



**INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE GENÉTICA E MORFOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA ANIMAL**

Natália Oliveira de Farias

**Avaliação dos efeitos ecotoxicológicos e comportamentais do fármaco
psicotrópico fluoxetina usando o peixe-zebra (*Danio rerio*) como
espécie modelo**

**Brasília – Distrito Federal – Brasil
2018**



**INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE GENÉTICA E MORFOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA ANIMAL**

Natália Oliveira de Farias

**Avaliação dos efeitos ecotoxicológicos e comportamentais do fármaco
psicotrópico fluoxetina usando o peixe-zebra (*Danio rerio*) como
espécie modelo**

Dissertação apresentada ao curso de Pós-graduação em Biologia Animal da Universidade de Brasília – UnB como parte dos requisitos para obtenção do grau de mestre.

Orientador: Prof. Dr. Cesar Koppe Grisolia

Co-orientador: Prof. Dr. Rhaul de Oliveira

**Brasília – Distrito Federal – Brasil
2018**

BANCA EXAMINADORA

Orientador: Prof. Dr. Cesar Koppe Grisolia (Universidade de Brasília – UnB)

Co-orientador: Prof. Dr. Rhaul de Oliveira (Universidade Estadual de Campinas – UNICAMP)

Profa. Dra. Márcia Renata Mortari (Universidade de Brasília – UnB)

Profa. Dra. Mariana Furio Franco Bernardes (Universidade de Brasília – UnB Campus Ceilândia)

Dedico este estudo a:

Minha família que sonhou comigo este sonho, me deram as mãos e caminharam do meu lado diariamente.

Aos meus amigos da vida que se encheram de paciência para me ouvir falar sobre a biologia e a paixão que sinto por esse tema e compartilharam grandes momentos comigo.

E aos meus professores, mestres do saber que foram capazes de despertar importantes mudanças em mim.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Universidade de Brasília (UnB) por ter me acolhido durante todos esses anos, por ter sido casa e espaço de doces aprendizados, onde pude compartilhar momentos com pessoas incríveis que me ajudaram a crescer e me fizeram percorrer novos e lindos caminhos.

Um agradecimento especial à Universidade de Aveiro (UA) que me ofereceu toda a infraestrutura necessária para que eu desenvolvesse parte do meu trabalho e onde tive a oportunidade de conhecer e reencontrar pessoas muito queridas. Desta forma, já deixo meu muito obrigada à Dra. Inês Domingues, Mayara Pereira Soares e Rita Bicho que me receberam com tanto carinho que houve momentos onde me pegava perdida em pensamentos, pois já me sentia acolhida como se estivesse em casa. Portugal não teria sido igual sem vocês.

Este projeto não teria sido possível sem o apoio financeiro da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), na concessão da bolsa de mestrado, portanto desde já, meus sinceros agradecimentos.

Agradeço ao meu orientador Dr. Prof. César Koppe Grisolia que desde cedo, abriu as portas do laboratório de genética toxicológica para que eu pudesse ali iniciar meus primeiros passos em direção a um futuro ainda cheio de vontades e expectativas, ao meu co-orientador, amigo, Dr. Rhaul de Oliveira que é a verdadeira expressão de “me virar ao avesso”, me trouxe frescor, sonhos, novidades e me despertou para uma vida cheia de desafios, meu muito obrigada, por tudo.

Muitíssimo obrigada aos tantos amigos que fiz e que já estão acolhidos dentro do coração. Reginaldo, Jéssica e Diego que chegaram no momento certo, no lugar

certo e foram base de sustento, foram meu início. Muriel, por ter estado ali todas as vezes, me ajudando, conversando, desabafando, rindo e rindo muito. Carol, por ser assim, leve, meiga e de um coração tão lindo que transborda. Pedro, Bryan, Alane, Arthur e Juliana, por terem sido sempre prestativos e mostrarem companheirismo frente a tantos testes. Dra. Thayres Andrade, Dra. Joana Mona e Dra. Patrícia N. Moretti por serem mulheres incríveis, que transpiram inspiração, coragem e paixão pelo o que fazem, foram essenciais na minha formação como bióloga e mais ainda como pessoa. Niedja e Vitória por serem tão opostas entre si e mais ainda de mim, me mostraram como é bom estar perto de pessoas com pensamentos de mundos diferentes e como é valioso todos os aprendizados que extraímos desses encontros. Ana Clara por ser capaz de me entender com um único olhar ou um gesto simplório e pelas inúmeras caronas que me salvavam do 110.

Agradeço também as amigas irmãs que a vida me deu de presente, Viviani, Érika, Bárbara, Paula e Karina, de quem eu recebi muito carinho, amor e atenção. Foram minhas parceiras desde quando a gente era pequenininha e achava que era gente grande, até hoje, onde somos gente grande e queríamos voltar a ser pequenininhas, meu muito obrigada.

Mais um obrigada a mais um grupo de amigas, agora biólogas, Samantha, minha quase dentista mais bióloga que eu conheço e amo muito, Ana Carla minha amiga do samba, da Chapada, do Axé, do coração e Mariana, amiga e parceira da noite, que fazia todas as disciplinas noturnas comigo, pois compartilhamos a pouca disposição de acordar cedo.

Um obrigado, cheio de carinho ao Ricardo Mucury, amigo, namorado, companheiro, também biólogo, mestre e futuro doutor dos primatas que chegou com toda

sua calma, sabedoria, paciência e me embalou com palavras e abraços de conforto que foram essenciais durante a caminhada.

E aos meus amados pais, Dayse e Júnior e irmão Edu. Para eles o meu mais sincero agradecimento, pois são eles a fonte de tudo que carrego aqui dentro de mim, todo o apoio, as conversas sobre as conquistas e os tombos da vida, toda a experiência que eles carregam naqueles braços cheios de amor que nunca falharam em me abraçar e trazer a paz e o aconchego que várias vezes precisei. E Edu por ser o irmão caçula mais genial que eu poderia ter.

A todos vocês, pessoas mais que especiais, meu muito obrigada!

“Nada na vida deve ser temido, somente compreendido. Agora é hora de compreender mais para temer menos.”

Marie Curie

RESUMO

Os fármacos são atualmente considerados contaminantes emergentes, devido à sua constante detecção nos ecossistemas aquáticos, consequência do aumento na sua produção, diversificação e consumo. A fluoxetina (FLX) é um dos fármacos antidepressivos mais prescritos no mundo, sendo utilizada principalmente no tratamento de doenças como: depressão, transtorno de ansiedade, transtorno obsessivo compulsivo e bulimia. Embora as concentrações destes fármacos sejam detectadas no meio ambiente em concentrações baixas que variam de ng/L-µg/L, essas podem causar efeitos na biota aquática. Desta forma, o presente estudo apresenta como objetivo avaliar os efeitos agudos e crônicos da FLX em *Danio rerio*, incluindo seus desdobramentos no desenvolvimento, fisiologia, comportamento, bioquímica e na organização tecidual. Foram realizados testes baseados nas normas da OECD n. 236 e 215, com embriões e juvenis do *Danio rerio*, respectivamente. Esses incluíram múltiplos parâmetros como, sobrevivência, desenvolvimento, crescimento, comportamento, micronúcleo e anormalidades nucleares, atividade da acetilcolinesterase e histologia. Através do teste de toxicidade com embriões de peixe, obteve-se um valor de 168 h-CL₅₀ de 1,18 mg/L. Além disso, foi possível observar atraso da eclosão e perda de equilíbrio em concentrações > 100 µg/L. Por outro lado, os efeitos sobre a atividade locomotora e da acetilcolinesterase foram encontrados em 0,88 e 6 µg/L, respectivamente. A exposição crônica à FLX alterou o crescimento dos juvenis de *D. rerio*. Os peixes expostos a maior concentração de FLX (100 µg/L) apresentaram uma maior taxa de crescimento. No 15º dia de exposição, observaram-se alterações no tempo do primeiro ataque ao alimento e no tempo total de consumo do alimento disponível na concentração de 100 µg/L. Foi possível também, observar a preferência dos peixes pela camada superior do aquário nas concentrações mais altas (10 e 100 µg/L), um indicativo de inibição do nível de estresse e efeito ansiolítico. Não foram detectadas anomalias nucleares eritrocíticas, indicadores de genotoxicidade. Órgãos como o fígado e o intestino tiveram sua morfologia alterada, em concentrações tão baixas quanto 0,1 µg/L. Em suma, os dados obtidos neste trabalho sugerem que a FLX é neurotóxica para os estágios iniciais de vida de *D. rerio*, em um curto período de tempo e a longo prazo, a exposição à FLX, em microgramas por litro, afeta a morfologia do *D. rerio* juvenil, podendo comprometer as funções vitais dos órgãos, e altera comportamentos ecologicamente relevantes para a sobrevivência dos peixes.

Palavras chave: Ecotoxicologia, antidepressivo, peixe-zebra, toxicologia aquática

ABSTRACT

Pharmaceuticals residues are currently considered environmental contaminants due to their constant detection in aquatic ecosystems, as a consequence of the increase in their production, diversification and consumption. Fluoxetine (FLX) is one of the most commonly prescribed antidepressant drugs in the world. It is used mainly in the treatment of diseases such as: clinical depression, anxiety disorder, obsessive compulsive disorder and bulimia. Although concentrations of these drugs are detected in the environment in ranges ranging from ng/L to µg/L, relatively low concentrations, they may cause effects on aquatic biota. Thus, the main objective of this study is to evaluate the effects of acute and chronic exposure of *Danio rerio* to FLX, including its developmental, physiological, behavioral, genomic, and tissue organization. Tests based on OECD standards n. 236 and 215 which included multiple parameters such as survival, development, growth, behaviour, genomic, micronucleus and nuclear abnormalities, acetylcholinesterase activity and histology. Through the toxicity test with fish embryos, a value of 168 h-LC₅₀ of 1.18 mg/L was obtained. In addition, it was possible to observe hatch delay and loss of equilibrium at concentrations > 100 µg/L. On the other hand, the effects on locomotor activity and acetylcholinesterase were found at 0.88 and 6 µg/L, respectively. Chronic exposure to FLX altered the juvenile growth of juvenile *D. rerio*. Fish exposed to a higher concentration of FLX (100 µg/L) presented a higher growth rate. Alterations in the time of the first food intake and in the total time feeding were observed in concentration of 100 µg/L, on the 15th day of exposure. It was also possible to observe the fish preference for the upper aquarium layer at the highest concentrations (10 and 100 µg/L), an indication of inhibition of the stress level, anxiolytic effect. No erythrocytic nuclear abnormalities or micronuclei, genotoxicity indicators, were detected. Organs such as liver and intestine had their morphology altered, at concentrations as low as 0.1 µg/L. In summary, the data obtained in this work suggest that FLX is neurotoxic to the initial stages of *D. rerio* life in a short period. Long-term exposure to FLX (µg/L) affects morphology of juvenile *D. rerio*, which may compromise the vital functions of the organs, and alter behaviour that is ecologically relevant to fish survival.

Key words: Ecotoxicology, antidepressant, zebrafish, aquatic toxicology

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Visão geral do teste estendido de toxicidade com embriões de peixe-zebra após 168 horas de exposição à FLX	18
Figura 2. Efeitos da FLX no equilíbrio do peixe-zebra em 120, 144 e 168 h de exposição (valor médio \pm erro padrão). A perda de equilíbrio é caracterizada pela posição lateralizada dos peixes no fundo dos poços das microplacas. Os asteriscos denotam significância estatística ($p < 0,05$), # denota concentrações onde ocorreu 100% de mortalidade.....	20
Figura 3. Tempo total de nado (TTN) e distância total percorrida (DTP) após 168 h de exposição à FLX: (A) TTN após 120 h; (B) TTN após 144 h; (C) TTN ap 168 h; (D) DTP após 120 h; (E) DTP após 144 h; (F) DTP após 168 h.....	21
Figura 4. Efeitos da fluoxetina sobre a atividade da colinesterase em embriões de peixe-zebra após 168 h de exposição à FLX (valores médios \pm erro padrão). (A) Ensaio com acetilcolina (ASCh); (B) Ensaio com propionilcolina (PSCh).....	22
Figura 5. Distribuição da sensibilidade de espécies (DSE) de dados de toxicidade a curto prazo para várias espécies de peixes versus concentração de fluoxetina. Triângulo representa dados próprios e os círculos outras espécies de peixes. A linha pontilhada indica limites superior e inferior.....	23
Figura 6. Uma visão geral da Concentração de Efeito Não Observado (CENO) da fluoxetina em parâmetros sub-letais de diferentes espécies de peixes (valores médios \pm erro padrão).....	27
Figura 7. Comparação da sensibilidade dos parâmetros utilizados no presente estudo para avaliar a toxicidade da fluoxetina em embriões de peixe-zebra	28
Figura 8. Box plot da taxa de crescimento específica (% dia ⁻¹) em relação aos tratamentos de FLX (0; 0,01; 0,1; 10 e 100 $\mu\text{g/L}$).3.3.2.....	49
Figura 9. Comportamento de alimentação registrado após 15 e 30 dias de exposição a FLX. Os resultados são mostrados para o tempo para a primeira ação de alimentação e tempo para ingestão total de alimentos.....	50
Figura 10. Comportamento de nado registrado após 30 dias de exposição à FLX. Os resultados são apresentados para a % de tempo que os peixes gastam em cada camada do aquário	51
Figura 11. Endpoint de genotoxicidade após exposição crônica a FLX (0; 0,01; 0,1; 1; 10 e 100 $\mu\text{g/L}$). Os valores representam a média \pm erro padrão de micronúcleos e outras	

anormalidades nucleares (núcleos “blebbed”, lobado, broto, “notched”, binucleada e segmentada)..... 52

Figura 12. Alterações morfológicas do fígado de *Danio rerio*. (A) FLX 0,0 µg/L, seta preta indicando hepatócito normal. (B) FLX 0,01 µg/L, diminuição do glicogênio (dg). (C) FLX 0,1 µg/L, ruptura de vaso sanguíneo (rv), atipia do contorno celular (acc). (D) FLX 1 µg/L, degeneração dos canalículos biliares (dc). (E) FLX 10 µg/L, hiperemia (hip), ruptura de vasos sanguíneos (rv). (F) FLX 100 µg/L, degeneração dos canalículos biliares (dc)..... 57

Figura 13. Morfologia da porção inicial do intestino de *Danio rerio*. (A) Medida de altura da vilosidade (av); célula de muco (cm). (B) Medida de altura do epitélio (ae); célula de muco (cm), coloração de HE. 58

Figura 14. Comparação da sensibilidade dos parâmetros utilizados no presente estudo para avaliar a toxicidade da fluoxetina em embriões/larvas e juvenis de *Danio rerio*... 82

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Percentual de eclosão de embriões de peixe-zebra durante 96 horas de exposição à FLX.....	19
Tabela 2. Classificação das alterações histológicas do fígado de <i>Danio rerio</i>	53

LISTA DE TERMINOLOGIA: UNIDADES, ABREVIATURAS E ACRÓNIMOS

5-HT_{1A} – Receptor de Serotonina 1A

AChE - Acetilcolinesterase

ANOVA – Análise de variância

ARN – Ácido ribonucleico, *do inglês Ribonucleic Acid (RNA)*

ASCh – Acetiltiocolina

CAS – Chemical Abstracts Service (database website)

CE – Concentração de efeito

CENO – Concentração de efeito não observado

ChE - Colinesterase

CL – Concentração letal

DA – Dopamina

DSE - Distribuição da sensibilidade das espécies, *do inglês Sensitive Species Distribution (SSD)*

DTNB – 5,5-dithio-bis-(2-nitrobenzoic acid)

DTP – Distância Total Percorrida

ETE – Estação de tratamento de esgoto, *do inglês Sewage treatment plant (STP)*

EUA – Estados Unidos da America, *do inglês United States of America (USA)*

FDA – Food and Drug Administration

FLX – Fluoxetina

HE - Hematoxilina & Eosina

HC - Hazardous Concentration

HPLC - High performance liquid chromatography

ISO - International Organization for Standardization

ISRS – Inibidor Seletivo da Recaptação de Serotonina, *do inglês Selective Serotonin Reuptake Inhibitor (SSRI)*

LOEC - Low Effective Concentration

MN – Micronúcleo

NE – Noradrenalina

OECD - Organization for Economic Co-operation and Development

ONU – Organização das Nações Unidas

PSCh - Propionilticolina

PBS – Tampão fosfato, *do inglês Phosphate Buffered Saline*

PMS – Post Mitochondrial Supernatant

SERT – Proteína transportadora de serotonina

TTN – Tempo Total de Nado

TEP – Teste de toxicidade com embriões de peixe, *do inglês Fish Embryo Toxicity (FET) test*

UnB - Universidade de Brasília

USEPA - United States Environmental Protection Agency

ZEB – Zebra Box

SUMÁRIO

Capítulo 01 - Fluoxetina no meio ambiente	1
1.1. Fluoxetina no ambiente aquático	1
1.2. Modelo do peixe-zebra	5
1.3. Justificativa	Error! Bookmark not defined.
1.4. Objetivos	6
1.4.1. Objetivos específicos	6
Capítulo 02 - Avaliação da toxicidade aguda da fluoxetina em embriões de <i>Danio rerio</i>	8
2.1. Introdução	9
2.2. Material e métodos	11
2.2.1 Químico	11
2.2.2 Análise Cromatográfica	11
2.2.3 Organismo de teste	12
2.2.4 Teste de toxicidade com embriões de peixe (TEP)	13
2.2.5 Teste de comportamento locomotor	14
2.2.6 Análise de biomarcadores	14
2.2.7 Análise estatística	16
2.2.8 Distribuição de sensibilidade das espécies (DSE)	16
2.3. Resultados	17
2.3.1 Teste de toxicidade com embriões de peixe-zebra	17
2.3.2 Comportamento locomotor	20
2.3.2 Biomarcadores	22
2.4. Discussão	22
2.5. Conclusão	29
Capítulo 03 - Avaliação dos efeitos crônicos da exposição à fluoxetina, utilizando <i>Danio rerio</i> como espécie modelo	39
3.1. Introdução	39
3.2. Material e Métodos	41
3.2.1. Químico	41

3.2.2. Organismos.....	42
3.2.3. Exposição crônica.....	42
3.2.4. Teste comportamental.....	43
3.2.5. Micronúcleo.....	43
3.2.6. Análise histopatológica	44
3.2.7. Análise estatística	47
3.3. Resultados	48
3.3.1. Taxa de crescimento	48
3.3.3. Comportamento natatório.....	50
3.3.4. Micronúcleo.....	51
3.3.5. Histopatologia.....	53
3.4 Discussão	58
3.4.1. Crescimento	59
3.4.2. Comportamento natatório e alimentar	61
3.4.3. Micronúcleo.....	63
3.4.4. Histopatologia.....	64
3.5. Conclusão	66
Capítulo 04 - Considerações finais e perspectivas futuras	81
Anexos e apêndices	98

Apresentação da dissertação

A Fluoxetina (FLX) é um fármaco de uso psiquiátrico com ocorrência registrada em rios, lagos, estuários e no tecido de organismos aquáticos em diferentes regiões do planeta. Como uma molécula empregada no tratamento de depressão pode ser encontrada em todos esses compartimentos ambientais? Vertebrados aquáticos, ao entrar em contato com a FLX, também têm a sua fisiologia regulada, como ocorrem com os seres humanos? Se sim, em quais concentrações? Quais são as possíveis consequências para a saúde ambiental? O que pode ser feito para minimizar os possíveis danos ecológicos? Estas e muitas outras perguntas sobre a FLX no meio ambiente têm recebido atenção de diversos pesquisadores em ecotoxicologia. Entretanto, apesar dos muitos estudos já realizados na área, ainda há muito a ser desvendado.

O intuito do presente trabalho é contribuir para a caracterização dos efeitos da FLX em populações de peixes-zebra. Desse modo, foram empregadas diversas metodologias com embriões e juvenis de peixe-zebra (*Danio rerio*), os resultados obtidos foram analisados e discutidos. Para facilitar a compreensão de cada etapa do trabalho realizado, esta dissertação de mestrado está dividida em 03 capítulos:

Capítulo 01 - Contextualização, justificativa e objetivos da dissertação: esta seção aborda a questão dos poluentes emergentes no meio ambiente, incluindo os medicamentos psiquiátricos, especialmente a fluoxetina.

Capítulo 02 - Teste agudo: exposição a baixa concentração de fluoxetina afeta o desenvolvimento, atividade locomotora e os neuromarcadores de embriões de peixe-zebra.

Capítulo 03 - Teste crônico: Este capítulo apresenta a análise dos efeitos tóxicos da fluoxetina, em um período de exposição de 30 dias, usando o organismo modelo *Danio*

rerio, avaliou-se parâmetros tais como: crescimento, mudanças no comportamento de alimentação e nado, efeitos mutagênicos e genotóxicos e alterações histológicas.

Capítulo 01 - Fluoxetina no meio ambiente

1.1. Fluoxetina no ambiente aquático

Os fármacos utilizados tanto na medicina humana quanto na veterinária representam hoje um grupo de contaminantes emergentes nos ecossistemas aquáticos. Os contaminantes emergentes são conhecidos por serem produtos químicos naturais ou produzidos pelo ser humano que já foram detectados em vários compartimentos ambientais e cuja toxicidade ou persistência são susceptíveis de alterar o metabolismo de seres vivos (Sauvé and Desrosiers, 2014). Sabe-se que a entrada dos fármacos nas matrizes ambientais ocorre principalmente através de efluentes de estações de tratamento de esgoto (ETEs) (Calisto; Esteves, 2009) culminando na contaminação de estuários, lagos, rios, águas superficiais e subterrâneas, sedimentos e, até mesmo, água tratada para consumo humano (Fent et al., 2006; Gonzalez Alonso et al., 2010), em concentrações que variam de ng/L - µg/L (Hernando et al., 2006). Ao todo, resíduos farmacêuticos já foram detectados nas matrizes ambientais de 71 países que abrangem os 5 grupos regionais da Organização das Nações Unidas (ONU) (Aus der Beek et al., 2015a).

Os fármacos são projetados para interagir com alta afinidade com alvos biológicos humanos específicos, como por exemplo receptores celulares e enzimas. (Margiotta-casaluci et al., 2014). Estes alvos podem ser evolutivamente conservados e funcionais também em organismos aquáticos, especialmente em peixes (Gunnarsson et al., 2008), sugerindo que a interação do fármaco com alvos biológicos pode teoricamente levar a um efeito farmacológico indesejado e potencialmente tóxico em espécies não-alvo presentes nos ecossistemas. A partir desta ideia, pressupõe-se que uma interação específica entre um fármaco e um alvo celular poderá resultar em uma resposta fisiológica antes mesmo de apresentar algum efeito tóxico, para isso exigirá uma concentração

plasmática semelhante àquela necessária para causar um efeito farmacológico em seres humanos, teoria conhecida como “*Read-Across Hypothesis*” (Rand-weaver et al., 2013).

As moléculas ativas dos fármacos passam por vários mecanismos de biotransformação que terminam em sua eliminação (Besse et al., 2008). No caso dos fármacos psicotrópicos, as moléculas podem levar mais tempo para serem metabolizadas no corpo, devido à duração do tratamento que pode se estender durante anos. Além disso, estas moléculas ativas também podem ser persistentes no meio ambiente, levando em consideração fatores, tais como: a entrada constante dos contaminantes via efluentes e, por vezes, a baixa degradação biológica e química (meia-vida) de algumas moléculas ativas nas águas.

Os antidepressivos estão entre os medicamentos mais comumente detectados no ambiente aquático (Fong e Ford, 2014). Estes, são fármacos desenvolvidos para tratar doenças como transtorno depressivo, transtorno obsessivo-compulsivo, transtorno de pânico (Halford et al., 2005). Uma ampla gama de antidepressivos são comercializados atualmente, incluindo alguns dos compostos tricíclicos prescritos mais antigos (ex. amitriptilina), os inibidores seletivos da recaptção da serotonina (ex. fluoxetina), os inibidores da recaptção de serotonina e norepinefrina (ex. venlafaxina) e os inibidores de recaptção de serotonina e antagonistas ALFA-2 (ex. trazodona) (Junior et al., 2014; Ford e Fong, 2015).

A fluoxetina foi o primeiro Inibidor Seletivo da Recaptção de Serotonina (ISRS) comercializado no mundo. Desde então, vem sendo utilizado para o tratamento de transtorno depressivo, transtorno de ansiedade, transtorno obsessivo-compulsivo e transtorno alimentar (Rossi et al., 2004). Desde a sua descoberta em 1975, e aprovação para comercialização pela Food and Drug Administration (FDA) em 1987, a FLX tornou-

se um dos antidepressivos mais amplamente prescritos, ficando entre os cinco principais fármacos psiquiátricos prescritos em 2011 (Grohol, 2018).

A FLX atua modulando a serotonina, também denominada 5-hidroxitriptamina (5-HT) que é um dos neuromoduladores mais importantes e presente em diversos metazoários, atua como neurotransmissor ou hormônio dependendo da sua localização sendo um modulador comum do comportamento animal. Durante a estimulação nervosa, a serotonina é liberada no neurônio pré-sináptico terminal e se liga reversivelmente ao receptor de 5-HT do neurônio pós-sináptico (Bossus et al., 2014). Após a liberação do receptor, a 5-HT é reciclada de volta para o neurônio pré-sináptico através da recaptação do transportador de serotonina. Sabe-se que a FLX é um inibidor potente e altamente seletivo do transportador da recaptação da serotonina no neurônio pré-sináptico, provocando um aumento nas concentrações de serotonina na fenda sináptica em vertebrados (Costagliola et al., 2008). Assim, a contaminação dos ecossistemas aquáticos é particularmente preocupante, dado que alguns organismos podem ser expostos de forma contínua ao longo da vida à FLX, portanto é importante verificar os impactos à curto e longo prazo desses compostos no desenvolvimento, sobrevivência e comportamento dos organismos aquáticos.

As concentrações de ISRS medidas no ambiente, incluindo a FLX e do seu metabolito ativo de fase I, norfluoxetina que possui atividade farmacológica semelhante e equipotente ao seu composto parental estão, na sua maioria, na gama de ng/L (Besse et al., 2008). Em um estudo realizado por Metcalfe et al. (2003), a FLX foi detectada a uma concentração referente a 46 ng/L em águas superficiais do rio *Little River* no Canadá. Kolpin et al. (2002) e Vanderford e Snyder (2006), por outro lado, registraram concentrações de FLX, iguais a 12 e 2,6 ng/L, em águas superficiais do rio do Colorado nos EUA.

Por fim, a serotonina influencia em muitos parâmetros biológicos, como crescimento, reprodução, percepção visual e comportamento (Campos et al., 2016). Ademais, é responsável por regular vários processos fisiológicos e comportamentais importantes, incluindo medo e ansiedade, agressão, locomoção e alimentação (Barry, 2013).

Brooks et al. (2003) propôs um estudo de toxicidade da FLX utilizando uma ampla gama de espécies aquáticas, porém sem utilizar parâmetros específicos do modo de ação do fármaco. Atualmente, já existem estudos que se aprofundam a fim de compreender, principalmente, as implicações fisiológicas e comportamentais das possíveis alterações causadas pela exposição a FLX (Brodin et al., 2014; Stewart, A.M., 2014). Nos últimos 5 anos, tem se observado o aumento no número de estudos com o objetivo de avaliar os efeitos da FLX em vertebrados e invertebrados aquáticos (ex. alteração de padrões comportamentais). A maioria dos estudos com invertebrados tem como foco a avaliação da reprodução e dos efeitos de crescimento, mas poucos conjuntos de dados estão disponíveis para elucidar os efeitos comportamentais. (Bossus et al., 2014). Bossus et al. (2014) realizou estudos com um crustáceo, *Echinogammarus marinus*, sob exposição aguda (1h, 24h e 192h) à concentrações que variavam de 0,001 a 1 µg/L de FLX. Seus resultados indicaram que o comportamento e a expressão gênica do crustáceo podem ser modulados em concentrações de FLX tão baixas quanto 0,001µg/L. Para avaliar os efeitos da FLX nos vertebrados, Barry (2013) and Forsatkar et al. (2014) avaliaram o comportamento natatório e agressividade de duas espécies de peixes, *Aphanius dispar* e *Betta splendens*, respectivamente. Ambos selecionaram concentrações de exposição ambientalmente relevantes, ou seja, na mesma faixas das concentrações encontradas em amostras de águas superficiais, (0,003 à 3 µg/L para *A. dispar* e 0,54 µg/L para *B. splendens*). Os resultados desses estudos, indicaram que a FLX diminuiu

significativamente o comportamento de agressão do *Aphanius dispar* na maior concentração de exposição, igual a 3 µg/L e o *B. splendens* teve seu comportamento de defesa territorial alterado na concentração igual a 0,54 µg/L.

1.2. Modelo do peixe-zebra

No presente estudo, o peixe-zebra foi escolhido como modelo animal para avaliar a toxicidade do fármaco psiquiátrico fluoxetina. Os peixes e, em particular, o peixe-zebra, têm um papel de destaque como vertebrado modelo para estudar os mecanismos de toxicidade aguda e crônica de químicos, incluindo testes moleculares e comportamentais. Seu uso se dá devido a conservação evolutiva de genes e vias de neurotransmissão, presentes também em mamíferos (Margiotta-casaluci et al., 2014).

O peixe-zebra é um pequeno ciprinídeo do Sudeste Asiático (~ 3 cm) com uma ocorrência natural em países como Índia, Butão e Bangladesh (Engeszer et al., 2007). O uso do peixe-zebra apresenta inúmeras vantagens na pesquisa científica (Egan et al., 2009). Na última década, novas técnicas e protocolos para avaliar a toxicidade com peixe-zebra foram desenvolvidos principalmente com embriões. Entre as principais vantagens na utilização do peixe-zebra, temos: (1) Facilidade no cultivo de todos os estágios da vida no laboratório; (2) alto desempenho reprodutivo com abundante nascimento; (3) os embriões são translúcidos, permitindo a avaliação do desenvolvimento embrionário e teratologias; (4) tamanho pequeno, que permite o cultivo em espaços confinados; (5) alta similaridade de órgão, vias metabólicas (por exemplo, estresse oxidativo, neurológico, desintoxicação) e genoma com outros vertebrados (Klüver, 2015).

Tanto o embrião do peixe-zebra, assim como o organismo adulto são utilizados atualmente para melhor compreender a função cerebral, a disfunção e a modulação genética e farmacológica. (Kalueff et al., 2014). São organismos sensíveis a fármacos de

uso psiquiátrico e são capazes de responder, a nível molecular, de forma semelhante aos seres humanos (Gunnarsson et al., 2008; Waugh et al., 2014). Assim, o uso do peixe-zebra é uma importante ferramenta que permite avanços tanto no campo da neurociência quanto na toxicologia ambiental. Estes representam um modelo animal apropriado para avaliação da toxicidade e para responder os desafios crescentes deste campo.

Em resumo, estudos tem demonstrado que as baixas concentrações de fármacos detectadas em amostras ambientais são suficientes para causar efeitos adversos em funções biológicas de organismos aquáticos não-alvos. A FLX continua sendo amplamente consumida devido sua eficiência no tratamento da depressão e ansiedade. A frequente detecção deste composto químico nas matrizes ambientais e no tecido de organismos aquáticos indica sua ampla ocorrência, comprometendo a qualidade da água e a saúde de organismos não-alvo. Poucos estudos avaliam os efeitos da FLX em padrões comportamentais do *Danio rerio*, tanto em ensaios agudos, quanto crônicos, além de que as implicações da exposição crônica a FLX permanecem em grande parte desconhecidas. Em vista disto, os resultados do presente estudo auxiliarão na caracterização dos efeitos da FLX no meio ambiente. Sendo assim uma contribuição importante para a uma futura avaliação do risco da FLX para ecossistemas aquáticos.

1.3.Objetivos

Avaliar os efeitos da fluoxetina para exposição aguda e crônica no peixe-zebra, incluindo seus desdobramentos no desenvolvimento embrionário, sobrevivência, crescimento, marcadores bioquímicos e genéticos, organização tecidual e comportamento.

1.3.1. Objetivos específicos

Avaliar:

- a toxicidade letal da fluoxetina (CL_{50}) e os efeitos no desenvolvimento do peixe-zebra (CE_{50}), através do teste de toxicidade com embriões de peixe (TEP);
- as alterações no comportamento natatório dos embriões, utilizando a técnica do zebrabox
- a atividade da acetilcolinesterase (AChE), através de testes bioquímicos;
- o crescimento e os padrões de comportamento de alimentação e nado de organismos juvenis expostos à fluoxetina em um ensaio crônico (30 dias);
- a genotoxicidade da fluoxetina pelo teste de micronúcleo e anormalidade nucleares com *D. rerio* juvenil;
- os efeitos da fluoxetina na formação e estrutura tecidual do fígado e intestino do *D. rerio* juvenil.

Capítulo 02 - Avaliação da toxicidade aguda da fluoxetina em embriões de *Danio rerio*

Aceito para publicação na revista *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology and Pharmacology*.

Resumo

A fluoxetina (FLX) é um antidepressivo inibidor seletivo da recaptação da serotonina (ISRS) amplamente utilizado em clínicas e muito frequentemente encontrado em amostras ambientais de ecossistemas aquáticos urbanos em concentrações que variam de ng/L a µg/L. As populações de peixes podem ser especialmente suscetíveis à FLX, devido à presença de receptores celulares conservados de serotonina. Efeitos neurotóxicos na biota de peixes de corpos d'água poluídos podem ser esperados, mas não há estudos suficientes na literatura atual para elucidar essa hipótese. Uma bateria de ensaios com embriões de peixe-zebra foi realizada para avaliar os potenciais efeitos da exposição à FLX, incluindo concentrações ambientalmente relevantes. Os parâmetros avaliados incluíram sobrevivência, desenvolvimento, comportamento e marcadores bioquímicos neuronais. Em relação à toxicidade aguda, foi obtido um valor de 168 h - CL₅₀ de 1,18 mg/L. Além disso, foram observados atraso na eclosão e perda de equilíbrio, mas em um nível de concentração muito maior do que a concentração detectada de FLX no ambiente aquático (> 100 µg/L). Por outro lado, os efeitos sobre a atividade locomotora e acetilcolinesterase foram encontrados em 0,88 e 6 µg/L, respectivamente. Em conjunto, estes resultados sugerem que a FLX é neurotóxica para os estágios iniciais da vida do peixe-zebra, em um curto período de tempo, causando mudanças em importantes atributos ecológicos que provavelmente podem ser vinculados do nível molecular ao nível populacional.

Palavras-chave: *Danio rerio*; embriotoxicidade, biomarcadores, ISRS, fármacos, neurotoxicidade, peixes, ecossistemas aquáticos, poluentes emergentes.

2.1. Introdução

Os fármacos são um grupo de compostos altamente diversificado, amplamente utilizados e não totalmente eliminados dos efluentes domésticos pelos atuais métodos de tratamento de efluentes (Aus der Beek et al., 2015a). Muitos deles são frequentemente detectados em águas superficiais, com concentrações medidas variando de ng/L a µg/L (Hernando et al., 2006). A contaminação da água por resíduos farmacêuticos tem sido atribuída principalmente à descarga constante de efluentes domésticos tratados ou não tratados no recebimento de corpos de água (Heberer, 2002). Os fármacos psicotrópicos estão entre os compostos mais utilizados e detectados nos ecossistemas aquáticos, mas seu risco potencial para a biota aquática é uma preocupação crescente, uma vez que estudos recentes relataram mudanças comportamentais em espécies aquáticas, especialmente em peixes, expostos a concentrações ambientalmente relevantes (Ford and Fong, 2015).

A fluoxetina (FLX) foi o primeiro antidepressivo utilizado no tratamento da depressão. Atualmente, a FLX também é utilizada no tratamento de transtorno obsessivo-compulsivo, transtorno de pânico e transtorno alimentar (Messiha, 1993). Pertencente ao grupo de inibidores seletivos da recaptação de serotonina, este antidepressivo é um potente inibidor seletivo do transportador para a recaptação de serotonina no neurônio pré-sináptico, aumentando as concentrações de serotonina nas fendas sinápticas (Costagliola et al., 2008).

Descoberto em 1975 e aprovada para comercialização pela Food and Drug Administration (FDA) em 1987, a FLX tem sido um dos antidepressivos mais prescritos em todo o mundo (Stewart, A.M., 2014). Consequentemente, a FLX foi detectada em amostras

ambientais aquáticas em concentrações que variam de ng/L a µg/L (Kolpin et al., 2002; Lister et al., 2009; Metcalfe et al., 2003; Weinberger and Klaper, 2014)

Ao contrário de outros contaminantes, os fármacos são projetados para desencadear uma resposta terapêutica específica em humanos (Fent et al., 2006), mas muitos de seus alvos moleculares também estão presentes em outras espécies ortólogas (Gunnarsson et al., 2008). Assim, efeitos biológicos em organismos não-alvo podem ser esperados. Por exemplo, a FLX tem sido descrita como neurotóxica para organismos aquáticos, afetando seu sistema nervoso central e causando modulação de neuroreceptores e neurotransmissores, alterações comportamentais, comprometimento reprodutivo e morte (Berg et al., 2013; Weiberger and Kleper, 2014; Weis, 2014). Apesar do crescente número de estudos que sugerem o potencial risco ambiental de fármacos psiquiátricos, os parâmetros para avaliação ecotoxicológica desses compostos não estão claramente definidos, e a ligação entre os efeitos observados e parâmetros ecologicamente relevantes permanece obscura, especialmente para populações de peixes.

O peixe-zebra (*Danio rerio*), em seu estágio inicial de desenvolvimento é amplamente utilizado como organismo modelo para avaliar a toxicidade dos contaminantes ambientais nas populações de peixes (Scholz et al., 2008). A espécie tem muitas vantagens, como genoma sequenciado, desova abundante, rápido desenvolvimento embrionário, embriões transparentes e protocolos disponíveis para avaliação aguda e crônica (ISO, 2007; OECD, 2013; Prieto et al., 2012). Na última década, a avaliação de neuromarcadores comportamentais e bioquímicos de peixe-zebra (ex. colinesterase) tem sido cada vez mais usada como parâmetro para avaliar os efeitos sub-letais de poluentes, demonstrando ser uma

medida sensível e confiável da exposição ao estresse (Domingues et al., 2010; Andrade et al., 2015; Henriques et al., 2015; Klüver, 2015). Ademais, os embriões de peixe-zebra conferem mais uma vantagem no que diz respeito ao uso de animais para investigação científica, uma vez que eles se adequam ao modelo dos 3R's (substituição, redução e refinamento), do inglês (replacement, reduced and refinement) (Baumans, 2004; Lammer et al., 2009).

Neste estudo, uma abordagem integrada foi realizada, usando embriões de peixe-zebra para avaliar a toxicidade a curto prazo de FLX. Os parâmetros selecionados, compreendendo vários níveis organizacionais, foram: i) mortalidade; ii) desenvolvimento embrionário (incluindo atrasos no desenvolvimento e anormalidades); iii) comportamento dos peixes (pela medição da atividade locomotora) e iv) atividade da acetilcolinesterase. Os resultados dos níveis moleculares a populacionais são discutidos, e as ligações entre respostas observadas e parâmetros de relevância ecológica são propostas.

2.2. Material e métodos

2.2.1 Químico

FLX 97% de pureza foi obtida da indústria farmacêutica C & C, Amapá, Brasil (Número CAS: 56296-78-7, fórmula empírica: C₁₇H₁₈F₃NO).

2.2.2 Análise Cromatográfica

Para confirmar a estabilidade da FLX em condições de teste, amostras de soluções de teste foram analisadas usando Cromatografia Líquida de Alta Performance (HPLC Shimadzu-Proeminence). As amostras foram originalmente mantidas na câmara climatizada,

onde todos os testes de toxicidade foram realizados (SL-24 Solab Científica). A estabilidade do FLX na água de diluição e as condições climáticas dos testes foram avaliadas pelo HLPC, seguindo o método descrito por Sabbioni et al., 2004 (**ver detalhes no Material Suplementar-SM1, Figura S1, Tabela S1 - Apêndice 1**).

