemos evidenciar a partir dos resultados obtidos aqui que o  $17\alpha$ -etinilestradiol é capaz de promover alterações comportamentais, e que estas alterações podem ser exacerbadas em situações de estresse, como é comum na natureza. Estes resultados demonstram que a exposição ao  $17\alpha$ -etinilestradiol torna os organismos aquáticos mais suscetíveis às pressões ambientais, o que pode comprometer a capacidade reprodutiva, e até mesmo a sobrevivência dos indivíduos.

Na exposição aguda ao  $17\alpha$ -etinilestradiol o comportamento social foi reduzido nas concentrações 0,05 e 75 ng/L, e na exposição crônica nas concentrações 50 e 75 ng/L. A redução do tempo em que o animal permanece no seguimento do aquário teste próximo ao cardume representa prejuízo no comportamento social. Isso devido ao Zebrafish ser uma espécie que vive em cardume e sua sociabilidade começa a ser definida ainda no início da vida por se tratar de um comportamento inato da espécie (KALUEFF et al., 2013). Em estudo anterior Fenske (2017) não encontrou alterações no comportamento social de Zebrafish expostos agudamente ao  $17\alpha$ -etinilestradiol, somente a exposição crônica prejudicou o comportamento social de peixes, evidenciando que o estresse

ambiental afeta este parâmetro nos peixes. Desta forma, considerando que o sistema de resposta ao estresse ajuda os indivíduos a lidar com condições adversas (ABREU et al., 2014), uma menor interação social pode deixar os animais mais suscetíveis a predação.

Associada à redução da interação social, a exposição aguda ao toxicante provocou um aumento da agressividade após 10 minutos de ambientação. Esta exposição contribuiu para que os animais expostos às concentrações de 5,0 e 75 ng/L de 17 $\alpha$ -etinilestradiol ficassem mais agressivos, aumentando o tempo de permanência no seguimento próximo ao espelho. O aumento da agressividade pode prejudicar o comportamento social, como foi observado e, conseqüentemente, o sucesso reprodutivo e até mesmo a capacidade de viverem em cardumes, característico da espécie, e que pode garantir sua sobrevivência ou sua capacidade de deixar descendentes (ARAÚJO, 2012).

Com relação ao teste de tanque novo, que é utilizado para determinar o comportamento tipo ansiedade, os animais expostos agudamente ao 17 $\alpha$ -etinilestradiol não apresentaram alterações. Entretanto, após exposição crônica ao hormônio sintético os peixes expostos à concentração de 0,05 ng/L de 17 $\alpha$ -etinilestradiol permaneceram menos tempo no seguimento superior do aquário teste, demonstrando o efeito ansiogênico do hormônio para este grupo. O Zebrafish normalmente apresenta comportamentos normais neste teste, então uma alteração nesse comportamento pode representar risco à espécie (KISYL et al., 2017).

As respostas ao estresse representam alterações fisiológicas caracterizadas pelo nível de cortisol alterado (DE ABREU et al., 2014). Um prejuízo na resposta ao estresse afeta a homeostase em resposta aos estressores, reduzindo os ajustes iônicos, metabólicos e comportamentais necessários para a resposta ao estresse (DE ABREU et al., 2014). O cortisol é um indicador do estresse para o Zebrafish (BARCELLOS, 2007), nossos resultados não demonstraram alterações nos níveis de cortisol na exposição crônica sem estresse, mas o fator estresse ambiental provocou aumento no nível de cortisol para a maioria das concentrações de 17 $\alpha$ -etinilestradiol. Quando um peixe apresenta desequilíbrio nos níveis de cortisol suas reações no ecossistema ficam prejudicadas, além disso, a redução da sociabilidade o torna mais suscetível à predação (DE ABREU et al., 2014), devido à perda da capacidade de viver em cardume, característico da espécie. Como foi observado neste estudo, a exposição aguda às doses de 0,5 e 75 ng/L de 17 $\alpha$ -etinilestradiol

provocaram uma redução da interação social, ao contrário da exposição crônica onde peixes expostos as doses 50 e 75 ng/L que aumentaram a interação social.

