

**UNIVERSIDADE FEDERAL DA FRONTEIRA SUL**

**CAMPUS PASSO FUNDO**

**CURSO DE MEDICINA**

**CRISTINE SOMAVILLA FAGUNDES**

**INVESTIGAÇÃO DOS EFEITOS DE ANTIBIÓTICOS SOBRE PARÂMETROS  
COMPORTAMENTAIS E DE ESTRESSE OXIDATIVO EM PEIXES-ZEBRA**

**PASSO FUNDO, RS**

**2025**

**CRISTINE SOMAVILLA FAGUNDES**

**INVESTIGAÇÃO DOS EFEITOS DE ANTIBIÓTICOS SOBRE PARÂMETROS  
COMPORTAMENTAIS E DE ESTRESSE OXIDATIVO EM PEIXES-ZEBRA**

Trabalho de Curso (TC) apresentado ao curso de medicina da Universidade Federal da Fronteira Sul (UFFS), Campus Passo Fundo, RS, como requisito parcial para obtenção do título de Médica.

Orientador: Prof. Dr. Ricieri Naue Mocelin

**PASSO FUNDO, RS**

**2025**

## FICHA CATALOGRÁFICA

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

Fagundes, Cristine Somavilla

Investigação dos efeitos de antibióticos sobre parâmetros comportamentais e de estresse oxidativo em peixes-zebra / Cristine Somavilla Fagundes. -- 2025. 57 f.:il.

Orientador: Doutor Ricieri Naue Mocelin

Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação) - Universidade Federal da Fronteira Sul, Curso de Bacharelado em Medicina, Passo Fundo,RS, 2025.

1. Antimicrobianos. 2. Modelos animais. 3. Peixe-zebra. I. Mocelin, Ricieri Naue, orient. II. Universidade Federal da Fronteira Sul. III. Título.

**CRISTINE SOMAVILLA FAGUNDES**

**INVESTIGAÇÃO DOS EFEITOS DE ANTIBIÓTICOS SOBRE PARÂMETROS  
COMPORTAMENTAIS E DE ESTRESSE OXIDATIVO EM PEIXES-ZEBRA**

Trabalho de Curso (TC) apresentado ao curso de medicina da Universidade Federal da Fronteira Sul (UFFS), Campus Passo Fundo, RS, como requisito parcial para obtenção do título de Médica.

Este Trabalho de Curso foi defendido e aprovado pela banca em: 25/06/2025

**BANCA EXAMINADORA**

---

Prof. Dr. Ricieri Naue Mocelin  
Orientador

---

Prof. Dr. Amauri Braga Simonetti  
Avaliador

---

Prof. Dr<sup>a</sup>. Gessi Koakoski  
Avaliadora

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço, primeiramente, a Deus e aos meus guias por me ajudarem a seguir em frente todos os dias.

Aos meus pais, Luciano e Viviane, por todo o amor incondicional, por sonharem comigo e não medirem esforços para garantir o meu futuro. Vocês me ensinaram a lutar e são a minha maior inspiração.

Ao meu irmão, Bruno, por toda a parceria e amor. Você foi a primeira pessoa a me ensinar sobre atenção e cuidado.

Ao meu companheiro, Miguel, por me acompanhar nessa caminhada com amor, carinho, paciência e compreensão. Você foi o meu porto seguro e tornou essa jornada muito mais leve.

Aos meus avós, por todo o suporte, carinho, zelo e orações. Sem vocês, seria impossível chegar até aqui.

Ao meu orientador, Ricieri, pela dedicação, sabedoria, disponibilidade e apoio essenciais para a realização deste trabalho. Você permitiu que eu transformasse curiosidade em conhecimento e me mostrou que o processo científico é feito de desafios, paciência e coragem.

## **APRESENTAÇÃO**

Este é um Trabalho de Curso (TC) de Graduação realizado pela estudante Cristine Somavilla Fagundes, como parte dos requisitos para obter o título de Bacharel em Medicina pela Universidade Federal da Fronteira Sul (UFFS), campus Passo Fundo-RS. A supervisão acadêmica foi conduzida pelo Prof. Dr. Ricieri Naue Mocelin. O trabalho segue as diretrizes do Manual de Trabalhos Acadêmicos da UFFS e está em conformidade com o Regulamento do TC do Curso. Ele abrange um projeto de pesquisa, um relatório de atividades e um artigo científico, elaborados ao longo de quatro semestres do programa de Medicina da UFFS. O primeiro segmento abrange o projeto de pesquisa, realizado durante o componente curricular (CCr) denominado Trabalho de Curso I, no segundo semestre de 2023. O segundo segmento compreende o Relatório de Pesquisa, detalhando os eventos desde a conclusão do projeto de pesquisa até a conclusão dos experimentos e a coleta de dados, ocorrido no primeiro e segundo semestres de 2024, sendo desenvolvido no âmbito do CCr de Trabalho de Curso II. O terceiro segmento, produzido no âmbito do CCr de Trabalho de Curso III, durante o primeiro semestre de 2025, é composto pela conclusão do volume, apresentação final e redação de um artigo científico. Este é derivado da aplicação prática do projeto, que envolve a execução experimental do plano desenvolvido, seguida de uma análise estatística dos resultados obtidos.

## RESUMO

A descoberta dos antibióticos revolucionou a medicina, melhorando o tratamento de doenças infecciosas e aumentando a expectativa de vida. Entretanto, o uso excessivo dessas substâncias têm gerado preocupações, tendo em vista a resistência bacteriana crescente e a falta de pesquisa de novos fármacos. Pesquisas com modelos em neurociência sugerem que a exposição a esses fármacos pode alterar parâmetros comportamentais e o status oxidativo, afetando o sistema nervoso central. Nesse sentido, através de um estudo transversal, observacional, analítico e descritivo, investigou-se o impacto dos antibióticos Ciprofloxacino, Claritromicina e Ceftriaxona sobre parâmetros comportamentais em peixes-zebra. O estudo utilizou peixes-zebra (*Danio rerio*) adultos, distribuídos em 4 grupos, sendo 1 grupo controle e 3 grupos expostos a ciprofloxacina 6,25 mg/L, claritromicina 2 mg/L ou ceftriaxona 1 mg/L por 96h. Após exposição, avaliou-se parâmetros comportamentais no teste do tanque novo (NTT), em que os animais foram filmados por 6 minutos para análise comportamental (locomoção e exploração). As análises estatísticas foram feitas através dos testes ANOVA *one-way* para comparação entre grupos, seguido de teste *post hoc* de *Bonferroni's*, para avaliar parâmetros comportamentais e locomotores no NTT. O nível de significância adotado foi de 5%. Os efeitos do sexo e do tanque foram testados inicialmente, mas os dados foram agrupados por ausência de diferenças significativas. Quando comparada ao grupo controle, a exposição aguda aos antibióticos não induziu mudanças sobre os parâmetros de locomoção. Ademais, não houve diferença significativa no padrão exploratório dos peixes-zebra entre os grupos avaliados. Os antibióticos testados não provocaram mudanças comportamentais de peixes-zebra após 96 horas de exposição, indicando perfil seguro em curto prazo. Contudo, são necessários estudos adicionais para avaliar possíveis impactos em exposições crônicas ou sob condições de estresse, combinando análises comportamentais com marcadores bioquímicos e moleculares. Esses achados fornecem subsídios para o desenvolvimento de melhores estratégias de avaliação toxicológica, monitoramento ambiental desses fármacos e sua influência na saúde humana.

**Palavras-chave:** *Antimicrobianos; Modelos Animais; Radicais Livres.*

## ABSTRACT

The advent of antibiotics has revolutionized modern medicine, significantly improving treatment of infectious diseases and extending life expectancy. However, the overuse of these compounds has raised substantial concerns, particularly regarding increasing bacterial resistance and limited development of novel antimicrobial agents. Studies employing neuroscience models suggest that antibiotic exposure may modulate behavioral parameters and oxidative status, potentially affecting central nervous system function. In this cross-sectional, observational, and analytical study, we investigated the behavioral effects of three antibiotics on adult zebrafish (*Danio rerio*). The experimental design included four groups: a control group and three treatment groups exposed to ciprofloxacin (6.25 mg/L), clarithromycin (2 mg/L), or ceftriaxone (1 mg/L) for 96 hours. Post-exposure, behavioral assessments were conducted using the Novel Tank Test (NTT), with six-minute video recordings analyzed for locomotion and exploratory activity. Statistical analysis was performed using one-way ANOVA, followed by Bonferroni's post hoc test, to compare behavioral and locomotor parameters across groups. Significance threshold was set at 5%. Initial testing for sex and tank effects revealed no significant differences, leading to pooled data analysis. Results indicated that acute antibiotic exposure did not significantly alter locomotion or exploratory behavior in zebrafish compared to controls. These findings suggest a favorable short-term safety profile for the tested antibiotics. However, further research is warranted to evaluate potential long-term or stress-induced effects, integrating behavioral assessments with biochemical and molecular biomarkers. This study contributes to the development of improved toxicological evaluation strategies and underscores the need for environmental monitoring of pharmaceutical compounds and their implications for human health.

**Keywords:** *Antimicrobial agents; Animal models; Free radicals.*

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b>	<b>9</b>
<b>2 DESENVOLVIMENTO</b>	<b>11</b>
2.1 PROJETO DE PESQUISA	11
<b>2.1.1 Tema</b>	<b>11</b>
<b>2.1.2 Problemas</b>	<b>11</b>
<b>2.1.3 Hipóteses</b>	<b>11</b>
<b>2.1.4 Objetivos</b>	<b>11</b>
2.1.4.1 Objetivo geral	11
2.1.4.2 Objetivos específicos	12
<b>2.1.5 Justificativa</b>	<b>12</b>
<b>2.1.6 Referencial teórico</b>	<b>13</b>
<b>2.1.7 Metodologia</b>	<b>24</b>
2.1.7.1 Tipo de estudo	24
2.1.7.2 Local e período de realização	24
2.1.7.3 População e amostragem	24
2.1.7.4 Variáveis e instrumentos de análise	25
2.1.7.5 Processamento, controle e análise estatística dos dados	27
2.1.7.6 Aspectos éticos	27
<b>2.1.8 Recursos</b>	<b>28</b>
<b>2.1.9 Cronograma</b>	<b>28</b>
2.2 REFERÊNCIAS	30
<b>3 RELATÓRIO DE PESQUISA</b>	<b>35</b>
<b>4 ARTIGO CIENTÍFICO</b>	<b>40</b>
<b>5 CONSIDERAÇÕES FINAIS</b>	<b>55</b>
<b>6 ANEXOS</b>	<b>56</b>
6.1 ANEXO A - PARECER DE APROVAÇÃO DO CEUA - UFFS	56

## 1 INTRODUÇÃO

A medicina moderna sofreu uma mudança radical em pouco mais de um século, graças à descoberta da penicilina em 1928, que garantiu o acréscimo de 23 anos ao tempo médio de vida dos seres humanos. Entretanto, a recente queda na busca por novos antibióticos, bem como a evolução da resistência bacteriana trouxeram interrogações e preocupações no atual cenário das discussões sobre saúde (Hutchings; Truman; Wilkins, 2019).

A crescente persistência das infecções que resultam em sintomas clinicamente crônicos abre alerta ao uso prolongado ou repetido de antibióticos para total erradicação desse tipo de doença (Grant; Hung, 2013). É comum que pacientes com câncer, por exemplo, recebam tratamento com fluoroquinolonas como profilaxia para a neutropenia febril, uma doença que causa queda na imunidade e aumenta as chances de infecção bacteriana. Os estudos sobre os efeitos desses fármacos no organismo humano demonstraram análises que sugerem o papel dos antimicrobianos na formação de radicais livres possivelmente nocivos e de toxicidade mitocondrial (Kaur *et al.*, 2013).

As mitocôndrias são organelas presentes nas células eucarióticas de animais, vegetais e fungos e são responsáveis pelos processos de respiração celular e produção de energia. Entretanto, são de origem bacteriana e, por isso, apresentam ribossomos 55s e 60s que apresentam sensibilidade a antibióticos (Chen; Chan, 2006). Paralelo a isso, estudos demonstraram que pacientes com doenças neurodegenerativas apresentaram queda no consumo de oxigênio no cérebro, disfunção bioenergética e mitocondrial. Esta última apresenta-se nos transtornos de ansiedade e de humor e nos estágios iniciais do desenvolvimento de demências. Esses estudos corroboram a existência da relação entre o uso de antibióticos e a ocorrência de quadros neurodegenerativos (Suárez-Rivero *et al.*, 2023). Apesar disso, estudos demonstram a existência de efeito neuroprotetor em antibióticos da classe dos macrolídeos, como a claritromicina, que atuam no bloqueio dos receptores GABA<sub>A</sub>, responsáveis pelo efeito inibitório do sistema nervoso central (SNC). Além disso, os macrolídeos são reconhecidos por atuarem nos receptores NMDA da neurotransmissão excitatória glutamatérgica, com evidência de eficácia no tratamento de ansiedade e depressão (Dinan; Dinan, 2022).

Para o estudo de comportamento e danos oxidativos, um dos modelos mais utilizados é o Peixe-zebra (*Danio rerio*). A relevância dessa espécie, tanto em sua fase adulta quanto larval, na área da neurociência tem aumentado significativamente ao longo das últimas décadas. O organismo modelo apresenta todos os principais sistemas de neuromediadores, incluindo receptores de neurotransmissores, transportadores e enzimas envolvidas na síntese e metabolismo. Isso se deve ao fato de que esse vertebrado apresenta uma notável semelhança genética, chegando a mais de 70% de homologia genética dos humanos (Kalueff; Stewart; Gerlai, 2014). Ademais, o peixe-zebra oferece várias vantagens em relação a outros modelos animais, como roedores - isso inclui facilidade de manutenção devido ao seu tamanho reduzido, maior taxa de reprodução, embriões transparentes e, de maneira geral, menor custo de experimentação, entre outras vantagens. Atualmente, é considerado ideal para a pesquisa de aspectos comportamentais e toxicológicos que têm relevância para a espécie humana. (Saluja *et al.*, 2021).

A estrutura geral e a forma das células são muito semelhantes entre os cérebros de ambos e são mantidas quando comparadas aos seus equivalentes humanos. Em termos de função, órgãos como a amígdala e a hipófise, por exemplo, desempenham um papel semelhante na regulação do comportamento emocional em ambas as espécies, com os principais neurotransmissores presentes nos seres humanos também encontrados no peixe-zebra. Em resposta ao estresse, eles também produzem cortisol, ativando um sistema semelhante ao eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (HHA) em humanos, conhecido como eixo hipotálamo-hipófise-interrenal (HHI). Além disso, a existência de modelos estabelecidos para estudar o comportamento e a ansiedade nessa espécie oferece uma vantagem significativa em termos de validação preditiva (Kalueff *et al.*, 2014; Kanungo *et al.*, 2014; Mocelin *et al.*, 2015). A extensa gama de comportamentos bem documentados combinada com as semelhanças em vários sistemas, possibilita a extrapolação dos resultados obtidos, estabelecendo um paralelo sólido com os seres humanos (Kalueff *et al.*, 2014; Macrae; Peterson, 2015). Nesse sentido, o objetivo do estudo é investigar os efeitos dos antibióticos sob parâmetros comportamentais e oxidativos em peixes-zebra em um modelo de transtorno mental relacionado ao estresse.