2.2.3 Organismo de teste

O peixe-zebra foi mantido em aquários com osmose reversa e água filtrada com carvão ativado. Os peixes foram cultivados em uma instalação aquática (ZebTec - Tecniplast, Itália) com um ciclo de fotoperíodo de 12: 12h (claro: escuro) na Universidade de Brasília (Brasil). Os parâmetros da água foram rigorosamente controlados: a temperatura foi mantida a $27,0 \pm 1^\circ\text{C}$, condutividade a $650 \pm 100 \mu\text{S} / \text{cm}$, pH a $7,0 \pm 0,5$ e oxigênio dissolvido $\geq 95\%$ saturação. Essas condições foram mantidas em todos os testes realizados.

Para a obtenção de embriões, grupos de peixes machos e fêmeas, na proporção de 1 : 2, respectivamente, foram colocados em aquários de 10 L, no dia anterior ao teste, separados por uma barreira de acrílico. O fundo dos aquários de desova foram equipados com redes ou cobertos de bolas de gude para evitar a predação dos embriões pelos adultos. No dia posterior, as barreiras foram retiradas pela manhã, cinco minutos antes das luzes da sala de cultivo acenderem, permitindo, assim, o contato entre machos e fêmeas e, conseqüentemente, a desova. Repetando o intervalo de desova entre 30 - 120 min, os peixes adultos foram recolhidos e devolvidos para o sistema de cultivo. A água dos aquários foi filtrada por uma peneira para a separação dos ovos, os quais foram lavados para remoção de restos de fezes e alimento. Os ovos de peixe-zebra foram coletados imediatamente após o acasalamento natural, lavados em água e verificados sob um estereomicroscópio (Microscópio de Zoom

Estereoscópico - Stemi 2000, Zeiss, Alemanha). Os ovos não fertilizados e os que apresentavam irregularidades de clivagem ou lesões foram descartados.

2.2.4 Teste de toxicidade com embriões de peixe (TEP)

O teste de toxicidade de embriões de peixe foi baseado no protocolo da OECD 236 “Fish Embryo Toxicity” (FET) (OECD, 2013) com adaptações descritas por Melo et al., (2015). Embriões de peixe-zebra foram expostos a sete diferentes concentrações de FLX (0; 0,01; 0,27; 0,74; 2,02; 5,51; 15,0 mg/L) preparados por diluições sucessivas de solução estoque. O teste foi realizado com 60 ovos por tratamento, divididos em 3 repetições, selecionados e distribuídos em microplacas de 24 poços da câmara climática (SL-24 Solab Científica, Brasil), 20 poços foram preenchidos com 2 mL da solução teste e quatro poços com água (controle da placa interna, conforme exigido pela diretriz da OECD). O teste foi iniciado imediatamente após a fertilização e continuou por 168 horas. Embriões e larvas foram observados diariamente sob um estereomicroscópio. Os parâmetros de desenvolvimento foram avaliados em embriões durante o período de teste, usando uma ampliação de 70 × para ovos e 40 × para embriões eclodidos. Antes da eclosão, foram avaliados os seguintes parâmetros: coagulação do ovo, formação do otólito, atraso geral no desenvolvimento, pigmentação dos olhos e do corpo, formação de somitos, batimentos cardíacos, edemas, descamação da cauda do saco vitelino, absorção do saco vitelino e eclosão. Após a eclosão, a malformações e o equilíbrio (embriões situados no fundo da microplaca após estímulo mecânico) também foram avaliados. Todos os parâmetros foram avaliados e quantificados como observados ou não observados.

2.2.5 Teste de comportamento locomotor

Larvas de peixe-zebra foram utilizadas para avaliar os efeitos do FLX na atividade locomotora. Locomoção foi avaliada para um total de 48 embriões por tratamento (3 réplicas de 16 embriões), incluindo o controle. Os embriões foram expostos a concentrações subletais variando entre 0,0, 8,8, 15,8, 281,2, 500 $\mu\text{g/L}$ de FLX, e análises de comportamento foram realizadas em 120, 144 e 168 h em placas de 96 poços (um embrião por poço). Antes da avaliação do comportamento, larvas ou larvas mortas que apresentavam anormalidades físicas foram descartadas e não incluídas nas análises. O movimento embrionário foi avaliado usando o sistema de rastreamento Zebrabox (ZEB 478 Viewpoint) equipado com uma câmera infravermelha de 25 quadros por segundo durante um período de 20 min. A temperatura foi mantida estável a 26 ± 1 °C. O movimento foi estimulado pela aplicação de luz: intervalos escuros, como descrito anteriormente em Irons et al (2010). Resumidamente, o teste consistiu em aclimatar os embriões à luz durante 5 min, seguido por um período de 10 min de escuridão e outra luz de 5 min. Normalmente, as larvas de peixe-zebra mostram menos locomoção durante os períodos de luz do que no escuro. Para cada réplica, a distância e o tempo de movimento em intervalos de 1 min foram registrados separadamente para cada período de escuro e claro. Os parâmetros comportamentais medidos incluíram a distância total percorrida (DTP) durante cada período de medição e o tempo total de nado (TTN) que as larvas apresentaram movimento.

2.2.6 Análise de biomarcadores

A fim de analisar a atividade da AChE, um biomarcador neuroendócrino, foram realizados testes de toxicidade com embriões de peixe-zebra utilizando uma gama de concentrações subletais que são mais representativas de cenários realistas de exposição

ambiental, nomeadamente 0, 1, 6, 32, 185 e 1053 $\mu\text{g/L}$ de FLX. Os testes foram realizados em copos de 1 L cheios com 500 mL de soluções de teste e 250 ovos. Após 168 horas de incubação, agrupamentos de 15 embriões eclodidos foram coletados em microtubos com 0,5 ml de tampão K-fosfato (0,1 M, pH 7,4), congelados em nitrogênio líquido e imediatamente armazenados a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ até o dia da análise. Antes da medida da atividade enzimática da AChE, as amostras foram descongeladas em gelo, homogeneizadas com sonicador (Ultrasonic Cleaner 2840D-Odontobras) e centrifugadas (Centrífuga Hettich - Mikro 220R) por 20 min a 10.000 g. O sobrenadante pós-mitocondrial resultante (PMS) foi isolado e 40 μl de cada amostra foram pipetados em microplacas de 96 poços para determinações enzimáticas (Jesus et al., 2013).

A atividade da AChE foi determinada utilizando como substrato acetiltiocolina (ASCh) e propioniltiocolina (PSCh), medindo o produto de conjugação entre tiocolina (resultado da degradação de ASCh ou PSCh) e ácido 5,5-ditiobis-2-nitrobenzóico (DTNB) (aumento da absorvância) a 414 nm, a cada 20 s, por 05 min, de acordo com o método previamente descrito por Ellman et al. (1961). Para a determinação enzimática, 40 μl de PMS e 250 μl de mistura reacional (acetilcolina e propionilcolina (75 mM) e DTNB (10 mM)) em tampão K-fosfato (0,1 M, pH 7,2) foram utilizados. As atividades de acetilcolinesterase foram expressas como micromoles de substrato hidrolisado por minuto por mg de proteína (U).

A concentração de proteína das amostras foi quantificada utilizando a metodologia de Bradford a 595 nm e a γ -globulina como padrão (Bradford, 1976). Todas as reações foram

realizadas espectrofotometricamente (leitor de microplacas SpectraMax M2) em quadruplicata.

2.2.7 Análise estatística

As concentrações efetivas (CL_{50} e EC_{50}) foram calculadas usando um modelo logístico de quatro parâmetros. Uma ANOVA unidirecional foi usada para detectar as diferenças entre os grupos para conjuntos de dados distribuídos normalmente. Quando os dados não passaram no teste de normalidade de Kolmogorov-Smirnov e no teste de homogeneidade de variância de Levene, foi realizado um teste de Kruskal-Wallis. Se resultados significativos foram encontrados, o teste de Dunnett ou Dunn (para dados paramétricos ou não paramétricos, respectivamente) foi usado para detectar diferenças significativas entre as concentrações testadas e o controle ($p < 0,05$). Todas as análises foram realizadas utilizando o pacote estatístico Sigma Stat 3.5 (SPSS, 2004).

2.2.8 Distribuição de sensibilidade das espécies (DSE)

A DSE foi realizada com valores de toxicidade (CL_{50}) dos dados experimentais do presente estudo e valores de artigos indexados publicados em periódicos revisados da literatura atual (**Tabela S2, ver material suplementar do apêndice 1**). Dados de toxicidade múltipla para diferentes espécies de peixes foram resumidos como meios geométricos. O gráfico DSE foi gerado usando a planilha da Agência de Proteção Ambiental dos EUA construída sobre o Excel (USEPA, 2016). Uma curva logística (log) foi ajustada aos dados usando regressão não linear. As concentrações de risco previstas para os organismos mais sensíveis de 5% e 50% foram estimadas (HC_5 e HC_{50} , respectivamente).

2.3. Resultados

2.3.1 Teste de toxicidade com embriões de peixe-zebra

Durante as 168 horas de teste, nenhuma mortalidade significativa foi observada para os grupos controle. Além disso, os grupos controle apresentaram desenvolvimento normal, conforme descrito por Kimmel et al. (1995). Uma revisão literária com diferentes espécies de peixes com suas respectivas concentrações de efeito letal para FLX estão resumidas na **Tabela S2, material suplementar do apêndice 1**. A FLX mostrou afetar significativamente a sobrevivência dos embriões apenas após a eclosão, como pode ser observado na **Figura 1**. Em 96 h não foi observada sobrevivência na maior concentração testada. A taxa de sobrevivência dos embriões expostos caiu criticamente após 120 h de exposição com um CL_{50} de 168 h de 1,18 mg/L (**Tabela S2, Fig. 1**).

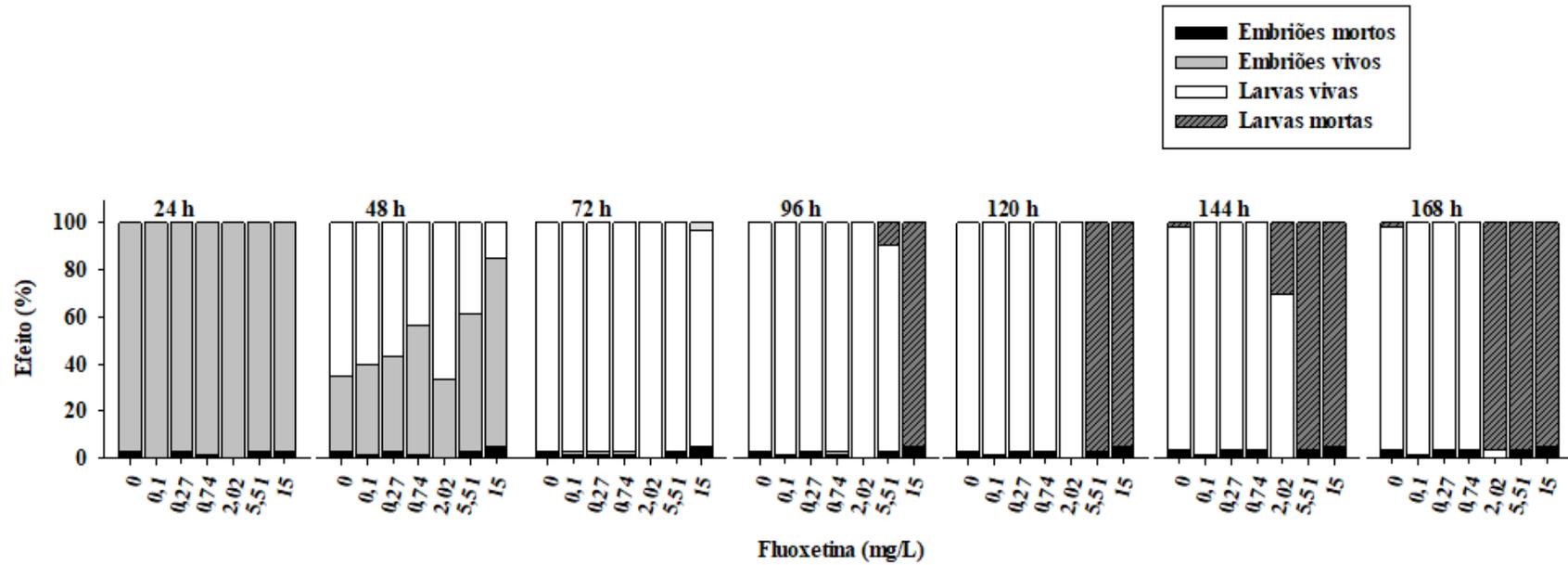
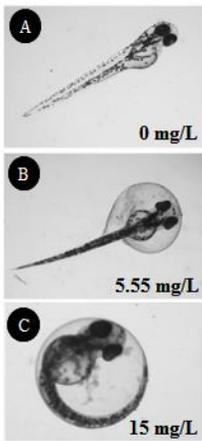


Figura 1. Visão geral do teste estendido de toxicidade com embriões de peixe-zebra após 168 horas de exposição à FLX

Além disso, a FLX afetou significativamente o desenvolvimento de embriões de peixe-zebra, inibindo a eclosão e induzindo perda de equilíbrio. Observou-se uma inibição da resposta à dose para o tempo de eclosão às 48 horas de exposição com um valor de CE_{50} de 8,45 mg / L (**Tabela 1**). Diferenças significativas na eclosão foram observadas apenas para a maior concentração testada (15 mg/L, one-way ANOVA: $F_{6, 20} = 21,74$; $p < 0,001$). Às 48 h, apenas 15% dos embriões eclodiram em comparação com 65% no grupo controle (**Tabela 1**).

Tabela 1. Percentual de eclosão de embriões de peixe-zebra durante 40 e 72 horas de exposição à FLX (valores médios \pm desvio padrão). (A) embriões normais; (B) Embriões parcialmente eclodidos#; (C) embriões não eclodidos

Fluoxetina (mg/L)	48 h	72 h	
0.0	65 (10.4)	100 (0)	
0.1	60 (7.6)	98.3 (1.7)	
0.3	56.7 (1.7)	98.4 (1.6)	
0.7	43.3 (10.9)	98.3 (1.7)	
2.0	66.7 (10.9)	100 (0)	
5.51	38.3 (1.7)	100 (0)	
15	15 (8.7)*	100 (0)	

*Asteriscos denotam diferença estatística quando comparados com o grupo controle ($p < 0.05$).

#Contados como embriões não eclodidos para fins estatísticos e percentuais.

A perda de equilíbrio é representada pelos embriões situados no fundo do poço da microplaca. Este fenótipo foi observado pela primeira vez em 72 h de exposição com efeito significativo na maior concentração testada, de 15 mg/L (one-way ANOVA: $F_{6, 20} = 38,99$; $p < 0,001$). Às 96 h, as concentrações de 2,02 e 5,51 mg/L também afetaram a perda de equilíbrio dos embriões eclodidos (one-way ANOVA: $F_{6, 20} = 38,99$; $p < 0,001$). Os efeitos no equilíbrio aumentaram progressivamente até o final do teste, como pode ser observado na **Figura 2**. Às 120 h, uma perda de equilíbrio ainda foi observada na concentração de 2,02

mg/L (one-way ANOVA: $F_{4, 14} = 19,43$; $p < 0,001$). No entanto, todos os organismos morreram na concentração de 5,51 mg/L. A perda de equilíbrio permaneceu para esta concentração em 144 h e 168 h (ANOVA unidirecional: $F_{1, 10} = 70,32$; $p < 0,001$; ANOVA unidirecional: $F_{6, 20} = 38,99$; $p < 0,001$). Foi determinado um 168 h-EC₅₀ de 1,02 mg/L

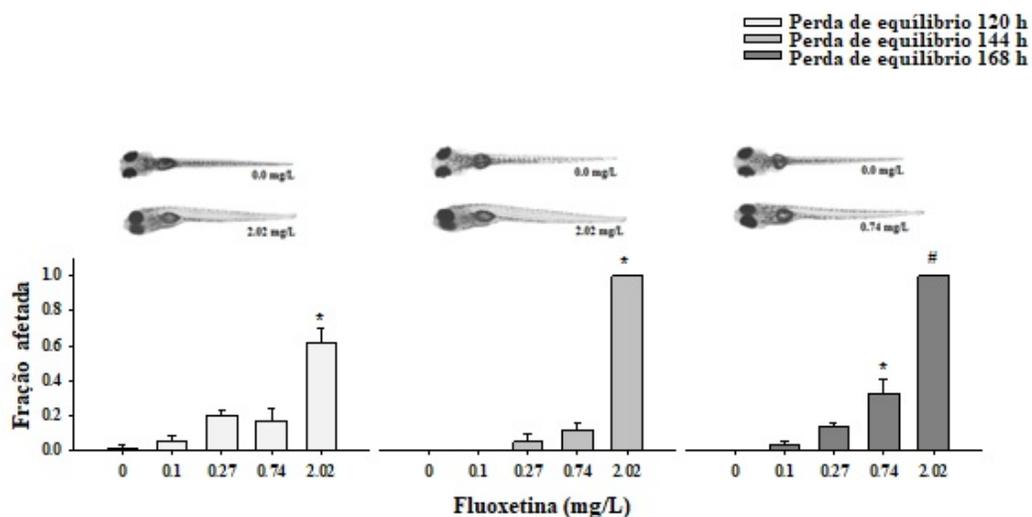


Figura 2. Efeitos da FLX no equilíbrio do peixe-zebra em 120, 144 e 168 h de exposição (valor médio \pm erro padrão). A perda de equilíbrio é caracterizada pela posição lateralizada dos peixes no fundo dos poços das microplacas. Os asteriscos denotam significância estatística ($p < 0,05$), # denota concentrações onde ocorreu 100% de mortalidade.

2.3.2 Comportamento locomotor

Os resultados do Zebrabox indicaram que a FLX induziu mudanças na atividade de natação de embriões de peixe-zebra (Figura 3). No geral, os efeitos mais pronunciados foram na distância total percorrida (DTP), especialmente observados em maiores concentrações de exposição e intensificados em maior tempo de exposição. A exposição à FLX causou uma diminuição significativa na DTP pelos embriões em todos os períodos testados (Kruskal-Wallis: $H = 124,362$; $P < 0,001$).

Por outro lado, os efeitos da FLX no TTN não seguiram um padrão de dose-resposta (**Figura 3**). Às 120 h, uma inibição significativa da TTN foi observada em concentrações mais baixas (0,88; 15,8 $\mu\text{g/L}$); no entanto, na concentração mais alta (500 $\mu\text{g/L}$) houve um aumento significativo no TTN (Kruskal-Wallis: $H = 62,276$; $P < 0,001$). Às 168 h, observou-se uma diminuição significativa na TTN na maior concentração testada. (Kruskal-Wallis: $H = 24,565$; $P < 0,001$).

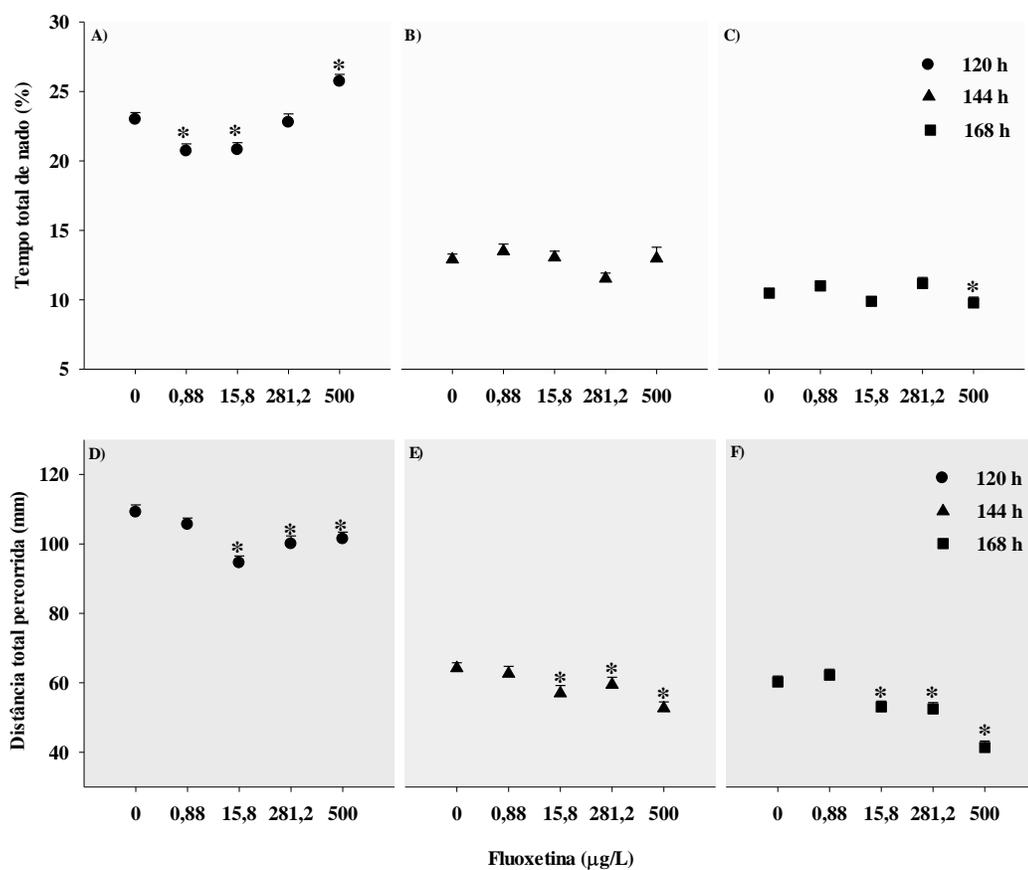


Figura 3. Tempo total de nado (TTN) e distância total percorrida (DTP) após 120 h, 144 h e 168 h de exposição à FLX: (A) TTN após 120 h; (B) TTN após 144 h; (C) TTN após 168 h; (D) DTP após 120 h; (E) DTP após 144 h; (F) DTP após 168 h

2.3.2 Biomarcadores

Os efeitos da FLX na AChE, utilizando ASCh e PSCh como substratos, são mostrados na **Figura 4**. Em geral, a FLX causou uma inibição na atividade da AChE após 168 h de exposição. A AChE foi significativamente inibida em concentrações $\geq 0,006$ mg/L quando comparada ao grupo controle em ambos os ensaios com ASCh (one-way ANOVA: $F_{5, 66} = 8,08$; $p < 0,001$) e PSCh (one-way ANOVA: $F_{5, 62} = 5,88$; $p < 0,001$) como substratos.

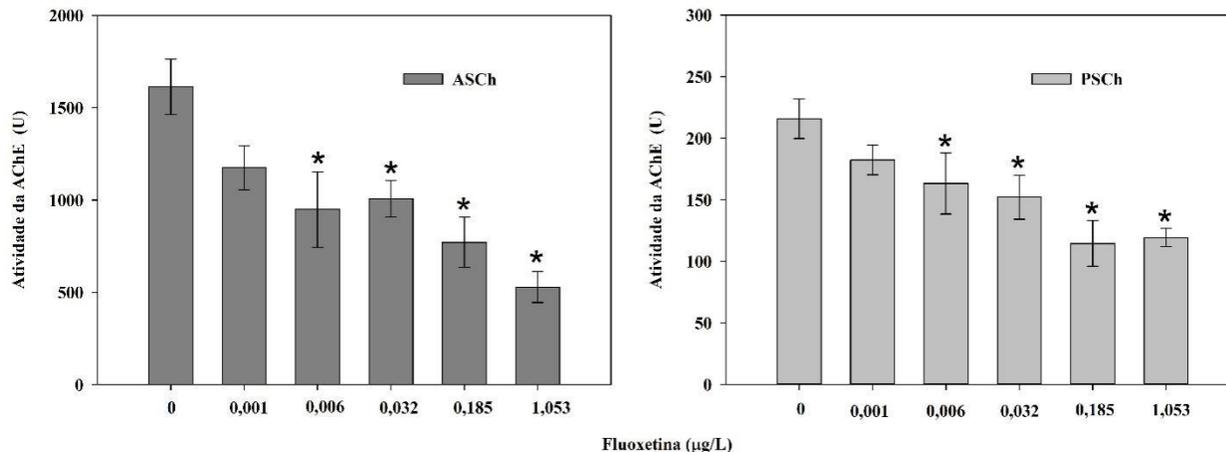


Figura 4. Efeitos da fluoxetina sobre a atividade da colinesterase em embriões de peixe-zebra após 168 h de exposição à FLX (valores médios \pm erro padrão). (A) Ensaio com acetilcolina (ASCh); (B) Ensaio com propionilcolina (PSCh)

2.4. Discussão

A FLX teve um impacto significativo na sobrevivência de embriões. A mortalidade foi dependente da concentração teste e do tempo, com um valor de 168 h-CL₅₀ de 1,18 mg/L. Esses resultados estão de acordo com os achados de outros estudos (**Tabela S2**). Os valores de CL₅₀ para oito espécies diferentes de peixes da literatura variam de 0,164 a 2 mg/L, e um valor de HC₅₀ de 1000 µg/L foi calculado (**Figura 5**), similar à concentração letal obtida em nosso estudo. Em um estudo em particular também conduzido com peixes-zebra, uma menor

toxicidade aguda do valor de FLX foi encontrada com um CL_{50} de 0,25 mg/L (Alsop and Wood, 2013). No entanto, este estudo foi realizado com larvas de peixe-zebra em 4-8 dias após a fertilização. Este estágio de desenvolvimento é mais sensível que os embriões, como demonstrado por vários estudos anteriores comparando diferentes estágios de desenvolvimento do peixe-zebra (ex. Domingues et al., 2010).

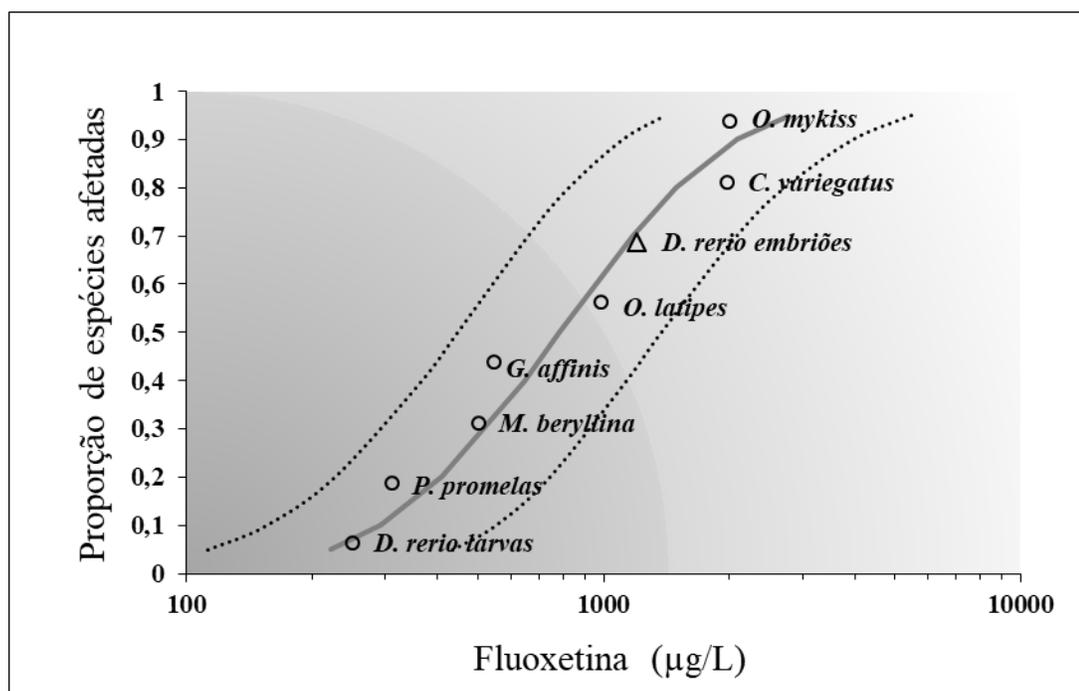


Figura 5. Distribuição da sensibilidade de espécies (DSE) de dados de toxicidade a curto prazo para várias espécies de peixes versus concentração de fluoxetina. Triângulo representa dados próprios e os círculos outras espécies de peixes. A linha pontilhada indica limites superior e inferior

A eclosão é um período crítico do desenvolvimento do embrião de peixe-zebra e tem sido amplamente utilizado como um ponto final nos testes da fase inicial da vida dos peixes. Neste estudo, a eclosão foi significativamente atrasada em 48 horas em embriões expostos a concentrações acima de 5,51 mg/L. Três mecanismos principais estão envolvidos no processo de eclosão do zebrafish: o movimento do embrião dentro do ovo, a atividade da

enzima corionase de incubação e ruptura osmótica (Hallare et al., 2005; Schoots et al., 1983). Os embriões não podem quebrar a barreira do cório se os efeitos do produto químico sobre o crescimento ou anormalidades do desenvolvimento forem muito graves. Embora o movimento de embriões dentro dos ovos não tenha sido medido no presente estudo, a exposição à FLX causou perda progressiva do equilíbrio dos embriões após a eclosão (**Figura 2**). Analisando os estágios locomotores anteriores, ou seja, enrolamento espontâneo, enrolamento evocado e nado contínuo, Airhart et al. (2007) não mostraram efeito da FLX nesses parâmetros na concentração de 1,42 mg/L. Pode-se especular que as concentrações mais altas de FLX usadas em nosso estudo (5,51 mg/L) podem ter causado uma inibição dos movimentos musculares, reduzindo a capacidade do embrião em romper a casca do ovo. No entanto, mais estudos são necessários para corroborar essa hipótese.

Organismos eclodidos expostos à FLX mostraram uma diminuição na DTP em concentrações > 0,88 µg/L. Nossos resultados estão de acordo com outros estudos que investigaram os efeitos da FLX no comportamento locomotor em fases iniciais da vida dos peixes (**Tabela S3, ver material suplementar do apêndice 1**). Airhart et al., (2007) também relataram uma diminuição na atividade de natação de larvas de peixe-zebra (1-5 dpf) após a exposição à FLX em concentrações iguais ou acima de 1420 µg/L. Da mesma forma, Prieto et al., (2012) mostraram que os embriões de peixe-zebra expostos a 15,8 µg/L de FLX exibiram uma diminuição significativa na atividade de natação. Os efeitos bifásicos da FLX na TTN do peixe-zebra foram detectados em concentrações muito baixas (0,88 µg/L) e uma indução na concentração mais alta testada (500 µg/L). Um efeito bifásico do psicotrópico valproato na atividade locomotora de larvas de peixe-zebra também tem sido relatado, onde baixas concentrações resultaram em larvas hiperativas e altas concentrações resultaram em larvas

hipoativas (Cowden et al., 2012). Maximino et al., (2011) também relatou um efeito bifásico em um estudo com adultos de peixe-zebra expostos ao etanol, onde os padrões de ansiedade e locomoção foram afetados em diferentes níveis de concentração. Os efeitos bifásicos de fármacos psiquiátricos são amplamente descritos na toxicologia de mamíferos, inclusive em humanos (Bailey et al., 2013). Uma vez que nossos resultados não seguem um padrão de dose resposta para os estágios iniciais da vida dos peixes, mais estudos podem abordar este tópico e as consequências para a avaliação de risco de fármacos psiquiátricos na biota aquática.

O comprometimento do comportamento locomotor pode estar relacionado a alterações neurológicas na neurotransmissão mediada por agentes tóxicos. Estudos anteriores (**Figura 6, Tabela S3**), relataram que a exposição a baixas concentrações de FLX afetou a atividade de diferentes neurotransmissores, como serotonina, dopamina e norepinefrina. Uma diminuição na atividade da colinesterase pode causar miopatia progressiva dos músculos esqueléticos e, conseqüentemente, perda de motilidade (Tierney, 2011). Este pode ser o caso da FLX, pois nossos resultados mostraram que a exposição a concentrações iguais ou superiores a 6 µg/L (**Figura 4**) causou uma inibição significativa da atividade da AChE, corroborando o perfil de comportamento locomotor reduzido exibido pelas larvas de peixe-zebra (**Figura 3**). Nossos resultados sugerem uma ligação entre a diminuição da AChE e a atividade locomotora de embriões eclodidos, mas outro mecanismo neurológico também pode estar envolvido nas alterações comportamentais causadas pela exposição à FLX. Já está estabelecido que a serotonina desempenha um papel importante na modulação do comportamento locomotor em uma ampla gama de vertebrados. Estudos conduzidos em teleósteos adultos, incluindo peixes-zebra, mostraram uma relação inversa entre os níveis de

serotonina e a atividade espontânea da natação. No estudo realizado por Airhart et al., (2007) a atividade locomotora reduzida observada em larvas de peixe-zebra foi correlacionada com uma diminuição em dois transcritos de receptores de serotonina (SERT - proteína transportadora de serotonina e 5-HT_{1A} - transcrição de receptores de serotonina 1A) na coluna vertebral, após a exposição à FLX. O ensaio de atividade da AChE é uma técnica bioquímica de custo efetivo amplamente utilizada para a avaliação da toxicidade de pesticidas organofosforados e carbamatos. Nossos dados sugerem uma sensibilidade similar dos marcadores colinérgicos e serotoninérgicos, sugerindo a AChE como uma opção viável de biomarcador para avaliar os efeitos da FLX.

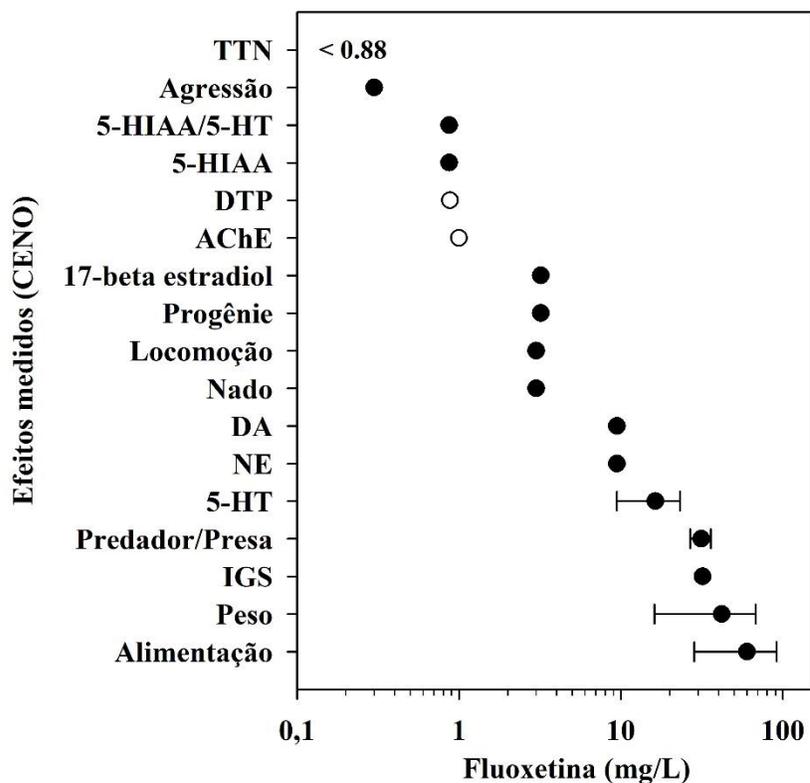


Figura 6. Uma visão geral da Concentração de Efeito Não Observado (CENO) da fluoxetina em parâmetros sub-letais de diferentes espécies de peixes (valores médios \pm erro padrão)

Como mostrado na **Figura 7**, o comportamento do parâmetro de natação é várias ordens de magnitude mais sensível do que os parâmetros de desenvolvimento e os marcadores moleculares relatados neste artigo. Da mesma forma, ao comparar as ‘Concentrações de Efeito Não Observado’ (CENO) de vários parâmetros analisados em outros estudos da literatura (**Figura 7**), o comportamento de natação também é o parâmetro mais sensível. No entanto, os efeitos em concentrações mais baixas, como o comportamento, tendem a ser desconsiderados nas práticas atuais de avaliação de risco ambiental, o que suscita uma preocupação especial por medicamentos como o FLX (Brodin et al., 2014). O rompimento do processo de desenvolvimento e as alterações de comportamento causadas por esses medicamentos podem ter consequências ecológicas negativas a longo prazo (Brodin et al., 2014). Portanto, o desenvolvimento de protocolos comportamentais para a avaliação de fármacos psiquiátricos, fornecendo parâmetros que refletem um cenário de exposição mais realista, poderia ajudar a melhorar nosso conhecimento sobre seus efeitos na vida aquática.

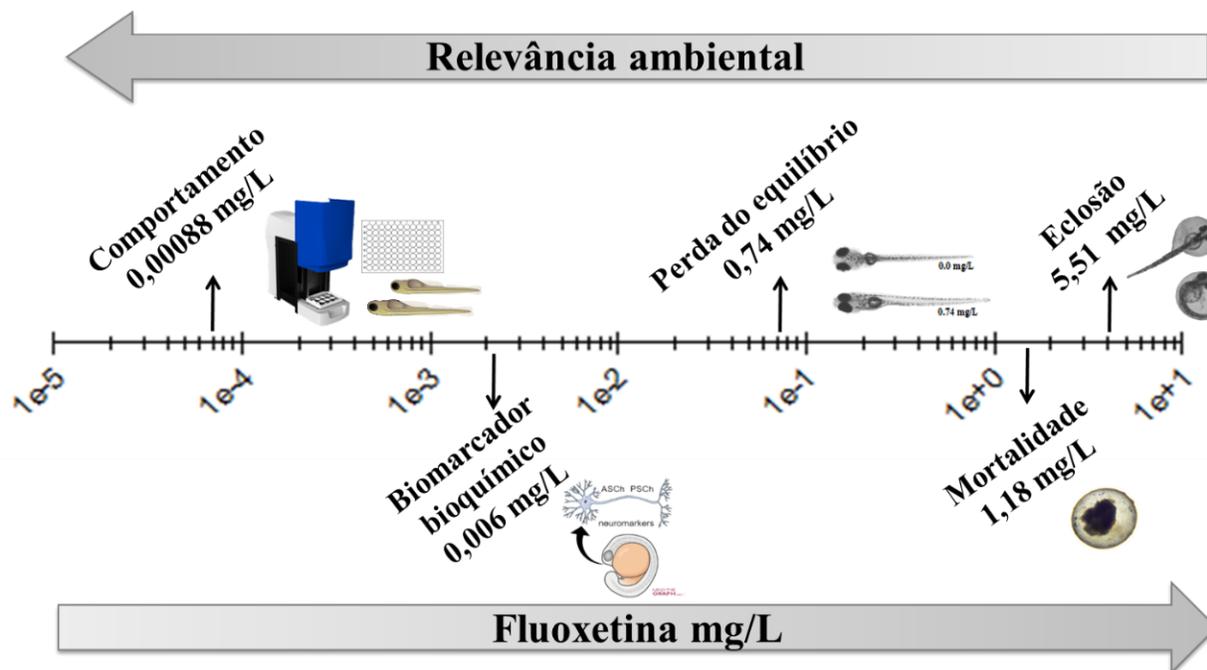


Figura 7. Comparação da sensibilidade dos parâmetros utilizados no presente estudo para avaliar a toxicidade da fluoxetina em embriões de peixe-zebra

Relevância ecológica

Em geral, a exposição à compostos químicos presentes no ambiente não resulta em mudanças morfológicas óbvias, mas sim mudanças sutis no nível molecular, dificultando a identificação e a caracterização dos efeitos da exposição. De fato, nossos resultados do teste de toxicidade com embriões de peixes demonstraram que a FLX é tóxica para embriões de peixe-zebra. A exposição à uma gama de concentrações sub-letais de FLX afetou a atividade locomotora em concentrações ambientalmente relevantes (0,88 $\mu\text{g/L}$), com resultados apoiados por alterações moleculares na atividade da AChE (LOEC <6 $\mu\text{g/L}$, **Figura 7**). As alterações no comportamento de natação são um tipo de resposta particularmente importante no ecossistema, pois estão relacionadas à aptidão individual dos organismos e podem originar

a interrupção da capacidade de evitar predadores e de se alimentar, levando a menores taxas de sobrevivência no ambiente (Brodin et al., 2014). Nossos resultados são corroborados por diferentes estudos mostrando que a FLX induz alterações em diferentes padrões comportamentais em peixes expostos, tais como agressão, relação predador/presa, alimentação, contagem de progênes, natação e atividade locomotora (**Tabela S3**). Os efeitos adversos da FLX na aptidão individual podem comprometer características ecológicas de populações de peixes, como agressão, ousadia, exploração e socialidade (Brodin et al., 2014). Assim, ao todo, esses estudos sugerem que a contaminação por FLX causaria desequilíbrio ecológico nos sistemas aquáticos.