Os níveis do neurotransmissor acetilcolina (ACh) são críticos ao longo do desenvolvimento, pois definem a relação de neurotransmissão excitatória e inibitória no cérebro além de promover e refinar as redes neurais no cérebro em desenvolvimento e quando adulto (MESHALKINA et al., 2017a). Esta neurotransmissão colinérgica está amplamente envolvida no desenvolvimento dos sistemas nervoso periférico e central e desempenha um importante papel na regulação do movimento muscular, aprendizagem, atenção, cognição e memória (ALTENHOFEN, 2017). A enzima acetilcolinesterase (AChE) é a principal responsável pela finalização de impulsos nervosos nas sinapses colinérgicas controlando os batimentos cardíacos, a dilatação dos vasos sanguíneos, a contração dos músculos, o controle motor, a cognição e aprendizagem (PETRONILHO, 2011 e ZANANDREA et al., 2018). Nosso estudo mostrou que a exposição aguda e crônica ao 17 $\alpha$ -etinilestradiol alterou significativamente a atividade da enzima AChE. Os peixes que não foram estressados por perseguição de 2 minutos e expostos foram à concentração de 5,0 ng/L do hormônio tiveram sua atividade aumentada tanto na exposição aguda quanto crônica. A consequência deste aumento na atividade da AChE é a diminuição nos níveis de acetilcolina nas sinapses nervosas, podendo representar um déficit cognitivo e motor (PETRONILHO, 2011). Já os expostos agudamente a 0,5 e 50 ng/L de 17 $\alpha$ -etinilestradiol apresentaram inibição da AChE. Considerando ainda os animais não estressados, os expostos cronicamente às concentrações 0,5, 50 e 75 ng/L apresentaram diminuição na atividade da enzima AChE. A inibição da atividade da AChE pode estar relacionada a uma excitação do sistema colinérgico, já que permite com que o neurotransmissor ACh permaneça por mais tempo na fenda sináptica, interagindo com os receptores colinérgicos e excitando o terminal pós-sináptico, que transmitirá esta informação as demais sinapses. Esta situação promoverá alterações nas respostas comportamentais, cognitivas e motoras do Zebrafish (PETRONILHO, 2011), como foi observado neste estudo. O estresse proposital após exposição aguda ao 17 $\alpha$ -etinilestradiol colaborou com a inibição da atividade da AChE para as concentrações 0,5, 5,0, 50 e 75 ng/L de 17 $\alpha$ -etinilestradiol. Na exposição crônica, este mesmo comportamento inibitório do toxicante sobre a atividade da AChE foi observado nas concentrações 0,5, 50 e 75 ng/L após exposição crônica com estresse proposital.

Os esteroides são compostos lipofílicos derivados do colesterol, sintetizados principalmente em glândulas endócrinas, e também podem ser produzidos em órgãos como o cérebro, pois eles agem tanto em órgãos periféricos como no sistema nervoso central (YAMAMOTO, 2016). Logo, hormônios de origem lipídica afetam vários mecanismos controlados por enzimas. O sistema nervoso é um dos tecidos mais atingidos pela ação de esteroides sexuais, os quais atuam na liberação e metabolismo de diversos neuropeptídeos e neurotransmissores, e influenciando a excitabilidade elétrica, a função sináptica e as particularidades morfológicas dos neurônios (RIBEIRO, 2014), indicando que os estrogênios podem ativar ou inibir enzimas que agem sobre a síntese de neurotransmissores, como a acetilcolina. Sendo o  $17\alpha$ -etinilestradiol um hormônio de origem lipídica, assim como outros desreguladores endócrinos, é capaz de interferir na função de enzimas responsáveis pela metabolização dos esteroides em metabólitos ativos, antes de interagirem com seu receptor específico (YAMAMOTO, 2016). Então, além do controle da transcrição da enzima AChE, o  $17\alpha$ -etinilestradiol também pode interferir na disponibilidade de colina e acetato para a síntese de ACh, e portanto, inibir a AChE, e esta seria uma forma de proteção do organismo em resposta à toxicidade do hormônio.

