



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
INSTITUTO DE BIOLOGIA
DEPARTAMENTO DE GENÉTICA E MORFOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA ANIMAL

Ana Clara Oliveira

**Avaliação da toxicidade aguda e crônica dos fármacos psiquiátricos
(nortriptilina e venlafaxina) em peixe-zebra (*Danio rerio*) utilizando
abordagens tradicionais e genômicas**

Brasília

2021



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
INSTITUTO DE BIOLOGIA
DEPARTAMENTO DE GENÉTICA E MORFOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA ANIMAL

Ana Clara Oliveira

**Avaliação da toxicidade aguda e crônica dos fármacos psiquiátricos
(nortriptilina e venlafaxina) em peixe-zebra (*Danio rerio*) utilizando
abordagens tradicionais e genômicas**

Tese apresentada ao curso de Pós-graduação em Biologia Animal da Universidade de Brasília (UnB), no Instituto de Ciências Biológicas no Departamento de Genética e Morfologia, como requisito para obtenção do título de doutor, pela Universidade de Brasília.

Orientador: Prof. Dr. Cesar Koppe Grisolia

Coorientador: Prof. Dr. Rolando André Villacis

Brasília

2021

FICHA CATALOGRÁFICA

Oliveira, Ana Clara

Avaliação da toxicidade aguda e crônica de fármacos psiquiátricos (nortriptilina e venlafaxina) em peixe-zebra (*Danio rerio*) utilizando abordagens tradicionais e genômicas/ Ana Clara Oliveira. - Brasília, 2021.
xxii, 230f.

Tese de Doutorado apresentada ao Instituto de Ciências Biológicas - Universidade de Brasília, Campus Darcy Ribeiro, Brasília, 2021

Orientador: Prof. Dr. César Koppe Grisolia.

1. Peixe-zebra. 2. Fármacos psiquiátricos. 3- Antidepressivos. 4 – Nortriptilina. 5- Venlafaxina. 6 - Toxicidade aguda. 7- Toxicidade crônica

Tese apresentada ao curso de Pós-graduação em Biologia Animal da Universidade de Brasília (UnB), no Instituto de Ciências Biológicas no Departamento de Genética e Morfologia, como requisito para obtenção do título de doutor, pela Universidade de Brasília.

Banca examinadora

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

Titular: Professora Dra. Daniela de Melo e Silva (Universidade Federal de Goiás – UFG)

Titular: Professor Dr. Denis Broock Rosemberg (Universidade Federal de Santa Maria – UFSM)

Titular: Professora Dra. Mariana de Souza Castro (Universidade de Brasília – UnB)

Suplente: Professor Dr. João Paulo Figueiró Longo (Universidade de Brasília – UnB)

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, **Prof. Dr. César Koppe Grisolia**, por ter me recebido em seu laboratório, com muito carinho, e por ter confiado em mim para ser sua aluna. Agradeço, em primeiro lugar, por ter me orientado e oferecido todo o suporte necessário para a realização desse trabalho, e em segundo lugar, pela amizade, apoio e por me auxiliar no meu amadurecimento profissional.

Ao meu coorientador, **Prof. Dr. Rolando André Villacis**, por toda a ajuda, suporte e principalmente, amizade, que me proporcionou durante os quatro anos de doutorado. Me ajudando, não só, na parte teórica e científica da minha tese, como também na parte experimental. Sem sua ajuda, muito do que me propus a fazer não seria possível.

Ao apoio financeiro das **instituições de fomento**: a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), na concessão da bolsa de doutorado; e a Fundação de Apoio à Pesquisa do Distrito Federal (FAP -DF) pelos auxílios complementares para andamento do projeto.

Ao **Prof. Dr. Osmindo Rodrigues Pires Júnior** pela simpatia e por permitir a utilização de equipamentos de seu laboratório.

Ao **Prof. Dr. Sacha Braun Chaves**, chefe do Departamento de Genética da FMRP-USP.

À **Profª. Drª. Mônica Pereira Garcia**, coordenadora do curso de Pós-Graduação do Departamento de Genética da FMRP-USP pelo apoio e dedicação à pós-graduação.

Aos **professores membros da banca examinadora**, pela disponibilidade e contribuições para este trabalho.

À técnica do laboratório de Genética Toxicológica, **Juliana**, por cuidar tão bem do sistema com nossos peixes e sempre disposta a nos auxiliar.

Aos colegas e amigos de Genética Toxicológica: **Diego, Natália, Tati e Ingrid**. Agradeço por partilharem comigo, conhecimento e amizade, por estarem sempre dispostos a ajudar quando precisei e, pela ótima convivência no nosso dia a dia. Agradeço de coração por terem me recebido de braços abertos no laboratório. Agradeço de maneira bastante especial, a amiga que me ajudou imensuravelmente na parte metodológica da minha tese e principalmente, por ter

sido sempre tão amável comigo durante esses quatro anos: **Maria Luiza**. Malu, obrigada por dividir comigo conhecimentos acadêmicos, cafés, receitas, caronas e muito trabalho na bancada de experimento; e, principalmente, obrigada por sempre me ajudar quando eu precisei! Vou levar sua amizade sempre comigo.

Ao meu **Papai** e minha **Mamãe**, por sempre acreditarem em mim, e não medirem esforços para realizar os meus sonhos. Graças a vocês, consegui concluir mais essa etapa da minha vida. Vocês que são meus maiores exemplos de vida, me falta palavras para agradecer.

Ao meu irmão, **João Gabriel**, que se não tivesse nascido, alguém ia ter que inventar. Obrigada por ser sempre tão alto astral, fazendo piada de tudo, e me mostrando o lado bom de toda e qualquer circunstância adversa.

Ao meu marido, **Mateus**, por sempre ser meu companheiro e por cuidar tanto de mim. Me incentivando, acolhendo e me apoiando em todos os momentos difíceis. Obrigada por ser a pessoa que posso contar todos os dias da minha vida.

Meu muito obrigada a todos que participaram e colaboraram com o desenvolvimento desse trabalho e conseqüentemente, com meu crescimento profissional.

RESUMO

Na última década, novas substâncias começaram a aparecer em concentrações quantificáveis nos ecossistemas aquáticos. Estas substâncias, conhecidas como contaminantes emergentes, incluem os fármacos psiquiátricos, medicamentos estes que se encontram entre os mais prescritos mundialmente. Com isso, a presença deles no meio ambiente eleva-se a cada ano. Atualmente, os possíveis efeitos nocivos dos fármacos psiquiátricos em organismos não-alvo são motivos de preocupação por parte da comunidade científica e menos de um terço dessas substâncias apresentam estudos ecotoxicológicos, sendo que mais escassas ainda são as pesquisas que avaliam os efeitos crônicos desses fármacos nos ambientes aquáticos em baixas concentrações. Nesse contexto, o objetivo deste trabalho foi avaliar o potencial nocivo de dois fármacos psiquiátricos antidepressivos amplamente utilizados, a nortriptilina (NTP) e a venlafaxina (VLX), que estão presentes em matrizes aquáticas, e que apresentam informação ecotoxicológica limitada. Para este fim utilizamos diferentes estágios de vida do peixe-zebra (*Danio rerio*), embrio-larval e adulto, para realizar exposições agudas e crônicas, avaliando múltiplos parâmetros de toxicidade. A exposição aguda à NTP (500; 1100; 2300; 4800; 10300; 22000; 46900 µg/L) no teste de toxicidade com embriões (168 horas), apresentou CL₅₀ de 1800 µg/L no fim do teste; alterou o equilíbrio das larvas: após 96 horas de exposição às concentrações de 1100; 2300; 4800 de NTP; após 144 horas de exposição às concentrações de 500, 1100, 2300 µg/L de NTP; e após 168 horas de exposição à concentração de 1100 µg/L de NTP. A exposição das larvas à NTP reduziu a frequência cardíaca após 48 horas de exposição à concentração de 10300 µg/L de NTP. Apresentaram diminuição da atividade da enzima acetilcolinesterase as larvas expostas: à concentração de 500 µg/L de NTP, durante 120 e 144 horas; e às concentrações de 0,088, 1,58 e 500 µg/L de NTP, durante 168 horas. A exposição à NTP também alterou, nas larvas, o comportamento natatório: após 120 horas de exposição à concentração de 500 µg/L de NTP; após 144 horas de exposição à concentração de 0,006, 0,088, 28,12 e 500 µg/L de NTP; e após 168 horas de exposição à concentração de 28,12 e 500 µg/L de NTP. A exposição aguda (96 horas), de peixes adultos, às concentrações de 500, 600, 800, 1100, 1400, 1800 e 2000 µg/L de NTP, apresentou CL₅₀ de 1100 µg/L, ao final do experimento e induziu a diminuição da atividade da enzima acetilcolinesterase nos peixes expostos às concentrações de 500, 600, 800, 1100 µg/L, mas não danos no DNA pela avaliação pelo teste do cometa e micronúcleo. A exposição crônica (28 dias), de peixes adultos, às concentrações de 0,1 e 10 µg/L de NTP, não induziu mortalidade, genotoxicidade, alteração na atividade da acetilcolinesterase e alterações histopatológicas nos rins, brânquias e fígado, mas foi capaz de

alterar o comportamento natatório dos animais expostos à concentração 10 µg/L de NTP, levando ao aumento na frequência de permanência na camada superior do aquário nesses animais expostos, em comparação com o controle. Nessa mesma exposição, a análise genômica por *microarray*, das amostras cerebrais, identificou 243 genes diferencialmente expressos nos grupos expostos em comparação ao grupo controle: sessenta e seis genes entre o grupo controle e os animais expostos à concentração de 0,1 µg/L de NTP e 184 genes são exclusivos entre o grupo controle e os animais expostos à concentração de 10 µg/L de NTP. As principais vias gênicas alteradas na concentração de 0,1 µg/L de NTP estão associadas com oxidorredução, transportadores de íon cálcio e fatores de transcrição; enquanto que na concentração de 10 µg/L de NTP, os principais genes alterados estão relacionados com processos de oxirredução, transporte transmembrana de íons, sistema imunológico, metabolismo mitocondrial e comportamento locomotor. No estudo de toxicidade da VLX, a exposição a esse fármaco (100000; 177900; 237300; 316400; 421800; 562500; 750000; 1000000 µg/L) no teste de toxicidade em embriões, durante 168 horas, apresentou CL₅₀ de 274100 µg/L ao final do experimento; antecipou a eclosão dos ovos nas concentrações de 100000 e 117900 µg/L; alterou o equilíbrio das larvas após 96 horas de exposição às concentrações de 100000; 237300; 316400; 421800 e 562500 µg/L de VLX; após 120 horas de exposição às concentrações de 316400; 421800 e 562500 µg/L de VLX; após 144 horas de exposição às concentrações de 316400 e 421800 µg/L de VLX; e após 168 horas de exposição às concentrações de 237300 e 316400 µg/L de VLX. No teste de toxicidade com embriões a exposição à VLX também reduziu a frequência cardíaca, das larvas, após 48 horas de exposição às concentrações de 237300; 316400; 421800 e 562500 µg/L. Larvas apresentaram diminuição na atividade das enzimas: acetilcolinesterase (após exposição às concentrações de 1000, 25000 e 100000 µg/L de VLX), glutathione S-transferase (após exposição às concentrações de 2, 1000 e 25000 µg/L de VLX) e aumento na atividade da enzima lactato desidrogenase (após exposição à concentração de 100000 µg/L de VLX). A exposição aguda (96 horas), de peixes adultos, às concentrações de 1000, 25000, 50000, 75000 e 100000 µg/L de VLX: apresentou CL₅₀ superior a 100000 µg/L ao final do experimento; e, nas amostras de cabeça: foi capaz de causar a diminuição na atividade da enzima glutathione-S-transferase (após exposição às concentrações de 25000, 50000 e 100000 µg/L de VLX) e aumento na atividade da enzima lactato desidrogenase (após exposição à concentração de 100000 µg/L de VLX); e nas amostras musculares, causou o aumento na atividade da enzima glutathione-S-transferase (após exposição à concentração de 100000 µg/L). Tal exposição aguda, não se mostrou genotóxica pelas avaliações do teste do cometa e micronúcleo. A exposição crônica (28 dias), de peixes adultos,

às concentrações de 0,2 e 1000 µg/L de VLX, não induziu mortalidade e genotoxicidade, mas alterou a atividade dos biomarcadores enzimáticos: aumentou a atividade das enzimas glutationa-S-transferase (após exposição à concentração de 0,2 µg/L de VLX) e lactato desidrogenase (após exposição à concentração de 0,2 e 1000 µg/L de VLX), nas amostras da cabeça. Avaliações morfométricas revelaram que, tal exposição crônica, causou no intestino redução na altura do epitélio, após exposição à concentração de 1000 µg/L de VLX; e, após exposição à concentração de 0,2 e 1000 µg/L de VLX causou redução na largura e na altura das vilosidades intestinais, além da redução do tamanho das lamelas secundárias das brânquias. A exposição crônica, à concentração de 1000 µg/L de VLX, também foi capaz de alterar o comportamento locomotor: causou redução na velocidade máxima de nado e aumento no tempo gasto e na distância percorrida na área superior do aquário pelos animais. Após essa exposição, a análise genômica por *microarray*, das amostras cerebrais, mostrou que 80 genes estavam diferencialmente expressos nos grupos tratados em comparação ao grupo controle, dos quais 60 são entre o controle e os animais expostos à concentração de 0,2 µg/L de VLX e 43 genes são entre o controle e os animais expostos à concentração de 1000 µg/L de VLX, sendo que para esses dois grupos expostos as principais vias gênicas alteradas estão associadas com atividade locomotora e ciclo circadiano. De maneira geral, a exposição à NTP se revelou mais tóxica em comparação com a exposição à VLX ao organismo-modelo, no teste com embriões e adultos, mas os dois antidepressivos em concentrações baixas, inclusive ambientalmente relevantes, apresentaram efeitos tóxicos nas larvas (causando comprometimento da atividade de enzimas biomarcadores e a alteração do padrão locomotor) e em peixes adultos (causando desregulação da expressão de genes). Além disso, após exposição crônica (à concentração de 10 µg/L de NTP e à concentração de 1000 µg/L de VLX), os dois fármacos causaram fenótipo semelhante: provocaram um comportamento locomotor mais relaxado de nado, indicando que ambas as exposições são capazes de alterar comportamentos primários de sobrevivência desses animais. Os resultados aqui apresentados são inéditos na literatura e contribuem para um melhor entendimento do efeito tóxico dos fármacos psiquiátricos descartados no meio ambiente em organismos não-alvo.

Palavras-chave: Peixe-zebra, fármacos psiquiátricos, antidepressivos, nortriptilina, venlafaxina, toxicidade aguda, toxicidade crônica

ABSTRACT

In the last decade, new substances began to appear in quantifiable concentrations in different aquatic ecosystems. These substances, known as emerging contaminants, include psychiatric drugs. These medicines are among the most prescribed worldwide and their presence in the environment tends to increase each year. Currently, the possible harmful effects of psychiatric drugs on non-target organisms are of concern to the scientific community. Less than one-third of these drugs present ecotoxicological studies. Particularly, there is a lack of research that evaluates the chronic effects of drugs in aquatic environments and in low concentrations. In this context, the objective of this study was to evaluate the harmful potential of two psychiatric drugs (nortriptyline and venlafaxine) present in aquatic matrices and with little or no ecotoxicological information. For this purpose we used different life stages of zebrafish (*Danio rerio*), acute and chronic exposures and multiple parameters of toxicity. Acute exposure to NTP (500; 1100; 2300; 4800; 10300; 22000; 46900 $\mu\text{g/L}$) in the embryo toxicity test (168 hours), showed LC_{50} of 1800 $\mu\text{g/L}$ at the end of the test; altered the larvae equilibrium after 96, 120, 144 and 168 hours of exposure and reduced the heart rate after 48 hours of exposure to the concentration of 10300 $\mu\text{g/L}$ of NTP. The larvae exposure led to enzyme activity acetylcholinesterase decreased: at 500 $\mu\text{g/L}$ NTP concentration, after 120 and 144 hours of exposure; and 0.088, 1.58 and 500 $\mu\text{g/L}$ NTP concentration, after 168 hours of exposure. Exposure to NTP also altered swimming behavior in larvae: after 120 hours of exposure at 500 $\mu\text{g/L}$ of NTP concentration; after 144 hours of exposure at 0.006, 0.088, 28.12 and 500 $\mu\text{g/L}$ of NTP concentration; and after 168 hours of exposure at 28.12 and 500 $\mu\text{g/L}$ NTP concentration. The adult fish acute exposure (96 hours) to 500, 600, 800, 1100, 1400, 1800 and 2000 $\mu\text{g/L}$ of NTP, showed a CL_{50} of 1100 $\mu\text{g/L}$ at the end of the experiment and induced a enzyme acetylcholinesterase activity decrease's in fish exposed to concentrations of 500, 600, 800, 1100 $\mu\text{g/L}$, but not DNA damage. Adult fish chronic exposure (28 days) to 0.1 and 10 $\mu\text{g/L}$ of NTP concentrations did not induce mortality, genotoxicity, changes in acetylcholinesterase activity and histopathological changes in the kidneys, gills and liver, but was able to alter the swimming behavior of animals exposed to the 10 $\mu\text{g/L}$ of NTP concentration, leading to an increase in the frequency of permanence in the upper layer of the aquarium in these exposed animals, compared to the control animals. In that same exposure, brain samples genomic analysis by microarray, identified 243 genes differentially expressed in the exposed groups in comparison to the control group: 59 genes are exclusive between the control group and the animals exposed to 0.1 $\mu\text{g/L}$ of NTP concentration and 177 genes are exclusive between the control group and

the animals exposed to 10 µg/L of NTP concentration. The main altered gene pathways in the concentration of 0.1 µg/L of NTP are associated with oxidoreduction, calcium ion transporters and transcription factors; while at 10 µg/L of NTP concentration, the main altered genes are related to oxidoreduction processes, ion transmembrane transport, immune system, mitochondrial metabolism and locomotor behavior. In the VLX toxicity study, exposure to this drug (100000; 177900; 237300; 316400; 421800; 562500; 750000; 1000000 µg / L) in the embryo toxicity test, for 168 hours, showed a 274100 µg/L CL₅₀ at the end of the experiment; anticipated the hatching of eggs at 100000 and 117900 µg/L of VLX exposure; altered the balance of the larvae after 96 hours of exposure, at 100000; 237300; 316400; 421800 and 562500 µg/L of VLX concentration, after 120 hours of exposure, at 316400; 421800 and 562500 µg/L of VLX concentrations, after 144 hours of exposure, at 316400 and 421800 µg/L of VLX concentrations and after 168 hours of exposure, at 237300 and 316400 µg/L of VLX concentrations; and, also, it reduced the larvae heart rate, after 48 hours of exposure to 237300; 316400; 421800 and 562500 µg/L of VLX concentrations. Larvae showed acetylcholinesterase enzymes decrease's activity of (after exposure to 1000, 25000 and 100000 µg/L of VLX), decreased glutathione S-transferase (after exposure to 2, 1000 and 25000 µg/L of VLX) and increased activity of the lactate dehydrogenase enzyme (after exposure to 100000 µg/L of VLX). The adult fish acute exposure (96 hours) to 1000, 25000, 50000, 75000 and 100000 µg/L of VLX: showed an LC₅₀ higher than 100000 µg/L at the end of the experiment; and, in the head samples: it was able to cause enzyme glutathione-S-transferase decrease's activity (after exposure to 25000, 50000 and 100000 µg/L of VLX) and increase's activity of the enzyme lactate dehydrogenase (after exposure to 100000 µg/L of VLX); and in muscle samples, caused activity of the enzyme glutathione-S-transferase increase's (after exposure to 100000 µg/L of VLX). Such acute exposure was not genotoxic by evaluations of the comet and micronucleus test. Adult fish chronic exposure (28 days) to 0.2 and 1000 µg/L of VLX did not induce mortality and genotoxicity, but altered the activity of enzyme biomarkers: increased activity of the enzyme glutathione-S-transferase (after exposure to the 0.2 µg/L of VLX) and lactate dehydrogenase (after exposure to 0.2 and 1000 µg/L of VLX), in the head samples. Morphometric evaluations revealed that such chronic exposure caused in the intestine epithelium height reductions, after exposure to 1000 µg/L of VLX; and, after exposure to 0.2 and 1000 µg/L of VLX concentrations caused intestinal villi width and height reductions, besides the gills size secondary lamellae of the reductions. Chronic exposure, to 1000 µg/L of VLX, change the locomotor behavior: causing maximum swimming speed reductions and time and distance spent in the upper area of the aquarium covered increases. After this exposure, the

brain samples genomic analysis by microarray, showed that 80 genes were differentially expressed in the treated groups compared to the control group, which 37 are exclusive between the control and the animals exposed to the concentration of 0.2 $\mu\text{g/L}$ of VLX and 20 genes are exclusives between the control and the animals exposed to the concentration of 1000 $\mu\text{g/L}$ of VLX, and for these two groups exposed the main altered gene pathways are associated with locomotor activity and circadian cycle. In general, exposure to NTP proved to be more toxic compared to exposure to VLX to the model organism, in embryo and adult test, but the two antidepressants at low concentrations, including environmentally relevant ones, had toxic effects on the larvae (causing impairment of the activity of biomarker enzymes and alteration of the locomotor pattern) and in adult fish (causing deregulation of gene expression). In addition, after chronic exposure (to 10 $\mu\text{g/L}$ of NTP and to 1000 $\mu\text{g/L}$ of VLX) caused a similar locomotor phenotype: relaxed swimming locomotor behavior indicating that both exposures are capable to altering primary survival behaviors of these animals. The results presented here are unprecedented in the literature and contribute to a better understanding of the toxic effect of psychiatric drugs discarded in the environment in non-target organisms.

Keywords: Zebrafish, psychiatric drugs, antidepressants, nortriptyline, venlafaxine, acute toxicity, chronic toxicity

LISTA DE TERMINOLOGIA: UNIDADES, ABREVIATURAS E ACRÓNIMOS

Abrafarma	Associação Brasileira de Redes de Farmácias e Drogarias
ACh	Acetilcolina
AChE	Acetilcolinesterase
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
ASCh	Acetiltiocolina (sintética)
ATCs	Antidepressivos tricíclicos
Cd	Cádmio
CDNB	1-cloro-2,4-dinitrobenzeno
CETESB	Companhia Ambiental do Estado de São Paulo
CEUA	Comitê de Ética no Uso Animal
CL ₅₀	Concentração letal média
COX	Ciclooxigenase
Cr	Cromo
Cu	Cobre
DE	Dano elevado
DM	Dano moderado
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DTNB	5,5-ditiobis-2-nitrobenzólico
DTP	Distância total percorrida
EPA	Agência de Proteção ambiental dos Estados Unidos
ERO	Espécies reativas de oxigênio
ETEs	Estações de tratamento de esgoto
FET	Teste de toxicidade em embriões/larvas

GABA	Ácido gama-aminobutírico
GST	Glutathione s-transferase
Hg	Mercúrio
HPLC	<i>High Performance Liquid Chromatograph</i>
IAH	Índice de Alterações Histológicas
IMAO	Monoamina oxidase
IRND	Inibidores da recaptação da noradrenalina-dopamina
ISRSNs	Inibidores da recaptação de serotonina-noradrenalina,
ISRS	Inibidores seletivos da recaptação da serotonina
ISSO	<i>International Organization for Standardization</i>
LDH	Lactato desidrogenase
µg	Microgramas
MAOI	<i>Monoamine oxidase inhibitor;</i>
MTN	Teste de mergulho em tanque novo
NADH	Nicotinamida adenina dinucleotídeo
NDRI	<i>Noradrenaline-dopamine reuptake inhibitors</i>
ng	Nanogramas
NTP	Nortriptilina
ODV	O-desmetilvenlafaxina
OMS	Organização Mundial da Saúde
Pb	Chumbo
PSCh	Propioniltiocolina
REM	<i>Rapid Eye Movement</i>
RMA	<i>Robust Multiarray Average</i>
RNA	Ácido ribonucleico
SBF	Soro fetal bovino
SNC	Sistema nervoso central

SNRI	<i>Serotonin-norepinephrine reuptake inhibitor</i>
SS	Síndrome da serotonina
SSRI	<i>Selective serotonin reuptake inhibitor</i>
TAC	<i>Transcriptome Analysis Console</i>
TCA	<i>Tricyclic antidepressant</i>
TTN	Tempo total de nado
UnB	Universidade de Brasília
VLX	Venlafaxina
Zn	Zinco

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estrutura química da nortriptilina. Fonte: Fišar, 2015.	33
Figura 2. Estrutura química da venlafaxina. Fonte: Sivalakshmi <i>et al.</i> , 2002.	35
Figura 3. <i>Danio rerio</i> : popularmente conhecido como peixe-zebra ou paulistinha. Fonte: Popular Science.	46
Figura 4. Representação esquemática do desenho experimental do estudo ecotoxicológico da nortriptilina.	51
Figura 5. Representação esquemática do desenho experimental do estudo ecotoxicológico da venlafaxina.	51
Figura 6. Fotografias de micronúcleo e diferentes tipos de anormalidades nucleares em eritrócitos de sangue periférico de <i>Danio rerio</i> . (1) Micronúcleo, (2) broto, (3) célula binucleada, (4) núcleo <i>blebbed</i> , (5) núcleo lobado e (6) núcleo <i>notched</i> . Fonte: Cáceres-Vélez <i>et al.</i> , (2013).	59
Figura 7. Curva padrão mostrando a relação entre a concentração de NTP e a intensidade do pico dos cromatogramas.	66
Figura 8. Panorama geral do efeito tóxico de sete diferentes concentrações de NTP (500; 1100; 2300; 4800; 10300; 22000; 46900 µg/L) no desenvolvimento embrio-larval de <i>Danio rerio</i> , após 168 horas de exposição.	68
Figura 9. CL ₅₀ da NTP em embriões/larvas de peixes-zebra, após exposição de 168 horas. A linha pontilhada vermelha indica 50% dos indivíduos afetados. Curvas feitas por análises de regressão em que os valores de R ² correspondem ao coeficiente de determinação da curva...69	69
Figura 10. Porcentagem de indivíduos com equilíbrio afetado pela NTP. Valores médios ± erro padrão. (*) p<0,05 e (***) p<0,001 em relação ao grupo controle. #: morte de todos os indivíduos.....	70
Figura 11. Frequência cardíaca das larvas expostas por 48 horas às concentrações de 500; 1100; 2300; 4800 e 10300 µg/L de NTP. Valores médios ± erro padrão. (*) p<0,05, em relação ao grupo controle.	71
Figura 12. Fotos das larvas após 72h de exposição: 1) organismo pertence ao grupo controle e com desenvolvimento normal; 2) organismo pertencente ao grupo exposto a 4,8 mg/L de NTP. É possível identificar: edema cardíaco(a), curvatura anormal da cauda(b), e degeneração da cauda(c).....	73
Figura 13. Efeitos da NTP sobre a atividade da AChE, em larvas, após 120, 144 e 168 h de exposição. Valores médios ± erro padrão. A: 120 h de exposição; B: 144 h de exposição; C: 168 h de exposição; (***) p<0,001, em relação ao grupo controle.....	74

Figura 14. Distância total percorrida (DTP) das larvas e tempo total de nado (TTN) das larvas, no período de escuro, após exposição com NTP: (A) DTP após 120 h; (B) DTP após 144 h; (C) DTP após 168 h; (D) TTN após 120 h; (E) TTN após 144 h; (F) TTN após 168 h. Valores médios \pm erro padrão. (*) $p < 0,05$, em relação ao grupo controle.	75
Figura 15. Porcentagem de distâncias curtas e longas percorridas pelas larvas, no período de escuro, após exposição com NTP: (A) Distância curta após 120 h; (B) Distância curta após 144 h; (C) Distância curta após 168 h; (D) Distância longa após 120 h; (E) Distância longa após 144 h; (F) Distância longa após 168 h. Valores médios \pm erro padrão. (*) $p < 0,05$, em relação ao grupo controle.	76
Figura 16. CL_{50} da NTP em peixes-zebra adultos, após 96 h de exposição. A linha pontilhada indica 50% dos indivíduos afetados.	77
Figura 17. Efeitos da exposição às concentrações 500, 600, 800 e 1100 $\mu\text{g/L}$ de NTP sobre a atividade da AChE, em peixes-zebra adultos, após 96 h de exposição. Valores médios \pm erro padrão. (*) $p < 0,05$, em relação ao grupo controle. (**) $p < 0,01$, em relação ao grupo controle.....	78
Figura 18. Efeitos da exposição às concentrações de 0,1 e 10 $\mu\text{g/L}$ de NTP sobre a atividade da AChE, em peixes-zebra adultos, após 28 dias de exposição. Valores médios \pm erro padrão.....	80
Figura 19. Morfologia do fígado de <i>Danio rerio</i> : (A) controle, (D) 0,1 e (G) 10 $\mu\text{g/L}$ de NTP; rim: (B) controle, (E) 0,1 e (H) 10 $\mu\text{g/L}$ de NTP; e brânquias: (C) controle, (F) 0,1 e (I) 10 $\mu\text{g/L}$ de NTP.....	84
Figura 20. Efeitos da exposição às concentrações de 0,1 e 10 $\mu\text{g/L}$ de NTP sobre a atividade exploratória vertical, em peixes-zebra adultos, após 28 dias de exposição. Valores médios \pm erro padrão. (*) $p < 0,05$	85
Figura 21. Diagrama de Venn mostrando os genes diferencialmente expressos entre as concentrações testadas de NTP (0,1 $\mu\text{g/L}$ (C1) e 10 $\mu\text{g/L}$ (C2)) e o grupo controle (CTR).	86
Figura 22. Curva padrão mostrando a relação entre a concentração de VLX e a intensidade do pico dos cromatogramas.	88
Figura 23. Panorama geral do efeito tóxico de oito diferentes concentrações de VLX (100000; 177900; 237300; 316400; 421800; 562500; 750000; 1000000 $\mu\text{g/L}$) no desenvolvimento embrio-larval de <i>Danio rerio</i> , após 168 h de exposição.	89
Figura 24. CL_{50} da VLX em embriões/larvas de peixes-zebra, após exposição de 144 e 168 h. A linha pontilhada vermelha indica 50% dos indivíduos afetados. Curvas feitas por análises de regressão em que os valores de R^2 correspondem ao coeficiente de determinação da curva.....	90
Figura 25. Porcentagem de indivíduos com equilíbrio afetado pela VLX. Valores médios \pm erro padrão. (*) $p < 0,05$ em relação ao grupo controle. #: morte dos organismos.....	92

Figura 26. Frequência cardíaca das larvas expostas por 48 horas às concentrações de 100000; 177900; 237400; 316400; 421800; 562500 µg/L de VLX. Valores médios ± erro padrão. (***) p<0,01 e (***) p<0,001, em relação ao grupo controle.....	93
Figura 27. Efeitos da exposição à VLX sobre a atividade da AChE, em larvas de peixes-zebra, após 168 h de exposição. Valores médios ± erro padrão. (*) p<0,05, em relação ao grupo controle.....	94
Figura 28. Efeitos da exposição à VLX sobre a atividade da GST, em larvas de peixes-zebra, após 168 h de exposição. Valores médios ± erro padrão. (***) p<0,001, em relação ao grupo controle.....	95
Figura 29. Efeitos da exposição à VLX sobre a atividade da LDH, em larvas de peixes-zebra, após 168 h de exposição. Valores médios ± erro padrão. (***) p<0,001, em relação ao grupo controle.....	96
Figura 30. Efeitos da exposição à VLX sobre a atividade da AChE, em peixes-zebra adultos, após 96 h de exposição às concentrações de 1000, 25000, 50000, 75000 e 100000 µg/L de VLX. Valores médios ± erro padrão.....	97
Figura 31. Efeitos da exposição à VLX sobre a atividade da GST, em peixes-zebra adultos, após 96 h de exposição às concentrações de 1000, 25000, 50000, 75000 e 100000 µg/L de VLX. Valores médios ± erro padrão. (*) p<0,05, em relação ao grupo controle.....	98
Figura 32. Efeitos da exposição à VLX sobre a atividade da LDH, em peixes-zebra adultos, após 96 h de exposição às concentrações de 1000, 25000, 50000, 75000 e 100000 µg/L de VLX. Valores médios ± erro padrão. (*) p<0,05, em relação ao grupo controle.....	99
Figura 33. Efeitos da exposição às concentrações 0,2 e 1000 µg/L de VLX sobre a atividade da AChE, em peixes-zebra adultos, após 28 dias de exposição. Valores médios ± erro padrão.....	101
Figura 34. Efeitos da exposição às concentrações 0,2 e 1000 µg/L de VLX sobre a atividade da GST, em peixes-zebra adultos, após 28 dias de exposição. Valores médios ± erro padrão. (*) p<0,05, em relação ao grupo controle.....	102
Figura 35. Efeitos da exposição às concentrações de 0,2 e 1000 µg/L de VLX sobre a atividade da LDH, em peixes-zebra adultos, após 28 dias de exposição. Valores médios ± erro padrão. (*) p<0,05, em relação ao grupo controle.....	103
Figura 36. (A) Morfologia do intestino de <i>Danio rerio</i> : (ae) altura do epitélio; (B) Medidas da altura do epitélio após 28 dias de exposição às concentrações de 0,2 e 1000 µg/L de VLX, em adultos. Valores médios ± erro padrão. (*) p<0,05, em relação ao grupo controle.....	105
Figura 37. (A) Morfologia do intestino de <i>Danio rerio</i> : (lv) largura da vilosidade; (B) Medidas da largura da vilosidade após 28 dias de exposição às concentrações de 0,2 e 1000 µg/L de VLX, em adultos. Valores médios ± erro padrão. (*) p<0,05, em relação ao grupo controle.....	105

Figura 38. (A) Morfologia do intestino de <i>Danio rerio</i> : (av) altura da vilosidade; (B) Medidas da altura da vilosidade após 28 dias de exposição às concentrações 0, 2 e 1000 µg/L de VLX, em adultos. Valores médios ± erro padrão. (*) p<0,05, em relação ao grupo controle.....	106
Figura 39. (A) Morfologia da brânquia de <i>Danio rerio</i> : medida da altura lamelar secundária (als); (B) Medidas da altura da lamela secundárias após 28 dias de exposição às concentrações 0,2 e 1000 µg/L de VLX, em adultos. Valores médios ± erro padrão. (*) p<0,05, em relação ao grupo controle.....	106
Figura 40. Parâmetros locomotores avaliados pelo teste MTN: (A) Distância percorrida; (B) Velocidade máxima; e (C) Ângulo absoluto de virada, após 28 dias de exposição às concentrações 0,2 e 1000 µg/L de VLX, em adultos. Valores médios ± erro padrão. (*) p<0,05, em relação ao grupo controle.	108
Figura 41. Parâmetros de comportamento tipo-ansioso, avaliados pelo teste MTN: (A) Entrada na área superior; (B) Tempo na área superior; (C) Distância na área superior e (D) Latência para a área superior, após 28 dias de exposição às concentrações 0,2 e 1000 µg/L de VLX, em adultos. Valores médios ± erro padrão. (*) p<0,05, em relação ao grupo controle.....	109
Figura 42. Diagrama de calor do posicionamento de todos os animais de cada grupo, seguido de imagens representativas da exploração vertical de 1 animal de cada grupo experimental..	109
Figura 43. Diagrama de Venn mostrando os genes diferencialmente expressos entre os grupos controle (CTR) e as concentrações testadas de VLX, C1: 0,2 µg/L e C2: 1000 µg/L.....	110
Figura 44. Resumo das principais alterações detectadas em <i>Danio rerio</i> após exposição aguda e crônica, nos diferentes estágios de vida, aos fármacos psiquiátricos NTP e VLX....	156

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.	Alterações histológicas avaliadas no fígado.....	60
Tabela 2.	Alterações histológicas avaliadas nas brânquias	60
Tabela 3.	Alterações histológicas avaliadas no rim	61
Tabela 4.	Valores de intensidade do contaminante com a respectiva classificação do órgão 62	
Tabela 5.	Concentrações de NTP e porcentagem de recuperação das soluções estoque ...	67
Tabela 6.	Estimativa dos valores de EC ₅₀ para a perda de equilíbrio das larvas após exposição por 168 horas à NTP (valores ± erro padrão). ^a : não mensurado	70
Tabela 7.	Alterações no desenvolvimento (%) em embriões expostos à NTP durante, 24, 48, 72, 120, 144 e 168 horas. Valores médios ± erro padrão.	73
Tabela 8.	Porcentagem de DNA na cauda de eritrócitos periféricos de peixes após exposição aguda à NTP. Valores médios ± erro padrão.....	79
Tabela 9.	Micronúcleos e anormalidades nucleares observados em eritrócitos de sangue periférico de peixes após exposição aguda à NTP. Valores médios ± erro padrão.....	79
Tabela 10.	Porcentagem de DNA na cauda de eritrócitos periféricos de peixes após exposição crônica à NTP. Valores médios ± erro padrão.....	81
Tabela 11.	Micronúcleos e anormalidades nucleares observados em eritrócitos de sangue periférico de peixes após exposição crônica à NTP. Valores médios ± erro padrão.....	81
Tabela 12.	Alterações histopatológicas hepáticas avaliadas em <i>Danio rerio</i> , após exposição à nortriptilina (0,1 e 10 µg/L), por 28 dias, e seus respectivos índices de alterações histológicas. (A) representa ausência e (P) representa presença de alteração.	82
Tabela 13.	Alterações histológicas renais avaliadas em <i>Danio rerio</i> , após exposição à nortriptilina (0,1 e 10 µg/L), por 28 dias, e seus respectivos índices de alterações histológicas. (A) representa ausência e (P) representa presença de alteração	82
Tabela 14.	Alterações histológicas branquiais avaliadas nas brânquias de <i>Danio rerio</i> , após exposição à nortriptilina (0,1 e 10 µg/L), por 28 dias, e seus respectivos índices de alterações histológicas. (A) representa ausência e (P) representa presença de alteração	83
Tabela 15.	Funções associadas aos genes diferencialmente expressos entre a menor concentração de NTP testada (0,1 µg/L) e o grupo controle.....	86
Tabela 16.	Funções associadas aos genes diferencialmente expressos entre a maior concentração de NTP testada (10 µg/L) e o grupo controle.....	87

Tabela 17. Concentrações de VLX e porcentagem de recuperação das soluções estoque...	88
Tabela 18. Eclosão dos embriões (%) durante o teste de toxicidade \pm erro padrão. (*) p<0,05.....	91
Tabela 19. Porcentagem de DNA na cauda de eritrócitos periféricos de peixes após exposição aguda à VLX. Dano moderado (DM) e dano elevado (DE). Valores médios \pm erro padrão.....	100
Tabela 20. Micronúcleos e anormalidades nucleares observadas em eritrócitos de sangue periférico de peixes após exposição aguda à VLX. Valores médios \pm erro padrão.	100
Tabela 21. Porcentagem de DNA na cauda de eritrócitos periféricos de peixes após exposição crônica à VLX. Valores médios \pm erro padrão. Dano moderado (DM) e dano elevado (DE).....	104
Tabela 22. Micronúcleos e anormalidades nucleares observadas em eritrócitos de sangue periférico de peixes após exposição crônica à VLX. Valores médios \pm erro padrão.	104
Tabela 23. Funções associadas aos genes diferencialmente expressos entre a menor concentração de VLX testada (0,2 μ g/L) e o grupo controle.	111
Tabela 24. Funções associadas aos genes diferencialmente expressos entre a maior concentração de VLX testada (1000 μ g/L) e o grupo controle.	112

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	25
1.1. Ecotoxicologia aquática.....	25
1.2. Presença de fármacos nos ecossistemas	28
1.3. Fármacos psicotrópicos no meio ambiente.....	30
1.4. Cloridrato de nortriptilina.....	33
1.5. Cloridrato de venlafaxina	34
1.6. Bioensaios ecotoxicológicos como ferramenta para avaliação da qualidade ambiental	36
1.7. Biomarcadores de toxicidade	37
1.7.1. Biomarcadores bioquímicos	38
1.7.2. Biomarcadores de genotoxicidade.....	39
1.7.3. Biomarcadores histológicos.....	40
1.8. Avaliação comportamental.....	43
1.9. Ecotoxicogenômica	44
1.10. Organismo modelo: peixe-zebra (<i>Danio rerio</i>).....	45
2. JUSTIFICATIVA.....	48
3. OBJETIVOS.....	49
3.1. Objetivo geral	49
3.2. Objetivos específicos.....	49
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	50
4.1. Organismo-teste: <i>Danio rerio</i>	50
4.2. Desenho experimental	50
4.2.1. Preparo das soluções estoque	52
4.2.2. Análise química	52
4.3. Teste de toxicidade em embriões/larvas (FET - <i>Fish embryo test</i>).....	53
4.4. Teste de toxicidade aguda em organismos adultos.....	54
4.5. Teste de toxicidade crônica em indivíduos adultos.....	54
4.6. Testes bioquímicos em larvas e animais adultos	55
4.7. Teste de comportamento locomotor em larvas.....	57
4.8. Testes de genotoxicidade e mutagenicidade em peixes adultos.....	57
4.8.1. Teste do cometa.....	58
4.8.2. Teste de micronúcleo e anormalidades nucleares.....	58

4.9.	Análises de órgãos, histopatologia e morfometria em organismos adultos.....	59
4.10.	Teste comportamental em peixes adultos	62
4.11.	Expressão gênica em larga escala (microarray) em peixes adultos.....	63
4.12.	Análises estatísticas	64
5.	RESULTADOS	66
5.1.	Estudo da Nortriptilina	66
5.1.1.	Estabilidade da NTP	66
5.1.2.	Avaliação do efeito tóxico da NTP em embriões/larvas de peixes-zebra	67
5.1.2.1.	Desenvolvimento embrio-larval.....	67
5.1.2.2.	Mortalidade	68
5.1.2.3.	Alterações no equilíbrio	69
5.1.2.4.	Alterações na frequência cardíaca.....	71
5.1.2.5.	Outras alterações no desenvolvimento embrio-larval	71
5.1.2.6.	Biomarcadores enzimáticos.....	74
5.1.2.6.1.	Atividade enzimática da AChE.....	74
5.1.2.7.	Teste de comportamento locomotor.....	74
5.1.3.	Avaliação do efeito tóxico agudo da NTP em peixes-zebra adultos	76
5.1.3.1.	Mortalidade	76
5.1.3.2.	Biomarcadores enzimáticos.....	77
5.1.3.2.1.	Atividade enzimática da AChE.....	77
5.1.3.3.	Biomarcadores de genotoxicidade	78
5.1.3.3.1.	Teste do cometa	78
5.1.3.3.2.	Teste do micronúcleo e anormalidades nucleares.....	79
5.1.4.	Avaliação do efeito tóxico crônico da NTP em peixes-zebra adultos.....	79
5.1.4.1.	Biomarcadores enzimáticos.....	79
5.1.4.1.1.	Atividade enzimática da AChE.....	79
5.1.4.2.	Biomarcadores de genotoxicidade	80
5.1.4.2.1.	Teste do cometa	80
5.1.4.2.2.	Teste do micronúcleo e anormalidades nucleares.....	81
5.1.4.3.	Análise histopatológicas do fígado, rins e brânquias	81
5.1.4.4.	Análise comportamental.....	84
5.1.4.5.	Perfis cerebrais da expressão gênica	85
5.2.	Estudo da venlafaxina.....	87

5.2.1.	Estabilidade da VLX	87
5.2.2.	Avaliação do efeito tóxico da VLX em embriões/larvas de peixes-zebra.....	89
5.2.2.1.	Desenvolvimento embrio-larval	89
5.2.2.2.	Mortalidade	90
5.2.2.3.	Taxa de eclosão	90
5.2.2.4.	Alterações no equilíbrio	91
5.2.2.5.	Alterações na frequência cardíaca.....	92
5.2.2.6.	Biomarcadores enzimáticos.....	93
5.2.2.6.1.	Atividade enzimática da AChE.....	93
5.2.2.6.2.	Atividade enzimática da GST	94
5.2.2.6.3.	Atividade enzimática da LDH	95
5.2.3.	Avaliação do efeito tóxico agudo da VLX em peixes-zebra adultos	96
5.2.3.1.	Mortalidade	96
5.2.3.2.	Biomarcadores bioquímicos.....	96
5.2.3.2.1.	Atividade enzimática da AChE.....	96
5.2.3.2.2.	Atividade enzimática da GST	97
5.2.3.2.3.	Atividade enzimática da LDH	98
5.2.3.3.	Biomarcadores de genotoxicidade	99
5.2.3.3.1.	Teste do cometa	99
5.2.3.3.2.	Teste do micronúcleo e anormalidades nucleares.....	100
5.2.4.	Avaliação do efeito tóxico crônico da VLX em peixes-zebra adultos	100
5.2.4.1.	Biomarcadores enzimáticos.....	100
5.2.4.1.1.	Atividade enzimática da AChE.....	100
5.2.4.1.2.	Atividade enzimática da GST	101
5.2.4.1.3.	Atividade enzimática da LDH	102
5.2.4.2.	Biomarcadores de genotoxicidade	103
5.2.4.2.1.	Teste do cometa	103
5.2.4.2.2.	Teste do micronúcleo e anormalidades nucleares.....	104
5.2.4.3.	Biomarcadores morfométrico de órgãos	104
5.2.4.3.1.	Morfometria do intestino	104
5.2.4.3.2.	Morfometria das brânquias	106
5.2.4.4.	Teste de mergulho em tanque novo (MTN).....	107
5.2.4.5.	Perfis cerebrais da expressão gênica	110

6.	DISCUSSÃO	113
6.1.	Estudo da nortriptilina	113
6.1.1.	Mortalidade, após a exposição à NTP, nos diferentes estágios de vida de <i>Danio rerio</i>	113
6.1.2.	Exposição à NTP e alteração no desenvolvimento embrionário do <i>Danio rerio</i>	115
6.1.3.	Exposição à NTP diminuiu a atividade da enzima acetilcolinesterase em diferentes estágios de vida de <i>Danio rerio</i>	117
6.1.4.	Exposição aguda e crônica à NTP e efeitos genotóxicos ao <i>Danio rerio</i> adulto	118
6.1.5.	Danos teciduais em <i>Danio rerio</i> após exposição crônica à NTP	120
6.1.6.	A exposição à NTP e alteração no comportamento natatório em diferentes estágios de vida, do <i>Danio rerio</i>	122
6.1.7.	Exposição crônica à NTP e a expressão diferencial de genes em amostras cerebrais de <i>Danio rerio</i>	125
6.2.	Estudo da venlafaxina.....	130
6.2.1.	Exposição à venlafaxina e seu efeito na sobrevivência do <i>Danio rerio</i>	130
6.2.2.	Vias celulares de neurotransmissão, metabolismo de energia, biotransformação e estresse oxidativo foram alteradas pela exposição à VLX	131
6.2.3.	Exposição aguda e crônica à VLX e efeitos genotóxicos em <i>Danio rerio</i>	138
6.2.4.	Modificações morfométricas em órgãos bioindicadores de toxicidades, após exposição crônica de <i>Danio rerio</i> à VLX.....	139
6.2.5.	Padrões locomotores e comportamentais em <i>Danio rerio</i> após exposição crônica à VLX	144
6.2.6.	Expressão gênica em cérebros de <i>Danio rerio</i> após exposição crônica à VLX.....	148
7.	CONCLUSÕES	155
7.1.	CONCLUSÕES GERAIS	155
7.2.	CONCLUSÕES ESPECÍFICAS	157
8.	REFERÊNCIAS	161
9.	ANEXO	208

1. INTRODUÇÃO

1.1. Ecotoxicologia aquática

Um conjunto diversificado de compostos orgânicos e sintéticos é utilizado pela sociedade, em grandes quantidades, para uma série de finalidades, incluindo a produção e a preservação de alimentos, processos de fabricação industrial, bem como na saúde humana e animal (Lapworth *et al.*, 2012). Ecossistemas aquáticos (como rios, lagos, mares e águas subterrâneas) atuam como o receptor final desses poluentes que são diariamente descartados implicando negativamente na qualidade da água para consumo humano, na conservação dos ecossistemas aquáticos e na qualidade de vida dos organismos ali presentes (Bundschuh *et al.*, 2017). Para a continuidade do desenvolvimento econômico, social e para a sustentabilidade do planeta como um todo, é imprescindível o monitoramento dos recursos hídricos. Nesse contexto, foi necessário o desenvolvimento de um campo científico que fosse capaz de verificar a qualidade das águas, hoje conhecido como ecotoxicologia aquática (Silva, Pompêo, & Paiva, 2015).