## **2 DESENVOLVIMENTO**

### **2.1 PROJETO DE PESQUISA**

#### **2.1.1 Tema**

Efeitos dos antibióticos sobre parâmetros comportamentais e de estresse oxidativo em peixes-zebra.

#### **2.1.2 Problemas**

- a) Quais os efeitos dos antibióticos Ciprofloxacino, Claritromicina e Ceftriaxona sobre o comportamento de peixes-zebra em um protocolo de estresse agudo por contenção (EAC)?
- b) Quais os efeitos dos antibióticos Ciprofloxacino, Claritromicina e Ceftriaxona sobre o *status* oxidativo de peixes-zebra em um protocolo de estresse agudo por contenção (EAC)?

#### **2.1.3 Hipóteses**

- a) Ciprofloxacino atua como ansiogênico, enquanto a Claritromicina e Ceftriaxona atuam como ansiolíticos em peixes-zebra.
- b) Ciprofloxacino promove o dano oxidativo, possuindo efeito neurotóxico, enquanto Claritromicina e Ceftriaxona diminuem esse processo, atuando como neuroprotetores em peixes-zebra.

#### **2.1.4 Objetivos**

##### **2.1.4.1 Objetivo geral**

Descrever a influência dos antibióticos Ciprofloxacino, Claritromicina e Ceftriaxona no comportamento e no *status* oxidativo em peixes-zebra.

#### 2.1.4.2 Objetivos específicos

- a) Investigar o efeito da exposição aguda aos antibióticos Ciprofloxacino, Claritromicina ou Ceftriaxona sobre o comportamento em peixes-zebra.
- b) Analisar o efeito da exposição aguda aos antibióticos Ciprofloxacino, Claritromicina ou Ceftriaxona em um modelo de estresse agudo sob parâmetros comportamentais em peixes-zebra.
- c) Avaliar o efeito da exposição aguda aos antibióticos Ciprofloxacino, Claritromicina ou Ceftriaxona em um modelo de estresse agudo sob parâmetros oxidativos em peixes-zebra.

#### 2.1.5 Justificativa

O estudo da influência dos antibióticos na medicina e na psiquiatria é de extrema importância devido às implicações significativas que esses medicamentos têm na saúde humana. Esses fármacos têm sido uma ferramenta crucial na luta contra infecções bacterianas, salvando inúmeras vidas e melhorando a qualidade de vida das pessoas. No entanto, seu uso inadequado e os efeitos colaterais associados a esses medicamentos são questões que merecem investigação detalhada e contínua. Isso inclui orientar médicos na escolha apropriada de antibióticos, duração do tratamento e prevenção de resistência. Além disso, a conscientização sobre os riscos associados ao seu uso indevido é fundamental para educar profissionais de saúde e o público em geral. Antibióticos, apesar de seu valor terapêutico, podem ter efeitos colaterais adversos, incluindo danos às mitocôndrias e ao sistema nervoso central (SNC). Compreender os mecanismos subjacentes a esses desfechos é fundamental para minimizar riscos e desenvolver tratamentos mais seguros. O bem-estar físico e mental está interligado. Investigar como os antibióticos afetam a saúde mental pode ajudar a desenvolver estratégias mais precisas de tratamento e cuidados de saúde, considerando o paciente como um todo. Nesse sentido, o uso do peixe-zebra como modelo para estudos comportamentais e moleculares auxilia significativamente. O peixe zebra (*Danio rerio*), conhecido mundialmente como zebrafish, é um pequeno teleosteo tropical de água doce, proposto inicialmente por George Streisinger como animal modelo para

estudos de desenvolvimento há cerca de 30 anos. A facilidade de manutenção e manipulação em relação a outros animais modelo como roedores, combinadas a uma complexidade típica de vertebrados que facilita a extrapolação de resultados nele obtidos em relação a humanos de maneira mais direta do que aqueles obtidos em invertebrados, tem feito do peixe zebra o animal de escolha para investimentos significativos em diversas áreas da pesquisa biomédica. O conhecimento neuroanatômico e histológico hoje disponível corrobora as sugestões de que o peixe zebra representa um organismo potencial nos estudos translacionais de estresse crônico, embora ainda exista a necessidade de se estabelecer paradigmas comportamentais adequados para sua avaliação e comparação com aqueles estabelecidos para outras espécies. Este projeto propõe o desenvolvimento e validação de um paradigma comportamental de estresse crônico para peixes, bem como a busca de uma assinatura comportamental, bioquímica e molecular. Considerando que bem-estar físico e mental estão interligados, é fundamental investigar como os antibióticos afetam a saúde mental pode ajudar a desenvolver estratégias mais precisas de tratamento e cuidados de saúde, considerando o ser humano como um todo. Em suma, os estudos sobre a influência dos antimicrobianos na neurociência são fundamentais para abordar desafios complexos relacionados à resistência bacteriana, à saúde mental e ao uso responsável desses medicamentos. O desenvolvimento do estudo em questão torna-se fundamental por identificar novas preocupações de segurança associadas ao uso de antibióticos. Ele não apenas beneficia pacientes individuais, mas também contribui para melhorar a saúde pública e promover o bem-estar em escala global, considerando que mente e corpo andam juntos em relação ao prazer de viver. Portanto, investir em pesquisas nessa área é uma prioridade para o avanço da medicina moderna.

### **2.1.6 Referencial teórico**

A descoberta e produção em larga escala de antibióticos nas primeiras décadas do século XX marcaram um dos avanços mais notáveis na história da medicina. Essa inovadora categoria de medicamentos, juntamente com um amplo conhecimento sobre agentes infecciosos e melhores medidas de higiene, desempenhou um papel crucial na significativa redução do medo associado a

diversas doenças contagiosas, resultando em um notável aumento na qualidade de vida e na expectativa de vida (Mohr, 2016).

A introdução dos antibióticos na prática médica foi, inquestionavelmente, o avanço médico mais significativo do século XX. Além de tratar doenças infecciosas, essas substâncias possibilitaram muitos procedimentos médicos modernos, como o tratamento do câncer, transplantes de órgãos e cirurgias de coração aberto. No entanto, o uso abusivo e inadequado desses compostos valiosos resultou no rápido aumento da resistência antimicrobiana (RAM), tornando algumas infecções praticamente intratáveis (Hutchings; Truman; Wilkins, 2019).

Os resultados das infecções bacterianas persistentes podem levar ao agravamento da doença e proporcionar uma maior probabilidade de morte decorrente da própria condição clínica, além de um aumento no risco de disseminação entre indivíduos. Erradicar esses patógenos representa um desafio considerável, muitas vezes requerendo tratamentos prolongados ou cursos repetidos de antibióticos. Durante essas infecções demoradas, existe uma população ou subpopulação de bactérias que demonstra resistência aos fármacos convencionais, possivelmente devido à sua incapacidade de se reproduzir ou a uma alteração em seu estado metabólico (Grant; Hung, 2013).

O aumento do tempo de exposição dos indivíduos aos antibióticos traz preocupação à saúde pública. Alguns pacientes em quimioterapia frequentemente fazem uso desses compostos para a profilaxia ou o tratamento de infecções bacterianas adquiridas pela neutropenia que o tratamento para o câncer induz (Kaur *et al.*, 2016). Entretanto, muitos pacientes oncológicos sofrem com essa condição por meses e até anos, com risco de recidivas. Além disso, o uso destes fármacos na indústria alimentícia e de insumos traz preocupações sobre o uso exagerado dessa substância. Em 2011, aproximadamente 3,3 milhões de quilogramas de antibióticos foram comercializados para uso humano, enquanto cerca de 13,6 milhões de quilogramas foram vendidos para uso em animais nos Estados Unidos. Esses números indicam que 80% desses produtos foram direcionados para aplicações na agricultura (FDA, 2014). Para nações pertencentes ao grupo BRICS, como Brasil, Rússia, Índia, China e África do Sul, é previsto um aumento de 99%, sugerindo que a quantidade de antibióticos consumidos poderá dobrar até 2030 (Van Boeckel *et al.*, 2015).

Os antibióticos da classe dos macrolídeos formam uma extensa categoria de agentes inibidores da síntese de proteínas, que despertam considerável interesse clínico devido à sua aplicabilidade em tratamentos médicos para seres humanos. Esses compostos consistem em uma estrutura cíclica de anel maciço variável em tamanho, à qual estão anexados um ou mais açúcares desoxi ou aminoácidos. A ação dos macrolídeos como antibióticos envolve sua ligação à subunidade ribossômica 50S de bactérias, o que interfere diretamente no processo de síntese de proteínas (Dinos, 2017).

Esses fármacos têm sido estudados por suas propriedades anti-inflamatórias e imunomodulatórias. Muitas células envolvidas na resposta imune são influenciadas de alguma forma pelos compostos dessa classe. A eritromicina, por exemplo, impede a liberação de Interleucina 8 (IL-8), de proteína ativadora de neutrófilos epiteliais 78 (ENA-78) e de proteína inflamatória de macrófagos (MIP-1) de macrófagos e leucócitos. Há evidências que sugerem que os antibióticos macrolídeos com lactonas macrocíclicas de origem policetídis de 14 e 15 membros, mas não os de 16 membros, diminuem a hipersecreção de citocinas e quimiocinas pró-inflamatórias em culturas celulares, modelos animais e pessoas com doença pulmonar inflamatória crônica, que parecem ser mediadas pela inibição da quinase regulada por sinal extracelular (ERK). Esses medicamentos também foram relacionados à interação com a quimiotaxia de neutrófilos (Lenz *et al.*, 2021). Essa característica é importante na regulação da produção de radicais livres no processo inflamatório bacteriano, responsável por causar lesões teciduais.

Apesar de demonstrarem uma notável eficácia antibacteriana, os macrolídeos frequentemente sofrem de baixa biodisponibilidade, farmacocinética imprevisível e instabilidade em ambientes ácidos, como o estômago. Devido a essas limitações, pesquisas iniciais buscaram desenvolver novos derivados com propriedades aprimoradas. Isso resultou na segunda geração dessa classe, que foram criados a partir de modificações semissintéticas dos produtos naturais da primeira geração, com destaque para a claritromicina (Dinos, 2017; apud Omura *et al.*, 1992). Um dos principais modos de ação desses agentes antibacterianos é a sua capacidade de interferir no processo de síntese de proteínas dentro das células bacterianas. Todos os antibióticos macrolídeos compartilham uma característica comum, que é a sua afinidade pela subunidade ribossômica maior (50S) nas bactérias (Vázquez-Laslop; Mankin, 2018).

De outro modo, as cefalosporinas são um grupo de antibióticos beta-lactâmicos que são amplamente utilizados no tratamento de infecções bacterianas. Seu mecanismo de ação é a inibição da síntese da parede celular do patógeno, o que leva à lise celular e morte do mesmo. A estrutura das cefalosporinas inclui um anel  $\beta$ -lactâmico, que é responsável por sua atividade, e uma cadeia lateral variável que determina sua atividade contra diferentes tipos de bactérias. Os medicamentos desse grupo são classificados em gerações com base em sua estrutura química e espectro de atividade, sendo que os de primeira geração têm um espectro mais estreito, enquanto os de quarta geração têm uma atividade mais ampla (Olarde-Luis; Cáceres-Galíndez; Cortés, 2018).

A ceftriaxona, pertencente à terceira geração desta classe, o mecanismo de ação consiste em inibir a síntese da parede celular bacteriana, impedindo a formação de ligações cruzadas entre os peptidoglicanos. O fármaco se liga a uma proteína ligadora de penicilina nas bactérias, inibindo a transpeptidação que é necessária para a formação da parede celular. Isso leva à lise celular e morte do patógeno (Tomberg *et al.*, 2010). Essa substância tem sido pesquisada por sua capacidade de proteger o SNC em doenças neuropsiquiátricas. Estudos recentes mostraram que a ceftriaxona pode aumentar a expressão de transportadores de glutamato, que são responsáveis por remover o excesso dessa molécula da sinapse, prevenindo a excitotoxicidade neuronal. Ademais, pode aumentar a degradação de proteínas mal dobradas, como a  $\alpha$ -sinucleína, que se acumulam em doenças como Parkinson e Alzheimer. Ela também pode proteger as células nervosas contra o estresse oxidativo e a inflamação, reduzindo a morte celular e melhorando a função cognitiva. Embora ainda haja muito a ser estudado sobre o mecanismo de ação da ceftriaxona, esses resultados sugerem que ela pode ser uma opção promissora para o tratamento de doenças neurodegenerativas (Smaga *et al.*, 2020).

As fluoroquinolonas são drogas antimicrobianas com atividade de amplo espectro. São agentes bactericidas que inibem a síntese de DNA nas bactérias. As primeiras exemplares, como a ciprofloxacina, tinham como alvo principalmente bactérias gram-negativas, incluindo espécies de *Pseudomonas*. As mais recentes, como a levofloxacina e a moxifloxacina, têm cobertura expandida contra bactérias gram-positivas, como *Staphylococcus* e *Streptococcus*, espécies de *Mycobacterium* e alguns anaeróbios (Chan; Bunce, 2017). O ciprofloxacino pertence à segunda geração desse grupo, e tem sido utilizada na prática clínica há cerca de três

décadas para o tratamento de várias infecções bacterianas (Zhang *et al.*, 2018). Em um estudo conduzido em ratos, esse medicamento administrado em baixas doses induziu neurotoxicidade através da depleção significativa dos neurotransmissores acetilcolina e dopamina no cérebro dos ratos. Além disso, a administração de ciprofloxacino aumentou significativamente as atividades das enzimas AChE, MAO-A e MAO-B no cérebro dos ratos. Essas mudanças bioquímicas podem levar a distúrbios motores e outros sintomas neurológicos (Ibitoye; Ajiboye; Aliyu, 2019).

Não se pode negar que os antibióticos são uma ferramenta preciosa na luta contra as infecções causadas por micro-organismos. Eles desempenham um papel significativo na redução das taxas de mortalidade relacionadas às infecções bacterianas e no aumento da esperança de vida da população global. No entanto, é importante notar que o uso desses fármacos está associado a diversos efeitos colaterais prejudiciais, sendo um dos mais comuns a disfunção das mitocôndrias. Em essência, a maioria dos antibióticos que matam bactérias, independentemente de seu alvo molecular específico, pode desencadear a morte celular atuando como fatores de estresse que levam à produção excessiva de substâncias reativas de oxigênio (ROS). Isso ocorre devido à interrupção do ciclo do ácido tricarboxílico (TCA) e da cadeia de transporte de elétrons nas mitocôndrias (Suárez-Rivero *et al.*, 2021). Status oxidativo refere-se ao equilíbrio dinâmico entre a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) e a capacidade antioxidante celular. Quando esse equilíbrio é perturbado (a favor das ROS), ocorre o estresse oxidativo, levando a danos em biomoléculas como lipídios, proteínas e DNA.

A quantificação da peroxidação lipídica pode ser realizada através do ensaio de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS). Esse ensaio é baseado na reação do ácido tiobarbitúrico com produtos de degradação de lipídios oxidados, como o malondialdeído (MDA), formando um complexo corado que pode ser quantificado por espectrofotometria. A quantidade de TBARS formados é proporcional à quantidade de lipídios oxidados presentes na amostra. O TBARS é um método amplamente utilizado para avaliar a peroxidação lipídica em amostras biológicas, como soro, plasma, tecidos e células, e pode ser realizado de forma simples, reprodutível e econômica (De Leon; Borges, 2020).