A presença de fármacos na água, destacando o  $17\alpha$ -etinilestradiol usado em nosso estudo, torna-se preocupante. Em nosso estudo não encontramos resíduos do hormônio na água em que os peixes ficaram expostos durante 15 dias, e nem na água sem peixe em que o fármaco foi administrado diariamente, o que indica que a meia-vida deste fármaco não excede 24 horas. Por outro lado, os níveis de  $17\alpha$ -etinilestradiol encontrados nos tecidos dos animais expostos cronicamente ao  $17\alpha$ -etinilestradiol apresentaram uma resposta dose dependente, evidenciando a acumulação do hormônio no tecido dos animais. Esta acumulação do fármaco condiz com o comportamento dos compostos químicos considerados disruptores endócrinos, como o são a classe dos hormônios estrogênios. Estes compostos podem ser biotransformados em substâncias que provocam efeitos deletérios à biota e aos humanos, e mesmo que sua meia-vida seja curta no ambiente, são lançados continuamente e persistem no meio (GHISELLI et al., 2007). Assim, destacando a homologia entre o Zebrafish e o ser humano, a resposta dose dependente da presença de  $17\alpha$ -etinilestradiol no tecido de Zebrafish, é um indicador de que este hormônio sintético é bioacumulador. Desta forma, o  $17\alpha$ -etinilestradiol pode acumular ao longo da cadeia trófica, devido ao seu caráter lipídico, demonstrando o

potencial de biomagnificação e, conseqüente, promoção de dano ao ecossistema aquático, podendo chegar ao homem.

Diante do exposto, o presente estudo demonstrou que, mesmo baixas (ng/L) concentrações ambientais de 17 $\alpha$ -etinilestradiol afetam os parâmetros comportamentais e neuroendócrinos do organismo modelo estudado. A exposição crônica ao fármaco 17 $\alpha$ -etinilestradiol reduziu a interação social, associado a uma resposta ansiogênica, em resposta a inibição da enzima AChE e a um aumento dos níveis do cortisol, após submissão dos peixes a estresse intencional. Associado a estes resultados o 17 $\alpha$ -etinilestradiol apresentou bioacumulação nos tecidos de Zebrafish, o que demonstra seu potencial de biomagnificação, podendo afetar o homem, como é característico dos disruptores endócrinos.

## 6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

1. Aqui observamos que o 17 $\alpha$ -etinilestradiol causa efeitos neuroendócrino o que fica evidenciado pelas alterações comportamentais em resposta às alterações observadas na atividade da enzima AChE, usada como parâmetro para determinar o status do sistema nervoso colinérgico, a exposição aguda e crônica ao 17 $\alpha$ -etinilestradiol alterou significativamente a atividade da enzima AChE.

2. Na exposição aguda ao 17 $\alpha$ -etinilestradiol o comportamento social foi reduzido, associada à essa redução, a exposição aguda provocou um aumento da agressividade após 10 minutos de ambientação. Após exposição crônica ao hormônio sintético este apresentou efeito ansiogênico ao Zebrafish. Essas alterações tornam a espécie mais suscetível à predação, e podem promover efeitos negativos na reprodução, comprometendo a manutenção da espécie no ecossistema.

3. Nossos resultados não demonstraram alterações nos níveis de cortisol na exposição crônica sem estresse, mas o fator estresse ambiental provocou aumento no nível de cortisol para a maioria das concentrações de 17 $\alpha$ -etinilestradiol.

4. Não encontramos resíduos do hormônio na água em que os peixes ficaram expostos durante 15 dias, e nem na água sem peixe em que o fármaco foi administrado diariamente, o que indica que a meia-vida deste fármaco não excede 24 horas. Por outro lado, os níveis de 17 $\alpha$ -etinilestradiol encontrados nos tecidos dos animais expostos cronicamente ao EE2 apresentaram uma resposta dose dependente, evidenciando a acumulação do hormônio no tecido dos animais.