2.5. Conclusão

Em resumo, a FLX causou efeitos desenvolvimentais e neurotóxicos nos estágios iniciais do zebrafish, após uma exposição de curto prazo. Concentrações de efeito observadas para a atividade locomotora e acetilcolinesterase estão na mesma faixa de concentração de FLX frequentemente detectada em amostras ambientais, sugerindo que as características ecológicas dos estágios iniciais da vida dos peixes podem ser prejudicadas em cenários realistas de exposição. Assim, o risco da exposição à FLX para populações de peixes em ecossistemas aquáticos não pode ser negligenciado. Para melhorar nossos achados, pesquisas futuras devem focar a avaliação da toxicidade em um cenário de exposição crônica em nível populacional, para desvendar como as alterações comportamentais observadas em cada indivíduo durante os estágios iniciais da vida podem se traduzir em um efeito ecológico direto nas comunidades aquáticas

Referências Bibliográficas

- Airhart, M.J., Lee, D.H., Wilson, T.D., Miller, B.E., Miller, M.N., Skalko, R.G., 2007. Movement disorders and neurochemical changes in zebrafish larvae after bath exposure to fluoxetine (PROZAC). *Neurotoxicol. Teratol.* 29, 652–664. <https://doi.org/10.1016/j.ntt.2007.07.005>
- Alsop, D., Wood, C.M., 2013. Metal and pharmaceutical mixtures: Is ion loss the mechanism underlying acute toxicity and widespread additive toxicity in zebrafish? *Aquat. Toxicol.* 140–141, 257–267. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2013.05.021>
- Andrade, T.S., Henriques, J.F., Rita, A., Luísa, A., Koba, O., Thai, P., Soares, A.M.V.M., Domingues, I., 2015. Carbendazim exposure induces developmental, biochemical and behavioural disturbance in zebrafish embryos. *Aquat. Toxicol.* <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2015.11.017>
- Aus der Beek, T., Weber, F.-A., Bergmann, A., Hickmann, S., Ebert, I., Hein, A., Küster, A., 2015a. Pharmaceuticals in the environment - global occurrences and perspectives. *Environ. Toxicol. Chem.* 35, n/a-n/a. <https://doi.org/10.1002/etc.3339>
- Aus der Beek, T., Weber, F.-A., Bergmann, A., Hickmann, S., Ebert, I., Hein, A., Küster, A., 2015b. Pharmaceuticals in the environment - global occurrences and perspectives. *Environ. Toxicol. Chem.* n/a-n/a. <https://doi.org/10.1002/etc.3339>
- Bailey, J., Oliveri, A., Levin, E.D., 2013. Zebrafish Model Systems for Developmental Neurobehavioral Toxicology 23, 14–23. <https://doi.org/10.1002/bdrc.21027>
- Barry, M.J., 2013. Effects of fluoxetine on the swimming and behavioural responses of the Arabian killifish. *Ecotoxicology* 22, 425–432. <https://doi.org/10.1007/s10646-012-1036-7>
- Baumans, V., 2004. Use of animals in experimental research: An ethical dilemma? *Gene Ther.* 11, S64–S66. <https://doi.org/10.1038/sj.gt.3302371>
- Berg, C., Backström, T., Winberg, S., Lindberg, R., Brandt, I., 2013. Developmental Exposure to Fluoxetine Modulates the Serotonin System in Hypothalamus. *PLoS One* 8. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0055053>
- Besse, J.P., Kausch-Barreto, C., Garric, J., 2008. Exposure assessment of pharmaceuticals and their metabolites in the aquatic environment: Application to the French situation and preliminary prioritization. *Hum. Ecol. Risk Assess.* 14, 665–695. <https://doi.org/10.1080/10807030802235078>
- Bisesi, J.H., Sweet, L.E., van den Hurk, P., Klaine, S.J., 2016. Effects of an antidepressant mixture on the brain serotonin and predation behavior of hybrid striped bass. *Environ. Toxicol. Chem.* 35, 938–945. <https://doi.org/10.1002/etc.3114>
- Blair, B.D., Crago, J.P., Hedman, C.J., Klaper, R.D., 2013. Pharmaceuticals and personal care products found in the Great Lakes above concentrations of environmental concern. *Chemosphere* 93, 2116–2123. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2013.07.057>
- Bossus, M.C., Guler, Y.Z., Short, S.J., Morrison, E.R., Ford, A.T., 2014. Behavioural and transcriptional changes in the amphipod *Echinogammarus marinus* exposed to two antidepressants, fluoxetine and sertraline. *Aquat. Toxicol.* 151, 46–56. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2013.11.025>

- Bozkurt, G., Abay, E., Ates, I., Karabogaz, G., Ture, M., Savran, F.O., Palanduz, S., Temocin, K., Algunes, C., 2004. Clastogenicity of selective serotonin-reuptake inhibitors. *Mutat. Res. - Genet. Toxicol. Environ. Mutagen.* 558, 137–144. <https://doi.org/10.1016/j.mrgentox.2003.11.005>
- Bradford, M., 1976. Rapid and Sensitive Method for Quantification of Microgram Quantities of Protein utilizing principle of Protein-Dye-Binding. *Anal. Biochem.* 72, 248–254.
- Bringolf, R.B., Heltsley, R.M., Newton, T.J., Eads, C.B., Fraley, S.J., Shea, D., Cope, W.G., 2010. Environmental occurrence and reproductive effects of the pharmaceutical fluoxetine in native freshwater mussels. *Environ. Toxicol. Chem.* 29, 1311–1318. <https://doi.org/10.1002/etc.157>
- Brodin, T., Piovano, S., Fick, J., Klaminder, J., Heynen, M., Heynen, M., Jonsson, M., 2014. Ecological effects of pharmaceuticals in aquatic systems — impacts through behavioural alterations. *Philos. Trans. R. Publ. Soc. B* 369, 20130580. <https://doi.org/10.1098/rstb.2013.0580>
- Brooks, B.W., Foran, C.M., Richards, S.M., Weston, J., Turner, P.K., Stanley, J.K., Solomon, K.R., Slatery, M., La Point, T.W., 2003. Aquatic ecotoxicology of fluoxetine. *Toxicol. Lett.* 142, 169–183. [https://doi.org/10.1016/S0378-4274\(03\)00066-3](https://doi.org/10.1016/S0378-4274(03)00066-3)
- Calisto, V., Esteves, V.I., 2009. Psychiatric pharmaceuticals in the environment. *Chemosphere.* <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2009.09.021>
- Campos, B., Rivetti, C., Kress, T., Barata, C., Dircksen, H., 2016. Depressing antidepressant: Fluoxetine affects serotonin neurons causing adverse reproductive responses in *Daphnia magna*. *Environ. Sci. Technol.* *acs.est.6b00826*. <https://doi.org/10.1021/acs.est.6b00826>
- Carrasco, K.R., Tilbury, K.L., Myers, M.S., 1990. Assessment of the Piscine Micronucleus Test as an in situ.
- Costagliola, C., Parmeggiani, F., Semeraro, F., Sebastiani, A., 2008. Selective serotonin reuptake inhibitors: a review of its effects on intraocular pressure. *Curr. Neuropharmacol.* 6, 293–310. <https://doi.org/10.2174/157015908787386104>
- Cowden, J., Padnos, B., Hunter, D., Macphail, R., Jensen, K., Padilla, S., 2012. Developmental exposure to valproate and ethanol alters locomotor activity and retinotectal projection area in zebrafish embryos. *Reprod. Toxicol.* 33, 165–173. <https://doi.org/10.1016/j.reprotox.2011.11.111>
- Cunha, V., Rodrigues, P., Santos, M.M., Moradas-Ferreira, P., Ferreira, M., 2016. Danio rerio embryos on Prozac ??? Effects on the detoxification mechanism and embryo development. *Aquat. Toxicol.* 178, 182–189. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2016.08.003>
- Domingues, I., Oliveira, R., Lourenço, J., Koppe, C., Mendo, S., Soares, A.M.V.M., 2010. Comparative Biochemistry and Physiology, Part C Biomarkers as a tool to assess effects of chromium (VI): Comparison of responses in zebra fish early life stages and adults ☆. *Comp. Biochem. Physiol. Part C* 152, 338–345. <https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2010.05.010>

- Egan, R.J., Bergner, C.L., Hart, P.C., Cachat, J.M., Canavello, P.R., Elegante, M.F., Elkhayat, S.I., Bartels, B.K., Tien, A.K., Tien, D.H., Mohnot, S., Beeson, E., Glasgow, E., Amri, H., Zukowska, Z., Kalueff, A. V., 2009. Understanding behavioral and physiological phenotypes of stress and anxiety in zebrafish. *Behav. Brain Res.* 205, 38–44. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2009.06.022>
- ELLMAN, G.L., COURTNEY, K.D., ANDRES, V., FEATHER-STONE, R.M., 1961. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochem. Pharmacol.* 7, 88–95. [https://doi.org/10.1016/0006-2952\(61\)90145-9](https://doi.org/10.1016/0006-2952(61)90145-9)
- Engeszer, R.E., Patterson, L.B., Rao, A.A., Parichy, D.M., 2007. Zebrafish in The Wild: A Review of Natural History And New Notes from The Field. *Zebrafish* 4, 21–40. <https://doi.org/10.1089/zeb.2006.9997>
- Fenech, M., 2000. The in vitro micronucleus technique. *Mutat. Res. Mol. Mech. Mutagen.* 455, 81–95.
- Fent, K., Weston, A. a., Caminada, D., 2006. Ecotoxicology of human pharmaceuticals. *Aquat. Toxicol.* 76, 122–159. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2005.09.009>
- Fong, P.P., Ford, A.T., 2014. The biological effects of antidepressants on the molluscs and crustaceans: A review. *Aquat. Toxicol.* 151, 4–13. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2013.12.003>
- Fonseka, T.M., Wen, X., Foster, J.A., Kennedy, S.H., 2016. Review Zebrafish Models of Major Depressive Disorders 14, 3–14. <https://doi.org/10.1002/jnr.23639>
- Ford, A.T., Fong, P.P., 2015. The effects of antidepressants appear to be rapid and at environmentally relevant concentrations. *Environ. Toxicol. Chem.* n/a-n/a. <https://doi.org/10.1002/etc.3087>
- Forsatkar, M.N., Nematollahi, M.A., Amiri, B.M., Huang, W. Bin, 2014. Fluoxetine inhibits aggressive behaviour during parental care in male fighting fish (*Betta splendens*, Regan). *Ecotoxicology* 23, 1794–1802. <https://doi.org/10.1007/s10646-014-1345-0>
- Galus, M., Kirischian, N., Higgins, S., Purdy, J., Chow, J., Ranganarajan, S., Li, H., Metcalfe, C., Wilson, J.Y., 2013. Chronic, low concentration exposure to pharmaceuticals impacts multiple organ systems in zebrafish. *Aquat. Toxicol.* 132–133, 200–211. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2012.12.021>
- Gonzalez Alonso, S., Catal, M., Maroto, R.R., Gil, J.L.R., de Miguel, R.G., Valcárcel, Y., 2010. Pollution by psychoactive pharmaceuticals in the Rivers of Madrid metropolitan area (Spain). *Environ. Int.* 36, 195–201. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2009.11.004>
- Groh, K.J., Carvalho, R.N., Chipman, J.K., Denslow, N.D., Halder, M., Murphy, C.A., Roelofs, D., Rolaki, A., Schirmer, K., Watanabe, K.H., 2015. Development and application of the adverse outcome pathway framework for understanding and predicting chronic toxicity: I. Challenges and research needs in ecotoxicology. *Chemosphere* 120, 764–777. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2014.09.068>
- Gunnarsson, L., Jauhainen, A., Kristiansson, E., Nerman, O., Larsson, D.G.J., 2008. Evolutionary conservation of human drug targets in organisms used for environmental risk assessments. *Environ. Sci. Technol.* 42, 5807–5813.

<https://doi.org/10.1021/es8005173>

- Halford, J.C.G., Harrold, J.A., Lawton, C.L., Blundell, J.E., 2005. Serotonin (5-HT) Drugs : Effects on Appetite Expression and Use for the Treatment of Obesity 201–213.
- Hallare, A. V., Schirling, M., Luckenbach, T., Köhler, H.R., Triebkorn, R., 2005. Combined effects of temperature and cadmium on developmental parameters and biomarker responses in zebrafish (*Danio rerio*) embryos. *J. Therm. Biol.* 30, 7–17. <https://doi.org/10.1016/j.jtherbio.2004.06.002>
- Hartwig, C., Muth-Köhne, E., Düring, R.-A., 2013. Screening for ecotoxicological effects of antiepileptic drugs in biologically treated waste water originating from an epilepsy ward by *Danio rerio* embryos. *Environ. Sci. Eur.* 25, 29. <https://doi.org/10.1186/2190-4715-25-29>
- Hazelton, P.D., Du, B., Haddad, S.P., Fritts, A.K., Chambliss, C.K., Brooks, B.W., Bringolf, R.B., 2014. Chronic fluoxetine exposure alters movement and burrowing in adult freshwater mussels. *Aquat. Toxicol.* 151, 27–35. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2013.12.019>
- Heberer, T., 2002. Occurrence, fate, and removal of pharmaceutical residues in the aquatic environment: a review of recent research data. *Toxicol. Lett.* 131, 5–17. [https://doi.org/10.1016/S0378-4274\(02\)00041-3](https://doi.org/10.1016/S0378-4274(02)00041-3)
- Henriques, J.F., Rita, A., Andrade, T., Koba, O., Golovko, O., Soares, A.M.V.M., Oliveira, M., Domingues, I., 2015. Effects of the lipid regulator drug gemfibrozil: A toxicological and behavioral perspective. *Aquat. Toxicol.* <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2015.09.017>
- Henry, T.B., Black, M.C., 2008. Acute and chronic toxicity of fluoxetine (selective serotonin reuptake inhibitor) in western Mosquitofish. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 54, 325–330. <https://doi.org/10.1007/s00244-007-9018-0>
- Hernando, M.D., Mezcuca, M., Fernández-Alba, A.R., Barceló, D., 2006. Environmental risk assessment of pharmaceutical residues in wastewater effluents, surface waters and sediments. *Talanta* 69, 334–342. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2005.09.037>
- Hooftman and Raat, 1982. Induction of nuclear anomalies (micronuclei) in the peripheral blood erythrocytes of the eastern mudminnow *Umbra pygmaea* by ethyl methanesulphonate 104, 147–152.
- Irons, T.D., MacPhail, R.C., Hunter, D.L., Padilla, S., 2010. Acute neuroactive drug exposures alter locomotor activity in larval zebrafish. *Neurotoxicol. Teratol.* 32, 84–90. <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/j.ntt.2009.04.066>
- ISO, 2007. 15088: Water quality - Determination fo the acute toxicity of waste to zebrafish eggs (*Danio rerio*). *Int. Stand.*
- Jesus, F.T., Oliveira, R., Silva, A., Catarino, A.L., Soares, A.M.V.M., Nogueira, A.J.A., Domingues, I., 2013. Lethal and sub lethal effects of the biocide chlorhexidine on aquatic organisms. *Ecotoxicology* 22, 1348–1358. <https://doi.org/10.1007/s10646-013-1121-6>

- Junior, C., Junior, I.L.C., Pletsch, A.L., Torres, R., 2014. Artigo Ocorrência de Fármacos Antidepressivos no Meio Ambiente - Revisão Ocorrência de Fármacos Antidepressivos no Meio Ambiente - Revisão 6, 1408–1431. <https://doi.org/10.5935/1984-6835.20140092>
- Kalueff, A. V., Echevarria, D.J., Homechaudhuri, S., Stewart, A.M., Collier, A.D., Kaluyeva, A.A., Li, S., Liu, Y., Chen, P., Wang, J.J., Yang, L., Mitra, A., Pal, S., Chaudhuri, A., Roy, A., Biswas, M., Roy, D., Podder, A., Poudel, M.K., Katare, D.P., Mani, R.J., Kyzar, E.J., Gaikwad, S., Nguyen, M., Song, C., 2016. Zebrafish neurobehavioral phenomics for aquatic neuropharmacology and toxicology research. *Aquat. Toxicol.* 170, 297–309. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2015.08.007>
- Kalueff, A. V., Stewart, A.M., Gerlai, R., 2014. Zebrafish as an emerging model for studying complex brain disorders. *Trends Pharmacol. Sci.* 1–13. <https://doi.org/10.1016/j.tips.2013.12.002>
- Kimmel, C.B., Ballard, W.W., Kimmel, S.R., Ullmann, B., Schilling, T.F., 1995. Stages of Embryonic Development of the Zebrafish. *World Wide Web Internet Web Inf. Syst.* 10.
- Klaper, W.I. and, 2015. Environmental concentrations of the selective serotonin reuptake inhibitor fluoxetine impact specific behaviors involved in reproduction, feeding and predator avoidance in the fish *Pimephales promelas* (fathead minnow) 77–83. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2013.10.012> Environmental
- Klüver, 2015. Fish Embryo Toxicity Test: Identification of Compounds with Weak Toxicity and Analysis of Behavioral Effects To Improve Prediction of Acute Toxicity for Neurotoxic Compounds. <https://doi.org/10.1021/acs.est.5b01910>
- Kolpin, D.W., Kolpin, D.W., Furlong, E.T., Furlong, E.T., Meyer, M.T., Meyer, M.T., 2002. *Environ. Sci. Technol.* 2002, 36, 1202–1211. *Environ. Sci. Technol.* 36, 1202–1211. <https://doi.org/10.1021/es011055j>
- Lammer, E., Carr, G.J., Wendler, K., Rawlings, J.M., Belanger, S.E., Braunbeck, T., 2009. Is the fish embryo toxicity test (FET) with the zebrafish (*Danio rerio*) a potential alternative for the fish acute toxicity test? *Comp. Biochem. Physiol. - C Toxicol. Pharmacol.* 149, 196–209. <https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2008.11.006>
- Lister, A., Regan, C., Van Zwol, J., Van Der Kraak, G., 2009. Inhibition of egg production in zebrafish by fluoxetine and municipal effluents: A mechanistic evaluation. *Aquat. Toxicol.* 95, 320–329. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2009.04.011>
- Little, E., Finger, S., 1990. Swimming behavior as an indicator of sublethal toxicity in fish. *Environ. Toxicol. Chem.* 9, 13–19. <https://doi.org/10.1002/etc.5620090103>
- Magno, L.D.P., Fontes, A., Gonçalves, B.M.N., Gouveia, A., 2015. Pharmacological study of the light/dark preference test in zebrafish (*Danio rerio*): Waterborne administration. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 135, 169–176. <https://doi.org/10.1016/j.pbb.2015.05.014>
- Margiotta-casaluci, L., Owen, S.F., Cumming, R.I., Polo, A. De, Winter, M.J., Panter, G.H., Rand-weaver, M., Sumpter, J.P., 2014. Quantitative Cross-Species Extrapolation between Humans and Fish: The Case of the Anti-Depressant Fluoxetine 9. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0110467>

- Mauter, M., Elimelech, M., 2008. Environmental applications of carbon-based nanomaterials. *Environ. Sci. Technol.* 42, 5843–5859. <https://doi.org/10.1021/es8006904>
- Maximino, C., da Silva, A.W.B., Gouveia, A., Herculano, A.M., 2011. Pharmacological analysis of zebrafish (*Danio rerio*) scototaxis. *Prog. Neuro-Psychopharmacology Biol. Psychiatry* 35, 624–631. <https://doi.org/10.1016/j.pnpbp.2011.01.006>
- Maximino, C., Puty, B., Benzecry, R., Araujo, J., Lima, M.G., De Jesus Oliveira Batista, E., Renata De Matos Oliveira, K., Crespo-Lopez, M.E., Herculano, A.M., 2013. Role of serotonin in zebrafish (*Danio rerio*) anxiety: Relationship with serotonin levels and effect of buspirone, WAY 100635, SB 224289, fluoxetine and para-chlorophenylalanine (pCPA) in two behavioral models. *Neuropharmacology* 71, 83–97. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2013.03.006>
- Melo, K.M., Oliveira, R., Grisolia, C.K., Domingues, I., Pieczarka, J.C., Filho, J.D.S., Nagamachi, C.Y., 2015. Short-term exposure to low doses of rotenone induces developmental, biochemical, behavioral, and histological changes in fish. <https://doi.org/10.1007/s11356-015-4596-2>
- Mennigen, J.A., Harris, E.A., Chang, J.P., Moon, T.W., Trudeau, V.L., 2009. Fluoxetine affects weight gain and expression of feeding peptides in the female goldfish brain. *Regul. Pept.* 155, 99–104. <https://doi.org/10.1016/j.regpep.2009.01.001>
- Mennigen, J.A., Sassine, J., Trudeau, V.L., Moon, T.W., 2010. Waterborne fluoxetine disrupts feeding and energy metabolism in the goldfish *Carassius auratus*. *Aquat. Toxicol.* 100, 128–137. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2010.07.022>
- Meshalkina, D.A., Kysil, E. V., Antonova, K.A., Demin, K.A., Kolesnikova, T.O., Khatsko, S.L., Gainetdinov, R.R., Alekseeva, P.A., Kalueff, A. V., 2018. The Effects of Chronic Amitriptyline on Zebrafish Behavior and Monoamine Neurochemistry. *Neurochem. Res.* 0, 1–9. <https://doi.org/10.1007/s11064-018-2536-5>
- Messiha, F.S., 1993. Fluoxetine: A spectrum of clinical applications and postulates of underlying mechanisms. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 17, 385–396. [https://doi.org/10.1016/S0149-7634\(05\)80115-0](https://doi.org/10.1016/S0149-7634(05)80115-0)
- Metcalf, C.D., Miao, X.-S., Koenig, B.G., Struger, J., 2003. Distribution of acidic and neutral drugs in surface waters near sewage treatment plants in the lower Great Lakes, Canada. *Environ. Toxicol. Chem.* 22, 2881–2889. <https://doi.org/10.1897/02-627>
- Minguez, L., Farcy, E., Ballandonne, C., Lepailleur, A., Serpentine, A., Lebel, J.M., Bureau, R., Halm-Lemeille, M.P., 2014. Acute toxicity of 8 antidepressants: What are their modes of action? *Chemosphere* 108, 314–319. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2014.01.057>
- Mitrovic-Tutundzic, P., 1994. Fish gills as a monitor of sublethal and chronic effects of pollution. In: *Sublethal and Chronic Effects of Pollutants on Freshwater Fish* 339–352.
- Moon, T.W., Walsh, P.J., Mommsen, T.P., 1985. Fish Hepatocytes: A Model Metabolic System 42.
- Morando, M.B., Medeiros, L.R., McDonald, M.D., 2009. Fluoxetine treatment affects

- nitrogen waste excretion and osmoregulation in a marine teleost fish (DOI:10.1016/j.aquatox.2009.03.011). *Aquat. Toxicol.* 95, 164–171. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2009.10.015>
- OECD, 2013. Test No. 236: Fish Embryo Acute Toxicity (FET) Test. OECD Guidel. Test. Chem. Sect. 2, OECD Publ. 1–22. <https://doi.org/10.1787/9789264203709-en>
- OECD, 2000. Oecd guideline for the testing of chemicals 301, 231–236.
- OECD, 1992a. Fish, acute toxicity test. Guidel. Test. Chem. 1–9. <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1787/9789264069961-en>
- OECD, 1992b. Oecd guideline for testing of chemicals 1–13.
- Paterson, G., Metcalfe, C.D., 2008. Uptake and depuration of the anti-depressant fluoxetine by the Japanese medaka (*Oryzias latipes*). *Chemosphere* 74, 125–130. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2008.08.022>
- Pei, S., Liu, L., Zhong, Z., Wang, H., Lin, S., Shang, J., 2016. Risk of prenatal depression and stress treatment: alteration on serotonin system of offspring through exposure to Fluoxetine. *Sci. Rep.* 6, 33822. <https://doi.org/10.1038/srep33822>
- Pettorelli, N., Coulson, T., Durant, S.M., Gaillard, J.M., 2011. Predation, individual variability and vertebrate population dynamics. *Oecologia* 167, 305–314. <https://doi.org/10.1007/s00442-011-2069-y>
- Prieto, M.J., Gutierrez, H.C., Arévalo, R.A., Chiaramoni, N.S., del Valle Alonso, S., 2012. Effect of risperidone and fluoxetine on the movement and neurochemical changes of zebrafish.
- Quinn, T.P., Peterson, N.P., 1996. The influence of habitat complexity and fish size on overwinter survival and growth of individually marked juvenile coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*) in Big Beef Creek, Washington. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 53, 1555–1564. <https://doi.org/10.1139/f96-092>
- Rand-weaver, M., Margiotta-casaluci, L., Patel, A., Panter, G.H., Owen, S.F., Sumpter, J.P., 2013. The Read-Across Hypothesis and Environmental Risk Assessment of Pharmaceuticals.
- Richendrfer, H., Creton, R., 2017. Cluster analysis profiling of behaviors in zebrafish larvae treated with antidepressants and pesticides. *Neurotoxicol. Teratol.* <https://doi.org/10.1016/j.ntt.2017.10.009>
- Rideout, R.M., Morgan, M.J., 2010. Relationships between maternal body size, condition and potential fecundity of four north-west Atlantic demersal fishes. *J. Fish Biol.* 76, 1379–1395. <https://doi.org/10.1111/j.1095-8649.2010.02570.x>
- Rivetti, C., Campos, B., Barata, C., 2016. Low environmental levels of neuro-active pharmaceuticals alter phototactic behaviour and reproduction in *Daphnia magna*. *Aquat. Toxicol.* 170, 289–296. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2015.07.019>
- Rossi, A., Barraco, A., Donda, P., 2004. Fluoxetine: A review on evidence based medicine. *Ann. Gen. Hosp. Psychiatry* 3, 1–8. <https://doi.org/10.1186/1475-2832-3-2>
- Sabbioni, C., Bugamelli, F., Varani, G., Mercolini, L., Musenga, A., Saracino, M.A., Fanali,

- S., Raggi, M.A., 2004. A rapid HPLC-DAD method for the analysis of fluoxetine and norfluoxetine in plasma from overdose patients. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 36, 351–356. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2004.06.008>
- Sauv??, S., Desrosiers, M., 2014. A review of what is an emerging contaminant. *Chem. Cent. J.* 8, 1–7. <https://doi.org/10.1186/1752-153X-8-15>
- Scholz, S., Fischer, S., Gündel, U., 2008. The zebrafish embryo model in environmental risk assessment — applications beyond acute toxicity testing 394–404. <https://doi.org/10.1007/s11356-008-0018-z>
- Schoots, A.F.M., Meijer, R.C., Denuch, J.M., 1983. Dopaminergic Regulation of Hatching in Fish Embryos 63, 59–63.
- Schultz, M.M., Furlong, E.T., 2008. Trace Analysis of Antidepressant Pharmaceuticals and Their Select Degradates in Environmental Matrices by LC / ESI / MS / MS a) b. *Anal. Chem.* 80, 1756–1762. <https://doi.org/10.1021/ac702154e>
- Schultz, M.M., Furlong, E.T., Kolpin, D.W., Werner, S.L., Schoenfuss, H.L., Barber, L.B., Blazer, V.S., Norris, D.O., Vajda, A.M., 2010. Antidepressant pharmaceuticals in two U.S. effluent-impacted streams: Occurrence and fate in water and sediment and selective uptake in fish neural tissue. *Environ. Sci. Technol.* 44, 1918–1925. <https://doi.org/10.1021/es9022706>
- Schultz, M.M., Painter, M.M., Bartell, S.E., Logue, A., Furlong, E.T., Werner, S.L., Schoenfuss, H.L., 2011. Selective uptake and biological consequences of environmentally relevant antidepressant pharmaceutical exposures on male fathead minnows. *Aquat. Toxicol.* 104, 38–47. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2011.03.011>
- SPSS, 2004. Sigma stat for windows (version 3.10).
- Stegeman, J.J., Lecht, J.J., 1991. P-450 Cytochrome in Aquatic Systems Monooxygenase Species : Carcinogen Biomarkers for Pollutant Exposure. *Environ. Heal.* 90, 101–109. <https://doi.org/10.2307/3430851>
- Stewart, A.M., et al. 2014, 2014. Aquatic toxicology of fluoxetine: Understanding the knowns and the unknowns. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2014.08.014>
- Teh, S.J., Adams, S.M., Hinton, D.E., 1997. Histopathologic biomarkers in feral freshwater fish populations exposed to different types of contaminant stress. *Aquat. Toxicol.* 37, 51–70. [https://doi.org/10.1016/S0166-445X\(96\)00808-9](https://doi.org/10.1016/S0166-445X(96)00808-9)
- Tierney, K.B., 2011. Behavioural assessments of neurotoxic effects and neurodegeneration in zebrafish. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Basis Dis.* 1812, 381–389. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2010.10.011>
- Ton, C., Lin, Y., Willett, C., 2006. Zebrafish as a model for developmental neurotoxicity testing. *Birth Defects Res. Part A - Clin. Mol. Teratol.* 76, 553–567. <https://doi.org/10.1002/bdra.20281>
- Triebkorn, R., Köhler, H.R., Honnen, W., Schramm, M., Adams, S.M., Müller, E.F., 1997. Induction of heat shock proteins, changes in liver ultrastructure, and alterations of fish behavior: Are these biomarkers related and are they useful to reflect the state of

- pollution in the field? *J. Aquat. Ecosyst. Stress Recover.* 6, 57–73. <https://doi.org/10.1023/A:1008224301117>
- USEPA, 2016. Pesticide ecotoxicity database, formerly: environmental effects database (EEDB). Environ Fate Eff Div U S EPA.
- Vanderford, B. and, Snyder, S.A., 2006. Analysis of Pharmaceuticals in Water by Isotope Dilution Liquid Chromatography / Tandem Mass 40, 7312–7320.
- Warner, R.E., Peterson, K.K., Borgman, L., 1966. Behavioural pathology in fish: a quantitative study of sublethal pesticide toxication. *J. Appl. Ecol.* 3, 223–247. <https://doi.org/10.2307/2401462>
- Waugh, T.A., Horstick, E., Hur, J., Jackson, S.W., Davidson, A.E., Li, X., Dowling, J.J., 2014. Fluoxetine prevents dystrophic changes in a zebrafish model of duchenne muscular dystrophy. *Hum. Mol. Genet.* 23, 4651–4662. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddu185>
- Weinberger, J., Klaper, R., 2014. Environmental concentrations of the selective serotonin reuptake inhibitor fluoxetine impact specific behaviors involved in reproduction, feeding and predator avoidance in the fish *Pimephales promelas* (fathead minnow). *Aquat. Toxicol.* 151, 77–83. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2013.10.012>
- Weis, J.S., 2014. Delayed Behavioral Effects of Early Life Toxicant Exposures in Aquatic Biota 165–187. <https://doi.org/10.3390/toxics2020165>
- Winberg, S., Thörnqvist, P.O., 2016. Role of brain serotonin in modulating fish behavior. *Curr. Zool.* 62, 317–323. <https://doi.org/10.1093/cz/zow037>
- Winder, V.L., Pennington, P.L., Hurd, M.W., Wirth, E.F., 2011. Fluoxetine effects on sheepshead minnow (*Cyprinodon variegatus*) locomotor activity. *J. Environ. Sci. Heal. Part B* 47, 51–58. <https://doi.org/10.1080/03601234.2012.607767>
- Wong, K., Elegante, M., Bartels, B., Elkhayat, S., Tien, D., Roy, S., Goodspeed, J., Suci, C., Tan, J., Grimes, C., Chung, A., Rosenberg, M., Gaikwad, S., Denmark, A., Jackson, A., Kadri, F., Chung, K.M., Stewart, A., Gilder, T., Beeson, E., Zapolsky, I., Wu, N., Cachat, J., Kalueff, A. V., 2010. Analyzing habituation responses to novelty in zebrafish (*Danio rerio*). *Behav. Brain Res.* 208, 450–457. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2009.12.023>
- Wong, R.Y., Oxendine, S.E., Godwin, J., 2013. Behavioral and neurogenomic transcriptome changes in wild-derived zebrafish with fluoxetine treatment. *BMC Genomics* 14, 348. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-14-348>
- Wu, M., Liu, S., Hu, L., Qu, H., Pan, C., Lei, P., Shen, Y., Yang, M., 2017. Global transcriptomic analysis of zebrafish in response to embryonic exposure to three antidepressants, amitriptyline, fluoxetine and mianserin. *Aquat. Toxicol.* 192, 274–283. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2017.09.027>
- Zhang, D., Wei, S., Kaila, C., Su, X., Wu, J., Karki, A.B., Young, D.P., Guo, Z., 2010. Carbon-stabilized iron nanoparticles for environmental remediation. *Nanoscale* 2, 917–919. <https://doi.org/10.1039/c0nr00065e>

Capítulo 03 - Avaliação dos efeitos crônicos da exposição à fluoxetina, utilizando *Danio rerio* como espécie modelo

3.1 Introdução

O tratamento de pacientes com distúrbios psiquiátricos crônicos implica, em muitos casos, no consumo diário de fármacos (Stewart, A.M., 2014). Uma vez administrado, uma parcela significativa desses fármacos e seus metabólitos é excretada na urina e fezes desses, chegando por fim às estações de esgoto (Heberer, 2002; Schultz and Furlong, 2008; Blair et al., 2013; Weinberger and Klaper, 2014). As tecnologias atuais não eliminam totalmente os resíduos de fármacos presentes nos efluentes domésticos. Assim, é crescente a preocupação sobre os possíveis efeitos adversos dos fármacos psiquiátricos nos ecossistemas aquáticos, principalmente os efeitos causados por concentrações subletais de compostos durante períodos longos de exposição (Kolpin et al., 2002; Fent et al., 2006; Hartwig et al., 2013; Aus der Beek et al., 2015b). Os efeitos de baixas concentrações de resíduos farmacêuticos, detectados no meio ambiente são melhor avaliados quando se realiza testes de toxicidade crônica, pois permitem uma avaliação de risco mais próxima do cenário real. Entretanto, poucos estudos crônicos com fármacos e organismos aquáticos são encontrados na literatura científica atual (Kolpin et al., 2002; Metcalfe et al., 2003; Calisto and Esteves, 2009; Blair et al., 2013).

Os antidepressivos estão entre os fármacos de uso psiquiátrico mais comumente detectados no meio ambiente aquático (Fong and Ford, 2014). Dentre esses destaca-se a fluoxetina (FLX), o antidepressivo mais prescritos no mundo (Richendrfer and Creton, 2017). Essa atua inibindo a recaptção da 5-hidroxitriptamina (5-HT, serotonina) e mantendo

os níveis desse neurotransmissor na fenda sináptica, sendo assim classificada como um Inibidor Seletivo da Recaptação da Serotonina (ISRS) (Messiha, 1993; Brooks et al., 2003; Pei et al., 2016). Uma vez que invertebrados e vertebrados têm alvos moleculares conservados (ex. receptores de serotonina) são necessários estudos que avaliem os efeitos crônicos de fármacos em organismos aquáticos (Galus et al., 2013; Kalueff et al., 2016; Meshalkina et al., 2018; Santos et. al 2018).

Em concentrações baixas e a longo prazo, a FLX pode modular as funções biológicas de invertebrados e vertebrados. Rivetti et al., (2016) demonstrou que a *Daphnia magna* tem seu comportamento reprodutivo e fototático negativo alterados em concentrações que variaram de 1 ng/L a 1 µg/L para fármacos de uso psiquiátrico, incluindo a FLX. Hazelton et al., (2014) avaliou os impactos sobre o comportamento (movimento lateral, escavação e filtragem) e metabolismo (armazenamento de glicogênio e respiração) dos adultos do bivalve *Lampsilis fasciola* para concentrações de FLX de 0; 0,5; 2,5 e 22,3 µg/L. Seus resultados mostraram que os mexilhões tiveram o comportamento locomotor alterado em concentrações tão baixas quanto 22,3 µg/L. Em um estudo conduzido por Weinberger e Klaper (2014), foram avaliados os efeitos de concentrações sub-letais (0 - 100 µg/L) em um período de exposição crônica em comportamentos associados à reprodução, alimentação e evasão de predadores, utilizando o peixe *Pimephales promelas* como organismo modelo. A exposição a concentração de 1 µg/L afetou significativamente os comportamentos de acasalamento dos peixes e os comportamentos relacionados à preparação, manutenção e defesa dos ninhos. Entretanto, ainda há lacunas que precisam ser preenchidas especialmente no que tange os efeitos subletais como crescimento, comportamento e morfofisiopatologias decorrentes da exposição à longo prazo.

O peixe-zebra tem sido considerado por diferentes autores como um organismo modelo para estudo de compostos neuroativos por meio de abordagens à nível celular, molecular e genético, exibe homologia genética e fisiológica com mamíferos, expressando as principais estruturas cerebrais, neurotransmissores, receptores e hormônios (Ton et al., 2006; Egan et al., 2009; Kalueff et al., 2016), sendo eficaz para rastrear os contaminantes com potencial efeito neurotóxico. Além de ser um modelo amplamente aceito para estudos de ecotoxicidade, protocolos padronizados recomendam o peixe-zebra como modelo para testes de toxicidade aquática (OCDE, Diretrizes 203, 210 e 215) (OECD, 2000, 1992a, 1992b). Desta forma, o objetivo do presente estudo consistiu em investigar os efeitos crônicos da FLX em peixes-zebra juvenis em diferentes níveis de avaliação, sendo elas: crescimento, comportamento alimentar e natatório, genotoxicidade e histopatologia.

3.2. Material e Métodos

3.2.1. Químico

Fluoxetina (FLX) com 97% de pureza foi obtida pela indústria farmacêutica C & C, Amapá, Brasil. (CAS Number: 56296-78-7, fórmula empírica: C₁₇H₁₈F₃NO).

3.2.2 Preparo de soluções

As soluções de teste foram obtidas por diluição de uma solução estoque de FLX com água de cultivo (5 mg de FLX diluída em 5 L de água). Soluções estoque foram preparadas conforme necessário ao longo do experimento. Foram realizadas diluições em série de 1:10 (estoque: água de cultivo) para preparar soluções dos respectivos tratamentos de 0,01; 0,1; 1; 10 e 100 µg/L de FLX. O meio de exposição foi renovado a cada dois dias (condição semi-estática).

3.2.3. Organismos

Os peixes utilizados no presente estudo foram criados em um sistema recirculante (ZebTec - Tecniplast, Itália) sub um ciclo de fotoperíodo de 12:12h (luz: escuro) na Universidade de Brasília (Brasil). Os parâmetros da água foram rigorosamente controlados: a temperatura foi mantida a $27,0 \pm 1^\circ\text{C}$, condutividade a $750 \pm 50 \mu\text{S}/\text{cm}$, pH a $7,0 \pm 0,5$ e oxigênio dissolvido $\geq 95\%$ de saturação. Essas condições foram mantidas em todos os testes realizados. Nitrito e amônia foram medidos a cada três dias. Os peixes foram alimentados duas vezes ao dia com dieta comercial (TetraMin peixe, EUA) e naupli de *Artemia salina*.