A geração de ROS é um processo contínuo e natural que desempenha funções biológicas importantes. Essa produção é regulada por diversos mecanismos e vias metabólicas e tem um papel crucial na sinalização tanto dentro como fora das

células (Soares *et al.*, 2015 *apud* Cunningham *et al.*, 2012). A principal fonte é a cadeia respiratória mitocondrial. Isso se deve ao fato de a mitocôndria possuir múltiplos centros *redox*, que têm a capacidade de transferir elétrons da molécula de oxigênio, resultando na formação de ânions superóxido (Soares *et al.*, 2015 *apud* Casey *et al.*, 2007).

O estresse oxidativo é caracterizado pelo acúmulo de compostos reativos ao oxigênio e ao nitrogênio dentro das células, conhecidos como espécies reativas de oxigênio (EROs) e nitrogênio (ERNs). Normalmente, esse fenômeno ocorre como resultado de um desequilíbrio no sistema *redox*, causado pelo acúmulo excessivo dessas espécies, e pela redução dos níveis de antioxidantes, ou de ambos (Soares *et al.*, 2015 *apud* Cunningham *et al.*, 2012).

Nesse contexto, esse distúrbio ativa o fator de transcrição nuclear kappa B (NF-κB), promovendo a transcrição de um amplo conjunto de genes que contêm informações para a produção de citocinas inflamatórias e moléculas de adesão (Soares *et al.*, *apud* Negro *et al.*, 2010). Com o NF-κB ativado, ocorre uma produção excessiva de várias citocinas pró-inflamatórias, como o fator de necrose tumoral alfa (TNF-α) e interleucinas (IL) 1, 2, 6 e 12. Além disso, esses fatores podem induzir a formação de EROs, criando um ciclo prejudicial entre o estresse oxidativo e a geração desses componentes imunológicos (Soares *et al.*, 2015 *apud* Hirsch *et al.*, 2013).

Dentro das mitocôndrias, é possível encontrar inúmeras proteínas com funções antioxidantes, acompanhadas de desacopladoras (UCPs) e canais iônicos que têm a capacidade de ajustar o gradiente de prótons. Esses elementos se conjugam para manter um controle preciso sobre o estado *redox* nas células. Além disso, as oxidases de membrana desempenham um papel significativo na geração de EROs e ERNs, que, por sua vez, podem interagir com outras moléculas e influenciar a função mitocondrial (SOARES *et al.*, 2015 *apud* DE GROOT *et al.*, 2012).

No corpo humano, o sistema de proteção antioxidante é composto por uma série de enzimas, bem como por diversos compostos que são produzidos internamente ou obtidos através da dieta. Esses componentes reagem com as EROs, neutralizando seus efeitos prejudiciais. O sistema de defesa antioxidante enzimático engloba a superóxido dismutase (SOD), a glutatona peroxidase (GPx) e a catalase (CAT). A SOD representa a primeira linha de defesa antioxidante e

constituem o principal sistema de proteção do organismo contra o ânion superóxido, pois catalisam a transformação do ânion superóxido ( $\text{O}_2^-$ ) em oxigênio ( $\text{O}_2$ ) e peróxido de hidrogênio ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) (Soares *et al.*, 2015 *apud* Stagnaro-Green *et al.*, 2011)

Existem três variações de SOD, um presente nas mitocôndrias, outro no citoplasma e um extracelular. A CAT, uma enzima antioxidante que se encontra nos peroxissomos celulares, desempenha um papel fundamental na conversão do  $\text{H}_2\text{O}_2$ , formado a partir da dismutação do  $\text{O}_2^-$  pela SOD, em água ( $\text{H}_2\text{O}$ ) e  $\text{O}_2$ . Além da CAT, a GPx também atua na eliminação do  $\text{H}_2\text{O}_2$ , ao acoplar sua redução com a oxidação da glutathiona reduzida (GSH). A GPx é uma enzima antioxidante que contém selênio e, além de reduzir efetivamente o  $\text{H}_2\text{O}_2$ , também converte peróxidos lipídicos em lipídios alcoólicos. Essas enzimas estão presentes no citoplasma em concentrações elevadas e também são encontradas na matriz mitocondrial. O desequilíbrio no estado redox desempenha um papel fundamental na origem e progressão de diversas doenças, incluindo doenças neurodegenerativas, câncer, doenças cardiovasculares, diabetes mellitus e hipercolesterolemia (Soares *et al.*, 2015 *apud* De Groot *et al.*, 2012).

Isso é especialmente preocupante em pacientes com sistemas de defesa antioxidante enfraquecidos ou com um risco genético conhecido de desenvolver distúrbios mitocondriais. Além disso, vários desses fármacos podem agravar as condições de pessoas que têm mutações no DNA mitocondrial (Gao; Chen; Guan, 2017). É bem conhecido que os neurônios têm uma alta demanda por energia e dependem dessa organela para manter a transmissão de sinais e a estrutura celular, regulando os níveis de ATP e cálcio (Chen; Chan, 2006). As doenças mitocondriais são um conjunto de distúrbios altamente variados causados por mutações em genes localizados no núcleo celular ou na própria organela, que afetam principalmente a produção de energia e síntese de ATP. Essas condições estão entre os tipos mais frequentes de problemas neurológicos (Gorman *et al.*, 2016). Na verdade, a maioria dos pacientes com doenças mitocondriais sofre de sérios problemas neurológicos e musculares (Nelson *et al.*, 1995).

Essas descobertas reforçam a ideia de que pacientes submetidos a tratamentos prolongados com antibióticos podem desenvolver problemas neurológicos e transtornos de comportamento (Mujampalli; Davis, 2016). Estudos em populações inteiras revelaram um aumento significativo no risco de diversos distúrbios psicológicos após infecções e exposição a esses medicamentos durante a

fase de crescimento, abrangendo a infância e a adolescência. De fato, há um crescente interesse na comunidade científica em relação às mitocôndrias quando se trata de transtornos neuropsiquiátricos, uma vez que um número cada vez maior de distúrbios mentais está sendo relacionado a problemas nessa organela (Suárez-Riviero *et al.*, 2021).

A partir disso, é importante ressaltar que as ROS envolvidas na ação dos antibióticos incluem o  $\cdot\text{O}_2^-$ , o  $\text{H}_2\text{O}_2$  e o radical hidroxila (OH) (Van Acker; Coenye, 2017). O estresse oxidativo é um fator importante em doenças neurodegenerativas. O aumento da geração de radicais livres e a diminuição da atividade antioxidante podem levar a danos no DNA mitocondrial e nuclear, causando mutações e disfunções nesses componentes celulares (Lin; Beal, 2006). Entretanto, a relação entre o uso de antibióticos e transtornos psiquiátricos não se limita apenas aos danos mitocondriais. O intestino é um dos grandes responsáveis pela produção e regulação de neurotransmissores, como a serotonina (5-HT). Os tratamentos com antibióticos geralmente afetam a microbiota bacteriana desse órgão e em outras barreiras do corpo, o que, nas fases iniciais do desenvolvimento, pode levar a alterações cognitivas e comportamentais semelhantes à depressão ou ansiedade em animais de laboratório (Desbonnet *et al.*, 2015).

A necessidade de encontrar a precisão dessas hipóteses é necessária para contribuir com os estudos. As pesquisas realizadas *in vivo* são um estágio fundamental para avaliar os efeitos de testes de substâncias medicamentosas. Devido às restrições e limitações dos modelos tradicionais de mamíferos, os cientistas têm buscado sistemas modelo de vertebrados alternativos (Jijie *et al.*, 2021). Para isso, a nível molecular, é possível testar em modelos animais, como ratos ou peixes-zebra. Esse último é importante para estudar problemas cerebrais porque é um modelo animal emergente na farmacogenética e neurofarmacologia (Steenbergen; Richardson; Champagne, 2011).

O peixe-zebra, popularmente conhecido como paulistinha, vem sendo amplamente utilizado como modelo animal em pesquisas sobre o estresse. Vários trabalhos recentes têm atestado a sua utilidade não apenas nesse tipo de estudo, mas também em achados psiquiátricos e toxicológicos. Isso se deve principalmente à forte semelhança entre os sistemas reguladores do peixe-zebra com humanos. Além disso, é um organismo modelo relativamente barato e fácil de manter em laboratório, o que o torna uma opção atraente para estudos de alto rendimento.

Portanto, essa espécie é uma ferramenta valiosa para pesquisas sobre diversas condições neurológicas e pode ajudar a avançar o conhecimento dos mecanismos subjacentes a esses quadros e suas consequências para a saúde (Steenbergen; Richardson; Champagne, 2011; Mocelin *et al.*, 2015; 2017).

Os circuitos neurais encontrados em vertebrados foram mantidos de forma substancial ao longo do processo evolutivo, o que permite a investigação do medo e da ansiedade humanos por meio do estudo de animais. O peixe-zebra é um tipo de vertebrado que apresenta semelhanças fisiológicas com os seres humanos, incluindo neurotransmissores, hormônios e receptores cruciais. Diferentemente de nematóides e da *Drosophila*, a similaridade genética entre o peixe-zebra e os humanos é de, no mínimo, 87% (Chaharderi *et al.*, 2023 *apud* Cachat *et al.*, 2011).

Os modelos de distúrbios cerebrais subjacentes a déficits cognitivos podem ser úteis para rastrear compostos neuroprotetores ou nootrópicos potenciais para o desenvolvimento de medicamentos, revelando os mecanismos cruciais para novos tratamentos terapêuticos. Ainda, a utilidade dos modelos dessa espécie na optogenética está permitindo cada vez mais que os pesquisadores vinculem a atividade neural ao comportamento e detectem eventos biológicos a nível celular. Essas abordagens inovadoras promovem a capacidade de prever como as mudanças na função do circuito podem levar a alterações na cognição e no comportamento relevantes para alterações neurocomportamentais (Stewart; Kalueff, 2012).

Os peixes-zebra adultos são usados para aumentar a compreensão da função e disfunção cerebral, bem como sua modulação genética e farmacológica. São altamente sensíveis às principais classes de drogas neurotrópicas ativas clinicamente e emergiram como uma ferramenta útil para triagem genética e descoberta de substâncias. Além disso, o uso desse modelo animal pode ajudar a modelar importantes síndromes neuropsiquiátricas e induzidas por drogas em humanos (Kalueff; Stewart; Gerlai, 2013).

Um importante indicador molecular nesse modelo é a resposta de cortisol ao estresse, que é facilmente quantificável. No peixe-zebra, o cortisol influencia o eixo HHI (Hipotálamo-hipófise-interrenal), enquanto nos humanos, afeta o eixo HHA (Hipotálamo-hipófise-adrenal). Devido a essa diferença, as características fisiológicas desempenham um papel importante na utilização desses modelos em estudos relacionados à ansiedade (Chaharderi *et al.*, 2023 *apud* Cachat *et al.*, 2011).

Além do mais, a redução no comportamento de *shoaling* (tendência do peixe-zebra de ficar em grupos) é um dos principais parâmetros observados durante esse estado. Há vários modelos de testes para induzir ansiedade, incluindo o modelo de estresse agudo de contenção, o estresse crônico imprevisível, a exposição a álcool ou substâncias de alarme, o modelo *knockout* de NPY (neuropeptídeo Y), entre outros (Saluja *et al.*, 2021). No modelo de contenção, presente nesse estudo, os peixes-zebra são colocados em um recipiente contendo água e mantidos imóveis por um período de tempo determinado (Dal Santo *et al.*, 2014; Bertelli *et al.*, 2021).

Quando expostos a estímulos que provocam medo ou ansiedade, o peixe-zebra demonstra uma variedade de comportamentos claramente mensuráveis, como uma redução significativa na exploração, maior preferência por ambientes escuros (escototaxia), tendência a se deslocar para o fundo da água (geotaxia), preferência por áreas periféricas (tigmotaxia), imobilidade (congelamento) e movimentos erráticos (rápidas voltas repetitivas). Esses comportamentos fundamentais podem ser avaliados em testes de observação. Dois exemplos notáveis de modelos empíricos usados para estudar comportamentos associados à ansiedade nesses animais são o "teste do tanque novo" (*novel tank test* – NTT) e o "teste claro-escuro". O primeiro é projetado para avaliar a tigmotaxia, enquanto o segundo se concentra na escototaxia. A tigmotaxia refere-se à tendência do animal a se movimentar próximo a superfícies verticais. O NTT é uma ferramenta abrangente amplamente empregada, que permite a identificação de fenótipos relacionados à ansiedade em peixes-zebra adultos. Esse teste baseia-se na resposta natural dos peixes de se movimentarem para áreas mais profundas quando são colocados em um novo ambiente (Chaharderi *et al.*, 2023).

Ademais, foi constatado que os antibióticos têm um impacto significativo nas comunidades bacterianas presentes no intestino do peixe-zebra, afetando o desenvolvimento desses indivíduos. Isso resulta em malformações, alterações comportamentais (afetando a locomoção, aprendizado, memória, exploração e agressividade), bem como efeitos adversos na capacidade de natação e na interação social. Devido às respostas comportamentais que estão ligadas a indicadores internos, como aspectos fisiológicos e bioquímicos, assim como fatores externos, como as condições ambientais e sociais, os efeitos adversos decorrentes da exposição a antibióticos podem ser identificados em estágios iniciais. Além disso, foi observado que essas substâncias podem causar danos ao coração, danos

genéticos, afetar os rins, a audição, o fígado, a reprodução, o sistema imunológico e causar estresse oxidativo no peixe-zebra, sem, no entanto, comprometer a sobrevivência deste. Recentemente, também foi constatado que peixe-zebra possui a capacidade de uma recuperação parcial após a exposição aos antibióticos (Jijie *et al.*, 2021).

Em um estudo semelhante, a eritromicina, (um macrolídeo) apresentou capacidade de influenciar o desempenho de natação dos peixes-zebra, sendo que em concentrações elevadas dessa substância (2 mg/L), podem diminuir a expressão gênica associada ao metabolismo energético muscular. Por outro lado, quando utilizada em concentrações mais baixas (1–10 µg/L), a eritromicina pode melhorar o desempenho de natação e também tem um efeito positivo na regulação dos genes relacionados às atividades da CAT e da SOD (Jijie *et al.*, 2021 *apud* Aderemi, 2020; Minski *et al.*, 2021; Li; Zhang, 2020).

Em outra ocasião, a exposição de embriões dessa espécie à norfloxacin (uma quinolona) resultou em neurotoxicidade, que se manifestou pela inibição da expressão de marcadores de células gliais e pelo aumento na expressão de marcadores de células-tronco e neurônios maduros. Outrossim, os efeitos das fluoroquinolonas nas larvas do peixe-zebra incluíram o aumento na expressão de genes cruciais relacionados ao sistema imunológico em resposta à exposição a uma concentração de 5 µg/L de ciprofloxacino (Jijie *et al.*, 2021 *apud* Qiu *et al.*, 2020; Nadal *et al.*, 2018).

Portanto, a avaliação da toxicidade de substâncias por meio da indução química em um modelo de peixe-zebra pode servir como uma ferramenta preditiva da possível toxicidade em seres humanos, dada a semelhança notável entre os sistemas digestivo, nervoso e cardiovascular entre as duas espécies (Chaharderi *Et Al.*, 2023). Nesse sentido, pesquisas utilizando o peixe-zebra têm oferecido um modelo biológico valioso para a investigação das características de diversos agentes relacionados a distúrbios cerebrais humanos, em particular os neuropsiquiátricos, como a doença de Alzheimer, por exemplo, proporcionando uma abordagem atrativa para esses estudos (Chaharderi *et al.*, 2023 *apud* Kalueff; Echevarria; Stewart, 2014).