O 17 $\alpha$ -etinilestradiol, mesmo em concentrações muito baixas (unidade de ng/L), afetou parâmetros comportamentais e neuroendócrinos na espécie estudada, o que pode comprometer o sucesso reprodutivo e a própria sobrevivência da espécie no ecossistema aquático. Ainda que a presença destes fármacos, de origem lipídica, nos ecossistemas aquáticos tem potencial ecotoxicológico, a concentração de 17 $\alpha$ -etinilestradiol nos tecidos dos animais após exposição crônica, foi dose dependente, o que indica o caráter de bioacumulação deste hormônio sintético de origem lipídica, o que pode indicar este fármaco como um disruptor endócrino, o que pode comprometer todos os níveis da cadeia trófica, chegando até o homem.

## REFERÊNCIAS

- ABREU, M. S. et al. **Diazepam and fluoxetine decrease the stress response in Zebrafish**. Plo Sone, v. 9, n. 7, p. e103232, 2014.
- ABREU, M. S. et al. **Effects of waterborne fluoxetine on stress response and osmoregulation in Zebrafish**. Environmental Toxicology and Pharmacology, v. 40, n. 3, p. 704-707, 2015.
- ABREU, M. S., et al. **Effects of ZnSO 4-induced peripheral anosmia on Zebrafish behavior and physiology**. Behavioural brain research 320: 275-281, 2017.
- ABREU, M. S. de et al. **Efeitos, percepção de fármacos e comunicação química em peixes**. Tese de Doutorado. Universidade Federal de Santa Maria. 2017.
- ALTENHOFEN, S. **Envolvimento dos sistemas purinérgico, colinérgico e dopaminérgico na neurotoxicidade induzida por metais e agrotóxicos em peixe-zebra (*Danio rerio*)**. 2017.
- AMÉRICO, J. H. P. et al. **Desreguladores endócrinos no ambiente e seus efeitos na biota e saúde humana**. Pesticidas, Curitiba, v. 22, p.17-34, dez. 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, 105p, 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.
- BARCELLOS, L. J. G. et al. **Whole-body cortisol increases after direct and visual contact with a predator in zebrafish, *Danio rerio***. Aquaculture, v. 272, n. 1-4, p. 774-778, 2007.
- BARREIROS, L. et al. **Analysis of 17- $\beta$ -estradiol and 17- $\alpha$ -ethinylestradiol in biological and environmental matrices - a review**. Microchemical Journal, v. 126, p. 243-262, 2016.
- BARTON, B. A. **Stress in fishes: a diversity of responses with particular reference to changes in circulating corticosteroids**. Integrative and comparative biology, v. 42, n. 3, p. 517-525, 2002.
- BEST J. D. e DERTON W. K. **Zebrafish: an *in vivo* model for the study of neurological diseases**. Neuropsychiatr Dis Treat, v.4, p.567-576,2008.
- BILA, D. M. e 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, 2007.

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

BRADFORD, M. M. **A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding.** Analytical biochemistry, v. 72, n. 1-2, p. 248-254, 1976.

BRAGA, I. **Ação de Gaba e Acetilcolina como bioreguladores na fisiologia de soja sob deficiência hídrica.** 2018.

BRASIL. **Lei nº 9.433**, de 08 de janeiro de 1997. Institui a Política Nacional de Recursos Hídricos, cria o Sistema Nacional de Gerenciamento de Recursos Hídricos, regulamenta o inciso XIX do art. 21 da Constituição Federal, e altera o art. 1º da Lei nº 8.001, de 13 de março de 1990, que modificou a Lei nº 7.990, de 28 de dezembro de 1989. Diário Oficial da União, 1997.

BRITO, F. **O deslocamento da população brasileira para as metrópoles.** Estudos Avançados, v. 20, n. 57, p. 221-236, 2006.

CAILLEAUD, K. et al. **Uptake and elimination, and effect of estrogen-like contaminants in estuarine copepods: an experimental study.** Environmental Science and Pollution Research, v. 18, n. 2, p. 226-236, 2011.

CARVALHO, S. C. et al. **Biomarker responses as indication of contaminant effects in *Oreochromis niloticus*.** Chemosphere, v. 89, n. 1, p. 60-69, 2012.