3.2.4. Exposição crônica

O procedimento do teste baseou-se na norma da OECD no. 215 (OECD, 2000).

Juvenis de *D. rerio* ($n = 270$), com idades semelhantes (aproximadamente 3-4 meses) foram pesados e distribuídos aleatoriamente em 18 tanques, contendo 4 L de solução teste (0; 0,01; 0,1; 1; 10 e 100 $\mu\text{g}/\text{L}$ de FLX). Os peixes foram expostos a cada uma das concentrações por 30 dias. Os ensaios foram realizados em triplicata (15 peixes por replicata), incluindo um grupo controle. As soluções teste foram totalmente renovadas a cada dois dias (condição semi-estática) e os animais foram alimentados duas vezes por dia com uma quantidade de alimento para peixes TetraMin (EUA) correspondente a 2 % do peso do peixe. O peso do peixe foi avaliado nos dias 0, 15 e 30 de exposição e o comportamento alimentar e natatório foi avaliado no décimo quinto (15º dia) e no último dia de teste (30º dia). O sistema ZebTEC (Tecniplast) manteve os parâmetros de temperatura (27°C), pH (7,4), saturação de oxigênio ($> 95\%$) e condutividade ($750 \mu\text{S}$) da água constantes durante todo o experimento. No final do teste, animais de cada condição experimental foram utilizados para análise de

micronúcleo, análises bioquímicas e análise histológica. A mortalidade foi monitorada diariamente.

3.2.5. Teste comportamental

Para as análises comportamentais de alimentação e natação, os peixes-zebra foram avaliados no décimo quinto (15º dia) e no último dia de exposição (30º dia). O comportamento alimentar foi analisado da seguinte forma: três organismos por tratamento foram transferidos para outro aquário com a mesma concentração da solução teste e adicionados 3 partículas do TetraMin. O tempo que os organismos demoram para dar a primeira mordida (tempo da primeira ação de alimentação), assim como o tempo necessário para a ingestão total do alimento (máximo de 20 minutos) foram registrados. O comportamento natatório foi avaliado com os mesmos 3 peixes de cada tratamento. Neste caso, os aquários foram divididos em três camadas (inferior: 0-5cm, médio: 6-10cm e superior: 11-15cm). Os organismos foram filmados durante 10 min a fim de estimar o tempo que cada peixe gastou nas camadas do aquário, e assim foi realizado o cálculo da frequência de nado por faixa de altura do aquário.

3.2.6. Micronúcleo

O teste foi realizado seguindo a metodologia estabelecida por Hooftman e Raat, (1982) para os eritrócitos de peixe. Aproximadamente 20 µL de sangue periférico foram coletados com uma ponta de pipeta heparinizada e um esfregaço foi posteriormente realizado. As lâminas foram fixadas em etanol puro durante 20 minutos, deixadas secar e corar em Giemsa (5%). As lâminas coradas foram observadas sob um microscópio óptico com uma ampliação de 1000 x e avaliadas quanto à presença de micronúcleos e outras anormalidades

nucleares analisadas (isto é, núcleos “blebbed”, núcleos lobulados, brotos, segmentados, binucleados (Carrasco et al., 1990; Fenech, 2000) em 1000 células por lâmina.

3.2.7. Análise histopatológica

Para realização da análise histopatológica, os animais foram eutanaziados através de decaptação no gelo. Após essa etapa, os organismos foram fixados por inteiro em fixador Davidson, processo que durou 24h, depois foram armazenados em tubos com álcool 70%.

Em seguida foi realizada a desidratação do tecido em gradiente crescente de etanol, de 70% ao absoluto, com subsequente diafanização em xilol e inclusão em parafina. Os blocos de parafina foram cortados, em micrótomo e dispostos em lâminas de vidro. Cinco cortes aleatórios e não sequenciais de 5 μ m de espessura, para cada indivíduo, foram corados com Hematoxilina & Eosina (HE). Posteriormente, 5 campos por corte foram fotografados (Axio Cam ERc 5s - Zeiss), nas objetivas de 63x sob microscópio. As análises histológicas levaram em consideração alterações histopatológicas, classificadas em estágio de severidade, possibilitando a aplicação de dois índices para avaliação das anormalidades, no caso das alterações analisadas no fígado.

O primeiro critério de avaliação das lesões teciduais é relativo a classificação das alterações quanto sua localização e tipo. Um segundo critério foi estabelecido visando quantificar o grau de alteração observado nos tecidos analisados, para isto levou-se em consideração o Índice de Alterações Histológicas (I.A.H), de acordo com critérios estabelecidos pelo método de Poleksic e Mitrovic-Tutundzic (1994). O método consiste de uma classificação para alterações estruturais em peixes de água doce, avaliando o grau de severidade das lesões.

Alterações histológicas hepáticas	Estágio
a) Alterações nos hepatócitos	
Desarranjo dos cordões hepáticos	I
Perda ou atipia do contorno celular	I
Perda ou atipia do contorno nuclear	I
Aumento do volume celular	I
Aumento do volume nuclear	I
Atrofia nuclear	II
Intensa vacuolização citoplasmática	I
Vacuolização nuclear	II
Diminuição da frequência relativa de ocorrência de núcleos	I
Degeneração citoplasmática	II
Degeneração nuclear	II
Rompimento celular	II
Diminuição do glicogênio	I
Estagnação biliar	I
b) Alterações nos vasos sanguíneos	
Aumento da frequência relativa de vasos sanguíneos	I
Hiperemia	II
Ruptura de vasos	II
Aumento do volume relativo dos vasos	I
c) Alterações nos canalículos biliares	
Degeneração dos canalículos biliares	II
d) Estágio terminal	
Necrose (focal ou total)	III

Posteriormente submete-se a uma fórmula que permite quantificar essas alterações, tornando possível comparar o grau de alterações teciduais em diferentes situações de poluição, permitindo correlacionar a intensidade das alterações encontradas com a intensidade de poluição ao qual o animal estiver exposto:

$$I = \sum_{i=1}^{n_a} a_i + 10 \sum_{i=1}^{n_b} b_i + 100 \sum_{i=1}^{n_c} c_i$$

Em que:

a- primeiro estágio de alteração;

b- segundo estágio de alteração;

c- terceiro estágio de alteração;

na- número total de alterações de primeiro estágio;

nb- número total de alterações de segundo estágio;

nc- número total de alterações de terceiro estágio.

Valores

Efeitos

0-10 órgão com funcionamento normal

11-20 órgão com alterações de leves a moderadas

21-50 órgão com alterações de moderadas a graves

51-100 órgão com alterações de graves a irreversíveis

>100 órgão com danos irreversíveis

Avaliação da altura do epitélio absorptivo

Para mensuração da altura do epitélio, cinco cortes aleatórios e não sequenciais de 5µm de espessura, para cada porção intestinal, foram corados com Hematoxilina & Eosina (HE). Posteriormente, cinco campos aleatórios foram fotografados (Axio Cam ERc 5s - Zeiss), na objetiva de 63x sob microscópio. Foram feitas cinco mensurações de altura do epitélio e vilosidade intestinal para cada campo fotografado, totalizando cento e vinte e cinco medidas por porção intestinal para cada animal. As mensurações foram feitas manualmente no programa ZEN (ZEN 2011 – Zeiss). Os dados foram analisados utilizando a média das cinco mensurações, de cada campo fotografado.

3.2.8. Análise estatística

A taxa de crescimento foi calculada e apresentada como "pseudo" taxa de crescimento específico (r) de acordo com a equação (OECD, 2000):

$$r: \frac{\log e w_2 - \overline{\log e w_1}}{t_2 - t_1} \times 100$$

Onde:

$\overline{\log e w_1}$ = média dos logaritmos dos valores w_1 para o peixe no tanque no início do experimento;

$\log e w_2$ = logaritmo do peso de um peixe individual no final do experimento;

t_1, t_2 = tempo (dias) no início e no final do período de estudo.

O pacote estatístico Sigma Plot 12.5 foi utilizado para analisar os dados obtidos dos demais parâmetros analisados no presente estudo (SPSS, 2004). Com o intuito de avaliar se a fluoxetina causou diferenças significativas nos parâmetros analisados, os grupos de exposição foram comparados com o controle por meio de uma análise de variância (ANOVA). Nos casos em que os dados passaram pelo teste de normalidade (Kolmogorov–Smirnov) e pelo teste de homogeneidade de variância (Levene's), uma ANOVA de uma via foi realizada, seguida do teste post-hoc de Dunnett. Já para nos casos em que os dados não passaram pelo teste de normalidade e homogeneidade de variância, o teste não paramétrico de Kruskal–Wallis foi utilizada, seguida do teste post-hoc de Dunn's. As concentrações de efeito (CE_{50}) e concentrações letais (CL_{50}) foram calculadas utilizando função logística, weibull ou sigmóide. Todas as análises estatísticas tiveram como base o nível de significância de 0,05.

3.3. Resultados

Não houve mortalidade durante o período de exposição do ensaio crônico para concentrações até 100 µg/L.

3.3.1. Taxa de crescimento

O peso dos peixes juvenis foi avaliado no 0º, 15º e 30º dia de exposição. As taxas de crescimento foram calculadas para dois períodos de exposição parcial (0º a 15º e 15º a 30º dia) e para um período de exposição total (0º a 30º dia). Os resultados mostram que as taxas de crescimento diferiram entre os tratamentos de FLX. O grupo tratado com a maior concentração de exposição (100 µg/L) apresentou massa menor quando comparado com o controle (one-way ANOVA: $H = 43,406$; $P = <0,001$) para o período de exposição total. Não houve diferença significativa para os períodos de exposição parcial. As taxas de crescimento em relação ao período total de exposição (30 dias) são apresentadas na **Figura 8**.

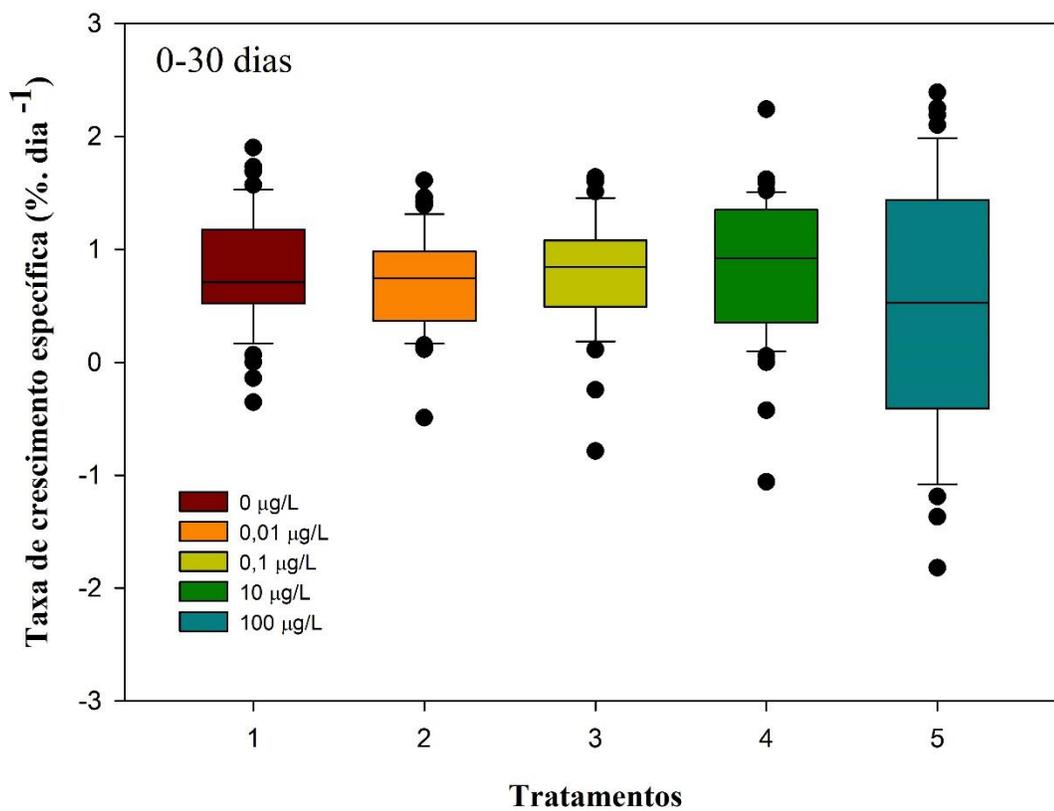


Figura 8. Box plot da taxa de crescimento específica (%.dia⁻¹) em relação aos tratamentos de FLX (0; 0,01; 0,1; 10 e 100 µg/L).3.3.2.

3.3.2 Comportamento de alimentação

Os resultados indicam que a FLX teve efeito sobre o tempo da primeira ação de alimentação na concentração de 100 µg/L no 15º (one-way ANOVA: $F = 6,603$; $P = <0,001$.) e 30º dia (one-way ANOVA: $F = 3,719$; $P = 0,007$) de exposição. O tempo da primeira ação de alimentação diminuiu no grupo exposto a maior concentração de FLX no 15º e 30º dia de exposição (**Figura 9**). Da mesma forma, a exposição a FLX diminuiu o tempo para a ingestão total de alimentos, na concentração de 100 µg/L no 15º dia de exposição (one-way ANOVA $H = 15,920$; $P = 0,007$).

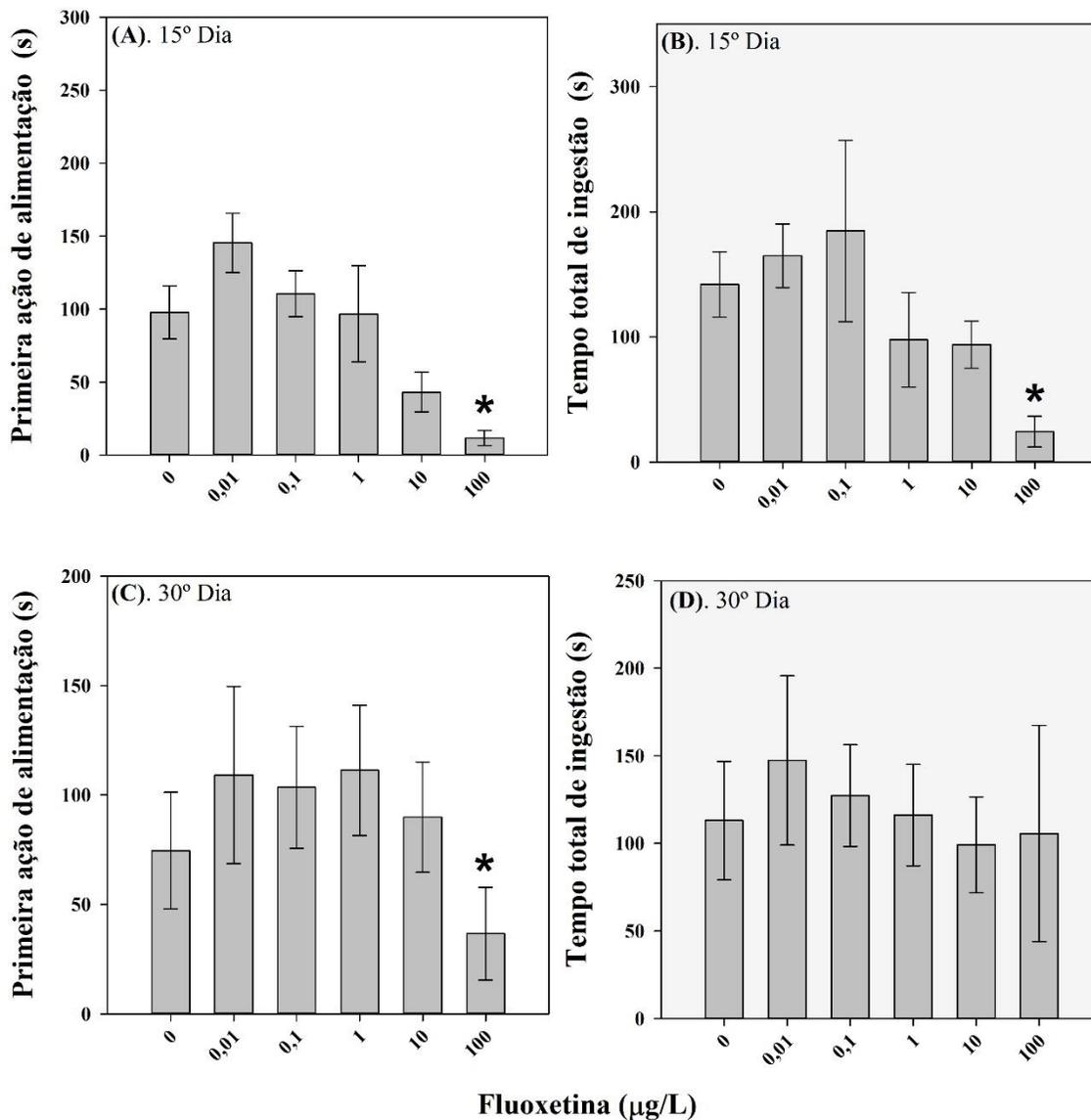


Figura 9. Comportamento de alimentação registrado após 15 e 30 dias de exposição a FLX. Os resultados são mostrados para o tempo para a primeira ação de alimentação e tempo para ingestão total de alimentos.

3.3.3. Comportamento natatório

Os resultados indicam que a FLX teve efeito sobre o tempo de permanência dos organismos nas camadas do aquário. Nas concentrações mais altas de exposição, iguais a 10 e 100 µg/L os peixes passaram maior tempo na camada superior do aquário (**Figura 8**). Não

houve diferença significativa dos grupos expostos a concentrações que variavam de 0 a 1 µg/L.

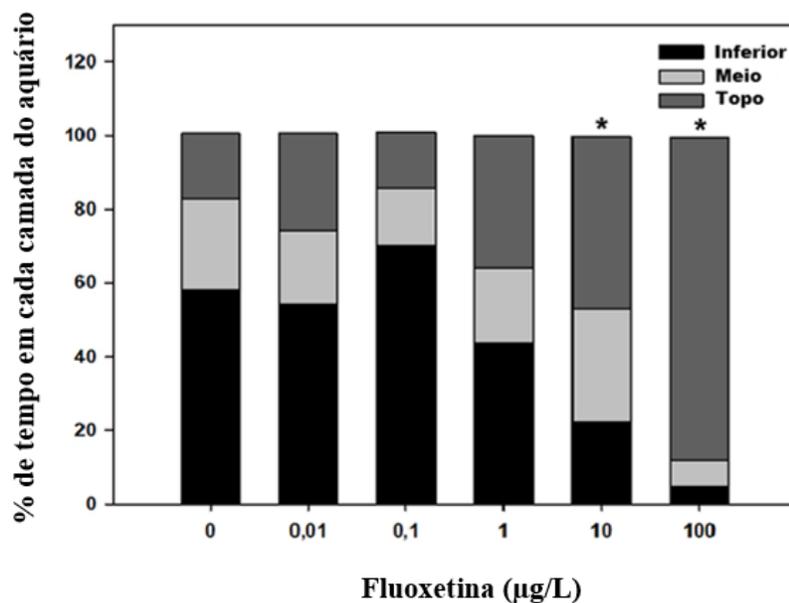


Figura 10. Comportamento de nado registrado após 30 dias de exposição à FLX. Os resultados são apresentados para a % de tempo que os peixes gastam em cada camada do aquário

3.3.4. Micronúcleo

A incidência de micronúcleos e outras anormalidades nucleares após a exposição a FLX não foi estatisticamente diferente quando os grupos tratados foram comparados com o controle. (one-way ANOVA: $H = 8.249$; $P = 0.143$). Observar **Figura 12**.

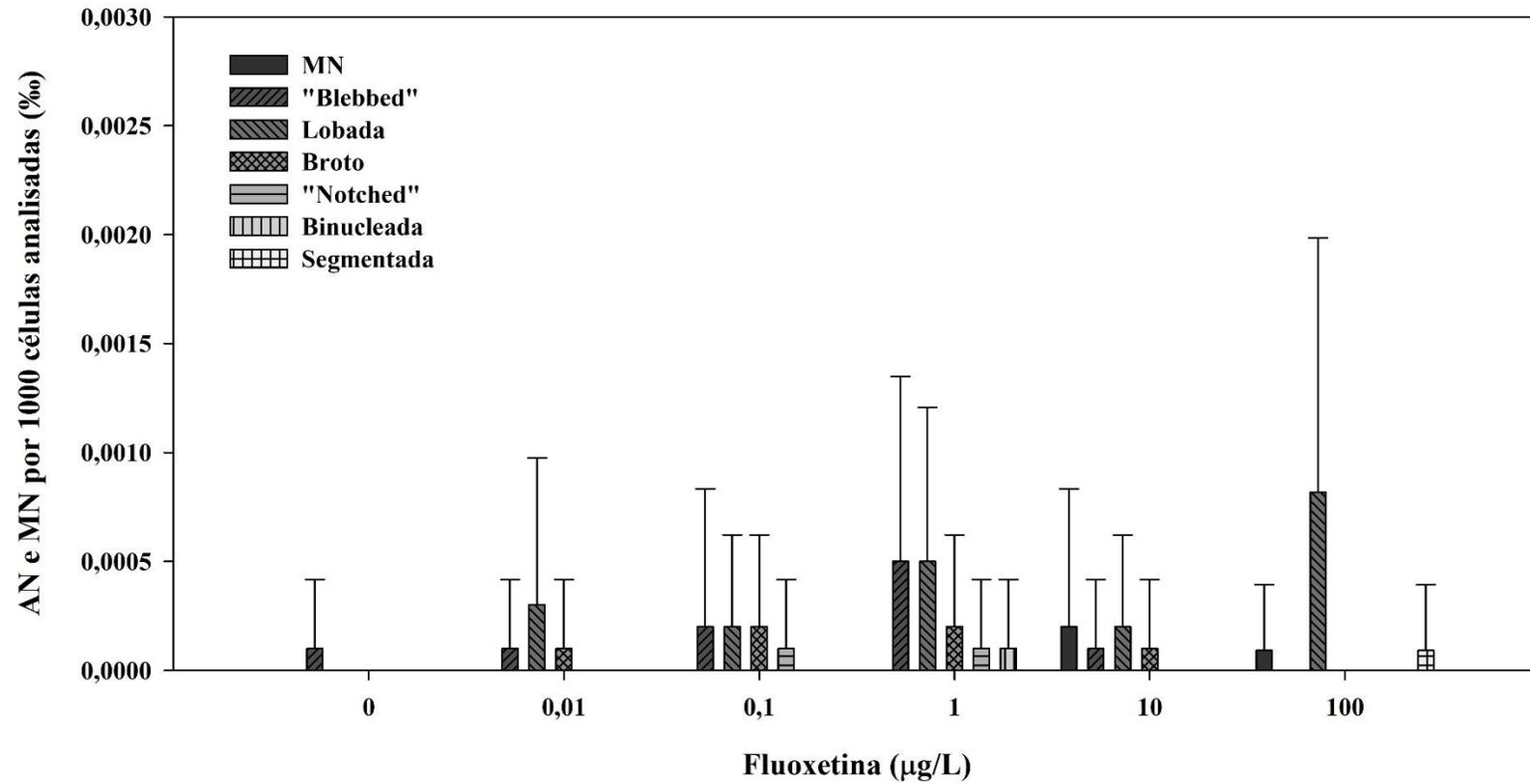


Figura 11. Endpoint de genotoxicidade após exposição crônica a FLX (0; 0,01; 0,1; 1; 10 e 100 µg/L). Os valores representam a média ± erro padrão de micronúcleos e outras anormalidades nucleares (núcleos “blebbed”, lobado, broto, “notched”, binucleada e segmentada)

3.3.5. Histopatologia

Para avaliar a histologia do peixe-zebra, amostras de fígado e intestino foram coletadas e analisadas. Para amostras de fígado, parâmetros tais como: desarranjo dos cordões hepáticos, perda/atipia do contorno celular, ruptura de vasos, degeneração dos canalículos biliares, diminuição do glicogênio, estagnação biliar e hiperemia foram identificados e avaliados. Observar **Tabela 2**.

Tabela 2. Classificação das alterações histológicas do fígado de *Danio rerio*

Alterações	Estágio	Grupo 0					Grupo 1					Grupo 2				
		1	2	3	4	5	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5
Ruptura de vasos	II		x		x	x	x		x	x			x	x	x	x
Degeneração dos canalículos biliares	II						x	x	x				x	x	x	x
Hiperemia	II				x	x	x	x		x	x	x		x	x	x
Estagnação biliar	I				x	x		x					x			x
Diminuição do glicogênio	I					x	x		x	x	x	x	x	x	x	
Perda/Atipia do contorno celular	I						x			x					x	x
Desarranjo dos cordões hepáticos	I						x			x	x		x	x	x	x
IAH		0	10	0	21	22	33	21	21	23	12	11	23	32	33	33

Tabela 3. (Continuação) Classificação das alterações histológicas do fígado de *Danio rerio*

Alterações	Estágio	Grupo 3					Grupo 4					Grupo 5				
		1	2	3	4	5	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5
Ruptura de vasos	II			x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
Degeneração dos canaliculos biliares	II		x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
Hiperemia	II	x		x	x	x	x	x		x				x	x	
Estagnação biliar	I		x	x		x		x	x		x		x			x
Diminuição do glicogênio	I	x	x		x		x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
Perda/Atipia do contorno celular	I				x	x	x		x		x	x		x		x
Desarranjo dos cordões hepáticos	I		x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
IAH		11	13	22	33	33	33	33	24	32	24	23	23	33	32	24

Grupo 0 = FLX 0,0 µg/L; Grupo 1 = FLX 0,01 µg/L; Grupo 2 = FLX 0,1 µg/L; Grupo 3 = FLX 1,0 µg/L; Grupo 4 = FLX 10 µg/L e Grupo 5 = FLX 100 µg/L.

Alterações encontradas:

Grupo 0- I= 10,6 Órgão com funcionamento normal

Grupo 1- I= 22,0 Órgão com alterações de moderadas a graves

Grupo 2- I= 26,4 Órgão com alterações de moderadas a graves

Grupo 3- I= 22,4 Órgão com alterações de moderadas a graves

Grupo 4- I= 29,2 Órgão com alterações de moderadas a graves

Grupo 5- I= 27,0 Órgão com alterações de moderadas a graves

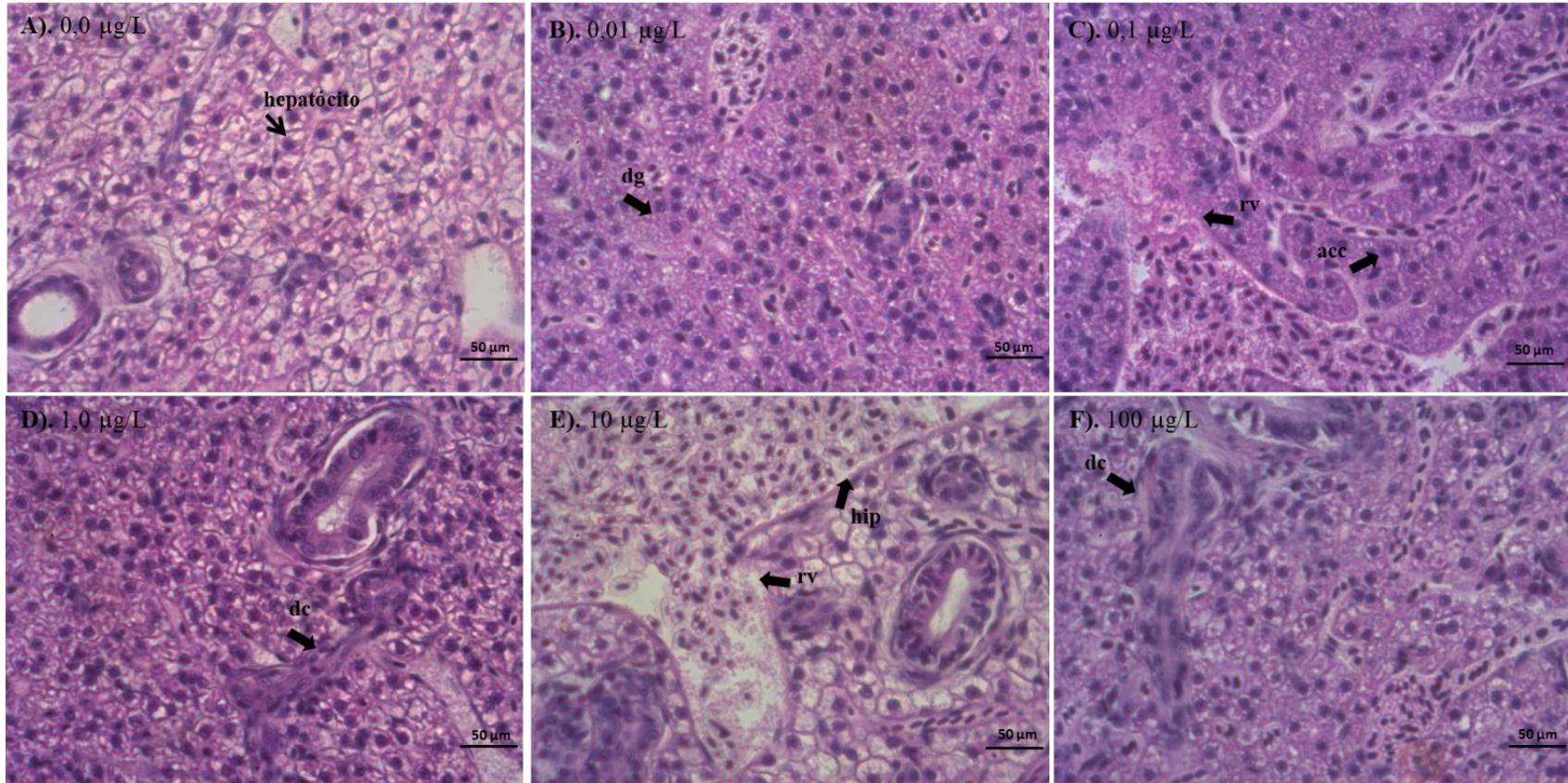


Figura 12. Alterações morfológicas do fígado de *Danio rerio*. (A) FLX 0,0 µg/L, seta preta indicando hepatócito normal. (B) FLX 0,01 µg/L, diminuição do glicogênio (dg). (C) FLX 0,1 µg/L, ruptura de vaso sanguíneo (rv), atipia do contorno celular (acc). (D) FLX 1 µg/L, degeneração dos canalículos biliares (dc). (E) FLX 10 µg/L, hiperemia (hip), ruptura de vasos sanguíneos (rv). (F) FLX 100 µg/L, degeneração dos canalículos biliares (dc).

Para o intestino foram realizadas medições da porção inicial. Verificamos a altura do epitélio e das vilosidades intestinais, desta forma foi possível observar uma leve diminuição na altura do epitélio (one-way ANOVA: $H = 21,245$; $P = <0,001$) e um aumento na altura das vilosidades (one-way ANOVA: $H = 81,405$; $P = <0,001$).

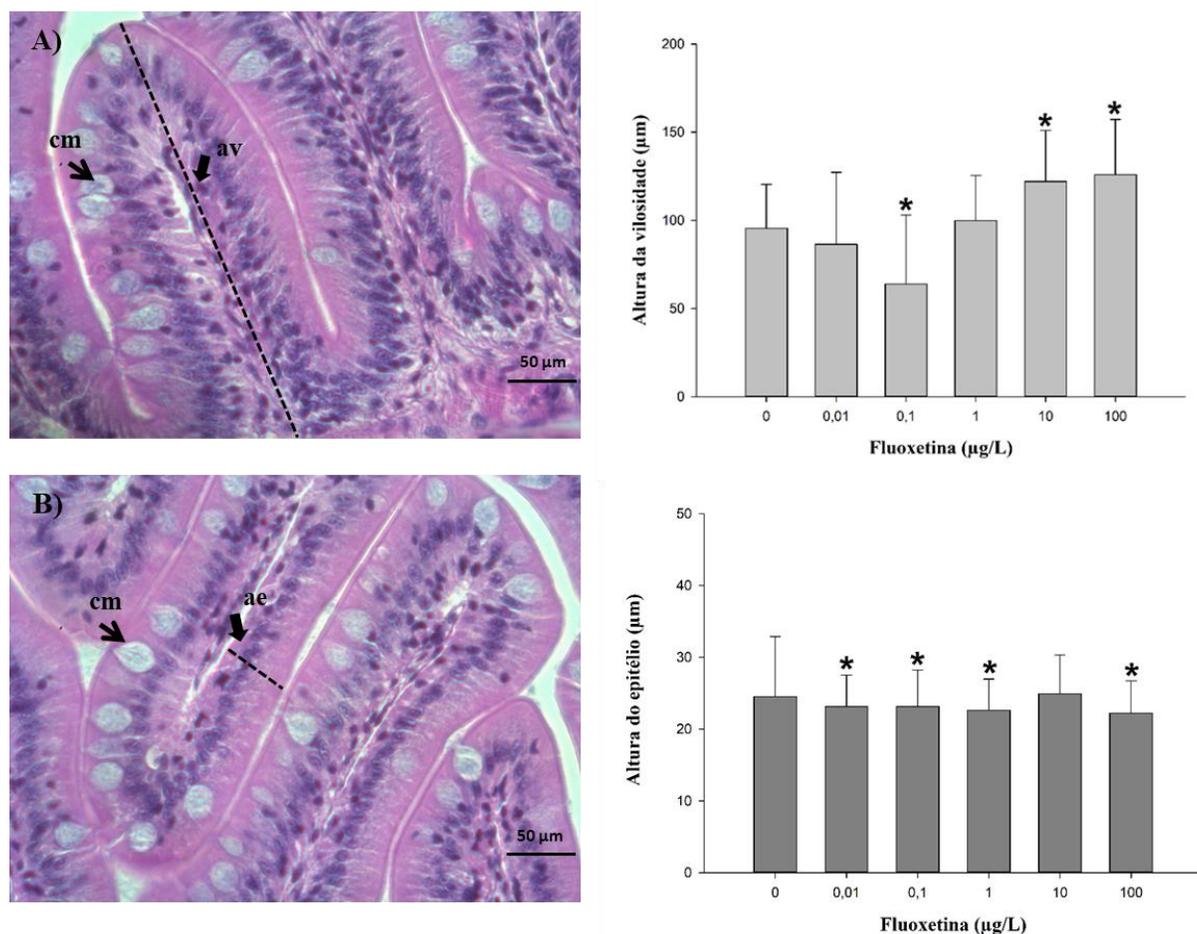


Figura 13. Morfologia da porção inicial do intestino de *Danio rerio*. (A) Medida de altura da vilosidade (av); célula de muco (cm). (B) Medida de altura do epitélio (ae); célula de muco (cm), coloração de HE.

3.4 Discussão

Embora as concentrações ambientais de ISRSs detectadas no ambiente sejam baixas, quando comparadas a outros poluentes, como pesticidas, produtos domésticos e de cuidados

personais, a exposição contínua e a longo prazo a estes contaminantes e aos seus metabolitos podem levar a potenciais efeitos aditivos em organismos aquáticos (Henry and Black, 2008). A ocorrência destes resíduos farmacêuticos no ambiente tem ganhado destaque/preocupação uma vez que há conhecimento precedente sobre o potencial efeito crônico destes para a biota aquática. No presente estudo nós avaliamos os efeitos da FLX em organismos aquáticos, usando peixes juvenis da espécie *Danio rerio*. Os efeitos aqui elucidados em diferentes níveis permitem o reconhecimento dos efeitos persistentes e duradouros da FLX no meio ambiente.

3.4.1. Crescimento

No presente estudo, a exposição à FLX inibiu o crescimento dos organismos expostos a maior concentração, referente a 100 µg/L. Resultados similares foram reportados em um estudo realizado por Mennigen et al. (2009). Foram administradas injeções intraperitoneais de FLX, a cada 3 dias com 5 µg/g do peso corpóreo do peixe dourado (*Carassius auratus*), durante 13 dias. Os resultados mostraram uma diminuição significativa na ingestão de alimentos, assim como uma diminuição no ganho de peso em fêmeas, atribuído pela alteração do sistema serotoninérgico que reduziu a ingestão e o ganho de peso e aumentou a expressão de neuropeptídeos inibidores de alimentação. Sabe-se que a administração de FLX resulta em perda de peso e um efeito anorexígeno consistente (Halford et al., 2005). A serotonina é uma molécula chave na sinalização da saciedade e no gasto de energia em mamíferos e seu sistema é anatomicamente conservado no sistema nervoso central de teleósteos.

Em uma concentração, duas vezes menor (54 µg/L) do que a concentração de efeito observado no crescimento dos peixes-zebra investigados no nosso estudo (100 µg/L), Mennigen et al., (2010) observou alterações significativas no peso corpóreo de peixes dourados depois de 28 dias de exposição. A ingestão alimentar e o ganho de peso foram

significativamente inibidos em peixes expostos a 54 $\mu\text{g/L}$ de FLX, resultados que corroboram com nosso estudo. Sob outra perspectiva, levando em consideração o crescimento e o desenvolvimento dos peixes-zebra durante os seus estágios iniciais de desenvolvimento, Wu et al. (2017) observaram que o comprimento do corpo das larvas de peixe-zebra diminuiu significativamente após a exposição à 10 $\mu\text{g/L}$ de FLX, além do mais houve um impacto significativo na transcrição de genes associados aos processos biológicos de sinalização envolvidos no desenvolvimento inicial de embriões/larvas de peixe-zebra.

O comprometimento do crescimento dos peixes em resposta à exposição aos ISRSs é um parâmetro individual ligado a efeitos de nível populacional, pois muitos processos relevantes à população são dependentes do desenvolvimento corporal. Como por exemplo, o tamanho do corpo pode afetar a vulnerabilidade à predação, as taxas de sobrevivência durante o inverno e o sucesso reprodutivo dos organismos (Pettorelli et al., 2011; Quinn and Peterson, 1996; Rideout and Morgan, 2010).

Baseado nas evidências apresentadas, a redução na ingestão de alimentos pode ser vista como a principal razão para o comprometimento do crescimento em resposta a exposição à FLX. Para além disso, os efeitos da FLX na locomoção dos peixes também podem oferecer uma explicação para a redução da ingestão alimentar. A alteração comportamental que aparenta estar mais associada diretamente à redução na ingestão de alimentos é o comprometimento da locomoção (Groh et al., 2015). Ademais, concentrações que afetam o comportamento locomotor são muitas vezes semelhantes as que causam prejuízos no crescimento a longo prazo (Little and Finger, 1990). Os resultados de crescimento sustentam a hipótese de que perturbações em parâmetros de natação e

alimentação, geradas pela exposição à FLX tem uma relação direta com os níveis anormais de crescimento dos peixes.

3.4.2. Comportamento natatório e alimentar

Muitos resíduos farmacêuticos encontrados no ambiente são projetados para modificar comportamentos ecologicamente importantes (Brodin et al., 2014). O comportamento natatório e alimentar representam parâmetros diretamente relacionados com a aptidão individual e persistência das populações de peixe no meio ambiente. Deste modo, variações e alterações induzidas pela exposição crônica de FLX podem representar uma resposta inicial à um estressor químico, assim como um risco para o desempenho individual das espécies de peixe e para a função do ecossistema. Alterações no comportamento natatório e alimentar podem levar a importantes consequências ecológicas devido à alteração da relação predador-presa e à diminuição da vantagem competitiva (Domingues et al., 2016).

Warner et al. (1966) foi um dos primeiros autores a estabelecer que o comportamento natatório pode ser um indicador sensível de estresse químico. O comprometimento da capacidade de natação pode reduzir a capacidade de alimentação dos peixes, além de alterar padrões de reprodução (Little and Finger, 1990).