A palavra ecotoxicologia foi introduzida por René Truhalt em 1969 (Walker *et al.*, 2006). O termo derivou da junção de outras duas palavras: ecologia e toxicologia. A ecologia é a disciplina que se ocupa das relações entre os seres vivos e o ambiente, enquanto a toxicologia estuda os efeitos adversos de determinada substância em um dado organismo, ao mesmo tempo em que tenta determinar seu mecanismo de ação tóxica (Zagatto & Bertoletti, 2006). A ecotoxicologia busca entender e prever os efeitos dos contaminantes nos sistemas ecológicos e é uma ferramenta importante para auxiliar a avaliação de impactos ambientais causados por substâncias potencialmente nocivas (Walker *et al.*, 2006).

Como resultado do avanço dessa ciência, é sabido que contaminantes acessam os ecossistemas aquáticos via pulverização aérea, deriva, volatilização (seguida da precipitação com as chuvas), infiltração no solo, escoamento superficial ou derramamento acidental por práticas agrícolas e efluentes industriais e domésticos (Gauthier *et al.*, 2020). Substâncias com potencial tóxico desconhecido vêm sendo estudadas e seus malefícios descritos, como é o caso dos metais pesados (a exemplo do cromo (Cr), chumbo (Pb), cádmio (Cd), mercúrio (Hg), cobre (Cu) e zinco (Zn)) que foram mundialmente estudados e hoje seus mecanismos de acúmulo em sedimentos e biomagnificação nas cadeias tróficas, levando a um potencial de toxicidade dos seres vivos, sabidamente conhecido (Natasha *et al.*, 2020; Kim, Kim, & Kumar, 2019; Rehman *et al.*, 2017). Por essa razão, a ecotoxicologia se consagrou como uma ciência determinante

para fornecer as ferramentas adequadas para o tratamento/prevenção dos malefícios gerados pelos poluentes ambientais (Felis *et al.*, 2020; Parezanović *et al.*, 2019).

Na ecotoxicologia aquática, os estudos utilizam diferentes organismos modelos para avaliar relações quantitativas de concentração-resposta, destacadas em um conjunto de parâmetros biológicos, como mortalidade, reprodução, crescimento e desenvolvimento (Xu *et al.*, 2020). Esses organismos modelos variam de acordo com a natureza do poluente a ser analisado: bactérias (exemplo: *Allivibrio fischeri*) (Parajó *et al.*, 2019), protozoários (principal exemplo: *Paramecium caudatum*) (Mansano *et al.*, 2016), plantas (exemplos: *Lemna minor*, *Lemna gibba*, *E. globulus*, *Pinus halepensis*, *Mill. Pinus nigra*, *Arnold. P. pinaster*, *Pinus sylvestris* e *Pinus radiata*) (Salgado *et al.*, 2017; Nunes *et al.*, 2014), algas (exemplo: *Raphidocelis subcapitata*, *Chlorella sp.*, *Stichococcus sp.*, *Monoraphidium dybowskii*, *Desmodesmus subspicatus*) (Gebara *et al.*, 2020; Parajó *et al.*, 2019), crustáceos (principal exemplo: *Daphnia magna*) (Bownik, 2020), moluscos (principais exemplos: *Mytilus edulis*, *Gibbula umbilicalis*, *Corbicula fluminea*, *Venerupis decussata* e *Venerupis philippinarum*) (Bolognesi, Cirillo & Chipman, 2019; Giménez & Nunes, 2019; Correia *et al.*, 2016; Brandão *et al.*, 2011), peixes (principal organismo: *Danio rerio*) (Naderi *et al.*, 2020) e anfíbios (exemplo: *Xenopus*, *Rana nigromaculata* e *Rana pipiens*) (Li *et al.*, 2020; Li *et al.*, 2009; van Schmidt *et al.*, 2012) são os principais organismos utilizados. Para os estudos de ecotoxicologia aquática os organismos-teste são submetidos a diferentes exposições: i) crônica: exposição à baixas concentrações da substância durante um longo período de vida do organismo; ii) aguda: exposição à concentrações altas durante um pequeno intervalo de vida do organismo (Jardim & Caldas, 2009).

No Brasil, a primeira iniciativa na área de ecotoxicologia, em termos metodológicos, ocorreu em 1976, em um programa internacional de padronização de testes de toxicidade desenvolvido pelo Comitê Técnico de Qualidade das Águas TC147 da *International Organization for Standardization* (ISO). Na ocasião, e com a participação da Companhia ambiental do Estado de São Paulo (Cetesb), foram desenvolvidos e adaptados alguns protocolos para verificar toxicidade aguda e crônica, utilizando diferentes espécies de organismos aquáticos, incluindo algas, microcrustáceos e peixes de águas continentais e marinhas (Bertoletti, 2012). Desde então, em quase 45 anos, vários estudos ecotoxicológicos foram realizados, no entanto, ainda insuficientes, frente à quantidade de substâncias e ecossistemas aquáticos encontrados no Brasil (Sousa-Moura, 2016), que possui 12% das reservas de água doce disponíveis no mundo (Agência Nacional das Águas, 2018). Os limitados recursos de água doce são importantes

fatores econômicos e sociais, o que torna a deterioração da qualidade desse recurso uma discussão cada dia mais necessária (Xu *et al.*, 2020).

Com as mudanças sociais e econômicas ocorridas na última década, novas substâncias que, anteriormente, não eram liberadas no meio ambiente, começaram a aparecer em concentrações quantificáveis em diferentes ecossistemas. Essas substâncias são nomeadas como contaminantes emergentes (Zenker *et al.*, 2014). Segundo a EPA (*United States Environmental Protection Agency*), contaminantes emergentes são “poluentes que, atualmente, não são incluídos em programas de monitoramento e que podem se tornar candidatos para legislações futuras dependendo de pesquisas sobre a toxicidade, efeitos sobre a saúde, percepção pelo público e dados sobre sua ocorrência em vários ambientes”. Contaminantes emergentes também são considerados como poluentes vestigiais, pois são encontrados no meio ambiente em baixas concentrações, geralmente microgramas (μg) ou nanogramas (ng) por litro, mas ainda assim têm um grande potencial para desencadear danos humanos e ambientais diversos (Gomes *et al.*, 2017).

Os poluentes emergentes não estão incluídos nas legislações ambientais e não são monitorados, principalmente devido a dois fatores: (i) constituem uma classe de substâncias que são comercializados com pouca ou nenhuma informação sobre seu potencial efeito tóxico a espécies não-alvo; e (ii) faltam evidências de sua persistência nos ecossistemas (Schwab *et al.*, 2005). Além disso, são necessários métodos analíticos mais específicos, do que aqueles usados rotineiramente, para detectar alguns desses poluentes emergentes nas colunas de água dos ambientes aquáticos e estações de tratamento (Gomes *et al.*, 2017; Bottoni *et al.*, 2013). No Brasil, a legislação pertinente (Resolução CONAMA 357) estabelece padrões (ou limites) somente para 86 substâncias, porém, estima-se que cotidianamente são despejados na água em torno de 70.000 agentes químicos (Bertoletti, 2012).

Os contaminantes emergentes constituem um grupo heterogêneo de compostos, assim como seus metabólitos e produtos de transformação, incluindo: produtos farmacêuticos e de cuidados pessoais, corantes sintéticos, pesticidas, produtos veterinários, subprodutos industriais, aditivos alimentares e também nanomateriais (Lapworth *et al.*, 2012). Entre os contaminantes emergentes, os produtos farmacêuticos compõem um dos grupos de estudo mais relevantes para ecossistemas aquáticos devido ao seu uso universal, às suas propriedades físico-químicas, metabólitos que são capazes de gerar e à sua capacidade de persistirem (moléculas inalteradas e metabólitos) na água, mesmo após o tratamento de águas residuais (Brausch *et al.*, 2012). Essas características fazem dos fármacos um importante grupo de estudo, uma vez que podem acarretar impactos ambientais ainda desconhecidos.

1.2. Presença de fármacos nos ecossistemas

Na última década, resíduos de produtos farmacêuticos, em concentrações de nanogramas ou microgramas por litro, foram detectados em águas superficiais, residuais, subterrâneas e na água potável (*World Health Organization, 2012*). Atualmente, a discussão relativa à presença desses compostos no meio ambiente, como um problema ambiental e de saúde pública vem crescendo. No mundo todo, diversos fármacos como antibióticos, hormônios sexuais, antidiabéticos, medicamentos psicotrópicos e anticonvulsivantes já foram identificados em diferentes matrizes aquáticas (*Blair et al., 2017*) e estudos indicam que esses poluentes podem causar diferentes efeitos nos organismos não-alvos expostos e nos seres humanos (*He et al., 2021*).

Os produtos farmacêuticos entram no meio ambiente através de muitas rotas, que incluem os excrementos humanos ou animais, efluentes de águas residuais, resíduos de esgoto tratado, resíduos industriais e instalações médicas e veterinárias (*Mousel et al., 2021; Fatta et al., 2007*). Há um crescente interesse por parte da comunidade científica em elucidar os efeitos dos produtos farmacêuticos no meio ambiente, uma vez que eles são especificamente projetados com dois propósitos: (i) afetar vias de regulação em humanos; e (ii) serem persistentes, de modo que sua estrutura química seja estável tempo suficiente para realizar o trabalho terapêutico (meia vida longa). Esses dois fatores, somados ao descarte contínuo dos fármacos, permitem que permaneçam no ambiente por um período significativo (e até indeterminado) de tempo. Dessa forma, consideram-se os fármacos como substâncias persistentes nos ecossistemas (*Jones, Voulvoulis & Lester, 2002*).

Uma avaliação de risco ambiental dos 25 medicamentos mais utilizados na Inglaterra foi apresentada por *Jones, Voulvoulis & Lester (2002)*. Na ocasião, os autores predisseram que muitos desses fármacos se encontravam em quantidades superiores a 1 µg/L no ambiente aquático e, o mais preocupante, que muitos deles seriam tóxicos nessas concentrações detectadas no ambiente aos organismos que vivem naqueles ecossistemas. Além disso, os 25 fármacos eram persistentes nas águas dos efluentes analisados, fato que os levaram a supor que é improvável que a maioria dos fármacos utilizados no dia a dia seja degradada em uma estação de tratamento e que, portanto, essas substâncias são diariamente liberadas nos rios e em outros ecossistemas aquáticos (*Jones, Voulvoulis & Lester, 2002*).

Um grupo de estudo, nos Estados Unidos, detectou níveis de produtos farmacêuticos em água potável, sendo que a maior concentração relatada foi de 40 ng/L para omepramato (sedativo) (*Benotti et al., 2009*). Na Europa, diversos estudos também encontraram produtos farmacêuticos na água da torneira de diferentes países, em concentrações variando de ng a µg/L,

incluindo Alemanha, Holanda e Itália (Huerta-Fontela *et al.*, 2011). Esses estudos indicam que, provavelmente, as populações estão duplamente expostas a produtos farmacêuticos que poluem o meio aquático: por meio da água potável e do consumo de organismos aquáticos (Bottoni *et al.*, 2013). Alguns produtos farmacêuticos, como antibióticos e hormônios sintéticos, já vêm sendo estudados a algum tempo devido a seus efeitos evidentes no ambiente (Riva, Zuccato & Castiglioni, 2015).

Dados da Associação Brasileira de Redes de Farmácias e Drogarias (Abrafarma) apontam o Brasil como o sétimo maior mercado mundial, mas, contraditoriamente, são escassos os estudos sobre a quantificação de medicamentos em ecossistemas aquáticos brasileiros (Godoy, 2014). Sodré *et al.*, (2007) relataram a presença de anti-inflamatórios: 0,84 µg/L de acetaminofeno e ácido acetilsalicílico 4,15 µg/L na bacia do rio Atibaia, São Paulo; e Américo *et al.*, (2012) detectaram anti-inflamatórios e analgésicos como diclofenaco 0,24 µg/L, ibuprofeno 0,40 µg/L, naproxeno 0,12 µg/L, paracetamol 0,21 µg/L e piroxicam 0,4 µg/L no município de Três Lagoas, Mato Grosso do Sul. Souza (2011), ao analisar amostras de esgoto bruto, tratado e águas superficiais das estações de tratamento de esgoto (ETEs) do Estado do Ceará, encontrou o agente hipolipemiante bezafibrato 0,003 ng/L, o ansiolítico diazepam 0,048 ng/L, e hormônios sintéticos 17β-estradiol 7400 ng/L e 17α-etinilestradiol 3955 ng/L, hormônios esses também detectados por Pivetta & Gastaldini (2019) em concentrações de 0,3 e 0,15 µg/L, respectivamente, em efluentes aquáticos na cidade de Santa Maria (Rio Grande do Sul) e no Lago Paranoá em Brasília, em concentrações de 5,6 ng/L (Sodré & Sampaio, 2020). Também no Lago Paranoá já foi identificado a presença de atenolol (34 ng/L), fármaco utilizado no tratamento para hipertensão, e o antibiótico sulfametoxazol (4 ng/L) (Sodré & Sampaio, 2020).

Se, de um lado, alguns fármacos, possuem uma grande quantidade de estudos ecotoxicológicos; do outro lado, temos fármacos cujos efeitos nas comunidades ainda são desconhecidos ou muito limitados, como é o caso dos fármacos psiquiátricos. A exposição a esses medicamentos gera preocupação devido ao seu potencial para perturbar os sistemas neuroendócrinos dos organismos expostos (Park *et al.*, 2012). Muitos cientistas temem que esses produtos químicos possam ser prejudiciais mesmo em concentrações mínimas (ng/L a µg/L). Devido ao uso inadequado e à falta de regulamentação do descarte, o risco de exposição aos fármacos psiquiátricos é, provavelmente, maior nos países em desenvolvimento, como o Brasil, em comparação com países desenvolvidos (Blair *et al.*, 2017; Rahman *et al.*, 2009).

Neste contexto, estudos ecotoxicológicos que esclareçam os efeitos desses fármacos psiquiátricos, no ambiente aquático, e seu impacto sobre o ecossistema e aos seres humanos são indispensáveis para a saúde pública e ambiental (Blair *et al.*, 2017; Rahman *et al.*, 2009).

1.3. Fármacos psicotrópicos no meio ambiente

De acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS), medicamentos psicotrópicos (ou psicoativos) são substâncias que agem no sistema nervoso central, produzindo alterações de comportamento, humor e cognição. São compostos químicos utilizados no tratamento de alguns tipos de transtorno mental, particularmente esquizofrenia, transtorno bipolar, ansiedade grave e depressão (Prado, Francisco & Barros, 2017). Esses medicamentos atuam, geralmente, sobre a liberação e a recaptação de moléculas responsáveis pela transmissão do impulso nervoso: os neurotransmissores, que por sua vez, são liberadas na fenda sináptica e agem em receptores sinápticos localizados na membrana do neurônio pós-sináptico, promovendo assim a sinapse nervosa (Brunger *et al.*, 2018).

Os medicamentos psiquiátricos mais comumente usados são os inibidores da recaptação dos neurotransmissores serotonina-noradrenalina (SNRIs, do inglês *serotonin-norepinephrine reuptake inhibitor*) e os inibidores seletivos da recaptação da serotonina (SSRI, do inglês *selective serotonin reuptake inhibitor*), embora existam outras classes de substâncias que possam ser utilizadas no tratamento da depressão, como inibidores da monoamina oxidase (MAOI, do inglês *monoamine oxidase inhibitor*); antidepressivos tricíclicos (TCAs, do inglês *tricyclic antidepressant*); inibidores da recaptação da noradrenalina-dopamina (NDRI, do inglês *noradrenaline-dopamine reuptake inhibitors*), entre outros (Goodman & Gilman, 2012).

Em 2015, um total de 547 milhões de prescrições para medicamentos psiquiátricos foram liberadas nos Estados Unidos, totalizando US \$ 21,2 bilhões. Os antidepressivos estão entre as classes de medicamentos mais prescritos, atrás apenas dos anti-hiperlipidêmicos e analgésicos, e sua demanda cresce a cada ano. O fármaco mais prescrito, em 2015, foi a sertralina, um membro da ampla classe dos SSRI, utilizada para tratar depressão, síndrome do pânico, estresse pós-traumático e transtornos de ansiedade. Outros medicamentos largamente prescritos desta mesma classe incluem fluoxetina, citalopram, escitalopram, fluvoxamina e paroxetina (Smith, 2017).

De fato, o uso cada vez maior de fármacos psicotrópicos resultará no aumento da liberação dessas substâncias nos ecossistemas e, portanto, na sua presença como contaminantes (Choi *et al.*, 2018). Devido a sua introdução contínua e constante no meio ambiente, os organismos aquáticos e o solo estão cronicamente expostos a esses produtos químicos (Comber *et al.*, 2018). Várias investigações realizadas no solo e nos corpos d'água superficiais e subterrâneos de diferentes países, nos últimos anos, bem como alguns dados emergentes de estudos ecotoxicológicos em espécies não-alvo, identificaram fármacos psiquiátricos como

contaminantes ambientais capazes de alterar o equilíbrio dos ecossistemas (Bottoni *et al.*, 2013; Park *et al.*, 2012; Stanley *et al.*, 2007; Wu *et al.*, 2012).

Diferente de outros contaminantes, os fármacos psicotrópicos são capazes de originar uma resposta terapêutica específica em humanos e em outros vertebrados, mesmo em concentrações muito baixas (Brausch *et al.*, 2012; Kar & Roy, 2012); além disso, muitos dos seus alvos moleculares, como receptores ou enzimas, apresentam ortólogos em várias espécies (Gunnarsson *et al.*, 2008). Somados, estes dois fatores podem explicar o porquê desses fármacos serem motivo de uma quantidade cada vez maior de pesquisas ecotoxicológicas (Rand-Weaver *et al.*, 2013; Kar & Roy, 2012). No entanto, de forma geral, os estudos ecotoxicológicos ainda são insuficientes para a maioria dessas substâncias. Faltam trabalhos que avaliem o potencial efeito nocivo dos fármacos psicotrópicos em exposições longas e baixas concentrações, assim como ocorre no meio ambiente (Brausch *et al.*, 2012; Santos *et al.*, 2010;).

Alguns fármacos psicotrópicos utilizados em maior quantidade pela população são encontrados, com maior frequência, nos diferentes ecossistemas aquáticos, como a carbamazepina e a sertralina. Grabicova *et al.*, (2014) identificaram, no Rio Blanice da República Checa, oito fármacos psiquiátricos em concentrações que iam de 5 ng/L do medicamento sertralina e 110 ng/L do medicamento carbamazepina. Este último composto também foi encontrado por Metcalfe *et al.*, (2003) em todas as amostras de águas superficiais obtidas de vários locais ao longo dos Grandes Lagos da América do Norte, chegando a concentrações de 0,65 mg/L a 400 metros de um local de descarga de águas residuais. Wu *et al.*, (2012) também mostraram que a carbamazepina era persistente no solo e bioacumulável em rúcula e tomate, sugerindo assim que a exposição humana a esse fármaco não só ocorre pelo contato com a água, mas também pelo consumo de plantas cultivadas em campos contaminados.

No Brasil, a presença da carbamazepina (utilizada no tratamento de epilepsia, distúrbio de humor e depressão) foi detectada em efluentes aquáticos brasileiros por Almeida *et al.* (2015), os resíduos do fármaco eram provenientes do Hospital universitário de Santa Maria, Rio Grande do Sul e se encontravam na concentração de 550 ng/L; e no Lago Paranoá, em Brasília, Distrito Federal, na concentração de 25 ng/L (Sodré & Cavalcanti, 2018).

Valenti *et al.*, (2009) identificaram a sertralina como agudamente letal a peixes (*Pimephales promelas*) expostos a concentrações de 500 µg/L. Esse mesmo antidepressivo se mostrou persistente nos ecossistemas aquáticos e bioacumulável em organismos bentônicos, como insetos e anelídeos, e em hortaliças cultivadas em solo contaminado (Carter *et al.*, 2014; Azrina *et al.*, 2006). Análises ecotoxicológicas em uma ampla gama de organismos, incluindo peixes,

vêm demonstrando que os SSRI, por inibirem a recaptação de serotonina, influenciam tanto a fisiologia quanto o comportamento desses animais, desempenhando um papel fundamental na redução dos seguintes aspectos: (i) territorialismo, em peixes de recife de coral; (ii) velocidade de locomoção, em *Aphanius dispar* (peixe ameaçado de extinção na Ásia); e (iii) agressão, em peixes Beta (*Betta splendens*) (Barry, 2013; Kohlert *et al.*, 2012; Perreault *et al.*, 2003; Meston & Frohlich, 2000), comportamentos esses que interferem diretamente a sobrevivência dos animais.

Um grupo de fármacos psicotrópicos que tem recebido atenção crescente são os benzodiazepínicos que agem através do receptor do ácido gama-aminobutírico (GABA), um canal iônico altamente conservado, encontrado em várias espécies de vertebrados (Gunnarsson *et al.*, 2008). Um dos benzodiazepínicos mais usados, o diazepam, mostrou diferentes efeitos tóxicos em peixes: no *Danio rerio* alterou o neurocomportamento e a expressão de genes envolvidos no ritmo circadiano; enquanto no *Lepomis gibbosus* induziu o aumento da resposta antioxidante e do tempo de natação fora das áreas de refúgio, o que pode levar a uma maior suscetibilidade à predação (Brandão *et al.*, 2013; Oggier *et al.*, 2010). A presença desse mesmo fármaco, em efluentes brasileiros, foi identificada por Almeida *et al.*, (2015) em efluentes provenientes do Hospital universitário de Santa Maria, Rio Grande do Sul, na concentração de 586,6 ng/L. Outro psicotrópico da classe dos benzodiazepínicos, o oxazepam, em concentrações similares às encontradas em águas superficiais de efluentes, também foi capaz de alterar o comportamento da *Perca fluviatilis*, aumentando a atividade de natação/alimentação e reduzindo a sociabilidade (Brodin *et al.*, 2013).

Ainda que existam estudos recentes sobre possíveis efeitos dos fármacos psiquiátricos no meio ambiente, dados da Agência Americana de Proteção Ambiental (EPA, <http://cfpub.epa.gov/ecotox/>) mostram que apenas 22% desses medicamentos têm estudos ecotoxicológicos, sendo que 54% dessas substâncias apresentam apenas informações sobre toxicidade aguda. Ademais, dos 226 fármacos psiquiátricos liberados para consumo no Brasil, pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA - RDC nº 06/2014), apenas 11% têm estudos ecotoxicológicos (Souza-Moura, 2016). Esta falta de informação ecotoxicológica evidencia a necessidade de se realizar mais estudos para elucidar o potencial nocivo dos fármacos psiquiátricos em organismos não-alvo. Como é o caso dos antidepressivos nortriptilina (NTP) e venlafaxina (VLX) que já foram detectados em diferentes ecossistemas aquáticos, dissolvidos na água ou acumulado em sedimentos (Fernandes *et al.*, 2020; Pivetta *et al.*, 2020; Ma *et al.*, 2018;) e em seres vivos (Martínez-Morcillo *et al.*, 2020), mas que

atualmente, contam com poucos estudos ecotoxicológicos que descrevem seus possíveis efeitos tóxicos em organismos-modelos após exposição crônica e aguda.

1.4. Cloridrato de nortriptilina

A nortriptilina (NTP) atua de duas maneiras no sistema nervoso central (SNC): (i) inibindo a recaptação de norepinefrina e serotonina pela membrana neuronal pré-sináptica; e (ii) bloqueando os receptores adrenérgicos na membrana neuronal pós-sináptica, aumentando assim a sinalização sináptica através desses neurotransmissores (Goodman & Gilman, 2012). Devido a esse mecanismo de ação, a nortriptilina atua como um inibidor não seletivo da recaptação de serotonina-noradrenalina e é classificada como antidepressivo tricíclico (ATCs) por apresentar três anéis de carbono em sua composição (Figura 1). Embora os ATCs sejam eficientes no tratamento para depressão, esses medicamentos geram efeitos colaterais graves em seres humanos, como aumento do risco de desenvolver doenças cardíacas (Jeon *et al.*, 2011).

Este antidepressivo é obtido pela desmetilação de outro fármaco: a amitriptilina, e trata-se do seu principal metabólito ativo (Rudorfer e Potter, 1997). Atualmente, a NTP, aprovada pela FDA (do inglês *Food and Drug Administration*), é também comercializada como um fármaco individual (recebe o nome comercial de Pamelor®) e, assim como a amitriptilina, é indicada para o tratamento da depressão melancólica (Rudorfer & Potter, 1997). A NTP também é utilizada no tratamento de dores neuropáticas crônicas (sensação dolorosa que ocorre em uma ou mais partes do corpo), geralmente em doses abaixo daquelas nas quais exerce seus efeitos antidepressivos (Derry *et al.*, 2015).

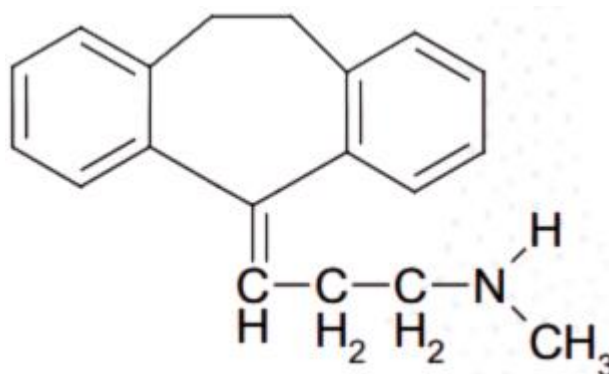


Figura 1. Estrutura química da nortriptilina. Fonte: Fišar, 2015.

A NTP é metabolizada no fígado e pode originar três diferentes metabólitos: 10-hidroxinortriptilina (tem metade da potência da NTP, mas possui menos efeitos anticolinérgicos e cardioprotóxicos); e 10-hidroxinortriptilina e Z-10-hidroxinortriptilina (que têm igual potência que a NTP). O tempo de meia-vida de eliminação desse fármaco varia de 15 a 39 horas, mas pode ser superior a 90 horas em idosos (Pamelor®, Bula Profissional).

Esse medicamento já foi detectado em águas residuais domésticas, efluentes, estações de tratamento de esgoto e em rios do Reino Unido em concentrações na faixa dos 0,04 até 0,12 ng/L (Ma *et al.*, 2018; Borova *et al.*, 2014; Kasprzyk-Hordern *et al.*, 2008). Pivetta *et al.*, (2020), em estudos realizados no Brasil, em estações de tratamento de águas residuais em Campinas (estado de São Paulo), detectaram a nortriptilina nas águas, após passar por tratamento na estação, na concentração de 786 ng/L. Apenas no Brasil, foram comercializados 4.000 kg de nortriptilina, em 2018, e estima-se que sua concentração na água seja de 8 ng/L. A nortriptilina, assim como outros antidepressivos, uma vez no meio ambiente pode se acumular e se propagar gradualmente nas cadeias alimentares, além do que, uma vez no meio ambiente, esse fármaco pode formar outros compostos por meio de fotólise, hidrólise e biodegradação (Ma *et al.*, 2018).

Estudos do potencial tóxico da NTP em organismos aquáticos são extremamente limitados na literatura científica. Sehonova *et al.*, (2017) avaliaram os efeitos tóxicos de três antidepressivos tricíclicos (amitriptilina, nortriptilina e clomipramina) nos estágios iniciais de vida da carpa comum (*Cyprinus carpio*) e detectaram que exposições dos embriões/larvas por 30 dias às concentrações de 10, 100 e 500 µg/L das drogas ocasionaram aumento significativo da mortalidade, atraso no desenvolvimento, anomalias morfológicas e alterações patológicas no cérebro e coração; além de alterar a atividade de enzimas antioxidantes e aumentar a peroxidação lipídica. Estes resultados sugerem um efeito potencial nocivo da NTP em baixas concentrações (Sehonova *et al.*, 2017).

1.5. Cloridrato de venlafaxina

Comercializada desde 1993, a venlafaxina (VLX) é um fármaco psiquiátrico inibidor seletivo da recaptação de serotonina-noradrenalina (ISRNs) que atua inibindo recaptação neuronal de serotonina/noradrenalina, ou seja, este medicamento aumenta a quantidade desses neurotransmissores no sistema nervoso (Silva & Fernández-Guasti, 2019). A VLX sofre metabolização hepática com importante efeito de primeira passagem, formando o metabólito ativo O-desmetilvenlafaxina (ODV), e sua eliminação ocorre em até 48 horas como VLX inalterada (5%), ODV (68%) e ou outros metabólitos secundários inativos (27%) (Farmacêutica, Bula profissional).

Popularmente comercializada como “Effexor®”, a VLX é uma das principais substâncias antidepressivas utilizada no tratamento da depressão, incluindo depressão com ansiedade associada (Fong *et al.*, 2015). Somente no Brasil, em 2018, foram comercializados 24.000 quilos de VLX (Pivetta *et al.*, 2020).

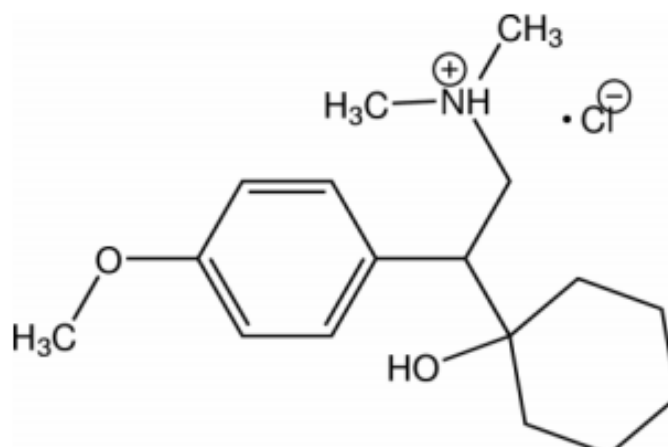


Figura 2. Estrutura química da venlafaxina. Fonte: Sivalakshmidevi *et al.*, 2002.

Schlüsener *et al.*, (2015) detectaram VLX a 180 ng/L em águas superficiais do rio Reno, constatação essa que os autores afirmam ser preocupante, uma vez que o rio Reno atravessa a Europa de Sul a Norte. Fernandes *et al.*, (2020) detectaram a presença de VLX, no Rio Douro e Leça (Portugal), dissolvido na água e acumulado nos sedimentos em concentrações de 641 ng/L e 0,251 ng/g, respectivamente, sinalizando esse fármaco como um poluente de alto risco à biodiversidade desses ecossistemas. Martínez-Morcillo *et al.*, (2020), ao coletar o molusco bivalve (*Cerastoderma edule*) em regiões do Oceano Atlântico, na costa da Galícia, identificaram que esse fármaco estava bioacumulado no tecido desses animais em concentrações de até 6 ng/g.

Testes agudos da exposição à VLX relatam os malefícios da exposição a esse fármaco em organismos não-alvos. Sehonova *et al.*, (2019) demonstraram que a exposição a 0,3 µg/L de VLX em embriões de *Danio rerio* e *Xenopus tropicalis* foi capaz de alterar a expressão de genes cruciais para o desenvolvimento de ambos: *pax 6* (olhos), *bmp 4* (ossos), *otx2* (olhos, nervo óptico, formação do cérebro e glândula pituitária) e *nkx2-5* (sistema cardiovascular). Alterações no comportamento de: *Argyrosomus regius* foram identificadas por Maulvault *et al.*, (2018), após exposição à concentração de 20 µg/L de VLX: diminuição na atividade social do peixe bem como a coesão do cardume; e em larvas de *Danio rerio*, que após 168 horas de exposição à 100 µg/L de VLX, tiveram a atividade de natação reduzida em até 40% (Huang, Sirotkin & McElroy, 2019). Em teste crônico, peixes-zebra adultos mostraram produção de embriões significativamente diminuída após uma exposição de 6 semanas a uma mistura farmacêutica de acetaminofeno, carbamazepina, gemfibrozil e venlafaxina (5 e 10 µg/L de cada fármaco), além de terem a histologia ovariana e a morfologia do túbulo proximal do rim alteradas após a referida exposição (Galus *et al.*, 2013a).

Esses dados sugerem que as populações de peixes expostas a produtos farmacêuticos descartados em águas residuais correm o risco de impactos negativos à saúde deles. Diante disso, fica evidente a necessidade de se conhecer os efeitos prolongados da exposição a VLX nos organismos expostos a tal contaminante.

1.6. Bioensaios ecotoxicológicos como ferramenta para avaliação da qualidade ambiental

Os bioensaios ecotoxicológicos são ferramentas cruciais no estudo dos contaminantes emergentes, uma vez que auxiliam a desvendar os possíveis efeitos da exposição dos organismos-teste ao composto que se quer analisar (Fracácio, 2001); por essa razão, são instrumentos importantes na busca de generalizações sobre o grau de toxicidade e determinação da influência direta dos compostos provenientes das atividades antrópicas. A partir da utilização de ensaios ecotoxicológicos complementares, é possível detectar a capacidade de um composto de produzir efeitos deletérios, permitindo avaliar em que medida essa substância é nociva, como, onde e quando os efeitos são detectáveis no organismo teste (Magalhães & Ferrão-Filho, 2008). Os testes de toxicidade podem ser agudos ou crônicos, cada um objetivando avaliar situações e parâmetros diferentes, mas obtendo respostas complementares.

O ensaio de toxicidade aguda pode ser definido como aquele que avalia os efeitos sofridos pelos organismos expostos ao agente químico, geralmente em altas concentrações, em um curto período. Devido à facilidade de execução, curta duração e baixo custo, os ensaios de toxicidade aguda foram os primeiros a ser empregados e desenvolvidos e, portanto, constituem a maior parte dos dados ecotoxicológicos (Klüver *et al.*, 2015). Nos ensaios de toxicidade aguda, usualmente, os critérios de avaliação são a mortalidade e a imobilidade dos organismos-teste, critérios esses facilmente detectáveis com alto significado biológico e ecológico. O principal objetivo dos testes agudos é verificar os efeitos da exposição produzido por uma substância química e determinar a concentração letal média (CL_{50}), isso é, a concentração da substância que causa efeitos na metade dos indivíduos de uma população exposta a um determinado composto (Fracácio, 2001).

No ambiente aquático os organismos estão expostos a níveis subletais dos poluentes devido à diluição destes na água. Este tipo de exposição não leva à morte dos organismos, mas pode causar distúrbios fisiológicos, histológicos, bioquímicos, genéticos e comportamentais a longo prazo. Geralmente, esses efeitos não são detectados em testes de toxicidade aguda, o que torna necessário o uso do teste de toxicidade crônica, pois este permite avaliar os efeitos adversos mais sutis nos organismos expostos (Zagatto & Bertoletti, 2006; Fracácio, 2001), como

alterações comportamentais, moleculares (enzimas, proteínas e material genético, por exemplo), histológicas, morfométricas, entre outras (Costa *et al.*, 2008).

Independentemente do tipo do teste, agudo ou crônico, os resultados podem (e devem) ser utilizados como subsídios para a tomada de decisões em relação às políticas públicas de meio ambiente, posto que possibilitam maior controle do lançamento de poluentes nos corpos hídricos e uma fiscalização eficaz do descarte dessas substâncias pelas agências ambientais (Silva *et al.*, 2015).

1.7. Biomarcadores de toxicidade

Os biomarcadores são medidas quantitativas e qualitativas que indicam mudanças em um sistema biológico após a exposição a uma determinada substância (exemplo: poluentes) ou agente físico (exemplo: radiação). Esses biomarcadores podem ser alterações celulares, bioquímicas, moleculares, histológicas ou fisiológicas que podem ser provenientes de fluidos corporais, tecidos ou órgãos. Os biomarcadores são muito utilizados na área da ecotoxicologia, pois são excelentes indicativos do grau de contaminação dos organismos (Lam & Gray, 2003; Walker, 1998).

Um biomarcador de efeito é um parâmetro biológico, medido no organismo, que reflete a interação da substância química com os receptores biológicos (Amorim, 2003). Estes biomarcadores refletem diferentes tipos de alterações mensuráveis no organismo, as quais, de acordo com a sua magnitude, podem ser reconhecidas e associadas a uma disfunção do organismo (Silva, 2016). Frequentemente empregados, são os biomarcadores que indicam fragmentação de ácido desoxirribonucleico (DNA), formação de micronúcleo e alterações em moléculas produzidas endogenamente, como a alteração da atividade de algumas enzimas, por exemplo, acetilcolinesterase (AChE), glutatona S-transferase (GST) e lactato desidrogenase (LDH) (Torres *et al.*, 2004). Nos tecidos, os biomarcadores histológicos, como alterações histopatológicas e morfometria, são também considerados uma importante ferramenta (Castro *et al.*, 2018; Wolf, 2018).

A utilização de biomarcadores em estudos de toxicologia apresenta várias vantagens, pois permite: (1) detectar precocemente a existência de contaminação por substâncias tóxicas biologicamente significativas, (2) identificar espécies ou populações em risco de contaminação, (3) avaliar a magnitude da contaminação, e (4) determinar o grau de severidade dos efeitos causados pelos contaminantes (Silva, 2016; Domingos, 2006). O estudo de diferentes biomarcadores é uma ferramenta importante de avaliação do efeito tóxico de substâncias poluentes em ecossistema aquático, uma vez que, com a aplicação de diferentes técnicas, em

níveis de complexidade (tecido, órgão, células e moléculas) distintos, torna-se possível a elucidação da concentração-efeito na avaliação de risco aos organismos expostos (Jesus & Carvalho, 2008).

1.7.1. Biomarcadores bioquímicos

A detecção de biomarcadores bioquímicos é uma estratégia baseada na identificação das alterações bioquímicas precoces e reversíveis que são indicadores sensíveis e específicos de uma resposta do organismo à exposição (Amorim, 2003). Entre os biomarcadores mais utilizados para organismos aquáticos, pode-se destacar a utilização de enzimas citosólicas envolvidas nos processos de desintoxicação de substâncias e seus metabólitos, enzimas antioxidantes, entre outras enzimas utilizadas como indicadores específicos de efeitos tóxicos em órgãos (Ganguilhet, 2019), como é o caso das seguintes enzimas: acetilcolinesterase, glutatona-S-transferase e desidrogenase láctica.

A complexidade das funções do sistema nervoso, os eventos neurotóxicos de natureza múltipla e a variabilidade e inacessibilidade dos sítios celulares e moleculares desse sistema são fatores que limitam o estabelecimento de indicadores para se avaliar a ação neurotóxica das substâncias químicas. Neste sentido, a quantificação da atividade da enzima acetilcolinesterase (AChE) funciona como um biomarcador de neurotoxicidade (Colombi, 2009; Amorim, 2003) para se determinar a ação neurotóxica de uma substância. A AChE é uma enzima responsável pela hidrólise do neurotransmissor acetilcolina (ACh), resultando em acetato e colina. Esse processo evita a propagação contínua do impulso nervoso, que pode acarretar efeitos comportamentais como hiperatividade, asfixia e morte (Amorim, 2003). Assim sendo, a quantificação de AChE, nos tecidos muscular e nervoso de peixes, tem sido bastante utilizada para avaliar os efeitos da contaminação, pois essa enzima encontra-se com ampla disponibilidade e em grande quantidade nesses tecidos (Coimbra *et al.*, 2013).