CONAMA, **Resolução 357**, de 17 de março de 2005. Conselho Nacional do Meio Ambiente-CONAMA, v. 357, 2005.

CONAMA, **Resolução 396**, de 07 de abril de 2008. Conselho Nacional do Meio Ambiente-CONAMA, v. 396, 2008.

CONAMA, **Resolução 397**, de 03 de abril de 2008. Conselho Nacional do Meio Ambiente-CONAMA, v. 397, 2008.

CONAMA, **Resolução 430**, de 13 de maio de 2011. Conselho Nacional do Meio Ambiente-CONAMA, v. 430, 2011.

CNRH, **Resolução nº 91**, de 05 de novembro de 2008. Conselho Nacional de Recursos Hídricos-CNRH, 2008.

CUNHA, D. L. et al. **Occurrence of estrogens and their removal by biological processes of sewage treatment.** Revista Ambiente & Água, v. 12, n. 2, p. 249-262, 2017.

DAHLBOM, S. J. et al. **Aggression and monoamines: effects of sex and social rank in zebrafish (*Danio rerio*).** Behavioural brain research, v. 228, n. 2, p. 333-338, 2012.

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, 1º Edição, 2011.

DE FARIAS, N. O. et al. **Exposure to low concentration of fluoxetine affects development, behaviour and acetylcholinesterase activity of Zebrafish embryos.** Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology, v. 215, p. 1-8, 2019.

DE LIMA, D. et al. **In vitro and in vivo inhibition of acetylcholinesterase and carboxylesterase by metals in Zebrafish (*Danio rerio*).** Marine environmental research, v. 91, p. 45-51, 2013.

DE OLIVEIRA, J. et al. **Efeito agudo da ginástica laboral na concentração de cortisol durante o turno de trabalho.** Movimento e Percepção, v. 9, n. 13, 2008.

DEBLONDE, T. et al. **Emerging pollutants in wastewater: A review of the literature.** International Journal of Hygiene and Environmental Health, v. 214, n. 6, p.442-448, nov. 2011.

DEMIN, K. A. et al. **Zebrafish models relevant to studying central opioid and endocannabinoid systems.** Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry, 2018.

DEVLIN, T. M. e TOMA, L. **Manual de bioquímica: com correlações clínicas.** 2007.

DIAS, R. A. J. M. **Contribuição para o estudo da remoção biológica simultânea do 17 $\beta$ -Estradiol e 17 $\alpha$ -Etinilestradiol em sistemas de discos biológicos.** 2017.

EGAN, R. J. et al. **Understanding behavioral and physiological phenotypes of stress and anxiety in Zebrafish.** Behavioural brain research, v. 205, n. 1, p. 38-44, 2009.

ELLMAN, G. L. et al. **A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity.** Biochemical pharmacology, v. 7, n. 2, p. 88-95, 1961.

ENGESZER, R. E. et al. **Zebrafish in the wild: a review of natural history and new notes from the field.** Zebrafish, v. 4, n. 1, p. 21-40, 2007.

EVRON, T. et al. **Adaptive changes in acetylcholinesterase gene expression as mediators of recovery from chemical and biological insults.** Toxicology, v. 233, n. 1-3, p. 97-107, 2007.

FENSKE, L. **Hormônio estrogênio na água provoca alterações comportamental e desregulação endócrina em Zebrafish.** UFFS. 2017.

FERNANDES, A. N. et al. **Remoção dos hormônios 17 $\beta$ -estradiol e 17 $\alpha$ -etinilestradiol de soluções aquosas empregando turfa decomposta como material adsorvente.** Química Nova, Porto Alegre, v. 34, n. 9, p.1526-1533, jun. 2011.

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.

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

GHISELLI, G. e JARDIM, W. F. **Interferentes endócrinos no ambiente.** Química Nova, v.30, n.3, p.695-706, 2007.

GIACOMINI, A. C. V. V. et al. **Fluoxetine and diazepam acutely modulate stress induced-behavior.** Behavioural Brain Research, n.296 p.301–310, 2016.

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.