No nosso estudo, o comportamento natatório foi avaliado levando em consideração o tempo que os organismos despendiam em cada uma das três camadas previamente estabelecidas no aquário - inferior, meio e topo - depois de 30 dias de exposição à FLX. A partir dos resultados é possível observar que os organismos expostos as duas maiores concentrações de FLX, iguais a 10 e 100 $\mu\text{g/L}$ tiveram o comportamento natatório alterado, ambos os grupos de exposição passaram maior tempo na camada superior do aquário (topo)

(**Figura 8**). Em geral, a exploração reduzida (menos transições para a parte superior) ou movimentos erráticos aumentados se correlacionam com o alto estresse e ansiedade dos peixes (Egan et al., 2009). Desta forma, no presente estudo a FLX age de modo a diminuir os níveis de ansiedade e estresse dos organismos, tal efeito ansiolítico permite que os peixes aparentem um comportamento mais "relaxado". Para o peixe em condições naturais, o comportamento descrito anteriormente representa um risco para sua sobrevivência, uma vez que o organismo estaria mais suscetível aos predadores. Em concordância com nossos resultados, Wong et al (2010) após iniciar tratamento crônico com a FLX observou que adultos de peixe-zebra apresentaram comportamento exploratório com maior frequência e duração de transições para a parte superior dos aquários.

Entende-se que a aquisição eficiente de alimentos é um pré-requisito importante para assegurar o crescimento fisiológico normal dos organismos. A capacidade de encontrar e adquirir a comida pode ser impactada negativamente pela exposição química. A serotonina desempenha função de controle do apetite, sugerindo que a exposição a ISRS pode modificar o comportamento alimentar. Neste caso, para avaliar o comportamento alimentar consideramos o tempo da primeira ação de alimentação e o tempo total da ingestão de alimentos, passado 15 e 30 dias de exposição à FLX (**Figura 9**). Os resultados mostraram que para a concentração de exposição igual a 100 $\mu\text{g/L}$, houve uma diminuição do tempo da primeira ação e do tempo total de ingestão dos alimentos para o 15º dia de exposição, ou seja os organismos fizeram o reconhecimento do alimento e se alimentaram mais rápido das partículas de ração disponíveis na superfície da água. A mesma tendência não foi observada no 30º dia de exposição para o tempo total de ingestão dos alimentos, do qual não houve diferença significativa. (**Figura 9**). Em um ensaio crônico (30 dias) realizado por Klaper

(2015), foi possível observar que grupos de *Pimephales promelas* expostos a 10 e 100 µg/L de FLX levaram mais tempo para encontrar e comer todos os dafnídeos em sua arena de alimentação.

Estas respostas sugerem que a FLX pode atuar de formas diferentes no sistema serotoninérgico, considerando períodos diferentes de exposição, mais curto (15 dias) e mais longo (30 dias). Estudos recentes avaliaram os efeitos da FLX sobre o comportamento de agressão e quantificaram concentrações cerebrais de 5-HT. Os resultados apontam que o aumento agudo e crônico da neurotransmissão cerebral de 5-HT tem efeitos diferentes, enquanto a ativação aguda de 5-HT poderia estar relacionada a um efeito geral de excitação, a ativação crônica observada em peixes está ligada à uma inibição comportamental (Winberg and Thörnqvist, 2016). Além disso, alterações comportamentais que comprometem a locomoção dos peixes e desregulam componentes vitais como padrões de atividade, velocidade de movimentos e orientação no espaço (Groh et al., 2015), podem ter uma relação direta com a redução na ingestão de alimentos.

3.4.3. Micronúcleo

Muitos contaminantes que estão presentes no ambiente aquático não são somente responsáveis por comprometer a sobrevivência e os processos fisiológicos dos organismos, mas podem também induzir alterações genéticas que podem levar ao desenvolvimento de mutações e carcinogênese (Flora et al., 1991). Levando em consideração que na toxicologia humana, o principal interesse em testar os efeitos genotóxicos e/ou mutagênicos é a correlação com a carcinogenicidade, na ecotoxicologia, o interesse se concentra basicamente nas consequências para a sobrevivência populacional das espécies (Sánchez-Arguello et al., 2012). Entre as técnicas para detectar os possíveis efeitos genotóxicos e/ou mutagênicos, o

teste de micronúcleo (MN) é frequentemente empregado em estudos genotóxicos utilizando peixes como bioindicadores (Russo et al., 2004).

À vista disso, os MNs são estruturas provenientes da divisão da cromatina nuclear. Portanto, sua presença nas células é indicativo de aberrações cromossômicas estruturais e/ou numéricas. As anormalidades nucleares, além dos MNs, também são consideradas indicadores de dano genotóxico, portanto devem ser levadas em consideração ao longo da análise convencional de micronúcleos (Çavas and Ergene-Gozuraka, 2005).

No presente estudo, a exposição do *D. rerio* à FLX nas concentrações testadas, não aumentou a incidência de micronúcleos ou outras anormalidades nucleares. Em um estudo realizado por (Sánchez-Arguello et al., 2012) reportou que a FLX também não induziu alterações citogenéticas nos tecidos mistos de embriões de *Physa acuta*. Houve uma sutil indução de MN na concentração de 0,5 mg/L de FLX quando misturado com benzo(a)pireno (BaP). Nossos resultados corroboram com estudos pré-clínicos em animais de laboratório que indicaram que os ISRSs não são genotóxicos (Bozkurt et al., 2004).

3.4.4. Histopatologia

Estudos anteriores (Bringolf et al., 2010; Schultz et al., 2010) mostraram que a FLX é absorvida e pode se acumular nos tecidos de organismos aquáticos, portanto a análise de parâmetros histológicos em órgãos de organismos contaminados é mais uma das ferramentas que auxiliam na avaliação das alterações biológicas desencadeadas pela exposição a poluentes emergentes como a FLX. A depender da distribuição e gravidade da lesão, a exposição à substâncias tóxicas pode causar alterações patológicas e afetar a função dos

órgãos. Aqui, avaliamos as alterações induzidas pela exposição crônica de FLX no fígado e no intestino dos peixes-zebra.

O fígado dos teleósteos é um órgão multifuncional, reconhecido como um bom órgão biomarcador, devido suas funções de metabolização, serve como indicador do estado fisiológico dos peixes (Galus et al., 2013). É também responsável pela produção da vitelogenina durante o crescimento gonadal e desintoxicação de compostos estranhos (Stegeman e Lecht, 1991). Ademais, desempenha um papel importante nas funções vitais do metabolismo basal (Moon et al., 1985) e representa o principal órgão para a acumulação e biotransformação de alimentos em peixes (Triebkorn et al., 1997). No presente estudo, foi possível observar danos histológicos no fígado de peixes expostos a concentrações iguais ou superiores a 0,1 µg/L de FLX. Os danos histológicas hepáticos, classificados pelo grau de severidade foram identificados como desarranjo dos cordões hepáticos, diminuição do glicogênio, ruptura de vaso sanguíneo, atipia do contorno celular, degeneração dos canalículos biliares e hiperemia. A incidência de cada uma destas alterações aumentou no tecido hepático, podendo ser um indicativo de processos degenerativos decorrentes de problemas metabólicos, devido à exposição à FLX. Alterações como vacuolização dos hepatócitos, depleção de glicogênio, inflamação, alteração no formato dos vasos sinusóides e neoplasmas podem ser interpretados como respostas ao estresse ambiental, sendo, desta forma, considerados como indicadores histopatológicos da qualidade do ambiente (Teh et al., 1997). Contudo, resultados diferentes foram reportados em um estudo realizado por Schultz et al. (2011), do qual não foi possível observar alterações histológicas significativas no fígado de *P. promelas* expostos à 28 ng/L de FLX, a diferença dos resultados pode ser explicada pelas concentrações de exposição utilizadas em cada um dos estudos.

O intestino, por sua vez, desempenha várias funções importantes no sistema digestório, como absorção de nutrientes, secreção de enzimas que auxiliam na digestão e hormônios, além disso é um órgão chave para homeostase do organismo. Conseqüentemente, a exposição à FLX pode comprometer a função do mesmo por alterar os componentes histológicos associados a este órgão. No nosso estudo, avaliamos as alterações por meio de medições da altura do epitélio e das vilosidades da porção inicial do intestino. Houve uma leve, porém significativa diminuição da altura do epitélio, e em contrapartida observou-se um aumento da altura das vilosidades em concentrações iguais a 10 e 100 µg/L. O encurtamento observado no epitélio intestinal pode estar relacionado com o alongamento que foi observado na altura das vilosidades, além do mais pode se relacionar com o fato dos organismos terem tido o comportamento de alimentação alterado, o que comprometeu o ganho de massa dos peixes juvenis e pode ter levado à uma diminuição da atividade dos enterócitos e na quantidade de organelas e/ou vacúolos absorptivos. Para além disso, o aumento da altura nas vilosidades, leva a um aumento da área de absorção, neste caso, os peixes podem ter desenvolvido um mecanismo compensatório para absorver mais nutrientes de uma menor quantidade de alimento ingerida. Morando et al. (2009) se propuseram a investigar a sensibilidade da osmorregulação intestinal à FLX, sabendo que este é um mecanismo que pode ser particularmente afetado em termos de contaminação ambiental. Os resultados sugerem que o processo metabólico é sensível ao tratamento com FLX (25 e 50 µg/g).

3.5. Conclusão

A exposição a baixas concentrações de fluoxetina induziu alterações em padrões de comportamento natatório e alimentar (LOEC = 10 µg/L), afetando o crescimento dos organismos juvenis de *D. rerio*. Alterações histológicas no fígado e no intestino podem

comprometer as funções vitais dos órgãos e podem estar relacionadas com as alterações observadas no comportamento alimentar dos peixes-zebra juvenis expostos à FLX. A longo prazo, a exposição à fluoxetina pode desencadear um desequilíbrio ecológico capaz de alterar a forma como os organismos aquáticos desempenham suas funções nos ecossistemas.

Referências bibliográficas

- Airhart, M.J., Lee, D.H., Wilson, T.D., Miller, B.E., Miller, M.N., Skalko, R.G., 2007. Movement disorders and neurochemical changes in zebrafish larvae after bath exposure to fluoxetine (PROZAC). *Neurotoxicol. Teratol.* 29, 652–664. <https://doi.org/10.1016/j.ntt.2007.07.005>
- Alsop, D., Wood, C.M., 2013. Metal and pharmaceutical mixtures: Is ion loss the mechanism underlying acute toxicity and widespread additive toxicity in zebrafish? *Aquat. Toxicol.* 140–141, 257–267. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2013.05.021>
- Andrade, T.S., Henriques, J.F., Rita, A., Luísa, A., Koba, O., Thai, P., Soares, A.M.V.M., Domingues, I., 2015. Carbendazim exposure induces developmental, biochemical and behavioural disturbance in zebrafish embryos. *Aquat. Toxicol.* <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2015.11.017>
- Aus der Beek, T., Weber, F.-A., Bergmann, A., Hickmann, S., Ebert, I., Hein, A., Küster, A., 2015a. Pharmaceuticals in the environment - global occurrences and perspectives. *Environ. Toxicol. Chem.* 35, n/a-n/a. <https://doi.org/10.1002/etc.3339>
- Aus der Beek, T., Weber, F.-A., Bergmann, A., Hickmann, S., Ebert, I., Hein, A., Küster, A., 2015b. Pharmaceuticals in the environment - global occurrences and perspectives. *Environ. Toxicol. Chem.* n/a-n/a. <https://doi.org/10.1002/etc.3339>
- Bailey, J., Oliveri, A., Levin, E.D., 2013. Zebrafish Model Systems for Developmental Neurobehavioral Toxicology 23, 14–23. <https://doi.org/10.1002/bdrc.21027>
- Barry, M.J., 2013. Effects of fluoxetine on the swimming and behavioural responses of the Arabian killifish. *Ecotoxicology* 22, 425–432. <https://doi.org/10.1007/s10646-012-1036-7>

- Baumans, V., 2004. Use of animals in experimental research: An ethical dilemma? *Gene Ther.* 11, S64–S66. <https://doi.org/10.1038/sj.gt.3302371>
- Berg, C., Backström, T., Winberg, S., Lindberg, R., Brandt, I., 2013. Developmental Exposure to Fluoxetine Modulates the Serotonin System in Hypothalamus. *PLoS One* 8. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0055053>
- Besse, J.P., Kausch-Barreto, C., Garric, J., 2008. Exposure assessment of pharmaceuticals and their metabolites in the aquatic environment: Application to the French situation and preliminary prioritization. *Hum. Ecol. Risk Assess.* 14, 665–695. <https://doi.org/10.1080/10807030802235078>
- Bisesi, J.H., Sweet, L.E., van den Hurk, P., Klaine, S.J., 2016. Effects of an antidepressant mixture on the brain serotonin and predation behavior of hybrid striped bass. *Environ. Toxicol. Chem.* 35, 938–945. <https://doi.org/10.1002/etc.3114>
- Blair, B.D., Crago, J.P., Hedman, C.J., Klaper, R.D., 2013. Pharmaceuticals and personal care products found in the Great Lakes above concentrations of environmental concern. *Chemosphere* 93, 2116–2123. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2013.07.057>
- Bossus, M.C., Guler, Y.Z., Short, S.J., Morrison, E.R., Ford, A.T., 2014. Behavioural and transcriptional changes in the amphipod *Echinogammarus marinus* exposed to two antidepressants, fluoxetine and sertraline. *Aquat. Toxicol.* 151, 46–56. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2013.11.025>
- Bozkurt, G., Abay, E., Ates, I., Karabogaz, G., Ture, M., Savran, F.O., Palanduz, S., Temocin, K., Algunes, C., 2004. Clastogenicity of selective serotonin-reuptake inhibitors. *Mutat. Res. - Genet. Toxicol. Environ. Mutagen.* 558, 137–144. <https://doi.org/10.1016/j.mrgentox.2003.11.005>
- Bradford, M., 1976. Rapid and Sensitive Method for Quantification of Microgram Quantities of Protein utilizing principle of Protein-Dye-Binding. *Anal. Biochem.* 72, 248–254.
- Bringolf, R.B., Heltsley, R.M., Newton, T.J., Eads, C.B., Fraley, S.J., Shea, D., Cope, W.G., 2010. Environmental occurrence and reproductive effects of the pharmaceutical fluoxetine in native freshwater mussels. *Environ. Toxicol. Chem.* 29, 1311–1318. <https://doi.org/10.1002/etc.157>

- Brodin, T., Piovano, S., Fick, J., Klaminder, J., Heynen, M., Heynen, M., Jonsson, M., 2014. Ecological effects of pharmaceuticals in aquatic systems — impacts through behavioural alterations. *Philos. Trans. R. Publ. Soc. B* 369, 20130580. <https://doi.org/10.1098/rstb.2013.0580>
- Brooks, B.W., Foran, C.M., Richards, S.M., Weston, J., Turner, P.K., Stanley, J.K., Solomon, K.R., Slattery, M., La Point, T.W., 2003. Aquatic ecotoxicology of fluoxetine. *Toxicol. Lett.* 142, 169–183. [https://doi.org/10.1016/S0378-4274\(03\)00066-3](https://doi.org/10.1016/S0378-4274(03)00066-3)
- Calisto, V., Esteves, V.I., 2009. Psychiatric pharmaceuticals in the environment. *Chemosphere*. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2009.09.021>
- Campos, B., Rivetti, C., Kress, T., Barata, C., Dirksen, H., 2016. Depressing antidepressant: Fluoxetine affects serotonin neurons causing adverse reproductive responses in *Daphnia magna*. *Environ. Sci. Technol.* [acs.est.6b00826](https://doi.org/10.1021/acs.est.6b00826). <https://doi.org/10.1021/acs.est.6b00826>
- Carrasco, K.R., Tilbury, K.L., Myers, M.S., 1990. Assessment of the Piscine Micronucleus Test as an in situ.
- Costagliola, C., Parmeggiani, F., Semeraro, F., Sebastiani, A., 2008. Selective serotonin reuptake inhibitors: a review of its effects on intraocular pressure. *Curr. Neuropharmacol.* 6, 293–310. <https://doi.org/10.2174/157015908787386104>
- Cowden, J., Padnos, B., Hunter, D., Macphail, R., Jensen, K., Padilla, S., 2012. Developmental exposure to valproate and ethanol alters locomotor activity and retino-tectal projection area in zebrafish embryos. *Reprod. Toxicol.* 33, 165–173. <https://doi.org/10.1016/j.reprotox.2011.11.111>
- Cunha, V., Rodrigues, P., Santos, M.M., Moradas-Ferreira, P., Ferreira, M., 2016. Danio rerio embryos on Prozac ??? Effects on the detoxification mechanism and embryo development. *Aquat. Toxicol.* 178, 182–189. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2016.08.003>
- Domingues, I., Oliveira, R., Lourenço, J., Koppe, C., Mendo, S., Soares, A.M.V.M., 2010. Comparative Biochemistry and Physiology, Part C Biomarkers as a tool to assess effects

- of chromium (VI): Comparison of responses in zebra fish early life stages and adults ☆.
Comp. Biochem. Physiol. Part C 152, 338–345.
<https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2010.05.010>
- Egan, R.J., Bergner, C.L., Hart, P.C., Cachat, J.M., Canavello, P.R., Elegante, M.F., Elkhayat, S.I., Bartels, B.K., Tien, A.K., Tien, D.H., Mohnot, S., Beeson, E., Glasgow, E., Amri, H., Zukowska, Z., Kalueff, A. V., 2009. Understanding behavioral and physiological phenotypes of stress and anxiety in zebrafish. *Behav. Brain Res.* 205, 38–44. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2009.06.022>
- ELLMAN, G.L., COURTNEY, K.D., ANDRES, V., FEATHER-STONE, R.M., 1961. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochem. Pharmacol.* 7, 88–95. [https://doi.org/10.1016/0006-2952\(61\)90145-9](https://doi.org/10.1016/0006-2952(61)90145-9)
- Engeszer, R.E., Patterson, L.B., Rao, A.A., Parichy, D.M., 2007. Zebrafish in The Wild: A Review of Natural History And New Notes from The Field. *Zebrafish* 4, 21–40. <https://doi.org/10.1089/zeb.2006.9997>
- Fenech, M., 2000. The in vitro micronucleus technique. *Mutat. Res. Mol. Mech. Mutagen.* 455, 81–95.
- Fent, K., Weston, A. a., Caminada, D., 2006. Ecotoxicology of human pharmaceuticals. *Aquat. Toxicol.* 76, 122–159. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2005.09.009>
- Fong, P.P., Ford, A.T., 2014. The biological effects of antidepressants on the molluscs and crustaceans: A review. *Aquat. Toxicol.* 151, 4–13. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2013.12.003>
- Fonseka, T.M., Wen, X., Foster, J.A., Kennedy, S.H., 2016. Review Zebrafish Models of Major Depressive Disorders 14, 3–14. <https://doi.org/10.1002/jnr.23639>
- Ford, A.T., Fong, P.P., 2015. The effects of antidepressants appear to be rapid and at environmentally relevant concentrations. *Environ. Toxicol. Chem.* n/a-n/a. <https://doi.org/10.1002/etc.3087>
- Forsatkar, M.N., Nematollahi, M.A., Amiri, B.M., Huang, W. Bin, 2014. Fluoxetine inhibits aggressive behaviour during parental care in male fighting fish (*Betta splendens*,

- Regan). *Ecotoxicology* 23, 1794–1802. <https://doi.org/10.1007/s10646-014-1345-0>
- Galus, M., Kirischian, N., Higgins, S., Purdy, J., Chow, J., Rangaranjan, S., Li, H., Metcalfe, C., Wilson, J.Y., 2013. Chronic, low concentration exposure to pharmaceuticals impacts multiple organ systems in zebrafish. *Aquat. Toxicol.* 132–133, 200–211. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2012.12.021>
- Gonzalez Alonso, S., Catal, M., Maroto, R.R., Gil, J.L.R., de Miguel, R.G., Valcárcel, Y., 2010. Pollution by psychoactive pharmaceuticals in the Rivers of Madrid metropolitan area (Spain). *Environ. Int.* 36, 195–201. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2009.11.004>
- Groh, K.J., Carvalho, R.N., Chipman, J.K., Denslow, N.D., Halder, M., Murphy, C.A., Roelofs, D., Rolaki, A., Schirmer, K., Watanabe, K.H., 2015. Development and application of the adverse outcome pathway framework for understanding and predicting chronic toxicity: I. Challenges and research needs in ecotoxicology. *Chemosphere* 120, 764–777. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2014.09.068>
- Gunnarsson, L., Jauhiainen, A., Kristiansson, E., Nerman, O., Larsson, D.G.J., 2008. Evolutionary conservation of human drug targets in organisms used for environmental risk assessments. *Environ. Sci. Technol.* 42, 5807–5813. <https://doi.org/10.1021/es8005173>
- Halford, J.C.G., Harrold, J.A., Lawton, C.L., Blundell, J.E., 2005. Serotonin (5-HT) Drugs : Effects on Appetite Expression and Use for the Treatment of Obesity 201–213.
- Hallare, A. V., Schirling, M., Luckenbach, T., Köhler, H.R., Triebskorn, R., 2005. Combined effects of temperature and cadmium on developmental parameters and biomarker responses in zebrafish (*Danio rerio*) embryos. *J. Therm. Biol.* 30, 7–17. <https://doi.org/10.1016/j.jtherbio.2004.06.002>
- Hartwig, C., Muth-Köhne, E., Düring, R.-A., 2013. Screening for ecotoxicological effects of antiepileptic drugs in biologically treated waste water originating from an epilepsy ward by *Danio rerio* embryos. *Environ. Sci. Eur.* 25, 29. <https://doi.org/10.1186/2190-4715-25-29>
- Hazelton, P.D., Du, B., Haddad, S.P., Fritts, A.K., Chambliss, C.K., Brooks, B.W., Bringolf, R.B., 2014. Chronic fluoxetine exposure alters movement and burrowing in adult

- freshwater mussels. *Aquat. Toxicol.* 151, 27–35.
<https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2013.12.019>
- Heberer, T., 2002. Occurrence, fate, and removal of pharmaceutical residues in the aquatic environment: a review of recent research data. *Toxicol. Lett.* 131, 5–17.
[https://doi.org/10.1016/S0378-4274\(02\)00041-3](https://doi.org/10.1016/S0378-4274(02)00041-3)
- Henriques, J.F., Rita, A., Andrade, T., Koba, O., Golovko, O., Soares, A.M.V.M., Oliveira, M., Domingues, I., 2015. Effects of the lipid regulator drug gemfibrozil: A toxicological and behavioral perspective. *Aquat. Toxicol.*
<https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2015.09.017>
- Henry, T.B., Black, M.C., 2008. Acute and chronic toxicity of fluoxetine (selective serotonin reuptake inhibitor) in western Mosquitofish. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 54, 325–330. <https://doi.org/10.1007/s00244-007-9018-0>
- Hernando, M.D., Mezcuca, M., Fernández-Alba, A.R., Barceló, D., 2006. Environmental risk assessment of pharmaceutical residues in wastewater effluents, surface waters and sediments. *Talanta* 69, 334–342. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2005.09.037>
- Hooftman and Raat, 1982. Induction of nuclear anomalies (micronuclei) in the peripheral blood erythrocytes of the eastern mudminnow *Umbra pygmaea* by ethyl methanesulphonate 104, 147–152.
- Irons, T.D., MacPhail, R.C., Hunter, D.L., Padilla, S., 2010. Acute neuroactive drug exposures alter locomotor activity in larval zebrafish. *Neurotoxicol. Teratol.* 32, 84–90.
<https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/j.ntt.2009.04.066>
- ISO, 2007. 15088: Water quality - Determination fo the acute toxicity of waste to zebrafish eggs (*Danio rerio*). *Int. Stand.*
- Jesus, F.T., Oliveira, R., Silva, A., Catarino, A.L., Soares, A.M.V.M., Nogueira, A.J.A., Domingues, I., 2013. Lethal and sub lethal effects of the biocide chlorhexidine on aquatic organisms. *Ecotoxicology* 22, 1348–1358. <https://doi.org/10.1007/s10646-013-1121-6>
- Junior, C., Junior, I.L.C., Pletsch, A.L., Torres, R., 2014. Artigo Ocorrência de Fármacos

Antidepressivos no Meio Ambiente - Revisão Ocorrência de Fármacos Antidepressivos no Meio Ambiente - Revisão 6, 1408–1431. <https://doi.org/10.5935/1984-6835.20140092>

Kalueff, A. V., Echevarria, D.J., Homechaudhuri, S., Stewart, A.M., Collier, A.D., Kaluyeva, A.A., Li, S., Liu, Y., Chen, P., Wang, J.J., Yang, L., Mitra, A., Pal, S., Chaudhuri, A., Roy, A., Biswas, M., Roy, D., Podder, A., Poudel, M.K., Katare, D.P., Mani, R.J., Kyzar, E.J., Gaikwad, S., Nguyen, M., Song, C., 2016. Zebrafish neurobehavioral phenomics for aquatic neuropharmacology and toxicology research. *Aquat. Toxicol.* 170, 297–309. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2015.08.007>

Kalueff, A. V., Stewart, A.M., Gerlai, R., 2014. Zebrafish as an emerging model for studying complex brain disorders. *Trends Pharmacol. Sci.* 1–13. <https://doi.org/10.1016/j.tips.2013.12.002>

Kimmel, C.B., Ballard, W.W., Kimmel, S.R., Ullmann, B., Schilling, T.F., 1995. Stages of Embryonic Development of the Zebrafish. *World Wide Web Internet Web Inf. Syst.* 10.

Klaper, W.I. and, 2015. Environmental concentrations of the selective serotonin reuptake inhibitor fluoxetine impact specific behaviors involved in reproduction, feeding and predator avoidance in the fish *Pimephales promelas* (fathead minnow) 77–83. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2013.10.012>. Environmental

Klüver, 2015. Fish Embryo Toxicity Test: Identification of Compounds with Weak Toxicity and Analysis of Behavioral Effects To Improve Prediction of Acute Toxicity for Neurotoxic Compounds. <https://doi.org/10.1021/acs.est.5b01910>

Kolpin, D.W., Kolpin, D.W., Furlong, E.T., Furlong, E.T., Meyer, M.T., Meyer, M.T., 2002. *Environ. Sci. Technol.* 2002, 36, 1202–1211. *Environ. Sci. Technol.* 36, 1202–1211. <https://doi.org/10.1021/es011055j>

Lammer, E., Carr, G.J., Wendler, K., Rawlings, J.M., Belanger, S.E., Braunbeck, T., 2009. Is the fish embryo toxicity test (FET) with the zebrafish (*Danio rerio*) a potential alternative for the fish acute toxicity test? *Comp. Biochem. Physiol. - C Toxicol. Pharmacol.* 149, 196–209. <https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2008.11.006>

Lister, A., Regan, C., Van Zwol, J., Van Der Kraak, G., 2009. Inhibition of egg production

- in zebrafish by fluoxetine and municipal effluents: A mechanistic evaluation. *Aquat. Toxicol.* 95, 320–329. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2009.04.011>
- Little, E., Finger, S., 1990. Swimming behavior as an indicator of sublethal toxicity in fish. *Environ. Toxicol. Chem.* 9, 13–19. <https://doi.org/10.1002/etc.5620090103>
- Magno, L.D.P., Fontes, A., Gonçalves, B.M.N., Gouveia, A., 2015. Pharmacological study of the light/dark preference test in zebrafish (*Danio rerio*): Waterborne administration. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 135, 169–176. <https://doi.org/10.1016/j.pbb.2015.05.014>
- Margiotta-casaluci, L., Owen, S.F., Cumming, R.I., Polo, A. De, Winter, M.J., Panter, G.H., Rand-weaver, M., Sumpter, J.P., 2014. Quantitative Cross-Species Extrapolation between Humans and Fish: The Case of the Anti-Depressant Fluoxetine 9. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0110467>
- Mauter, M., Elimelech, M., 2008. Environmental applications of carbon-based nanomaterials. *Environ. Sci. Technol.* 42, 5843–5859. <https://doi.org/10.1021/es8006904>
- Maximino, C., da Silva, A.W.B., Gouveia, A., Herculano, A.M., 2011. Pharmacological analysis of zebrafish (*Danio rerio*) scototaxis. *Prog. Neuro-Psychopharmacology Biol. Psychiatry* 35, 624–631. <https://doi.org/10.1016/j.pnpbp.2011.01.006>
- Maximino, C., Puty, B., Benzecry, R., Arajo, J., Lima, M.G., De Jesus Oliveira Batista, E., Renata De Matos Oliveira, K., Crespo-Lopez, M.E., Herculano, A.M., 2013. Role of serotonin in zebrafish (*Danio rerio*) anxiety: Relationship with serotonin levels and effect of buspirone, WAY 100635, SB 224289, fluoxetine and para-chlorophenylalanine (pCPA) in two behavioral models. *Neuropharmacology* 71, 83–97. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2013.03.006>
- Melo, K.M., Oliveira, R., Grisolia, C.K., Domingues, I., Pieczarka, J.C., Filho, J.D.S., Nagamachi, C.Y., 2015. Short-term exposure to low doses of rotenone induces developmental, biochemical, behavioral, and histological changes in fish. <https://doi.org/10.1007/s11356-015-4596-2>
- Mennigen, J.A., Harris, E.A., Chang, J.P., Moon, T.W., Trudeau, V.L., 2009. Fluoxetine affects weight gain and expression of feeding peptides in the female goldfish brain.

- Regul. Pept. 155, 99–104. <https://doi.org/10.1016/j.regpep.2009.01.001>
- Mennigen, J.A., Sassine, J., Trudeau, V.L., Moon, T.W., 2010. Waterborne fluoxetine disrupts feeding and energy metabolism in the goldfish *Carassius auratus*. *Aquat. Toxicol.* 100, 128–137. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2010.07.022>
- Meshalkina, D.A., Kysil, E. V., Antonova, K.A., Demin, K.A., Kolesnikova, T.O., Khatsko, S.L., Gainetdinov, R.R., Alekseeva, P.A., Kalueff, A. V., 2018. The Effects of Chronic Amitriptyline on Zebrafish Behavior and Monoamine Neurochemistry. *Neurochem. Res.* 0, 1–9. <https://doi.org/10.1007/s11064-018-2536-5>
- Messiha, F.S., 1993. Fluoxetine: A spectrum of clinical applications and postulates of underlying mechanisms. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 17, 385–396. [https://doi.org/10.1016/S0149-7634\(05\)80115-0](https://doi.org/10.1016/S0149-7634(05)80115-0)
- Metcalf, C.D., Miao, X.-S., Koenig, B.G., Struger, J., 2003. Distribution of acidic and neutral drugs in surface waters near sewage treatment plants in the lower Great Lakes, Canada. *Environ. Toxicol. Chem.* 22, 2881–2889. <https://doi.org/10.1897/02-627>
- Minguez, L., Farcy, E., Ballandonne, C., Lepailleur, A., Serpentine, A., Lebel, J.M., Bureau, R., Halm-Lemeille, M.P., 2014. Acute toxicity of 8 antidepressants: What are their modes of action? *Chemosphere* 108, 314–319. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2014.01.057>
- Mitrovic-Tutundzic, P., 1994. Fish gills as a monitor of sublethal and chronic effects of pollution. In: *Sublethal and Chronic Effects of Pollutants on Freshwater Fish* 339–352.
- Moon, T.W., Walsh, P.J., Mommsen, T.P., 1985. Fish Hepatocytes : A Model Metabolic System 42.
- Morando, M.B., Medeiros, L.R., McDonald, M.D., 2009. Fluoxetine treatment affects nitrogen waste excretion and osmoregulation in a marine teleost fish (DOI:10.1016/j.aquatox.2009.03.011). *Aquat. Toxicol.* 95, 164–171. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2009.10.015>
- OECD, 2013. Test No. 236: Fish Embryo Acute Toxicity (FET) Test. OECD Guidel. Test. Chem. Sect. 2, OECD Publ. 1–22. <https://doi.org/10.1787/9789264203709-en>

- OECD, 2000. Oecd guideline for the testing of chemicals 301, 231–236.
- OECD, 1992a. Fish, acute toxicity test. Guidel. Test. Chem. 1–9.
<https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1787/9789264069961-en>
- OECD, 1992b. Oecd guideline for testing of chemicals 1–13.
- Paterson, G., Metcalfe, C.D., 2008. Uptake and depuration of the anti-depressant fluoxetine by the Japanese medaka (*Oryzias latipes*). *Chemosphere* 74, 125–130.
<https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2008.08.022>
- Pei, S., Liu, L., Zhong, Z., Wang, H., Lin, S., Shang, J., 2016. Risk of prenatal depression and stress treatment: alteration on serotonin system of offspring through exposure to Fluoxetine. *Sci. Rep.* 6, 33822. <https://doi.org/10.1038/srep33822>
- Pettorelli, N., Coulson, T., Durant, S.M., Gaillard, J.M., 2011. Predation, individual variability and vertebrate population dynamics. *Oecologia* 167, 305–314.
<https://doi.org/10.1007/s00442-011-2069-y>
- Prieto, M.J., Gutierrez, H.C., Arévalo, R.A., Chiaramoni, N.S., del Valle Alonso, S., 2012. Effect of risperidone and fluoxetine on the movement and neurochemical changes of zebrafish.
- Quinn, T.P., Peterson, N.P., 1996. The influence of habitat complexity and fish size on over-winter survival and growth of individually marked juvenile coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*) in Big Beef Creek, Washington. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 53, 1555–1564. <https://doi.org/10.1139/f96-092>
- Rand-weaver, M., Margiotta-casaluci, L., Patel, A., Panter, G.H., Owen, S.F., Sumpter, J.P., 2013. The Read-Across Hypothesis and Environmental Risk Assessment of Pharmaceuticals.
- Richendrfer, H., Creton, R., 2017. Cluster analysis profiling of behaviors in zebrafish larvae treated with antidepressants and pesticides. *Neurotoxicol. Teratol.*
<https://doi.org/10.1016/j.ntt.2017.10.009>
- Rideout, R.M., Morgan, M.J., 2010. Relationships between maternal body size, condition and potential fecundity of four north-west Atlantic demersal fishes. *J. Fish Biol.* 76,

1379–1395. <https://doi.org/10.1111/j.1095-8649.2010.02570.x>

- Rivetti, C., Campos, B., Barata, C., 2016. Low environmental levels of neuro-active pharmaceuticals alter phototactic behaviour and reproduction in *Daphnia magna*. *Aquat. Toxicol.* 170, 289–296. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2015.07.019>
- Rossi, A., Barraco, A., Donda, P., 2004. Fluoxetine: A review on evidence based medicine. *Ann. Gen. Hosp. Psychiatry* 3, 1–8. <https://doi.org/10.1186/1475-2832-3-2>
- Sabbioni, C., Bugamelli, F., Varani, G., Mercolini, L., Musenga, A., Saracino, M.A., Fanali, S., Raggi, M.A., 2004. A rapid HPLC-DAD method for the analysis of fluoxetine and norfluoxetine in plasma from overdose patients. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 36, 351–356. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2004.06.008>
- Sauv??, S., Desrosiers, M., 2014. A review of what is an emerging contaminant. *Chem. Cent. J.* 8, 1–7. <https://doi.org/10.1186/1752-153X-8-15>
- Scholz, S., Fischer, S., Gündel, U., 2008. The zebrafish embryo model in environmental risk assessment — applications beyond acute toxicity testing 394–404. <https://doi.org/10.1007/s11356-008-0018-z>
- Schoots, A.F.M., Meijer, R.C., Denucb, J.M., 1983. Dopaminergic Regulation of Hatching in Fish Embryos 63, 59–63.
- Schultz, M.M., Furlong, E.T., 2008. Trace Analysis of Antidepressant Pharmaceuticals and Their Select Degradates in Environmental Matrices by LC / ESI / MS / MS a) b. *Anal. Chem.* 80, 1756–1762. <https://doi.org/10.1021/ac702154e>
- Schultz, M.M., Furlong, E.T., Kolpin, D.W., Werner, S.L., Schoenfuss, H.L., Barber, L.B., Blazer, V.S., Norris, D.O., Vajda, A.M., 2010. Antidepressant pharmaceuticals in two U.S. effluent-impacted streams: Occurrence and fate in water and sediment and selective uptake in fish neural tissue. *Environ. Sci. Technol.* 44, 1918–1925. <https://doi.org/10.1021/es9022706>
- Schultz, M.M., Painter, M.M., Bartell, S.E., Logue, A., Furlong, E.T., Werner, S.L., Schoenfuss, H.L., 2011. Selective uptake and biological consequences of environmentally relevant antidepressant pharmaceutical exposures on male fathead

- minnows. *Aquat. Toxicol.* 104, 38–47. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2011.03.011>
- SPSS, 2004. Sigma stat for windows (version 3.10).
- Stegeman, J.J., Lecht, J.J., 1991. P-450 Cytochrome in Aquatic Systems Monooxygenase Species : Carcinogen Biomarkers for Pollutant Exposure. *Environ. Heal.* 90, 101–109. <https://doi.org/10.2307/3430851>
- Stewart, A.M., et al. 2014, 2014. Aquatic toxicology of fluoxetine: Understanding the knowns and the unknowns. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2014.08.014>
- Teh, S.J., Adams, S.M., Hinton, D.E., 1997. Histopathologic biomarkers in feral freshwater fish populations exposed to different types of contaminant stress. *Aquat. Toxicol.* 37, 51–70. [https://doi.org/10.1016/S0166-445X\(96\)00808-9](https://doi.org/10.1016/S0166-445X(96)00808-9)
- Tierney, K.B., 2011. Behavioural assessments of neurotoxic effects and neurodegeneration in zebrafish. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Basis Dis.* 1812, 381–389. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2010.10.011>
- Ton, C., Lin, Y., Willett, C., 2006. Zebrafish as a model for developmental neurotoxicity testing. *Birth Defects Res. Part A - Clin. Mol. Teratol.* 76, 553–567. <https://doi.org/10.1002/bdra.20281>
- Triebkorn, R., Köhler, H.R., Honnen, W., Schramm, M., Adams, S.M., Müller, E.F., 1997. Induction of heat shock proteins, changes in liver ultrastructure, and alterations of fish behavior: Are these biomarkers related and are they useful to reflect the state of pollution in the field? *J. Aquat. Ecosyst. Stress Recover.* 6, 57–73. <https://doi.org/10.1023/A:1008224301117>
- USEPA, 2016. Pesticide ecotoxicity database, formerly: environmental effects database (EEDB). Environ Fate Eff Div U S EPA.
- Vanderford, B. and, Snyder, S.A., 2006. Analysis of Pharmaceuticals in Water by Isotope Dilution Liquid Chromatography / Tandem Mass 40, 7312–7320.
- Warner, R.E., Peterson, K.K., Borgman, L., 1966. Behavioural pathology in fish: a quantitative study of sublethal pesticide toxication. *J. Appl. Ecol.* 3, 223–247. <https://doi.org/10.2307/2401462>

- Waugh, T.A., Horstick, E., Hur, J., Jackson, S.W., Davidson, A.E., Li, X., Dowling, J.J., 2014. Fluoxetine prevents dystrophic changes in a zebrafish model of duchenne muscular dystrophy. *Hum. Mol. Genet.* 23, 4651–4662. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddu185>
- Weinberger, J., Klaper, R., 2014. Environmental concentrations of the selective serotonin reuptake inhibitor fluoxetine impact specific behaviors involved in reproduction, feeding and predator avoidance in the fish *Pimephales promelas* (fathead minnow). *Aquat. Toxicol.* 151, 77–83. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2013.10.012>
- Weis, J.S., 2014. Delayed Behavioral Effects of Early Life Toxicant Exposures in Aquatic Biota 165–187. <https://doi.org/10.3390/toxics2020165>
- Winberg, S., Thörnqvist, P.O., 2016. Role of brain serotonin in modulating fish behavior. *Curr. Zool.* 62, 317–323. <https://doi.org/10.1093/cz/zow037>
- Winder, V.L., Pennington, P.L., Hurd, M.W., Wirth, E.F., 2011. Fluoxetine effects on sheepshead minnow (*Cyprinodon variegatus*) locomotor activity. *J. Environ. Sci. Heal. Part B* 47, 51–58. <https://doi.org/10.1080/03601234.2012.607767>
- Wong, K., Elegante, M., Bartels, B., Elkhayat, S., Tien, D., Roy, S., Goodspeed, J., Suci, C., Tan, J., Grimes, C., Chung, A., Rosenberg, M., Gaikwad, S., Denmark, A., Jackson, A., Kadri, F., Chung, K.M., Stewart, A., Gilder, T., Beeson, E., Zapolsky, I., Wu, N., Cachat, J., Kalueff, A. V., 2010. Analyzing habituation responses to novelty in zebrafish (*Danio rerio*). *Behav. Brain Res.* 208, 450–457. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2009.12.023>
- Wong, R.Y., Oxendine, S.E., Godwin, J., 2013. Behavioral and neurogenomic transcriptome changes in wild-derived zebrafish with fluoxetine treatment. *BMC Genomics* 14, 348. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-14-348>
- Wu, M., Liu, S., Hu, L., Qu, H., Pan, C., Lei, P., Shen, Y., Yang, M., 2017. Global transcriptomic analysis of zebrafish in response to embryonic exposure to three antidepressants, amitriptyline, fluoxetine and mianserin. *Aquat. Toxicol.* 192, 274–283. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2017.09.027>
- Zhang, D., Wei, S., Kaila, C., Su, X., Wu, J., Karki, A.B., Young, D.P., Guo, Z., 2010.