A despeito dos danos oxidativos que podem ocorrer nas membranas celulares e no material genético, como resultado da formação de radicais livres, nos sistemas vivos existe uma variedade de defesas antioxidantes, enzimáticas que controlam a formação excessiva das espécies reativas de oxigênio (EROs). A glutatona (GSH) reduzida é uma enzima que faz parte desse sistema de defesa e atua em uma das principais vias de desintoxicação celular (Oliveira & Souza, 2007; Zottis, 2005). Após a sinalização da presença de um metabólito tóxico, a GSH se liga a esse metabólito e há a sinalização para a eliminação desse composto pela célula. A glutatona S-transferase (GST) é a enzima responsável por catalisar a ligação do metabólito à GSH. Assim, para além das suas funções essenciais no transporte intracelular, as GSTs têm

papel decisivo na defesa contra o dano oxidativo e produtos de peroxidação do DNA e lipídeos (Zottis, 2005). Portanto, aumento de GST nas amostras analisadas indica que existe um processo celular endógeno de prevenção dos efeitos deletérios à exposição a uma determinada substância (Silva, 2016).

A desidrogenase láctica (LDH) é responsável pela conversão de piruvato a lactato, produto final da glicólise, sendo, portanto, fundamental para o processo que resulta em energia para as células. Desta forma, a regulação de LDH reflete o metabolismo energético durante a exposição a diferentes condições ambientais (Ganguilhet, 2019). A LDH é utilizada como um biomarcador enzimático de toxicidade, pois ela se eleva no tecido, quando há dano celular membranar (podendo levar a lise celular e dano tecidual) e estresse celular ocasionado pela exposição a um agente químico (Djelić *et al.*, 2019; Abe *et al.*, 2018).

1.7.2. Biomarcadores de genotoxicidade

Mutações no material genético de um ser vivo podem ser induzidas por exposição à agentes físicos, químicos ou biológicos. Essas alterações incluem anormalidades cromossômicas, ampliações gênicas e mutações que podem causar instabilidade genômica, resultando em uma cascata de consequências danosas a uma célula e, conseqüentemente, ao organismo (Campos, 2013). Um agente químico que interage com o material genético, produzindo alterações em sua estrutura ou função, é denominado um agente genotóxico (Friedberg, 2003). Biomarcadores de genotoxicidade permitem avaliar se determinado composto produz alterações na estrutura ou função do DNA e se é um potencial agente mutagênico e/ou tumorigênico em animais e humanos (Coimbra *et al.*, 2013) por meio da avaliação de mutação gênica, dano cromossômico ou lesão no DNA (Valente *et al.*, 2017). Nesse contexto, o teste da contagem de micronúcleo e o teste do cometa, em células sanguíneas, mostram-se biomarcadores eficazes como indicadores da genotoxicidade de um determinado composto (Borm *et al.*, 2018).

Micronúcleos são estruturas visíveis no citoplasma de células interfásicas, resultantes de fragmentos cromossômicos ou de cromossomos inteiros que, por não se ligarem às fibras do fuso no processo de divisão celular, não são incluídas no núcleo das células-filhas (Heddle *et al.*, 1983). A quantificação dessa estrutura em células sanguíneas serve como índice para evidenciar danos no DNA que foram causados frente a uma exposição a um agente contaminante (Borm *et al.*, 2018; Coimbra *et al.*, 2013). A ação de agentes externos físicos, químicos ou biológicos podem promover distúrbios na maquinaria mitótica, gerando falhas na segregação cromossômica e podendo levar à formação de micronúcleos. O teste do

micronúcleo, em peixe-zebra, é um ensaio *in vivo* que permite detectar agentes potencialmente clastogênicos, mutagênicos ou aneugênicos (Rivero, 2007). Além da formação de micronúcleos, alterações morfológicas no envelope nuclear foram descritas primeiramente por Carrasco *et al.*, (1990). Essas alterações morfológicas já foram também identificadas em células sanguíneas de diversas espécies de peixes (Palhares e Grisolia, 2002; Souza e Fontanelli, 2006; Özkan *et al.*, 2009; Güner *et al.*, 2011), sugerindo que devem ser levadas em consideração durante a análise das lâminas, pois, provavelmente, estão relacionadas aos processos de citotoxicidade, alterações na divisão celular, assim como genotoxicidade e mutagenicidade. Acredita-se que as alterações nucleares sejam formadas por acúmulo de cromatina em regiões do núcleo, dando a ele diferentes aspectos. Além disso, também parecem desencadear processos de morte celular (Miranda, 2006).

O ensaio cometa é um teste de genotoxicidade, utilizado na detecção de lesões no material genético, as quais, após serem processadas pelo aparato enzimático celular de reparo do DNA, podem ser corrigidas ou levadas a mutações e danos cromossômicos (Borm *et al.*, 2018). Nessa técnica, as células são incluídas em gel sobre uma lâmina de microscopia e submetidas à corrente elétrica. O DNA apresenta carga negativa e tende a migrar em direção ao polo positivo. O DNA fragmentado (clastogênese) migra para fora do núcleo, ficando com a aparência de um cometa ou cauda. Por outro lado, o DNA íntegro fica armazenado no núcleo, pois é muito grande para migrar (Silva, 2007). As alterações mais facilmente identificadas no DNA são quebras simples ou duplas, *crosslinks* e quebras resultantes de reparo por excisão. O teste do cometa identifica lesões genômicas que podem ser consertadas pelos mecanismos celulares de reparo e, quando não reparadas, podem causar mutações (Silva, 2007).

Uma vez que danos no DNA são frequentes em célula e tecido-específicos, uma técnica como a do ensaio cometa, que permite a detecção de danos e seus reparos em uma única célula ou em determinada subpopulação celular, é de extrema relevância para a avaliação da genotoxicidade de diferentes compostos (Amaral *et al.*, 2017; Valente *et al.*, 2017).

1.7.3. Biomarcadores histológicos

A histologia, nos estudos ecotoxicológicos, é uma ferramenta muito útil para diagnósticos dos efeitos agudos e crônicos de agentes químicos e, por isso, alterações histológicas decorrentes da exposição à xenobióticos são utilizadas como biomarcadores no monitoramento ambiental (Al-Zaidan *et al.*, 2015), uma vez que, os efeitos tóxicos de poluentes podem ser evidenciados em células e tecidos dos animais (Albinati *et al.*, 2009). Embora apresentem diferentes abordagens na avaliação dos danos, diferentes metodologias histológicas são

utilizadas como biomarcadores para o diagnóstico de impactos ambientais (Bernet *et al.*, 1999). Nesse contexto, biomarcadores histopatológicos e morfometria de órgãos, funcionam como importantes biomarcadores de tecido, uma vez que ajudam a elucidar possíveis lesões teciduais em função da duração e da intensidade da exposição a um determinado poluente e, também, da capacidade adaptativa desse tecido (Arouca *et al.*, 2012; Albinati *et al.*, 2009; Souza *et al.*, 2003).

Poluentes, nos ecossistemas aquáticos, podem ser absorvidos pelos peixes principalmente pela alimentação, respiração, ingestão de água e através da pele. Assim, uma vez incorporados aos tecidos desses animais, os poluentes podem ser acumulados nas brânquias, no fígado, no rim, no intestino e no músculo, podendo causar alterações histológicas nesses órgãos (Wolf & Wolfe, 2005; Bernet *et al.*, 1999; Heath, 1997). As brânquias dos peixes são órgãos com grande superfície, e o fato de estarem em contato direto com os possíveis agentes poluentes da água fazem delas um órgão chave para análise de biomarcadores histológicos (Santos, 2010). Além disso, esse órgão apresenta células mucosas que exercem importante papel na defesa contra patógenos e agentes poluentes nos ecossistemas aquáticos (Díaz *et al.*, 2001; Ferguson *et al.*, 1992). Os agentes dissolvidos na água entrarão em contato com a brânquia e com as lamelas respiratórias, no processo de respiração dos peixes, o que pode levar a alterações na morfologia dessas estruturas (Santos, 2010). Durante a exposição, os poluentes podem comprometer a adesão entre as células branquiais epiteliais e as células subjacentes, levando ao colapso da integridade estrutural das lamelas secundárias e subsequente falha das funções respiratórias das brânquias (Samanta *et al.*, 2016). Além disso, na presença de poluentes, as brânquias podem exibir modificações que são consideradas respostas de defesa, e essas modificações podem ser verificadas pelas alterações histopatológicas nesses tecidos: hipertrofia de células epiteliais, deslocamento de células do epitélio, alterações nas células mucosas e cloreto, alterações nos vasos sanguíneos lamelares, dilatação e desarranjo dos capilares e, ainda, processos degenerativos como a necrose (Castro *et al.*, 2018; Jabeen *et al.*, 2018); sendo possível ocorrer, também, alterações que podem ser quantificadas pela avaliação morfométrica desse órgão (Wells & Pinder, 1996). Análises histopatológicas das brânquias de Pacu (*Piaractus mesopotamicus*), expostos ao herbicida Reward[®], mostraram edemas subepiteliais nas células de revestimento das lamelas secundárias, hiperplasia das células de revestimento e fusão apical das lamelas secundárias (Henares *et al.*, 2008).

Além das brânquias, o fígado é também um importante órgão biomarcador para avaliação de biomarcadores histológicos, uma vez que é responsável pela metabolização de substâncias tóxicas e pode, portanto, sofrer alterações estruturais mediante essa exposição de maneira,

inclusive, inicial, em comparação com outros órgãos (Rocha *et al.*, 2010; Santos, 2010). Alterações nos hepatócitos como desarranjo dos cordões hepáticos, atipias no contorno celular e nuclear, diminuição do glicogênio, estagnação biliar, alterações nos vasos sanguíneos, como ruptura de vasos e alterações mais severas de morte celular como degeneração dos canalículos biliares e necrose podem ser interpretados como respostas ao estresse ambiental, e assim, consideradas alterações histopatológicas da qualidade do ambiente (Wolf & Wheeler, 2018; Rezende *et al.*, 2016). Exposição de peixes (*Cirrhina mrigala*) a sedimentos contaminados por metais pesados levaram a aumento de alterações histopatológicas estruturais, núcleos picnóticos, necrose hepática, vacuolização citoplasmática e dilatação de capilares sinusóides, e isso, por sua vez, indica um provável aumento do volume de sangue recebido no fígado para desintoxicar o organismo (Jabeen *et al.*, 2018).

O rim dos peixes é um órgão misto composto de elementos hematopoiéticos, reticuloendoteliais, endócrinos e excretorios, que participa ativamente em importantes processos fisiológicos, por exemplo, a produção de cortisol, hormônio alterado na presença de fatores que perturbam a homeostase animal, incluindo exposição à poluentes (Lins *et al.*, 2010; Barreto, 2006). Adicionalmente à essas funções, esse órgão constitui a principal rota de excreção para os metabólitos de vários contaminantes, aos quais o peixe tenha sido eventualmente exposto, através da filtração glomerular durante a formação da urina (Silva, 2004). Lesões no tecido linfóide renal, alterações nos glomérulos e túbulos renais como a degeneração hialina e citoplasmática, alteração na cápsula de Bowman, obstrução tubular, dilatação e ruptura de vasos sanguíneos, entre outras alterações, podem ser utilizadas como indicadores para o monitoramento de efeitos de um determinado contaminante (Wolf *et al.*, 2015). Análises histológicas do rim de peixes (*Pomadasys hasta* e *Lutjanus russellii*) coletados em áreas de intensa poluição ambiental do Mar Vermelho (Litoral de Al Hudaydah, Cidade no Iémen) mostraram, em maior incidência, degeneração vacuolar, degradação de túbulos renais, separação tubular, sinais de degeneração do tecido hematopoiético e infiltração de células sanguíneas. Tais análises apontam o rim como um importante órgão no biomonitoramento do status de poluição e contaminação aquática (Omar, Saleh & Marie, 2014).

O intestino dos peixes é responsável pela absorção de nutrientes, secreção de enzimas e de hormônios, absorção de líquidos e é, portanto, um órgão chave para homeostase do organismo. Conseqüentemente, a exposição a agentes contaminantes pode comprometer a função intestinal por alterar os componentes histológicos associados a esse órgão (Santos *et al.*, 2016). As vilosidades intestinais são as estruturas que auxiliam na digestão, aumentando a superfície de absorção e secreção (Damasceno, 2016); além disso, estudos distintos mostram que parâmetros

morfométricos como o tamanho, espessura dessas vilosidades, e de seus epitélios, podem ser desencadeados por mudanças ambientais estressantes que os peixes sofrem (Santos *et al.*, 2016; Koeneman *et al.*, 2010; Silva *et al.*, 2010). O tecido intestinal de trutas-marrons que viviam em regiões impactadas pela poluição ambiental (industrial e residencial) no rio Krka (Croácia) mostrou-se sensível às mudanças induzidas pela poluição na água, o que levou, nesses organismos, a aumento da superfície epitelial, na tentativa de proteger o epitélio dos poluentes. Esse aumento epitelial foi avaliado e quantificado por metodologias morfométricas, que constataram hiperplasia das células intestinais epiteliais produtoras de muco (caliciformes) (Barišić, *et al.*, 2018). A espessura das vilosidades e altura dos enterócitos de *Danio rerio* foi reduzida após exposição ao larvicida temefos, fato indicador de que a exposição aos poluentes químicos ambientais pode promover modificações histológicas no intestino delgado desse organismo-modelo, as quais podem comprometer a sua homeostase (Santos *et al.*, 2016), e que consolida as medições morfométricas como bons indicadores de toxicidade.

1.8. Avaliação comportamental

Uma análise importante e complementar que vem sendo empregada em estudos ecotoxicológicos, com peixes como organismo modelo, é a avaliação comportamental desses animais, como indicador de toxicidade, uma vez que, essa análise pode trazer elementos complementares importantes para as interpretações dos resultados, juntamente com outros testes realizados (Hong & Zha, 2019). As variáveis mais frequentemente quantificadas, nos testes são a latência, para exibir certo comportamento, tempo gasto em cada local ou condição e frequência de vezes que ocupa cada local ou condição (Volpato, 2007).

Perfis comportamentais de *Danio rerio* tornaram-se uma ferramenta amplamente utilizada por pesquisadores em farmacologia (Hong e Zha, 2019). Uma vez que os fármacos, no ambiente, podem interagir com espécies não-alvos (Brausch *et al.*, 2012; Kar & Roy, 2012), metodologias que analisam o comportamento desses organismos, após a exposição, podem fornecer resultados precisos sobre os efeitos neurotóxicos de um determinado fármaco (Hong & Zha, 2019).

Antidepressivos são mundialmente prescritos e seus resíduos são encontrados com frequência nas águas e, acredita-se, que são resistentes à degradação por micro-organismos durante o tratamento de esgoto (Vaclavik *et al.*, 2020). Pesquisas com peixes sugerem que esses animais podem ser sensíveis à inibição dos neurotransmissores pelos medicamentos antidepressivos, levando a uma série de efeitos adversos comportamentais ligados ao mecanismo de ação desses medicamentos (Stewart *et al.*, 2013).

Estudos comportamentais, que avaliem as mudanças dos organismos após a exposição a esses medicamentos, oferecem informações valiosas, não só para os efeitos crônicos em organismos não alvos, mas também para os efeitos nas cadeias alimentares dos ecossistemas aquáticos, uma vez que o comportamento do animal, pós-exposição, interfere diretamente na sua sobrevivência, alimentação e reprodução (Parolin *et al.*, 2019). Trabalhos recentes apontam resultados evidenciadores de que a exposição à fármacos psiquiátricos podem tornar o animal mais susceptível à predação em seu habitat natural. Os resultados do estudo realizado por Sinyakova *et al.*, (2018) demonstraram que a exposição à fluoxetina em peixes *Danio rerio* aumentou significativamente o tempo gasto na parte superior do tanque e reduziu significativamente a atividade motora. Vaclavik *et al.*, (2020) confirmaram que a exposição à sertralina tem efeito no comportamento dos peixes, resultando na supressão do reflexo de escape e no aumento do estresse. O estudo comportamental de um organismo a uma determinada substância é um aliado formidável aos estudos clássicos ecotoxicológicos, pois possibilitam a melhor compreensão dos prováveis e diversos efeitos que estressores ambientais podem gerar nos organismos e ecossistemas aquáticos (Bachour *et al.*, 2020).

1.9. Ecotoxicogenômica

A terminologia “ecotoxicogenômica” descreve a integração de metodologias em larga escala (“ciências ômicas”) nos estudos ecotoxicológicos, incluindo a genômica, proteômica e metabolômica (Kim, Koedrith & Seo, 2015; Piña & Barata, 2011;). Visto que a interação primária dos poluentes químicos com os organismos acontece no âmbito de biomoléculas, antes de mudanças fisiológicas e biológicas, é esperado que ocorram nos organismos, alterações de expressão gênica como resultado da exposição aos poluentes. Portanto, estudos com abordagens moleculares permitem obter maiores informações sobre os efeitos dos poluentes nos organismos, aprimorando o conhecimento dos modos de ação dos contaminantes, e resultando na identificação de biomarcadores induzidos pelo estresse (Fent & Sumpter, 2011; Schirmer *et al.*, 2010).

A principal técnica genômica utilizada na avaliação toxicológica é a transcriptômica baseada em microarranjos (*microarrays*), a qual permite analisar os níveis de transcritos de milhares de genes, e, assim identificar marcadores biomoleculares e possíveis vias biológicas que sejam alvos de fármacos (Fent & Sumpter, 2011; Piña & Barata, 2011). Nos últimos anos, abordagens transcriptômicas foram utilizadas em estudos ecotoxicológicos de compostos potencialmente tóxicos, em diversas espécies aquáticas (Kim, Koedrith & Seo, 2015), contudo, poucos fármacos psiquiátricos, e seus efeitos nos organismos, foram avaliados por esta metodologia.

Estudos de transcriptômica com peixe-zebra começaram a ser realizados em anos recentes. Oggier *et al.*, (2010) usaram a técnica de *microarray* para avaliar os efeitos da exposição ao diazepam (ansiolítico), em concentrações baixas (ng/L e µg/L), e encontraram expressão alterada de mais ou menos 100 transcritos, com destaque para genes envolvidos no ritmo circadiano. Outro estudo expôs larvas de peixe-zebra a concentrações de 25 e 250 µg/L de fluoxetina e sertralina por 96 horas (Park *et al.*, 2012). Os autores identificaram vários transcritos desregulados, incluindo genes associados com resposta ao estresse e atividade da acetilcolinesterase (Park *et al.*, 2012).

Considerando a alta similaridade genética entre humanos e peixe-zebra, estudos de perfis de expressão gênica em *Danio rerio* podem permitir: (i) elucidar mecanismos de toxicidade; (ii) detectar os efeitos de substâncias tóxicas em vias bioquímicas inesperadas; (iii) comparar perfis de expressão gênica para determinar diferenças/similaridades às respostas dos seres humanos a essas mesmas substâncias (Rogers *et al.*, 2011; van der Ven *et al.*, 2006).

Embora a maioria de estudos genômicos tenha avaliado a resposta gênica em testes de curta duração e concentrações elevadas, do ponto de vista ambiental, é mais relevante focar nas alterações genômicas causadas por exposições crônicas. Além disso, em baixas concentrações, apenas os genes regulados por determinado fármaco serão afetados, potencializando assim a identificação de novos biomarcadores de genotoxicidade (Piña & Barata, 2011). Importante ressaltar que, para melhor compreender o mecanismo de ação dos compostos tóxicos, é necessário vincular o perfil de expressão gênica com mudanças fisiológicas e comportamentais do organismo-teste (Fent & Sumpter, 2011).

A ecotoxicogenômica representa uma importante ferramenta de estudo, possibilitando a melhor compreensão dos prováveis e diversos efeitos que estressores ambientais fármacos psiquiátricos persistentes é um deles - podem gerar nos organismos. Os estudos, em larga escala, das alterações genéticas revelam informações sobre os mecanismos moleculares da interação fármaco-genoma; e podem auxiliar na obtenção de maior conhecimento sobre o mecanismo de ação dos fármacos no meio ambiente (Fent & Sumpter, 2011).

1.10. Organismo modelo: peixe-zebra (*Danio rerio*)

Os organismos aquáticos estão expostos aos contaminantes não apenas através do descarte de águas residuais, mas também através de sua cadeia alimentar. Os peixes estão em níveis tróficos elevados das cadeias alimentares aquáticas e são sensíveis às mudanças ambientais, razões pelas quais servem como um bioindicador da qualidade ambiental (Ergene *et al.*, 2007). Atualmente, o peixe-zebra (Figura 3) é um organismo consolidado como modelo experimental

em diversas áreas da ciência, tais como genética, biologia do desenvolvimento, comportamento, toxicologia e neurociência (Gore *et al.*, 2018). Essa espécie da família *Cyprinidae* é natural da Ásia; caracteriza-se por ser um teleósteo que mede de 3 a 4 centímetros (quando adulto), onívoro (alimenta-se principalmente de fitoplâncton e microinvertebrados), dulciaquícola, ovíparo e com um tempo médio de vida entre 2-5 anos (Bambino & Chu, 2017).



Figura 3. *Danio rerio*: popularmente conhecido como peixe-zebra ou paulistinha. Fonte: Popular Science.

O peixe-zebra é um excelente organismo modelo para avaliar o potencial tóxico das substâncias no meio aquático. As principais justificativas para isso decorrem do fato de esses animais apresentarem as seguintes características: pequeno porte, baixo custo, fácil manutenção, alta taxa de reprodução, genoma sequenciado e com alta similaridade genética com os mamíferos (74%) (Howe *et al.*, 2013; Marcon *et al.*, 2016; Kamstra *et al.*, 2015;). A alta capacidade reprodutiva das fêmeas de peixe-zebra, comprovada pela geração de centenas de ovos em um curto espaço de tempo, aliada à transparência dos embriões; permite acompanhar facilmente todo o desenvolvimento embrionário, realizar vários experimentos geracionais, e também investigar a evolução de doenças desde o estágio embrionário até o adulto (Ali *et al.*, 2011).

Em contraste com os ensaios desenvolvidos *in vitro*, os estudos em animais vivos permitem analisar processos de desenvolvimento complexos que atuam ao longo do tempo para formar organismos adultos (Kang *et al.*, 2013; Scholz *et al.*, 2013). Alguns órgãos do peixe-zebra, como intestino e fígado, apresentam similaridades morfológicas e funcionais aos dos seres humanos e, por isso, os mecanismos e as vias patológicas podem ser correlacionados entre as espécies (Brown *et al.*, 2012; Ali *et al.*, 2011; Shin & Fishman, 2002). Além disso, graças à similaridade genética do peixe-zebra com os seres humanos, estudos de genotoxicidade, biomarcadores genéticos e alteração de perfis de expressão gênica são amplamente empregados

(Howe *et al.*, 2013). Os sistemas de neurotransmissores como gabaérgico, colinérgico, serotoninérgico, dopaminérgico e noradrenérgico, também estão presentes em zebrafish, o que o torna um bom organismo modelo para o estudo de fármacos psiquiátrico que agem interferindo na atividade desses neurotransmissores (Marcon *et al.*, 2016; Kamstra *et al.*, 2015).

2. JUSTIFICATIVA

Os fármacos psiquiátricos têm um enorme valor medicinal nas sociedades humanas, e tanto seu consumo como sua liberação no meio ambiente tendem a se intensificar nas próximas décadas. Neste contexto, estudos ecotoxicológicos são necessários para esclarecer os possíveis efeitos nocivos desses medicamentos no equilíbrio dos ecossistemas aquáticos, uma vez que fornecem dados para que as autoridades governamentais possam adotar medidas adequadas de avaliação e gestão de risco dessas substâncias; e, assim estabelecer um arcabouço científico que baseie o sistema de regulação ao meio ambiente.

Entre os fármacos psiquiátricos, que foram desenhados para agir em vias específicas do sistema nervoso central, menos de um terço possuem dados ecotoxicológicos, evidenciando uma clara lacuna que precisa ser preenchida. A maior parte dos estudos presentes na literatura científica é de natureza aguda, porém, esses fármacos são encontrados em baixas concentrações nas matrizes ambientais e podem ter efeitos nocivos em ecossistemas aquáticos em longas exposições, uma vez que o aporte é contínuo e a degradação é lenta. Drogas psiquiátricas de uso amplo, como a NTP e VLX, têm dados ecotoxicológicos limitados, principalmente, no que diz respeito a estudos que se utilizem de múltiplos parâmetros para avaliar os efeitos tóxicos desses fármacos, aos organismos não-alvo expostos. Por essa razão, o presente trabalho elegeu esses medicamentos para uma análise toxicológica multiparamétrica que pudesse ser valiosa para elucidar os impactos dessas substâncias medicamentosas no ambiente aquático.

O peixe-zebra, seja na forma de embriões/larvas ou adultos, é um dos principais organismos modelo utilizado em estudos ecotoxicológicos. Este animal é sensível a fármacos psiquiátricos e pode ser utilizado para avaliar o potencial efeito nocivo dessas substâncias em organismos não-alvo de ambientes aquáticos.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo geral

Estudar os efeitos toxicológicos da exposição aguda e crônica de dois fármacos psiquiátricos (NTP e VLX) em estágios de vida diferentes do peixe-zebra (embriões e adultos).

3.2. Objetivos específicos

A exposição de embriões/larvas de peixe-zebra foi utilizada para identificar:

- Concentração letal em 50% dos organismos (CL₅₀).
- Efeitos subletais: malformações no desenvolvimento, alterações no equilíbrio, na frequência cardíaca e na taxa de eclosão.
- Alterações no comportamento locomotor de larvas (exclusivo para animais expostos à NTP).
- Alterações na atividade de biomarcadores enzimáticos de toxicidade.

A exposição aguda de adultos de peixe-zebra foi utilizada para identificar:

- Concentração letal em 50% dos organismos (CL₅₀).
- Alterações na atividade de biomarcadores enzimáticos de toxicidade.
- Genotoxicidade.

A exposição crônica de adultos de peixe-zebra foi utilizada para identificar:

- Alterações na atividade de biomarcadores enzimáticos de toxicidade.
- Genotoxicidade.
- Alterações histológicas.
- Alterações no comportamento associados com a locomoção.
- Perfis de expressão gênica em tecido cerebral.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Organismo-teste: *Danio rerio*

Todos os procedimentos seguiram os princípios éticos de experimentação animal, visando evitar ou minimizar o estresse, a angústia, a dor e o desconforto dos organismos. O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética no Uso Animal (CEUA) do Instituto de Biologia da Universidade de Brasília (UnB, protocolo nº100226/2014). Os procedimentos seguiram as normas para experimentação estabelecidas na Lei Arouca (nº 11.794, de 8 de outubro de 2008) e preconizadas na literatura científica: usos de Animais de Laboratório (*National Research Council*, 1996; *American Veterinary Medical Association- AVMA*, 2007).

Foram utilizados peixes *Danio rerio* adultos, mantidos em um sistema automatizado de cultivo em laboratório (ZebTEC, Tecniplast, Buguggiate, Varese, Itália), localizado no Departamento de Genética e Morfologia (GEM) da UnB. A água do sistema provém da rede de abastecimento comum e é pré-tratada por filtração em osmose reversa. A temperatura foi mantida em torno de 27 ± 1 °C com aeração constante; pH de $7,5 \pm 0,5$ e condutividade de 650 ± 100 µS/cm. A sala de aquários dispõe de um fotoperíodo de 12 h de luz e 12 h de escuro. Os peixes foram alimentados de duas a três vezes por dia com ração comercial (Sera Vipan, TetraMin) e alimentação viva (*Artemia salina*).

4.2. Desenho experimental

As Figuras 4 e 5 representam o desenho experimental do presente trabalho, resumindo todas as etapas, tipos de ensaio (agudo ou crônico) e parâmetros de toxicidade avaliados nos peixes-zebra expostos aos fármacos psiquiátricos NTP e VLX, respectivamente.

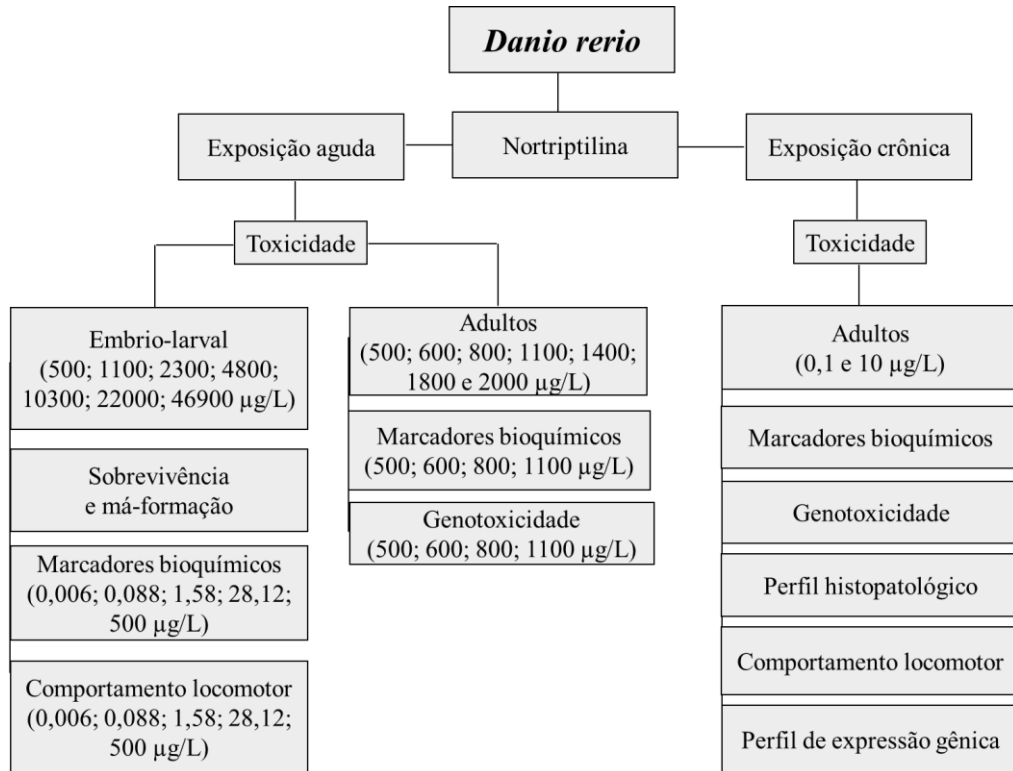


Figura 4. Representação esquemática do desenho experimental do estudo ecotoxicológico da nortriptilina.

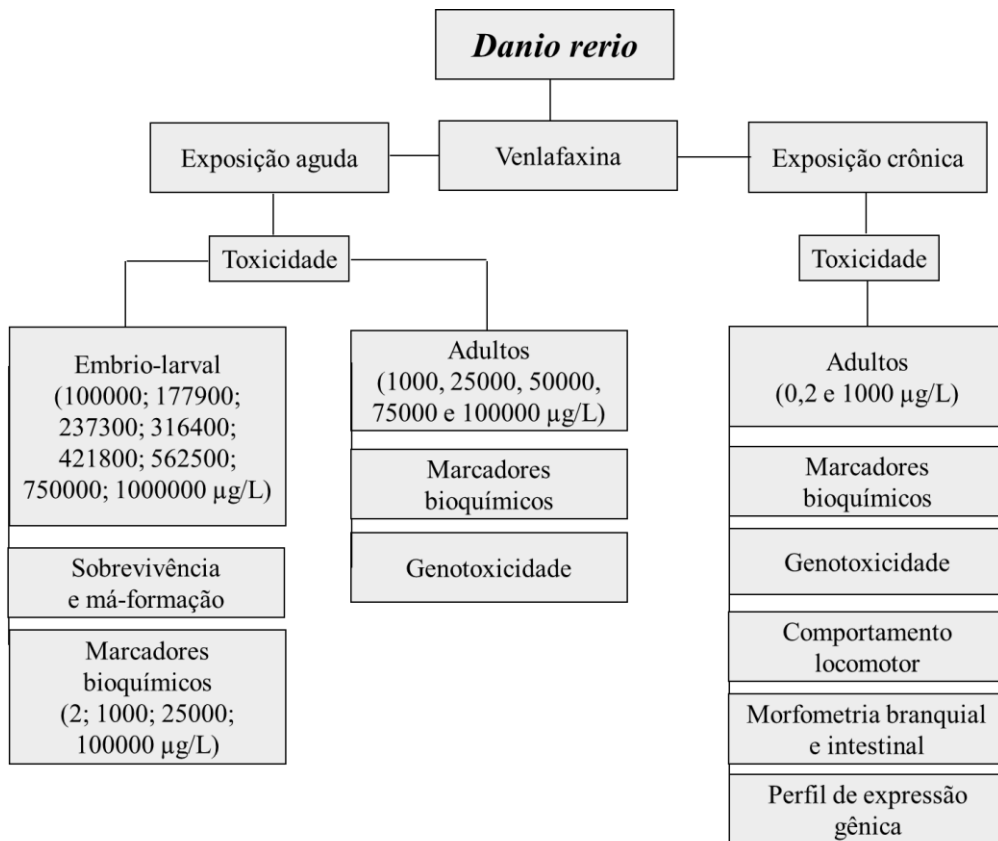


Figura 5. Representação esquemática do desenho experimental do estudo ecotoxicológico da venlafaxina.

4.2.1. Preparo das soluções estoque

A NTP e a VLX utilizadas nos testes ecotoxicológicos foram obtidas da indústria farmacêutica C & C, Amapá, Brasil. O princípio ativo da NTP utilizado nos experimentos (Reg Number: 77721) apresenta fórmula molecular = $C_{19}H_{21}N.HCl$ e massa molecular = 299,8429 g/mol. Já o princípio ativo da VLX utilizado nos testes ecotoxicológicos (Reg Number: 77713) apresenta fórmula molecular = $C_{17}H_{27}NO_2.HCl$ (Lima, Silva & Otero, 2018).

Prévio aos experimentos, foi preparada uma solução padrão de NTP e VLX (com concentração variável de acordo com cada ensaio desenvolvido), que foi sonicada durante 15 minutos, pulso 5/3 segundos (ON/OFF) e 20% de amplitude (Ultrasonic Cleaner 2840D-Odontobras, Ribeirão Preto, Brasil). A partir dessa solução principal, foram realizadas as diluições correspondentes a fim de obter os valores desejados para cada teste. Vale ressaltar que a preparação da solução padrão e das diluições levou em consideração a água usada nos experimentos. Nos ensaios com embriões/larvas, foi utilizada água do sistema ZebTec, e nos ensaios com adultos foi utilizada água reconstituída (OECD 203).

4.2.2. Análise química

As soluções-estoques de NTP e VLX foram analisadas diariamente por um período de sete dias, para determinar quanto tempo os fármacos levavam para serem degradados, após diluição e exposição às condições abióticas experimentais. A curva padrão foi determinada por HPLC (*High Performance Liquid Chromatograph*) (Shimadzu-Prominence, Kyoto, Japão), que contém os seguintes componentes: um desgaseificador em linha (Modelo DGU 20A5), um módulo de entrega de solvente (Modelo LC-20AT), um autoinjeter (Modelo SIL-20AHT), um forno de coluna (Modelo CTO-20A), um detector espectrofotométrico (UV-VIS - Modelo SPD-20A), um sistema controlador (Modelo CBM-20A) e o software de análise LC Solutions (Shimadzu-Prominence, Kyoto, Japão). A coluna utilizada foi a CLC de fase inversa C-18-ODS (M) (4,6 mm i.d X 15 cm, 5 μ m).

Soluções de NTP, com concentrações variando entre 5 e 50 μ g/mL, foram preparadas com água ultrapura a fim de determinar a curva padrão. O método de gradiente usado, foi com uma fase móvel, composta de solução 0,12% de TFA em água ultrapura (A) e acetonitrila (B). O comprimento de onda para a absorbância foi de 240 nm, o volume de injeção de 10 μ L e a temperatura do forno foi mantida em 30°C.

Soluções de VLX, com concentrações variando entre 1 e 25 μ g/mL, foram preparadas com água ultrapura a fim de determinar a curva padrão. O método de gradiente usado foi uma fase móvel, composta de solução 0,12% de TFA em água ultrapura (A) e acetonitrila (B). O

comprimento de onda para a absorbância foi de 226 nm, o volume de injeção de 10 µL e a temperatura do forno foi mantida em 25°C.

4.3. Teste de toxicidade em embriões/larvas (FET -*Fish embryo test*)

Para a obtenção de ovos, peixes machos e fêmeas (1♀:2♂), com aproximadamente seis meses de idade, foram colocados em uma caixa de incubação, constituída por um tanque horizontal, com divisória, para separar os machos das fêmeas. No dia seguinte, a divisória foi removida imediatamente após as luzes terem sido acessas. Os embriões de *Danio rerio* se desenvolvem rapidamente, por isso os ovos fertilizados foram coletados até uma hora depois das luzes terem sido acesas e lavados pelo menos três vezes com água proveniente do sistema de cultivo. A fim de garantir a sincronização do desenvolvimento no início da exposição, os ovos fertilizados foram identificados na fase de blástula. Além disso, a viabilidade dos ovos foi avaliada (ovos translúcidos) antes de se realizar a distribuição aleatória nos grupos experimentais.

A avaliação do desenvolvimento embrio-larval foi baseada no protocolo modificado do FET da OECD 236 (OECD, 2013). Os ovos coletados foram testados em sete concentrações diferentes de NTP (500; 1100; 2300; 4800; 10300; 22000 e 46900 µg/L) e em oito concentrações diferentes de VLX (100000; 177900; 237300; 316400; 421800; 562500; 750000 e 1000000 µg/L) com seus respectivos controles. As concentrações de cada teste, foram selecionadas a partir de resultados de pré-testes realizados, em nosso laboratório, que indicavam uma provável toxicidade desses fármacos. Os pré-testes foram feitos com base nos dados científicos da literatura. Os experimentos foram realizados em triplicata (provenientes de 3 cruzamentos diferentes), com placas de cultura de 24 poços, e tiveram duração de 168 horas. Vinte poços, em cada placa, foram preenchidos com 2 mL da solução de fármaco correspondente, enquanto os quatro poços restantes foram preenchidos com 2 mL de água do sistema ZebTec, constituindo assim o grupo controle interno de cada placa. Um embrião foi transferido para cada poço das placas, e elas foram acondicionadas em uma câmara climática com condições idênticas à sala de cultivo. Durante os sete dias de exposição, não houve troca das soluções com o fármaco e controle às quais os embriões estavam expostos.

Na fase de embrião foi avaliada a mortalidade antes e após a eclosão (coagulação dos ovos e morte de embriões). Além disso, também foram avaliadas alterações em parâmetros de desenvolvimento embrionário, tais como formação do otólito, pigmentação do corpo e olhos, formação dos somitos, presença de batimento cardíaco, separação da cauda do saco vitelínico, edema, acúmulo de hemácias, formação do telencéfalo e eclosão. Após a eclosão foram

avaliados os seguintes parâmetros: pigmentação do corpo e olhos, batimento cardíaco, edema, acúmulo de hemácias, inflação da bexiga natatória, malformações da cauda e resposta a estímulo mecânico (perda de equilíbrio, definido como o embrião deitado lateralmente no fundo do poço da microplaca).

4.4. Teste de toxicidade aguda em organismos adultos

O teste foi realizado seguindo a norma da OECD 203 (OECD, 1992). Peixes adultos, com idade de um ano, foram pesados (± 70 mg) e distribuídos aleatoriamente em aquários (7 organismos por aquário) com capacidade de 4 L. Com base nos resultados de toxicidade dos embriões e em pré-testes, de exposição aguda, feitos com adultos, foram escolhidas sete diferentes concentrações de NTP (500; 600; 800; 1100; 1400; 1800; 2000 $\mu\text{g/L}$), cinco diferentes concentrações de VLX (1000; 25000; 50000; 75000; 100000 $\mu\text{g/L}$) e os respectivos grupos controles. Para cada concentração havia três aquários diferentes de exposição dos peixes (triplicatas), totalizando 21 peixes por tratamento incluindo o grupo controle. A mortalidade dos peixes foi monitorada diariamente (a cada 24 horas), durante as 96 horas de duração do experimento. Os animais foram alimentados duas vezes por dia com ração comercial (Sera Vipán) e os peixes que sobreviveram após às 96 horas de exposição, foram utilizados para fazer as análises de genotoxicidade e bioquímicas.

Os parâmetros físico-químicos da água, referentes à temperatura ($27.0 \pm 1^\circ\text{C}$), pH (7.0 ± 0.5), condutividade ($650 \pm 100 \mu\text{S/cm}$) e saturação de oxigênio (≥ 95 %), foram mantidos constantes durante todo o teste. Além disso, a quantidade de compostos nitrogenados (nitrato, nitrito e amônia) foram monitorados, diariamente, com kits comerciais da Labcon (Alcon, Camboriú, Santa Catarina, Brasil), a fim de evitar um ambiente tóxico devido à presença de excretas dos próprios peixes.

É importante mencionar que a água utilizada nesses testes foi a reconstituída, preparada com água deionizada e uma mistura de sais (11,76 g de CaCl_2 ; 4,93 g de MgSO_4 ; 2,59 g de NaHCO_3 e 0,23 g de KCl para 40 litros de água reconstituída) (OECD 203, 1992). Prévio à exposição com a NTP e VLX, os peixes foram aclimatados na água reconstituída por 14 dias. A água dos aquários experimentais foi trocada a cada três dias, com base nos resultados obtidos nos testes da estabilidade da NTP e da VLX e de acordo com os protocolos de cultivo, para que os parâmetros físico-químicos da água não sofressem variações.

4.5. Teste de toxicidade crônica em indivíduos adultos

As concentrações de NTP utilizadas na exposição crônica (28 dias) foram escolhidas com base na CL_{50} obtida no teste de toxicidade aguda com adultos e nas informações científicas de

artigos que encontraram esse fármaco em ecossistemas aquáticos: 10 µg/L e 0,1 µg/L (ambientalmente relevante). As concentrações de VLX utilizadas na exposição crônica (28 dias) foram escolhidas com base no teste de toxicidade aguda com adultos e nas informações científicas de artigos que encontraram esse fármaco em ecossistemas aquáticos: 1000 µg/L e 0,2 µg/L. Peixes adultos, com idade de um ano, foram expostos a cada uma das duas concentrações por 28 dias. Os ensaios foram realizados em quadruplicata (7 peixes por aquário/replicata), incluindo um grupo controle. As soluções foram renovadas a cada três dias (condição semi-estática), e os animais foram alimentados duas vezes por dia com ração comercial (Sera Vipran). Assim como no teste agudo com adultos, os peixes foram aclimatados na água reconstituída por duas semanas antes de iniciar os experimentos, e os parâmetros físico-químicos mantidos constantes ao longo do tempo.

Após os 28 dias de exposição, nenhuma morte foi observada e os peixes foram coletados aleatoriamente das replicatas para realizar análises bioquímicas, de genotoxicidade (micronúcleo e cometa), de histologia, genômicas e comportamentais.

4.6. Testes bioquímicos em larvas e animais adultos

Tanto as larvas como as partes do corpo (cabeça e músculo) dos organismos adultos foram coletados e armazenados em microtubos, com 2 ml de tampão PBS (0,1 M, pH 7,2), e imediatamente armazenadas a -80°C até o dia da análise. As amostras foram descongeladas em gelo, homogeneizadas com sonicador (Vibra-Cell™ 75042, 20 kHz, 500 W, Sonics & Materials, Newtown, Connecticut, EUA) e centrifugadas (Centrífuga Hettich - Mikro 220R, Hettich Lab, Tuttlingen, Alemanha) por 20 min a 10.000 g. A quantidade de proteína foi quantificada pelo método de Bradford e ao obter a concentração de proteína, necessária para cada teste enzimático o volume necessário para a reação enzimática pipetado em microplacas de 96 poços para determinação enzimática. Na exposição, de larvas e adultos, à NTP a atividade da enzima AChE foi avaliada, enquanto que, após a exposição, de larvas e adultos, à VLX, foram avaliadas as atividades das enzimas AChE, GST e LDH uma vez que a literatura apontava prováveis efeitos nessas enzimas causados pela exposição à VLX, mas não pela NTP.