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

HU, S. et al. **Effects of 17 $\beta$ -estradiol and 17 $\alpha$ -ethinylestradiol on the embryonic development of the clearhead icefish (*Protosalan xhyalocranius*).** Chemosphere 176, 2017: 18-24.

HUANG, X. et al. **Determination of steroid sex hormones in urine matrix by stir bar sorptive extraction based on monolithic material and liquid chromatography with diode array detection.** Talanta, v. 75, n. 1, p. 172-177, 2008.

IBGE- **Pesquisa Nacional de Amostras de Domicílios (Pnad)**, 2015.

IDALENCIO, R.n et al.  **$\alpha$ -Methyltyrosine, a tyrosine hydroxylase inhibitor, decreases stress response in Zebrafish (*Danio rerio*).** General and comparative endocrinology, v. 252, p. 236-238, 2017.

KAIZER, R. R. et al. **Diet-induced changes in AChE activity after long-term exposure.** Neurochemical Research, v.29, p. 2251-2255, 2004

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.

KALUEFF, A. V. et al. **Gaining translational momentum: more zebrafish models for neuroscience research.** Progress in neuro-psychopharmacology & biological psychiatry. 2014a.

KALUEFF, A. V. et al. **Zebrafish as an emerging model for studying complex brain disorders.** Trends in pharmacological sciences, v. 35, n. 2, p. 63-75, 2014b.

KYSIL, E. V. et al., **Comparative Analyses of Zebrafish Anxiety-Like Behavior Using Conflict-Based Novelty Tests.** Zebrafish.v.14, n.3, 2017.

LIANG, Y. et al. **Transcriptional alterations induced by binary mixtures of ethinylestradiol and norgestrel during the early development of zebrafish (*Danio rerio*).** Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology 195, 2017: 60-67.

LIMA, D. A. **Revista Hospital Universitário Pedro Ernesto.** v. 7, n.1, 2008.

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, mar. 2011.

MESHALKINA, D. A. et al. **Zebrafish models of autism spectrum disorder.** Experimental Neurology, fev. 2017.a

MESHALKINA, D. A. et al. **Understanding Zebrafish cognition.** Behavioural processes, v. 141, p. 229-241, 2017.b

MU, X. et al. **The enantio selective toxicity and oxidative stress of beta-cypermethrin on Zebrafish.** Environmental Pollution, v. 229, p. 312-320, 2017.

MULLER, T.E., R. D.B. et al. **Repeated ethanol exposure alters social behavior and oxidative stress parameters of Zebrafish.** Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry, v. 79, p. 105-111, 2017.

MUNHOZ BENITES, L. et al. **Avaliação do potencial mutagênico de cobre da água do Rio Uruguai.** Ciência e Natura, v. 36, n. 2, 2014.

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

OLIVEIRA, T. A. et al. **Alcohol impairs predation risk response and communication in Zebrafish.** PLoSOne , v. 8, n. 10, p. e75780, 2013.

OLIVEIRA, V. E. de. **Potencial neurotóxico do alumínio como modelo da doença de Alzheimer em *Caenorhabditis elegans*.**2017.

ÖRN, S. et al. **Sexual disruption in Zebrafish (*Danio rerio*) exposed to mixtures of 17 $\alpha$ -ethinylestradiol and 17 $\beta$ -trenbolone.** Environmental toxicology and pharmacology 41, 2016: 225-231.

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, 44p, 2011.

PEREIRA, E. L. e MIGUEL, A. L. R. **Produção industrial de hormônios esteróides.** Revista da Universidade Vale do Rio Verde, v. 15, n. 2, p. 411-435, 2017.

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.

PETRONILHO, E. C. et al. **Acetilcolinesterase: Alzheimer e guerra química.** Revista Militar de Ciência e Tecnologia, 2011.

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

PORTE, C. et al. **Endocrine disruptors in marine organisms: approaches and perspectives.** Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology, v. 143, n. 3, p. 303-315, 2006.

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.

RAMSAY, J. M. et al. **Whole-body cortisol response of zebrafish to acute net handling stress.** Aquaculture, v. 297, n. 1-4, p. 157-162, 2009.