Carbon-stabilized iron nanoparticles for environmental remediation. *Nanoscale* 2, 917–919. <https://doi.org/10.1039/c0nr00065e>

Considerações finais e perspectivas futuras

O presente trabalho perpassa pelos efeitos agudos e crônicos da exposição do modelo vertebrado aquático peixe-zebra (*Danio rerio*) à FLX. Esta espécie representa um excelente modelo para compreender os mecanismos farmacológicos da FLX, mostrando-se útil para rastrear os efeitos neurotóxicos e ecotoxicológicos *in vivo* do fármaco avaliado no presente estudo (Wu et al., 2017; Fonseka et al., 2016; Kalueff et al., 2016, 2014).

Após uma exposição à curto prazo, a FLX alterou o desenvolvimento e causou efeitos neurotóxicos nos estágios iniciais do peixe-zebra, inibição da colinesterase, em concentrações tão baixas quanto 6 µg/L, concentração esta que se encontra na gama das concentrações de FLX frequentemente detectadas em amostras ambientais (Blair et al., 2013; Bringolf et al., 2010; Heberer, 2002; Metcalfe et al., 2003; Weinberger and Klaper, 2014), sugerindo que as características morfológicas e fisiológicas dos estágios iniciais de vida dos peixes podem ser prejudicadas em cenários reais de exposição, como previamente descrito por outros autores na literatura (Airhart et al., 2007; Prieto et al., 2012; Magno et al., 2015; Cunha et al., 2016). Além disso, as larvas de peixe-zebra mostraram-se mais sensíveis à FLX (LOEC 0,88 µg/L) do que os organismos adultos (LOEC 10 µg/L), em termos de comportamento, provavelmente devido ao fato de que o sistema nervoso central das larvas ainda está em processo de desenvolvimento (**Figura 14**). O ensaio de embriões/larvas foi indicativo de possíveis efeitos da FLX sobre a dinâmica populacional de *D. rerio*, pois afetaria significativamente os embriões e larvas, originando peixes com poucas chances de sobrevivência e de período de vida curto.

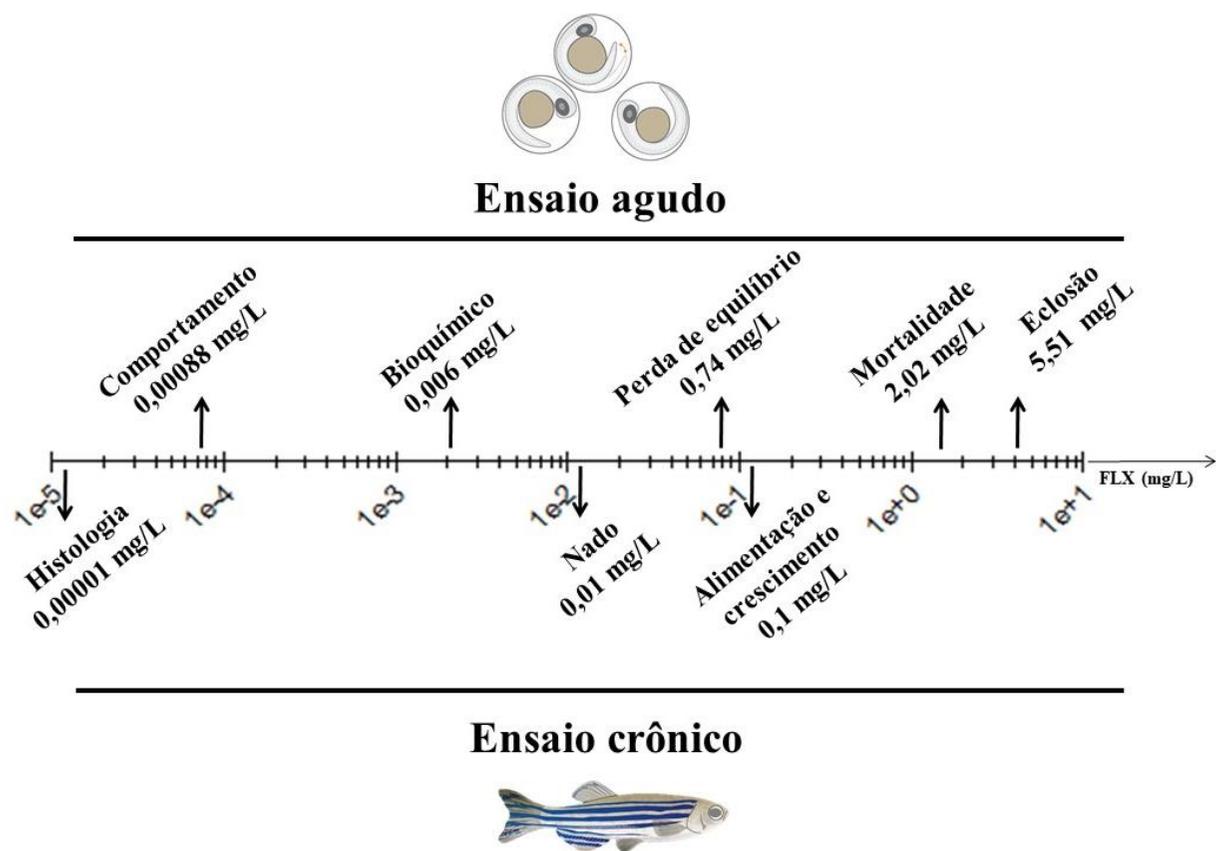


Figura 14. Comparação da sensibilidade dos parâmetros utilizados no presente estudo para avaliar a toxicidade da fluoxetina em embriões/larvas e juvenis de *Danio rerio*.

Os riscos para as espécies aquáticas expostas por longos períodos, em baixas concentrações de FLX ainda não estão completamente elucidados. Desta forma, em busca de aprimorar os resultados do presente trabalho, em um segundo momento realizou-se estudos com enfoque na avaliação da toxicidade da FLX em um cenário de exposição crônica com juvenis de *D. rerio*, para desvendar como as alterações observadas nos indivíduos durante podem se traduzir efeitos ecológicos nas comunidades aquáticas. Uma vez que os padrões de comportamento estão intimamente associados à aptidão do indivíduo no ambiente, os ensaios comportamentais se apresentam como uma ferramenta confiável e útil para observar alterações nos padrões comportamentais do peixe-zebra (Egan et al., 2009; Maximino et al., 2013; Wong et al., 2013; Brodin et al., 2014). No presente estudo foi possível observar as possíveis consequências ecológicas atreladas à um comportamento de nado alterado, que podem por exemplo mudar os padrões do comportamento alimentar e, conseqüentemente, inibir o crescimento das populações de peixe (LOEC 100 µg/L). Ademais as alterações histológicas observadas no fígado e no intestino (0,01 µg/L) podem comprometer as funções vitais dos órgãos. Desta forma, a longo prazo, a exposição à FLX pode desencadear um desequilíbrio ecológico capaz de alterar a forma como os organismos aquáticos desempenham suas funções nos ecossistemas.

Os resultados obtidos confirmam a necessidade da avaliação dos efeitos da FLX em regimes de exposição aguda e crônica. A avaliação dos efeitos agudos permite traçar os níveis de toxicidade da FLX e compreender os mecanismos de ação do composto (Paterson and Metcalfe, 2008; Winder et al., 2011; Minguez et al., 2014; Bisesi et al., 2016). Partindo deste ponto é possível esmiuçar os efeitos da FLX, a partir do refinamento dos bioensaios em períodos longos de exposição, utilizando concentrações sub-letais capazes de fornecer

informações até mesmo à nível molecular. Pesquisas adicionais devem se concentrar na investigação de mecanismos moleculares envolvidos na ação da FLX, pois pouco se conhece sobre os eventos moleculares associados à resposta celular atribuída à exposição a fármacos em peixes.

Por fim, pensando em um panorama mais global, onde a proteção efetiva dos ecossistemas aquáticos é fundamental para o bem estar humano, outros estudos são necessários para contribuir na redefinição de prioridades e na concepção de futuras políticas públicas para biomonitoramento das concentrações e seus dos efeitos, além do desenvolvimento e uso de tratamentos terciários eficientes na remoção de fármacos em ETEs (ex: filtros nanoestruturados de carbono, membranas de filtração e carvão ativado) (Mauter and Elimelech, 2008; Zhang et al., 2010).

Referências Bibliográficas

- Airhart, M.J., Lee, D.H., Wilson, T.D., Miller, B.E., Miller, M.N., Skalko, R.G., 2007. Movement disorders and neurochemical changes in zebrafish larvae after bath exposure to fluoxetine (PROZAC). *Neurotoxicol. Teratol.* 29, 652–664. <https://doi.org/10.1016/j.ntt.2007.07.005>
- Alsop, D., Wood, C.M., 2013. Metal and pharmaceutical mixtures: Is ion loss the mechanism underlying acute toxicity and widespread additive toxicity in zebrafish? *Aquat. Toxicol.* 140–141, 257–267. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2013.05.021>
- Andrade, T.S., Henriques, J.F., Rita, A., Luísa, A., Koba, O., Thai, P., Soares, A.M.V.M., Domingues, I., 2015. Carbendazim exposure induces developmental, biochemical and behavioural disturbance in zebrafish embryos. *Aquat. Toxicol.* <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2015.11.017>

- Aus der Beek, T., Weber, F.-A., Bergmann, A., Hickmann, S., Ebert, I., Hein, A., Küster, A., 2015a. Pharmaceuticals in the environment - global occurrences and perspectives. *Environ. Toxicol. Chem.* 35, n/a-n/a. <https://doi.org/10.1002/etc.3339>
- Aus der Beek, T., Weber, F.-A., Bergmann, A., Hickmann, S., Ebert, I., Hein, A., Küster, A., 2015b. Pharmaceuticals in the environment - global occurrences and perspectives. *Environ. Toxicol. Chem.* n/a-n/a. <https://doi.org/10.1002/etc.3339>
- Bailey, J., Oliveri, A., Levin, E.D., 2013. Zebrafish Model Systems for Developmental Neurobehavioral Toxicology 23, 14–23. <https://doi.org/10.1002/bdrc.21027>
- Barry, M.J., 2013. Effects of fluoxetine on the swimming and behavioural responses of the Arabian killifish. *Ecotoxicology* 22, 425–432. <https://doi.org/10.1007/s10646-012-1036-7>
- Baumans, V., 2004. Use of animals in experimental research: An ethical dilemma? *Gene Ther.* 11, S64–S66. <https://doi.org/10.1038/sj.gt.3302371>
- Berg, C., Backström, T., Winberg, S., Lindberg, R., Brandt, I., 2013. Developmental Exposure to Fluoxetine Modulates the Serotonin System in Hypothalamus. *PLoS One* 8. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0055053>
- Besse, J.P., Kausch-Barreto, C., Garric, J., 2008. Exposure assessment of pharmaceuticals and their metabolites in the aquatic environment: Application to the French situation and preliminary prioritization. *Hum. Ecol. Risk Assess.* 14, 665–695. <https://doi.org/10.1080/10807030802235078>
- Bisesi, J.H., Sweet, L.E., van den Hurk, P., Klaine, S.J., 2016. Effects of an antidepressant mixture on the brain serotonin and predation behavior of hybrid striped bass. *Environ. Toxicol. Chem.* 35, 938–945. <https://doi.org/10.1002/etc.3114>
- Blair, B.D., Crago, J.P., Hedman, C.J., Klaper, R.D., 2013. Pharmaceuticals and personal care products found in the Great Lakes above concentrations of environmental concern. *Chemosphere* 93, 2116–2123. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2013.07.057>
- Bossus, M.C., Guler, Y.Z., Short, S.J., Morrison, E.R., Ford, A.T., 2014. Behavioural and

- transcriptional changes in the amphipod *Echinogammarus marinus* exposed to two antidepressants, fluoxetine and sertraline. *Aquat. Toxicol.* 151, 46–56. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2013.11.025>
- Bozkurt, G., Abay, E., Ates, I., Karabogaz, G., Ture, M., Savran, F.O., Palanduz, S., Temocin, K., Algunes, C., 2004. Clastogenicity of selective serotonin-reuptake inhibitors. *Mutat. Res. - Genet. Toxicol. Environ. Mutagen.* 558, 137–144. <https://doi.org/10.1016/j.mrgentox.2003.11.005>
- Bradford, M., 1976. Rapid and Sensitive Method for Quantification of Microgram Quantities of Protein utilizing principle of Protein-Dye-Binding. *Anal. Biochem.* 72, 248–254.
- Bringolf, R.B., Heltsley, R.M., Newton, T.J., Eads, C.B., Fraley, S.J., Shea, D., Cope, W.G., 2010. Environmental occurrence and reproductive effects of the pharmaceutical fluoxetine in native freshwater mussels. *Environ. Toxicol. Chem.* 29, 1311–1318. <https://doi.org/10.1002/etc.157>
- Brodin, T., Piovano, S., Fick, J., Klaminder, J., Heynen, M., Heynen, M., Jonsson, M., 2014. Ecological effects of pharmaceuticals in aquatic systems — impacts through behavioural alterations. *Philos. Trans. R. Publ. Soc. B* 369, 20130580. <https://doi.org/10.1098/rstb.2013.0580>
- Brooks, B.W., Foran, C.M., Richards, S.M., Weston, J., Turner, P.K., Stanley, J.K., Solomon, K.R., Slattey, M., La Point, T.W., 2003. Aquatic ecotoxicology of fluoxetine. *Toxicol. Lett.* 142, 169–183. [https://doi.org/10.1016/S0378-4274\(03\)00066-3](https://doi.org/10.1016/S0378-4274(03)00066-3)
- Calisto, V., Esteves, V.I., 2009. Psychiatric pharmaceuticals in the environment. *Chemosphere.* <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2009.09.021>
- Campos, B., Rivetti, C., Kress, T., Barata, C., Dircksen, H., 2016. Depressing antidepressant: Fluoxetine affects serotonin neurons causing adverse reproductive responses in *Daphnia magna*. *Environ. Sci. Technol.* [acs.est.6b00826](https://doi.org/10.1021/acs.est.6b00826). <https://doi.org/10.1021/acs.est.6b00826>
- Carrasco, K.R., Tilbury, K.L., Myers, M.S., 1990. Assessment of the Piscine Micronucleus Test as an in situ.

- Costagliola, C., Parmeggiani, F., Semeraro, F., Sebastiani, A., 2008. Selective serotonin reuptake inhibitors: a review of its effects on intraocular pressure. *Curr. Neuropharmacol.* 6, 293–310. <https://doi.org/10.2174/157015908787386104>
- Cowden, J., Padnos, B., Hunter, D., Macphail, R., Jensen, K., Padilla, S., 2012. Developmental exposure to valproate and ethanol alters locomotor activity and retinotectal projection area in zebrafish embryos. *Reprod. Toxicol.* 33, 165–173. <https://doi.org/10.1016/j.reprotox.2011.11.111>
- Cunha, V., Rodrigues, P., Santos, M.M., Moradas-Ferreira, P., Ferreira, M., 2016. Danio rerio embryos on Prozac ??? Effects on the detoxification mechanism and embryo development. *Aquat. Toxicol.* 178, 182–189. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2016.08.003>
- Domingues, I., Oliveira, R., Lourenço, J., Koppe, C., Mendo, S., Soares, A.M.V.M., 2010. Comparative Biochemistry and Physiology, Part C Biomarkers as a tool to assess effects of chromium (VI): Comparison of responses in zebra fish early life stages and adults ☆. *Comp. Biochem. Physiol. Part C* 152, 338–345. <https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2010.05.010>
- Egan, R.J., Bergner, C.L., Hart, P.C., Cachat, J.M., Canavello, P.R., Elegante, M.F., Elkhayat, S.I., Bartels, B.K., Tien, A.K., Tien, D.H., Mohnot, S., Beeson, E., Glasgow, E., Amri, H., Zukowska, Z., Kalueff, A. V., 2009. Understanding behavioral and physiological phenotypes of stress and anxiety in zebrafish. *Behav. Brain Res.* 205, 38–44. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2009.06.022>
- ELLMAN, G.L., COURTNEY, K.D., ANDRES, V., FEATHER-STONE, R.M., 1961. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochem. Pharmacol.* 7, 88–95. [https://doi.org/10.1016/0006-2952\(61\)90145-9](https://doi.org/10.1016/0006-2952(61)90145-9)
- Engeszer, R.E., Patterson, L.B., Rao, A.A., Parichy, D.M., 2007. Zebrafish in The Wild: A Review of Natural History And New Notes from The Field. *Zebrafish* 4, 21–40. <https://doi.org/10.1089/zeb.2006.9997>
- Fenech, M., 2000. The in vitro micronucleus technique. *Mutat. Res. Mol. Mech. Mutagen.*

455, 81–95.

- Fent, K., Weston, A. a., Caminada, D., 2006. Ecotoxicology of human pharmaceuticals. *Aquat. Toxicol.* 76, 122–159. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2005.09.009>
- Fong, P.P., Ford, A.T., 2014. The biological effects of antidepressants on the molluscs and crustaceans: A review. *Aquat. Toxicol.* 151, 4–13. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2013.12.003>
- Fonseka, T.M., Wen, X., Foster, J.A., Kennedy, S.H., 2016. Review Zebrafish Models of Major Depressive Disorders 14, 3–14. <https://doi.org/10.1002/jnr.23639>
- Ford, A.T., Fong, P.P., 2015. The effects of antidepressants appear to be rapid and at environmentally relevant concentrations. *Environ. Toxicol. Chem.* n/a-n/a. <https://doi.org/10.1002/etc.3087>
- Forsatkar, M.N., Nematollahi, M.A., Amiri, B.M., Huang, W. Bin, 2014. Fluoxetine inhibits aggressive behaviour during parental care in male fighting fish (*Betta splendens*, Regan). *Ecotoxicology* 23, 1794–1802. <https://doi.org/10.1007/s10646-014-1345-0>
- Galus, M., Kirischian, N., Higgins, S., Purdy, J., Chow, J., Rangaranjan, S., Li, H., Metcalfe, C., Wilson, J.Y., 2013. Chronic, low concentration exposure to pharmaceuticals impacts multiple organ systems in zebrafish. *Aquat. Toxicol.* 132–133, 200–211. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2012.12.021>
- Gonzalez Alonso, S., Catal, M., Maroto, R.R., Gil, J.L.R., de Miguel, R.G., Valcárcel, Y., 2010. Pollution by psychoactive pharmaceuticals in the Rivers of Madrid metropolitan area (Spain). *Environ. Int.* 36, 195–201. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2009.11.004>
- Groh, K.J., Carvalho, R.N., Chipman, J.K., Denslow, N.D., Halder, M., Murphy, C.A., Roelofs, D., Rolaki, A., Schirmer, K., Watanabe, K.H., 2015. Development and application of the adverse outcome pathway framework for understanding and predicting chronic toxicity: I. Challenges and research needs in ecotoxicology. *Chemosphere* 120, 764–777. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2014.09.068>
- Gunnarsson, L., Jauhainen, A., Kristiansson, E., Nerman, O., Larsson, D.G.J., 2008.

- Evolutionary conservation of human drug targets in organisms used for environmental risk assessments. *Environ. Sci. Technol.* 42, 5807–5813. <https://doi.org/10.1021/es8005173>
- Halford, J.C.G., Harrold, J.A., Lawton, C.L., Blundell, J.E., 2005. Serotonin (5-HT) Drugs : Effects on Appetite Expression and Use for the Treatment of Obesity 201–213.
- Hallare, A. V., Schirling, M., Luckenbach, T., Köhler, H.R., Triebkorn, R., 2005. Combined effects of temperature and cadmium on developmental parameters and biomarker responses in zebrafish (*Danio rerio*) embryos. *J. Therm. Biol.* 30, 7–17. <https://doi.org/10.1016/j.jtherbio.2004.06.002>
- Hartwig, C., Muth-Köhne, E., Düring, R.-A., 2013. Screening for ecotoxicological effects of antiepileptic drugs in biologically treated waste water originating from an epilepsy ward by *Danio rerio* embryos. *Environ. Sci. Eur.* 25, 29. <https://doi.org/10.1186/2190-4715-25-29>
- Hazelton, P.D., Du, B., Haddad, S.P., Fritts, A.K., Chambliss, C.K., Brooks, B.W., Bringolf, R.B., 2014. Chronic fluoxetine exposure alters movement and burrowing in adult freshwater mussels. *Aquat. Toxicol.* 151, 27–35. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2013.12.019>
- Heberer, T., 2002. Occurrence, fate, and removal of pharmaceutical residues in the aquatic environment: a review of recent research data. *Toxicol. Lett.* 131, 5–17. [https://doi.org/10.1016/S0378-4274\(02\)00041-3](https://doi.org/10.1016/S0378-4274(02)00041-3)
- Henriques, J.F., Rita, A., Andrade, T., Koba, O., Golovko, O., Soares, A.M.V.M., Oliveira, M., Domingues, I., 2015. Effects of the lipid regulator drug gemfibrozil: A toxicological and behavioral perspective. *Aquat. Toxicol.* <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2015.09.017>
- Henry, T.B., Black, M.C., 2008. Acute and chronic toxicity of fluoxetine (selective serotonin reuptake inhibitor) in western Mosquitofish. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 54, 325–330. <https://doi.org/10.1007/s00244-007-9018-0>
- Hernando, M.D., Mezcuca, M., Fernández-Alba, A.R., Barceló, D., 2006. Environmental risk

- assessment of pharmaceutical residues in wastewater effluents, surface waters and sediments. *Talanta* 69, 334–342. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2005.09.037>
- Hooftman and Raat, 1982. Induction of nuclear anomalies (micronuclei) in the peripheral blood erythrocytes of the eastern mudminnow *Umbra pygmaea* by ethyl methanesulphonate 104, 147–152.
- Irons, T.D., MacPhail, R.C., Hunter, D.L., Padilla, S., 2010. Acute neuroactive drug exposures alter locomotor activity in larval zebrafish. *Neurotoxicol. Teratol.* 32, 84–90. <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/j.ntt.2009.04.066>
- ISO, 2007. 15088: Water quality - Determination fo the acute toxicity of waste to zebrafish eggs (*Danio rerio*). Int. Stand.
- Jesus, F.T., Oliveira, R., Silva, A., Catarino, A.L., Soares, A.M.V.M., Nogueira, A.J.A., Domingues, I., 2013. Lethal and sub lethal effects of the biocide chlorhexidine on aquatic organisms. *Ecotoxicology* 22, 1348–1358. <https://doi.org/10.1007/s10646-013-1121-6>
- Junior, C., Junior, I.L.C., Pletsch, A.L., Torres, R., 2014. Artigo Ocorrência de Fármacos Antidepressivos no Meio Ambiente - Revisão Ocorrência de Fármacos Antidepressivos no Meio Ambiente - Revisão 6, 1408–1431. <https://doi.org/10.5935/1984-6835.20140092>
- Kalueff, A. V., Echevarria, D.J., Homechaudhuri, S., Stewart, A.M., Collier, A.D., Kaluyeva, A.A., Li, S., Liu, Y., Chen, P., Wang, J.J., Yang, L., Mitra, A., Pal, S., Chaudhuri, A., Roy, A., Biswas, M., Roy, D., Podder, A., Poudel, M.K., Katare, D.P., Mani, R.J., Kyzar, E.J., Gaikwad, S., Nguyen, M., Song, C., 2016. Zebrafish neurobehavioral phenomics for aquatic neuropharmacology and toxicology research. *Aquat. Toxicol.* 170, 297–309. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2015.08.007>
- Kalueff, A. V, Stewart, A.M., Gerlai, R., 2014. Zebrafish as an emerging model for studying complex brain disorders. *Trends Pharmacol. Sci.* 1–13. <https://doi.org/10.1016/j.tips.2013.12.002>
- Kimmel, C.B., Ballard, W.W., Kimmel, S.R., Ullmann, B., Schilling, T.F., 1995. Stages of

- Embryonic Development of the Zebrafish. World Wide Web Internet Web Inf. Syst. 10.
- Klaper, W.I. and, 2015. Environmental concentrations of the selective serotonin reuptake inhibitor fluoxetine impact specific behaviors involved in reproduction, feeding and predator avoidance in the fish *Pimephales promelas* (fathead minnow) 77–83. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2013.10.012>. Environmental
- Klüver, 2015. Fish Embryo Toxicity Test: Identification of Compounds with Weak Toxicity and Analysis of Behavioral Effects To Improve Prediction of Acute Toxicity for Neurotoxic Compounds. <https://doi.org/10.1021/acs.est.5b01910>
- Kolpin, D.W., Kolpin, D.W., Furlong, E.T., Furlong, E.T., Meyer, M.T., Meyer, M.T., 2002. Environ. Sci. Technol. 2002, 36, 1202–1211. Environ. Sci. Technol. 36, 1202–1211. <https://doi.org/10.1021/es011055j>
- Lammer, E., Carr, G.J., Wendler, K., Rawlings, J.M., Belanger, S.E., Braunbeck, T., 2009. Is the fish embryo toxicity test (FET) with the zebrafish (*Danio rerio*) a potential alternative for the fish acute toxicity test? Comp. Biochem. Physiol. - C Toxicol. Pharmacol. 149, 196–209. <https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2008.11.006>
- Lister, A., Regan, C., Van Zwol, J., Van Der Kraak, G., 2009. Inhibition of egg production in zebrafish by fluoxetine and municipal effluents: A mechanistic evaluation. Aquat. Toxicol. 95, 320–329. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2009.04.011>
- Little, E., Finger, S., 1990. Swimming behavior as an indicator of sublethal toxicity in fish. Environ. Toxicol. Chem. 9, 13–19. <https://doi.org/10.1002/etc.5620090103>
- Magno, L.D.P., Fontes, A., Gonçalves, B.M.N., Gouveia, A., 2015. Pharmacological study of the light/dark preference test in zebrafish (*Danio rerio*): Waterborne administration. Pharmacol. Biochem. Behav. 135, 169–176. <https://doi.org/10.1016/j.pbb.2015.05.014>
- Margiotta-casaluci, L., Owen, S.F., Cumming, R.I., Polo, A. De, Winter, M.J., Panter, G.H., Rand-weaver, M., Sumpter, J.P., 2014. Quantitative Cross-Species Extrapolation between Humans and Fish: The Case of the Anti-Depressant Fluoxetine 9. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0110467>

- Mauter, M., Elimelech, M., 2008. Environmental applications of carbon-based nanomaterials. *Environ. Sci. Technol.* 42, 5843–5859. <https://doi.org/10.1021/es8006904>
- Maximino, C., da Silva, A.W.B., Gouveia, A., Herculano, A.M., 2011. Pharmacological analysis of zebrafish (*Danio rerio*) scototaxis. *Prog. Neuro-Psychopharmacology Biol. Psychiatry* 35, 624–631. <https://doi.org/10.1016/j.pnpbp.2011.01.006>
- Maximino, C., Puty, B., Benzecry, R., Araujo, J., Lima, M.G., De Jesus Oliveira Batista, E., Renata De Matos Oliveira, K., Crespo-Lopez, M.E., Herculano, A.M., 2013. Role of serotonin in zebrafish (*Danio rerio*) anxiety: Relationship with serotonin levels and effect of buspirone, WAY 100635, SB 224289, fluoxetine and para-chlorophenylalanine (pCPA) in two behavioral models. *Neuropharmacology* 71, 83–97. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2013.03.006>
- Melo, K.M., Oliveira, R., Grisolia, C.K., Domingues, I., Pieczarka, J.C., Filho, J.D.S., Nagamachi, C.Y., 2015. Short-term exposure to low doses of rotenone induces developmental, biochemical, behavioral, and histological changes in fish. <https://doi.org/10.1007/s11356-015-4596-2>
- Mennigen, J.A., Harris, E.A., Chang, J.P., Moon, T.W., Trudeau, V.L., 2009. Fluoxetine affects weight gain and expression of feeding peptides in the female goldfish brain. *Regul. Pept.* 155, 99–104. <https://doi.org/10.1016/j.regpep.2009.01.001>
- Mennigen, J.A., Sassine, J., Trudeau, V.L., Moon, T.W., 2010. Waterborne fluoxetine disrupts feeding and energy metabolism in the goldfish *Carassius auratus*. *Aquat. Toxicol.* 100, 128–137. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2010.07.022>
- Meshalkina, D.A., Kysil, E. V., Antonova, K.A., Demin, K.A., Kolesnikova, T.O., Khatsko, S.L., Gainetdinov, R.R., Alekseeva, P.A., Kalueff, A. V., 2018. The Effects of Chronic Amitriptyline on Zebrafish Behavior and Monoamine Neurochemistry. *Neurochem. Res.* 0, 1–9. <https://doi.org/10.1007/s11064-018-2536-5>
- Messiha, F.S., 1993. Fluoxetine: A spectrum of clinical applications and postulates of underlying mechanisms. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 17, 385–396.

[https://doi.org/10.1016/S0149-7634\(05\)80115-0](https://doi.org/10.1016/S0149-7634(05)80115-0)

- Metcalf, C.D., Miao, X.-S., Koenig, B.G., Struger, J., 2003. Distribution of acidic and neutral drugs in surface waters near sewage treatment plants in the lower Great Lakes, Canada. *Environ. Toxicol. Chem.* 22, 2881–2889. <https://doi.org/10.1897/02-627>
- Minguez, L., Farcy, E., Ballandonne, C., Lepailleur, A., Serpentine, A., Lebel, J.M., Bureau, R., Halm-Lemeille, M.P., 2014. Acute toxicity of 8 antidepressants: What are their modes of action? *Chemosphere* 108, 314–319. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2014.01.057>
- Mitrovic-Tutundzic, P., 1994. Fish gills as a monitor of sublethal and chronic effects of pollution. In: *Sublethal and Chronic Effects of Pollutants on Freshwater Fish* 339–352.
- Moon, T.W., Walsh, P.J., Mommsen, T.P., 1985. *Fish Hepatocytes: A Model Metabolic System* 42.
- Morando, M.B., Medeiros, L.R., McDonald, M.D., 2009. Fluoxetine treatment affects nitrogen waste excretion and osmoregulation in a marine teleost fish (DOI:10.1016/j.aquatox.2009.03.011). *Aquat. Toxicol.* 95, 164–171. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2009.10.015>
- OECD, 2013. Test No. 236: Fish Embryo Acute Toxicity (FET) Test. OECD Guidel. Test. Chem. Sect. 2, OECD Publ. 1–22. <https://doi.org/10.1787/9789264203709-en>
- OECD, 2000. *Oecd guideline for the testing of chemicals* 301, 231–236.
- OECD, 1992a. Fish, acute toxicity test. *Guidel. Test. Chem.* 1–9. <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1787/9789264069961-en>
- OECD, 1992b. *Oecd guideline for testing of chemicals* 1–13.
- Paterson, G., Metcalfe, C.D., 2008. Uptake and depuration of the anti-depressant fluoxetine by the Japanese medaka (*Oryzias latipes*). *Chemosphere* 74, 125–130. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2008.08.022>
- Pei, S., Liu, L., Zhong, Z., Wang, H., Lin, S., Shang, J., 2016. Risk of prenatal depression and stress treatment: alteration on serotonin system of offspring through exposure to

- Fluoxetine. *Sci. Rep.* 6, 33822. <https://doi.org/10.1038/srep33822>
- Pettorelli, N., Coulson, T., Durant, S.M., Gaillard, J.M., 2011. Predation, individual variability and vertebrate population dynamics. *Oecologia* 167, 305–314. <https://doi.org/10.1007/s00442-011-2069-y>
- Prieto, M.J., Gutierrez, H.C., Arévalo, R.A., Chiaramoni, N.S., del Valle Alonso, S., 2012. Effect of risperidone and fluoxetine on the movement and neurochemical changes of zebrafish.
- Quinn, T.P., Peterson, N.P., 1996. The influence of habitat complexity and fish size on over-winter survival and growth of individually marked juvenile coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*) in Big Beef Creek, Washington. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 53, 1555–1564. <https://doi.org/10.1139/f96-092>
- Rand-weaver, M., Margiotta-casaluci, L., Patel, A., Panter, G.H., Owen, S.F., Sumpter, J.P., 2013. The Read-Across Hypothesis and Environmental Risk Assessment of Pharmaceuticals.
- Richendrfer, H., Creton, R., 2017. Cluster analysis profiling of behaviors in zebrafish larvae treated with antidepressants and pesticides. *Neurotoxicol. Teratol.* <https://doi.org/10.1016/j.ntt.2017.10.009>
- Rideout, R.M., Morgan, M.J., 2010. Relationships between maternal body size, condition and potential fecundity of four north-west Atlantic demersal fishes. *J. Fish Biol.* 76, 1379–1395. <https://doi.org/10.1111/j.1095-8649.2010.02570.x>
- Rivetti, C., Campos, B., Barata, C., 2016. Low environmental levels of neuro-active pharmaceuticals alter phototactic behaviour and reproduction in *Daphnia magna*. *Aquat. Toxicol.* 170, 289–296. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2015.07.019>
- Rossi, A., Barraco, A., Donda, P., 2004. Fluoxetine: A review on evidence based medicine. *Ann. Gen. Hosp. Psychiatry* 3, 1–8. <https://doi.org/10.1186/1475-2832-3-2>
- Sabbioni, C., Bugamelli, F., Varani, G., Mercolini, L., Musenga, A., Saracino, M.A., Fanali, S., Raggi, M.A., 2004. A rapid HPLC-DAD method for the analysis of fluoxetine and

- norfluoxetine in plasma from overdose patients. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 36, 351–356.
<https://doi.org/10.1016/j.jpba.2004.06.008>
- Sauv??, S., Desrosiers, M., 2014. A review of what is an emerging contaminant. *Chem. Cent. J.* 8, 1–7. <https://doi.org/10.1186/1752-153X-8-15>
- Scholz, S., Fischer, S., Gündel, U., 2008. The zebrafish embryo model in environmental risk assessment — applications beyond acute toxicity testing 394–404.
<https://doi.org/10.1007/s11356-008-0018-z>
- Schoots, A.F.M., Meijer, R.C., Denucb, J.M., 1983. Dopaminergic Regulation of Hatching in Fish Embryos 63, 59–63.
- Schultz, M.M., Furlong, E.T., 2008. Trace Analysis of Antidepressant Pharmaceuticals and Their Select Degradates in Environmental Matrices by LC / ESI / MS / MS a) b. *Anal. Chem.* 80, 1756–1762. <https://doi.org/10.1021/ac702154e>
- Schultz, M.M., Furlong, E.T., Kolpin, D.W., Werner, S.L., Schoenfuss, H.L., Barber, L.B., Blazer, V.S., Norris, D.O., Vajda, A.M., 2010. Antidepressant pharmaceuticals in two U.S. effluent-impacted streams: Occurrence and fate in water and sediment and selective uptake in fish neural tissue. *Environ. Sci. Technol.* 44, 1918–1925.
<https://doi.org/10.1021/es9022706>
- Schultz, M.M., Painter, M.M., Bartell, S.E., Logue, A., Furlong, E.T., Werner, S.L., Schoenfuss, H.L., 2011. Selective uptake and biological consequences of environmentally relevant antidepressant pharmaceutical exposures on male fathead minnows. *Aquat. Toxicol.* 104, 38–47. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2011.03.011>
- SPSS, 2004. Sigma stat for windows (version 3.10).
- Stegeman, J.J., Lecht, J.J., 1991. P-450 Cytochrome in Aquatic Systems Monooxygenase Species : Carcinogen Biomarkers for Pollutant Exposure. *Environ. Heal.* 90, 101–109.
<https://doi.org/10.2307/3430851>
- Stewart, A.M., et al. 2014, 2014. Aquatic toxicology of fluoxetine: Understanding the knowns and the unknowns. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2014.08.014>

- Teh, S.J., Adams, S.M., Hinton, D.E., 1997. Histopathologic biomarkers in feral freshwater fish populations exposed to different types of contaminant stress. *Aquat. Toxicol.* 37, 51–70. [https://doi.org/10.1016/S0166-445X\(96\)00808-9](https://doi.org/10.1016/S0166-445X(96)00808-9)
- Tierney, K.B., 2011. Behavioural assessments of neurotoxic effects and neurodegeneration in zebrafish. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Basis Dis.* 1812, 381–389. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2010.10.011>
- Ton, C., Lin, Y., Willett, C., 2006. Zebrafish as a model for developmental neurotoxicity testing. *Birth Defects Res. Part A - Clin. Mol. Teratol.* 76, 553–567. <https://doi.org/10.1002/bdra.20281>
- Triebskorn, R., Köhler, H.R., Honnen, W., Schramm, M., Adams, S.M., Müller, E.F., 1997. Induction of heat shock proteins, changes in liver ultrastructure, and alterations of fish behavior: Are these biomarkers related and are they useful to reflect the state of pollution in the field? *J. Aquat. Ecosyst. Stress Recover.* 6, 57–73. <https://doi.org/10.1023/A:1008224301117>
- USEPA, 2016. Pesticide ecotoxicity database, formerly: environmental effects database (EEDB). Environ Fate Eff Div U S EPA.
- Vanderford, B. and, Snyder, S.A., 2006. Analysis of Pharmaceuticals in Water by Isotope Dilution Liquid Chromatography / Tandem Mass 40, 7312–7320.
- Warner, R.E., Peterson, K.K., Borgman, L., 1966. Behavioural pathology in fish: a quantitative study of sublethal pesticide toxication. *J. Appl. Ecol.* 3, 223–247. <https://doi.org/10.2307/2401462>
- Waugh, T.A., Horstick, E., Hur, J., Jackson, S.W., Davidson, A.E., Li, X., Dowling, J.J., 2014. Fluoxetine prevents dystrophic changes in a zebrafish model of duchenne muscular dystrophy. *Hum. Mol. Genet.* 23, 4651–4662. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddu185>
- Weinberger, J., Klaper, R., 2014. Environmental concentrations of the selective serotonin reuptake inhibitor fluoxetine impact specific behaviors involved in reproduction, feeding and predator avoidance in the fish *Pimephales promelas* (fathead minnow).