A atividade da enzima AChE, após exposição à NTP foi avaliada: i) em embriões/larvas, em cinco concentrações subletais (0,006; 0,08; 1,58; 28,12 e 500 µg/L) por 120, 144 e 168 horas após exposição, exposição essa similar ao do teste locomotor, justamente com o intuito de verificar, se a atividade dessa enzima teria correlação com a atividade locomotora; ii) em organismos adultos, em quatro concentrações subletais (500; 600; 800; 1100 µg/L) por 96 horas; e em organismos adultos, em duas concentrações subletais (0,1 e 10 µg/L) por 28 dias.

As atividades dos biomarcadores AChE, GST e LDH foram quantificadas após exposição à VLX, nos seguintes grupos: i) em embriões/larvas, em quatro concentrações subletais (2; 1000; 25000; 100000 µg/L) após 168 horas de exposição. Tais concentrações de exposição diferem do teste FET, pois escolhemos concentrações que tivessem semelhanças com a exposição aguda e crônica dos organismos-adultos, uma vez que a VLX se mostrou, relativamente, pouco tóxica às larvas; ii) em organismos adultos, em cinco concentrações subletais (1000; 25000; 50000; 75000; 100000 µg/L) por 96 horas; e em organismos adultos, em duas concentrações subletais (0,2 e 1000 µg/L) por 28 dias.

Os substratos acetiltiocolina (ASCh) e propioniltiocolina (PSCh) foram empregados para determinar a atividade da AChE. O aumento da absorvância, resultante do produto da conjugação entre tiocolina (um produto da degradação de ASCh ou PSCh) e ácido 5,5-ditiobis-2-nitrobenzóico (DTNB, Sigma-Aldrich) em PBS, foi medido no comprimento de onda de 414 nm, em intervalos de 20 s, durante 5 min, temperatura ambiente (Ellman et al, 1961). Para a determinação enzimática, 50 µl de amostra e 250 µl da solução de reação - acetilcolina ou propionilcolina (7,5 mM para ambos substratos) e DTNB (10 mM) - em PBS (0,1 M, pH 7,2) foram utilizados.

O substrato CDNB foi empregado para determinar a atividade da enzima glutathione S-transferase (GST), levando à formação de um tioéter (composto com estrutura e características químicas semelhantes aos éteres, diferenciando-se na composição molecular pela substituição do oxigênio pelo enxofre). A formação desse composto é monitorada pelo aumento da absorvância resultante do produto GST e CDNB, que foi medido no comprimento de onda de 340 nm, em intervalos de 20 segundos, durante 5 minutos (Ellman *et al.*, 1961). Para a determinação enzimática, 100 µl de amostra e 200 µl da solução de reação - glutathione (10 mM, Sigma-Aldrich) e CDNB (10 mM, Sigma-Aldrich) - em PBS (0,1 M, pH 6,5) foram utilizados.

Para medir a atividade da enzima lactato desidrogenase (LDH), foi utilizado um substrato de piruvato e nicotinamida adenina dinucleotídeo (NADH). A LDH reduz o substrato piruvato e oxida o NADH formando lactato e NAD⁺. A oxidação de NADH é medida pelo espectrofotômetro. Uma solução de 17 µg/L de NADH (Sigma-Aldrich) e outra solução de 107 µg/L de piruvato (Sigma-Aldrich) são preparadas usando Tris-NaCl (pH=7,2), e, armazenadas em temperatura ambiente e protegidas da luz. Para a determinação enzimática, a solução de reação (250 µl de solução de NADH/Tris-NaCl, somada a 40 µl Piruvato/Tris-NaCl), é adicionada em uma placa com 40 µl de amostra. A atividade catalítica é calculada a partir da velocidade de desaparecimento do NADH, que é proporcional à atividade de LDH nas

amostras, utilizando-se um comprimento de onda de 340 nm, em intervalos de 20 segundos, durante 5 minutos (Ellman *et al.*, 1961).

A atividade enzimática da AChE, GST e LDH foi medida em um espectrofotômetro (MultiSkan FC Microplate Photometer, Thermo Scientific, Ratastie, Finlândia) e expressa em milimol (mmol) de substrato hidrolisado por minuto por mg de proteína. A concentração de proteína das amostras foi determinada em quadruplicata, pelo método de Bradford (Bradford, 1976), a 595 nm, usando γ -globulina como padrão.

4.7. Teste de comportamento locomotor em larvas

A locomoção foi avaliada para um total de 48 embriões por tratamento (três réplicas de 16 embriões), incluindo o controle. Os embriões/larvas utilizados nesse teste foram expostos por 168 horas às mesmas concentrações de NTP usadas nos testes bioquímicos (0,006; 0,08; 1,58; 28,12 e 500 $\mu\text{g/L}$) e avaliados nos mesmos tempos (120, 144 e 168 h) em placas de 96 poços (um embrião por poço). Prévio à análise comportamental, larvas mortas ou que apresentaram anormalidades físicas foram descartadas. O movimento das larvas foi estudado usando o sistema de rastreamento Zebrabox (ZEB 478 Viewpoint Life Sciences, software version 3.22, Lyon, France), 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 intervalos de luz:escuro, como descrito anteriormente em Irons *et al.*, (2010). O teste consiste em aclimatar os embriões à luz, durante 5 min, seguido por um período de 10 min de escuridão e outro de luz por 5 min, a fim de verificar as diferenças de locomoção desses animais na luz e no escuro. Normalmente, as larvas de peixe-zebra apresentam menos locomoção durante os períodos de luz do que no escuro. Para cada réplica, os parâmetros comportamentais incluíram a distância total percorrida (DTP), o tempo total de nado (TTN) e a porcentagem de curtas e longa distâncias percorridas pelos organismos (um limiar de 5 mm/seg foi usado para separar pequenos e grandes movimentos).

4.8. Testes de genotoxicidade e mutagenicidade em peixes adultos

Os peixes utilizados para os testes de genotoxicidade e mutagenicidade foram os sobreviventes a exposição: i) à NTP no ensaio agudo (500; 600; 800; 1100 $\mu\text{g/L}$) e crônico (0,1 e 10 $\mu\text{g/L}$); ii) à VLX no ensaio agudo (1000, 25000, 50000, 75000 e 100000 $\mu\text{g/L}$) e crônico (0,2 e 1000 $\mu\text{g/L}$). De cada animal ($n = 10$) foi coletado sangue com seringa heparinizada seguindo os protocolos da Lei nº 11.794/2008 (Lei Auroca). Após a coleta, o sangue foi armazenado em microtubos contendo 500 μL de soro fetal bovino (SBF). Dessa mistura (SBF-sangue), 40 μL foram utilizados para realizar o teste do cometa e 50 μL foram empregados na

realização do esfregaço em lâminas histológicas para o teste do micronúcleo e anormalidades nucleares.

4.8.1. Teste do cometa

Para realização do teste do cometa, os procedimentos foram realizados de acordo com o protocolo descrito por Kosmehl *et al.*, (2008). Assim, 40 μ L da solução SBF-sangue foram misturados cuidadosamente com 120 μ L de agarose de baixo ponto de fusão (*lowmelting point agarose* - LMP 7%), previamente fundida e mantida em banho-maria a 37 °C, e aplicados em lâminas previamente forradas com agarose normal (1,5 %). As lamínulas foram colocadas sobre as lâminas e, em seguida, estas foram levadas à geladeira por 10 minutos, e, depois desse tempo, as lamínulas foram retiradas. Posteriormente, as lâminas foram imersas em solução de lise (NaCl 2,5 M, Na₂EDTA 100 mM, Tris 10 mM, Triton X-100 1% e DMSO 10%, pH 10,0), e, após duas horas, foram retiradas e colocadas em uma cuba de eletroforese horizontal, preenchida com solução de eletroforese alcalina (EDTA 0,2M, NaOH 10M, pH 13) a 4°C. As lâminas descansaram na cuba (dentro da geladeira) por 15 minutos, e, então, a fonte de eletroforese foi ligada e regulada para 20 Volts e 300 mA. Transcorridos 15 minutos em corrente eletroforética, as lâminas foram mergulhadas em solução de neutralização (Tris-HCl 0,4 M, pH 7,5) por cinco minutos na solução, cinco minutos descansando fora da solução (três vezes), e foram deixadas para secar a temperatura ambiente. Após secagem, as lâminas foram fixadas com etanol absoluto (cinco minutos) e guardadas na geladeira (4°C) até o momento da análise. Todas as etapas do teste foram realizadas no escuro, e, antes da análise, as lâminas foram renomeadas com códigos. Desse modo, a origem das amostras ficou desconhecida.

As lâminas foram coradas com brometo de etídio (20 μ g/mL), no mesmo dia da avaliação, e classificadas e analisadas 200 células por indivíduo no microscópio de fluorescência (ZEISS Axioskop 2-HAL 100, Göttingen, Alemanha). Foram analisadas, por experimento, duas lâminas de cada organismo, e cada grupo continha dez organismos. As lâminas foram analisadas, e as células observadas foram classificadas de acordo com o tipo de dano (0, 1, 2, 3 e 4), correspondentes ao tamanho e à proporção do nucleóide-cauda. A classificação se baseou nos autores Gontijo *et al.*, (2003) e Collins *et al.*, (2008).

4.8.2. Teste de micronúcleo e anormalidades nucleares

Os testes de micronúcleo e anormalidades nucleares foram realizados de acordo com os protocolos propostos por Fenech *et al.*, (2003) e Baršienė *et al.*, (2006). Apenas 50 μ L da mistura SBF-sangue foi utilizada nos esfregaços sanguíneos. Posteriormente, as lâminas foram secas à temperatura ambiente, fixadas com metanol absoluto (10 minutos), coradas com Giemsa

(20%) e analisadas no microscópio de luz (ZEISS Axioskop 2-HAL 100 Göttingen, Alemanha) com objetiva de 100x. Cada grupo, de tratamento, continha dez organismos e três mil células foram contadas e analisadas por indivíduo (realizando previamente o teste cego). As características propostas por Fenech *et al.*, (2003) foram adotadas para a identificação das seguintes anormalidades nucleares: micronúcleo, broto, célula binucleada, núcleo *blebbed*, núcleo lobado e núcleo *notched* (Figura 8).

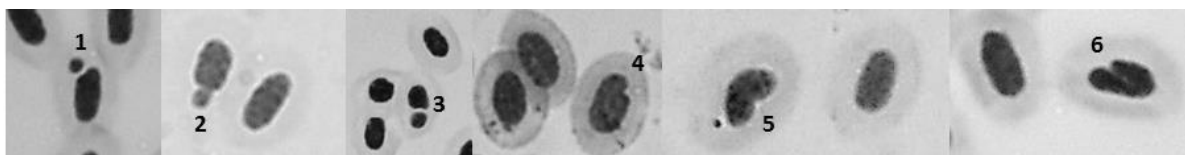


Figura 6. Fotografias de micrônúcleo e diferentes tipos de anormalidades nucleares em eritrócitos de sangue periférico de *Danio rerio*. (1) Micrônúcleo, (2) broto, (3) célula binucleada, (4) núcleo *blebbed*, (5) núcleo lobado e (6) núcleo *notched*. Fonte: Cáceres-Vélez *et al.*, (2013).

4.9. Análises de órgãos, histopatologia e morfometria em organismos adultos

Para a análise dos órgãos dos peixes, um total de dez animais, de cada concentração testada nos testes crônicos da NTP e VLX, foram eutanasiados em superdose de anestésico e fixados inteiros em solução de Davidson (33% etanol, 22% formol, 11,5% ácido acético glacial e 33,5% água destilada), desidratados em gradiente crescente de etanol, dos 70% ao absoluto, diafanizados em xilol e imersos em blocos de parafina para emblocagem. 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 animal, foram corados com hematoxilina & eosina (HE). Posteriormente, cinco campos aleatórios de cada órgão foram fotografados (AxioCam HRc, Carl Zeiss, Inc., NY, EUA) nas objetivas de 40x e 100x sob microscópio.

A análise da histologia dos peixes adultos, expostos de maneira crônica à NTP e VLX, foi feita de maneira distinta. Para os organismos expostos à NTP após a retirada das fotos, foi feita a análise histológica no fígado, brânquias e rins, levando em consideração modificações histopatológicas, classificadas em estágio de severidade, conforme indicado nas tabelas 1, 2 e 3, nas quais foram aplicadas dois índices para avaliação das alterações (Poleksić & Mitrović-Tutundžić, 1994).

Tabela 1. Alterações histológicas avaliadas no fígado.

a) Alterações nos hepatócitos	
Desarranjo dos cordões hepáticos	I
Perda ou atipia do contorno celular	I
Perda ou atipia do contorno 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	III

Tabela 2. Alterações histológicas avaliadas nas brânquias

ALTERAÇÕES HISTOLÓGICAS BRANQUIAIS	ESTÁGIO
a) Hipertrofia e hiperplasia do tecido respiratório	
Hipertrofia das células epiteliais	I
Adelgaçamento epitelial	I
Deslocamento ou elevação das células do epitélio	I
Ruptura epitelial	II
Hiperplasia das células epiteliais na base das lamelas secundárias	I
Hiperplasia das células epiteliais ao longo das lamelas secundárias	I
Fusão parcial (na base ou no topo) das lamelas secundárias	I
Fusão completa de algumas lamelas secundárias	I
Fusão completa de todas as lamelas secundárias	II
Degeneração celular	II
Infiltração de leucócitos no epitélio branquial	I
b) Alterações nas células mucosas e cloreto	
Hipertrofia e/ou hiperplasia das células mucosas	I
Presença de células mucosas nas lamelas secundárias	I
Hipertrofia e/ou hiperplasia das células cloreto	I
Presença de células cloreto nas lamelas secundárias	I
c) Alterações nos vasos sanguíneos lamelares	
Dilatação dos capilares	I
Desarranjo dos capilares	I
Congestão vascular	I
Hemorragia causada por ruptura de capilares	I
Aneurisma lamelar	II
d) Estágio terminal	
Fibrose	III
Necrose	III

Tabela 3. Alterações histológicas avaliadas no rim

ALTERAÇÕES HISTOLÓGICAS RENAIIS	ESTÁGIO
a) Alterações no tecido linfoide	
Perda do contorno celular ou contorno celular atípico	I
b) Alterações nos glomérulos e túbulos renais	
Degeneração hialina tubular leve	I
Degeneração hialina tubular severa	II
Hipertrofia das células tubulares	I
Desorganização tubular ou glomerular	I
Degeneração tubular ou glomerular	II
Aumento ou diminuição do espaço da cápsula de Bowman	I
Dilatação dos capilares glomerulares	I
Degeneração citoplasmática das células tubulares	II
Degeneração nuclear das células tubulares	II
Presença de túbulos em regeneração ou de “novos néfrons”	I
Presença de muitos grânulos PAS-positivos no epitélio tubular	I
Obstrução tubular	I
Aumento do lúmen tubular	I
Presença de tecido linfoide na cápsula de Bowman	II
Diminuição da frequência relativa de glomérulos	I
c) Alterações nos vasos sanguíneos	
Dilatação dos vasos sanguíneos	I
Hiperemia	II
Ruptura dos vasos sanguíneos	II
d) Estágio terminal	
Necrose	III

O primeiro índice utilizado foi o Índice de Alterações Histológicas (IAH), de acordo com dois critérios estabelecidos pelo método de Poleksić & Mitrović-Tutundžić (1994). O método consiste em uma classificação das alterações estruturais em peixes de água doce: o primeiro critério possibilita classificar as alterações quanto sua localização e tipo; e o segundo critério avaliar o grau de severidade das lesões. Posteriormente esses valores obtidos nos dois critérios passam por tratamento matemático em uma fórmula que permite quantificar essas alterações, e correlacionar a intensidade das alterações encontradas com a intensidade do contaminante ao qual o animal foi exposto. A fórmula para tal cálculo é:

$$I = \sum_{i=1}^{na} a_i + 10 \sum_{i=1}^{nb} b_i + 100 \sum_{i=1}^{nc} c_i$$

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.

Os valores de intensidade e a qual classificação eles se referem são:

Tabela 4. Valores de intensidade do contaminante com a respectiva classificação do órgão

Valor	Efeitos
0-10	Órgão funcionalmente normal
11-20	Órgão com alterações de leves a moderadas
21-50	Órgão com alterações de moderadas a graves
>100	Órgão com danos irreversíveis

Já para os organismos expostos à VLX, após a retirada das fotos, mensurações do intestino e das brânquias foram feitas nas lâminas histológicas utilizando régua milimetrada e um microscópio. Para o intestino, três parâmetros foram quantificados: altura do epitélio, altura da vilosidade intestinal e largura da vilosidade para cada campo fotografado (cinco campos aleatórios), e cinco mensurações aleatórias, utilizando régua milimetrada, foram feitas. A medição das brânquias foi feita a partir do tamanho dos filamentos das lamelas secundárias. Para avaliação morfométrica dos órgãos descritos, em cada um dos organismos, foram avaliados cinco cortes histológicos diferentes, e, para cada corte, cinco fotos de cada órgão (brânquia e intestino) foram tiradas, sendo que para cada foto cinco medições aleatórias foram realizadas, totalizando 125 medidas do tamanho da estrutura avaliada para cada animal (n=10) exposto. As mensurações foram feitas manualmente no programa ZEN (ZEN 2011 – Zeiss), e os dados para análise estatística foram avaliados utilizando a média das cinco mensurações de cada campo fotografado, em cinco cortes diferentes para cada organismo, totalizando 25 médias independentes por organismo, que resultam em 250 médias por grupo (controle e duas concentrações).

4.10. Teste comportamental em peixes adultos

As análises comportamentais de natação foram avaliadas em organismos provenientes do teste de toxicidade crônico, amostrados no último dia de exposição à NTP e à VLX.

Para proceder as análises comportamentais dos peixes expostos à NTP nove indivíduos de cada grupo tratado (0,1 e 10 µg/L) e do controle foram avaliados. O teste se iniciou pela análise do comportamento natatório em que: três organismos por tratamento foram transferidos para outro aquário com a mesma concentração da solução teste. Os aquários, retangulares medindo

10 cm x 20 cm x 13 cm (largura x comprimento x altura), foram divididos em três camadas (inferior: 0-4cm, médio: 4-8cm e superior: 8-13cm) e os animais foram filmados durante 10 minutos a fim de estimar o tempo que cada peixe gastou nas camadas do aquário. Uma câmera semiprofissional (DSLR) da marca Nikon foi utilizada nas filmagens e estava posicionada na parte frontal do aquário, em torno de 35 cm de distância, para captar a exploração de todo o objeto. Foram utilizados algoritmos escritos em MATLAB para extrair a frequência média de permanência, na camada superior, intermediária e inferior do aquário, de cada grupo de peixes. O algoritmo de análise consiste em um método de subtração, em que cada imagem gravada, durante o vídeo comportamental, é subtraída da imagem seguinte e os píxeis com valores positivos, após a subtração das duas imagens sequenciais, representam a posição de cada animal, variando no tempo. A posição dos animais, por camada, foi determinada também automaticamente pelas coordenadas nos eixos X e Y de cada imagem, para se determinar onde o grupo de animais estava em cada imagem do filme comportamental. Esse método permite a determinação da posição dos animais em relação às camadas do aquário durante o tempo de 10 minutos. A acurácia de tal método de análise foi verificada por inspeção visual dos filmes originais em comparação aos resultados obtidos com tal metodologia de quantificação descrita.

A avaliação do comportamento após a exposição à VLX, foi feita de forma distinta da descrita para NTP. Assim, para mensurar a atividade locomotora nos animais expostos à VLX, foi escolhido o teste de mergulho em tanque novo (Egan *et al.*, 2009; Fontana *et al.*, 2019). Para tanto, 16 peixes por grupo, tratado (0,2 e 1000 µg/L) e controle, foram individualmente filmados em aquários retangulares divididos igualmente em duas secções horizontais iguais (superior e inferior). A coluna d'água foi mantida em 7 cm de altura, produzindo um volume final de 2 litros. Uma câmera de vídeo (modelo Nikon DSLR) foi posicionada na parte frontal do aparato, em torno de 35 cm do aquário, para captar a exploração de todo o ambiente, e, em seguida, os peixes foram colocados individualmente em um novo aquário e seu comportamento foi imediatamente registrado por seis minutos. A atividade locomotora foi estimada pela distância percorrida, ângulo de giro absoluto e velocidade máxima, enquanto a exploração vertical foi avaliada pela latência para entrar no topo, número de transições para o topo e o tempo gasto na área do topo (Kalueff *et al.*, 2013). A análise comportamental foi realizada pelo software ANY-maze® (Stoelting CO, EUA).

4.11. Expressão gênica em larga escala (microarray) em peixes adultos

A análise de *microarray* foi realizada com 36 animais do teste de toxicidade crônica (12 por concentração testada de NTP, 0,1 e 10 µg/L, e de VLX, 0,2 e 1000 µg/L, mais o controle). Os

cérebros dos 12 animais, para cada concentração, foram distribuídos em quatro tubos de ensaios diferentes, totalizando 3 cérebros por tubo de ensaio. Tal procedimento nos permitiu fazer um *pool* cerebral para cada concentração testada, e dessa maneira, conseguir avaliar possíveis alterações na expressão gênica de um número maior de organismos, maximizar o poder estatístico e reduzir custos. Assim, cada amostra de RNA foi extraída a partir de um *pool* de três cérebros. Os cérebros de cada organismo foram dissecados, congelados em nitrogênio líquido e armazenados a -80°C até o isolamento do RNA. O RNA total foi obtido utilizando o protocolo padrão do Trizol combinado com o Pure Link RNA Mini Kit (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EUA). A concentração dos RNAs foi medida no NanoDrop ND-1000 Spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific, Wilmington, DE, EUA). Assim mesmo, a integridade do material foi avaliada com o equipamento Bioanalyzer 2100 (Agilent Technologies, Palo Alto, CA, EUA). Todos os RNAs apresentaram razão 260/280 entre 1,5-2 e RIN (*RNA integrity number*) $> 7,5$.

A análise transcriptômica foi realizada com a plataforma comercial Zebrafish Gene 1.0 ST Array (Affymetrix, Santa Clara, CA, EUA), iniciando-se com 100 ng de cada RNA extraído de um *pool* de cérebros. Os processos de transcrição reversa, amplificação e marcação (biotina) foram realizados com o kit WT Plus (Affymetrix) de acordo com as recomendações do fabricante. O material marcado foi hibridizado em chips específicos contendo as sondas (*oligoarrays*), e mantidos por 16 h a 45°C no Affymetrix GeneChip Hybridization Oven 645. Logo depois, os chips foram lavados/corados (streptoavidina), utilizando-se para tal o Affymetrix GeneChip Fluidics Station 450 e escaneados no Affymetrix GeneChip Scanner 7G.

O programa *Affymetrix Transcriptome Analysis Console* (TAC) v.4.0.1 foi utilizado para avaliar a qualidade dos *arrays* escaneados, para normalizar e sumarizar os dados brutos (arquivos CEL) através do algoritmo RMA (*Robust Multiarray Average*) e para obter os genes diferencialmente expressos entre o controle e as duas concentrações testadas. por fármaco analisado (Limma eBayes, *fold change* $> |1,5|$ ou $> |2,0|$ e $p < 0,05$). Posteriormente, esses genes foram submetidos a análises de ontologia (processos biológicos e funções moleculares) e enriquecimento de vias utilizando a versão 20197 do software online WEB-based Gene Set Analysis Toolkit (WebGestalt, <http://webgestalt.org/option.php>).

4.12. Análises estatísticas

Os dados quantitativos foram avaliados por meio de estatística paramétrica ou não paramétrica, de acordo com a distribuição de normalidade (Kolmogorov–Smirnov) e pelo teste de homogeneidade de variância (Levene's). Para os dados paramétricos, foi realizada a Análise

de Variância (ANOVA One Way), seguida pelo Teste de Dunnet. Os dados não paramétricos foram avaliados com o teste de Kruskal-Wallis, seguido pelo Teste de Dunn's (comparações múltiplas). A determinação das concentrações letais (CL_{50}) foi calculada utilizando função logística, weibull, sigmoide ou análise de Probit. O pacote estatístico Sigma Stat 3.5 software (SysStat, San Jose, California, USA) foi utilizado para analisar os dados obtidos no presente estudo e todas as análises estatísticas tiveram como base o nível de significância de $p < 0,05$.

5. RESULTADOS

5.1. Estudo da Nortriptilina

5.1.1. Estabilidade da NTP

Após as análises do HPLC, a curva padrão para a análise da estabilidade da NTP foi calculada. A relação entre a concentração de NTP, nas amostras, e a área sobre os picos do cromatograma está mostrada na Figura 7.

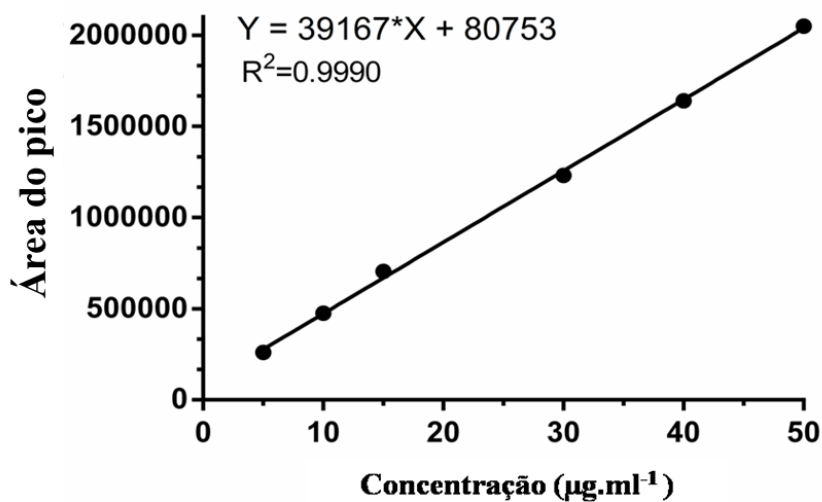


Figura 7. Curva padrão mostrando a relação entre a concentração de NTP e a intensidade do pico dos cromatogramas.

As concentrações e porcentagem de recuperação das soluções estoque estão mostradas na Tabela 5. Os dados obtidos indicam que a molécula de NTP é bastante estável nas condições avaliadas, inclusive após sete dias. Para uma concentração inicial de 5000 µg/L de NTP foi possível recuperar quase 72% da droga após sete dias.

Tabela 5. Concentrações de NTP e porcentagem de recuperação das soluções estoque

Tempo (dias)	Condições de cultivo*	
	Concentração (µg/L)	% de recuperação
Dia 0	4592 (81)	100
Dia 1	4724 (15)	102,87
Dia 2	4182 (101)	91,08
Dia 3	4182 (101)	91,08
Dia 4	3823 (99)	83,25
Dia 5	3570 (96)	77,74
Dia 6	3567 (99)	77,69
Dia 7	3300 (13)	71,86

Em parênteses estão representados os valores de desvio padrão * Condições de cultivo: 26.0 ± 1°C, fotoperíodo 14 h luz: 10 h escuro, intensidade da luz: 32 lux.

A verificação da estabilidade do fármaco na água é importante porque permite estimar melhor o momento certo para trocar a água dos aquários durante os testes de toxicidade, garantindo assim que os organismos-teste estejam em contato com concentrações adequadas da droga durante todo o experimento, estabelecendo um sistema semi-estático de exposição.

5.1.2. Avaliação do efeito tóxico da NTP em embriões/larvas de peixes-zebra

5.1.2.1. *Desenvolvimento embrio-larval*

Durante o FET, os embriões foram observados diariamente para avaliar possíveis efeitos nocivos da NTP, que incluem, no geral, mortalidade, atraso da eclosão, alterações do equilíbrio e edemas corporais. A Figura 8 mostra um panorama geral da toxicidade de NTP no desenvolvimento embrio-larval.

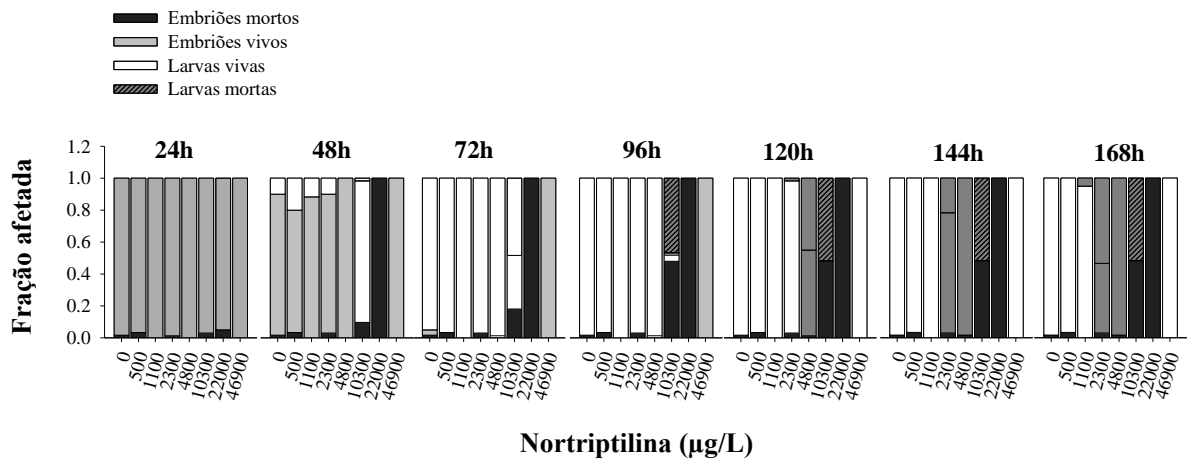


Figura 8. Panorama geral do efeito tóxico de sete diferentes concentrações de NTP (500; 1100; 2300; 4800; 10300; 22000; 46900 µg/L) no desenvolvimento embrio-larval de *Danio rerio*, após 168 horas de exposição.

As duas maiores concentrações de NTP analisadas (22000 e 46900 µg/L) foram tóxicas aos embriões em todos os tempos de análise, impossibilitando seu desenvolvimento para larvas. Por outro lado, nas demais concentrações uma toxicidade progressiva foi observada, ou seja, a mortalidade foi maior com o aumento do tempo de exposição. Enquanto algumas larvas na concentração de 2300 µg/L sobrevivem ao final do sétimo dia, todas as larvas presentes nas concentrações de 4800 e 10300 µg/L morrem em até 144 horas. Apenas as duas menores concentrações (500 e 1100 µg/L) apresentaram um número desprezível de embriões ou larvas mortas até o final do experimento.

5.1.2.2. *Mortalidade*

Para determinar a CL_{50} da NTP, a mortalidade progressiva dos embriões e larvas foi quantificada ao longo das 168 horas de duração do experimento. A Figura 9 estima os valores para cada tempo de análise: às 24 horas, a CL_{50} foi de 30369 µg/L; às 48 horas, 13853 µg/L; às 72 horas, 13141 µg/L; às 96 horas, 7970 µg/L; às 120 horas, 4920 µg/L; às 144 horas, 3000 µg/L; e às 168 horas, 2190 µg/L. Os resultados de CL_{50} revelam que os embriões se tornam mais sensíveis à NTP à medida que o tempo de exposição aumenta.

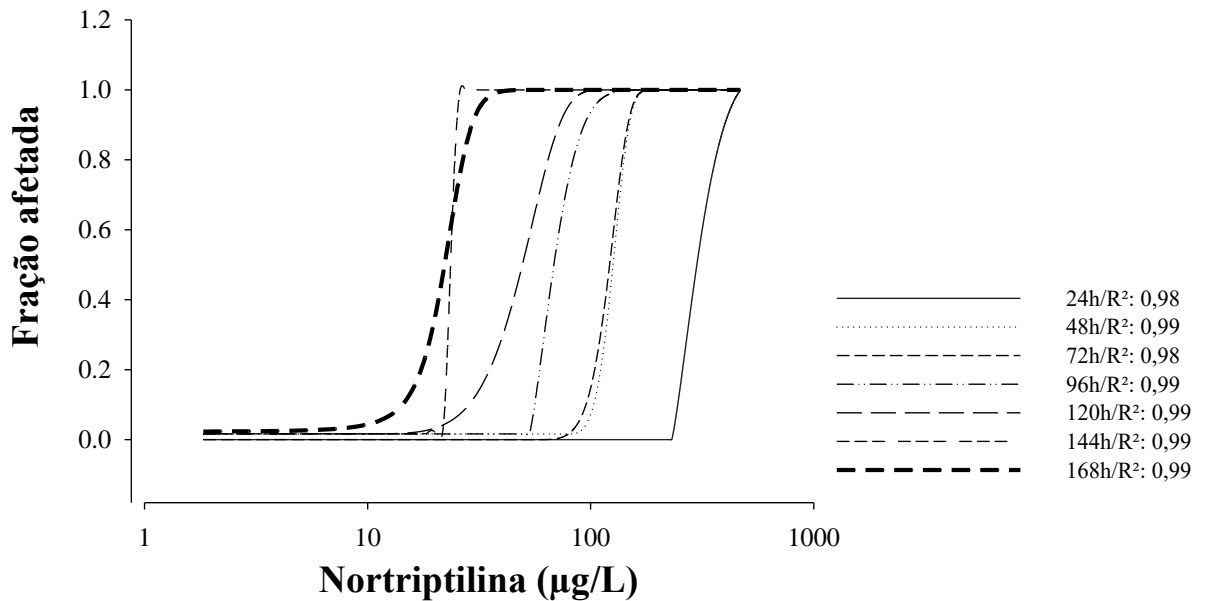


Figura 9. CL₅₀ da NTP em embriões/larvas de peixes-zebra, após exposição de 168 horas. A linha pontilhada vermelha indica 50% dos indivíduos afetados. Curvas feitas por análises de regressão em que os valores de R² correspondem ao coeficiente de determinação da curva.

5.1.2.3. Alterações no equilíbrio

Na Figura 10, está apresentada a porcentagem de organismos, expostos às diferentes concentrações de NTP, com alterações comportamentais nos tempos de 96, 120, 144 e 168 horas. Para os três dias iniciais do experimento, alterações no equilíbrio não são quantificáveis devido à idade das larvas, razão pela qual não consta no gráfico. As três maiores concentrações também não estão no gráfico devido à elevada mortalidade.

A exposição à NTP alterou o equilíbrio das larvas: após 96 horas de exposição às concentrações de 1100; 2300; 4800 µg/L ($p < 0,001$); após 144 horas de exposição às concentrações de 500, 1100, 2300 µg/L ($p < 0,001$); e após 168 horas de exposição à concentração de 1100 µg/L de NTP ($p < 0,05$).

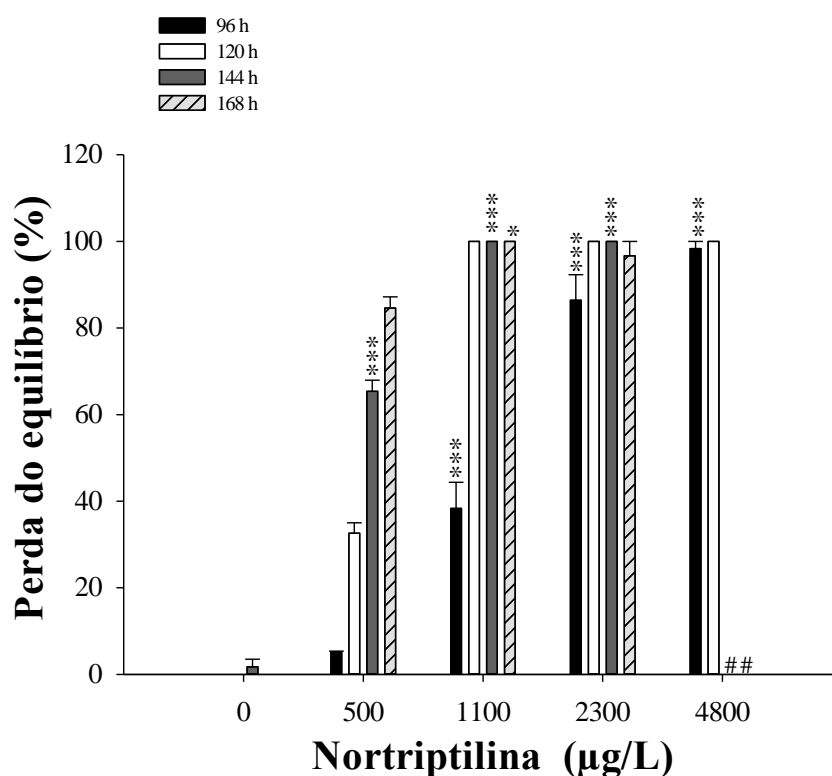


Figura 10. Porcentagem de indivíduos com equilíbrio afetado pela NTP. Valores médios \pm erro padrão. (*) $p < 0,05$ e (***) $p < 0,001$ em relação ao grupo controle. #: morte de todos os indivíduos.

Uma análise de regressão foi realizada para que pudéssemos estabelecer os valores de efeito de perda do equilíbrio à 50% das larvas expostas (EC_{50}) à NTP, após 96, 120, 144 e 168 horas de exposição. Esses valores estão apresentados na tabela 6.

Tabela 6. Estimativa dos valores de EC_{50} para a perda de equilíbrio das larvas após exposição por 168 horas à NTP (valores \pm erro padrão). ^a: não mensurado

Tempo (h)	EC_{50}	R^2
96	1247 (81,3)	0.98
120	552 (0 ^a)	0.99
144	432,2 (13,8)	0.99
168	390,3 (0 ^a)	0.99

Ao comparar os dados de mortalidade e equilíbrio, é possível perceber que, embora o fármaco não induza à morte das larvas nas concentrações menores, é capaz de alterar o equilíbrio delas.

5.1.2.4. Alterações na frequência cardíaca

Alterações na frequência cardíaca foram quantificadas após 48 horas de exposição à NTP, uma vez que, nesse estágio de desenvolvimento, a perceptibilidade dos batimentos cardíacos do organismo é maior. A Figura 11 apresenta os batimentos cardíacos das larvas, medidos 48 h após o início do teste. Apenas as larvas expostas a 10300 $\mu\text{g/L}$ de NTP diminuíram significativamente seus batimentos cardíacos em relação aos controles ($p < 0,05$). As três maiores concentrações não estão no gráfico devido às altas taxas de mortalidade.

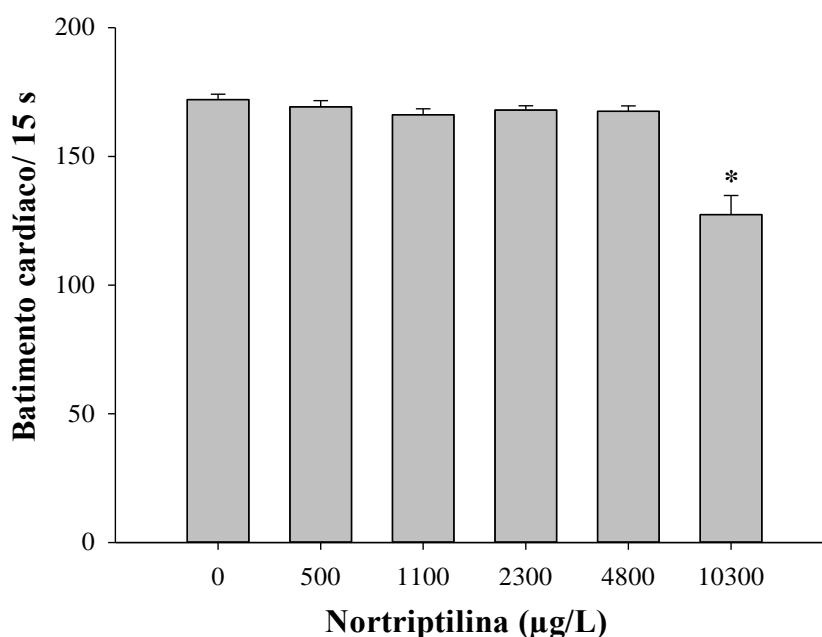


Figura 11. Frequência cardíaca das larvas expostas por 48 horas às concentrações de 500; 1100; 2300; 4800 e 10300 $\mu\text{g/L}$ de NTP. Valores médios \pm erro padrão. (*) $p < 0,05$, em relação ao grupo controle.

Comparando os dados de mortalidade e batimento cardíaco, foi possível constatar que a alteração cardíaca precedeu a morte das larvas expostas a 10300 $\mu\text{g/L}$ de NTP. Nessa concentração, os organismos começaram a morrer a partir de 72 h, atingindo 100% de mortalidade após às 96 h de exposição.

5.1.2.5. Outras alterações no desenvolvimento embrio-larval

Além de alterações no equilíbrio, eclosão e frequência cardíaca; outras alterações importantes no desenvolvimento também foram monitoradas nas 168 h de duração do teste: ausência de formação de somitos, malformação craniofacial, microftalmia, pigmentação, malformação do otólito, edema cardíaco e malformação da cauda. Na Tabela 7, estão representadas apenas as alterações com frequência maior que dez por cento nas triplicatas. A

maior concentração do teste (469000 $\mu\text{g/L}$) foi excluída da tabela, pois os indivíduos não sobreviveram.

A malformação da cauda e edema cardíaco foram identificados em todos os grupos tratados e em quase todos os tempos de análise, a exceção do tempo de 96 h. Além disso, no tempo de 24 h e na concentração de 22000 $\mu\text{g/L}$, vinte e seis por cento dos embriões apresentaram um atraso no desenvolvimento. Apesar dessas diferenças encontradas nos grupos tratados com a NTP, em relação aos controles, nenhuma delas foi estatisticamente significativa. Entretanto, esses dados de alterações no desenvolvimento são importantes uma vez que revelam um padrão: antecedem a mortalidade. Comparando os dados de malformação da cauda e edema cardíaco com os de mortalidade (Figura 8), foi possível inferir que as larvas morreram dessas alterações de desenvolvimento, as quais impossibilitaram sua sobrevivência.

Tabela 7. Alterações no desenvolvimento (%) em embriões expostos à NTP durante, 24, 48, 72, 120, 144 e 168 horas. Valores médios \pm erro padrão.

Alterações no desenvolvimento (%) \pm Erro Padrão															
Nortriptilina ($\mu\text{g/L}$)		Tempo (h)													
		24			48			72		120		144		168	
		Má formação cauda	Edema	Atraso desenvolvimento	Má formação cauda	Edema	Má formação cauda	Edema	Má formação cauda	Edema	Má formação cauda	Edema	Má formação cauda	Edema	
Controle	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
500	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
1100	0	0	0	0	0	0	0	1,6 \pm 1,6	1,6 \pm 1,6	1,6 \pm 1,6	1,6 \pm 1,6	1,6 \pm 1,6	1,6 \pm 1,6		
2300	0	0	0	0	0	0	0	6,5 \pm 3,6	9,2 \pm 6,3	23,2 \pm 6	17,6 \pm 12,9	23,2 \pm 6	17,6 \pm 12,9		
4800	0	0	0	0	0	0	0	#	#	#	#	#	#		
10300	0	0	0	21,3 \pm 16	9,6 \pm 7,2	54,7 \pm 14,8	9,6 \pm 7,2	#	#	#	#	#	#		
22000	1,6 \pm 1,6	19,3 \pm 3,5	24 \pm 9,2	#	#	#	#	#	#	#	#	#	#		

#: morte dos indivíduos

**Figura 12.** Fotos das larvas após 72h de exposição: 1) organismo pertence ao grupo controle e com desenvolvimento normal; 2) organismo pertencente ao grupo exposto a 4,8 mg/L de NTP. É possível identificar: edema cardíaco(a), curvatura anormal da cauda(b), e degeneração da cauda(c).