RANGEL, J. F. P. G. F. **Análise quantitativa de monómeros existentes na saliva através de técnicas cromatográficas.** Instituto Superior de Ciências da Saúde Egas Moniz, 2010.

REOLON, G. K. et al. **Sex and the housing: Effects on behavior, cortisol levels and weight in zebrafish.** Behavioural brain research, v. 336, p. 85-92, 2018.

RIBEIRO, M. S. **Análise estereológica de neurônios do corpo amigdalóide e avaliação comportamental de camundongos sob o uso de esteróides anabolizantes-** MG. 2014. 78 f. Dissertação (Mestrado em biociências aplicadas a saúde) - Universidade Federal de Alfenas, Minas Gerais, 2014.

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

SAVERINO, C.; GERLAI, R. **The social zebrafish: behavioral responses to conspecific, heterospecific, and computer animated fish.** Behavioural brain research, v. 191, n. 1, p. 77-87, 2008.

SEIBT, K. J. et al. **Antipsychotic drugs inhibit nucleotide hydrolysis in zebrafish (*Danio rerio*) brain membranes.** Toxicology In Vitro, v. 23, n. 1, p.78-82, fev. 2009.

SIEBEL, A. M. **Efeito de crises convulsivas e fármacos antiepilépticos em parâmetros neuroquímicos e moleculares em peixe zebra (*Danio rerio*)**. Dissertação de Mestrado. Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul. 2011.

SIEBEL, A.M. **O papel do sistema purinérgico e da via de sinalização TOR em crises convulsivas e estresse oxidativo**. 2013.

SILVA, M. C. G. et al. **Impact evaluation caused by disponibility of free and complexed 17 $\beta$ -estradiol into cyclodextrin in the aquatic environment in tilapia (*Oreochromis niloticus*)**. Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia, v. 70, n. 1, p. 222-230, 2018.

SILVA, R. F. **Avaliação da Presença de Contaminantes Emergentes em Estações de Tratamento de Esgoto do Estado de Pernambuco e sua Degradação por POA**. Dissertação (Mestrado) - Curso de Química, Departamento de Química Fundamental, Universidade Federal de Pernambuco - UFPE, Recife, 2011.

SINK, T. D. et al. **Development of a whole-body cortisol extraction procedure for determination of stress in golden shiners, *Notemigonus crysoleucas***. Fish Physiology and Biochemistry, v. 33, n. 3, p. 189-193, 2007.

SINK, T. D. et al. **Validation, use, and disadvantages of enzyme-linked immunosorbent assay kits for detection of cortisol in channel catfish, largemouth bass, red pacu, and golden shiners**. Fish Physiology and Biochemistry, v. 34, n. 1, p. 95-101, 2008.

SODRÉ, F. F. et al. **Ocorrência de Interferentes Endócrinos e Produtos Farmacêuticos em Águas Superficiais da Região de Campinas (SP, Brasil)**. Journal Of The Brazilian Society Of Ecotoxicology, v. 2, n. 2, p.187-196, 2007.

SOREQ, H. e SEIDMAN, S. **Acetylcholinesterase - new roles for an old actor**. Nature Reviews Neuroscience, v.c n.4, p. 294, 2001.

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

TEIXEIRA, R. et al. **Determinação de hormônios estrógenos em água potável usando CLAE-DAD**. Química Nova, v. 33, n. 9, p. 1837–1842, 2010.

TOKARZ, J. et al. **Zebrafish and steroids: what do we know and what do we need to know?** The Journal of steroid biochemistry and molecular biology, v. 137, p. 165-173, 2013.

TONIN, A. A. **Componentes dos sistemas purinérgico e colinérgico nos processos inflamatórios e neurológicos em roedores infectados experimentalmente com *Toxoplasma gondii***. UFSM. 2014.

VERBINNEN, R. T. et al. **Determinação de hormônios estrógenos em água potável usando CLAE-DAD.** Química Nova, São Carlos, v. 33, n. 9, p.1837-1842, ago. 2010.

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

VON SPERLING, M. **Introdução à qualidade das águas e ao tratamento de esgotos.** Editora UFMG, 1996.