## 2.1.7 Metodologia

### 2.1.7.1 Tipo de estudo

Trata-se de um estudo quantitativo, observacional, transversal, descritivo e analítico a partir de análise comportamental e de *status* oxidativo em modelo animal.

### 2.1.7.2 Local e período de realização

Estudo a ser realizado durante o período de janeiro de 2024 a dezembro de 2024, no Laboratório de Neuropsicobiologia Translacional (LaNT) da Universidade Federal da Fronteira Sul, *campus* Passo Fundo, localizados no município de Passo Fundo, no estado do Rio Grande do Sul.

### 2.1.7.3 População e amostragem

Com o intuito de representar de forma mais eficaz a diversidade genética da população, optou-se por utilizar peixes-zebra adultos com cerca de quatro meses de idade, pertencentes à linhagem *wild-type* (caracterizada pelo fenótipo *short-fin*). Esse modelo será adquirido de fornecedores especializados. Antes de iniciar os experimentos, os animais passarão por um período de quarentena com duração de 30 dias. Durante esse período, serão mantidos em um sistema de circulação de água. As condições de quarentena serão rigorosamente monitoradas, garantindo parâmetros físico-químicos ideais, de acordo com padrões estabelecidos para aclimação e alimentação, conforme previamente descrito na literatura científica (Mocelin *et al.*, 2018, 2019).

A determinação do tamanho do grupo experimental foi realizada mediante um cálculo amostral planejado, levando em consideração o desfecho primário de cada modelo e as informações disponíveis na literatura. Para a realização desse cálculo, foi utilizado o software MiniTab®, tomando como base o número de grupos experimentais, um valor de significância  $\alpha$  de 5%, poder do teste estatístico de 80%, uma diferença esperada entre as médias de 50% e uma estimativa do desvio padrão de 40%, resultando em um tamanho amostral de 300 animais. Os resultados também indicaram que um tamanho amostral de 24 animais ( $n=24$ ) é adequado para

as análises comportamentais, enquanto um tamanho amostral de 4 ( $n=4$ ) é suficiente para as análises relacionadas ao estresse oxidativo, considerando que será realizado um pool de encéfalos (6 encéfalos para cada  $n$ ).

Após a fase experimental, as carcaças dos animais serão descartadas em lixo contaminado e recolhido por empresa terceirizada da Universidade Federal da Fronteira Sul, Campus Passo Fundo, o qual fará a destinação final.

#### 2.1.7.4 Variáveis e instrumentos de análise

Em todos os experimentos, serão avaliados o impacto do sexo (machos e fêmeas) e também o efeito do tanque, garantindo que haja pelo menos dois tanques por grupo experimental. Isso é feito para evitar qualquer interferência visual ou contaminação. A atribuição dos tratamentos para os tanques de aclimação será realizada de maneira aleatória e com randomização. Para a análise de comportamento e estresse oxidativo, os pesquisadores envolvidos estarão cegos quanto aos grupos experimentais, e cada aquário será identificado por um código gerado por um pesquisador que não participará dos experimentos. Esses códigos serão revelados apenas durante a análise estatística.

Após o período de quarentena, os animais serão introduzidos nos tanques de 16 litros de forma aleatória, utilizando números gerados aleatoriamente por computador. Cada tanque conterá 12 animais, sendo seis machos e seis fêmeas. A alocação dos animais em grupos experimentais será realizada de maneira aleatória em cada etapa do processo, usando a ferramenta disponível em [www.random.org](http://www.random.org). Os pesquisadores encarregados da manipulação dos animais e das análises comportamentais e bioquímicas permanecerão sem conhecimento dos grupos experimentais durante todo o processo. A revelação da codificação ocorrerá somente após a conclusão das análises (Bertelli *et al.*, 2021).

Os fármacos Ceftriaxona, Claritromicina e Ciprofloxacino serão adquiridos de fornecedores especializados. As concentrações utilizadas serão baseadas em estudos anteriores (Jijie *et al.*, 2021 *apud* Aderemi, 2020; Minski *et al.*, 2021; Li; Zhang, 2020; Jijie *et al.*, 2021 *apud* Qiu *et al.*, 2020; Nadal *et al.*, 2018). As soluções de Ceftriaxona, Claritromicina e Ciprofloxacino serão preparadas no dia da exposição ao tratamento. Os animais serão expostos ao inicialmente ao tratamento com antibiótico por 96 horas (OECD, 2018), de acordo com o tanque em que estarão

confinados. Os fármacos serão administrados nas seguintes concentrações: Ceftriaxona 1mg/L, Ciprofloxacino 6,25mg/L e Claritromicina 2 mg/L (Jijie *et al.*, 2021 *apud* Aderemi, 2020; Minski *et al.*, 2021; Li; Zhang, 2020; JIJIE *et al.*, 2021 *apud* Qiu *et al.*, 2020; Nadal *et al.*, 2018; Petersen *et al.*, 2021). Posteriormente à exposição, os peixes serão submetidos ao Estresse Agudo por Contenção (EAC) por 90 minutos e ao Teste de Tanque Novo. O protocolo foi detalhado em estudos anteriores e demonstra que o EAC induz comportamento tipo-ansiosogênico e dano oxidativo nos animais (Dal Santo *et al.*, 2014; Ghisleni *et al.*, 2012; Piato *et al.*, 2011b; Reis *et al.*, 2019; Bertelli *et al.*, 2021). Após a exposição aos fármacos, os peixes serão transferidos individualmente para o aparato comportamental de teste NTT de acordo com o delineamento experimental específico. Todos os protocolos comportamentais serão registrados em vídeo e posteriormente analisados utilizando o software ToxTrac®.

I. Teste de tanque novo: os peixes serão transferidos individualmente ao aquário teste (24 x 8 x 20 cm) e filmados por 6 minutos. Os seguintes parâmetros comportamentais serão avaliados: distância percorrida (m), número de cruzamentos, número de entradas e tempo de permanência (s) na área superior e inferior do aquário (Mocelin *et al.*, 2015, 2018, 2019).

Para a execução do EAC, após 96 h de exposição aos antibióticos, os peixes serão alocados cuidadosamente e individualmente em tubos criogênicos de 1,8 mL (Corning®) com aberturas em ambas as extremidades (para permitir a circulação adequada da água) em um tanque de 16 L por 90 min. Os grupos não estressados serão transferidos para um tanque de 16 L pelo mesmo período de tempo, entretanto, sem contenção. Os parâmetros comportamentais indicativos de estresse e comportamento ansioso são: Redução da exploração (especialmente na parte superior dos tanques novos), evitação de ambientes novos, comportamento errático (*shoaling*) e congelamento (Kalueff; Stewart; Gerlai, 2013).

Para avaliar o estresse oxidativo, logo após a conclusão de cada protocolo comportamental, os animais serão eutanasiados e o encéfalo coletado. Os tecidos cerebrais serão posteriormente homogeneizados, centrifugados, e o líquido resultante será armazenado a -80 °C para análise posterior. Será feito um agrupamento (*pool*) de 6 encéfalos de peixes-zebra para cada "n," onde "n" representa o número de sujeitos em cada grupo experimental, sendo igual a 4. Os parâmetros que serão examinados incluem a atividade das enzimas superóxido

dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathione S-transferase (GST), glutathione reduced (GSH), a atividade da enzima glutathione reductase (GR) e a atividade da glutathione peroxidase (GPx). Além disso, será avaliado o dano oxidativo aos lipídios por meio da medição das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) e o dano oxidativo às proteínas pelos níveis de grupos tióis proteicos (SH) e não proteicos (NPSH). Todas as técnicas de análise de estresse oxidativo seguirão protocolos utilizados em estudos anteriores (Mocelin *et al.*, 2019, Muller *et al.*, 2017).

#### 2.1.7.5 Processamento, controle de qualidade e análise estatística dos dados

Para iniciar a avaliação dos dados, será realizada uma análise estatística descritiva e criados gráficos de frequência. Além disso, verificar-se-á a normalidade dos dados utilizando o teste de Shapiro-Wilk. Ao analisar o impacto das diferentes intervenções ou tratamentos farmacológicos aplicados nos modelos descritos neste projeto, a análise estatística apropriada ocorrerá levando em consideração a distribuição dos dados, utilizando como método estatístico o teste de ANOVA de um ou duas-vias, seguido do teste de *post hoc* de Tukey, utilizando o software GraphPad Prism (versão 9.2.0). O sexo dos animais será considerado como um possível fator, no entanto, se essa variável não demonstrar significância estatística, os dados serão combinados (machos e fêmeas). Os resultados serão apresentados na forma da média  $\pm$  erro padrão da média. Em todas as comparações, o nível de significância adotado será  $p < 0,05$ .

#### 2.1.7.6 Aspectos éticos

Este projeto será iniciado após obter a aprovação da Comissão de Ética em Uso de Animais (CEUA-UFFS) e envolverá uma equipe de profissionais devidamente qualificados. Para garantir o bem-estar dos animais, eles serão mantidos em condições apropriadas. O desenho experimental seguirá os princípios dos 3 Rs (*replace, refine e reduce*), com o objetivo de otimizar a utilização de um menor número de animais, minimizando o estresse e o sofrimento durante todas as fases experimentais e na manutenção dos animais no laboratório. A eutanásia dos peixes será realizada por meio de um processo de resfriamento rápido (2-4 °C),





## 2.2 REFERÊNCIAS

- BERTELLI, Paulo Ricardo *et al.* Anti-stress effects of the glucagon-like peptide-1 receptor agonist liraglutide in zebrafish. **Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry**, [S. l.], v. 111, p. 110388, 18 jun. 2021. DOI <https://doi.org/10.1016/j.pnpbp.2021.110388>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0278584621001470?via%3Dihub>. Acesso em: 20 set. 2023
- CHAN, Tiffany; BUNCE, Paul E. Fluoroquinolone antimicrobial drugs. **Canadian Medical Association Journal**, [S. l.], v. 189, n. 17, p. E638, 1 maio 2017. DOI 10.1503/cmaj.160938. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28461376/>. Acesso em: 30 ago. 2023.
- CHEN, Hsiuchen; CHAN, David C. Critical dependence of neurons on mitochondrial dynamics. **Current opinion in cell biology**, [S. l.], ano 4, v. 18, p. 453-459, ago. 2006. DOI 10.1016/j.ceb.2006.06.004. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16781135/>. Acesso em: 30 ago. 2023.
- DAL SANTO, Glauca *et al.* Acute restraint stress induces an imbalance in the oxidative status of the zebrafish brain. **Neuroscience Letters**, [S. l.], v. 558, p. 103-108, 13 jan. 2014. DOI <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2013.11.011>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0304394013010112?via%3Dihub>. Acesso em: 22 ago. 2023.
- DE LEON, Jesús Aguilar Diaz; BORGES, Chad R. Evaluation of Oxidative Stress in Biological Samples Using the Thiobarbituric Acid Reactive Substances Assay. **Journal of Visualized Experiments**, [S. l.], v. 159, p. PMC9617585, 12 maio 2020. DOI 10.3791/61122. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32478759/>. Acesso em: 12 set. 2023.
- DESBONNET, Lieve *et al.* Gut microbiota depletion from early adolescence in mice: Implications for brain and behaviour. **Brain, behavior and Immunity**, [S. l.], v. 48, p. 165-173, Ago. 2015. DOI 10.1016/j.bbi.2015.04.004. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25866195/>. Acesso em: 28 ago. 2023.
- DINAN, Katherine; DINAN, Timothy. Antibiotics and mental health: The good, the bad and the ugly. **Journal of Internal Medicine**, [S. l.], v. 292, p. 858-869, Dez. 2022. DOI 10.1111/joim.13543. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35819136/>. Acesso em: 30 ago. 2023.
- DINOS, George P. The macrolide antibiotic renaissance. **British Journal of Pharmacology**, [S. l.], ano 18, v. 174, p. 2967-2983, 10 ago. 2017. DOI 10.1111/bph.13936. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28664582/>. Acesso em: 30 ago. 2023.
- GAO, Zewen; CHEN, Ye; GUAN, Min-Xin. Mitochondrial DNA mutations associated with aminoglycoside induced ototoxicity. **Journal of otology**, [S. l.], v. 12, n. 1, p. 1-8,

Mar. 2017. DOI 10.1016/j.joto.2017.02.001. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29937831/>. Acesso em: 30 ago. 2023.

GORMAN, Gráinne S *et al.* Mitochondrial diseases. **Nature Reviews**, [S. l.], v. 2, 20 out. 2016. Disease Primers, p. 1-22. DOI 10.1038/nrdp.2016.80. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27775730/>. Acesso em: 29 ago. 2023.

GRANT, Sarah Schmidt; HUNG, Deborah T. Persistent bacterial infections, antibiotic tolerance, and the oxidative stress response. **Virulence**, [S. l.], v. 4, n. 4, p. 273-283, 15 maio 2013. DOI 10.4161/viru.23987. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23563389/>. Acesso em: 30 ago. 2023.

HUTCHINGS, Matthew I.; TRUMAN, Andrew W.; WILKINSON, Barrie. Antibiotics: past, present and future. **Current Opinion in Microbiology**, [S. l.], v. 51, p. 72-80, 13 nov. 2019. DOI 10.1016/j.mib.2019.10.008. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31733401/>. Acesso em: 30 ago. 2023.

IBITOYE, Oluwayemisi Beatrice; AJIBOYE, Taofeek; ALIYU, Najeeb Olamilekan. Protective Influence of *Phyllanthus Muellarianus* on Ciprofloxacin-Induced Neurotoxicity in Male Rats. **Journal of Dietary Supplements**, [S. l.], v. 17, n. 3, p. 321-335, 8 maio 2019. DOI 10.1080/19390211.2019.1586805. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31066327/>. Acesso em: 22 ago. 2023.

JIJIE, Roxana *et al.* Zebrafish as a Screening Model to Study the Single and Joint Effects of Antibiotics. **Pharmaceuticals (Basel)**, [S. l.], v. 14, n. 6, p. 578, 14 jun. 2021. DOI 10.3390/ph14060578. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8234794/>. Acesso em: 10 out. 2023.

KALINICHENKO, LS; KORNHUBER, J; MULLER, CP. Individual differences in inflammatory and oxidative mechanisms of stress-related mood disorders. **Frontiers in Neuroendocrinology**, Elsevier, p. 100783, 12 ago. 2019. DOI 10.1016/j.yfrne.2019.100783. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31415777/>. Acesso em: 12 mar. 2024.

KALUEFF, Allan V; STEWART, Adam Michael; GERLAI, Robert. Zebrafish as an emerging model for studying complex brain disorders. **Trends Pharmacol Sci**, [S. l.], v. 35, n. 2, p. 63-75, Fev. 2014. DOI 10.1016/j.tips.2013.12.002. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24412421/>. Acesso em: 30 ago. 2023.

KANUNGO, Jyotshna *et al.* Zebrafish model in drug safety assessment. **Current pharmaceutical design**, [S. l.], v. 20, n. 34, p. 5416-5429, 2014. DOI 10.2174/1381612820666140205145658. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24502596/>. Acesso em: 27 ago. 2023.