5.1.2.6. Biomarcadores enzimáticos

5.1.2.6.1. Atividade enzimática da AChE

Nos três tempos analisados (120, 144 e 168 h), há tendência de diminuição da atividade da AChE nas larvas expostas à NTP. A maior concentração testada (500 µg/L) reduziu significativamente ($p < 0,001$) a atividade da AChE nos três tempos avaliados (Figura 13). Em 168 h também houve redução significativa ($p < 0,001$) da atividade da AChE nas concentrações de 0,088 e 1,58 µg/L (Figura 13.C), indicando que, concentrações baixas, em um tempo de exposição maior, são capazes de alterar esse parâmetro.

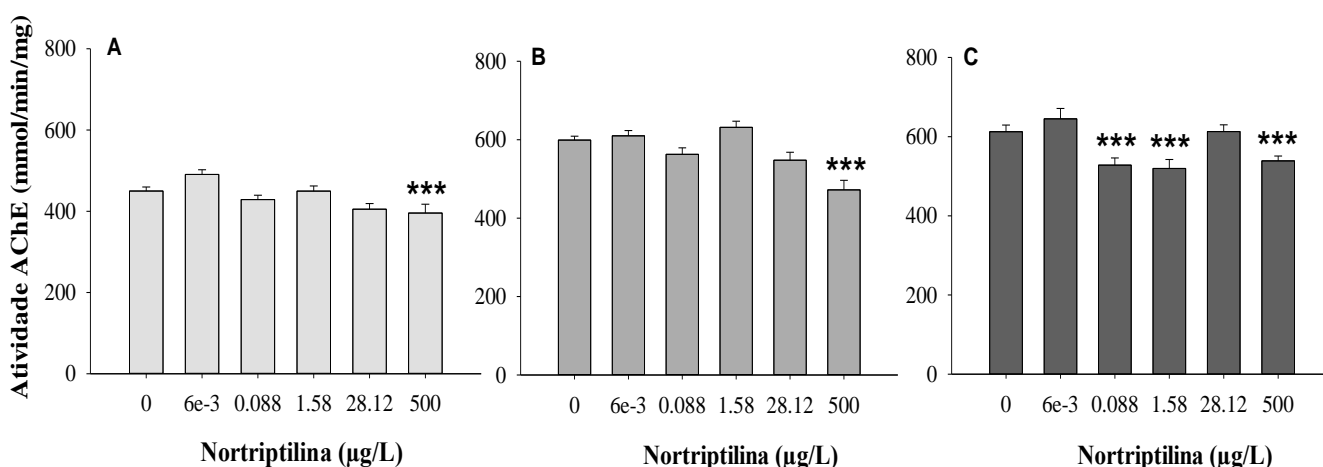


Figura 13. Efeitos da NTP sobre a atividade da AChE, em larvas, após 120, 144 e 168 h de exposição. Valores médios \pm erro padrão. A: 120 h de exposição; B: 144 h de exposição; C: 168 h de exposição; (***) $p < 0,001$, em relação ao grupo controle.

5.1.2.7. *Teste de comportamento locomotor*

As concentrações e os tempos de análise foram os mesmos usados no teste bioquímico. Os resultados do ZebraBox mostraram que a NTP induziu mudanças na atividade de natação das larvas. Para demonstrar os efeitos da NTP no comportamento locomotor, foram escolhidos os períodos em que as larvas permaneceram no escuro, uma vez que são nessas condições que há maior movimentação dos organismos. Os efeitos mais pronunciados e significativos foram na diminuição da distância total percorrida (DTP, Figura 14.A-C), especialmente nas maiores concentrações de exposição. Há tendência de redução da DTP quanto maior for a concentração de NTP. O tempo total de nado (TTN) das larvas também foi afetado pela NTP (Figura 14.D-F). Em 120 h de exposição, houve redução ($p < 0,05$) na maior concentração; no tempo de 144 h, as concentrações de 0,006 e 28,12 reduziram o TTN ($p < 0,05$) e, em 168 h após a exposição, a concentração de 28,12 µg/L continuou com o TTN reduzido ($p < 0,05$) em relação ao controle.

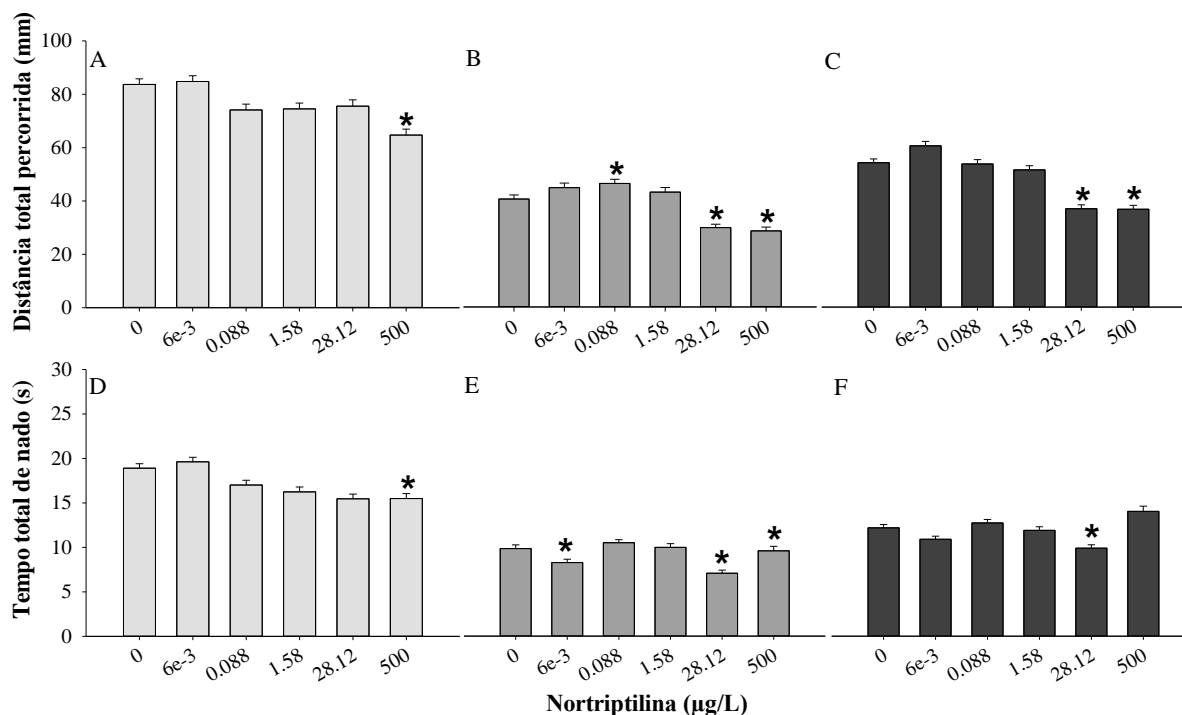


Figura 14. Distância total percorrida (DTP) das larvas e tempo total de nado (TTN) das larvas, no período de escuro, após exposição com NTP: (A) DTP após 120 h; (B) DTP após 144 h; (C) DTP após 168 h; (D) TTN após 120 h; (E) TTN após 144 h; (F) TTN após 168 h. Valores médios \pm erro padrão. (*) $p < 0,05$, em relação ao grupo controle.

A porcentagem de distâncias curtas (Figura 15.A-C) e longas (Figura 15.D-F) percorridas pelos animais durante a fase escura também apresentou alterações significativas após exposição à NTP. Em todos os três tempos analisados, ao menos uma concentração baixa (0,006 e/ou 0,088 $\mu\text{g/L}$) e uma concentração mais elevada (28,12 e/ou 500 $\mu\text{g/L}$) foram capazes de alterar as distâncias percorridas em relação ao grupo controle ($p < 0,05$) (Figura 15). Esses dados indicam que a exposição à NTP, nos três tempos analisados, é capaz de alterar o padrão locomotor das larvas em baixas e altas concentrações do fármaco.

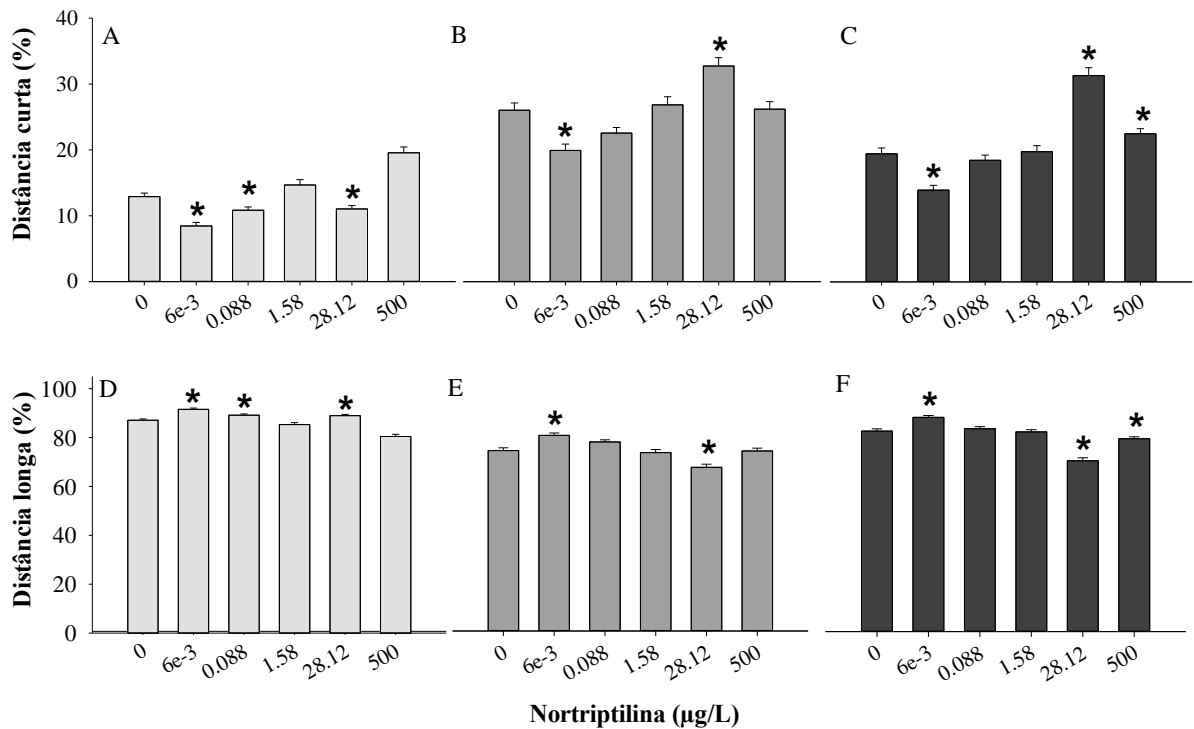


Figura 15. Porcentagem de distâncias curtas e longas percorridas pelas larvas, no período de escuro, após exposição com NTP: (A) Distância curta após 120 h; (B) Distância curta após 144 h; (C) Distância curta após 168 h; (D) Distância longa após 120 h; (E) Distância longa após 144 h; (F) Distância longa após 168 h. Valores médios \pm erro padrão. (*) $p < 0,05$, em relação ao grupo controle.

5.1.3. Avaliação do efeito tóxico agudo da NTP em peixes-zebra adultos

5.1.3.1. *Mortalidade*

Durante as 96 h de exposição a sete diferentes concentrações de NTP (500, 600, 800, 1100; 1400; 1800 e 2000 $\mu\text{g/L}$), os peixes foram observados diariamente para quantificação da mortalidade. A Figura 16 mostra a CL_{50} da NTP em peixes-zebra adultos: aproximadamente 1100 $\mu\text{g/L}$ (análise de Probit). Este valor de CL_{50} revela que os indivíduos adultos são mais sensíveis à NTP do que os embriões/larvas.

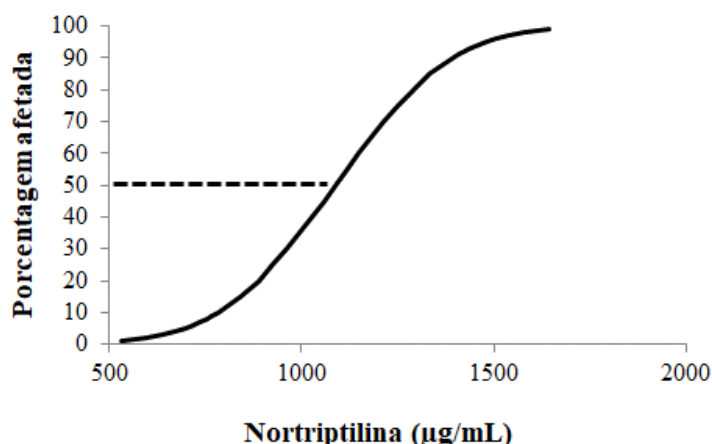


Figura 16. CL₅₀ da NTP em peixes-zebra adultos, após 96 h de exposição. A linha pontilhada indica 50% dos indivíduos afetados.

5.1.3.2. *Biomarcadores enzimáticos*

5.1.3.2.1. Atividade enzimática da AChE

A exposição à NTP causou redução estatisticamente significativa ($p < 0,05$) da atividade da AChE na cabeça de peixes submetidos às concentrações de 500; 600; 800; 1100 µg/L (Figura 17). Nas três maiores concentrações (1400; 1800 e 2000 µg/L) do teste agudo restaram poucos ou nenhum peixe sobrevivente e por essa razão não foram utilizados para detecção da atividade de AChE. Além disso, foi possível observar tendência de maior inibição da atividade da AChE, quanto maior a concentração de NTP. Já nos músculos, apenas a maior concentração da NTP (1100 µg/L) reduziu de maneira significativa ($p < 0,01$) a atividade da AChE (Figura 17), no entanto, também foi possível observar tendência de redução da atividade da AChE nas outras concentrações, embora não estatisticamente significativas.

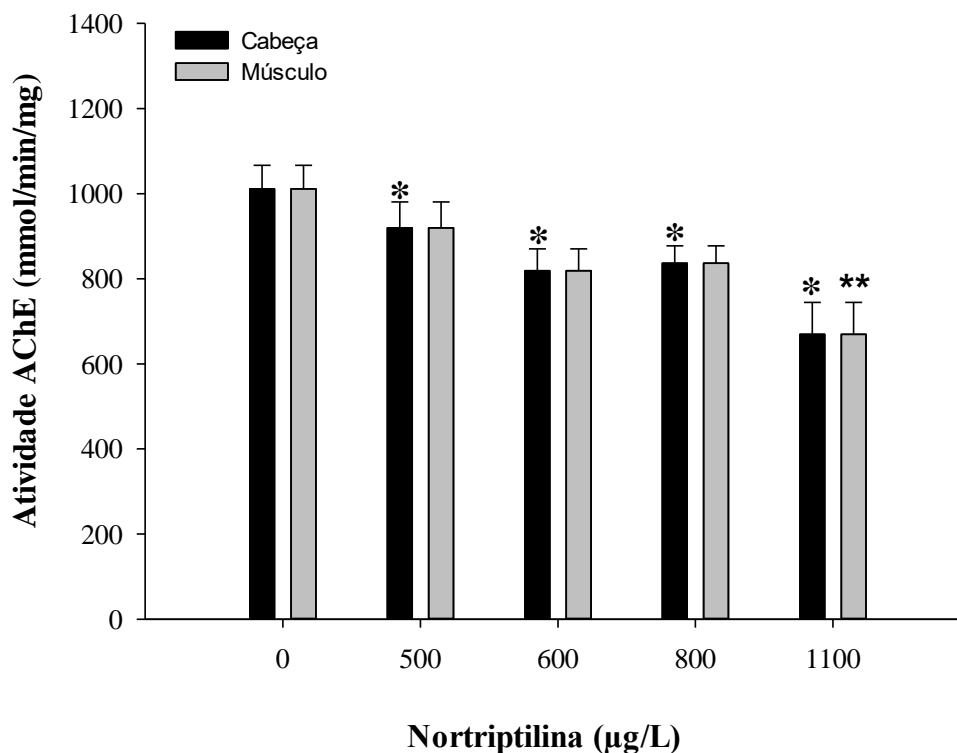


Figura 17. Efeitos da exposição às concentrações 500, 600, 800 e 1100 µg/L de NTP sobre a atividade da AChE, em peixes-zebra adultos, após 96 h de exposição. Valores médios ± erro padrão. (*) $p < 0,05$, em relação ao grupo controle. (**) $p < 0,01$, em relação ao grupo controle.

5.1.3.3. *Biomarcadores de genotoxicidade*

Os testes de genotoxicidade (cometa e micronúcleo) foram feitos com sangue dos peixes expostos às concentrações de 500, 600, 800 e 1100 µg/L de NTP após 96 horas, uma vez que nas três maiores concentrações (1400; 1800 e 2000 µg/L) do teste agudo houve pouco ou nenhum peixe sobrevivente.

5.1.3.3.1. *Teste do cometa*

Na Tabela 8 estão representadas as porcentagens de fragmentação do DNA nos eritrócitos dos peixes adultos, após 96 h de exposição com NTP. As porcentagens de fragmentação não mostram diferenças estatisticamente significativas indicando que a NTP não é genotóxica, nas concentrações analisadas.

Tabela 8. Porcentagem de DNA na cauda de eritrócitos periféricos de peixes após exposição aguda à NTP. Valores médios \pm erro padrão.

Nortriptilina ($\mu\text{g/L}$)	DNA na cauda (%) \pm Erro Padrão
Controle	4,7 \pm 0,36
500	5,7 \pm 0,36
600	4,7 \pm 0,33
800	6,5 \pm 0,19
1100	4,8 \pm 0,56

5.1.3.3.2. Teste do micronúcleo e anormalidades nucleares

A Tabela 9 representa as células com micronúcleos e anormalidades nucleares que foram observadas em eritrócitos de peixes do grupo controle e daqueles expostos a diferentes concentrações de NTP. Assim como no teste do cometa, não foram observadas diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$), indicando que a exposição aguda da NTP não é capaz de induzir genotoxicidade.

Tabela 9. Micronúcleos e anormalidades nucleares observados em eritrócitos de sangue periférico de peixes após exposição aguda à NTP. Valores médios \pm erro padrão.

Nortriptilina ($\mu\text{g/L}$)	Alteração nuclear (%) \pm Erro padrão					
	Micronúcleo	Broto	Binucleada	<i>Blebbled</i>	Lobed	<i>Notched</i>
Controle	0,023 \pm 0,009	0,023 \pm 0,009	0,043 \pm 0,02	0,033 \pm 0,01	0,017 \pm 0,006	0,047 \pm 0,01
500	0,019 \pm 0,008	0,015 \pm 0,008	0,007 \pm 0,005	0,026 \pm 0,01	0,015 \pm 0,01	0,074 \pm 0,03
600	0,067 \pm 0,03	0,057 \pm 0,01	0,017 \pm 0,007	0,42 \pm 0,11	0,03 \pm 0,01	0,07 \pm 0,032
800	0,048 \pm 0,01	0,059 \pm 0,01	0,004 \pm 0,004	0,49 \pm 0,13	0,04 \pm 0,02	0,03 \pm 0,007
1100	0,015 \pm 0,008	0,052 \pm 0,01	0,041 \pm 0,037	0,59 \pm 0,2	0,04 \pm 0,02	0,104 \pm 0,035

5.1.4. Avaliação do efeito tóxico crônico da NTP em peixes-zebra adultos

5.1.4.1. Biomarcadores enzimáticos

5.1.4.1.1. Atividade enzimática da AChE

Na exposição crônica, as concentrações bem baixas de NTP não foram capazes de alterar a atividade da AChE, tanto nas amostras provenientes da cabeça como dos músculos dos animais (Figura 18).

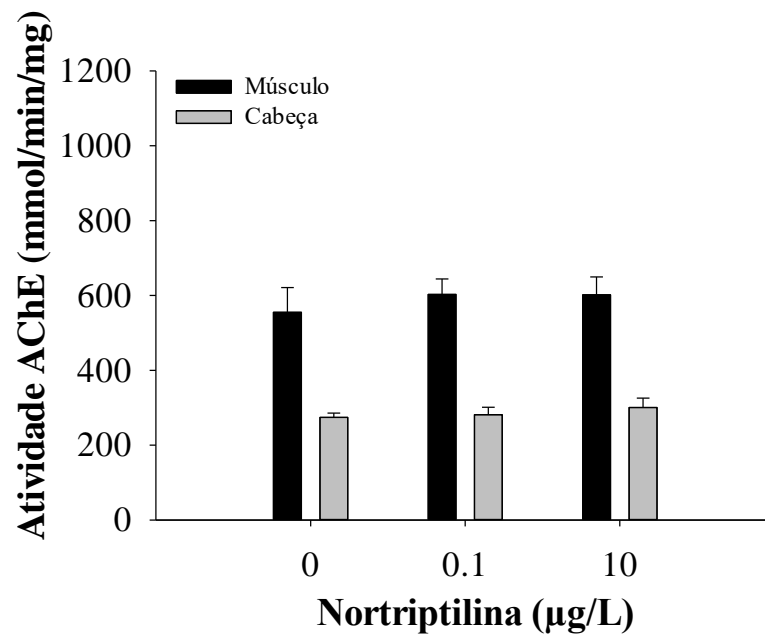


Figura 18. Efeitos da exposição às concentrações de 0,1 e 10 µg/L de NTP sobre a atividade da AChE, em peixes-zebra adultos, após 28 dias de exposição. Valores médios ± erro padrão.

5.1.4.2. *Biomarcadores de genotoxicidade*

5.1.4.2.1. Teste do cometa

Na Tabela 10 estão representadas as porcentagens de fragmentação do DNA nas células sanguíneas de peixes expostos de maneira crônica à NTP (28 dias), e esta porcentagem está dividida em dano moderado (DM) e dano elevado (DE). As porcentagens de fragmentação e a falta de diferenças estatisticamente significativas indicam que a NTP não é genotóxica. Este resultado já era esperado, tendo em vista que a NTP não foi genotóxica no teste agudo com concentrações mais elevadas.

Tabela 10. Porcentagem de DNA na cauda de eritrócitos periféricos de peixes após exposição crônica à NTP. Valores médios \pm erro padrão.

Nortriptilina ($\mu\text{g/L}$)	DNA na cauda (%) \pm Erro Padrão	
	DM	DE
Controle	8,05 \pm 1,15	6,25 \pm 2,1
0,1	6,52 \pm 1,05	10,2 \pm 1,9
10	7,22 \pm 1,02	7,56 \pm 2,28

5.1.4.2.2. Teste do micronúcleo e anormalidades nucleares

A Tabela 11 apresenta as anormalidades nucleares e células com micronúcleos observados em eritrócitos de peixes adultos dos grupos controle e expostos cronicamente à NTP. Como no teste do cometa, longas exposições de NTP a baixas concentrações não foram mutagênicas.

Tabela 11. Micronúcleos e anormalidades nucleares observados em eritrócitos de sangue periférico de peixes após exposição crônica à NTP. Valores médios \pm erro padrão.

Nortriptilina ($\mu\text{g/L}$)	Anormalidades nucleares (%) \pm Erro padrão					
	Micronúcleo	Broto	Binucleada	<i>Blebbled</i>	Lobed	<i>Notched</i>
Controle	0	0,01 \pm 0,005	0	0,04 \pm 0,02	0,003 \pm 0,003	0,017 \pm 0,013
0,1	0,007 \pm 0,004	0,007 \pm 0,004	0	0,2 \pm 0,07	0,01 \pm 0,01	0,05 \pm 0,02
10	0,007 \pm 0,004	0,007 \pm 0,004	0	0,07 \pm 0,01	0	0,03 \pm 0,01

5.1.4.3. Análise histopatológicas do fígado, rins e brânquias

As análises do fígado, rim e brânquias em *Danio rerio*, após exposição à NTP (0,1 e 10 $\mu\text{g/L}$), por 28 dias, não mostraram alterações significativas nos órgãos, indicando que essa exposição não foi capaz de causar alterações histopatológicas nesses órgãos dos animais expostos em comparação com o grupo controle, como determinado pelo índice de alterações histológicas na tabela 12 (fígado), tabela 13 (rim) e tabela 14 (brânquias).

Tabela 12. Alterações histopatológicas hepáticas avaliadas em *Danio rerio*, após exposição à nortriptilina (0,1 e 10 µg/L), por 28 dias, e seus respectivos índices de alterações histológicas. (A) representa ausência e (P) representa presença de alteração.

Alterações histológicas hepáticas	Estágio	Controle	10 µg/L	0,1 µg/L
Desarranjo dos cordões hepáticos	I	A	A	A
Perda ou atipia do contorno celular	I	A	A	A
Perda ou atipia do contorno nuclear	II	A	A	A
Atrofia nuclear	I	A	A	A
Intensa vacuolização citoplasmática	I	A	A	A
Vacuolização nuclear	II	A	A	A
Diminuição da frequência relativa de ocorrência de núcleos	I	A	A	A
Degeneração citoplasmática	I	A	A	A
Degeneração nuclear	II	A	A	A
Rompimento celular	II	A	A	A
Diminuição do glicogênio	I	A	A	A
Estagnação biliar	I	A	A	A
Aumento da frequência relativa de vasos sanguíneos	I	A	A	A
Hiperemia	I	A	A	A
Ruptura de vasos	II	A	A	A
Aumento do volume relativo dos vasos	I	A	A	A
Degeneração dos canalículos biliares	I	A	A	A
Necrose	II	A	A	A
Desarranjo dos cordões hepáticos	II	A	A	A
Perda ou atipia do contorno celular	III	A	A	A
Índice de alterações histológicas		0	0	0

Tabela 13. Alterações histológicas renais avaliadas em *Danio rerio*, após exposição à nortriptilina (0,1 e 10 µg/L), por 28 dias, e seus respectivos índices de alterações histológicas. (A) representa ausência e (P) representa presença de alteração

Alterações histológicas renais	Estágio	Controle	10 µg/L	0,1 µg/L
Perda do contorno celular ou contorno celular atípico	I	A	A	A
Degeneração hialina tubular leve	I	A	A	A
Degeneração hialina tubular severa	II	A	A	A
Hipertrofia das células tubulares	I	A	A	A
Desorganização tubular ou glomerular	I	A	A	A
Degeneração tubular ou glomerular	II	A	A	A
Aumento ou diminuição do espaço da cápsula de Bowman	I	A	A	A
Dilatação dos capilares glomerulares	I	A	A	A
Degeneração citoplasmática das células tubulares	II	A	A	A
Degeneração nuclear das células tubulares	II	A	A	A
Presença de túbulos em regeneração ou de “novos néfrons”	I	A	A	A
Presença de muitos grânulos PAS-positivos no epitélio tubular	I	A	A	A
Obstrução tubular	I	A	A	A
Aumento do lúmen tubular	I	A	A	A
Presença de tecido linfóide na cápsula de Bowman	II	A	A	A
Diminuição da frequência relativa de glomérulos	I	A	A	A
Dilatação dos vasos sanguíneos	I	A	A	A
Hiperemia	II	A	A	A
Ruptura dos vasos sanguíneos	II	A	A	A
Necrose	III	A	A	A
Índice de alterações histológicas		0	0	0

Tabela 14. Alterações histológicas branquiais avaliadas nas brânquias de *Danio rerio*, após exposição à nortriptilina (0,1 e 10 µg/L), por 28 dias, e seus respectivos índices de alterações histológicas. (A) representa ausência e (P) representa presença de alteração

Alterações histológicas branquiais	Estágio	Controle	10 µg/L	0,1 µg/L
Hipertrofia das células epiteliais	I	A	A	A
Adelgamento epitelial	I	A	A	A
Deslocamento ou elevação das células do epitélio	I	A	A	A
Ruptura epitelial	II	A	A	A
Hiperplasia das células epiteliais na base/lamelas secundárias	I	A	A	A
Hiperplasia das células epiteliais ao longo/lamelas secundárias	I	A	A	A
Fusão parcial (na base ou no topo) das lamelas secundárias	I	A	A	A
Fusão completa de algumas lamelas secundárias	I	A	A	A
Fusão completa de todas as lamelas secundárias	II	A	A	A
Degeneração celular	II	A	A	A
Infiltração de leucócitos no epitélio branquial	I	A	A	A
Hipertrofia e/ou hiperplasia das células mucosas	I	A	A	A
Presença de células mucosas nas lamelas secundárias	I	A	A	A
Hipertrofia e/ou hiperplasia das células cloreto	I	A	A	A
Presença de células cloreto nas lamelas secundárias	I	A	A	A
Dilatação dos capilares	I	A	A	A
Desarranjo dos capilares	I	A	A	A
Congestão vascular	I	A	A	A
Hemorragia causada por ruptura de capilares	I	A	A	A
Aneurisma lamelar	II	A	A	A
Fibrose	III	A	A	A
Necrose	III	A	A	A
Índice de alterações histológicas		0	0	0

A figura 19 mostra fotos dos órgãos analisados em nossos testes, nas duas concentrações testadas e no grupo controle, ilustrando e resumindo o que foi encontrado em todas as análises histopatológicas: órgãos, com células e estruturas íntegras.

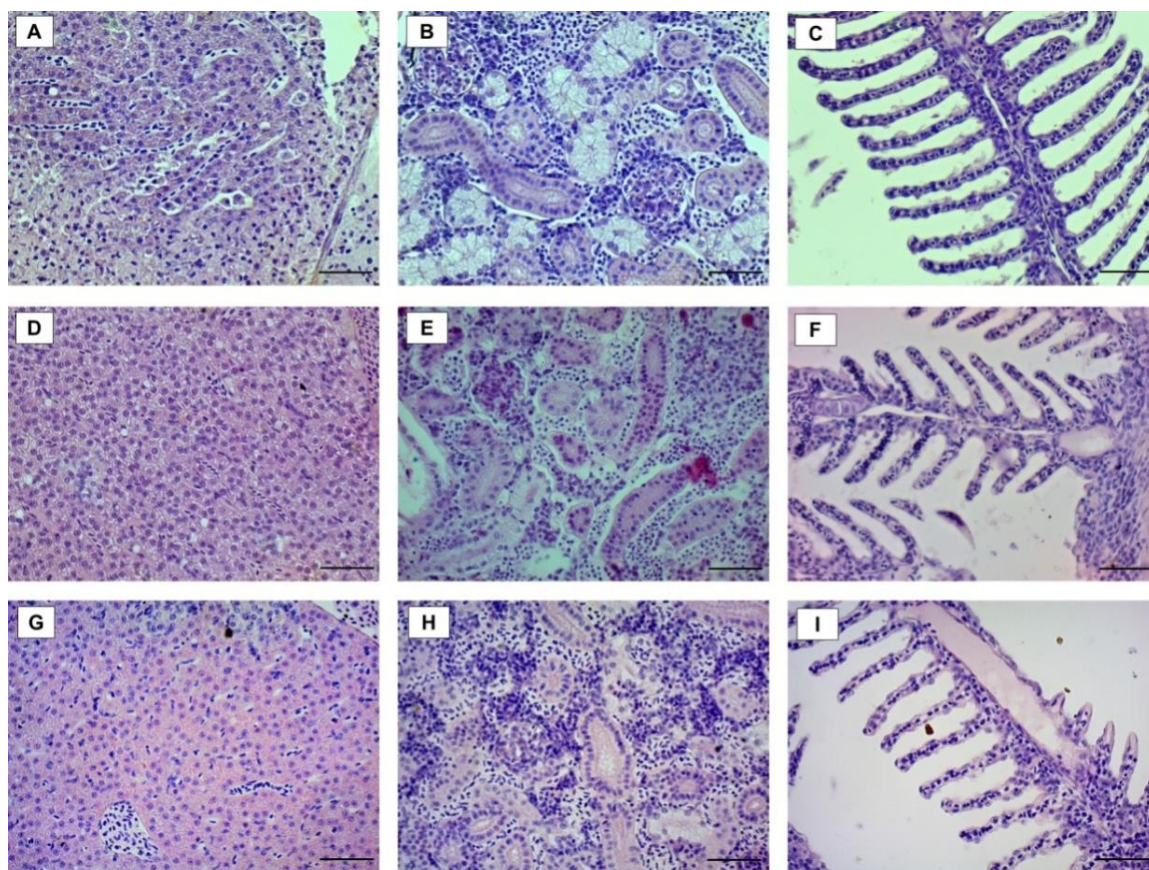


Figura 19. Morfologia do fígado de *Danio rerio*: (A) controle, (D) 0,1 e (G) 10 µg/L de NTP; rim: (B) controle, (E) 0,1 e (H) 10 µg/L de NTP; e brânquias: (C) controle, (F) 0,1 e (I) 10 µg/L de NTP.

5.1.4.4. *Análise comportamental*

Ao serem colocados em um tanque novo, foi verificado o comportamento locomotor (exploração vertical) dos peixes, após exposição crônica, e, a partir dessa análise, constatou-se que os peixes expostos à 10 µg/L de NTP, durante 28 dias, reduziram a frequência de permanência na camada inferior do aquário, de forma estatisticamente significativa, em comparação com o grupo controle (Figura 19), indicando que essa exposição causou, nos animais, um efeito ansiolítico, ao induzir redução de um comportamento natural de defesa antipredatória.

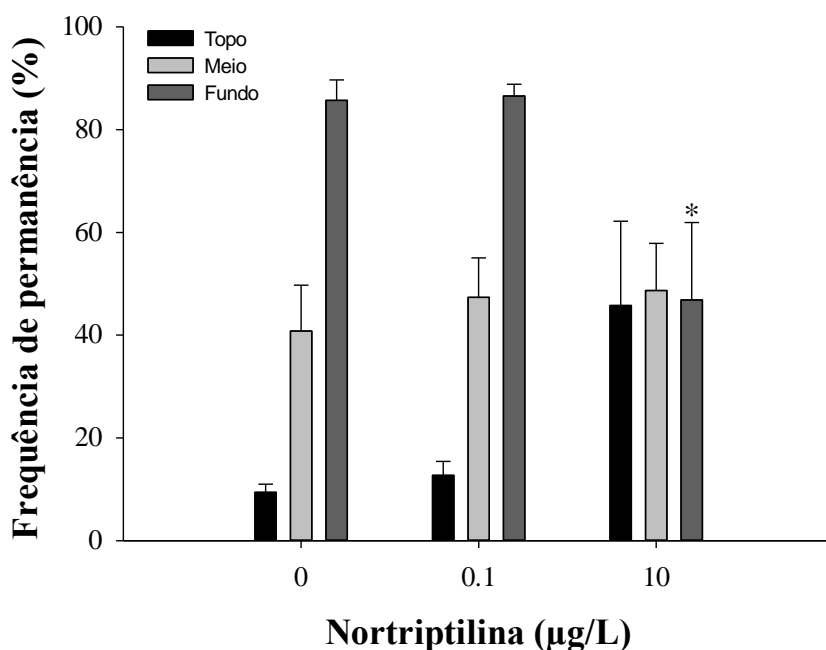


Figura 20. Efeitos da exposição às concentrações de 0,1 e 10 µg/L de NTP sobre a atividade exploratória vertical, em peixes-zebra adultos, após 28 dias de exposição. Valores médios \pm erro padrão. (*) $p < 0,05$.

A exposição crônica, por 28 dias, à concentração de 10 µg/L de NTP, foi capaz de alterar locomoção e comportamento de exploração vertical do peixe-zebra adulto, ao modificar as respostas locomotoras básicas de sobrevivência desses animais.

5.1.4.5. Perfis cerebrais da expressão gênica

A metodologia de *microarray* foi utilizada com o intuito de desvendar os possíveis mecanismos moleculares de toxicidade cerebral da NTP em concentrações bem baixas e ambientalmente relevantes. Foi identificado um total de 243 genes, diferencialmente expressos, (643 transcritos) entre os grupos teste e o controle, sendo 66 genes, trinta e três com expressão reduzida e 33 com expressão aumentada, entre os animais expostos à menor concentração (0,1 µg/L) e o controle; e 184 genes, cento e trinta e sete com expressão reduzida e 47 com expressão aumentada, entre os expostos à maior concentração (10 µg/L) e o controle (Figura 21). Comuns aos dois grupos tratados houve sete genes diferencialmente expressos. Interessante notar que a concentração baixa e ambientalmente relevante (0,1 µg/L) foi capaz de alterar a expressão de um número significativo de genes. Além disso, houve um efeito concentração-resposta no número de genes alterados, isto é, quanto maior a concentração de NTP, maior o número de genes diferencialmente expressos.

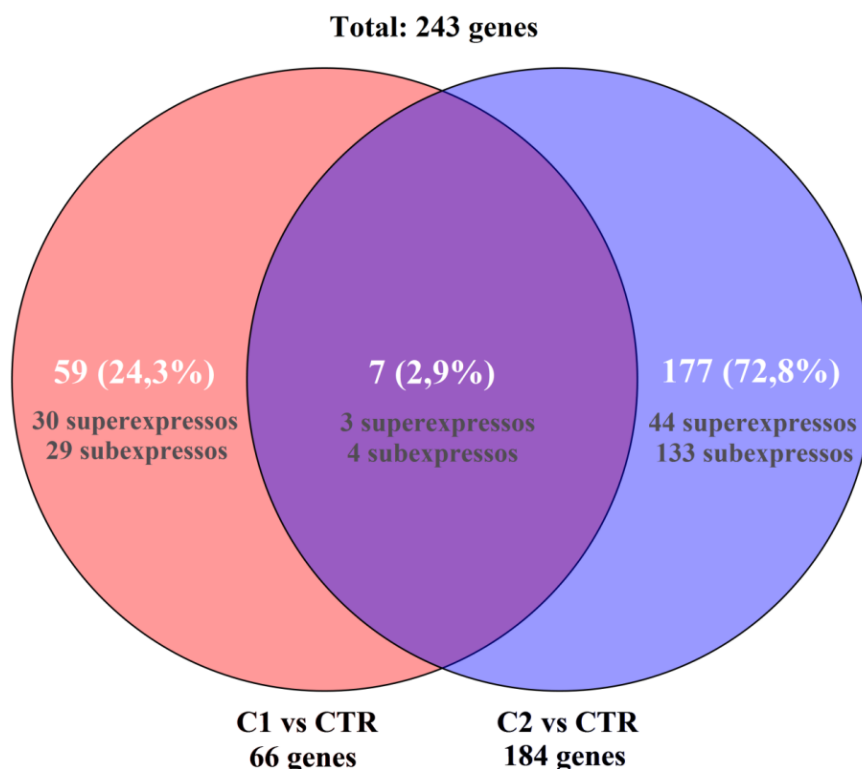


Figura 21. Diagrama de Venn mostrando os genes diferencialmente expressos entre as concentrações testadas de NTP (0,1µg/L (C1) e 10 µg/L (C2)) e o grupo controle (CTR).

Uma análise funcional *in silico*, com os genes diferencialmente expressos, revelou enriquecimento de genes associados com a atividade de fatores de transcrição de ligação ao DNA, ligação ao íon cálcio e atividade de oxidoredutases na concentração de 0,1 µg/L, em comparação ao controle (Tabela 15). A lista completa de genes que se mostraram diferencialmente expressos, com seus respectivos nomes e *fold changes*, pode ser verificada na tabela 1 do Anexo, do presente trabalho.

Tabela 15. Funções associadas aos genes diferencialmente expressos entre a menor concentração de NTP testada (0,1 µg/L) e o grupo controle

Identificador	Nome	Genes	Taxa de enriquecimento	p-valor
GO:0016491	Ligação a íons de cálcio	<i>rcvrnb, si:ch73-233f7.1, loxl2b</i>	5,9451	0,012
GO:0003700	Atividade de fator de transcrição por ligação ao DNA	<i>smad9, npas4a, fosab, egr4</i>	4,5935	0,009
GO:0016491	Atividade de oxidoredutase	<i>cox5aa, loxl2b, me2</i>	4,2699	0,031

Nas amostras cerebrais dos peixes expostos à maior concentração (10 µg/L), houve enriquecimento de um número maior de genes que estavam relacionados com processos de atividade de oxidoredutase, atividade de transportadores, geração de metabólitos precursores e energia, resposta imune, organização mitocondrial e regulação da locomoção (Tabela 16). A

lista completa de genes que se mostraram diferencialmente expressos, com seus respectivos nomes e *fold changes*, pode ser verificada na tabela 2 do Anexo, do presente trabalho.

Tabela 16. Funções associadas aos genes diferencialmente expressos entre a maior concentração de NTP testada (10 µg/L) e o grupo controle

Identificador	Nome	Genes	Taxa de enriquecimento	p-valor
GO:0006091	Geração de metabólitos precursores e energia	<i>gapdhs, cox8a, cox7c, cox6c</i>	5,0759	0,008
GO:0006955	Resposta imune	<i>cd74a, ccr12a, ccl34b.1, si:ch211-288c4.6, cd59, tlr20.2</i>	4,5565	0,002
GO:0007005	Organização da mitocôndria	<i>si:ch211-0215a9.5, gabarapa, mxe</i>	4,3388	0,031
GO:0016491	Atividade de oxidoreductase	<i>zgc:56493, mgst3b, cyp4t8, gapdhs, cyba, cox8a, fads2, ldha, cox7c, cox6c</i>	3,7455	< 0,001
GO:0009605	Atividade locomotora	<i>cyba, ccr12a, ccl34b.1, si:ch211-286c4.6, gabarapa, cd59, mxe</i>	2,9047	0,009
GO:0005215	Atividade de transportador	<i>LOC562831, kcnj13, slc36a4, atp6v0b, vps29, cox8a, mate4, slc7a5, atp5f1c, cox7c, cox6c, slc7a10a</i>	2,8553	< 0,001

Tal resultado nos leva a acreditar que a exposição crônica à NTP causa alterações de expressão gênica no cérebro de *Danio rerio*, tanto em baixas quanto em altas concentrações.

5.2. Estudo da venlafaxina

5.2.1. Estabilidade da VLX

Após as análises do HPLC, a curva padrão para a análise da estabilidade da VLX foi calculada. A relação entre a concentração de VLX, nas amostras, e a área sobre os picos do cromatograma está mostrada na Figura 22.

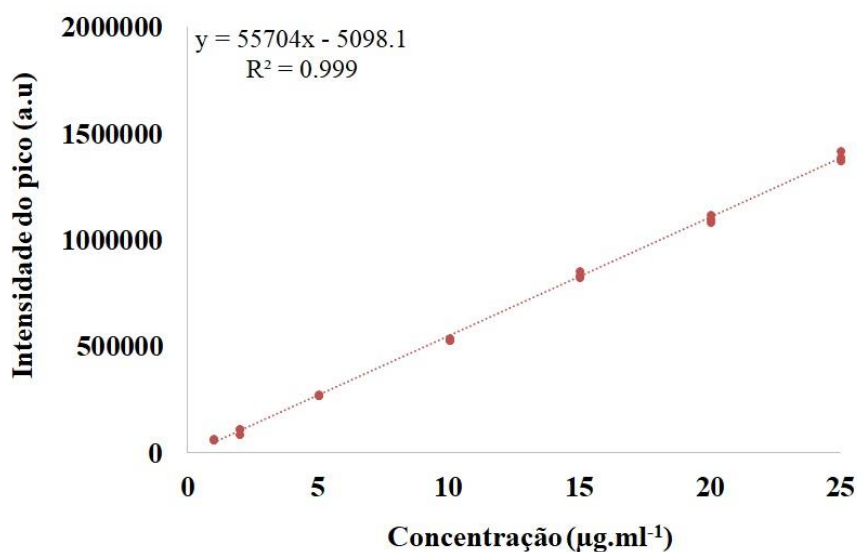


Figura 22. Curva padrão mostrando a relação entre a concentração de VLX e a intensidade do pico dos cromatogramas.

As concentrações e porcentagem de recuperação das soluções estoque estão mostradas na Tabela 17. Os dados obtidos indicam que a molécula de VLX é bastante estável nas condições avaliadas, inclusive após sete dias. Para uma concentração inicial de 1600 µg/L de VLX, foi possível recuperar quase 93% da droga após sete dias.