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

WENDELAAR BONGA, S. E. **The stress response in fish.** Physiological reviews, v. 77, n. 3, p. 591-625, 1997.

WESIERSKA, G. J. **Endocrine disruptor contaminants in water and heir 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 indi-rect potable reuse of reclaimed water from domes-tic wastewater.** Huan Jing Ke Xue, v. 35, p. 1041-1050, 2014.

YAMAMOTO, F. Y. **Avaliação da qualidade da água e detecção de desreguladores endócrinos em cinco reservatórios do Rio Iguaçu.** 2016.

ZANANDREA, R. et al. **Lithium prevents scopolamine-induced memory impairment in zebrafish.** Neuroscience letters, v. 664, p. 34-37, 2018.

ZATTA, P. et al. **In vivo and in vitro effects of aluminum on the acetivity of mouse brain acetylcholinesterase.** Brain Research Bulletin, v. 59, p. 41-45, 2002.

ZHANG, T. et al. **Does time difference of the acetylcholinesterase (AChE) inhibition in different tissues exist? A case study of zebra fish (*Danio rerio*) exposed to cadmium chloride and deltamethrin.** Chemosphere, v. 168, p. 908-916, 2017.

ZIMMERMANN, F. F. et al. **Estabelecimento de modelos de déficit de interação social em zebrafish (*Danio rerio*):** avaliação de parâmetros neuroquímicos, moleculares e comportamentais. 2016.

## ANEXO A – Parecer Consubstanciado da Comissão de Ética no Uso de Animais IFRS.



### Comissão de Ética no Uso de Animais

Sertão, 10 de março de 2017  
CEUA N 7018231115

Ilmo(a). Sr(a).  
Responsável: Rosilene Rodrigues Kalzer Perin  
Área: Laboratório De Bioquímica E Biologia Molecular  
Rosilene Rodrigues Kalzer Perin (orientador)

Título da proposta: "Avaliação do efeito do hormônio estrogênio sobre o metabolismo de zebrafish".

#### Parecer Consubstanciado da Comissão de Ética no Uso de Animais IFRS

A Comissão de Ética no Uso de Animais da Instituto Federal do Rio Grande do Sul, no cumprimento das suas atribuições, analisou e **APROVOU** a Emenda (versão de 17/fevereiro/2017) da proposta acima referenciada.

Resumo apresentado pelo pesquisador: "Solicito a continuação desse projeto, as atividades propostas foram realizadas com sucesso e constituem a dissertação de mestrado da acadêmica Lurlan Fenske sob minha orientação no Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia Ambiental da UFFS Câmpus Erechim. Foram realizadas as análises comportamentais e analisados os parâmetros bioquímicos hormonais. Assim, tendo em vista os bons resultados obtidos com o presente estudo, pretende-se continuar as investigações à nível de enzimas. Para tanto, os procedimentos de exposição ao etinilestradiol e de manutenção dos animais e preparo das amostras serão os mesmos adotados anteriormente. Pretende-se dar continuidade ao presente estudo devido à importância ambiental da contaminação das águas residuárias com hormônios de uso humano e veterinário, assim a presente proposta será continuada como tema de uma nova dissertação de mestrado da acadêmica Jéssica Reis de Oliveira Sofatti, que é bióloga e recebeu treinamento especializado durante a realização do projeto de pesquisa da Lurlan Fenske. Esse projeto é desenvolvido em parceria com o pesquisador Leonardo José Gill Barcelos, veterinário, que nos acompanha, orienta e oportuniza treinamento para nossa equipe, junto ao seu laboratório na UPF (Universidade de Passo Fundo). A nova solicitação de prazo inclui/prevê o período total do mestrado da acadêmica que ingressou em fevereiro de 2017 e concluirá sua dissertação até fevereiro de 2019.".

Comentário da CEUA: "Aprovado".

Prof. Eliezer Jose Pegoraro  
Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais  
Instituto Federal do Rio Grande do Sul

Profa. Dra. Juliana dos Santos  
Vice-Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais  
Instituto Federal do Rio Grande do Sul

## ANEXO B – Mapa de utilização dos animais adquiridos para o experimento