KAUR, Kamaljeet *et al.* Fluoroquinolone-related neuropsychiatric and mitochondrial toxicity: a collaborative investigation by scientists and members of a social network. **The journal of community and supportive oncology**, [S. l.], v. 14, n. 2, p. 54-65, Fev. 2013. DOI 10.12788/jcso.0167. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26955658/>. Acesso em: 30 ago. 2023.

KILKENNY, Carol *et al.* Improving Bioscience Research Reporting: The ARRIVE Guidelines for Reporting Animal Research. **PLOS Biology** 8:e1000412. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1000412>, [S. l.], v. 8, n. 6, p. 1-5, 29 jun. 2010. DOI <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1000412>. Disponível em: <https://journals.plos.org/plosbiology/article?id=10.1371/journal.pbio.1000412>. Acesso em: 10 out. 2023.

LIN, Michael T; BEAL, M Flint. Mitochondrial dysfunction and oxidative stress in neurodegenerative diseases. **Nature**, [S. l.], v. 443, n. 7113, p. 787-795, 19 out. 2006. DOI 10.1038/nature05292. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17051205/>. Acesso em: 27 ago. 2023.

MACRAE, Calum A; PETERSON, Randall T. Zebrafish as tools for drug discovery. **Nature Reviews**, [S. l.], v. 14, n. 10, 11 set. 2015. Drug discovery, p. 721-731. DOI 10.1038/nrd4627. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26361349/>. Acesso em: 27 ago. 2023.

MAXIMINO, Caio. Scototaxis as anxiety-like behavior in fish. **Nature protocols**, [S. l.], v. 5, n. 2, p. 209-216, 1 fev. 2010. DOI 10.1038/nprot.2009.225. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20134420/>. Acesso em: 25 ago. 2023.

MOCELIN, Ricieri *et al.* Behavioral and Biochemical Effects of N-Acetylcysteine in Zebrafish Acutely Exposed to Ethanol. **Neurochemical Research**, [S. l.], v. 43, p. 458-464, 1 dez. 2017. DOI <https://doi.org/10.1007/s11064-017-2442-2>. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s11064-017-2442-2>. Acesso em: 3 out. 2023.

MOCELIN, Ricieri *et al.* N-acetylcysteine prevents stress-induced anxiety behavior in zebrafish. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, [S. l.], v. 139, dez. 2015. B, p. 121-126. DOI <https://doi.org/10.1016/j.pbb.2015.08.006>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0091305715300435?via%3Di%3Dhub>. Acesso em: 3 out. 2023.

MOCELIN, Ricieri Naue *et al.* N-Acetylcysteine Reverses Anxiety and Oxidative Damage Induced by Unpredictable Chronic Stress in Zebrafish. **Molecular Neurobiology**, [S. l.], v. 56, p. 1188–1195, 6 jun. 2018. DOI <https://doi.org/10.1007/s12035-018-1165-y>. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s12035-018-1165-y>. Acesso em: 3 out. 2023.

MOHR, Kathrin I. History of Antibiotics Research. **Current Topics in Microbiology and Immunology**, [S. l.], v. 398, p. 237-272, 2016. DOI 10.1007/82\_2016\_499. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27738915/>. Acesso em: 30 ago. 2023.

MÜLLER, Talise E. Sodium Selenite Prevents Paraquat-Induced Neurotoxicity in Zebrafish. **Molecular Neurobiology**, [S. l.], v. 55, p. 1928–1941, 27 fev. 2017. DOI <https://doi.org/10.1007/s12035-017-0441-6>. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s12035-017-0441-6#citeas>. Acesso em: 3 out. 2023.

MUNJAMPALLI, Sai Krishna J; DAVIS, Debra E. Medicinal-Induced Behavior Disorders. **Neurologic Clinics**, [S. l.], v. 34, n. 1, p. 133-169, Fev. 2016. DOI 10.1016/j.ncl.2015.08.006. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26613997/>. Acesso em: 27 ago. 2023.

NELSON, I. A new mitochondrial DNA mutation associated with progressive dementia and chorea: A clinical, pathological, and molecular genetic study.. **Annals of neurology**, [S. l.], v. 37, n. 3, p. 400-403, Mar. 1997. DOI 10.1002/ana.410370317. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/7695240/>. Acesso em: 28 ago. 2023.

OLARTE-LUIS, Tatiana; CÁCERES-GALÍNDEZ, Dolli; CORTÉS, Jorge Alberto. Nuevas cefalosporinas. **Revista Chilena de Infectología**, Santiago, v. 35, n. 5, p. 465-475, 3 jul. 2018. DOI <http://dx.doi.org/10.4067/s0716-10182018000500465>. Disponível em: [https://www.scielo.cl/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0716-10182018000500465](https://www.scielo.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0716-10182018000500465). Acesso em: 23 ago. 2023.

PERCIE DU SERT, Nathalie *et al.* Reporting animal research: Explanation and elaboration for the ARRIVE guidelines 2.0. **PLOS Biology**, [S. l.], v. 18, n. 7, p. e3000411, 14 jul. 2020. DOI <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.3000411>. Disponível em: <https://journals.plos.org/plosbiology/article?id=10.1371/journal.pbio.3000411>. Acesso em: 12 set. 2023.

PETERSEN, Barbara Dutra *et al.* Antibiotic drugs alter zebrafish behavior. **Comparative Biochemistry and Physiology, Part C**, [S. l.], v. 242, p. 108936, 4 nov. 2020. DOI 10.1016/j.cbpc.2020.108936. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33160041/>. Acesso em: 10 out. 2023.

REIS, Carlos Guilherme Rosa. **Efeito da N-Acetilcisteína-Amida sobre parâmetros comportamentais e bioquímicos em peixes-zebra**. Orientador: Prof. Dr. Angelo Piato. 2017. 44 p. Dissertação (Mestrado em Neurociências) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, [S. l.], 2019. Disponível em: <https://lume.ufrgs.br/handle/10183/196663>. Acesso em: 28 ago. 2023.

Riehl R, Kyzar E, Allain A, et al (2011) Behavioral and physiological effects of acute ketamine exposure in adult zebrafish. **Neurotoxicol Teratol** 33:658–667. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ntt.2011.05.011>. Acesso em 01 out. 2023.

SALUJA, Diksha *et al.* Importance of Zebrafish as an Efficient Research Model for the Screening of Novel Therapeutics in Neurological Disorders. **CNS & Neurological Disorders - Drug Targets**, [S. l.], v. 20, n. 2, p. 145-157, 2021. DOI 10.2174/1871527319666201207211927. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33290204/>. Acesso em: 30 ago. 2023.

SMAGA, Irena *et al.* Molecular changes evoked by the beta-lactam antibiotic ceftriaxone across rodent models of substance use disorder and neurological disease. **Neuroscience and Behavioral Reviews**, [S. l.], n. 115, p. 116-130, 1 ago. 2021. DOI 10.1016/j.neubiorev.2020.05.016. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32485268/>. Acesso em: 30 ago. 2023.

STEENBERGEN, Peter J; RICHARDSON, Michael K; CHAMPAGNE, Danielle L. The use of the zebrafish model in stress research. **Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry**, [S. l.], v. 35, p. 1432-1451, 30 out. 2010. DOI 10.1016/j.pnpbp.2010.10.010. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20971150/>. Acesso em: 13 set. 2023.

STEWART, Adam Michael; KALUEFF, Allan V. The developing utility of zebrafish models for cognitive enhancers research. **Current Neuropharmacology**, [S. l.], v. 10, n. 3, p. 263-271, Set. 2012. DOI 10.2174/157015912803217323. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23449968/>. Acesso em: 27 ago. 2023.

SUÁREZ-RIVERO, Juan M. *et al.* Neurodegeneration, Mitochondria, and Antibiotics. **Metabolites**, [S. l.], v. 13, n. 416, 12 mar. 2023. DOI 10.3390/metabo13030416. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC10056573/>. Acesso em: 30 ago. 2023.

THE ORGANISATION FOR ECONOMIC CO-OPERATION AND DEVELOPMENT (OECD). **OECD GUIDELINE FOR TESTING OF CHEMICALS**. [S. l.: s. n.], 2018. Disponível em: [https://www.oecd.org/en/publications/test-no-203-fish-acute-toxicity-test\\_9789264069961-en.html](https://www.oecd.org/en/publications/test-no-203-fish-acute-toxicity-test_9789264069961-en.html). Acesso em: 13 set. 2023.

TOMBERG, Joshua; UNEMO, Magnus; NICHOLAS, Robert A. Molecular and structural analysis of mosaic variants of penicillin-binding protein 2 conferring decreased susceptibility to expanded-spectrum cephalosporins in *Neisseria gonorrhoeae*: role of epistatic mutations. **Biochemistry**, [S. l.], v. 49, n. 37, p. 8062-8070, 21 set. 2010. DOI 10.1021/bi101167x. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20704258/>. Acesso em: 22 ago. 2023.

VAN ACKER, Heleen; COENYE, Tom. The Role of Reactive Oxygen Species in Antibiotic-Mediated Killing of Bacteria. **Trends in Microbiology**, [S. l.], v. 25, n. 6, p. 456-466, Jun. 2017. DOI 10.1016/j.tim.2016.12.008. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28089288/>. Acesso em: 27 ago. 2023.

VAN BOECKEL, Thomas P *et al.* Global trends in antimicrobial use in food animals. **Proceedings of the National Academy of Sciences (PNAS)**, [S. l.], v. 112, n. 18, p. 5649-5654, 15 maio 2015. DOI 10.1073/pnas.1503141112. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25792457/>. Acesso em: 30 ago. 2023.

VÁZQUEZ-LASLOP, Nora; MANKIN, Alexander S. How Macrolide Antibiotics Work. **Trends in Biochemical Sciences**, [S. l.], ano 9, v. 43, p. 668-684, 24 jul. 2018. DOI 10.1016/j.tibs.2018.06.011. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30054232/>. Acesso em: 30 ago. 2023.

ZHANG, Gui-Fu *et al.* Ciprofloxacin derivatives and their antibacterial activities. **European Journal of Medicinal Chemistry**, [S. l.], v. 146, p. 599-612, 25 fev. 2018. DOI 10.1016/j.ejmech.2018.01.078. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29407984/>. Acesso em: 30 ago. 2023.

### 3 RELATÓRIO DE PESQUISA

O presente estudo trata-se de um Trabalho de Curso (TC), intitulado “investigação dos efeitos de antibióticos sobre parâmetros comportamentais e de estresse oxidativo em peixes-zebra”, e é pré-requisito para obtenção do grau de bacharel em Medicina na Universidade Federal da Fronteira Sul (UFFS). Foi desenvolvido pela acadêmica Cristine Somavilla Fagundes e tem como principal objetivo descrever a influência dos antibióticos Ciprofloxacino, Claritromicina e Ceftriaxona no comportamento e no *status* oxidativo em peixes-zebra. Refere-se a um estudo quantitativo, observacional, transversal, descritivo e analítico a partir de análise comportamental e de *status* oxidativo em modelo animal.

O projeto de pesquisa foi desenvolvido no componente curricular de Trabalho de Curso I, no segundo semestre letivo de 2023, sob a orientação do Prof. Dr. Ricieri Naue Mocelin. Ao ser concluído, foi submetido à avaliação da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal da Fronteira Sul no dia 12 de dezembro de 2023 e o primeiro parecer foi recebido no dia 23 de fevereiro de 2024. As pendências contidas no documento foram resolvidas e enviadas para apreciação ética no dia 11 de março de 2024. Apesar do retorno das pendências dentro do prazo, o CEUA passou por alteração e atualização do sistema e as avaliações dos revisores foram perdidas, ocasionando grande prejuízo, uma vez que as mesmas pendências que já haviam sido respondidas retornavam para ajustes, gerando grande demora. Para além disso, mesmo o projeto já aprovado (inclusive passando em aprovação em 2 reuniões), foi incluído no sistema e gerada a certificação (protocolo CEUA/UFFS nº 2517121223) apenas no dia 16 de agosto de 2024, 5 meses após o retorno às pendências (ANEXO E).

Durante o período de análise do projeto pela comissão competente, foram realizados os cursos online de Curso de Capacitação em Animais de Experimentação da Universidade Federal de Pelotas (UFPEL), e de Iniciação em Ciência em Animais de Laboratório, oferecido pela Fiocruz. Além disso, foram orçados e adquiridos os materiais necessários para a execução do projeto. Após a aprovação pelo CEUA, foi possível fazer aquisição dos animais e iniciar os experimentos no dia 09 de outubro de 2024.

Os animais foram mantidos nas instalações do Laboratório de Neuropsicobiologia Translacional (LaNT) no *campus* Passo Fundo da UFFS.

Previamente os animais foram mantidos em habituação durante 15 dias, acondicionados em tanques de 40 litros (45 x 35 x 30 cm) com densidade máxima de 2 peixes/litro, sob condições ideais para a espécie, com água não clorada mantida sob constante filtração mecânica, biológica e química, temperatura de  $26 \pm 2^\circ\text{C}$ , ciclo claro/escuro de 14/10h e alimentados 2 vezes ao dia com ração comercial (Poytara tropicais dia-a-dia, Araraquara/SP), conforme literatura. Os animais ( $n = 7-8$ , 50:50 machos:fêmeas) foram expostos durante 96 horas a água do sistema (Controle), Ceftriaxona (1 mg/L, Eurofarma), uma cefalosporina de 3º geração, Ciprofloxacino (6,25 mg/L, Eurofarma), uma fluoroquinolona, ou Claritromicina (2 mg/L, EMS), uma tetraciclina. As concentrações foram obtidas de estudos prévios (JIJIE *et al.*, 2021 *apud* ADEREMI, 2020; MINSKI *et al.*, 2021; LI; ZHANG, 2020; JIJIE *et al.*, 2021 *apud* QIU *et al.*, 2020; NADAL *et al.*, 2018; PETERSEN *et al.*, 2021). Os fármacos foram adquiridos de farmácias comerciais.

Imediatamente após as 96 horas de exposição, os animais foram gentilmente transferidos individualmente ao aparato experimental do teste de tanque novo. O teste consiste em um aparato de 2,7 litros (24 x 8 x 20 cm) contendo água do sistema e divididos virtualmente em 3 áreas (superior, média e inferior). Os animais foram filmados (Logitech C920) durante 6 minutos e os vídeos quantificados no software Any-maze™ (Stoelting Co., EUA). Os seguintes parâmetros foram analisados durante 6 minutos: distância total percorrida (m), número total de cruzamento, tempo de permanência na área inferior e superior (s). Alterações na distância total percorrida e no número de cruzamentos são indicadores de alterações locomotoras. Aumento no tempo de permanência na área inferior e diminuição do tempo de permanência na área superior são indicativos de comportamento tipo-ansiosogênico.

Instantaneamente após o teste comportamental, os animais passaram por anestesia geral por imersão em água a  $2^\circ\text{C}$  (resfriamento rápido) em um recipiente béquer de 500 mL e eutanasiados.

A distribuição normal dos dados e a homogeneidade da variância foram determinadas pelos testes de *Kolmogorov-Smirnov* e *Levene*, respectivamente. Os dados foram analisados através do *test t*. O efeito tanque e sexo foram avaliados em todas as comparações e os dados foram agrupados por não apresentarem diferença significativa. Considerando a perda de mais de 50% dos animais expostos à

Claritromicina, provavelmente por toxicidade devido à alta concentração ou contaminação do tanque, os dados foram separados para evitar viés de resultado.