Tabela 17. Concentrações de VLX e porcentagem de recuperação das soluções estoque.

Tempo (dias)	Condições de cultivo*		% de recuperação
	Concentração (µg/L)		
Dia 0	16170	(81)	100
Dia 1	16370	(19)	102,33
Dia 2	15860	(440)	98,75
Dia 3	15860	(480)	96,86
Dia 4	15820	(430)	96,63
Dia 5	15700	(310)	95,92
Dia 6	15550	(330)	95,01
Dia 7	15310	(250)	93,52

Em parênteses estão representados os valores de desvio padrão * Condições de cultivo: 26.0 ± 1°C, fotoperíodo 14 h luz: 10 h escuro, intensidade da luz: 32 lux.

A verificação da estabilidade da VLX, na água, é uma importante informação uma vez que possibilita estimar o momento adequado para trocar a água dos aquários, durante os testes de

toxicidade, garantindo que os peixes estejam em contato com concentrações adequadas do fármaco durante todo o experimento, estabelecendo, dessa forma, uma condição semi-estática.

5.2.2. Avaliação do efeito tóxico da VLX em embriões/larvas de peixes-zebra

5.2.2.1. *Desenvolvimento embrio-larval*

Durante o FET, os embriões foram observados diariamente para avaliar possíveis efeitos nocivos causados pela VLX, que incluem, no geral, mortalidade, atraso da eclosão, alterações do equilíbrio e edemas corporais. A Figura 23 mostra um panorama geral da toxicidade de VLX no desenvolvimento embrio-larval.

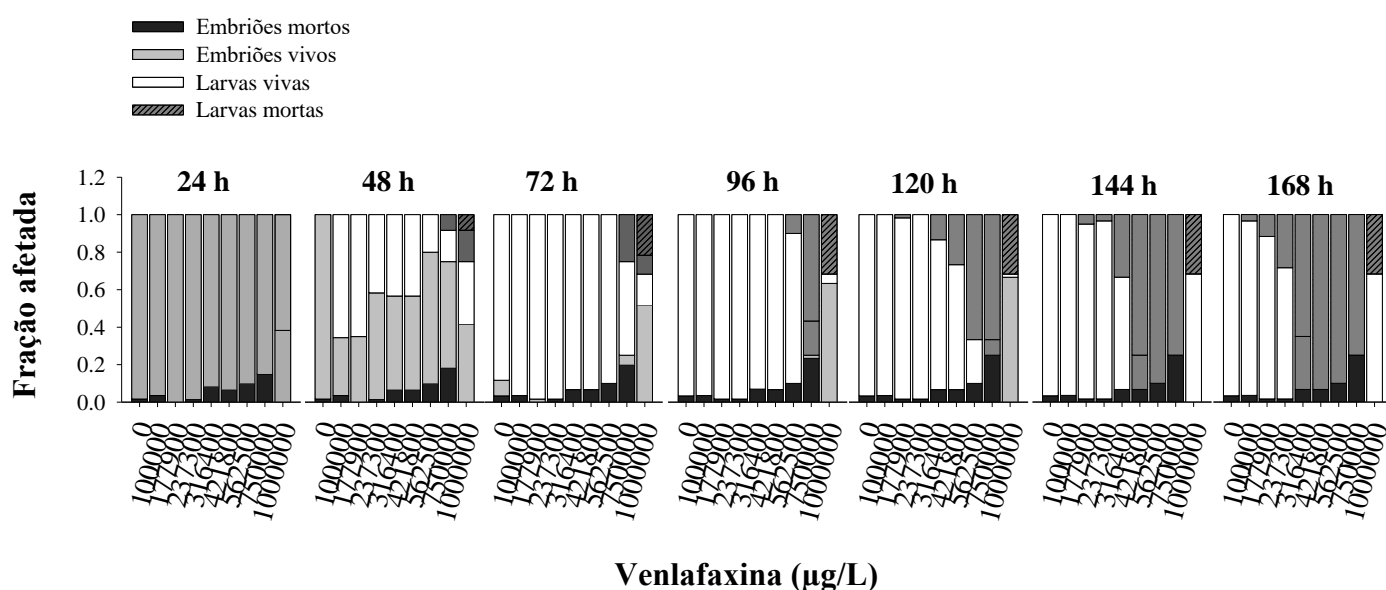


Figura 23. Panorama geral do efeito tóxico de oito diferentes concentrações de VLX (100000; 177900; 237300; 316400; 421800; 562500; 750000; 1000000 µg/L) no desenvolvimento embrio-larval de *Danio rerio*, após 168 h de exposição.

A exposição dos embriões de *Danio rerio* à VLX, em 24 horas, foi capaz de promover a mortalidade de alguns embriões expostos às concentrações de 1000000 até 316400 µg/L. À medida que a exposição prosseguiu (48, 72, 120, 144 e 168 h), os organismos foram se desenvolvendo em larvas, e gradativamente morreram, à medida que o tempo de exposição aumentava. Assim, ao final do experimento (168 horas de exposição), apenas nas três menores concentrações do teste (100000; 177900; 237300 µg/L), havia mais de 50% de larvas vivas. Portanto, é possível perceber que, para embriões e larvas de *Danio rerio*, quanto maior o tempo de exposição bem como o de concentração de VLX, mais tóxico esse fármaco foi a esse organismo-teste.

5.2.2.2. *Mortalidade*

Para determinar a CL_{50} da VLX, a mortalidade progressiva dos embriões e larvas foi quantificada ao longo das 168 h de duração do experimento. A CL_{50} foi determinada para os tempos de 144 e 168 horas de exposição, pois, apenas nesses dois tempos de exposição, houve 100% de mortalidade nas maiores concentrações testadas (421800; 562500; 750000 e 1000000 $\mu\text{g/L}$).

Para o tempo de 144 horas de exposição, a CL_{50} foi de 317500 $\mu\text{g/L}$ e, após 168 horas de exposição, a CL_{50} foi de 274100 $\mu\text{g/L}$. A VLX mostra-se gradativamente mais tóxica à medida que o tempo de exposição também aumenta, pois as curvas de regressão da concentração letal para 50% dos indivíduos (CL_{50}) revelam que, quanto maior o tempo de exposição, menor será a concentração do fármaco necessário para matar metade dos indivíduos expostos (Figura 24).

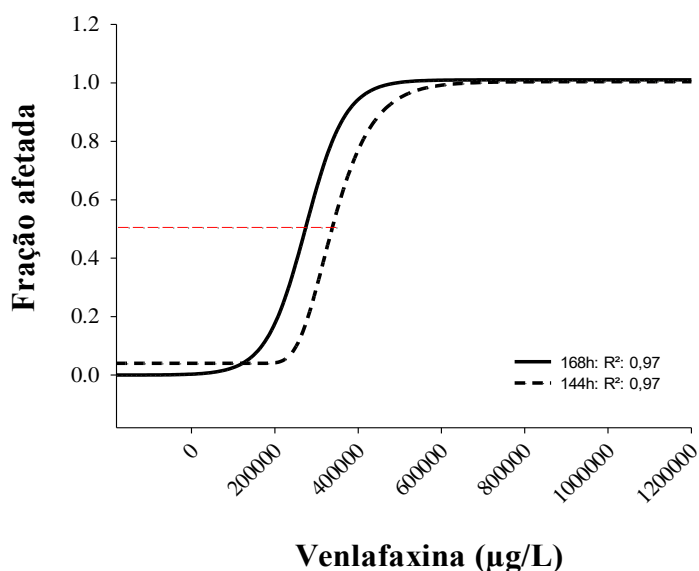


Figura 24. CL_{50} da VLX em embriões/larvas de peixes-zebra, após exposição de 144 e 168 h. A linha pontilhada vermelha indica 50% dos indivíduos afetados. Curvas feitas por análises de regressão em que os valores de R^2 correspondem ao coeficiente de determinação da curva.

5.2.2.3. *Taxa de eclosão*

A Tabela 18 especifica a porcentagem de eclosão para cada tempo de análise, nos diferentes grupos que foram expostos. Alterações na eclosão só podem ser percebidas a partir de 48 h, motivo pelo qual o tempo de 24 h não consta da tabela. As taxas de eclosão dos grupos tratados diferiram estatisticamente em comparação com o grupo controle nas duas menores concentrações testadas (100000 e 117900 $\mu\text{g/L}$) após 48 horas de exposição, indicando que a exposição a VLX antecipou a eclosão dos organismos (Tabela 18).

Tabela 18. Eclosão dos embriões (%) durante o teste de toxicidade \pm erro padrão. (*)
 $p < 0,05$.

Venlafaxina ($\mu\text{g/L}$)	Eclosão (%) \pm Erro padrão					
	Tempo (h)					
	48	72	96	120	144	168
Controle	33,3 \pm 8,8	91,32 \pm 6,3	100 \pm 0	100 \pm 0	100 \pm 0	100 \pm 0
100000	65,53 \pm 13,6*	96,49 \pm 3,5	96,49 \pm 3,6	100 \pm 0	100 \pm 0	100 \pm 0
177900	65 \pm 5,7*	98,3 \pm 1,6	98,3 \pm 1,6	98,3 \pm 1,6	98,3 \pm 1,6	98,3 \pm 1,6
237300	41,67 \pm 8,3	98,3 \pm 1,6	98,3 \pm 1,6	98,3 \pm 1,6	98,3 \pm 1,6	98,3 \pm 1,6
316400	43,3 \pm 16,9	93,3 \pm 4,4	93,3 \pm 4,4	93,3 \pm 4,4	93,3 \pm 4,4	93,3 \pm 4,4
421800	43,3 \pm 14,5	93,3 \pm 3,3	93,3 \pm 3,3	93,3 \pm 3,3	93,3 \pm 3,3	93,3 \pm 3,3
562500	20 \pm 7,6	90 \pm 0	90 \pm 0	90 \pm 0	90 \pm 0	90 \pm 0
750000	25 \pm 13,2	75 \pm 7,6	75 \pm 7,6	75 \pm 7,6	75 \pm 7,6	75 \pm 7,6
1000000	25 \pm 13,2	31,67 \pm 18,7	31,67 \pm 18,7	31,67 \pm 18,7	31,67 \pm 18,7	31,67 \pm 18,7

5.2.2.4. Alterações no equilíbrio

Na Figura 25, apresenta-se a porcentagem de organismos, expostos às diferentes concentrações de VLX, com alterações no equilíbrio, nos tempos de 96, 120, 144 e 168 h. Para os três dias iniciais do experimento, alterações no equilíbrio não são quantificáveis devido à idade das larvas, e, por isso, não constam no gráfico.

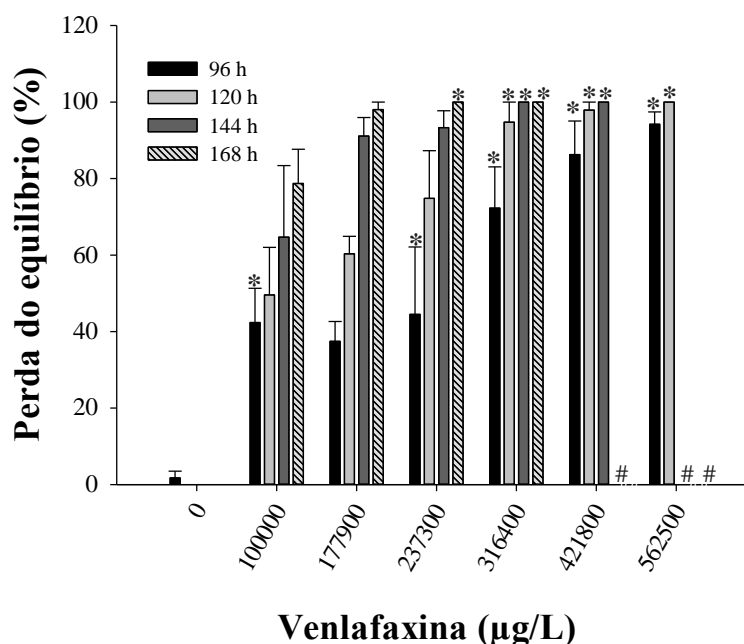


Figura 25. Porcentagem de indivíduos com equilíbrio afetado pela VLX. Valores médios \pm erro padrão. (*) $p < 0,05$ em relação ao grupo controle. #: morte dos organismos

O padrão comportamental de equilíbrio das larvas é alterado a partir de 96 horas de exposição à VLX e é mantido à medida que a exposição prossegue (168 horas). A perda de equilíbrio, nas larvas expostas à VLX, foi estatisticamente significativa em relação às larvas do grupo controle, após 96 h, nas concentrações 100000; 237400; 316400; 421800; 562500 de $\mu\text{g/L}$; após 120 h, nas concentrações 316400; 421800 e 562500 de $\mu\text{g/L}$; após 144 h, nas concentrações de 316400 e 421800 de $\mu\text{g/L}$; e após 168 h, nas concentrações de 237400 e 316400 $\mu\text{g/L}$.

Ao comparar os dados de mortalidade e equilíbrio, é possível perceber que, embora o fármaco não induza à morte das larvas, nas concentrações menores (100000; 237400; 316400 $\mu\text{g/L}$), é capaz de alterar o equilíbrio delas após um período maior de exposição (144 e 168 h).

5.2.2.5. Alterações na frequência cardíaca

Alterações na frequência cardíaca foram quantificadas, após 48 h de exposição à VLX (Figura 26), uma vez que, nesse estágio de desenvolvimento a perceptibilidade dos batimentos cardíacos do organismo é maior. Houve redução, estatisticamente significativa, na frequência cardíaca das larvas expostas às concentrações de 562500; 421800; 316400 e 237300 $\mu\text{g/L}$ de VLX. As duas maiores concentrações (750000 e 1000000 $\mu\text{g/L}$) não estão no gráfico devido às altas taxas de mortalidade.

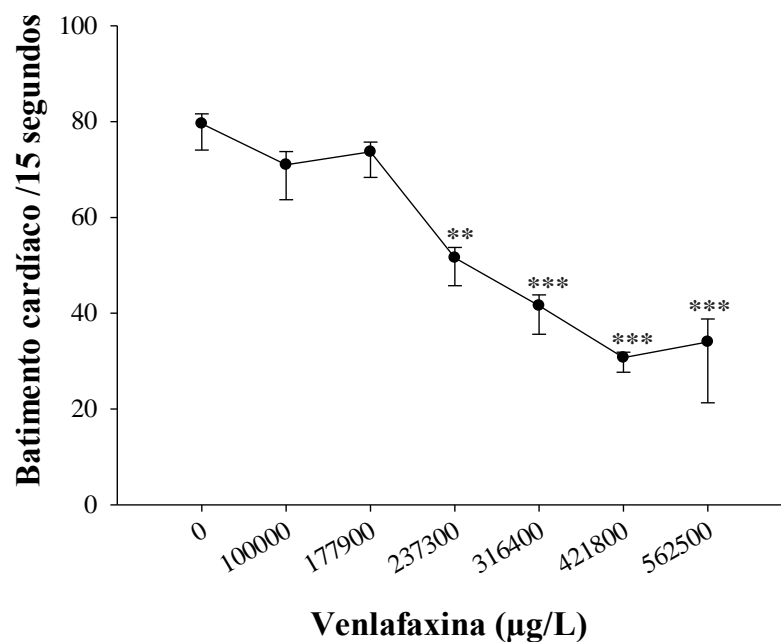


Figura 26. Frequência cardíaca das larvas expostas por 48 horas às concentrações de 100000; 177900; 237400; 316400; 421800; 562500 µg/L de VLX. Valores médios \pm erro padrão. (**) $p < 0,01$ e (***) $p < 0,001$, em relação ao grupo controle.

5.2.2.6. *Biomarcadores enzimáticos*

5.2.2.6.1. *Atividade enzimática da AChE*

A atividade da enzima AChE foi quantificada nas larvas expostas durante 168 horas à VLX, nas concentrações de 2, 1000, 25000 e 100000 µg/L. A exposição às concentrações de 1000, 25000 e 100000 µg/L de VLX foram capazes de induzir redução estatisticamente significativa ($p < 0,05$) da atividade da enzima AChE, em comparação com o grupo controle.

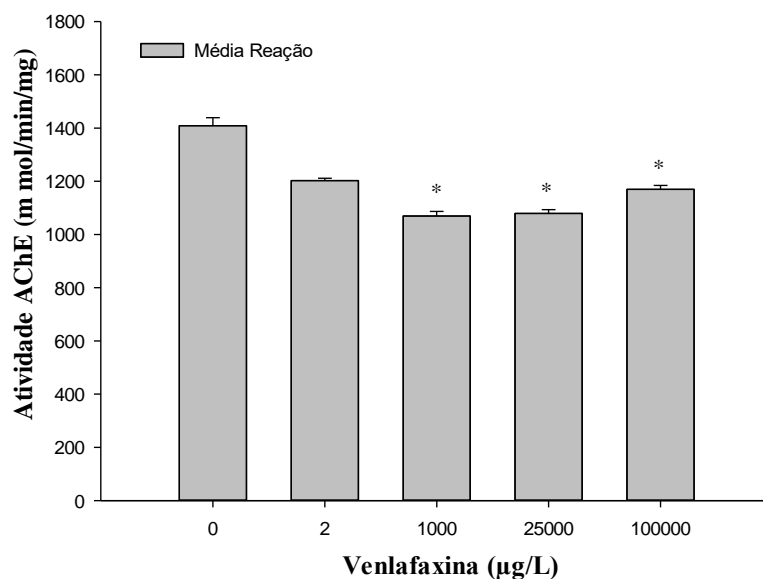


Figura 27. Efeitos da exposição à VLX sobre a atividade da AChE, em larvas de peixes-zebra, após 168 h de exposição. Valores médios \pm erro padrão. (*) $p < 0,05$, em relação ao grupo controle.

5.2.2.6.2. Atividade enzimática da GST

A atividade da enzima glutathione S-transferase (GST) foi quantificada nas larvas expostas, durante 168 horas, à VLX nas concentrações de 2, 1000, 25000 e 100000 $\mu\text{g/L}$. A exposição às concentrações de 2, 1000 e 25000 $\mu\text{g/L}$ de VLX foram capazes de induzir redução estatisticamente significativa ($p < 0,001$) da atividade da enzima GST, em relação ao grupo controle.

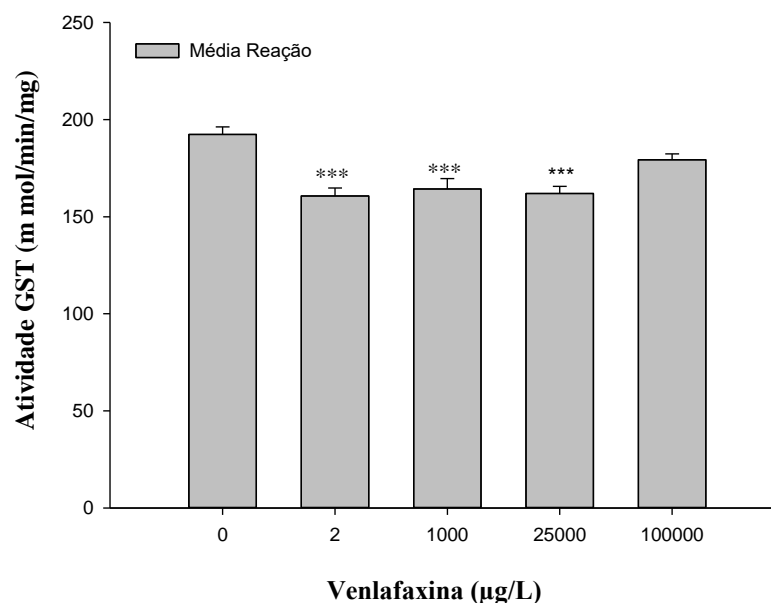


Figura 28. Efeitos da exposição à VLX sobre a atividade da GST, em larvas de peixes-zebra, após 168 h de exposição. Valores médios \pm erro padrão. (***) $p < 0,001$, em relação ao grupo controle.

5.2.2.6.3. Atividade enzimática da LDH

A atividade da enzima lactato desidrogenase (LDH) foi quantificada nas larvas, após às 168 horas de exposição, à VLX, nas concentrações de 2, 1000, 25000 e 100000 $\mu\text{g/L}$. A exposição à concentração de 100000 $\mu\text{g/L}$ de VLX foi capaz de induzir aumento estatisticamente significativo ($p < 0,001$) da atividade da enzima LDH, em comparação com o grupo controle, o que sugere que altas concentrações de VLX possam ser tóxicas aos embriões e larvas de *Danio rerio*.

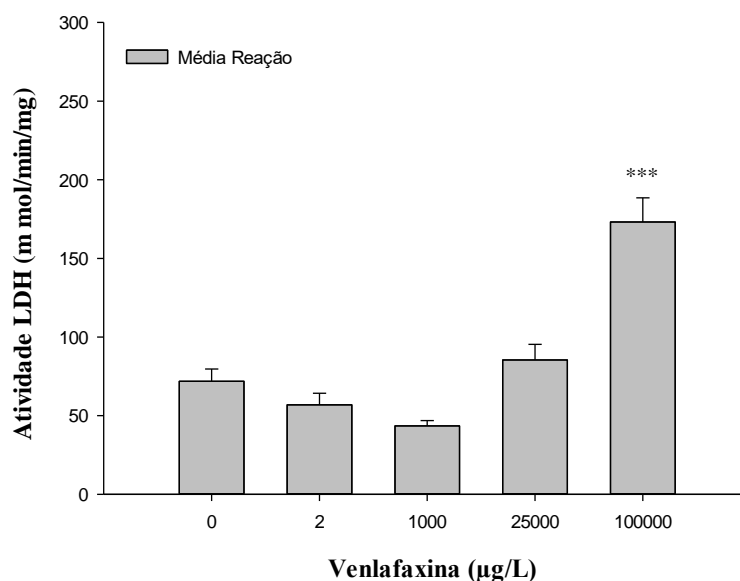


Figura 29. Efeitos da exposição à VLX sobre a atividade da LDH, em larvas de peixes-zebra, após 168 h de exposição. Valores médios \pm erro padrão. (***) $p < 0,001$, em relação ao grupo controle.

5.2.3. Avaliação do efeito tóxico agudo da VLX em peixes-zebra adultos

5.2.3.1. *Mortalidade*

Durante 96 h de exposição, os adultos expostos às cinco diferentes concentrações de VLX (1000, 25000, 50000, 75000 e 100000 $\mu\text{g/L}$) foram diariamente observados para quantificação da mortalidade. A maior concentração analisada foi de 100000 $\mu\text{g/L}$ e, após 96 horas de exposição, não houve 100% de mortalidade. Por essa razão, não foi possível delimitar uma CL_{50} para a VLX após a exposição de peixe zebra adultos. Acreditamos que a CL_{50} , provavelmente, seja um valor superior a 100000 $\mu\text{g/L}$, e, portanto, do ponto de vista ambiental e ecotoxicológico, não foi pertinente tentar delimitar o CL_{50} para peixes-zebra adultos após exposição à VLX.

5.2.3.2. *Biomarcadores bioquímicos*

5.2.3.2.1. Atividade enzimática da AChE

A atividade da enzima AChE foi quantificada nas amostras de músculo e cabeça dos organismos adultos expostos de maneira aguda (96 horas) à VLX nas concentrações de 1000, 25000, 50000, 75000 e 100000 $\mu\text{g/L}$. A exposição aguda à VLX, em organismos adultos, não foi capaz de induzir, estatisticamente, a inibição ou aumento da atividade da AChE (Figura 30).

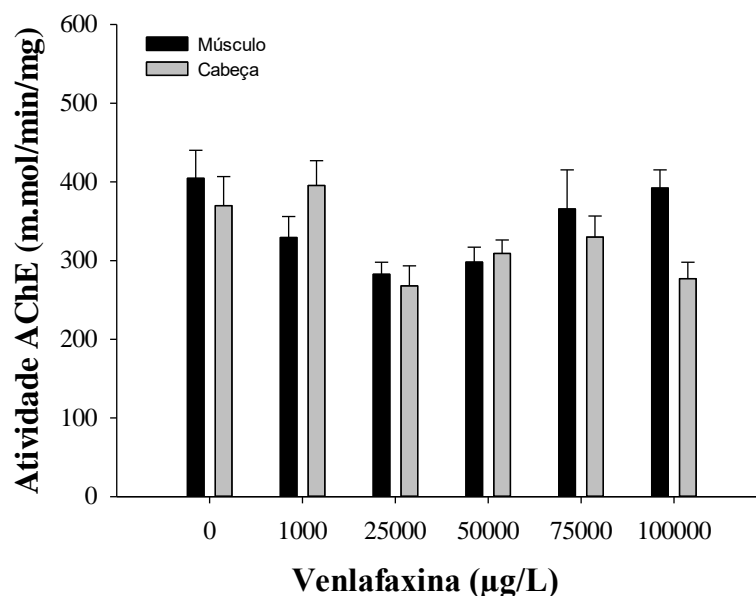


Figura 30. Efeitos da exposição à VLX sobre a atividade da AChE, em peixes-zebra adultos, após 96 h de exposição às concentrações de 1000, 25000, 50000, 75000 e 100000 µg/L de VLX. Valores médios \pm erro padrão.

5.2.3.2.2. Atividade enzimática da GST

A atividade da GST foi quantificada, nas amostras de músculo e cabeça dos organismos adultos expostos de maneira aguda (96 horas) à VLX nas concentrações de 1000, 25000, 50000, 75000 e 100000 µg/L. Nas amostras de cabeça, houve redução estatisticamente significativa ($p < 0,05$) na atividade de GST, nos grupos expostos às concentrações de 25000, 50000 e 100000 µg/L; e, para as amostras musculares, houve aumento da atividade dessa enzima ($p < 0,05$) no grupo exposto à concentração de 100000 µg/L, como indicado na Figura 31.

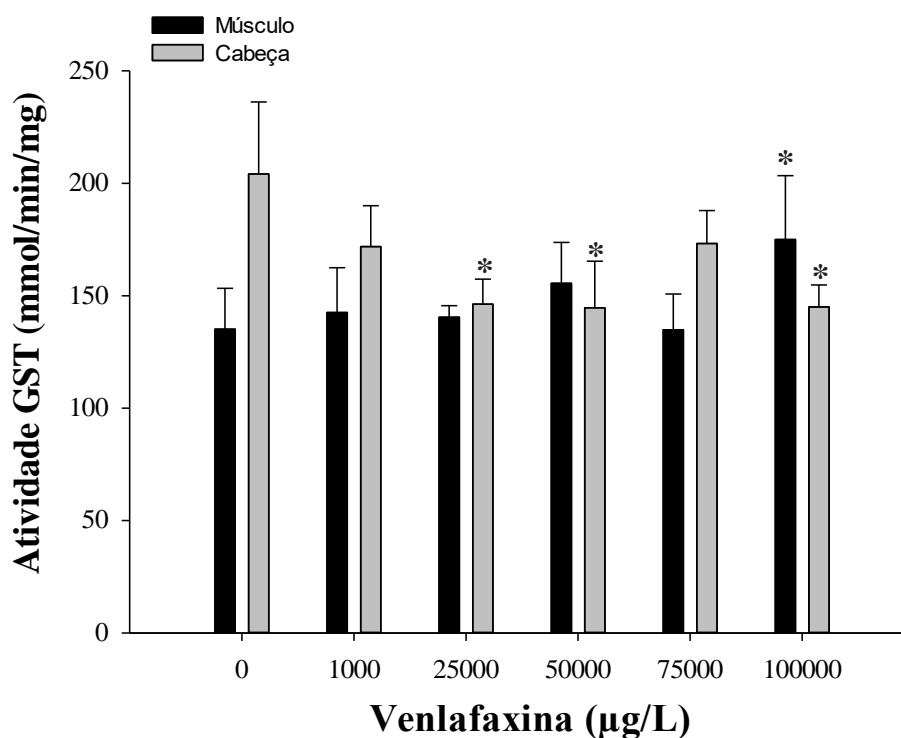


Figura 31. Efeitos da exposição à VLX sobre a atividade da GST, em peixes-zebra adultos, após 96 h de exposição às concentrações de 1000, 25000, 50000, 75000 e 100000 µg/L de VLX. Valores médios ± erro padrão. (*) $p < 0,05$, em relação ao grupo controle.

5.2.3.2.3. Atividade enzimática da LDH

A atividade da enzima lactato desidrogenase (LDH) foi quantificada nas amostras de músculo e cabeça dos organismos adultos expostos de maneira aguda (96 horas) à VLX nas concentrações de 1000, 25000, 50000, 75000 e 100000 µg/L. Em organismos adultos a exposição, por 96 horas, à concentração de 100000 µg/L de VLX foi capaz de induzir o aumento ($p < 0,05$) da atividade da LDH (Figura 32), em relação ao grupo controle, para as amostras de cabeça e, apesar de não haver aumento estatístico para as demais concentrações de VLX (1000, 25000, 50000 e 75000 µg/L), é possível identificar tendência de aumento da LDH, culminando no aumento estatístico na maior concentração (100000 µg/L). Essa mesma tendência pode ser visualizada nas amostras de músculo, apesar de não haver diferenças estatísticas.

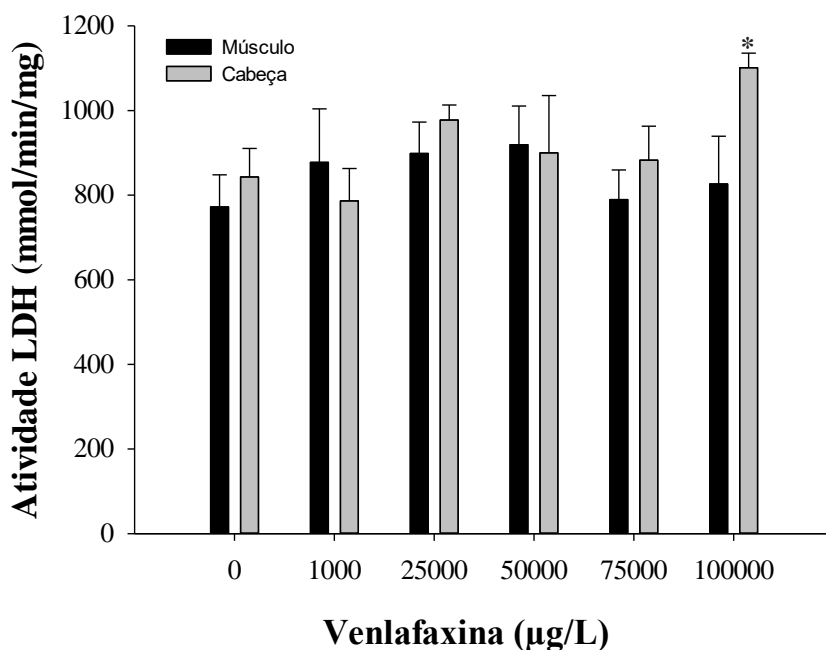


Figura 32. Efeitos da exposição à VLX sobre a atividade da LDH, em peixes-zebra adultos, após 96 h de exposição às concentrações de 1000, 25000, 50000, 75000 e 100000 µg/L de VLX. Valores médios \pm erro padrão. (*) $p < 0,05$, em relação ao grupo controle.

5.2.3.3. *Biomarcadores de genotoxicidade*

5.2.3.3.1. Teste do cometa

Na Tabela 19, estão representadas as porcentagens de fragmentação do DNA nos eritrócitos dos peixes adultos, após 96 h de exposição à VLX. As porcentagens de fragmentação e a falta de diferenças estatisticamente significativas indicam que a VLX não é genotóxica, mesmo na concentração mais alta de 100000 µg/L.

Tabela 19. Porcentagem de DNA na cauda de eritrócitos periféricos de peixes após exposição aguda à VLX. Dano moderado (DM) e dano elevado (DE). Valores médios \pm erro padrão.

Venlafaxina ($\mu\text{g/L}$)	DNA na cauda (%) \pm Erro Padrão	
	DM	DE
Controle	11 \pm 3,1	1,5 \pm 1,2
1000	13,9 \pm 5,0	0,52 \pm 0,26
25000	13,9 \pm 2,22	3,66 \pm 3,67
75000	15,08 \pm 1,66	5,58 \pm 2,46
100000	14,3 \pm 1,84	3,3 \pm 1,31

5.2.3.3.2. Teste do micronúcleo e anormalidades nucleares

A Tabela 20 representa as células com micronúcleos e anormalidades nucleares (broto, binucleada, *blebbed*, lobed e *notched*) que foram observadas em eritrócitos de peixes do grupo controle e daqueles submetidos a diferentes concentrações de VLX. A frequência de micronúcleo, bem como das outras anormalidades nucleares analisadas, não foi estatisticamente significativa entre os grupos expostos à VLX e o grupo controle, indicando que a exposição por 96 horas a esse fármaco, não é genotóxica.

Tabela 20. Micronúcleos e anormalidades nucleares observadas em eritrócitos de sangue periférico de peixes após exposição aguda à VLX. Valores médios \pm erro padrão.

Venlafaxina ($\mu\text{g/L}$)	Anormalidades nucleares (%) \pm Erro padrão					
	Micronúcleo	Broto	Binucleada	<i>Blebbed</i>	Lobed	<i>Notched</i>
Controle	0	0,0083 \pm 0,0001	0,0027 \pm 0,0001	0,005 \pm 0,0002	0,01 \pm 0,0004	0,005 \pm 0,0002
1000	0,019 \pm 0,0005	0,0083 \pm 0,0001	0	0,2 \pm 0,07	0,01 \pm 0,01	0,05 \pm 0,02
25000	0,007 \pm 0,004	0,007 \pm 0,004	0,003 \pm 0,001	0,013 \pm 0,001	0	0,008 \pm 0
75000	0,014 \pm 0	0,011 \pm 0	0,003 \pm 0	0,13 \pm 0,003	0,008 \pm 0	0,022 \pm 0
100000	0,027 \pm 0,0008	0,03 \pm 0,0005	0	0	0	0,005 \pm 0,0001

5.2.4. Avaliação do efeito tóxico crônico da VLX em peixes-zebra adultos

5.2.4.1. Biomarcadores enzimáticos

5.2.4.1.1. Atividade enzimática da AChE

Na exposição crônica, as concentrações de VLX (0,2 e 1000 $\mu\text{g/L}$) não foram capazes de alterar a atividade da AChE, tanto nas amostras provenientes da cabeça como dos músculos dos animais (Figura 33).

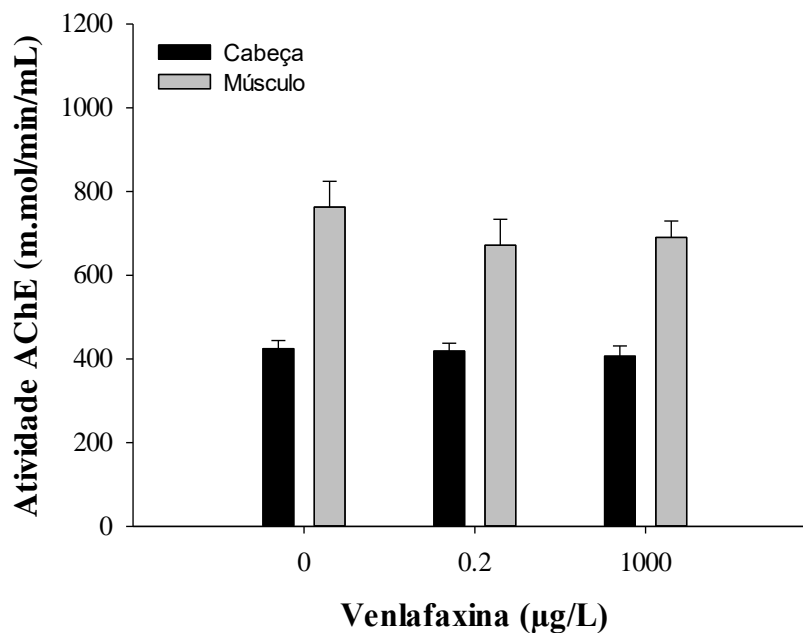


Figura 33. Efeitos da exposição às concentrações 0,2 e 1000 $\mu\text{g/L}$ de VLX sobre a atividade da AChE, em peixes-zebra adultos, após 28 dias de exposição. Valores médios \pm erro padrão.

5.2.4.1.2. Atividade enzimática da GST

A exposição crônica foi capaz de aumentar ($p < 0,05$) a atividade da enzima GST nas amostras de cabeça dos grupos expostos à concentração de 0,2 $\mu\text{g/L}$, quando comparadas ao grupo controle (Figura 34).

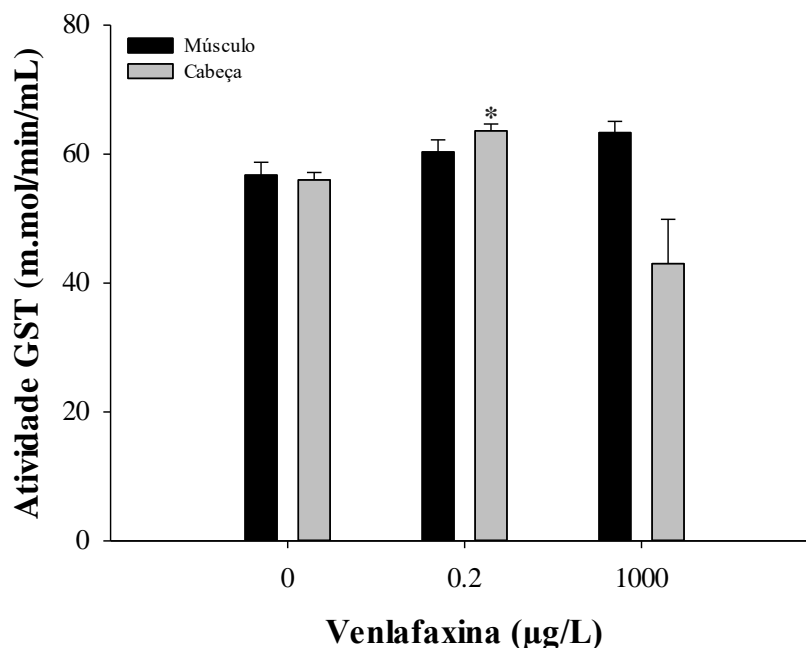


Figura 34. Efeitos da exposição às concentrações 0,2 e 1000 µg/L de VLX sobre a atividade da GST, em peixes-zebra adultos, após 28 dias de exposição. Valores médios \pm erro padrão. (*) $p < 0,05$, em relação ao grupo controle.

5.2.4.1.3. Atividade enzimática da LDH

A exposição de *Danio rerio* à concentração de 1000 µg/L de VLX, durante 28 dias, foi capaz de aumentar ($p < 0,05$) a atividade da LDH (Figura 35) nas amostras da cabeça e essa mesma exposição não mostrou diferenças estatísticas nas amostras de músculo (Figura 35).

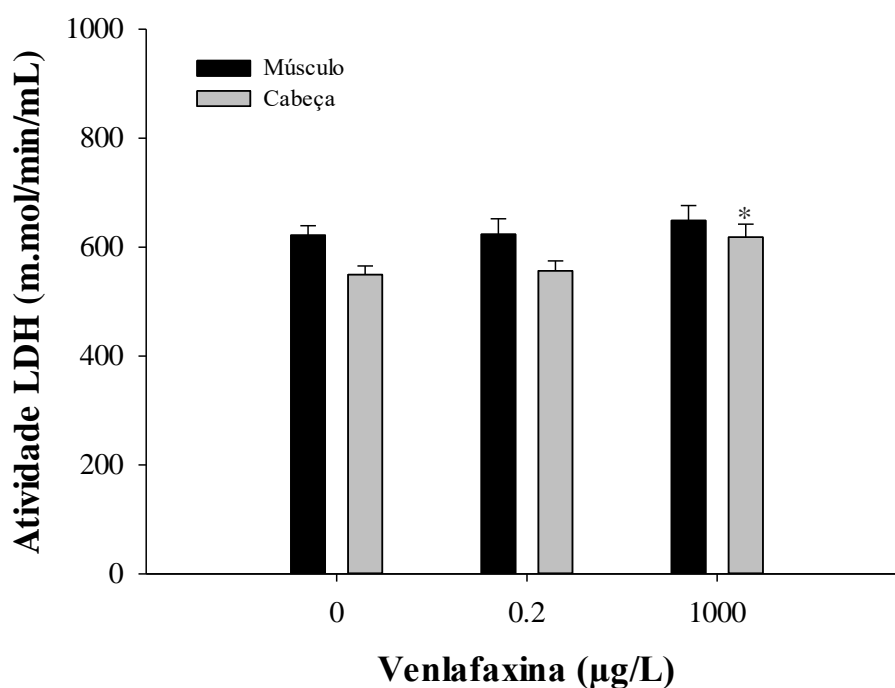


Figura 35. Efeitos da exposição às concentrações de 0,2 e 1000 µg/L de VLX sobre a atividade da LDH, em peixes-zebra adultos, após 28 dias de exposição. Valores médios ± erro padrão. (*) $p < 0,05$, em relação ao grupo controle.

5.2.4.2. *Biomarcadores de genotoxicidade*

5.2.4.2.1. Teste do cometa

Na Tabela 21, estão representadas as porcentagens de fragmentação do DNA, nas células sanguíneas de peixes expostos de maneira crônica (28 dias), às concentrações 0,2 e 1000 µg/L de VLX. A falta de diferenças estatisticamente significativas entre as porcentagens de fragmentação dos grupos expostos em relação ao grupo controle indica que a VLX não é genotóxica. Este resultado já era esperado tendo em vista que a VLX não foi genotóxica no teste agudo e em concentrações muito maiores.

Tabela 21. Porcentagem de DNA na cauda de eritrócitos periféricos de peixes após exposição crônica à VLX. Valores médios \pm erro padrão. Dano moderado (DM) e dano elevado (DE).

Venlafaxina ($\mu\text{g/L}$)	DNA na cauda (%) \pm Erro Padrão	
	DM	DE
Controle	10,1 \pm 1,2	8,45 \pm 1,4
0,2	9,9 \pm 1,6	2,07 \pm 0,96
1000	17,32 \pm 1,1	2,58 \pm 1,3

5.2.4.2.2. Teste do micronúcleo e anormalidades nucleares

A Tabela 22 apresenta as anormalidades nucleares e as células com micronúcleos observados em eritrócitos de peixes adultos dos grupos controle e expostos cronicamente (28 dias), às concentrações 0,2 e 1000 $\mu\text{g/L}$ de VLX. Como no teste do cometa, longas exposições de VLX a baixas concentrações não foram mutagênicas.

Tabela 22. Micronúcleos e anormalidades nucleares observadas em eritrócitos de sangue periférico de peixes após exposição crônica à VLX. Valores médios \pm erro padrão.

Venlafaxina ($\mu\text{g/L}$)	Alterações nucleares (%) \pm Erro padrão					
	Micronúcleo	Broto	Binucleada	<i>Blebbled</i>	Lobed	<i>Notched</i>
Controle	0,002 \pm 0,002	0	0,0023 \pm 0,0023	0,019 \pm 0,007	0	0,0023 \pm 0,0023
0,2	0,005 \pm 0,003	0,01 \pm 0,005	0	0	0,005 \pm 0,003	0,005 \pm 0,003
1000	0,002 \pm 0,002	0,012 \pm 0,005	0	0	0,002 \pm 0,002	0,01 \pm 0,01

5.2.4.3. *Biomarcadores morfológico de órgãos*

5.2.4.3.1. Morfometria do intestino

Com o intuito de verificar se a exposição crônica à VLX (0,2 e 1000 $\mu\text{g/L}$) foi capaz de causar alterações na morfologia de peixe-zebra, foram realizadas medições do intestino dos animais, nas quais foram mensuradas: a altura do epitélio e das vilosidades intestinais e a largura das vilosidades dos peixes adultos expostos. Após a exposição foi identificada redução, estatisticamente significativa, da altura do epitélio intestinal do organismo-modelo, na concentração de 1000 $\mu\text{g/L}$ (Figura 36).