- Aquat. Toxicol. 151, 77–83. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2013.10.012>
- Weis, J.S., 2014. Delayed Behavioral Effects of Early Life Toxicant Exposures in Aquatic Biota 165–187. <https://doi.org/10.3390/toxics2020165>
- Winberg, S., Thörnqvist, P.O., 2016. Role of brain serotonin in modulating fish behavior. *Curr. Zool.* 62, 317–323. <https://doi.org/10.1093/cz/zow037>
- Winder, V.L., Pennington, P.L., Hurd, M.W., Wirth, E.F., 2011. Fluoxetine effects on sheepshead minnow (*Cyprinodon variegatus*) locomotor activity. *J. Environ. Sci. Heal. Part B* 47, 51–58. <https://doi.org/10.1080/03601234.2012.607767>
- Wong, K., Elegante, M., Bartels, B., Elkhayat, S., Tien, D., Roy, S., Goodspeed, J., Suci, C., Tan, J., Grimes, C., Chung, A., Rosenberg, M., Gaikwad, S., Denmark, A., Jackson, A., Kadri, F., Chung, K.M., Stewart, A., Gilder, T., Beeson, E., Zapolsky, I., Wu, N., Cachat, J., Kalueff, A. V., 2010. Analyzing habituation responses to novelty in zebrafish (*Danio rerio*). *Behav. Brain Res.* 208, 450–457. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2009.12.023>
- Wong, R.Y., Oxendine, S.E., Godwin, J., 2013. Behavioral and neurogenomic transcriptome changes in wild-derived zebrafish with fluoxetine treatment. *BMC Genomics* 14, 348. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-14-348>
- Wu, M., Liu, S., Hu, L., Qu, H., Pan, C., Lei, P., Shen, Y., Yang, M., 2017. Global transcriptomic analysis of zebrafish in response to embryonic exposure to three antidepressants, amitriptyline, fluoxetine and mianserin. *Aquat. Toxicol.* 192, 274–283. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2017.09.027>
- Zhang, D., Wei, S., Kaila, C., Su, X., Wu, J., Karki, A.B., Young, D.P., Guo, Z., 2010. Carbon-stabilized iron nanoparticles for environmental remediation. *Nanoscale* 2, 917–919. <https://doi.org/10.1039/c0nr00065e>

Apêndice 1. Manuscrito do artigo “Exposure to low concentration of fluoxetine affects development, locomotor activity and neuromarkers of zebrafish embryos” aceito para publicação na revista *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology and Pharmacology*.

1 **Exposure to low concentration of fluoxetine affects development, behaviour**
2 **and acetylcholinesterase activity of zebrafish embryos**

3 Natália Oliveira de Farias^{1#}; Rhaul Oliveira^{1,2,3##}; Diego Sousa-Moura¹; Reginaldo Carlyle Silva
4 de Oliveira¹; Maria Augusta Carvalho Rodrigues¹; Thayres Sousa Andrade¹; Inês Domingues⁴;
5 Níchollas Serafim Camargo^{5,6}; Luís Alexandre Muehlmann^{5,6} and Cesar Koppe Grisolia¹

6 ¹Laboratório de Genética Toxicológica, Departamento de Genética e Morfologia, Instituto de
7 Ciências Biológicas, Universidade de Brasília, Asa Norte, 70910-900, Brasília, Distrito Federal,
8 Brazil.

9 ²Faculdade de Tecnologia, Universidade Estadual de Campinas, UNICAMP, 13484-332,
10 Limeira, São Paulo, Brazil.

11 ³Programa de Pós-graduação em Toxicologia e Análises Toxicológicas, Faculdade de Ciências
12 Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, FCF – USP, 05508-000, Butantã, São Paulo, Brazil.

13 ⁴Departamento de Biologia e CESAM, Universidade de Aveiro, Campus Universitário de
14 Santiago, 3810-193, Aveiro, Portugal.

15 ⁵Laboratório de Nanobiotecnologia, Departamento de Genética e Morfologia, Instituto de
16 Ciências Biológicas, Universidade de Brasília, Asa Norte, 70910-900, Brasília, Distrito Federal,
17 Brazil.

18 ⁶Faculdade da Ceilândia, Universidade de Brasília, 72220-90, Brasília, Distrito Federal, Brazil.

19 **Running title:** Toxicity of fluoxetine on zebrafish embryos

20 **ms. has 27 pages, 7 figures, 1 tables, 2 suppl. Files**

21 # These authors contributed equally to the study

22 *Corresponding address: Rhaul de Oliveira, Instituto de Biologia, Universidade de Brasília,
23 Campus Universitário Darcy Ribeiro, Asa Norte, 70910-900 Brasília – Distrito Federal, Brazil.
24 Phone: +55 61 31073084 and Fax: +55 61 32734942

25 **Highlights:**

- 26 - Fluoxetine toxicity was assessed using zebrafish embryos as a model organism.
- 27 - Fluoxetine is toxic for embryos with a 168 h-LC₅₀ of 1.18 mg/L.
- 28 - Fluoxetine caused loss of equilibrium and hatching delay in embryos.
- 29 - Acetylcholinesterase is inhibited by low levels of fluoxetine.
- 30 - Fluoxetine affects the locomotor activity of embryos.

31 **Abstract**

32 Fluoxetine (FLX) is a selective serotonin reuptake inhibitor (SSRI) antidepressant
33 widely used in clinics and very often found in environmental samples of urban aquatic
34 ecosystems in concentrations ranging from ng/L to µg/L. Fish populations might be
35 especially susceptible to FLX due to the presence of conserved cellular receptors of
36 serotonin. Neurotoxic effects on fish biota of polluted water bodies may be expected,
37 but there are no sufficient studies in the current literature to elucidate this hypothesis.
38 Batteries of embryo larval assays with zebrafish were performed to evaluate the
39 potential effects of FLX exposure, including environmentally relevant concentrations.
40 Evaluated parameters included survival, development, behaviour and neuronal
41 biochemical markers. Regarding acute toxicity, a 168 h-LC₅₀ value of 1.18 mg/L was
42 obtained. Moreover, hatching delay and loss of equilibrium were observed, but at a
43 concentration level much higher than FLX measured environmental concentrations (>
44 100 µg/L). On the other hand, effects on locomotor and acetylcholinesterase activity
45 were found at 0.88 and 6 µg/L respectively. Altogether, these results suggest that FLX
46 is neurotoxic to early life stages of zebrafish, in a short period of time causing changes
47 in important ecological attributes which can probably be linked from molecular to
48 population level.

49 **Keywords:** Danio rerio; embryotoxicity; pharmaceuticals; locomotor effects;
50 neurotoxicity; fish.

51 **1. Introduction**

52 Pharmaceuticals are a highly diverse group of compounds, widely used and not
53 totally eliminated from domestic effluents by current methods of wastewater treatment
54 (Aus der Beek et al., 2015) in consequence many of them are often detected in surface
55 waters (Hernando et al., 2006). Water contamination by pharmaceuticals has been
56 mainly attributed to the constant discharge of treated or untreated domestic effluents in
57 receiving water bodies (Heberer and Heberer, 2002). Psychiatric drugs are among the
58 most used and detected contaminants in aquatic ecosystems, but their potential risk to
59 aquatic biota is a growing concern, since recent studies have reported behavioural
60 changes in aquatic species, especially fish, exposed to environmentally relevant
61 concentrations of those chemicals (Ford and Fong, 2015).

62 Fluoxetine (FLX) was the first antidepressant used in the treatment of clinical
63 depression (Henry and Black, 2008). Nowadays, FLX is also used in the treatment of
64 major depressive disorder, obsessive-compulsive disorder, panic disorder, and bulimia.
65 Belonging to the group of selective serotonin reuptake inhibitors, this antidepressant is a
66 potent selective inhibitor of the transporter enzyme for serotonin reuptake at the
67 presynaptic membrane, increasing serotonin concentrations at postsynaptic receptor
68 sites (Costagliola et al., 2008).

69 Discovered in 1975 and approved for commercialization by the Food and Drug
70 Administration (FDA) in 1987, FLX has been one of the most heavily prescribed
71 antidepressant drugs worldwide (Stewart et al., 2014). Consequently, FLX has been
72 detected in aquatic environmental samples at concentrations ranging from ng/L to µg/L
73 (Kolpin et al., 2002; Lister et al., 2009; Metcalfe et al., 2003; Weinberger and Klaper,
74 2014).

75 Unlike other contaminants, pharmaceuticals are designed to trigger a specific
76 therapeutic response in humans (Fent et al., 2006), but many of their molecular targets
77 are also present in other orthologous species (Gunnarsson et al., 2008). Thus, biological
78 effects on non-target organisms might be expected. For instance, FLX has been
79 described as neurotoxic to aquatic organisms, affecting their central nervous system and
80 causing neuroreceptor and neurotransmitter modulation, behavioural changes,
81 reproductive impairment and death (Berg et al., 2013; Weinberger and Klaper, 2014;
82 Weis, 2014). All these biological effects are directly or indirectly related to the drug's
83 designed mode of action to act as an antidepressant for humans. In spite of the
84 increasing number of studies suggesting the potential aquatic environmental risk of
85 psychiatric drugs, standard approaches and endpoints for ecotoxicological assessment of
86 these compounds are not clearly defined, and the link among the observed effects and
87 ecologically relevant parameters remains unclear, especially for fish populations.

88 Zebrafish (*Danio rerio*) early life stages are widely used as a model organism to
89 assess the toxicity of environmental contaminants in fish populations (Scholz et al.,
90 2008). The species has many advantages, such as a sequenced genome, abundant
91 spawning, rapid embryonic development, transparent embryos and available standard
92 protocols for acute and chronic assessment (ISO, 2007; Prieto et al., 2012; OECD,

93 2013). Moreover, in the last decade, the assessment of zebrafish behavioural and
94 biochemical neuromarkers (e.g. cholinesterase) has been increasingly used as an
95 endpoint to assess the sub-lethal effects of pollutants, proving to be a sensitive and
96 reliable measure of stress exposure (Domingues et al., 2010; Andrade et al., 2015;
97 Henriques et al., 2015; Klüver, 2015).

98 In this study, an integrated approach was conducted, using zebrafish embryos to
99 evaluate the short-term toxicity of FLX. The parameters selected, comprising several
100 organizational levels, were: i) mortality; ii) embryo development (including
101 developmental delays and abnormalities); iii) fish behaviour (by measuring locomotor
102 activity) and iv) acetylcholinesterase activity. Results from molecular to population
103 levels are discussed, and links between observed responses and parameters of ecological
104 relevance are proposed.

105 **2. Material and methods**

106 **2.1 Chemical**

107 FLX 97 % of purity was obtained from C&C Pharmaceutical industry, Amapa,
108 Brazil (CAS Number: 56296-78-7, empirical formula: $C_{17}H_{18}F_3NO$).

109 **2.2 Chromatographic Analysis**

110 To confirm the stability of FLX in test conditions, samples from test solutions
111 were analysed using High Performance Liquid Chromatography (HPLC Shimadzu-
112 Prominence). Samples were originally kept in the climate-controlled chamber where all
113 toxicity tests were performed (SL-24 Solab Científica). Stability of FLX in the dilution
114 water and climatic conditions of the tests were evaluated by HLPC, following the
115 method described by Sabbioni et al., 2004 (see details in **Suppl. Material-SM1, Figure**
116 **S1, Table S1**).

117 **2.3 Test organisms**

118 Zebrafish were maintained in aquariums with reverse osmosis and activated carbon
119 filtered water. Fish were raised in an aquatic facility (ZebTec - Tecniplast, Italy) with a
120 photoperiod cycle of 12:12h (light:dark) at the University of Brasilia (Brazil). The water
121 parameters were strictly controlled: temperature was maintained at $27.0 \pm 1^\circ\text{C}$,

122 conductivity at $650 \pm 100 \mu\text{S}/\text{cm}$, pH at 7.0 ± 0.5 and dissolved oxygen $\geq 95\%$
123 saturation. These conditions were maintained in all the performed tests.

124 Zebrafish eggs were collected immediately after natural mating, rinsed in water,
125 and checked under a stereomicroscope (Stereoscopic Zoom Microscope – Stemi 2000,
126 Zeiss, Germany). The unfertilized eggs and those showing cleavage irregularities or
127 injuries were discarded (less than 15 % of the total number of eggs).

128 **2.4 Fish Embryo Toxicity (FET) test**

129 Fish embryo toxicity test was based on the OECD guideline Protocol 236 “Fish Embryo
130 Toxicity” (FET) test (OECD, 2013) with adaptations described by Melo et al., (2015).
131 Zebrafish embryos were exposed to seven different concentrations of FLX (0; 0.01;
132 0.27; 0.74; 2.02; 5.51; 15.0 mg/L) prepared by successive dilutions of stock solution.
133 The test was performed using 60 eggs per treatment, divided in 3 replicates, selected
134 and distributed in 24-well microplates in the climate chamber (SL-24 Solab Científica,
135 Brazil), 20 wells were filled up with 2 mL of the test solution and four wells with water
136 (internal plate control, as required in the OECD guideline). The test was initiated
137 immediately after fertilization, and it was continued for 168 h. Embryos and larvae were
138 observed daily under a stereomicroscope. Developmental parameters were evaluated in
139 embryos over the test period, using a magnification of $\times 70$ for eggs and $\times 40$ for
140 hatched embryos. Before hatching, the following parameters were evaluated: egg
141 coagulation, otolith formation, general delay in development, eye and body
142 pigmentation, somite formation, heartbeat, oedemas, detachment of the tail-bud from
143 the yolk sac, yolk sac absorption and hatching. After hatching, spine malformation and
144 posture (embryos side-lying in the bottom of the microplate well after mechanical
145 stimulus) were also evaluated. All parameters were assessed and quantified as observed
146 or not observed.

147 **2.5 Locomotor behaviour assay**

148 Zebrafish larvae were used to assess effects of FLX on locomotor activity. Locomotion
149 was evaluated for a total of 48 embryos per treatment (3 replicates of 16 embryos)
150 including the control. The embryos were exposed to sub-lethal concentrations ranging
151 through 0.0, 8.8, 15.8, 281.2, 500 $\mu\text{g}/\text{L}$ of FLX, and behaviour analyses were performed
152 at 120, 144 and 168 h in 96-well plates (one embryo per well). Prior to the assessment

153 of behaviour, dead larvae or larvae that exhibited physical abnormalities were discarded
154 and not included in the analyses. Embryonic movement was evaluated using the
155 Zebrabox (ZEB 478 Viewpoint) tracking system equipped with a 25-frame-per-second
156 infrared camera over a period of 20 min. The temperature was maintained stable at 26 ± 1
157 °C. Movement was stimulated by applying light:dark intervals as previously described
158 in Irons et al (2010). Briefly, the test consisted of acclimating the embryos in the light
159 for 5 min, followed by a 10 min dark period and another 5 min light. Typically,
160 zebrafish larvae show less locomotion during light periods than in the dark. For each
161 replicate, the distance and time moving in 1 min intervals were recorded separately for
162 each dark and light period. The behavioural endpoints measured included the total
163 swimming distance (TSD) moved during each measurement period and the total
164 swimming time (TST) that the larvae displayed movement.

165 **2.6 Biomarker analysis**

166 In order to analyse the activity of AChE, a neuroendocrine biomarker, toxicity
167 tests with zebrafish embryos were performed using a range of sub-lethal concentrations
168 which are more representative of realistic scenarios of environmental exposure, namely
169 0, 1, 6, 32, 185 and 1053 $\mu\text{g/L}$ of FLX (concentrations based in preliminary tests). Tests
170 were performed in 1 L beakers filled up with 500 mL of test solutions and 250 eggs.
171 After 168 h of incubation, pools of 15 viable, non-deformed and hatched embryos were
172 collected into microtubes with 0.5 ml of K-phosphate buffer (0.1 M, pH 7.4), frozen in
173 liquid nitrogen and immediately stored at $-80\text{ }^\circ\text{C}$ until the day of analysis. Prior to
174 AChE enzymatic activity measurement, samples were defrosted on ice, homogenized
175 using a sonicator (Ultrasonic Cleaner 2840D-Odontobras), and refrigerated centrifuged
176 ($4\text{ }^\circ\text{C}$) for 20 min at 10,000 g (Centrifuge Hettich – Mikro 220R). Resulting post-
177 mitochondrial supernatant (PMS) was isolated, and 40 μl of each sample was pipetted in
178 96-well microplates for enzymatic determinations (Jesus et al., 2013).

179 AChE activity was determined using acetylthiocholine (ASCh) and propionylthiocholine
180 (PSCh) as substrates, measuring the conjugation product between thiocholine (result of
181 the degradation of ASCh or PSCh) and 5,5-dithiobis-2-nitrobenzoic acid (DTNB)
182 (absorbance increase) at 414 nm, every 20 s, during 05 min, according to the method
183 previously described by Ellman et al. (1961). For the enzymatic determination, 40 μl of
184 PMS and 250 μl of reaction mixture (acetylcholine and propionylcholine (75 mM) and

185 DTNB (10 mM) in K-phosphate buffer (0.1 M, pH 7.2) were used
186 Acetylcholinesterase activities were expressed as micromoles of substrate hydrolysed
187 per minute per mg of protein (U).

188 The protein concentration of samples was quantified using the Bradford Method
189 at 595 nm and γ -globulin as standard (Bradford, 1976). All reactions were performed
190 spectrophotometrically (SpectraMax M2 microplate reader) in quadruplicate.

191 **2.7 Statistical analysis**

192 The effective concentrations (LC_{50} and EC_{50}) were calculated using a four-
193 parameter logistic model. A one-way ANOVA was used to detect the differences
194 between the groups for normally distributed data sets. When data did not pass the
195 Kolmogorov–Smirnov normality test and Levene's homogeneity of variance test, a
196 Kruskal–Wallis test was performed. If significant results were found, Dunnett's or
197 Dunn's test (for parametric or non-parametric data, respectively) was used to detect
198 significant differences between the tested concentrations and the control ($p < 0.05$). All
199 analyses were performed using the Sigma Stat 3.5 statistical package (SPSS, 2004).

200 **2.8 Species sensitivity distribution (SSD)**

201 The SSD was performed with toxicity values (LC_{50}) from the experimental data of the
202 present study and values from indexed articles published in peer reviewed journals
203 (**Table S2**). Multiple toxicity data for different species of fish were summarized as
204 geometric means. The SSD plot was generated using the U.S. Environmental Protection
205 Agency spreadsheet built over Excel (USEPA, 2016). A logistic curve (log) was fitted
206 to the data using nonlinear regression. The predicted hazardous concentrations for the
207 5% and 50% most sensitive organisms were estimated (HC_5 and HC_{50} , respectively).

208 **3. Results**

209 **3.1 Zebrafish embryo toxicity test**

210 During the 168 h of test, no significant mortality was observed for the control
211 groups. Additionally, control groups showed normal development, as described by
212 Kimmel et al. (1995). The lethal effective concentrations for FLX are summarized in
213 **Table S2**. FLX showed to affect embryos' survival only after hatching, as can be

214 observed in **Figure 1**. At 96 h no survival was observed at the highest tested
215 concentration. The survival rate of exposed embryos dropped critically after 120 h of
216 exposure with a 168 h-LC₅₀ of 1.18 mg/L (**Table S2, Fig. 1**).

217 Additionally, FLX significantly affected the development of zebrafish embryos
218 by inhibiting hatching and inducing loss of equilibrium. A dose response inhibition for
219 the hatching time was observed at 48 h of exposure with EC₅₀ value of 8.45 mg/L
220 (**Table 1**). Significant differences in hatching were observed only for the highest tested
221 concentration (15 mg/L, one-way ANOVA: $F_{6, 20} = 21.74$; $p < 0.001$). At 48 h, only 15
222 % of the embryos hatched compared to 67% in the control group (**Table 1**).

223 The loss of equilibrium is represented by embryos side-lying in the bottom of the
224 microplate well. This phenotype was first observed at 72 h of exposure with significant
225 effect at the highest concentration tested, of 15 mg/L (one-way ANOVA: $F_{6, 20} = 38.99$;
226 $p < 0.001$). At 96 h, the concentrations of 2.02 and 5.51 mg/L also affected the loss of
227 equilibrium of hatched embryos (one-way ANOVA: $F_{6, 20} = 38.99$; $p < 0.001$). The
228 effects on equilibrium progressively increased until the end of the test, as can be
229 observed in **Figure 2**. At 120 h, a loss of equilibrium was still observed at the
230 concentration of 2.02 mg/L (one-way ANOVA: $F_{4, 14} = 19.43$; $p < 0.001$). However, all
231 organisms died at the concentration of 5.51 mg/L. The loss of equilibrium remained for
232 this concentration at 144 h and 168 h (one-way ANOVA: $F_{1, 10} = 70.32$; $p < 0.001$; one-
233 way ANOVA: $F_{6, 20} = 38.99$; $p < 0.001$). A 168 h-EC₅₀ of 1.02 mg/L was determined.

234 **3.2 Locomotor behaviour**

235 The ZebraBox results indicated that FLX induced changes in the swimming
236 activity of zebrafish embryos (**Figure 3**). Overall, the most pronounced effects were on
237 TSD, especially observed in higher exposure concentrations and intensified in higher
238 exposure time.

239 FLX exposure caused a significant decrease in the total distance moved by the
240 embryos at all tested periods (Kruskal-Wallis: $H = 124.362$; $P < 0.001$) **Figure 3A-C**. The
241 effects of FLX on the TST are depicted in the **Figure 3D-F**. At 120 h, a significant
242 inhibition of TST was observed at lower concentrations (8.8, 15.8 μg/L); however, at the
243 highest concentration (500 μg/L) there was a significant increase in TST (Kruskal-

244 Wallis: $H = 62.276$; $P < 0.001$). At 144 h, a slight increase in the TST was observed at
245 low concentrations, but no statistically significant differences were found in any
246 treatment when compared to the control. (Kruskal-Wallis: $H = 10.299$; $P < 0.067$). At
247 168 h a significant decrease in TST was observed at the highest tested concentration.
248 (Kruskal-Wallis: $H = 24.565$; $P < 0.001$).

249 **3.2 Biomarkers**

250 The effects of FLX on AChE, using ASCh and PSCh as substrates, are showed
251 in **Figure 4**. In general, FLX caused a dose response inhibition in the activity of AChE
252 after 168 h of exposure. AChE was significantly inhibited at concentrations ≥ 0.006
253 mg/L when compared to the control group in both assays with ASCh (one-way
254 ANOVA: $F_{5, 66} = 8.08$; $p < 0.001$) and PSCh (one-way ANOVA: $F_{5, 62} = 5.88$; $p < 0.001$)
255 as substrates.

256 **4. Discussion**

257 FLX had a significant impact on the survival of embryos. Mortality was
258 concentration and time dependent with a 168 h-LC₅₀ value of 1.18 mg/L. These results
259 are in line with the findings of other studies (**Table S2**). LC₅₀ values for eight different
260 species of fish gathered from the literature vary from 0.164 to 2 mg/L, and an HC₅₀
261 value of 1000 $\mu\text{g/L}$ was calculated (**Figure 5**), similar to the lethal concentration
262 obtained in our study. In a particular study also conducted with zebrafish, a lower acute
263 toxicity of FLX value was found with a 96 h-LC₅₀ of 0.25 mg/L (Alsop and Wood,
264 2013). However, this study was carried out with zebrafish larvae at 4-8 days post
265 fertilization. This developmental stage is more sensitive than embryos, as demonstrated
266 by several previous studies comparing different zebrafish developmental stages (e.g.
267 Domingues et al., 2010).

268 Hatching is a critical period of zebrafish embryo development and has been
269 widely used as an endpoint in fish early life stage tests. In this study, hatching was
270 significantly delayed at 48 h in embryos exposed to concentrations above 5.51 mg/L,
271 but among 98 and 100% of the embryos hatched at 72 h observation period. Three main
272 mechanisms are involved in the hatching process of zebrafish: the embryo's movement
273 inside the egg, the activity of the hatching chorionase enzyme and osmotic rupture
274 (Hallare et al., 2005; Schoots et al., 1983). Embryos cannot break the corium barrier if

275 the effects of the chemical on growth or developmental abnormalities are too severe.
276 Although the movement of embryos inside the eggs was not measured in the present
277 study, FLX exposure caused progressive loss of equilibrium of embryos after hatching
278 (**Figure 2**). Analysing the earlier locomotor stages, namely spontaneous coiling, evoked
279 coiling, and burst swimming, Airhart et al. (2007) showed no effect of FLX in those
280 parameters at the concentration of 1.42 mg/L. One could speculate that the higher FLX
281 concentrations used in our study (5.51 mg/L) may have caused an inhibition of
282 muscular movements, reducing the ability of the embryo to break the egg shell.
283 However, further studies are necessary to corroborate this hypothesis.

284 Overall hatched organisms exposed to FLX showed a decrease in the TSD in
285 concentrations $> 0.88 \mu\text{g/L}$. Our results are in agreement with other studies
286 investigating the effects of FLX on locomotor behaviour of fish early life stages (**Table**
287 **S3**). Airhart et al., (2007) also reported a decrease in swimming activity of zebrafish
288 larvae (1-5 dpf) after exposure to FLX (NOEC of $\sim 700 \mu\text{g/L}$). Likewise, Prieto et al.,
289 (2012) showed that zebrafish embryos exposed to $15.8 \mu\text{g/L}$ of FLX exhibited a
290 significant decrease in swimming activity. The biphasic effects of FLX on TST of
291 zebrafish were detected at very low concentrations ($0.88 \mu\text{g/L}$) and an induction at the
292 highest tested concentration ($500 \mu\text{g/L}$). A biphasic effect of the psychiatric drug
293 valproate on zebrafish larvae locomotor activity has also been reported, where low
294 concentrations resulted in hyperactive larvae and high concentrations resulted in
295 hypoactive larvae (Cowden et al., 2012). Maximino (2011) also reported a biphasic
296 effect in a study with zebrafish adults exposed to ethanol, where both anxiety and
297 locomotion patterns were affected at different concentration levels. Biphasic effects of
298 psychiatric drugs are widely described in mammal toxicology, including in humans.
299 Since our results suggest a non-dose response pattern for fish early life stages, further
300 studies might address this topic and the consequences for the risk evaluation of
301 psychiatric drugs in aquatic biota.

302 Impairment of locomotor behaviour might be related to neurological alterations
303 in neurotransmission mediated by toxic agents. Previous studies (**Figure 6, Table S3**),
304 reported that exposure to low concentrations of FLX affected the activity of different
305 neurotransmitters, such as serotonin, dopamine and norepinephrine. A decrease in
306 cholinesterase activity can cause progressive myopathy of skeletal muscles and

307 consequently loss of motility (Tierney, 2011). This may be the case for FLX, as our
308 results showed that exposure to concentrations equal to or above 6 $\mu\text{g/L}$ (**Figure 4**)
309 caused a significant inhibition of AChE activity, corroborating the reduced locomotor
310 behaviour profile exhibited by zebrafish larvae (**Figure 3**). Our results suggest a link
311 between the decrease of AChE and locomotor activity of hatched embryos, but future
312 measurement of acetylcholine neurotransmitters might be performed to corroborate this
313 hypotheses. Others neurological mechanisms may also be involved in the behaviour
314 alterations caused by FLX exposure. It is already established that serotonin plays an
315 important role in modulating locomotor behaviour in a wide range of vertebrates.
316 Studies conducted in adult teleosts, including zebrafish, have shown an inverse
317 relationship between serotonin levels and spontaneous swimming activity. In the study
318 carried out by Airhart et al., (2007) the reduced locomotor activity observed in zebrafish
319 larvae was correlated with a decrease in two serotonin receptor transcripts (SERT –
320 serotonin transporter protein and 5-HT_{1A} – serotonin 1A receptor transcript) in spinal
321 cord after exposure to FLX. The AChE activity assay is a biochemical, cost-effective
322 technique widely used for toxicity assessment of organophosphorus and carbamate
323 pesticides. Our data suggest a similar sensitivity of cholinergic and serotonergic
324 markers, suggesting AChE as a viable option for a biomarker for assessing FLX effects.

325 As shown in **Figure 7**, the parameter swimming behaviour is several orders of
326 magnitude more sensitive than developmental parameters and molecular markers
327 reported in this paper. Likewise, when comparing the ‘No Observed Effect
328 Concentrations’ (NOEC) of several endpoints analysed in other studies from the
329 literature (**Figure 7**), swimming behaviour is also the most sensitive parameter.
330 Nonetheless, effects at lower concentrations such as behaviour tend to be disregarded in
331 the current environmental risk assessment practices, which raises a special concern for
332 drugs like FLX (Brodin et al., 2014). Disruption of the developmental process and
333 behaviour alterations caused by these drugs may have negative long-term ecological
334 consequences (Brodin et al., 2014). Therefore, the development of behaviour protocols
335 for the assessment of psychiatric drugs providing parameters that reflect a more realistic
336 exposure scenario could help to improve our knowledge on its effects on aquatic life.

337 *Ecological relevance*

338 In general, exposure to environmental chemical compounds does not result in
339 obvious morphological changes, but rather subtle changes at the molecular level,
340 making the effects of exposure difficult to identify and characterize. In fact, our results
341 from the fish embryo toxicity assays demonstrated that FLX is toxic to zebrafish
342 embryos. Exposure to a range of sub-lethal FLX concentrations affected the locomotor
343 activity at environmentally relevant concentrations (0.88 µg/L), with results supported
344 by molecular changes in AChE activity (LOEC < 6 µg/L, **Figure 7**). Alterations in
345 swimming behaviour are a particularly important type of response in the ecosystem,
346 since they are related to individual fitness of the organisms and may originate disruption
347 of capability for predator avoidance and feeding, ultimately leading to lower survival
348 rates in the environment (Brodin et al., 2014). Our results are supported by different
349 studies showing that FLX induces alterations in different behavioural traits in exposed
350 fish, such as aggression, predator/prey relationship, feeding, progeny counts, swimming
351 and locomotor activity (**Table S3**). Adverse effects of FLX on the individual fitness
352 might compromise ecological traits of fish populations such as aggression, boldness,
353 exploration and sociality (Brodin et al., 2014). Thus, altogether, these studies suggest
354 that FLX contamination would cause ecological imbalance in aquatic systems.

355 **5. Conclusion**

356 In summary, FLX caused developmental and neurotoxic effects on zebrafish
357 early life-stages after a short-term exposure. No observed effect concentration for
358 locomotor and acetylcholinesterase activity are in the same range of FLX concentration
359 often detected in environmental samples, suggesting that ecological traits of fish early
360 life stages can be impaired in realistic scenarios of exposure. To improve our findings,
361 future research should focus on toxicity assessment in a chronic exposure scenario at the
362 population level, to unravel how the observed behavioural alterations in the individual
363 fish during early life stages may translate into a direct ecological effect on aquatic
364 communities.

365 **Acknowledgements**

366 The authors are grateful to the Brazilian Ministry of Education and Ministry of
367 Science and Technology of Brazil for the scholarship provided to RO (CNPq BJT-
368 A/PNPD CAPES); DSM for CAPES PhD scholarship. CKG for CNPq research grant

369 305741/2015-2; NFO and RCS for CNPq PIBIC scholarship. FAPDF for TSA research
370 grant (1250/2016) and project funding call 05/2016 -“Micropoluentes emergentes e o
371 uso da água na Bacia do Paranoá: diagnóstico, identificação de fontes, efeitos tóxicos
372 métodos de remoção e de detecção in situ ”.

373 **Ethical standards**

374 The experiments are in accordance with the current laws of the country in which
375 they were performed. The study was approved by the ethics committee at the University
376 of Brasilia (protocol n.100226/2014).

377 **Conflict of interest**

378 The authors declare that they have no conflict of interest.

379 **References**

- 380 Airhart, M.J., Lee, D.H., Wilson, T.D., Miller, B.E., Miller, M.N., Skalko, R.G., 2007.
381 Movement disorders and neurochemical changes in zebrafish larvae after bath
382 exposure to fluoxetine (PROZAC). *Neurotoxicol. Teratol.* 29, 652–664.
383 doi:10.1016/j.ntt.2007.07.005
- 384 Alsop, D., Wood, C.M., 2013. Metal and pharmaceutical mixtures: Is ion loss the
385 mechanism underlying acute toxicity and widespread additive toxicity in
386 zebrafish? *Aquat. Toxicol.* 140–141, 257–267. doi:10.1016/j.aquatox.2013.05.021
- 387 Andrade, T.S., Henriques, J.F., Almeida, A.R., Machado, A.L., Koba, O., Giang, P.T.,
388 Soares, A.M.V.M., Domingues, I., 2015. Carbendazim exposure induces
389 developmental, biochemical and behavioural disturbance in zebrafish embryos.
390 *Aquat. Toxicol.* 170, 390–9. doi:10.1016/j.aquatox.2015.11.017
- 391 Aus der Beek, T., Weber, F.-A., Bergmann, A., Hickmann, S., Ebert, I., Hein, A.,
392 Küster, A., 2015. Pharmaceuticals in the environment - global occurrences and
393 perspectives. *Environ. Toxicol. Chem.* 35, 823–835. doi:10.1002/etc.3339
- 394 Berg, C., Backström, T., Winberg, S., Lindberg, R., Brandt, I., 2013. Developmental
395 Exposure to Fluoxetine Modulates the Serotonin System in Hypothalamus. *PLoS*
396 *One* 8. doi:10.1371/journal.pone.0055053
- 397 Bradford, M., 1976. Rapid and Sensitive Method for Quantification of Microgram

398 Quantities of Protein utilizing principle of Protein-Dye-Binding. *Anal. Biochem.*
399 72, 248–254.

400 Brodin, T., Piovano, S., Fick, J., Klaminder, J., Heynen, M., Heynen, M., Jonsson, M.,
401 2014. Ecological effects of pharmaceuticals in aquatic systems — impacts
402 through behavioural alterations. *Philos. Trans. R. Publ. Soc. B* 369, 20130580.
403 doi:10.1098/rstb.2013.0580

404 Costagliola, C., Parmeggiani, F., Semeraro, F., Sebastiani, A., 2008. Selective serotonin
405 reuptake inhibitors: a review of its effects on intraocular pressure. *Curr.*
406 *Neuropharmacol.* 6, 293–310. doi:10.2174/157015908787386104

407 Cowden, J., Padnos, B., Hunter, D., Macphail, R., Jensen, K., Padilla, S., 2012.
408 Developmental exposure to valproate and ethanol alters locomotor activity and
409 retino-tectal projection area in zebrafish embryos. *Reprod. Toxicol.* 33, 165–173.
410 doi:10.1016/j.reprotox.2011.11.111

411 Domingues, I., Oliveira, R., Lourenço, J., Koppe, C., Mendo, S., Soares, A.M.V.M.,
412 2010. Comparative Biochemistry and Physiology, Part C Biomarkers as a tool to
413 assess effects of chromium (VI): Comparison of responses in zebra fish early life
414 stages and adults ☆. *Comp. Biochem. Physiol. Part C* 152, 338–345.
415 doi:10.1016/j.cbpc.2010.05.010

416 Ellman, G.L., Courtney, K.D., Andres Jr., V., Featherstone, R.M., 1961. A new rapid
417 colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochem. Pharmacol.*
418 7, 88–95.

419 Fent, K., Weston, A.A., Caminada, D., 2006. Ecotoxicology of human pharmaceuticals.
420 *Aquat. Toxicol.* 76, 122–59. doi:10.1016/j.aquatox.2005.09.009

421 Ford, A.T., Fong, P.P., 2015. The effects of antidepressants appear to be rapid and at
422 environmentally relevant concentrations. *Environ. Toxicol. Chem.* n/a-n/a.
423 doi:10.1002/etc.3087

424 Gunnarsson, L., Jauhiainen, A., Kristiansson, E., Nerman, O., Larsson, D.G.J., 2008.
425 Evolutionary conservation of human drug targets in organisms used for
426 environmental risk assessments. *Environ. Sci. Technol.* 42, 5807–5813.
427 doi:10.1021/es8005173

428 Hallare, a. V., Schirling, M., Luckenbach, T., Köhler, H.-R., Triebkorn, R., 2005.

429 Combined effects of temperature and cadmium on developmental parameters and
430 biomarker responses in zebrafish (*Danio rerio*) embryos. *J. Therm. Biol.* 30, 7–17.
431 doi:10.1016/j.jtherbio.2004.06.002

432 Heberer, T., Heberer, T., 2002. Occurrence, fate, and removal of pharmaceutical
433 residues in the aquatic environment: a review of recent research data. *Toxicol. Lett.*
434 131, 5–17. doi:10.1016/S0378-4274(02)00041-3

435 Henriques, J.F., Almeida, A.R., Andrade, T., Koba, O., Golovko, O., Soares,
436 A.M.V.M., Oliveira, M., Domingues, I., 2015. Effects of the lipid regulator drug
437 gemfibrozil: A toxicological and behavioral perspective. *Aquat. Toxicol.*
438 doi:10.1016/j.aquatox.2015.09.017

439 Henry, T.B., Black, M.C., 2008. Acute and chronic toxicity of fluoxetine (selective
440 serotonin reuptake inhibitor) in western Mosquitofish. *Arch. Environ. Contam.*
441 *Toxicol.* 54, 325–330. doi:10.1007/s00244-007-9018-0

442 Hernando, M.D., Mezcuca, M., Fernández-Alba, A.R., Barceló, D., 2006. Environmental
443 risk assessment of pharmaceutical residues in wastewater effluents, surface waters
444 and sediments. *Talanta* 69, 334–342. doi:10.1016/j.talanta.2005.09.037

445 Irons, T.D., MacPhail, R.C., Hunter, D.L., Padilla, S., 2010. Acute neuroactive drug
446 exposures alter locomotor activity in larval zebrafish. *Neurotoxicol. Teratol.* 32,
447 84–90. doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.ntt.2009.04.066

448 ISO, 2007. 15088: Water quality - Determination fo the acute toxicity of waste to
449 zebrafish eggs (*Danio rerio*). *Int. Stand.*

450 Jesus, F.T., Oliveira, R., Silva, A., Catarino, A.L., Soares, A.M.V.M., Nogueira, A.J. a,
451 Domingues, I., 2013. Lethal and sub lethal effects of the biocide chlorhexidine on
452 aquatic organisms. *Ecotoxicology* 22, 1348–1358. doi:10.1007/s10646-013-1121-6

453 Kimmel, C.B., Ballard, W.W., Kimmel, S.R., 1995. Stages of embryonic development
454 of the zebrafish. *Am. J. ...* 10.

455 Klüver, 2015. Fish Embryo Toxicity Test: Identi fi cation of Compounds with Weak
456 Toxicity and Analysis of Behavioral E ff ects To Improve Prediction of Acute
457 Toxicity for Neurotoxic Compounds. doi:10.1021/acs.est.5b01910

458 Kolpin, D.W., Furlong, E.T., Meyer, M.T., Thurman, E.M., Zaugg, S.D., Barber, L.B.,
459 Buxton, H.T., 2002. Pharmaceuticals, hormones, and other organic wastewater

460 contaminants in U.S. streams, 1999-2000: A national reconnaissance. *Environ. Sci.*
461 *Technol.* 36, 1202–1211. doi:10.1021/es011055j

462 Lister, A., Regan, C., Van Zwol, J., Van Der Kraak, G., 2009. Inhibition of egg
463 production in zebrafish by fluoxetine and municipal effluents: A mechanistic
464 evaluation. *Aquat. Toxicol.* 95, 320–329. doi:10.1016/j.aquatox.2009.04.011

465 Maximino, C., da Silva, A.W.B., Gouveia, A., Herculano, A.M., 2011. Pharmacological
466 analysis of zebrafish (*Danio rerio*) scototaxis. *Prog. Neuro-Psychopharmacology*
467 *Biol. Psychiatry* 35, 624–631. doi:10.1016/j.pnpbp.2011.01.006

468 Melo, K.M., Oliveira, R., Grisolia, C.K., Domingues, I., Pieczarka, J.C., Filho, J.D.S.,
469 Nagamachi, C.Y., 2015. Short-term exposure to low doses of rotenone induces
470 developmental, biochemical, behavioral, and histological changes in fish.
471 doi:10.1007/s11356-015-4596-2

472 Metcalfe, C.D., Miao, X.-S., Koenig, B.G., Struger, J., 2003. Distribution of acidic and
473 neutral drugs in surface waters near sewage treatment plants in the lower Great
474 Lakes, Canada. *Environ. Toxicol. Chem.* 22, 2881–2889. doi:10.1897/02-627

475 OECD, 2013. Test No. 236: Fish Embryo Acute Toxicity (FET) Test. OECD Guidel.
476 Test. Chem. Sect. 2, OECD Publ. 1–22. doi:10.1787/9789264203709-en

477 Prieto, M.J., Gutierrez, H.C., Arévalo, R.A., Chiamoni, N.S., del Valle Alonso, S.,
478 2012. Effect of risperidone and fluoxetine on the movement and neurochemical
479 changes of zebrafish.