A plataforma de agrupamento dos dados e análise estatística utilizada foi o *GraphPAD Prism* (versão 9.5.0). As diferenças foram consideradas significativas em  $p < 0,05$ . Os dados são expressos como a média  $\pm$  erro padrão da média (S.E.M.). O número de animais foi estimado por meio de uma análise de poder. Calculamos o tamanho da amostra necessário para detectar uma diferença média no tempo gasto na área superior do tanque usando *G\*Power* (versão 3.1.9.2), considerando os seguintes parâmetros: alfa = 0,05, potência = 0,9 e tamanho do efeito = 1,2, bem como estudos anteriores.

Os resultados até então produzidos foram utilizados para avaliação dos níveis de toxicidade dos fármacos em suas concentrações. Ao final, após análise comportamental, identificou-se que a exposição não induziu alteração locomotora dos animais. Sendo assim, um novo experimento foi realizado com o intuito de duplicar o resultado anterior e para coleta do material encefálico para posterior análise bioquímica.

Após essa análise, novos peixes-zebra foram adquiridos e aclimatados pelo período de 14 dias. No final de 2024, os fármacos foram adquiridos de farmácias comerciais e os peixes-zebra foram expostos por 96 horas à água sem tratamento (Controle), e aos antibióticos Ceftriaxona 1 mg/L (Ceftriaxona Sódica 500 mg, Eurofarma), Ciprofloxacino 6,25 mg/L (Cloridrato de Ciprofloxacino 500 mg, Pratti Donaduzzi) ou Claritromicina 2 mg/L (Claritromicina 500 mg, EMS). As concentrações foram revisadas com dados da literatura (JIJIE *et al.*, 2021 *apud* ADEREMI, 2020; MINSKI *et al.*, 2021; LI; ZHANG, 2020; JIJIE *et al.*, 2021 *apud* QIU *et al.*, 2020; NADAL *et al.*, 2018; PETERSEN *et al.*, 2021).

Imediatamente após a exposição, os peixes foram transferidos individualmente para os tanques de 2,7 litros (24 x 8 x 20 cm), preenchidos com água do sistema e separados virtualmente em 3 áreas (superior, média e inferior). Nos tanques, os animais foram filmados (Logitech C920) por 6 minutos. Após a gravação, os dados foram processados no software Any-maze™ (Stoelting Co., EUA).

Os parâmetros de análise foram: distância total percorrida (m) e número total de cruzamento (alterações locomotoras), tempo de permanência na área inferior e superior (comportamento). Instantaneamente após o teste comportamental, os

animais passaram por anestesia geral por resfriamento rápido (imersão em água a 2°C) em um recipiente béquer de 500 mL e eutanasiados para coleta de encéfalo e posterior análise bioquímica.

A distribuição normal dos dados e a homogeneidade da variância foram respectivamente determinadas pelos testes de *Kolmogorov-Smirnov* e *Levene*. Através do teste t, os dados foram analisados. O efeito tanque e sexo foram avaliados em todas as comparações, mas não apresentaram diferença significativa, motivo pelo qual optou-se por agrupar os dados.

A plataforma de agrupamento dos dados e análise estatística utilizada foi o *GraphPAD Prism* (versão 9.5.0). As diferenças foram consideradas significativas em  $p < 0,05$ . Os dados estão expressos como a média  $\pm$  erro padrão da média (S.E.M.). O número de animais foi estimado por meio de uma análise de poder. O tamanho da amostra necessário para detectar uma diferença média no tempo gasto na área superior do tanque foi calculado através do software *G\*Power* (versão 3.1.9.2), considerando os seguintes parâmetros: alfa=0,05, potência=0,9 e tamanho do efeito=1,2, bem como estudos anteriores.

A amostra final foi composta por 96 animais, distribuídos em 8 tanques (n=24), contendo 12 animais cada, com proporção sexual equilibrada (50% machos e 50% fêmeas). Os resultados indicaram um tamanho amostral ideal de 24 animais para cada grupo de exposição (n=24) nas análises comportamentais realizadas. O efeito do tanque e do sexo foi avaliado em todas as comparações estatísticas. Os dados foram agrupados, uma vez que não foram observadas diferenças significativas entre os grupos. Os antibióticos não induziram alteração locomotora quando comparados ao grupo controle na distância total percorrida, número total de cruzamento entre as áreas do aparato, e no número total de imobilidade. Ademais, não houve diferença estatística ( $p > 0,05$ ) entre os grupos de tratamento e o grupo controle quanto ao comportamento.

O protocolo de estresse agudo de contenção (EAC), um dos objetivos do projeto, não foi executado devido a novamente perda dos animais por contaminação do tanque e/ou animais adoecidos na primeira tentativa, bem como o pouco tempo disponível para aquisição, habituação e execução do experimento até a apresentação do trabalho. Em relação às análises bioquímicas dos materiais coletados na análise comportamental aqui apresentada, apesar de coletadas, foram armazenadas para análise futuras, uma vez que a centrífuga refrigerada

apresentava defeito e foi encaminhada para conserto, não retornando à UFFS. No presente momento, os dados parciais estão sendo apresentados e estudos futuros serão executados para contemplar todos os objetivos propostos do projeto visando a publicação.

No mês de junho de 2025, foi sintetizado o conteúdo deste volume final, composto pelo projeto de pesquisa, relatório de atividades e artigo científico contendo resultados parciais, que segue os moldes da Revista *Neuroscience Letters*. As normas que orientam a escrita do artigo científico estão de acordo com o guia para autores disponível no link abaixo:  
<https://www.sciencedirect.com/journal/neuroscience-letters/publish/guide-for-authors>

#### 4 ARTIGO CIENTÍFICO

### **INVESTIGAÇÃO DOS EFEITOS DOS ANTIBIÓTICOS CEFTRIAXONA, CIPROFLOXACINO E CLARITROMICINA SOBRE PARÂMETROS COMPORTAMENTAIS EM PEIXE-ZEBRA.**

INVESTIGATION OF THE EFFECTS OF CEFTRIAXONE, CIPROFLOXACIN, AND  
CLARITHROMYCIN ANTIBIOTICS ON BEHAVIORAL PARAMETERS IN  
ZEBRAFISH.

Cristine Somavilla Fagundes<sup>1</sup>, Ricieri Naue Mocelin<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Laboratório de Neuropsicobiologia Translacional (LaNT), curso de Medicina, Universidade Federal da Fronteira Sul (UFFS), Passo Fundo/RS.

Correspondência:

\*Ricieri Naue Mocelin, Rua Capitão Araújo, 20 (UFFS, Anexo II), Centro, CEP: 99010- 200, Passo Fundo, RS. E-mail: ricieri.mocelin@uffs.edu.br.

Os autores deste trabalho não possuem nenhum conflito de interesse.

## RESUMO

**Objetivo:** Investigar os efeitos dos antibióticos Ciprofloxacino, Claritromicina e Ceftriaxona sobre parâmetros comportamentais em peixes-zebra. **Métodos:** 96 peixes-zebra (*Danio rerio*) adultos, da linhagem *wild-type*, foram divididos em grupos expostos durante 96h a Ciprofloxacino 6,25 mg/L, Claritromicina 2 mg/L, Ceftriaxona 1 mg/L ou veículo (controle). Imediatamente após, os animais foram submetidos ao teste de tanque novo (NTT), filmados durante 6 minutos e posteriormente quantificados os parâmetros de distância total percorrida (m), número de cruzamentos entre as áreas do aparato, número de episódios de imobilidade, tempo de permanência e distância percorrida nas áreas inferior e superior. O tamanho do grupo experimental foi realizado mediante cálculo amostral. A normalidade e a homogeneidade da variância dos dados foram verificadas pelos testes de *D'Agostino-Pearson* e *Levene*, respectivamente. Os resultados foram analisados por ANOVA de uma via seguida pelo teste *post hoc* de *Bonferroni's*, considerando o nível de significância com  $p < 0,05$ . **Resultados:** A exposição aos antibióticos Ciprofloxacino 6,25 mg/L, Claritromicina 2 mg/L ou Ceftriaxona 1 mg/L por 96h não induziram dano locomotor e alteração comportamental quando comparados ao grupo controle no NTT. **Conclusão:** Apesar da ausência de efeitos comportamentais dos antibióticos no estudo, é importante destacar que a ceftriaxona é capaz de induzir neuroproteção em modelos animais, entretanto, altas doses em humanos podem causar distúrbios neuropsiquiátricos. O Ciprofloxacino induz alterações dos níveis de neurotransmissores em modelos animais e, a claritromicina possui dados inconsistentes. Nesse sentido, mais estudos são necessários para avaliar os efeitos dos antibióticos sobre parâmetros comportamentais e do *status* oxidativo induzido por estresse a fim de identificar os riscos e benefícios dos antibióticos no sistema nervoso central.

Palavras-chave: *Ceftriaxona; Ciprofloxacino; Claritromicina; Modelos Animais; Peixe-zebra.*

## ABSTRACT

**Objective:** To investigate the effects of the antibiotics ciprofloxacin, clarithromycin, and ceftriaxone on behavioral parameters in zebrafish. **Methods:** 96 adult wild-type zebrafish (*Danio rerio*) were divided into groups and exposed for 96 hours to 6.25 mg/L ciprofloxacin, 2 mg/L clarithromycin, 1 mg/L ceftriaxone, or a vehicle (control). Immediately afterward, the animals underwent a novel tank test (NTT). Fish were filmed for 6 minutes, and the following parameters were subsequently quantified: total distance traveled (m), number of crosses between apparatus areas, number of immobility episodes, and time spent and distance traveled in the bottom and top areas. The experimental group size was determined by sample calculation. Data normality and homogeneity of variance were checked using D'Agostino-Pearson and Levene's tests, respectively. Results were analyzed by one-way ANOVA followed by Bonferroni's post-hoc test, with a threshold level set at  $p < 0.05$ . **Results:** Exposure to 6.25 mg/L ciprofloxacin, 2 mg/L clarithromycin, or 1 mg/L ceftriaxone for 96 hours did not induce locomotor damage or behavioral alterations compared to the control group in the NTT. **Conclusion:** Despite the absence of behavioral effects of these antibiotics in this study, it's important to note that ceftriaxone can induce neuroprotection in animal models; however, high doses in humans may cause neuropsychiatric disorders. Ciprofloxacin has been shown to alter neurotransmitter levels in animal models, while data for clarithromycin are inconsistent. Therefore, further studies are necessary to evaluate effects of antibiotics on behavioral parameters and on oxidative status induced by stress, aiming to identify antibiotic's risks and benefits on the central nervous system.

Keywords: *Ceftriaxone; Ciprofloxacin; Clarithromycin; Animal Models; Zebrafish.*

## INTRODUÇÃO

A medicina moderna sofreu uma mudança radical em pouco mais de um século, com a descoberta da penicilina em 1928, que acrescentou 23 anos ao tempo médio de vida dos seres humanos [1,2]. Desenvolvidos inicialmente para tratar infecções, os antibióticos acompanharam o avanço da medicina ao possibilitarem a execução de diversos procedimentos modernos, como tratamento do câncer, transplante de órgãos e cirurgias [3]. O avanço das pesquisas ao longo das décadas

expandiu o uso desses compostos para áreas além da medicina, como a agropecuária e a agricultura. Entretanto, nos últimos anos, estudos demonstraram que o consumo em larga escala pela população, bem como a contaminação ambiental e de alimentos de origem animal culmina em acúmulo desses compostos no corpo humano [4,5]. Tais ocorrências estão diretamente associadas ao aumento dos casos de resistência bacteriana e a preocupações em saúde pública, considerando os possíveis impactos na morbimortalidade de indivíduos expostos à terapia antimicrobiana prolongada [5, 6].

Apesar disso, antibióticos, como a Ceftriaxona e a Claritromicina, têm sido pesquisados como potenciais adjuvantes no tratamento de transtornos neuropsiquiátricos, com a hipótese de que atuem positivamente no eixo cérebro-intestino-microbiota, participando na modulação de neuroreguladores e na manutenção do *status* oxidativo em tecidos neuronais [7]. Por outro prisma, estudos sugerem que fármacos como o Ciprofloxacino podem induzir efeitos negativos, como ansiedade, depressão e estresse, possivelmente por interferirem na regulação de neurotransmissores e seus transportadores [7, 8, 9].

Nesse sentido, peixe-zebra é um organismo que emerge como modelo promissor para estudos em neurociência por apresentarem importante homologia do sistema nervoso central com o ser humano, tendo mais de 70% de semelhança entre as espécies. Nesse ínterim, compartilham das mesmas substâncias neuromoduladoras e hormônios que regulam o comportamento emocional [10, 11]. Destacam-se o hormônio cortisol que é liberado em situações de estresse, e os neurotransmissores glutamato, dopamina e acetilcolina, envolvidos em funções cognitivas, recompensa e na atividade nervosa autônoma [10, 12]. Considerando a íntima relação entre as alterações neuronais com mudanças comportamentais no peixe-zebra, esse modelo possibilita estabelecer um paralelo sólido com a espécie humana, atrelado ainda a possibilidades de análises neurodesenvolvimentais e toxicológicas [10, 11, 12, 13, 14].

Nesse contexto e considerando a necessidade de melhor detalhar os efeitos dos antibióticos no SNC, o objetivo do estudo foi investigar os efeitos da exposição a ceftriaxona, ciprofloxacino ou claritromicina sob parâmetros comportamentais em peixes-zebra.

## **MATERIAIS E MÉTODOS**

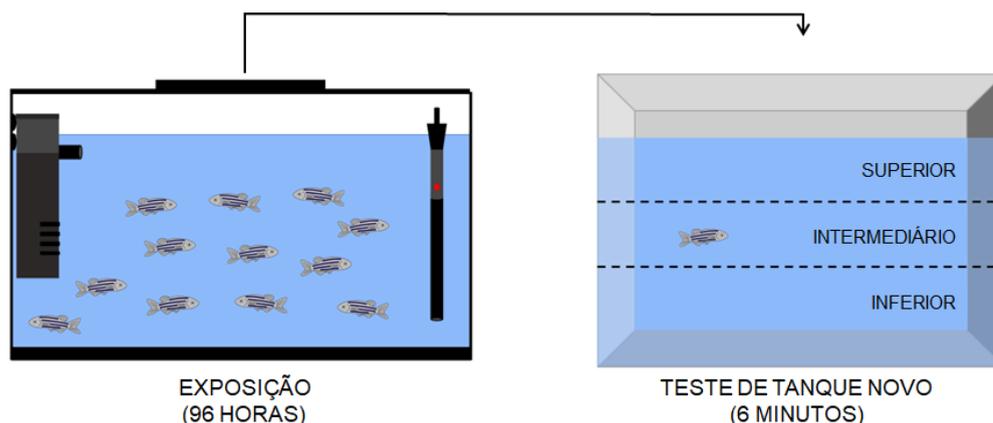
### *Animais e aclimação*

Um total de 96 peixes-zebra (*Danio rerio*) adultos (4-6 meses de idade) do tipo selvagem (*wild-type*) foram obtidos a partir de um fornecedor especializado (Recanto dos Peixes, Passo Fundo/RS), habituados e aclimatados por 2 semanas em tanques de 40 litros sob condições físico-químico adequadas para a espécie e alimentados 2 vezes ao dia com ração granulada (Poytara, Dia-A-Dia, Araraquara/SP) [15].