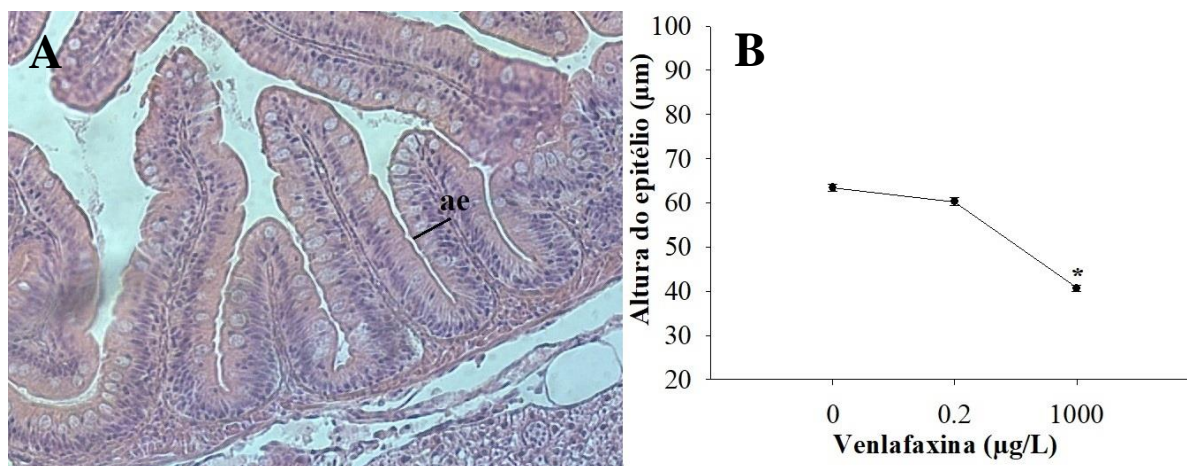


Figura 36. (A) Morfologia do intestino de *Danio rerio*: (ae) altura do epitélio; (B) Medidas da altura do epitélio após 28 dias de exposição às concentrações de 0,2 e 1000 µg/L de VLX, em adultos. Valores médios ± erro padrão. (*) $p < 0,05$, em relação ao grupo controle.

A largura das vilosidades intestinais de *Danio rerio* apresentaram redução estatisticamente significativa nos organismos expostos a ambas às concentrações de VLX (0,2 e 1000 µg/L), em comparação com o grupo controle (Figura 37).

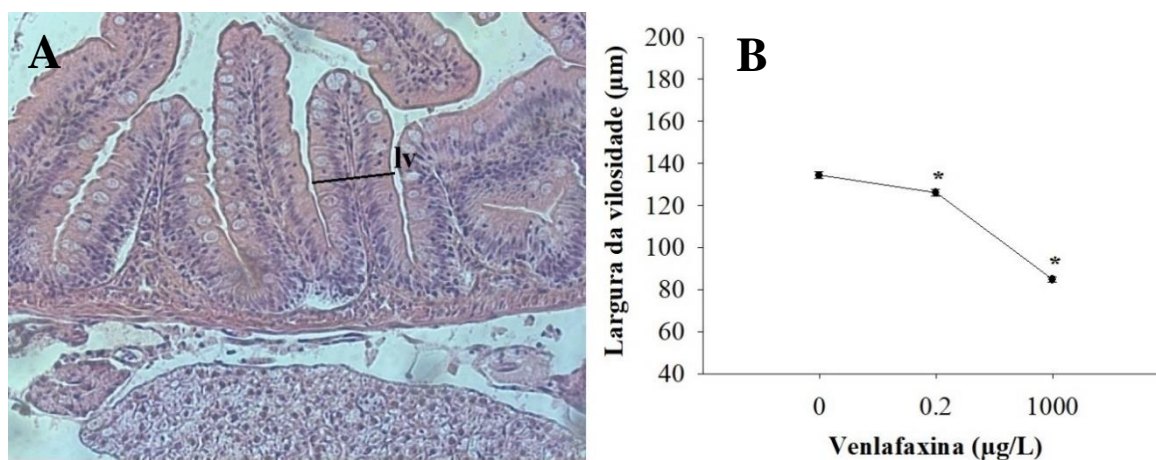


Figura 37. (A) Morfologia do intestino de *Danio rerio*: (lv) largura da vilosidade; (B) Medidas da largura da vilosidade após 28 dias de exposição às concentrações de 0,2 e 1000 µg/L de VLX, em adultos. Valores médios ± erro padrão. (*) $p < 0,05$, em relação ao grupo controle.

A exposição crônica às concentrações de 0,2 e 1000 µg/L de VLX também foi capaz de causar redução estatisticamente significativa na altura das vilosidades intestinais, em relação ao grupo controle (Figura 38).

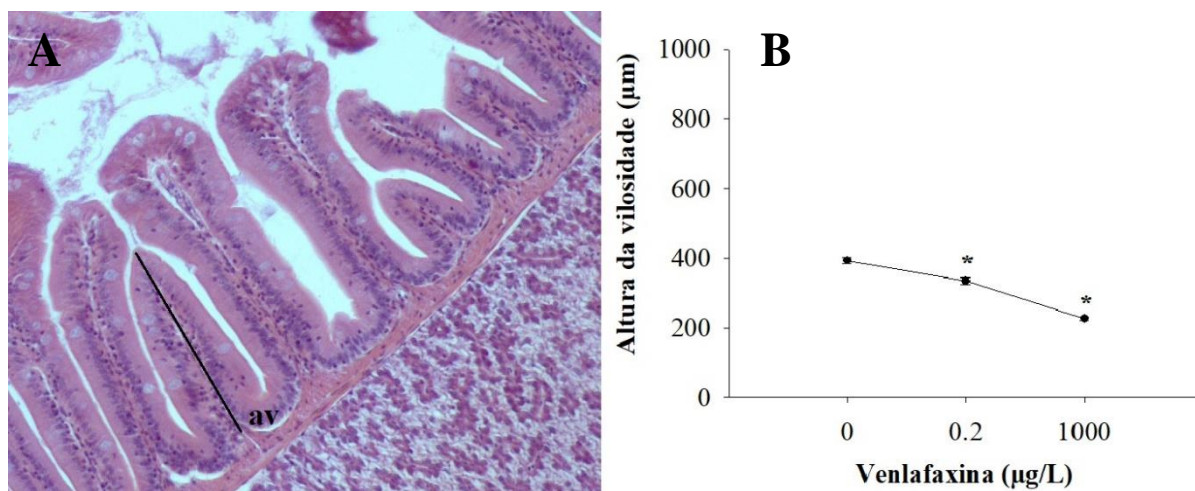


Figura 38. (A) Morfologia do intestino de *Danio rerio*: (av) altura da vilosidade; (B) Medidas da altura da vilosidade após 28 dias de exposição às concentrações 0, 2 e 1000 µg/L de VLX, em adultos. Valores médios \pm erro padrão. (*) $p < 0,05$, em relação ao grupo controle.

O presente trabalho, indica que a exposição à VLX, durante 28 dias, foi capaz de alterar a morfologia intestinal de *Danio rerio*, pela redução da altura do epitélio, largura e área da vilosidade.

5.2.4.3.2. Morfometria das brânquias

A análise das brânquias foi realizada pela medição da altura das lamelas secundárias dos peixes adultos expostos durante 28 dias à VLX (0,2 e 1000 µg/L), e essa exposição foi capaz de causar redução significativa ($p < 0,05$) do tamanho lamelar nos dois grupos expostos ao fármaco em comparação com o grupo controle.

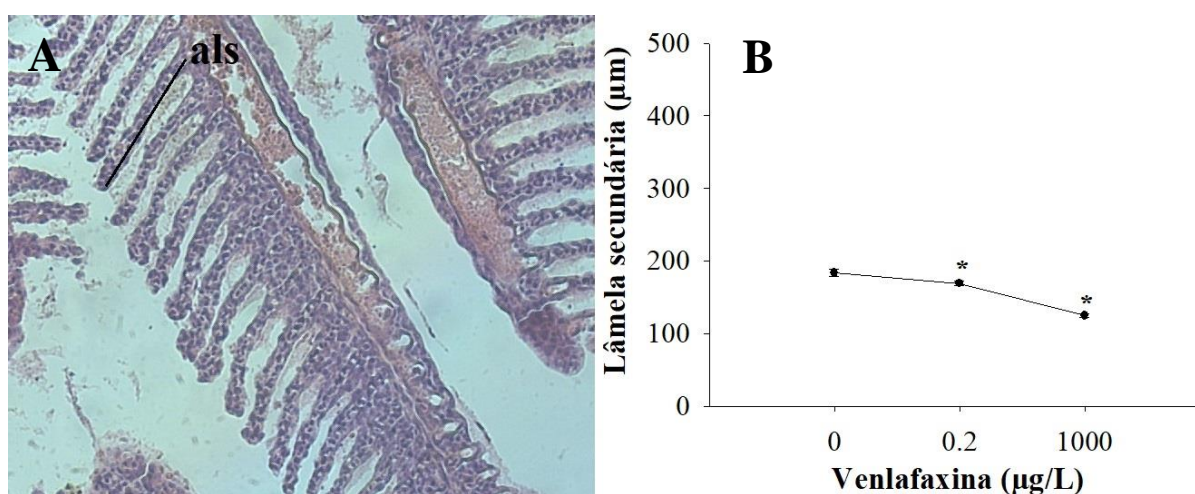


Figura 39. (A) Morfologia da brânquia de *Danio rerio*: medida da altura lamelar secundária (als); (B) Medidas da altura da lamela secundárias após 28 dias de exposição às concentrações 0,2 e 1000 µg/L de VLX, em adultos. Valores médios \pm erro padrão. (*) $p < 0,05$, em relação ao grupo controle.

5.2.4.4. *Teste de mergulho em tanque novo (MTN)*

Para avaliar alterações nos parâmetros locomotores, três variáveis do nado dos animais foram mensuradas: distância percorrida, velocidade máxima e ângulo absoluto de virada (Figura 40). A exposição à VLX não foi capaz de causar alterações, estatisticamente significativas, na distância percorrida e no ângulo absoluto de virada dos animais, em nenhuma das concentrações testadas. Entretanto, a velocidade máxima de nado dos animais foi reduzida nos grupos expostos em comparação com o grupo controle (Figura 40.B), sendo que, para a concentração de 1000 µg/L de VLX (a mais alta do teste) houve redução estatisticamente significativa em comparação com o grupo controle ($p < 0,05$).

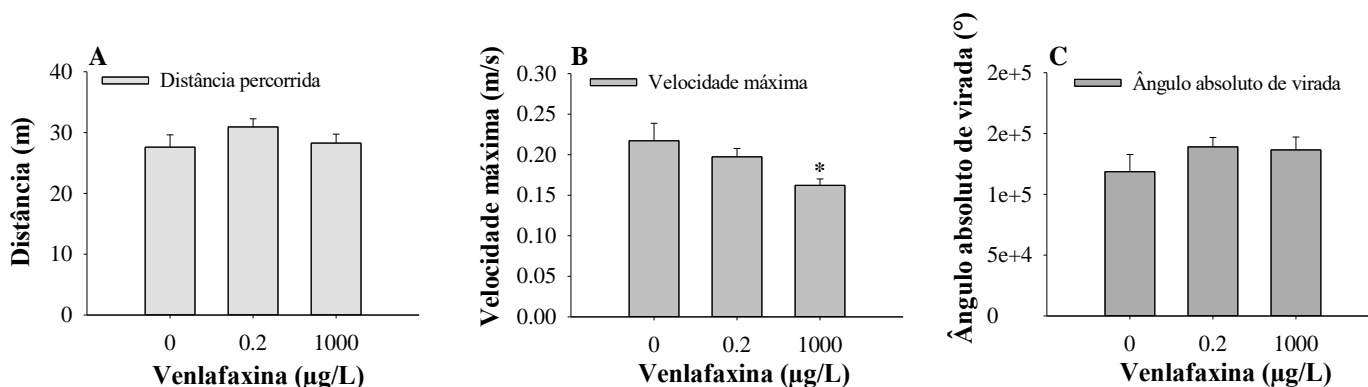


Figura 40. Parâmetros locomotores avaliados pelo teste MTN: (A) Distância percorrida; (B) Velocidade máxima; e (C) Ângulo absoluto de virada, após 28 dias de exposição às concentrações 0,2 e 1000 µg/L de VLX, em adultos. Valores médios \pm erro padrão. (*) $p < 0,05$, em relação ao grupo controle.

Ao analisarmos, pelo teste MTN, o tempo, distância, latência e número de entradas na área superior do aquário, é possível quantificar o quão fora do seu mecanismo de defesa natural o peixe se comportou. Os peixes expostos às concentrações 0,2 e 1000 µg/L de VLX, durante 28 dias, não tiveram alterações estatisticamente significativas no número de entradas na área superior do aquário, apesar de que, pela análise do gráfico (Figura 41.A), é possível perceber um padrão do aumento do número de entradas no topo do aquário nos grupos expostos em comparação com o grupo controle, além de ser possível perceber que o número de entradas foi aumentando progressivamente com o aumento da concentração do antidepressivo. O tempo gasto e a distância percorrida na área superior do aquário (Figura 41.B e 41.C), aumentam progressivamente à medida que a concentração de VLX também aumenta, sendo que, para a concentração mais elevada do teste (1000 µg/L) houve um aumento estatístico ($p < 0,05$) para os dois parâmetros, em comparação com o grupo controle. O tempo que o peixe demora para ir pela primeira vez a área superior é chamado de latência para área superior, e essa foi progressivamente menor à medida que a concentração de VLX aumentou, nos grupos expostos em comparação com o grupo controle (Figura 41.D), sendo que essa redução é estatisticamente significativa na concentração de 1000 µg/L.

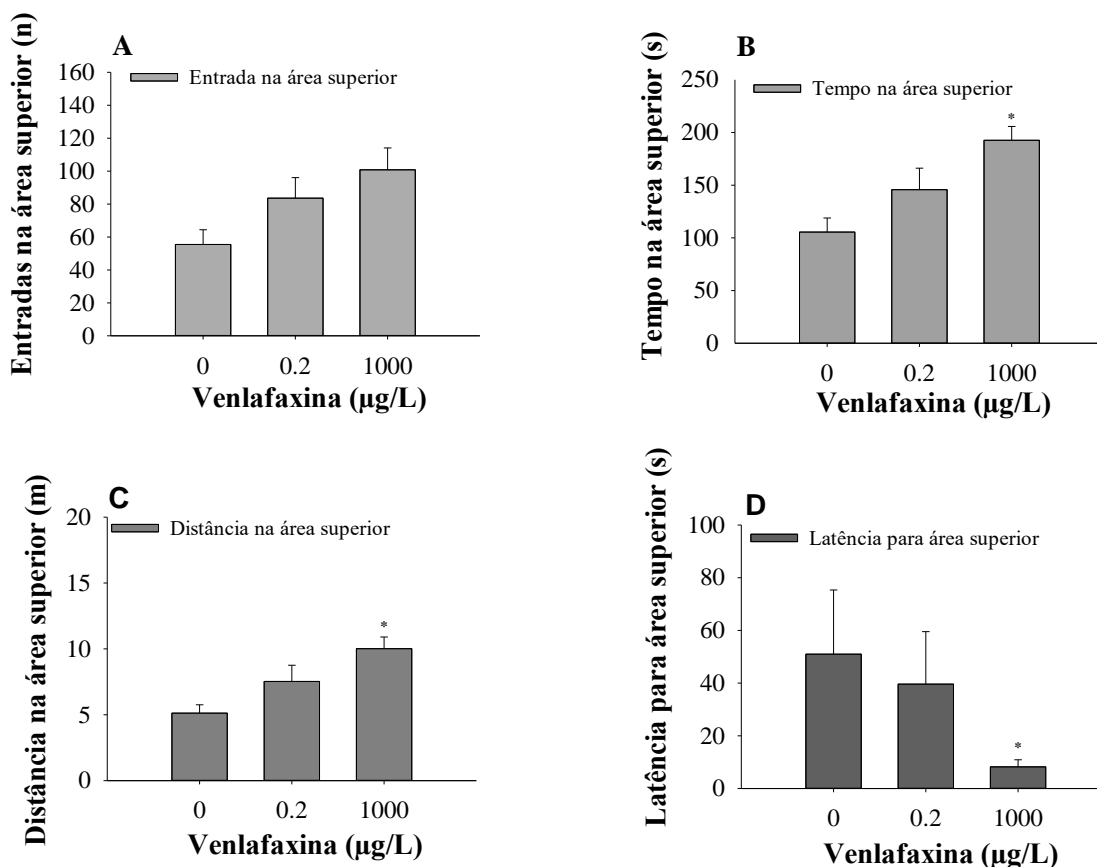


Figura 41. Parâmetros de comportamento tipo-ansioso, avaliados pelo teste MTN: (A) Entrada na área superior; (B) Tempo na área superior; (C) Distância na área superior e (D) Latência para a área superior, após 28 dias de exposição às concentrações 0,2 e 1000 µg/L de VLX, em adultos. Valores médios \pm erro padrão. (*) $p < 0,05$, em relação ao grupo controle.

O resumo do padrão locomotor dos animais durante os testes, pode ser mais facilmente visualizado pela representação do diagrama de calor (Figura 42), na qual é possível visualizar a preferência locomotora dos animais no espaço do aquário, em cada grupo tratado.

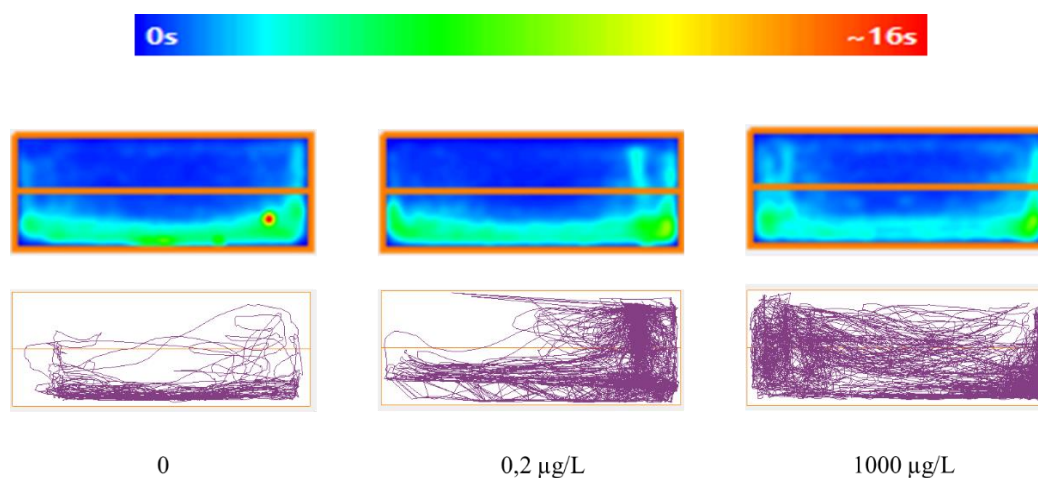


Figura 42. Diagrama de calor do posicionamento de todos os animais de cada grupo, seguido de imagens representativas da exploração vertical de 1 animal de cada grupo experimental.

5.2.4.5. Perfis cerebrais da expressão gênica

Os resultados da expressão gênica, nos cérebros dos animais, mostraram 80 genes (234 transcritos) diferencialmente expressos entre os grupos expostos (0,2 e 1000 $\mu\text{g/L}$) e o controle: na menor concentração (0,2 $\mu\text{g/L}$) foram identificados 60 genes diferencialmente expressos em relação ao controle, enquanto na maior concentração (1000 $\mu\text{g/L}$) foram detectados 43 genes diferencialmente expressos quando comparado ao controle. Houve ainda 23 genes alterados em comum a ambas as concentrações (Figura 43). Interessante notar que a concentração mais baixa e ambientalmente relevante (0,2 $\mu\text{g/L}$) foi capaz de alterar a expressão de 60 genes, e que não houve um efeito concentração-resposta no número de genes alterados, isto é, a maior concentração de VLX testada não levou a um número maior de genes diferencialmente expressos.

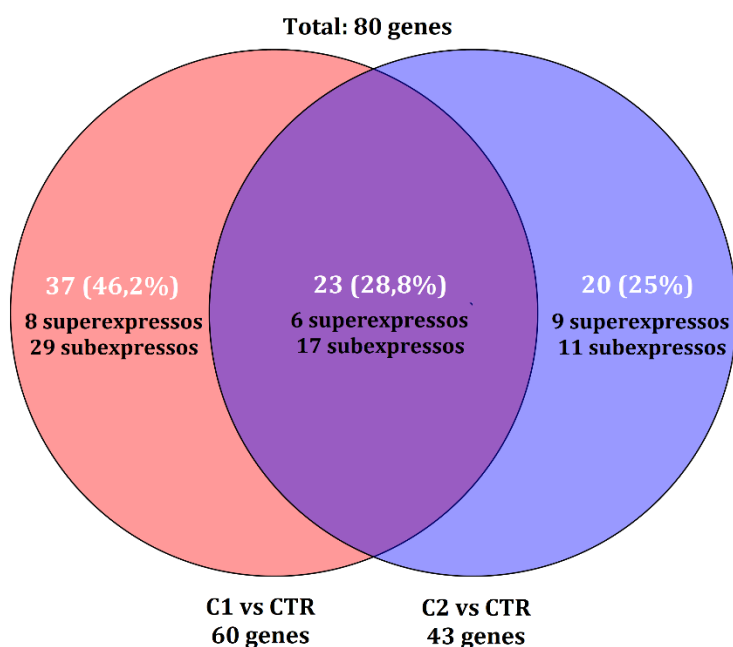


Figura 43. Diagrama de Venn mostrando os genes diferencialmente expressos entre os grupos controle (CTR) e as concentrações testadas de VLX, C1: 0,2 $\mu\text{g/L}$ e C2: 1000 $\mu\text{g/L}$.

Curiosamente, quando analisamos os genes diferencialmente expressos, é possível perceber que, nos dois grupos tratados, a exposição à VLX levou à inibição na expressão de um número maior de genes do que a hiperexpressão (Tabelas 3 e 4, Anexo). Como já descrito, ao comparar o grupo exposto à concentração 0,2 $\mu\text{g/L}$ com o controle, sessenta genes encontravam-se diferencialmente expressos, sendo que, desse montante, quarenta e seis estavam com a expressão reduzida, em comparação com 14 genes que estavam com a expressão aumentada. Quando analisamos os genes diferencialmente expressos no grupo tratado com a maior

concentração (1000 µg/L), o padrão se repete: dos 43 genes com expressão alterada, vinte e oito tiveram a expressão reduzida, enquanto 15 genes tiveram a expressão aumentada.

Com o intuito de melhor avaliar os genes que se mostraram diferencialmente expressos, foi realizada uma análise funcional *in silico*, com os genes diferencialmente expressos identificados em ambas as comparações. No grupo exposto à concentração de 0,2 µg/L de VLX, a maior parte dos genes diferencialmente expressos estão envolvidos com a atividade locomotora, ciclo circadiano, resposta a composto orgânico cíclico e regulação positiva da expressão gênica (Tabela 23). A lista completa de genes que se mostraram diferencialmente expressos, com suas respectivas funções e *fold changes*, pode ser verificada na Tabela 3 do Anexo, do presente trabalho.

Tabela 23. Funções associadas aos genes diferencialmente expressos entre a menor concentração de VLX testada (0,2 µg/L) e o grupo controle.

Identificador	Nome	Genes	Taxa de enriquecimento	p-valor
GO:0003774	Atividade motora	<i>myhb, myhz2, myhz1.3, myhz1.2</i>	24,429	< 0,001
GO:0048511	Ciclo circadiano	<i>si:ch211-132b12.7, ciarta, nr1dl</i>	23,716	< 0,001
GO:0014070	Resposta a composto orgânico cíclico	<i>rorcb, nr1dl, anxa1a</i>	12,542	0,002
GO:0010628	Regulação positiva da expressão gênica	<i>hoxb5b, hoxc6a, nr1dl, hoxb5a</i>	4,0921	0,014

Um padrão semelhante, na função dos genes, é encontrado ao analisarmos os animais tratados cronicamente à concentração de 1000 µg/L, ou seja, as vias enriquecidas indicam que os genes, diferencialmente expressos estão envolvidos no ciclo circadiano, resposta a composto orgânico cíclico e regulação negativa do processo metabólico de composto contendo nucleobase (Tabela 24). A lista completa de genes que se mostraram diferencialmente expressos, com suas respectivas funções e *fold changes*, pode ser verificada na Tabela 4 do Anexo, do presente trabalho.

Tabela 24. Funções associadas aos genes diferencialmente expressos entre a maior concentração de VLX testada (1000 µg/L) e o grupo controle.

Identificador	Nome	Genes	Taxa de enriquecimento	p-valor
GO:0048511	Ciclo circadiano	<i>per1a, si:ch211-132b12.7, nr1d2b, ciarta, nr1d1, nfil3-5</i>	64,731	< 0,001
GO:0014070	Resposta a composto orgânico cíclico	<i>rorcb, nr1d2b, nr1d1</i>	17,021	< 0,001
GO:0045934	Regulação negativa do processo metabólico de composto contendo nucleobase	<i>per1a, si:ch211-132b12.7, nr1d2b, her4.1, nr1d1, nfil3-5</i>	10,568	< 0,001

Nas análises *in silico*, outros genes importantes também apresentaram expressão diferenciada nos grupos, como é o caso de diferentes genes do grupo *HOX* (*hoxc5a* e *hoxb5b*) que estavam superexpressos, nos dois grupos expostos ($p < 0,01$) em relação ao grupo controle; e a anexina (*anxa1a*, $p < 0,001$), importante proteína envolvida nas vias de resposta inflamatória, que estava com a expressão reduzida no grupo exposto à concentração de 0,2 µg/L, em comparação com o grupo controle (Tabela 4, Anexo).

6. DISCUSSÃO

6.1. Estudo da nortriptilina

6.1.1. Mortalidade, após a exposição à NTP, nos diferentes estágios de vida de *Danio rerio*

A exposição à NTP provocou aumento na mortalidade do peixe-zebra, tanto no estágio embrio-larval, quanto no estágio adulto, resultante da exposição aguda. Não foi verificada a mortalidade no teste crônico, visto que, as concentrações escolhidas foram sabidamente não letais para que pudéssemos avaliar outros parâmetros toxicológicos. Após o teste agudo com adultos e embriões, é possível observar, em todos esses estágios de vida, um padrão semelhante da toxicidade da NTP: concentrações maiores do fármaco induziram maiores taxas de mortalidade. Ou seja, tanto para organismos larvais quanto adultos a mortalidade foi causada pela exposição à altas concentrações ao medicamento, já nas concentrações mais baixas, não foi observado o mesmo efeito. Esse resultado sugere que esse organismo-modelo, tanto na fase embrionária quanto na adulta, é sensível à nortriptilina, como resultado da toxicidade que a exposição gera. Yang *et al.*, (2014), pela mesma metodologia de exposição no estágio embrio-larval empregada neste trabalho, identificaram que a amitriptilina (molécula da qual a nortriptilina é derivada) também induziu a mortalidade dos embriões e das larvas em concentrações similares (2; 3; 5; 10; 25 e 50 mg/L) às empregadas neste trabalho (0,5; 1,1; 2,3; 4,8; 10,3; 22; 46,9 mg/L), e encontraram uma LC₅₀ de 27200 µg/L após exposição à 24 horas, resultado esse que corrobora a LC₅₀, encontrada no presente estudo, de 30369 µg/L. Sehonova *et al.*, (2017), utilizando como organismo-modelo a carpa da espécie *Cyprinus carpio*, detectou alta mortalidade, após a exposição à nortriptilina. Os autores mostraram que 500 µg/L de NTP aumentou a mortalidade nos estágios iniciais da carpa com 100% de mortalidade após 22 dias de exposição (Sehonova *et al.*, 2017). Nosso trabalho, recentemente publicado, Oliveira *et al.*, (2021), pioneiramente, detalhou à literatura científica a mortalidade de larvas de *Danio rerio* após exposição à NTP e até o presente momento, não há estudos que descrevam a mortalidade de peixes-zebra adultos após exposição aguda, o que torna os dados por nós obtidos importantes para o delineamento do panorama da toxicidade da NTP nos ecossistemas.

O organismo-modelo empregado neste trabalho se mostrou mais sensível à droga no estágio adulto que no estágio embrio-larval pois, em menor tempo de exposição (96 horas) e em menores concentrações da nortriptilina (500; 600; 800; 1100; 1400; 1800; 2000 µg/L), os animais adultos tiveram maior taxa de mortalidade em comparação com os embriões e larvas, que foram expostos por um intervalo de tempo maior (168 horas) e em maiores concentrações

(500; 1100; 2300; 4800; 10300; 22000; 46900 $\mu\text{g/L}$). A proteção física que o córion exerce, somada ao fato de os embriões não possuírem as vias metabólicas totalmente desenvolvidas (como nos adultos) são as prováveis razões da maior resistência dos embriões em comparação com os adultos (Embry *et al.*, 2010). Assim como este, outros estudos já demonstraram maior resistência dos embriões a diferentes compostos, em comparação com os organismos adultos de peixe-zebra (Li *et al.*, 2018; Sanches *et al.*, 2018; Wu *et al.*, 2018; Mu *et al.*, 2015).

Os efeitos tóxicos dos TCAs são resultado de quatro ações farmacológicas principais: (i) Inibição da recaptção da norepinefrina nos terminais nervosos; (ii) Bloqueio adrenérgico direto; (iii) Cardiotoxicidade; e (iv) Ação anticolinérgica (Kerr, McGuYe & Wilkie, 2001). Os resultados da quantificação da atividade da AChE, nas larvas e nos organismos adultos, após exposição aguda, indicam que os organismos adultos tinham menor atividade dessa enzima, quando expostos a altas concentrações de NTP, o que pode ser resultante da ação anticolinérgica, já sabida, dos TCAs (Mayer *et al.*, 2016; Nunes-Tavares *et al.*, 2002). Os efeitos anticolinérgicos da nortriptilina bloqueiam a ligação da acetilcolina aos dois tipos de receptores colinérgicos: nicotínicos e muscarínicos (Nunes-Tavares *et al.*, 2002; Snyder & Yamamura, 1977). O impedimento da ligação da acetilcolina aos seus receptores, pelos TCAs, gera um excesso desse neurotransmissor na junção neuromuscular, provocando paralisia dos músculos lisos, esqueléticos e cardíacos. Portanto, é plausível supor que parte da mortalidade observada possa ser resultado da ação anticolinérgica ocasionada pela ação da nortriptilina.

A cardiotoxicidade dos TCAs é a principal causa de morte por *overdose* em humanos (Grover *et al.*, 2012). Essa toxicidade pode ser causada por alguns fatores, mas é resultado, principalmente, da repolarização ventricular tardia, causada pela inibição do transporte de sódio, que resulta em insuficiência cardíaca potencialmente fatal (Eimon & Rubinstein, 2009; Kerr, McGuYe & Wilkie, 2001; Brennan, 1980). Neste trabalho, durante a realização do teste de toxicidade em embriões (FET), constatou-se que a NTP promoveu má-formação no sistema cardiovascular desses organismos, uma vez que se identificou diminuição dos batimentos cardíacos das larvas, em 48 horas de exposição, e edemas cardíacos a partir do segundo dia de exposição; edemas esses que precediam à morte dos organismos. Com base nesses resultados, sugere-se a cardiotoxicidade provocada pela NTP como uma das principais causas da mortalidade observada nos peixes expostos (embrio-larval e adulto) neste estudo.

A administração elevada da nortriptilina, em humanos, causa cardiotoxicidade, fato que também foi aferido nos testes feitos nesta pesquisa; e o peixe-zebra é frequentemente empregado como modelo animal para triagem de toxicidade cardiovascular *in vivo* (Lin *et al.*, 2014; Zhu *et al.*, 2014; Eimon & Rubinstein, 2009; Rubinstein, 2006), devido à alta

similaridade com os efeitos observados em humanos. Com base nessas evidências, é plausível admitir que a mortalidade do peixe-zebra (larva e adulto), em nossos experimentos, pode ser a soma da toxicidade gerada pela ação anticolinérgica e da cardiotoxicidade que fármacos TCAs, como a NTP, induzem (El-Demerdash & Mohamadin, 2004). Sehonova *et al.*, (2017), utilizando como organismo-modelo a carpa da espécie *Cyprinus carpio*, também detectou alta mortalidade, após a exposição à nortriptilina e também relacionou a elevada mortalidade encontrada aos efeitos cardiotoxícos da exposição à NTP.

6.1.2. Exposição à NTP e alteração no desenvolvimento embrionário do *Danio rerio*

Além da mortalidade e da determinação da CL_{50} , o teste do FET permite analisar possíveis efeitos subletais. Em relação a esses efeitos nas larvas expostas à nortriptilina, alguns parâmetros foram biologicamente representativos, como: alterações no equilíbrio e má formação no desenvolvimento, e merecem detalhamento.

O tempo normal de eclosão de embriões de peixe-zebra ocorre entre 48 a 72 horas após a fertilização, e a exposição à nortriptilina não foi capaz de induzir atraso na eclosão. Sehonova *et al.*, (2017) também não detectaram alterações na taxa de eclosão de embriões de *Cyprinus carpio*, após a exposição à nortriptilina, na fase embrio-larval. Não existem outros trabalhos na literatura que analisem a exposição de embriões de peixe-zebra à nortriptilina; contudo é importante destacar que Yang *et al.*, (2014), pela exposição desse mesmo organismo modelo à amitriptilina (que forma a nortriptilina como metabólito), também não encontraram efeitos na eclosão dos embriões (1, 10, 100 ng/L, 1, 10, 100 µg/L e 1 mg/L).

Os edemas cardíacos, observados nas larvas expostas à NTP no presente trabalho, provavelmente, foram causados pelo efeito cardiotoxíco da NTP, e, também provavelmente, foram determinantes para gerar as elevadas taxas de mortalidade encontradas no teste do FET. Em relação à má-formação da cauda e edema cardíaco, é interessante observar que esse tipo de má-formação precedia a morte dos organismos. Por exemplo, às 24 horas de exposição, os embriões da concentração de 22000 µg/L de nortriptilina estavam vivos, mas já apresentavam má-formação na cauda e edema cardíaco; e, em seguida, no tempo de 48 horas, todos esses embriões já estavam mortos. Esse padrão de má-formação seguido de morte ocorre até o tempo de 72 horas de exposição. Importante destacar que, no tempo de 72 h, constatou-se baixa porcentagem de indivíduos mortos na concentração de 10300 µg/L, mas 54% dos organismos vivos já contavam com má-formação na cauda e edema cardíaco, e morreram nas 24 horas seguintes, resultados que demonstram, novamente, que essa droga é capaz de causar efeitos sub-letais que irão comprometer a sobrevivência dos animais. Não há trabalhos na literatura que

reportem edema cardíaco e má-formação da cauda em embriões de *Danio rerio*, ou em outras espécies, causada pela exposição à nortriptilina ou a outros antidepressivos tricíclicos. Nesse aspecto, este trabalho é pioneiro em relatar alterações que o fármaco é capaz de provocar nesse organismo modelo nesse estágio do desenvolvimento.

A má-formação da cauda nos indivíduos é condizente com a alteração do equilíbrio, também identificada nos organismos durante o teste, uma vez que, se as larvas possuem caudas defeituosas, o equilíbrio do nado será comprometido. No ambiente, alterações no comportamento de natação das larvas podem comprometer a alimentação e a capacidade de evitar predadores, impactando diretamente na sobrevivência (Painter *et al.*, 2009). Após 96 horas de exposição, as concentrações de 1100; 2300 e 4800 $\mu\text{g/L}$ induziram alterações estatisticamente significativas no equilíbrio das larvas; assim como no tempo de 144 horas, em que todas as larvas vivas (expostas a concentrações de 500; 1100 e 2300 $\mu\text{g/L}$) apresentavam equilíbrio alterado. No tempo de 120 horas, não se apresentaram valores estatisticamente significativos, contudo, ao analisar o gráfico, constata-se que a maior parte das larvas estava com o equilíbrio afetado. Portanto, podemos inferir que, mesmo não causando morte aos organismos, a exposição a concentrações menores de nortriptilina são capazes de alterar o comportamento dos indivíduos.

Embora haja uma relação entre equilíbrio na natação e inflação da bexiga (Lindsey *et al.*, 2010), identificamos larvas com desequilíbrio com bexigas natatórias infladas e não infladas, sugerindo que outros fatores, como distúrbios neurológicos, podem contribuir para esse fenótipo. Nossos resultados da quantificação da acetilcolinesterase, nas larvas, indicaram redução da atividade enzimática nos tempos de 120, 144 e 168 horas em exposição a concentrações ainda menores que as utilizadas no teste FET, o que nos leva à hipótese de que a perda de equilíbrio das larvas também pode estar relacionada à diminuição da acetilcolinesterase nas placas motoras, além da má-formação da cauda. É plausível supor que, se a exposição a baixas concentrações da nortriptilina foi capaz de causar menor atividade da acetilcolinesterase, essa diminuição também pode estar ocorrendo após a exposição a concentrações mais elevadas, como as testadas no teste FET.

Os efeitos subletais encontrados: má-formação na cauda, alteração do equilíbrio e edema cardíaco são importantes quando pensamos no funcionamento das comunidades aquáticas. A alteração no equilíbrio do nado, resultante da má-formação da cauda, por exemplo, pode prejudicar a sobrevivência desses animais no habitat natural: larvas de peixes que têm seu equilíbrio de nado alterado estão mais suscetíveis a predadores e, portanto, sujeitas a um declínio da sua população.

6.1.3. Exposição à NTP diminuiu a atividade da enzima acetilcolinesterase em diferentes estágios de vida de *Danio rerio*

A acetilcolina (ACh) é um neurotransmissor liberado pelos neurônios na placa motora, estimulando as células musculares esqueléticas. Normalmente, a acetilcolina é eliminada rapidamente, depois de cumprida a sua função (Lionetto *et al.*, 2013). A ACh é inativada pela enzima AChE, que catalisa a acetilcolina em metabólitos inativos de colina e ácido acético. Assim, esta enzima, tem a função de, rapidamente, eliminar, da fenda sináptica, a acetilcolina liberada na sinapse - o que é essencial para o adequado desempenho da função muscular (Taylor *et al.*, 1993). Os TCAs, como a nortriptilina, têm, sabidamente, efeitos anticolinérgicos que bloqueiam os dois tipos de receptores colinérgicos: nicotínicos e muscarínicos (Nunes-Tavares *et al.*, 2002; Snyder & Yamamura, 1977), e, por essa razão, é importante entender como esses antidepressivos induzem alterações na atividade da acetilcolinesterase, uma vez que essa enzima é um importante biomarcador de neurotoxicidade.

Larvas e indivíduos adultos de *Danio rerio*, após exposição à nortriptilina, em nossos experimentos, mostraram redução da atividade da acetilcolinesterase, indicando que tal exposição se mostrou neurotóxica à esses organismos. No estágio larval, a redução da atividade de acetilcolinesterase ocorreu nos tempos 120, 144 e 168 horas, após a exposição. No tempo de 120 e 144 horas, apenas a maior concentração (500 µg/L) foi capaz de diminuir a atividade da enzima; mas, após exposição mais prolongada, no tempo de 168 horas, a inibição também ocorreu em baixas concentrações (0,088 e 1,58 µg/L). Esse resultado indica que, além da concentração, o tempo em que os organismos estão expostos à NTP é determinante para a inibição da AChE, uma vez que essa enzima apresentou menor atividade em baixas concentrações, após maior tempo de exposição. O efeito da NTP à atividade da AChE, em peixe-zebra adulto, foi quantificado no fim do teste agudo, após 96 horas de exposição. Assim como ocorrido com as larvas, os adultos, após exposição aguda, também tiveram redução estatisticamente significativa da atividade da acetilcolinesterase, em todas as concentrações de exposição (500; 600; 800 e 1100 µg/L), nas amostras de cabeça; e também na concentração de 1100 µg/L nas amostras provenientes dos músculos. Em contraste, a exposição crônica à NTP, em peixes adultos, não se mostrou capaz de induzir alterações na atividade da AChE em tecidos de cabeça e músculo. As concentrações micromolares escolhidas para realizar a exposição crônica dos organismos (0,1 e 10 µg/L) mimetizaram as mesmas já encontradas em ambientes aquáticos (Choi *et al.*, 2018; Ma *et al.*, 2018). É plausível assumir que, neste trabalho, não foram encontradas modificações na atividade da AChE, após exposição crônica, porque as concentrações foram muito baixas concentrações (0,1 e 10 µg/L) para induzir alterações desse

âmbito. Importante ressaltar que, no teste com larvas, a concentração ambientalmente relevante de 0,088 µg/L, após 168 horas de exposição, promoveu redução da atividade da enzima AChE, o que indica sensibilidade distinta, dependendo da fase de vida do peixe-zebra, resultando em alterações enzimáticas diferentes. Com base nos dados obtidos das amostras larvais e de organismos adultos, pode-se dizer que a exposição à NTP inibe a atividade da AChE e têm propriedades neurotóxicas em *Danio rerio*.

Importante registrar que não há trabalhos, na literatura científica, que demonstrem a diminuição de atividade da acetilcolinesterase em *Danio rerio*; entretanto, Nunes-Tavares *et al.*, 2002, também encontraram redução na atividade da acetilcolinesterase após a exposição do peixe *Electrophorus electricus* (populamente chamado de poraquê) à NTP e amitriptilina. A redução da atividade da AChE também foi detectada em diferentes organismos modelo, após a exposição à amitriptilina: em ratos, essa inibição foi proporcional à dose de amitriptilina, 2.5-50 mg/kg, isso é, quanto maior a concentração a que o organismo era exposto, maior era a inibição enzimática (Chappey *et al.*, 1990); assim como em rãs-touro (*Lithobates catesbeianus*) (Tiberi & Lavoie, 1985). Os estudos da amitriptilina, ajudam a elucidar os resultados encontrados, neste nosso trabalho, relativos à exposição à NTP (metabólito originado da amitriptilina), uma vez que há poucos trabalhos na literatura descrevendo os efeitos da exposição à NTP. A clomipramina, antidepressivo tricíclico, também se mostrou capaz de reduzir a atividade da AChE em cultura de células do córtex (Mavanji & Datta, 2002). A literatura científica produzida indica que há inibição da AChE por parte dos antidepressivos tricíclicos (Wang *et al.*, 2018), constatação essa, que também corrobora os dados encontrados neste trabalho.

6.1.4. Exposição aguda e crônica à NTP e efeitos genotóxicos ao *Danio rerio* adulto

Pela característica de serem constantemente liberados nos ecossistemas, deve-se considerar, entre as várias reações adversas que os antidepressivos causam aos organismos expostos, a possível ocorrência de um efeito genotóxico (Brambilla, Mattioli & Martelli, 2009). A necessidade de elucidar os efeitos da exposição a esses medicamentos se faz ainda mais latente, uma vez que alguns antidepressivos apresentaram efeitos genotóxicos em ensaios, *in vitro* (Slamon *et al.*, 2001) e *in vivo* (Elmorsy *et al.*, 2017; Hassanane *et al.*, 2012), por mais que essa correlação não tenha sido igualmente encontrada em estudos de populações humanas, com pacientes que fazem uso de tais medicamentos (Tamin *et al.*, 2006; Sternbach, 2003).