480 Sabbioni, C., Bugamelli, F., Varani, G., Mercolini, L., Musenga, A., Saracino, M.A.,
481 Fanali, S., Raggi, M.A., 2004. A rapid HPLC-DAD method for the analysis of
482 fluoxetine and norfluoxetine in plasma from overdose patients. *J. Pharm. Biomed.*
483 *Anal.* 36, 351–356. doi:10.1016/j.jpba.2004.06.008

484 Scholz, S., Fischer, S., Gündel, U., 2008. The zebrafish embryo model in environmental
485 risk assessment — applications beyond acute toxicity testing 394–404.
486 doi:10.1007/s11356-008-0018-z

487 Schoots, A.F.M., Meijer, R.C., Denucb, J.M., 1983. Dopaminergic Regulation of
488 Hatching in Fish Embryos 63, 59–63.

489 SPSS, 2004. Sigma stat for windows (version 3.10).

490 Stewart, A.M., Grossman, L., Nguyen, M., Maximino, C., Rosemberg, D.B.,

491 Echevarria, D.J., Kalueff, A. V., 2014. Aquatic toxicology of fluoxetine:
492 Understanding the knowns and the unknowns. *Aquat. Toxicol.*
493 doi:10.1016/j.aquatox.2014.08.014

494 Tierney, K.B., 2011. Behavioural assessments of neurotoxic effects and
495 neurodegeneration in zebrafish. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Basis Dis.* 1812,
496 381–389. doi:10.1016/j.bbadis.2010.10.011

497 USEPA, 2016. Pesticide ecotoxicity database, formerly: environmental effects database
498 (EEDB). Environ Fate Eff Div U S EPA.

499 Weinberger, J., Klaper, R., 2014. Environmental concentrations of the selective
500 serotonin reuptake inhibitor fluoxetine impact specific behaviors involved in
501 reproduction, feeding and predator avoidance in the fish *Pimephales promelas*
502 (fathead minnow). *Aquat. Toxicol.* 151, 77–83. doi:10.1016/j.aquatox.2013.10.012

503 Weis, J.S., 2014. Delayed Behavioral Effects of Early Life Toxicant Exposures in
504 Aquatic Biota 165–187. doi:10.3390/toxics2020165

505 **Legends**

506 **Figure 1.** Overview of zebrafish embryos extended toxicity test after 168 h of exposure
507 to FLX. The proportion of eggs and non-hatched embryos that died are represented by
508 black bars; the proportion of embryos that stayed alive but did not hatch are presented
509 as grey bars; those that hatched as white bars and the proportion of embryos that died
510 after hatch as spotted, dark dashed grey bars.

511 **Figure 2.** Effects of FLX on zebrafish equilibrium at 120, 144 and 168 h of exposure
512 (mean value \pm standard error). Loss of equilibrium is characterized by the fish side-laying
513 at the bottom of the microplates wells. Asterisks denotes statistical significance ($p < 0.05$),
514 # denotes concentrations where 100 % mortality occurred.

515 **Figure 3.** Total swimming time (TST) and total swimming distance (TSD) travelled
516 after exposure to FLX: **(A)** TST after 120 h; **(B)** TST after 144 h; **(C)** TST after 168
517 h; **(D)** TSD after 120 h; **(E)** TSD after 144 h; **(F)** TSD after 168 h. Asterisks denote
518 statistical significance when compared to control group ($p < 0.05$).

519 **Figure 4.** Fluoxetine effects on cholinesterase activity of zebrafish embryos after 168 h
520 of exposure to FLX (mean values \pm standard error). (A) assay with acetylcholine (ASCh);
521 (B) assay using propionylcholine (PCh). Asterisks denote statistical significance when
522 compared to control group ($p < 0.05$).

523 **Figure 5.** Species sensitivity distribution (SSD) plot of short-term toxicity data for several
524 fish species versus fluoxetine concentration. Triangle represents own data and the circles
525 other fish species. The dotted line denotes upper and lower limits.

526 **Figure 6.** An overview of No Observed Effect Concentration (NOEC) of fluoxetine on
527 sub-lethal endpoints of different fish species (mean values \pm standard error).
528 Abbreviations: TST = Total swimming time, TSD = Total swimming distance, AChE =
529 Acetylcholinesterase, DA = Dopamine, NE = Norepinephrine. Open circles means our
530 own results.

531 **Figure 7.** Comparative sensitivity of measured parameters used in the present study to
532 assess the toxicity of fluoxetine to zebrafish embryos. Values between brackets are LOEC
533 (Lowest Observed Effect Concentrations) and LC₅₀ (Lethal concentration 50%) for
534 mortality

535 **Table 1.** Percentage of hatching for zebrafish embryos during 96 h of exposure to FLX.
536 (A) Normal embryos; (B) Partially hatched embryos#; (C) Unhatched embryos.

537 **Legends to supplementary files**

538 **Supplementary file 1.** Standard curve showing the relationship between the
539 concentration of FLX and the area under the curve (AUC) and concentrations of
540 fluoxetine and recovery from used stock solutions.

541 **Supplementary file 2.** Review of lethal and sub lethal effects of fluoxetine using
542 different species of fish for toxicity assessment.

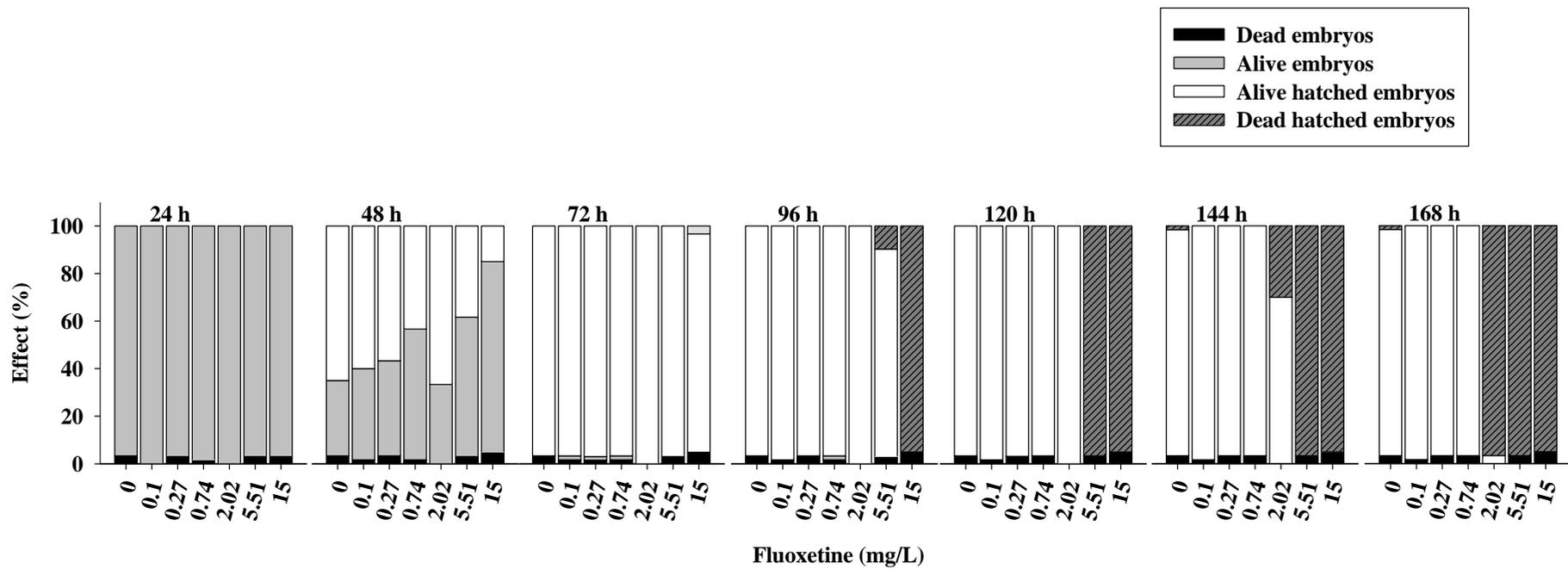


Figure 1

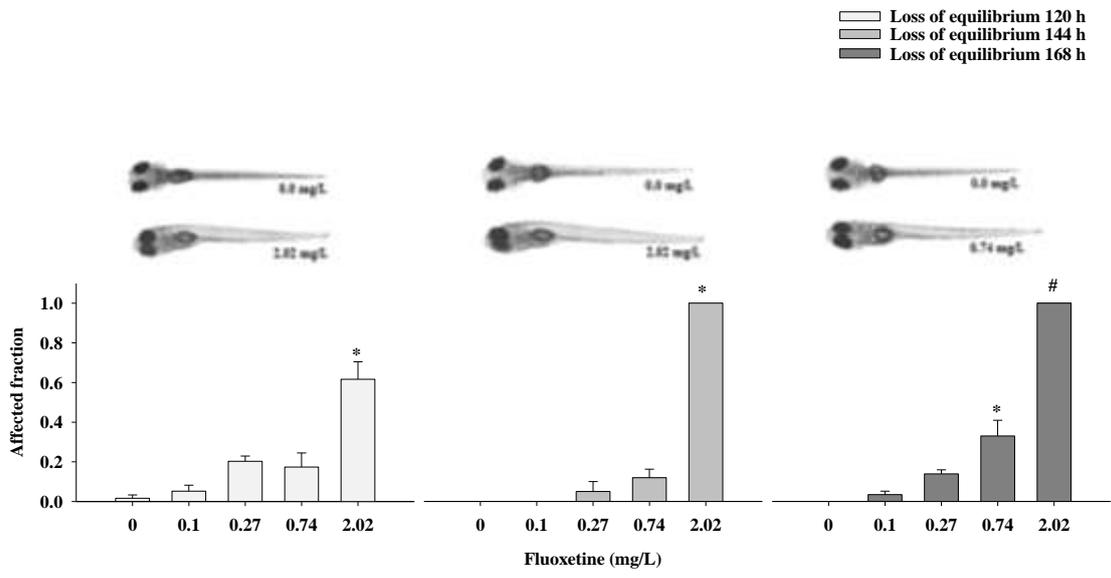


Figure 2

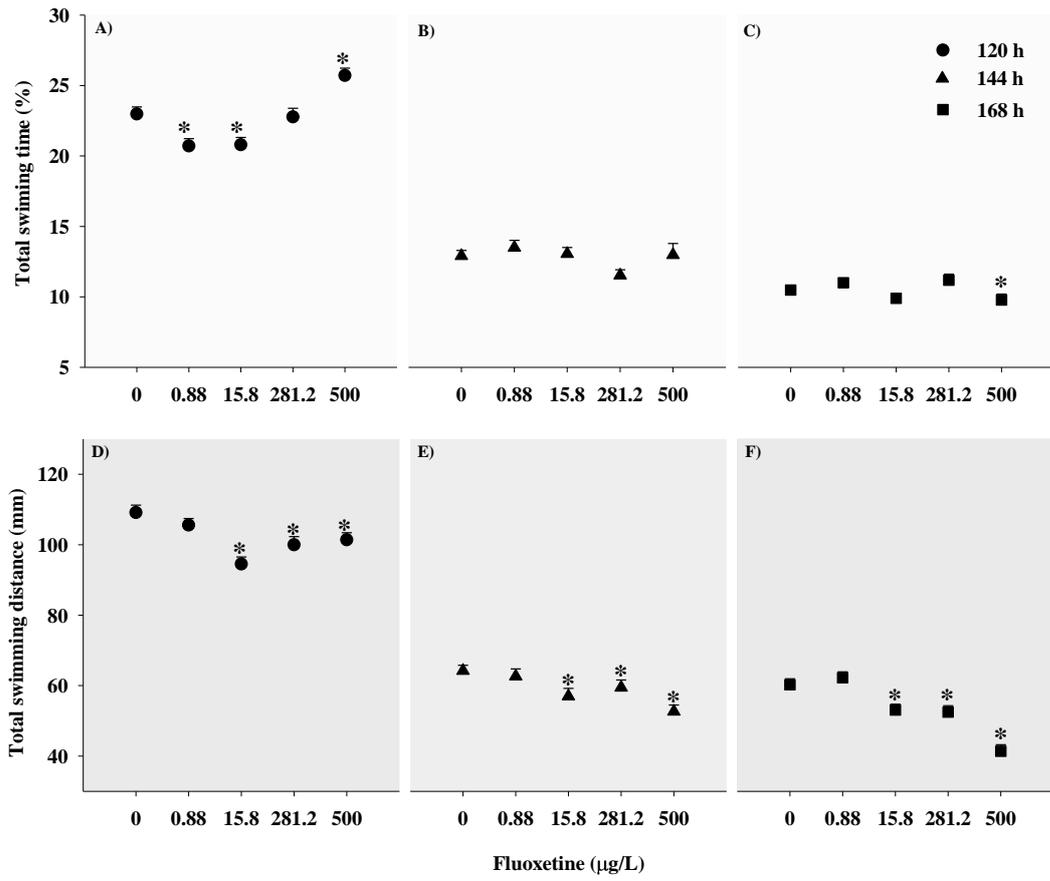


Figure 3

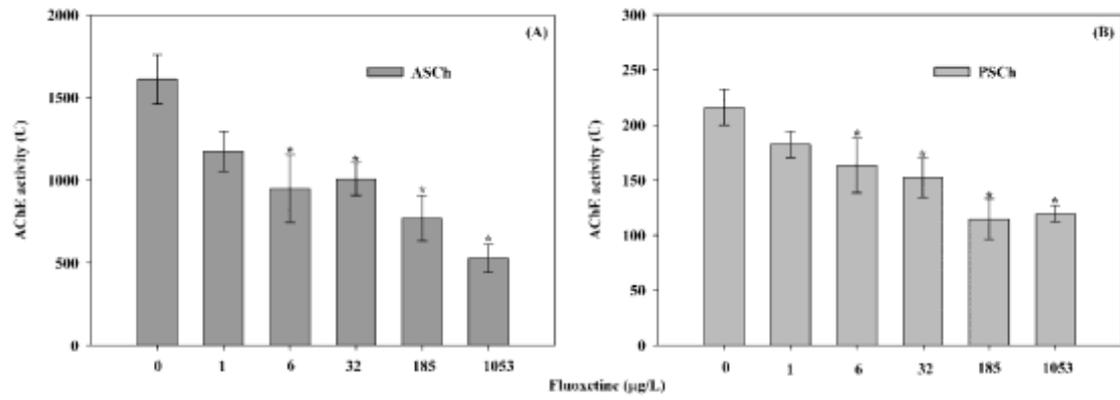


Figure 4

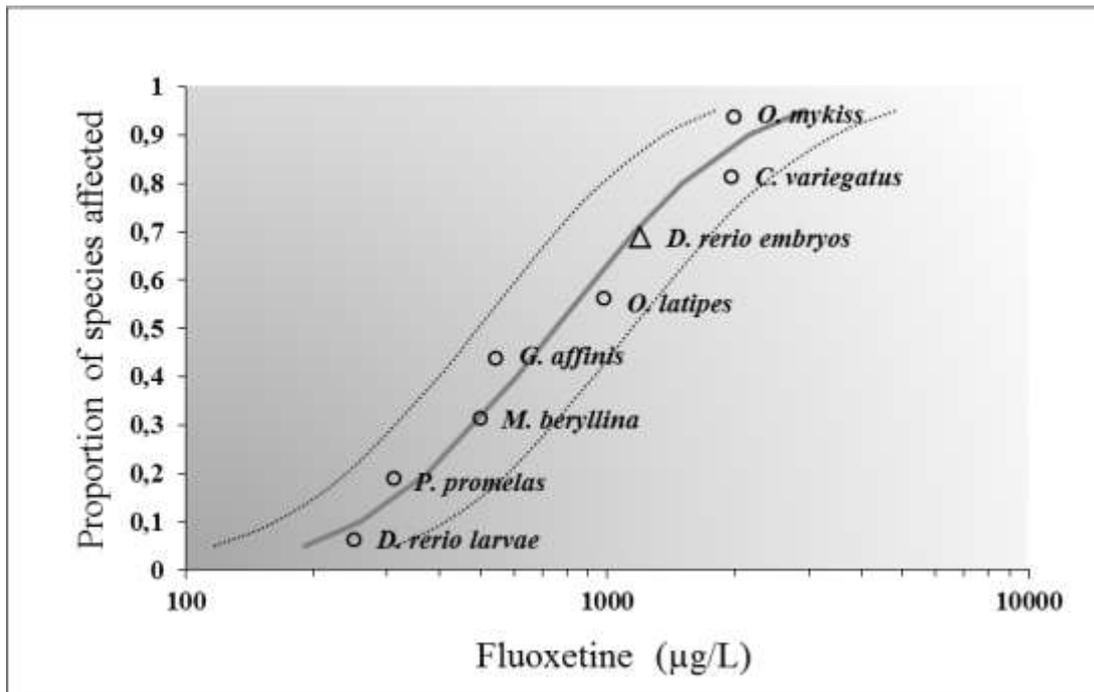


Figure 5

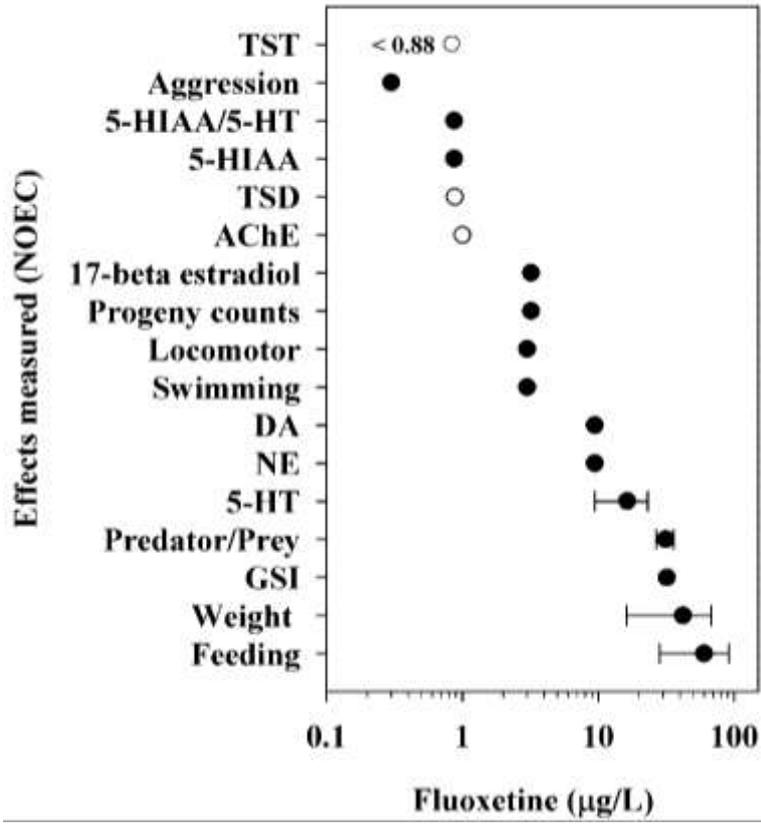


Figure 6

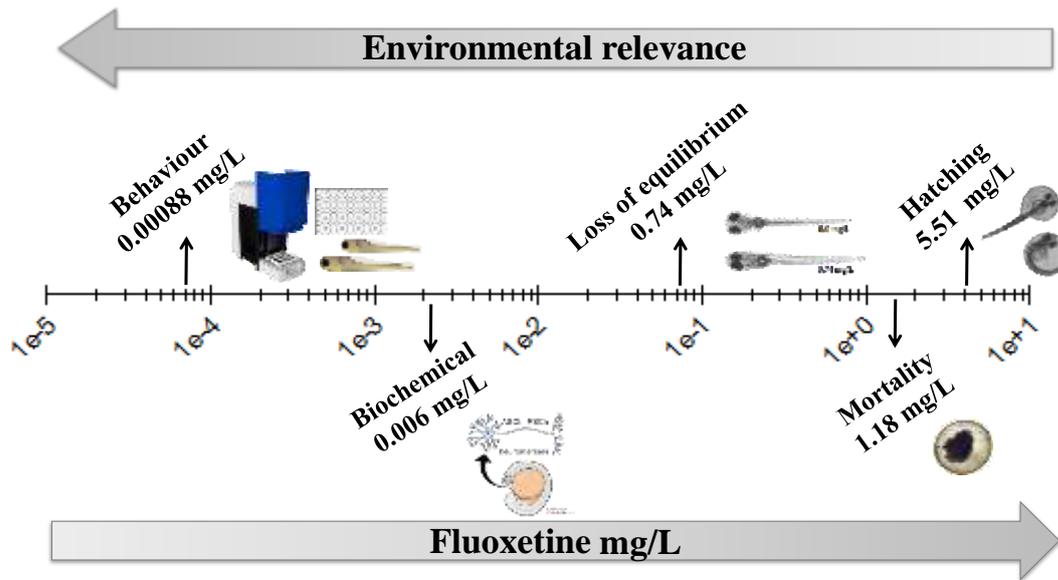
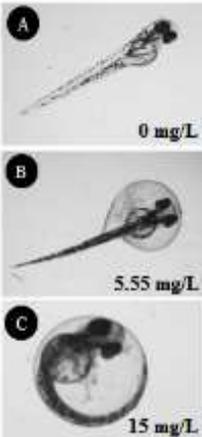


Figure 7

Table 1. Percentage of hatching for zebrafish embryos during 96 h of exposure to FLX. (A) Normal embryos; (B) Partially hatched embryos#; (C) Unhatched embryos.

Fluoxetine (mg/L)	48 h	72 h
0.0	65 (10.4)	100 (0)
0.1	60 (7.6)	98.3 (1.7)
0.3	56.7 (1.7)	98.4 (1.6)
0.7	43.3 (10.9)	98.3 (1.7)
2.0	66.7 (10.9)	100 (0)
5.51	38.3 (1.7)	100 (0)
15	15 (8.7)*	100 (0)



*Asterisks denote statistical significance when compared to control group ($p < 0.05$).

#Counted as unhatched embryos for percentage and statistical purposes.

Exposure to low concentration of fluoxetine affects development, behaviour and acetylcholinesterase activity of zebrafish embryos

Natália Oliveira de Farias^{1#}; Rhaul Oliveira^{1,2,3##}; Diego Sousa-Moura¹; Reginaldo Carlyle Silva de Oliveira¹; Maria Augusta Carvalho Rodrigues¹; Thayres Sousa Andrade¹; Inês Domingues⁴; Níchollas Serafim Camargo^{5,6}; Luís Alexandre Muehlmann^{5,6} and Cesar Koppe Grisolia¹

¹Laboratório de Genética Toxicológica, Departamento de Genética e Morfologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade de Brasília, Asa Norte, 70910-900, Brasília, Distrito Federal, Brazil.

²Faculdade de Tecnologia, Universidade Estadual de Campinas, UNICAMP, 13484-332, Limeira, São Paulo, Brazil.

³Programa de Pós-graduação em Toxicologia e Análises Toxicológicas, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, FCF – USP, 05508-000, Butantã, São Paulo, Brazil.

⁴Departamento de Biologia e CESAM, Universidade de Aveiro, Campus Universitário de Santiago, 3810-193, Aveiro, Portugal.

⁵Laboratório de Nanobiotecnologia, Departamento de Genética e Morfologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade de Brasília, Asa Norte, 70910-900, Brasília, Distrito Federal, Brazil.

⁶Faculdade da Ceilândia, Universidade de Brasília, 72220-90, Brasília, Distrito Federal, Brazil.

These authors contributed equally to the study

*Corresponding address:

Rhaul de Oliveira, Instituto de Biologia, Universidade de Brasília, Campus Universitário Darcy Ribeiro, Asa Norte, 70910-900 Brasília – Distrito Federal, Brazil

Phone: +55 61 31073084 and Fax: +55 61 32734942

These supplementary data provide a description of sampling procedure for chemical analysis and the respective results.

Index:

Figure S1. Standard curve showing the relationship between the concentration of FLX and the area under the curve (AUC)	2
Table S1. Concentrations of fluoxetine and recovery from t stock solutions.....	3

Chemical analysis

Stock solutions of fluoxetine (FLX) were prepared for each test and analysed daily over a period of seven days. During this period, they were kept under the same experimental conditions as the toxicity tests. The method used for determination of FLX was adapted from reference 1. The standard curve was determined by HPLC (Shimadzu-Prominence) coupled to degasser (model DGU 20A₅), solvent distribution module (model LC – 20AT), automatic sampler (model SIL – 20 AHT), column heater (model CTO – 20A), UV-VIS detector (model SPD-20A) and controller CBM-20A. The column used was C-18 reverse phase CLC – ODS (M) (4.6 mm i.d X 15 cm, 5 μ m).

FLX solutions in concentration between 0.1 and 20 μ g/ml were prepared in a phosphate buffer pH 3.0 and acetonitrile (35:65% (v/v)) to standard curve determination. The isocratic method flow was performed with 1.0 ml/min flow, and mobile phase was phosphate buffer pH 3.0 and acetonitrile (35:65% (v/v)). The absorbance wavelength was 228 nm and the injection volume was 20 μ L. The oven temperature was kept at 30 $^{\circ}$ C. For data processing and parameter determination, the software LC solution (Shimadzu, Tokyo, Japan) was used.

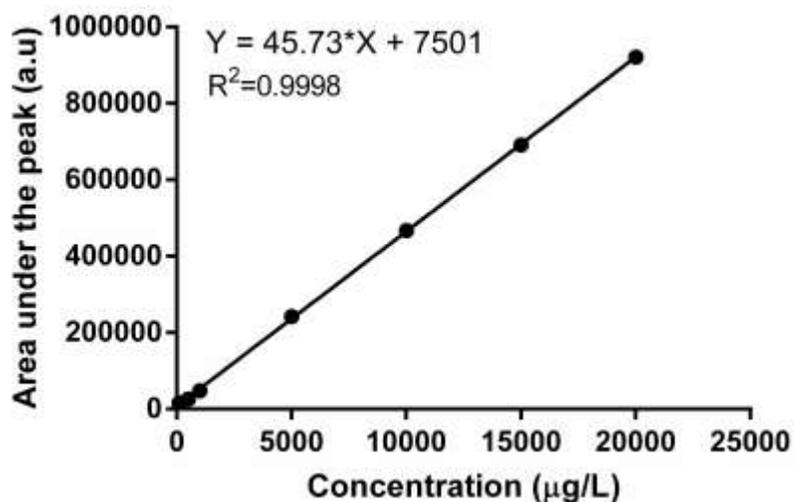


Figure S1 - Standard curve showing the relationship between the concentration of FLX and the area under the curve of the chromatogram.

Table S1 - Concentrations of fluoxetine and percentage of recovery from the stock solutions (concentrations followed by standard deviation in brackets).

Time	Concentration ($\mu\text{g/L}$)	% of recovery	Concentration ($\mu\text{g/L}$)	% of recovery
Day 0 nominal concentration	2020		15000	
Day 0	2685 (0.050)	100	15463 (0.103)	100
Day 1	2014 (0.018)	75.00	16358 (0.126)	105.79
Day 2	1797 (0.011)	66.92	14333 (0.103)	92.69
Day 3	1618 (0.017)	60.26	14244 (0.049)	92.11
Day 4	1456 (0.042)	54.24	14182 (0.141)	91.72
Day 5	1543 (0.030)	57.47	14418 (0.177)	93.24
Day 6	1770 (0.029)	65.94	14495 (0.048)	93.74
Day 7	2013 (0.041)	74.97	13605 (0.377)	87.98

[1]. Sabbioni, C.; Bugamelli, F.; Varani, G.; Mercolini, L.; Musenga, A.; Saracino, M. A.; Fanali, S.; Raggi, M. A. A Rapid HPLC-DAD Method for the Analysis of Fluoxetine and Norfluoxetine in Plasma from Overdose Patients. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2004**, *36*, 351–356.

Exposure to low concentration of fluoxetine affects development, behaviour and acetylcholinesterase activity of zebrafish embryos

Natália Oliveira de Farias^{1#}; Rhaul Oliveira^{1,2,3#*}; Diego Sousa-Moura¹; Reginaldo Carlyle Silva de Oliveira¹; Maria Augusta Carvalho Rodrigues¹; Thayres Sousa Andrade¹; Inês Domingues⁴; Níchollas Serafim Camargo^{5,6}; Luís Alexandre Muehlmann^{5,6} and Cesar Koppe Grisolia¹

¹Laboratório de Genética Toxicológica, Departamento de Genética e Morfologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade de Brasília, Asa Norte, 70910-900, Brasília, Distrito Federal, Brasil.

²Faculdade de Tecnologia, Universidade Estadual de Campinas, UNICAMP, 13484-332, Limeira, São Paulo, Brazil.

³Programa de Pós-graduação em Toxicologia e Análises Toxicológicas, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, FCF – USP, 05508-000, Butantã, São Paulo, Brazil.

⁴Departamento de Biologia e CESAM, Universidade de Aveiro, Campus Universitário de Santiago, 3810-193, Aveiro, Portugal.

⁵Laboratório de Nanobiotecnologia, Departamento de Genética e Morfologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade de Brasília, Asa Norte, 70910-900, Brasília, Distrito Federal, Brazil.

⁶Faculdade da Ceilândia, Universidade de Brasília, 72220-90, Brasília, Distrito Federal, Brazil.

These authors contributed equally to the study

*Corresponding address:

Rhaul de Oliveira, Instituto de Biologia, Universidade de Brasília, Campus Universitário Darcy Ribeiro, Asa Norte, 70910-900 Brasília – Distrito Federal, Brazil

Phone: +55 61 31073084 and Fax: +55 61 32734942

These supplementary data provide our own data and a literature review of the lethal and sub-lethal effects of fluoxetine on different fish species including zebrafish.

Index:

Table S2. Table S2. Lethal effects of fluoxetine using different species of fish for toxicity assessment (LC ₅₀ values in µg/L, mortality)	2
Table S3. Table S3. Sub lethal effects of fluoxetine using different species of fish for toxicity assessment (NOEC ² values in µg/L)	3

Table S2. Review of fluoxetine mortality data for fish species. Data From short-term toxicity tests with 1 – 7 days of exposure. Values presented as LC₅₀¹ in µg/L).

Species	Life stages	Time of exposure (Day)	Values (µg/L)	References
<i>Cyprinodon variegatus</i>	Juvenile	4	1976	(Winder et al., 2011)
<i>Danio rerio</i>	Embryos	7	1200	Own results
<i>Danio rerio</i>	Larvae	4	250.55	(Alsop and Wood, 2013)
<i>Gambusia affinis</i>	Adult	7	546	(Henry and Black, 2008)
<i>Menidia beryllina</i>	Adult	2	500	(Daigle, 2010)
<i>Oncorhynchus mykiss</i>	n.r. ²	n.r.	2000	(Lilly, 2006)
<i>Oryzias latipes</i>	Adult	2	655	(Johnson, 2004)
<i>Oryzias latipes</i>	Juvenile	4	5500	(Nakamura et al., 2008)
<i>Oryzias latipes</i>	Juvenile	4	200	(Nakamura et al., 2008)
<i>Oryzias latipes</i>	Juvenile	4	1300	(Nakamura et al., 2008)
<i>Pimephales promelas</i>	Juvenile	7	686.71	(Brooks et al., 2003)
<i>Pimephales promelas</i>	Juvenile	2	198	(Stanley et al., 2007)
<i>Pimephales promelas</i>	Larvae	2	164	(Johnson, 2004)
<i>Pimephales promelas</i>	Juvenile	7	890.87	(Brooks et al., 2003)
<i>Pimephales promelas</i>	Juvenile	2	216	(Stanley et al., 2007)
<i>Pimephales promelas</i>	Juvenile	2	212	(Stanley et al., 2007)

¹LC₅₀ = Lethal concentration 50%

² n.r. = not reported

Table S3. Short-term sub lethal effects of fluoxetine on fish species (1-7 days of exposure; NOEC¹ values in µg/L).

Species	Life stages	Time of exposure (Day)	Effect ²	Effect measurement ³	Values (µg/L)	References
<i>Aphanius dispar</i>	Juvenile	3	BEH	Locomotor	3	(Barry, 2013)
<i>Aphanius dispar</i>	Juvenile	3	BEH	Swimming	3	(Barry, 2013)
<i>Aphanius dispar</i>	Juvenile	7	BEH	Aggression	0.3	(Barry, 2013)
<i>Aphanius dispar</i>	Juvenile	7	BEH	Swimming	3	(Barry, 2013)
<i>Danio rerio</i>	Embryos	7	CEL	AChE	60	Own results
<i>Danio rerio</i>	Adult	7	REP	GSI	32	(Lister et al., 2009)
<i>Danio rerio</i>	Adult	7	REP	17-beta estradiol	3.2	(Lister et al., 2009)
<i>Danio rerio</i>	Adult	7	REP	Progeny counts	3.2	(Lister et al., 2009)
<i>Danio rerio</i>	Adult	7	BEH	Locomotor	100	(Wong et al., 2013)
<i>Danio rerio</i>	Embryos	7	BEH	TST	< 0.88	Own results
<i>Danio rerio</i>	Embryos	7	BEH	TSD	15.8	Own results
<i>Danio rerio</i>	Adult	7	GRO	Weight	32	(Lister et al., 2009)
<i>Morone saxatilis ssp. x chrysops</i>	Juvenile	6	CEL	5-HIAA/5-HT	0.87	(Gaworecki and Klaine, 2008)
<i>Morone saxatilis ssp. x chrysops</i>	Juvenile	6	CEL	5-HIAA	0.87	(Gaworecki and Klaine, 2008)
<i>Morone saxatilis ssp. x chrysops</i>	Juvenile	6	CEL	5-HIAA/5-HT	0.87	(Gaworecki and Klaine, 2008)
<i>Morone saxatilis ssp. x chrysops</i>	Juvenile	6	CEL	5-HT	23.2	(Gaworecki and Klaine, 2008)
<i>Morone saxatilis ssp. x chrysops</i>	Juvenile	6	CEL	5-HT	9.44	(Gaworecki and Klaine, 2008)
<i>Morone saxatilis ssp. x chrysops</i>	Juvenile	6	CEL	NE	9.44	(Gaworecki and Klaine, 2008)
<i>Morone saxatilis ssp. x chrysops</i>	Juvenile	6	CEL	DA	9.44	(Gaworecki and Klaine, 2008)
<i>Morone saxatilis ssp. x chrysops</i>	Adult	3	BEH	Predator/Prey	41.17	(Bisesi et al., 2016)
<i>Morone saxatilis ssp. x chrysops</i>	Adult	3	BEH	Predator/Prey	27.42	(Bisesi et al., 2016)
<i>Morone saxatilis ssp. x chrysops</i>	Adult	6	BEH	Predator/Prey	18.59	(Bisesi et al., 2016)
<i>Morone saxatilis ssp. x chrysops</i>	Adult	6	BEH	Predator/Prey	41.17	(Bisesi et al., 2016)

Table S3. Short-term sub lethal effects of fluoxetine on fish species (1-7 days of exposure; NOEC¹ values in µg/L).

Species	Life stages	Time of exposure (Day)	Effect ²	Effect measurement ³	Values (µg/L)	References
<i>Pimephales promelas</i>	Juvenile	7	BEH	Feeding	53	(Stanley et al., 2007)
<i>Pimephales promelas</i>	Juvenile	7	BEH	Feeding	9	(Stanley et al., 2007)
<i>Pimephales promelas</i>	Juvenile	7	BEH	Feeding	118	(Stanley et al., 2007)
<i>Pimephales promelas</i>	Juvenile	7	GRO	Weight	9	(Stanley et al., 2007)
<i>Pimephales promelas</i>	Juvenile	7	GRO	Weight	118	(Stanley et al., 2007)

¹ NOEC = No observed effective concentration

² BEH = Behaviour; CEL = Cellular; GRO = Growth; REP = Reproductive

³ 5-HIAA = 5-Hydroxyindoleacetic acid; 5-HT = Serotonin; AchE = Acetylcholinesterase; DA = Dopamine; GSI = Gonadosomatic Index; NE = Norepinephrine; TSD = Total Swimming Distance; TST = Total Swimming Time.

References

- Alsop, D., Wood, C.M., 2013. Metal and pharmaceutical mixtures: Is ion loss the mechanism underlying acute toxicity and widespread additive toxicity in zebrafish? *Aquat. Toxicol.* 140-141, 257–267. doi:10.1016/j.aquatox.2013.05.021
- Barry, M.J., 2013. Effects of fluoxetine on the swimming and behavioural responses of the Arabian killifish. *Ecotoxicology* 22, 425–432. doi:10.1007/s10646-012-1036-7
- Bisesi, J.H., Sweet, L.E., van den Hurk, P., Klaine, S.J., 2016. Effects of an antidepressant mixture on the brain serotonin and predation behavior of hybrid striped bass. *Environ. Toxicol. Chem.* 35, 938–945. doi:10.1002/etc.3114
- Brooks, B.W., Turner, P.K., Stanley, J.K., Weston, J.J., Glidewell, E. a., Foran, C.M., Slattery, M., La Point, T.W., Huggett, D.B., 2003. Waterborne and sediment toxicity of fluoxetine to select organisms. *Chemosphere* 52, 135–142. doi:10.1016/S0045-6535(03)00103-6

- Daigle, J.K., 2010. ACUTE RESPONSES OF FRESHWATER AND MARINE SPECIES TO ETHINYL by.
- Gaworecki, K.M., Klaine, S.J., 2008. Behavioral and biochemical responses of hybrid striped bass during and after fluoxetine exposure. *Aquat. Toxicol.* 88, 207–213. doi:10.1016/j.aquatox.2008.04.011
- Henry, T.B., Black, M.C., 2008. Acute and chronic toxicity of fluoxetine (selective serotonin reuptake inhibitor) in western Mosquitofish. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 54, 325–330. doi:10.1007/s00244-007-9018-0
- Johnson, 2004. Risk assessment of selective serotonin reuptake inhibitors: comparing methods in tiered environmental risk assessment.
- Lilly, E., 2006. Fluoxetine Hydrochloride Capsules and Tablets 1–9.
- Lister, A., Regan, C., Van Zwol, J., Van Der Kraak, G., 2009. Inhibition of egg production in zebrafish by fluoxetine and municipal effluents: A mechanistic evaluation. *Aquat. Toxicol.* 95, 320–329. doi:10.1016/j.aquatox.2009.04.011
- Nakamura, Y., Yamamoto, H., Sekizawa, J., Kondo, T., Hirai, N., Tatarazako, N., 2008. The effects of pH on fluoxetine in Japanese medaka (*Oryzias latipes*): Acute toxicity in fish larvae and bioaccumulation in juvenile fish. *Chemosphere* 70, 865–873. doi:10.1016/j.chemosphere.2007.06.089
- Stanley, J.K., Ramirez, A.J., Chambliss, C.K., Brooks, B.W., 2007. Enantiospecific sublethal effects of the antidepressant fluoxetine to a model aquatic vertebrate and invertebrate. *Chemosphere* 69, 9–16. doi:10.1016/j.chemosphere.2007.04.080
- Winder, V.L., Pennington, P.L., Hurd, M.W., Wirth, E.F., 2011. Fluoxetine effects on sheepshead minnow (*Cyprinodon variegatus*) locomotor activity. *J. Environ. Sci. Heal. Part B* 47, 51–58. doi:10.1080/03601234.2012.607767
- Wong, R.Y., Oxendine, S.E., Godwin, J., 2013. Behavioral and neurogenomic transcriptome changes in wild-derived zebrafish with fluoxetine treatment. *BMC Genomics* 14, 348. doi:10.1186/1471-2164-14-348