Após período de aclimação, realizou-se o preparo dos tanques com seus respectivos tratamentos, sendo então posteriormente os animais alocados em aquários de 16 litros de modo aleatório em 4 grupos experimentais. O experimento foi composto por 8 tanques com 12 animais em cada (6 machos e 6 fêmeas). Os pesquisadores envolvidos estiveram cegos em relação aos grupos experimentais, sendo que cada aquário foi identificado por um código, revelado somente após a análise estatística. O desenho experimental seguiu os princípios dos 3 Rs (*replace, refine e reduce*), com o objetivo de otimizar a utilização de menor número de animais, minimizando o estresse e o desconforto destes em todas as etapas do estudo, incluindo sua manutenção e os procedimentos experimentais. O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA/UFFS N° 2517121223).

### *Fármacos e administração*

Os antibióticos Ceftriaxona (Ceftriaxona Sódica 500 mg, Eurofarma), Ciprofloxacino (Cloridrato de Ciprofloxacino 500 mg, Pratti Donaduzzi) e Claritromicina (Claritromicina 500 mg, EMS) foram obtidos através de farmácias comerciais. Após a aclimação, os animais foram divididos em grupos Controle (veículo, sem tratamento), Ceftriaxona (1 mg/L), Ciprofloxacino (6,25 mg/L) ou Claritromicina (2 mg/L) e expostos durante 96 horas. Cada grupo experimental foi composto por 2 tanques. As concentrações e tempo de exposição foram obtidos de estudos prévios [11,16,17].



**Figura 1:** Representação esquemática do protocolo experimental.

### *Análise comportamental*

Imediatamente após período de exposição (96 h), os animais foram submetidos ao teste de tanque novo (NTT), os quais foram gentilmente transferidos individualmente ao tanque teste de 2,7 L (24 x 8 x 20 cm) e filmados durante 6 minutos. Posteriormente, os vídeos foram carregados no software Any-maze™ (Stoelting Co., USA) para a quantificação dos seguintes parâmetros comportamentais: distância total percorrida (m), número de cruzamentos entre as 3 áreas do aparato, número de episódios de imobilidade, distância total percorrida (m) e tempo de permanência (s) nas áreas superior e inferior do aparato. A redução da exploração do ambiente bem como maior tempo de permanência na área inferior, redução de exploração e imobilidade são considerados comportamentos indicativos de estresse e/ou comportamento tipo-ansiedade [16, 18].

### *Análise estatística*

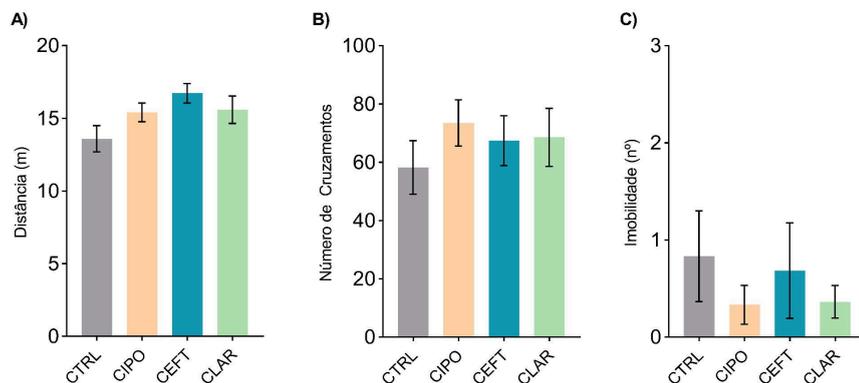
A determinação do tamanho do grupo experimental foi realizada mediante um cálculo amostral planejado, levando em consideração o desfecho primário de cada modelo e as informações disponíveis na literatura [19]. Para a realização do cálculo amostral, foi utilizado o software G\*Power (versão 3.1), tomando como base o número de grupos experimentais, um valor de significância  $\alpha$  de 5%, poder do teste estatístico de 80%, uma diferença esperada entre as médias de 50% e uma estimativa do desvio padrão de 40%. O efeito tanque e sexo foram avaliados em todas as comparações e os dados foram agrupados por não apresentarem diferença significativa. A retirada de animais (*outliers*) da análise estatística foi realizada mediante cálculo de limite superior (média mais 2 vezes o desvio padrão da média)

e limite inferior (média menos 2 vezes o desvio padrão da média), considerando o tempo de permanência na área superior como parâmetro.

A normalidade e a homogeneidade da variância dos dados foram verificadas pelos testes de *D'Agostino-Pearson* e *Levene*, respectivamente. Os resultados foram analisados por ANOVA de uma via seguida pelo teste *post hoc* de *Bonferroni's*. Os dados são expressos como média  $\pm$  erro padrão da média (E.P.M.). O nível de significância foi estabelecido em  $p < 0,05$ .

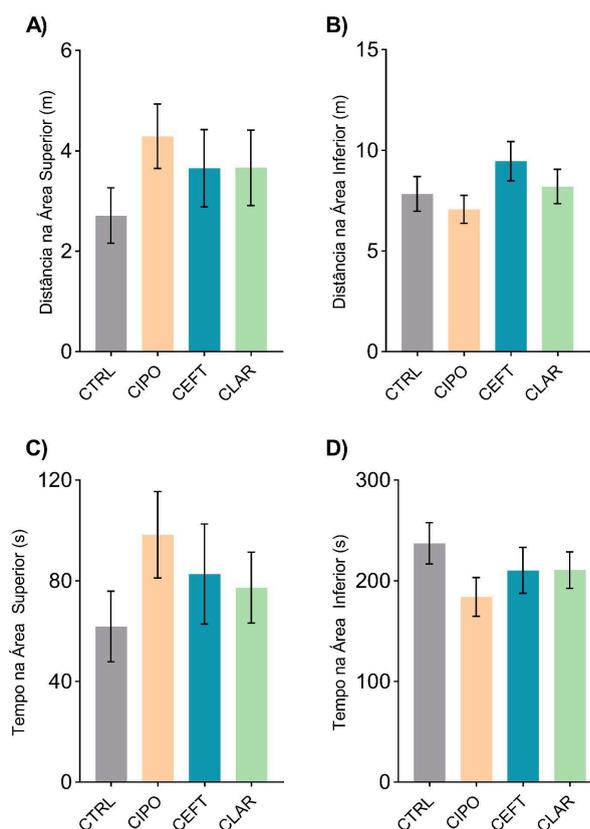
## RESULTADOS

A figura 2 mostra os efeitos da exposição aos antibióticos Ciprofloxacino, Ceftriaxona ou Claritromicina em peixes-zebra sob parâmetros locomotores no teste de tanque novo. Como esperado, nenhum dos antibióticos induziu alteração locomotora quando comparados ao grupo controle na distância total percorrida (Fig. 2A), número total de cruzamento entre as áreas do aparato (Fig. 2B) e no número total de imobilidade (Fig. 2C).



**Figura 2:** Parâmetros locomotores de peixes-zebra (*Danio rerio*) expostos a ciprofloxacino (6,25 mg/L), ceftriaxona (1 mg/L) ou claritromicina (2 mg/L) por 96 horas. (A) Distância total percorrida (m), (B) Número de cruzamentos entre áreas do tanque e (C) Episódios de imobilidade. Dados expressos como média  $\pm$  E.P.M. (n=20–24 por grupo). ANOVA de uma via,  $p > 0,05$  (n.s.).

Em relação aos parâmetros comportamentais no NTT, a figura 3 mostra que não houve diferença estatística ( $p > 0,05$ ) da exposição dos antibióticos em relação ao grupo não exposto (Controle) na distância total percorrida na área superior (Fig. 3A) e inferior (Fig. 3B), bem como no tempo de permanência na área superior (Fig. 3C) e inferior (Fig. 3D), nos peixes-zebra expostos aos antibióticos.



**Figura 3:** Comportamento exploratório de peixes-zebra (*Danio rerio*) expostos a ciprofloxacino (6,25 mg/L), ceftriaxona (1 mg/L) ou claritromicina (2 mg/L) por 96 horas. (A) Distância percorrida na área superior, (B) Distância na área inferior, (C) Tempo de permanência na área superior e (D) Tempo na área inferior do tanque. Valores representam média  $\pm$  E.P.M. (n=20–24). ANOVA de uma via,  $p > 0,05$  (n.s.).

## DISCUSSÃO

A exposição aos antibióticos Ciprofloxacino 6,25 mg/L (fluoroquinolona), Ceftriaxona 1 mg/L (cefalosporina) ou Claritromicina 2 mg/L (macrolídeo), não induziram alterações locomotoras e comportamentais em peixes-zebra no teste de tanque novo (NTT).

O NTT é uma importante ferramenta de análise locomotora e comportamental em peixes-zebra. Quando expostos a estímulos que provocam medo ou ansiedade, como protocolos de estresse, os animais demonstram uma variedade de comportamentos claramente mensuráveis durante o teste, como redução significativa na exploração, maior tempo de permanência no fundo do aparato e aumento no número de episódios imóveis [20].

Em consonância com o encontrado no estudo, o ciprofloxacino (6,25 mg/L) não induz alteração locomotora e comportamental em peixes-zebra. Entretanto, em doses elevadas (25 mg/L) os animais apresentam hiperlocomoção no NTT ao aumentarem a distância total percorrida, bem como exerce comportamento agressivo ao número de ataques a imagem refletida no teste de agressividade [17]. A alteração comportamental é sugestiva de mudanças na neurotransmissão colinérgica e dopaminérgica, as quais exercem funções essenciais no SNC, estando a acetilcolina envolvida em alteração cognitiva, contração muscular e modulação autonômica parassimpática; e a dopamina na regulação do movimento, sistema de recompensa, humor e na cognição [12]. Diante disso, sabe-se que altas concentrações de ciprofloxacino estão associadas à depleção significativa de acetilcolina e dopamina em ratos [21], apontando a necessidade de controle de acúmulo deste fármaco no organismo, tendo em vista seu efeito nocivo no SNC.

A exposição a ceftriaxona (1 mg/L) não induz alterações exploratórias ou comportamentais. Entretanto, atenua o tempo de imobilidade e reverte o comportamento tipo-ansiedade induzido pela exposição crônica ao álcool em peixes-zebra no NTT. [22] A redução do dano oxidativo induzido pela exposição ao álcool pela ceftriaxona pode explicar em partes a reversão do comportamento tipo-ansioso em peixes-zebra, uma vez que a formação de espécies reativas de oxigênio (EROs) estão envolvidos na mudança da capacidade antioxidante do organismo e resulta em danos a diferentes sistemas biológicos [23, 24, 25]. A ceftriaxona também já mostrou capacidade em atenuar o déficit de memória e melhora nos movimentos irregulares em modelos de doença de Parkinson, atuando como antioxidante ao reverter a diminuição de enzimas antioxidantes, bem como na prevenção da degeneração da via dopaminérgica [26, 27]. Além disso, em modelos animais de estresse, a ceftriaxona apresenta proteção dos danos comportamentais e oxidativos ao estimular o aumento do transportador de glutamato 1 (GLT-1) [28]. O glutamato é o principal neurotransmissor excitatório do SNC, essencial para comunicação neuronal, plasticidade sináptica e funções cognitivas, o qual é regulado pelo GLT-1. No entanto, se houver alteração na regulação dos transportadores e elevar os níveis de glutamato, danos neuronais serão observados devido a excitotoxicidade, observado em transtornos mentais [29, 30, 31]. Essa evidência é explicada em estudos pré-clínicos, os quais demonstram que comportamentos tipo-depressão ou tipo-ansiedade são induzidos por elevação dos níveis de

glutamato e diminuição na expressão de GLT-1 [22, 32]. Tais resultados indicam que concentrações mais altas e tratamento prolongado com ceftriaxona produzem efeito neuroprotetor em organismos modelo. Entretanto, em humanos, altas concentrações apresentam efeito nocivo ao SNC, como alteração de humor, psicose, crise convulsiva e agitação motora [33, 34].

São escassos os estudos avaliando os efeitos da claritromicina sobre o SNC, especialmente em modelos animais. Os efeitos da claritromicina sob parâmetros comportamentais em peixes-zebra adultos são descritos pela primeira vez no presente trabalho, onde identificou-se que a exposição a 2 mg/L não induz nenhuma alteração motora ou comportamental. Um estudo avaliou os efeitos da exposição à esse fármaco em peixes-zebra adultos sobre parâmetros metabólicos ambientais, os quais concluíram que essa substância parece ter correlação em alterar vias e metabólicos [35], no entanto, sem apresentar qualquer relação com humanos. Apesar disso, em larvas de peixes-zebra, a claritromicina induziu apoptose celular no tecido nervoso e dano oxidativo [36]. Contudo, esse composto foi capaz de melhorar a lesão cerebral em ratos submetidos à hemorragia subaracnoidea [37]. Em humanos, o fármaco tem sido associado a efeitos adversos a nível de SNC, como mania, confusão mental e alteração de conduta. [8, 38] Mesmo assim, tem sido considerado promissor na regulação imune e do estresse oxidativo [39].

O conhecimento da relação etiológica entre o estresse e transtornos mentais como ansiedade e depressão, apesar de dúbio, é amplo e bem difundido, caracterizado por alterações nos níveis de neurotransmissores e redução da atividade sináptica no organismo [40]. Ademais, já identificou-se que o desequilíbrio dinâmico entre a produção de ROS e a capacidade antioxidante celular gerando estresse oxidativo, este, é capaz de desenvolver danos em biomoléculas como lipídios, proteínas e DNA, que conseqüentemente possuem íntima relação com transtornos mentais [6].

O uso ampliado de antibióticos e sua distribuição no ecossistema têm alertado a comunidade científica sobre os efeitos potenciais do acúmulo desses compostos no organismo humano e seus desfechos na morbimortalidade populacional. Dessa forma, estudos sobre a influência dos antibióticos no organismo humano são importantes para melhor entendimento dos impactos que esse fenômeno traz para a saúde pública. No presente estudo, os antibióticos não apresentaram efeitos superiores ou inferiores ao grupo controle. Esses resultados

sugerem que mais estudos são necessários para esclarecer a concentração aproximada necessária para atingir o efeito benéfico desse medicamento no SNC, distinguindo os limites para evitar riscos e atingir benefícios com a sua administração. Por fim, os achados corroboram com a literatura, porém, estudos são necessários para avaliar a potencial vantagem deste fármaco em também em doenças neuropsiquiátricas.

## **CONCLUSÃO**

Este estudo demonstrou que os antibióticos ciprofloxacino, ceftriaxona e claritromicina, não induziram alterações motoras e comportamentais em peixes-zebra adultos após 96h de exposição, sugerindo segurança do uso. No entanto, os resultados não descartam efeitos em exposições prolongadas ou em modelos de estresse, reforçando a necessidade de estudos complementares que integrem avaliações comportamentais, bioquímicas e moleculares. Os achados oferecem bases para investigações toxicológicas mais abrangentes, com implicações tanto para a segurança farmacológica quanto para o monitoramento ambiental de antibióticos, apontando caminhos para protocolos mais robustos na avaliação de riscos neurocomportamentais.

## **AGRADECIMENTOS**

Agradecemos a Bruno Zilli Peroni e Matheus Ricardo Hoffmann de Souza pelo apoio prestado na realização dos experimentos desenvolvidos neste trabalho

## **CONTRIBUIÇÕES DOS AUTORES**

Cristine Somavilla Fagundes e Ricieri Naue Mocelin participaram de todas as etapas da concepção, delineamento, aquisição, análise e interpretação dos dados, escrita do artigo e aprovaram a versão final do trabalho.

## **FINANCIAMENTO**

Universidade Federal da Fronteira Sul (PAFEP-TCC / Edital Nº 31/PROGRAD/UFFS/2024)

## REFERÊNCIAS

- [1] K.I. Mohr, History of antibiotics research, *Curr Top Microbiol Immunol.* 398 (2016) 237-272. [https://doi.org/10.1007/82\\_2016\\_499](https://doi.org/10.1007/82_2016_499).
- [2] N.A. Martínez-González, S. Coenen, A. Plate, A. Colliers, T. Rosemann, O. Senn, S. Neuner-Jehle, The impact of interventions to improve the quality of prescribing and use of antibiotics in primary care patients with respiratory tract infections: a systematic review protocol, *BMJ Open* 7 (2017) e016253. <https://doi.org/10.1136/bmjopen-2017-016253>.
- [3] M.I. Hutchings, A.W. Truman, B. Wilkinson, Antibiotics: past, present and future, *Curr Opin Microbiol.* 51 (2019) 72-80. doi:10.1016/j.mib.2019.10.008.
- [4] S.I. Polianciuc, A.E. Gurzău, B. Kiss, M.G. Ştefan, F. Loghin, Antibiotics in the environment: causes and consequences, *Med Pharm Rep.* 93 (3) (2020) 231-240, <https://doi.org/10.15386/mpr-1742>
- [5] M.C. Danner, A. Robertson, V. Behrends, J. Reiss, Antibiotic pollution in surface fresh waters: occurrence and effects, *Sci Total Environ.* 664 (2019) 793-804, <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.01.406>.
- [6] S.S. Grant, D.T. Hung, Persistent bacterial infections, antibiotic tolerance, and the oxidative stress response, *Virulence.* 4 (4) (2013) 273-283, <https://doi.org/10.4161/viru.23987>.
- [7] K. Dinan, T. Dinan, Antibiotics and mental health: the good, the bad and the ugly, *J Intern Med.* 292 (6) (2022) 858-869, <https://doi.org/10.1111/joim.13543>.
- [8] L. Lally, L. Mannion, The potential for antimicrobials to adversely affect mental state, *BMJ Case Rep.* (2013) bcr2013009659, <https://doi.org/10.1136/bcr-2013-009659>.
- [9] J. Zhang J, K. Liu K, L. Sun, L. Yang, X. Liu, Y. Zhu, R. Wei, Z. Jin, L. Wang, Y. Ma, S. Wang, A. Liu, F. Tao, Exposure to antibiotics and mental disorders in children: a community-based cross-sectional study, *Environ Geochem Health.* 43 (8) (2021) 3237-3253, <https://doi.org/10.1007/s10653-021-00840-2>.
- [10] A.V. Kalueff, A.M. Stewart, R. Gerlai, Zebrafish as an emerging model for studying complex brain disorders, *Trends Pharmacol Sci.* 35 (2) (2014) 63-75, <https://doi.org/10.1016/j.tips.2013.12.002>.
- [11] R. Jijie, P.A. Mircea, G. Solcan, et al. Zebrafish as a screening model to study the single and joint effects of antibiotics, *Pharmaceuticals.* 14 (6) (2021) 578 <https://doi.org/10.3390/ph14060578>.

- [12] K.A. Horzmann, J.L. Freeman, Zebrafish get connected: Investigating neurotransmission targets and alterations in chemical toxicity, *Toxics*, 4 (3) (2016) 19. <https://doi.org/10.3390/toxics4030019>
- [13] D. Saluja, J. Rishabj, S. Kaushal, B. Verma, N. Sharma, R. Singh, S. Agrawal, M. Yadav, A. Kumar, C. Singh, A. Singh, Importance of zebrafish as an efficient research model for the screening of novel therapeutics in neurological disorders, *CNS Neurol Disord Drug Targets*. 20 (2) (2021) 145-157, <https://doi.org/10.2174/1871527319666201207211927>.
- [14] C.A. MacRae, R.T. Peterson, Zebrafish as tools for drug discovery. *Nat Rev Drug Discov*. 14(10) (2015) 721-731, <https://doi.org/10.1038/nrd4627>.
- [15] M. Westerfield, *The zebrafish book: A guide for the laboratory use of zebrafish (Danio rerio)*, fifth ed., University of Oregon Press, Eugene, Oregon, 2007.
- [16] B.D. Petersen, T.C.B. Pereira, S. Altenhofen, D.D. Nabinger, P.M.A. Ferreira, M.R. Bogo, C.D. Bonan, Antibiotic drugs alter zebrafish behavior, *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol*. 242 (2021) 108936, <https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2020.108936>.
- [17] B.D. Petersen, T.C.B. Pereira, S. Altenhofen, D.D. Nabinger, P.M.A. Ferreira, M.R. Bogo, C.D. Bonan, Antibiotic drugs alter zebrafish behavior, *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol*. 242 (2021) 108936, <https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2020.108936>, <https://doi.org/10.1016/j.vascn.2012.10.003>.
- [18] J. Kanungo, E. Cuevas, S.F. Ali, M.G. Paule, Zebrafish model in drug safety assessment, *Curr Pharm Des*. 20 (34) (2014) 5416-5429, <https://doi.org/10.2174/1381612820666140205145658>
- [19] G. Dal Santo, G.M.M. Conterato, L.J.G. Barcellos, D.B. Rosemberg, A.L. Piato, Acute restraint stress induces an imbalance in the oxidative status of the zebrafish brain, *Neurosci Lett*. 558 (2014) 103-108. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2013.11.011>.
- [20] A.M. Chahardehi, H. Arsad, V. Lim, Zebrafish as a successful animal model for screening toxicity of medicinal plants. *Plants (Basel)*. 9(10) (2020) 1345, <https://doi.org/10.3390/plants9101345>.
- [21] O.B. Ibitoye, N.O. Aliyu, T.O. Ajiboye, Protective influence of *Phyllanthus muellarianus* on ciprofloxacin-induced neurotoxicity in male rats, *J Diet Suppl*. 17(3) (2020) 321-335, <https://doi.org/10.1080/19390211.2019.1586805>.

- [22] J.F. Agostini, N.L.F. Costa, H.T. Bernardo, S.L. Baldin, N.V. Mendes, K.P. Pickler, M.C. Manenti, E.P. Rico, Ceftriaxone attenuated anxiety-like behavior and enhanced brain glutamate transport in zebrafish subjected to alcohol withdrawal, *Neurochem Res*, 45 (7) 2020(2020) 1526-1535, <https://doi.org/10.1007/s11064-020-03008-z>.
- [23] L.M. Sayre, G. Perry, M.A. Smith, Oxidative Stress and Neurotoxicity, *Chem. Res. Toxicol.* 21 (1) (2008) 172-188, <https://pubs.acs.org/doi/full/10.1021/tx700210j>.
- [24] A. Halaris, Neuroinflammation and Neurotoxicity Contribute to neuroprogression in neurological and psychiatric disorders, *Future Neurology*. 13(2) (2017), 59-69, <https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.2217/fnl-2017-0039>.
- [25] M. Comporti, C. Signorini, S. Leoncini, C. Gardi, L. Ciccoli, A. Giardini, D. Vecchio, B. Arezzini, Ethanol-induced oxidative stress: basic knowledge. *Genes Nutr.* 5 (2) (2010) 101–109, <https://doi.org/10.1007/s12263-009-0159-9>.
- [26] X. Zhou, J. Lu, K. Wei, J. Wei, P. Tian, M. Yue, Y. Wang, D. Hong, F. Li, B. Wang, T. Chen, X. Fang, Neuroprotective effect of ceftriaxone on MPTP-induced Parkinson's disease mouse model by regulating inflammation and intestinal microbiota, *Oxid Med Cell Longev.* (2021) 9424582, <https://doi.org/10.1155/2021/9424582>.
- [27] B. Kaur, A. Prakash, Ceftriaxone attenuates glutamate-mediated neuro-inflammation and restores BDNF in MPTP model of Parkinson's disease in rats, *Pathophysiology*. 24 (2) (2017) 71-79, <https://doi.org/10.1016/j.pathophys.2017.02.001>.
- [28] I. Smaga, D. Ferro, J. Mesa, M. Filip, L.A. Knackstedt, Molecular changes evoked by the beta-lactam antibiotic ceftriaxone across rodent models of substance use disorder and neurological disease. *Neurosci Biobehav Rev.* 115 (2020) 116-130, <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2020.05.016>.
- [29] C.T. Li, K.C. Yang, W.C. Lin, Glutamatergic Dysfunction and Glutamatergic Compounds for Major Psychiatric Disorders: Evidence From Clinical Neuroimaging Studies, *Front Psychiatry*. 9 (2019) 767, <https://doi.org/10.3389/fpsy.2018.00767>
- [30] B. Belsham, Glutamate and its role in psychiatric illness. *Hum Psychopharmacol.* 16 (2) (2001) 139-146, <https://doi.org/10.1002/hup.279>.
- [31] J.Y.M. Roman, C.C. González, Glutamate and excitotoxicity in central nervous system disorders: ionotropic glutamate receptors as a target for neuroprotection, *Neuroprotection*. 2 (2) (2024) 137-150, <https://doi.org/10.1002/nep3.46>.

- [32] S. Kang, J. Li, A. Bekker, J.H. Ye, Rescue of glutamate transport in the lateral habenula alleviates depression - and anxiety - like behaviors in ethanol-withdrawn rats, *Neuropharmacology*. 129 (2017) 47–56, <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2017.11.013>
- [33] C. Lacroix, A.P. Bera-Jonville, F. Montastruc, L. Velly, J. Micallef, R. Guilhaumou, Serious neurological adverse events of ceftriaxone, *Antibiotics (Basel)* 10 (5) (2021) 540, <https://doi.org/10.3390/antibiotics10050540>.
- [34] C. Lacroix, F. Kheloufi, F. Montastruc, Y. Bennis, V. Pizzoglio, J. Micallef, Serious central nervous system side effects of cephalosporins: a national analysis of serious reports registered in the French Pharmacovigilance Database. *J Neurol Sci*. 398 (2019) 196-201, <https://doi.org/10.1016/j.jns.2019.01.018>.
- [35] R.B. Sotto, C.D. Medriano, Y. Cho, H. Kim, I.Y. Chung, K.S. Seok, K.G. Song, S.W. Hong, Y. Park, S. Kim, Sub-lethal pharmaceutical hazard tracking in adult zebrafish using untargeted LC-MS environmental metabolomics, *J Hazard Mater*. 339 (2017) 63-72 <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2017.06.009>
- [36] Y. Zhang, X. Li, Z. Liu, X. Zhao, L. Chen, G. Hao, X. Ye, S. Meng, G. Xiao, J. Mu, X. Mu, J. Qiu, Y. Qian, The neurobehavioral impacts of typical antibiotics toward zebrafish larvae, *Chemosphere*. 340 (2023) 139829, <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2023.139829>.
- [37] H. Kanamaru, F. Kawakita, H. Nishikawa, F. Nakano, R. Asada, H. Suzuki, Clarithromycin ameliorates early brain injury after subarachnoid hemorrhage via suppressing periostin-related pathways in mice. *Neurotherapeutics*. 18 (3) (2021) 1880-90, <https://doi.org/10.1007/s13311-021-01050-5>.
- [38] J. Negrín-González, G. Peralta Filpo, J. L. Carrasco, T. Robledo Echarren, M. Fernández-Rivas. Psychiatric adverse reaction induced by clarithromycin. *Eur Ann Allergy Clin Immunol*. 46 (3) (2014) 114-115.
- [39] K.D. Lenz, K.E. Klosterman, H. Mukundan, J.Z. Kubicek-Sutherland, Macrolides: from toxins to therapeutics, *Toxins (Basel)*. 13 (5) (2021) 347, <https://doi.org/10.3390/toxins13050347>.
- [40] J.S. Bains, J.I. Cusulin, W. Inoue, Stress-related synaptic plasticity in the hypothalamus, *Nat Rev Neurosci*. 16 (7) (2015) 377-388, <https://doi.org/10.1038/nrn3881>.

## 5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os resultados apresentados ao final deste volume são parciais, pois o projeto segue em execução. As amostras coletadas estão armazenadas para posterior análise bioquímica, e esta será realizada assim que o equipamento necessário (centrífuga refrigerada) estiver novamente disponível após o conserto. As hipóteses previam efeitos ansiolíticos (claritromicina/ceftriaxona) e ansiogênicos (ciprofloxacino), mas os resultados não mostraram alterações comportamentais significativas. Essa divergência pode estar relacionada provavelmente à ausência de um modelo de estresse, o qual é capaz de induzir comportamento do tipo-ansiedade e estresse oxidativo, sendo possível investigar possível efeito de prevenção. Destaca-se também que falhas técnicas impossibilitaram a execução tanto das análises bioquímicas como da realização de protocolo de estresse agudo.

Este trabalho representou uma importante etapa no meu desenvolvimento acadêmico, permitindo o aprimoramento da capacidade crítica e metodológica na pesquisa científica. Ao abordar temas relevantes para a medicina baseada em evidências, reforça-se a necessidade de embasar decisões clínicas em dados robustos, contribuindo para a segurança e eficácia terapêutica. Agradeço profundamente a todos que me apoiaram nesta jornada.

Cristine Fagundes

Passo Fundo, 25 de junho de 2025.

## 6 ANEXOS

### ANEXO A – PARECER DE APROVAÇÃO DO CEUA - UFFS



Universidade Federal da Fronteira Sul

Comissão de Ética no  
Uso de Animais

#### CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "INVESTIGAÇÃO DOS EFEITOS DE ANTIBIÓTICOS SOBRE PARÂMETROS COMPORTAMENTAIS E DE ESTRESSE OXIDATIVO EM PEIXES-ZEBRA", protocolada sob o CEUA nº 2517121223 (ID 000682), sob a responsabilidade de **Riciéri Naue Mocelin e equipe; Cristine Somavilla Fagundes** - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **APROVADA** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal da Fronteira Sul (CEUA/UFFS) na reunião de 16/08/2024.

We certify that the proposal "INVESTIGATION OF THE EFFECTS OF ANTIBIOTICS ON BEHAVIORAL PARAMETERS AND OXIDATIVE STRESS IN ZEBRAFISH", utilizing 300 Fishes (males and females), protocol number CEUA 2517121223 (ID 000682), under the responsibility of **Riciéri Naue Mocelin and team; Cristine Somavilla Fagundes** - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **APPROVED** by the Ethic Committee on Animal Use of the Federal University of South Border (CEUA/UFFS) in the meeting of 08/16/2024.

Finalidade da Proposta: Pesquisa (Acadêmica)

Vigência da Proposta: de 01/2024 a 12/2025 Área: Ciências Biológicas

Origem: Não aplicável biotério

Espécie: Peixes

sexo: Machos e Fêmeas

idade: 3 a 6 meses

Quantidade: 300

Linhagem: Wild-type (fenótipo short-fin)

Peso: 1 a 1 g

Realeza, 16 de agosto de 2024

Prof. Dra. Fabíola Dalmolin  
Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais  
Universidade Federal da Fronteira Sul

Biol. Cássio Batista Marcon  
Vice-Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais  
Universidade Federal da Fronteira Sul