O *status* dos TCAs, como possíveis agentes indutores de danos no DNA, ainda não está claro, porque os estudos em animais e epidemiológicos fornecem resultados inconsistentes

(Tamin *et al.*, 2006). Precárias também são as elucidações dos impactos da exposição, a longo prazo, aos resíduos de antidepressivos tricíclicos (Kumar *et al.*, 2014). Entretanto, apesar de ainda não existir consenso em relação ao potencial genotóxico desses medicamentos, o fato de alguns estudos mostrarem correlação entre a exposição a antidepressivos tricíclicos e a indução de danos no DNA, já é razão suficiente para que outros estudos ecotoxicológicos busquem investigar tal informação. A administração de amitriptilina (1 mg/kg, uma vez ao dia, durante 15 dias), em camundongos (*M. musculus*), mostrou-se capaz de induzir a formação: (i) de anormalidades cromossômicas em células da medula óssea; (ii) falta total ou parcial de pareamento dos cromossomos homólogos durante a prófase meiótica, resultando em alta frequência de univalentes; e (iii) anormalidades morfológicas em espermatozoides (Hassanane *et al.*, 2012). Na presença de compostos tóxicos, os peixes geralmente respondem de maneira similar aos grandes vertebrados, incluindo os seres humanos, e, por essa razão, são organismos modelo excelentes para ensaios com substâncias químicas que possam ter potencial genotóxico (Rivero, 2007).

Linfócitos provenientes de adultos de *Danio rerio* expostos à NTP, de maneira aguda (96 horas) e crônica (28 dias), não apresentaram aumento na formação de micronúcleos e outras anormalidades nucleares e quebras no DNA, pelo teste do cometa. Os micronúcleos representam fragmentos cromossômicos ou cromossomos completos, anormalmente segregados durante a divisão celular, (Madrigal-Bujaidar *et al.*, 2008), e o teste do cometa é capaz de quantificar prováveis quebras no DNA (Zhang *et al.*, 2018); portanto, ao identificar e quantificar essas alterações, é possível saber se o antidepressivo causa danos ao DNA das células de peixe-zebra.

Os resultados deste trabalho não indicam a NTP como um agente capaz de induzir danos/quebras no DNA do peixe-zebra no estágio adulto, e, portanto, para esse organismo, tal medicamento não se revelou como agente genotóxico após exposições aguda e crônica. Nossos resultados atuais concordam com outros estudos de avaliação genotóxica. Brambilla *et al.*, (2009), em um artigo de revisão, compilaram diferentes trabalhos para identificar antidepressivos com capacidade carcinogênica, e tanto a NTP como a amitriptilina (fármaco do qual a nortriptilina é derivada) não mostraram efeitos de tal ordem em *S. typhimurium* após exposição à 500 µg/placa. A amitriptilina também não se mostrou genotóxica, *in vivo*, em *Drosophila melanogaster* (0,001-100 mM) (Schaik & Graf, 1991) e em, *in vitro*, em células de glioblastoma após exposição à 3.2-320 µM por 24 horas (Slamon *et al.*, 2001). Estudos epidemiológicos não encontraram correlação entre o uso de NTP e o aumento na incidência de

câncer de esôfago, rim (Friedman *et al.*, 2009) e câncer de mama (Tamin *et al.*, 2006), em pacientes que faziam uso de tal antidepressivo.

Os questionamentos acerca do potencial genotóxico e carcinogênico dos antidepressivos baseiam-se na capacidade desses medicamentos formarem compostos N-nitrosos (nitrosaminas e nitritos) no ambiente gástrico dos vertebrados. A NTP já foi apontada como capaz de formar compostos N-nitrosos, na presença de nitrito, em vertebrados, (Brambilla *et al.*, 2009) e, por essa razão, investigações acerca de seu potencial indutor de lesões de DNA, principalmente em uma exposição crônica, fazem-se necessárias, uma vez que o descarte desse medicamento, no ambiente, acontece de maneira contínua. Nesse cenário pouco desvendado, nossos resultados se fazem relevantes, uma vez que somam informações que podem explicar prováveis efeitos genotóxicos da NTP.

6.1.5. Danos teciduais em *Danio rerio* após exposição crônica à NTP

Uma vez que as principais vias de contaminação nos peixes são alimentação e respiração (Heath, 1997), para análise de toxicidade causada pela exposição à NTP, foram escolhidos, por nós, órgãos relacionados à essas principais vias de contaminação: fígado, rim e brânquias. O fígado é um órgão de biotransformação, com alta concentração de GSTs, enzimas com papel central na biotransformação e eliminação de xenobióticos e na defesa das células contra o estresse oxidativo (Huber, Almeida & de Fatima, 2008), representando, por isso, um bom órgão para investigação da toxicidade ambiental (Amorim, 2003). As brânquias são os primeiros órgãos dos peixes em contato com os poluentes nas águas e são responsáveis por inúmeras funções, incluindo respiração e excreção de produtos nitrogenados. Por serem particularmente sensíveis à presença de contaminantes no ambiente, as brânquias são importantes órgãos para investigação da toxicidade aquática (Barreto, 2006), e particularmente importantes para a exposição à NTP, pois esse medicamento foi capaz de formar compostos N-nitrosos na presença de nitrito, em vertebrados, (Brambilla *et al.*, 2009), um produto nitrogenado, que poderia ser eliminado pela brânquia. O rim também desempenha papel importante na regulação de íons em peixes (Kato *et al.*, 2005), e na produção de corticosteróides, sendo o principal deles o cortisol, que é liberado em situações de estresse pelo animal. O estresse crônico, resulta na liberação constante de cortisol pelos rins, podendo causar hiperplasia e hipertrofia das células inter-renais dos teleósteos (Slamon *et al.*, 2001). Poluentes dissolvidos na água, entram em contato com os tecidos dos peixes e são excretados pelos rins no processo de formação da urina (Heath, 1997), e, nesse processo, por receber grande fluxo sanguíneo, o rim é considerado um importante órgão alvo para a análise da toxicidade de poluentes (Datta *et al.*, 2009).

Na literatura científica há um maior acervo de estudos que avaliam danos histopatológicos, após à exposição a antidepressivos, utilizando camundongos como organismo modelo. Para a maior parte dos estudos, há a descrição dos efeitos desses medicamentos no fígado em comparação com os outros órgãos dos animais. Danos histopatológicos no fígado, após exposição crônica à fluoxetina (15 mg/kg/dia) e clozapina (20 mg/kg/dia), foram verificados por Zlatković *et al.*, (2014) pelo aumento da infiltração de neutrófilos expostos em relação ao grupo controle. Almansour, Jarrar & Jarrar (2018) também identificaram alterações histológicas no fígado de camundongos: degeneração hidrópica dos hepatócitos, necrose, alteração nuclear, dilatação sinusoidal, hiperplasia do ducto biliar, infiltração de células inflamatórias entre outras, após a exposição crônica (nove semanas) à sertralina (1, 2, 4, 8 mg/kg/dia). Ainda em camundongos, a administração crônica combinada de dois medicamentos utilizados no tratamento de transtornos psiquiátricos (aripirazol, 1.35 mg/kg/dia, com fluvoxamina, 9 mg/kg/dia) gerou dano hepático (Shastry, Shafeeque & Ashwathnarayana, 2013). Apesar da literatura descrever danos histopatológicos causados pela exposição à antidepressivos em camundongos, escassos são os estudos científicos que avaliam os mesmos efeitos em peixes.

Estudos de Brooks *et al.*, (2005), em peixes adultos expostos à fluoxetina e sertralina, encontrou concentrações mais altas de antidepressivos bioacumulados, nas amostras provenientes do fígado em comparação com as amostras musculares, o que indica que, para esses medicamentos, alterações morfológicas e funcionais podem ocorrer no fígado mais cedo do que em outros órgãos. Também Nowakowska *et al.*, (2020), ao analisar os efeitos da exposição a esses mesmos antidepressivos (na concentração de 25 µg/L), em *Danio rerio*, constataram que essa exposição levou a redução da taxa de proliferação das células no fígado, o que sugere que essa exposição tenha gerado dano ao fígado e redução do potencial de reparo das células desse órgão. Mais escassos são ainda estudos que avaliam outros órgãos dos peixes, além do fígado, como rim e brânquias. Exames histológicos das brânquias e rim indicaram aumento de deformações da lamela branquial e alterações nos túbulos proximais do rim pela degeneração hialina intracelular, respectivamente, em trutas arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*) expostas à sertralina (400 µg/kg/dia) (Vaclavik *et al.*, 2020).

Em nosso estudo, buscamos avaliar se a exposição crônica (28 dias), de peixes adultos de *Danio rerio*, ao antidepressivo NTP (0,1 e 10 µg/L) é capaz de gerar danos histopatológicos, como um possível efeito da toxicidade causada pela exposição à esse fármaco, e, para isso, foram analisados tecidos provenientes do fígado, rim e brânquias. Ao analisar as lâminas com esses materiais, as amostras dos três tecidos foram classificadas como “órgãos funcionalmente normais”, indicando que a exposição à NTP não foi capaz de gerar alterações histopatológicas

em peixes adultos de *Danio rerio*. Considerando que a NTP foi identificada em ecossistemas aquáticos (Ziarrusta *et al.*, 2016; Baker, Barron & Kasprzyk-Horden, 2014; Borova *et al.*, 2014) e diante, do já posto cenário problemático da contaminação ambiental desse fármaco, bem como os efeitos que ele pode acarretar aos organismos expostos, a ausência de danos histopatológicos tem caráter positivo. Até a presente data, não há, na literatura científica, estudos que avaliem possíveis danos histopatológicos causados pela exposição à NTP, e, diante desse cenário, nosso estudo mostra as primeiras análises desse parâmetro, indicando que em concentrações ambientalmente relevantes há poucas chances de peixes desenvolverem alterações histopatológicas causadas exclusivamente pela exposição à NTP. Sabemos, entretanto, que outros experimentos e análises histológicas devem ser realizadas, para que essa afirmação seja pautada em um montante maior de dados científicos e sistematizados, fornecendo um suporte teórico mais substancial para essa conclusão de nosso estudo.

6.1.6. A exposição à NTP e alteração no comportamento natatório em diferentes estágios de vida, do *Danio rerio*

As moléculas-alvo da NTP, os transportadores de serotonina e norepinefrina (Choi *et al.*, 2018), são conservadas em táxons vertebrados (Caveney *et al.*, 2006) e, portanto, a NTP tem o potencial de afetar uma gama diversificada de comportamentos ecologicamente importantes na vida selvagem (Gillman, 2007; Oliveira *et al.*, 2021). No presente estudo, o teste de comportamento locomotor em *Danio rerio*, no estágio larval, mostrou que, de maneira geral, a exposição à NTP altera o padrão de deslocamento dessas larvas. Quando expostas a 500 µg/L de NTP mostraram uma distância total percorrida (DTP) significativamente menor do que o grupo controle após 120, 144 e 168 h; e diminuição significativa na DTP em organismos expostos à 28,12 µg/L NTP após 144 e 168 h, quando comparados ao controle. As larvas também apresentaram o tempo total de nado (TTN) reduzido: após exposição à 28,12µg/L de NTP por 144 e 168 h; à 500 µg/L de NTP após 120 e 144 h; e à 0,006 µg/L de NTP após 144 h de exposição. O comportamento das larvas, em termos de movimentos curtos e longos, também mudou após exposição à NTP em concentrações ambientalmente relevantes. Observamos: redução dos movimentos curtos e aumento dos movimentos longos nos animais expostos à menor concentração de NTP (0,006 µg/L) após 120, 144 e 168 h; redução significativa nos movimentos curtos e aumento nos movimentos longos após 120 h de exposição à 0,088 µg/L. Já no teste crônico (28 dias), com adultos, tal antidepressivo também foi capaz de alterar o comportamento natatório desses animais após exposição à concentração de 10 µg/L de NTP, levando a aumento no tempo de nado no topo do aquário. Portanto, nossos resultados apontam

que a exposição, na fase larval e fase adulta à NTP, é capaz de causar alterações no padrão de nado do peixe-zebra.

Os testes de exposição com larvas e adultos, desenvolvidos no presente estudo, testam algumas concentrações, de NTP, semelhantes às já encontradas no meio ambiente, uma vez que nos ecossistemas aquáticos, os animais estão expostos aos antidepressivos em baixas concentrações. As mudanças no padrão motor das larvas expostas à NTP sugerem que a exposição a tal antidepressivo alterou a homeostase desses animais em um estágio inicial de vida, levando à uma série de modificações fisiológicas que resultaram em mudanças no padrão motor geral por nós quantificadas. Tais alterações locomotoras no estágio larval, podem, no meio ambiente, comprometer o sucesso na sobrevivência e no crescimento dos indivíduos. Adicionalmente, alterações comportamentais também foram identificadas nos organismos adultos que, quando expostos à NTP, passaram mais tempo na camada superior do aquário, em comparação com o grupo controle, o que indica que os animais estavam com ansiedade reduzida, pois é esperado que o peixe-zebra adulto, ao ser colocado em um tanque novo, permaneça inicialmente no fundo e se habitue lentamente ao resto do tanque, como uma resposta antipredatória e defensiva (Haghani *et al.*, 2019). Portanto, esses animais expostos à NTP, ao passarem mais tempo no topo do aquário, em comparação ao grupo controle, indicam que tal exposição causou efeitos ansiolíticos (induzindo à calma) nesses animais, alterando comportamentos cruciais para a sua sobrevivência. Curiosamente, esse fenótipo observado foi dependente da concentração. Os dados obtidos, a partir da avaliação do comportamento das larvas e dos adultos, são complementares e juntos sugerem que a exposição à NTP gera efeitos ansiolíticos, resultando em alterações nos mecanismos controladores do nado do peixe-zebra.

Interessantemente, peixes-zebra adultos expostos à NTP, na mesma concentração empregada por nós no teste com adultos (10 µg/L), mas por um tempo menor (sete dias), em comparação ao nosso trabalho, também gastaram mais tempo nadando nas camadas superiores, em comparação ao grupo controle, indicando que tempos reduzidos de exposição à NTP também podem causar tal efeito ansiolítico nesse organismo modelo (Marcon *et al.*, 2016). Como já publicado pelo nosso grupo (Oliveira *et al.*, 2021) e apresentado no presente trabalho, a exposição à NTP, no estágio larval (*D. rerio*), também foi capaz de diminuir a eficiência de deslocamento das larvas, em concentrações que já foram detectadas no ambiente (0,006 e 0,08 µg/L), o que nos leva a acreditar que, provavelmente, a alteração no comportamento natatório é um efeito subletal, causado pela exposição à NTP em *Danio rerio* e, possivelmente, em outros peixes. Até o presente momento, apenas Oliveira *et al.*, (2021) e Marcon *et al.*, (2016) descreveram, na literatura científica, alterações comportamentais no nado de peixe-zebra como

consequência da exposição à NTP. Sendo que o primeiro grupo, provou, pioneiramente, que tais alterações ocorrem em concentrações já detectadas no ambiente, fato que indica a periculosidade de tal substância à biota aquática.

A exposição a amitriptilina também se mostrou capaz de causar alterações no nado de peixes-zebra, em diferentes tempos de exposição e etapas do ciclo de vida, similares com as geradas pelo seu metabólito ativo (NTP): aumento do tempo de nado no topo do aquário e diminuição da velocidade de nado em adultos, após exposição às concentrações de 1 e 5 mg/L, durante 20 minutos (Demin *et al.*, 2017); diminuição da velocidade e da distância total percorrida em adultos, após 14 dias de exposição à concentração de 50 µg/L, e também, assim como no presente estudo, aumento significativo do tempo gasto no topo do aquário, em comparação ao grupo controle (Meshalkina *et al.*, 2018); e, em larvas, houve a redução da distância total percorrida após 144 h de exposição às concentrações de 300 e 3000 µg/L (Sehonova *et al.*, 2019), padrão esse similar ao encontrado nas larvas, após a exposição à NTP, como descrito por Oliveira *et al.*, (2021). Essa correspondência nas alterações locomotoras de peixe-zebra, após exposição à amitriptilina e a seu metabólito ativo, NTP, provavelmente se dá pela semelhança na estrutura molecular dos fármacos que atuam nas mesmas vias de inibição de recaptação de neurotransmissores (Demin *et al.*, 2017).

Os efeitos comportamentais da exposição à NTP em peixes, identificados na literatura científica e em nosso trabalho, está de acordo com o fato de que sistemas monoaminérgicos, especialmente os serotoninérgicos, interferem nas vias de ansiedade (Tovote, Fadok & Lüthi, 2015), e tal exposição a esse inibidor de recaptação de serotonina, NTP, resultaria em mudanças na condução sináptica (Santarelli *et al.*, 2003), podendo causar as referidas alterações comportamentais em larvas e adultos. O uso contínuo de antidepressivos serotoninérgicos, como a NTP, pode promover atividade serotoninérgica excessiva, que por sua vez pode desencadear o aparecimento de um quadro patológico denominado de hiperserotonemia ou ainda “síndrome da serotonina (SS)”, uma condição tóxica grave, potencialmente fatal, causada por excesso de atividade serotoninérgica no cérebro (Bartlett, 2017; Demin *et al.*, 2017). Em humanos, tal patologia causa alterações nas células musculares, como rigidez, incoordenação motora (ataxia) e arritmia (Gillman, 2006; Bartlett, 2017), e o peixe-zebra, por possuir um sistema serotoninérgico bem desenvolvido, funcionalmente semelhante aos mamíferos (Stewart *et al.*, 2011), constitui um bom modelo para estudar fenótipos relacionados à hiperserotonemia, sendo que, a hipolocomoção e a habitação superior no aquário (“*surfacing behavior*”, comportamento de superfície) são os principais comportamentos observados nos animais expostos a antidepressivos serotoninérgicos (Stewart *et al.*, 2013). Pautados em tais conhecimentos

científicos, podemos supor que a exposição à NTP, em *D. rerio*, possa ter gerado descontrole na inibição da recaptação da serotonina, desencadeando algum grau de hiperserotonemia nesses animais, o que gerou consequências na regulação das vias de ansiedade. A junção desses desequilíbrios neurofisiológicos, resultou no comportamento natatório alterado do peixe-zebra, descritos por nós: hipolocomoção nas larvas e comportamento de superfície (“*surfacing behavior*”) nos adultos, o que converge com os dados da literatura científica. Para validar essa hipótese de um fenótipo semelhante ao causado pela SS, após exposição à NTP nos peixes, é necessária a detecção dos níveis de serotonina extracelular nesses animais; como já realizado em camundongos com comportamentos da SS, após tratamento com medicamento que aumentam os níveis de serotonina (Fox *et al.*, 2008).

Por fim, é válido pontuar que, no presente estudo, o teste de expressão gênica mostrou que a exposição à concentração de 10 µg/L de NTP causou a expressão diferencial de genes do comportamento em comparação ao grupo controle; o que nos leva a supor que as alterações locomotoras, por nós verificadas, possam ser resultado das alterações na expressão de genes comportamentais somadas às alterações nos processos fisiológicos da serotonina desencadeadas pela NTP. Supomos que essas alterações, somadas, levaram às mudanças fenotípicas no nado e no comportamento desses animais. Nesse sentido, o presente estudo demonstra que a exposição à NTP foi capaz de alterar o padrão comportamental de peixe-zebra, não só pelas alterações locomotoras verificadas como também pelas alterações em genes que controlam o comportamento desses animais.

6.1.7. Exposição crônica à NTP e a expressão diferencial de genes em amostras cerebrais de *Danio rerio*

Até o momento, mais de 600 produtos farmacêuticos foram detectados no meio ambiente em todos os continentes (Tan *et al.*, 2020). Peixes são excelentes modelos para estudar o impacto e as respostas da exposição à essas substâncias poluentes, uma vez que são sensíveis às variações ambientais (Mitra *et al.*, 2020) e apresentam homologia de genes, processos fisiológicos e vias bioquímicas com os seres humanos, fornecendo informações sobre os efeitos de poluentes não só para os peixes como também para a população humana (Thomas & Klaper, 2012). Buscando esclarecer prováveis efeitos tóxicos da exposição à NTP ao organismo modelo *Danio rerio*, bem como elucidar prováveis efeitos de desregulação gênica no sistema nervoso desses animais, investigações no transcriptoma do cérebro desses animais foram realizadas. A partir de tal análise, no presente estudo, foram identificados um total de 243 genes diferencialmente expressos entre os grupos teste e o controle: sendo 66 genes entre os animais expostos à menor concentração (0,1 µg/L) e o controle e 184 genes entre os expostos à maior

concentração (10 µg/L) e o controle. Dos 243 genes diferencialmente expressos, sete estão com expressão diferenciada nas duas concentrações (0,1 e 10 µg/L) e são genes relacionados a proteínas transportadoras (*zgc:172122* e *slc12a10.3*) e funcionamento do encéfalo (*si:ch73-7i4.2*, *si:ch211-181d7.1*, *si:ch211-181d7.3*, *si:ch211-233m11.1* e *tcra-v54*), como esperado pelo mecanismo de ação da NTP. Vale ressaltar que a concentração ambientalmente relevante (0,1 µg/L), mesmo sendo tão baixa, foi capaz de causar alterações em vias gênicas importantes, como regulação do encéfalo, no peixe-zebra.

Interessante observar que, diferentemente da exposição ao outro antidepressivo de estudo desse trabalho (VLX), as alterações nos perfis de expressão gênica, após exposição à NTP, parecem seguir um padrão concentração-dependente, uma vez que, na concentração de 0,1 µg/L há menos genes alterados em comparação com a maior concentração testada 10 µg/L. Ainda em comparação com a VLX, a exposição à NTP desencadeou um número maior de genes alterados. Não há, na literatura científica, trabalhos que analisam o perfil de expressão gênica do *Danio rerio*, após exposição à NTP, assim, a avaliação feita no presente estudo, traz, pela primeira vez, tais informações de toxicidade.

Quando realizamos as análises de enriquecimento de vias, encontramos diferenças quanto às principais vias alteradas em cada grupo exposto (0,1 e 10 µg/L). As análises, *in silico*, das amostras cerebrais expostas à concentração de 0,1 µg/L de NTP, revelaram três importantes vias com grande quantidade de genes diferencialmente expressos: atividade de fatores de transcrição de ligação ao DNA, ligação ao íon cálcio e atividade de oxidoredutases. Fatores de transcrição são proteínas que se ligam ao DNA para permitir a ligação deste com a enzima RNA-polimerase, promovendo a transcrição e a futura tradução de um gene, ou seja, fatores de transcrição auxiliam na regulação da expressão de um gene, permitindo que ele esteja “ativo” ou “inativo” (Pelster & Egg, 2018). Assim, a exposição à concentração de 0,1 µg/L de NTP, ao alterar a expressão de genes relacionados ao controle dos fatores de transcrição, desencadeou alteração na expressão de vários genes, como verificado neste experimento, e, por essa razão, essa alteração de genes de fatores de transcrição nos ajuda a esclarecer os possíveis mecanismos pelos quais a referida exposição foi capaz de promover a indução e a inibição de 243 genes. A alteração na expressão de genes de ligação ao íon cálcio, em consequência da exposição à concentração de 0,1 µg/L de NTP, pode ter causado desregulação, de maneira sistêmica, em processos fisiológicos dos peixes, dos quais esse elemento participa: formação dos ossos, dentes, escamas, coagulação do sangue, desenvolvimento e crescimento do sistema esquelético, muscular e sistema enzimático (Haverinen *et al.*, 2018). Obviamente que o fato de genes, das amostras cerebrais dos peixes expostos estarem com expressão diferencial, em relação ao grupo

controle, não resultará necessariamente em alterações fisiológicas significativas e detectáveis. Entretanto, como não há trabalhos na literatura, que relacionem a exposição à NTP e alterações em genes de receptores de cálcio, tal resultado se faz importante, justamente por auxiliar no delineamento da provável toxicidade da exposição a longo prazo à NTP em baixas concentrações, o que acontece no meio ambiente. E por fim, a expressão diferencial em genes relacionados às enzimas de oxirredução, mostrou que a exposição à concentração de 0,1 µg/L de NTP, foi capaz de alterar a homeostase no controle da oxidação de espécies químicas reativas, que, muito provavelmente, foram geradas pela exposição à NTP uma vez que essa alteração não foi verificada no grupo controle. Uma das enzimas de oxirredução com expressão significativamente reduzida ($p < 0,05$), por nós verificada, foi a ciclooxigenase (COX). Assim, o fato de a isoforma COX-2, que é formada em sítios de lesão/inflamação e expressa constitutivamente no sistema nervoso central, já ter sido encontrada com a expressão inibida pela exposição à concentração de 10 µg/L NTP, em amostras cerebrais de peixe-zebra (Marcon *et al.*, 2016), corrobora os resultados por nós encontrados. Em células tumorais de camundongos, a exposição à NTP foi capaz de aumentar a produção das espécies reativas de oxigênio (Yuan *et al.*, 2015) indicando que a exposição a esse medicamento pode alterar as vias de oxirredução celular, o que também corrobora os achados do presente estudo, no que concerne a genes diferencialmente expressos envolvidos nessas vias.

Ainda nas amostras cerebrais expostas à concentração de 0,1 µg/L, verificamos também que dois genes associados ao comportamento, *npas4a* e *fosab*, estavam com expressão significativamente reduzida nessa concentração, em comparação ao grupo controle. O gene *npas4* (proteína 4 do domínio PAS-neuronal) é um fator de transcrição, dependente da atividade neuronal, que regula a transcrição de genes que controlam o desenvolvimento da atividade cerebral e plasticidade sináptica (Lopes, Abril-de-Abreu & Oliveira, 2015; Ploski *et al.*, 2011) e que também vem sendo descrito como atuante na formação de memória de longo prazo, aprendizagem (Hawk & Abel, 2011; Ramamoorthi *et al.*, 2011) e de medo (Ploski *et al.*, 2011). No peixe-zebra o gene *fosab* (*c-fos*) é expresso logo após a percepção de um estímulo e é considerado um indicador confiável de atividade neuronal, bem como um marcador da resposta ao estresse (Stewart *et al.*, 2014) e, mais recentemente, foi descoberto seu papel na recuperação de memória (Samaras & Pavlidis, 2020). Peixes-zebra adultos, após passarem por uma situação teste para verificar aprendizagem e memória a um agente estressor, tiveram comportamento locomotor “ansioso” (maior tempo de nado no fundo do aquário) e alteração hormonal (aumento do cortisol) acompanhada por aumento na expressão de *fosab*, indicando que esse gene participa da recuperação da memória relacionada às respostas comportamentais e

hormonais ao estresse (Samaras & Pavlidis, 2020). Esse mesmo organismo modelo após ser submetido, de maneira crônica (28 dias), a um contaminante ambiental (tributilestanho) teve aumento no comportamento agressivo, comportamento locomotor “ansioso” e aumento na expressão de *c-fos* (Liu *et al.*, 2020). Tais resultados sugerem que a expressão de *fosab* é modulada por situações de estresse que o peixe-zebra precisa lidar em sua rotina, seja ela por um estímulo visual ou por substâncias contaminantes, o que corrobora os resultados do presente trabalho, visto que a alteração em *fosab*, nas amostras do cérebro de peixes, foi justamente resultado de um episódio estressante: a exposição à concentração de 0,1 µg/L de NTP; o que pode ter desencadeado, nesses animais, algum grau de estresse fisiológico, levando à alteração desse gene. Interessante notar que, mesmo os testes comportamentais não mostrando alterações estatisticamente significativas entre o padrão de nado dos organismos expostos à concentração de 0,1 µg/L de NTP e controle, a avaliação do genoma revelou que os genes *npas4a* e *fosab*, que interferem no comportamento locomotor “ansioso” do peixe-zebra, estavam com a expressão reduzida, em comparação ao controle, sugerindo que esses animais, como resultado da exposição à NTP em concentrações bem baixas, podem sim, sofrer algum grau de distúrbio no controle do seu comportamento natatório.

O enriquecimento das vias, nas amostras cerebrais dos peixes expostos à concentração de 10 µg/L de NTP, mostrou quantidade maior de genes alterados em comparação com a menor concentração-teste, sendo que majoritariamente as funções alteradas foram aquelas relativas à atividade de oxidoredutases e transportadores de membrana, geração de metabólitos precursores e energia, resposta imune, organização mitocondrial e comportamento locomotor. É possível perceber que, tanto na menor (0,1 µg/L) como na maior (10 µg/L) concentração usadas no teste, genes de oxidoredutase estavam alterados, o que indica que, provavelmente, houve um descontrole dos sistemas de defesa antioxidante, que é um provável efeito da exposição à NTP em peixe-zebra. Tal descontrole pode gerar a produção mais alta de radicais livres o que, por sua vez, pode levar ao estresse oxidativo nas células, conduzindo à oxidação de biomoléculas, com consequente perda de suas funções biológicas e/ou desequilíbrio homeostático (Barbosa *et al.*, 2010). Como já mencionado anteriormente, estudos científicos demonstram a relação entre exposição à NTP com estresse oxidativo (Yuan *et al.*, 2015). Diante do fato de que tal exposição se configura como um estresse ao peixe (vide resultados do presente trabalho), é esperado que essa exposição gere danos oxidativos nesses animais, uma vez que o estresse fisiológico aumenta a quantidade de radicais livres nas células (Barbosa *et al.*, 2010). Um dos genes com expressão aumentada, na via de atividade de oxidoredutases, foi *cyp4t8*, e a família CYP, que, nos humanos, controla a metabolização hepática de medicamentos, via

citocromo P450 (CYP), e as isoformas (*CYP2C19*, *CYP2D6*) são, uma das principais enzimas na metabolização da NTP nos humanos (Bhasi *et al.*, 2004; Steimer *et al.*, 2004; Venkatakrisnan, von Moltke & Greenblatt, 2000), o que corrobora a hipótese de que a exposição à concentração de 10 µg/L de NTP, foi tóxica a esses organismos, levando ao aumento da expressão dos genes relacionados à metabolização desse medicamento que, pela contínua exposição, acabou aumentando também a expressão de outros genes nas vias de oxirredução. Tal constatação nos leva a supor que a expressão diferencial nas vias gênicas de transportadores de membrana, na geração de metabólitos e energia e na organização mitocondrial, que aparecem nas vias de enriquecimento, possam ser resultado dessa tentativa fisiológica de eliminação da NTP, em elevada concentração (10 µg/L), visto que, muitos dos genes que se mostraram alterados nessas vias, como *cox8a*, *cox7c*, *cox6c*, resultam em proteínas relacionadas com processos de oxidações e reduções (Lin *et al.*, 2018).

Ainda, ao analisarmos as vias de transportadores de membrana, a geração de metabólitos e de energia e a organização mitocondrial, encontramos diferentes genes com expressão aumentada; tais genes exercem funções no sistema nervoso, a exemplo do *kcnj13*: papel fundamental na transmissão sináptica (Podobnik *et al.*, 2020), e do *slc36a4* e *slc7a5*: transportadores de serotonina na membrana (Quaak *et al.*, 2012). Esse aumento indica que, provavelmente, a NTP estava inibindo a recaptação de serotonina na membrana neuronal, ocorrência que acaba por interferir na transmissão sináptica e desencadeou aumento na expressão desses genes, como um possível mecanismo de compensação dessa via, bloqueada pela ação da NTP. Essa constatação sugere ainda que o referido antidepressivo parece ter agido nos peixes, em vias homólogas às quais agem nos humanos.

Além desse conjunto de genes a exposição à concentração de 10 µg/L de NTP foi capaz de promover diminuição na expressão de genes relacionados com o sistema imunológico do peixe-zebra. Tal relação de exposição à NTP e desregulação de genes das vias inflamatórias já foi identificada: em camundongos após exposição por 14 dias e 30 dias, à 4 mg/kg/dia (Malki *et al.*, 2017) e à 25 mg/kg/dia de NTP, respectivamente (Carboni *et al.*, 2010); e em *Danio rerio* expostos por 7 dias à 0,01 mg/L de NTP (Marcon *et al.*, 2016), o que corrobora nossos resultados. De maneira particular, os genes das isoformas da ciclooxigenase (*cox*), que desempenham função nas vias inflamatórias, foram identificados, no presente estudo, com expressão diferencial, e também por outros autores, após exposição à NTP (Marcon *et al.*, 2016; Marchetti *et al.*, 2020) o que mostra que provavelmente essa seja uma via frequentemente alterada pela exposição à NTP.

Uma via de genes diferencialmente expressa, que chama atenção pela complementariedade que exerce, em outro teste desenvolvido no presente trabalho, foi a dos comportamentos locomotores. Isso porque tanto os dados comportamentais como os de expressão gênica convergem para o mesmo diagnóstico: a exposição à concentração de 10 µg/L de NTP induz alterações comportamentais verificadas pelos aspectos locomotor e gênico, respectivamente. Como já discutido anteriormente, a exposição à concentração de 10 µg/L de NTP levou a aumento no tempo de nado dos peixes expostos no topo do aquário, o que indica que os animais estavam com um comportamento mais relaxado após tal exposição. Os dados de transcriptômica nos permitem inferir que tais alterações comportamentais foram resultado da ação da NTP no sistema nervoso dos animais, o que culminou em alterações em genes envolvidos com o comportamento. Uma vez que a NTP é um antidepressivo que bloqueia a ação da serotonina: neurotransmissor cuja função, entre outras, é controlar o estado de excitação do indivíduo (Melo *et al.*, 2012), as alterações em genes comportamentais são condizentes. Apenas Marcon *et al.*, (2016) relatam resultados sobre mudanças no comportamento de peixes-adultos após exposição à NTP. Esse grupo de pesquisadores testou uma concentração idêntica a nossa (10 µg/L) e, assim como nós, verificaram aumento no comportamento ansiolítico do peixe-zebra (mais tempo e maior número de entradas na camada superior) após exposição; contudo, tal grupo não avaliou alterações genéticas, ao contrário do presente estudo que, pela primeira vez na literatura científica, aborda tais parâmetros na avaliação da toxicidade crônica da NTP.

6.2. Estudo da venlafaxina

6.2.1. Exposição à venlafaxina e seu efeito na sobrevivência do *Danio rerio*

Os diferentes estágios de vida do peixe-zebra mostraram sensibilidade similar ao antidepressivo venlafaxina: concentrações inferiores a 100000 µg/L no teste agudo, com larvas e adultos, não foram capazes de promover a morte significativa dos organismos. Para a realização do teste da toxicidade em embriões (FET) foram selecionadas concentrações mais altas com o intuito de delimitar uma CL₅₀, e, como resultado de tal experimento, constatamos que após 144 horas de exposição, a CL₅₀ foi de 317500 µg/L e, após 168 horas de exposição, a CL₅₀ foi de 274100 µg/L. De maneira geral, as concentrações que induziram mortalidade dos embriões e larvas foram as concentrações de 177900; 237300; 316400; 421800; 562500; 750000; 1000000 µg/L, e foi possível constatar que houve um crescente da mortalidade à medida que aumentava tempo e as concentrações de exposição, fato que permite afirmar que a

exposição de *Danio rerio* à VLX segue o padrão concentração/tempo dependente (Freitas *et al.*, 2017).

VLX é uma molécula que se mostrou capaz de bioacumular em peixes *Misgurnus anguillicaudatus* (Dojô), o que indica que, quanto maior o tempo e a quantidade do fármaco a que o organismo é exposto, maior será a toxicidade gerada por essa exposição (Qu *et al.*, 2019). Peixes *Pimephales promelas* expostos às concentrações de 0,88, 8,8 e 88 µg/L de VLX, durante todo o seu ciclo de vida (163 dias) (Parrott & Metcalfe, 2017), e embriões de peixes-zebra expostos às concentrações de 0,5 e 10 µg/L de VLX (Galus *et al.*, 2013) não tiveram a sua sobrevivência afetada pela exposição; isso indica que, em concentrações ambientalmente relevantes, esse antidepressivo não é capaz de alterar a sobrevivência de algumas espécies de peixe (Parrott & Metcalfe, 2017; Galus *et al.*, 2013).

Em outros organismos aquáticos, algas verdes (*Pseudokirchneriella subcapitata*) e dáfnia (*Daphnia magna*), valores de EC₅₀, para exposição à VLX, foram estabelecidos em 47,58 mg/L, para toxicidade, e 141,28 mg/L, para imobilidade, respectivamente (Di Poi *et al.*, 2018). Esse fármaco também foi capaz de levar a morte dos componentes fototróficos de biofilmes de água doce após 72 horas de exposição à 50 µg/L (Freixa *et al.*, 2018). Além de bactérias, algas e animais, a VLX também se mostrou tóxica à um organismo do Reino Plantae, a samambaia (*Polystichum setiferum*), pois induziu alterações na atividade de biomarcadores de viabilidade celular após 24 e 48 horas de exposição às concentrações de 10 e 1000 µg/L de VLX (Feito, Valcárcel & Catalá, 2013).

Ao analisar os efeitos da exposição de diferentes organismos à VLX, é possível perceber que essa substância se mostra tóxica aos seres vivos que não são organismos-alvos desse medicamento. Fato esse que, da perspectiva ecotoxicológica, é preocupante uma vez que essa substância se encontra nos ecossistemas e interage com os componentes bióticos deles, podendo desencadear, desde efeitos subletais, como alterações comportamentais, até a morte dos indivíduos nas comunidades. Estudos ecotoxicológicos adicionais são necessários para melhor definição do panorama de toxicidade que a VLX, poluente emergente, pode causar nos seres vivos expostos. Nesse sentido, o presente trabalho, ao trazer análises de múltiplos parâmetros, após a exposição de *Danio rerio* a esse medicamento, busca contribuir para que se conheça melhor esse panorama.

6.2.2. Vias celulares de neurotransmissão, metabolismo de energia, biotransformação e estresse oxidativo foram alteradas pela exposição à VLX

A exposição do *Danio rerio* à VLX foi capaz de alterar os padrões da atividade de biomarcadores enzimáticos, em diferentes estágios de vida: larval e adulto, após exposição

aguda e crônica. Nas larvas, alterações estatisticamente significativas foram encontradas para todos os biomarcadores enzimáticos de toxicidade escolhidos: redução da atividade da enzima acetilcolinesterase, redução da atividade da enzima GST e aumento da atividade da enzima LDH. Quando analisamos os indivíduos adultos, submetidos à exposição aguda (96 horas) à VLX, identificamos o seguinte: não ocorreram alterações estatisticamente significativas na enzima AChE, nas amostras da cabeça ou músculos; a enzima GST, nas amostras de cabeça, estava reduzida de maneira estatisticamente significativa, em relação ao grupo controle, ao passo que amostras musculares exibiram aumento estatisticamente significativo da atividade dessa enzima, em comparação com o grupo controle; e a atividade da enzima LDH se mostrou estatisticamente aumentada nos tecidos provenientes da cabeça. Ainda analisando os indivíduos adultos, verificamos que a exposição crônica (28 dias) à VLX, de maneira correspondente à exposição aguda, não foi capaz de alterar, estatisticamente, os padrões da atividade da enzima AChE; diferentemente das enzimas GST e LDH, que, assim como foram alteradas após exposição aguda também tiveram atividade aumentada no teste crônico. Ao analisarmos conjuntamente os dados bioquímicos, nos diferentes estágios de vida e em tempos de exposição diferentes, constatamos que a exposição à VLX é capaz de alterar o padrão enzimático dos biomarcadores avaliados, o que, por sua vez, pode indicar que a exposição a essa droga pode estar causando alterações celulares bioquímicas em importantes vias relacionadas à neurotransmissão, metabolismo de energia, biotransformação e estresse oxidativo em *Danio rerio*.

Uma vez que já é sabido e bastante descrito na literatura científica que alguns poluentes ambientais, inibem AChE, a avaliação da atividade dessa enzima é um excelente biomarcador para avaliação de toxicidade de uma determinada substância ao sistema nervoso de um organismo (Lionetto *et al.*, 2013). No presente estudo, a exposição ao antidepressivo VLX foi capaz de causar inibição da atividade da AChE em larvas expostas às concentrações de 1000, 25000 e 100000 µg/L de VLX. Embriões de peixe-zebra expostos, durante 72 e 120 horas, a diferentes concentrações de fluoxetina (0,1; 1; 10; 100 e 1000 µg/L) tiveram aumento na atividade de AChE, em comparação com o grupo controle, desde as concentrações mais baixas (ambientalmente relevantes) até as concentrações mais altas. Além das larvas, a fluoxetina também foi capaz de induzir o aumento na atividade de AChE, em organismos adultos, como em *Carassius auratus* (carpas), após exposição aguda, seis dias, à concentração de 0,1 µg/L (Pan *et al.*, 2018) e também em *Pseudorasbora parva* (gobião), após 42 dias de exposição à concentração de 50 µg/L (Chen *et al.*, 2018), indicando que esse antidepressivo parece interferir na AChE, em concentrações ambientalmente relevantes, independente do estágio de vida e do

tempo de exposição (Pan *et al.*, 2018). Outro antidepressivo, a sertralina que, assim como a fluoxetina, inibe a recaptção de serotonina, mostrou-se capaz de aumentar a atividade de AChE em *Carassius auratus* (carpas) adultos, após um, dois, quatro e sete dias de exposição à concentração de 4,36 µg/L (Xie *et al.*, 2015) e em caranguejos adultos (*Carcinus maenas*) após sete dias de exposição à concentração de 5 µg/L (Rodrigues *et al.*, 2015); esses estudos fornecem mais evidências para a crescente preocupação de que, no meio ambiente, fármacos antidepressivos, são capazes de causar alterações em organismos não-alvos, mesmo em baixas concentrações (Chen *et al.*, 2018; Pan *et al.*, 2018; Xie *et al.*, 2015).

Até a data presente, não há estudos relativos a alterações nesse biomarcador de neurotoxicidade induzidas pela exposição à VLX. Ainda assim, as informações científicas descritas no presente estudo, de que o antidepressivo VLX ao diminuir a atividade enzimática de AChE em larvas de *Danio rerio*, mostra-se neurotóxico, é corroborado por outros dados científicos que também mostram esse mesmo efeito neurotóxico do medicamento à organismos não-alvos expostos a diversas concentrações dele no ambiente (Bidel *et al.*, 2016). Exemplo disso é o fato de esse fármaco ser capaz de promover disfunções nos mecanismos de transmissão das sinapses nervosas pela diminuição dos níveis de norepinefrina (neurotransmissor), bem como redução no número de sítios de ligação de receptores glutaminérgicos em sépias (*Sepia officinalis*) expostas à concentração de 5 ng/L de VLX durante 20 dias. Além da alteração fisiológica, a exposição à VLX também induziu modificações anatômicas, no cérebro desses organismos, pela redução da proliferação celular no lobo vertical (estrutura-chave envolvida em processos cognitivos) e nos lobos ópticos (centros principais de processamento visual), resultando em redução total no volume encefálico desses animais. Interessantemente, mas não surpreendente, como resultado dessas mudanças no neurodesenvolvimento, 20 dias de exposição à concentração de 100 ng/L de VLX foram associados a uma diminuição na capacidade de camuflagem dos moluscos (Bidel *et al.*, 2016). Isso indica que a presença de VLX como poluente, em ecossistemas aquáticos, pode trazer graves consequências aos organismos não-alvos, visto que pode alterar padrões neurofisiológicos e comportamentais dos animais de modo a comprometer a sobrevivência deles, e conseqüentemente, a manutenção da biodiversidade aquática. Estudos que avaliaram a neurotoxicidade ao avaliar alterações na expressão gênica, após exposição à VLX, também indicam um cenário desanimador dos efeitos que esse medicamento pode causar aos componentes bióticos do meio ambiente. Exposição à VLX altera significativamente conjuntos de genes neuronais de crescimento, desenvolvimento e regulação neuronal em cérebros de peixes; e essas mesmas vias são igualmente alteradas em células neuronais humanas *in vitro*,

indicando homologia de respostas fisiológicas, processo, preocupante, uma vez que esse medicamento se encontra em cursos de água utilizada para consumo pela população humana (Kaushik *et al.*, 2016). Os autores, nesse estudo, também indicam que as vias neuronais alteradas pela exposição à VLX estão relacionadas ao desenvolvimento de patologias humanas, como o autismo, e sugerem que fármacos psicoativos, em concentrações ambientalmente relevantes, podem induzir distúrbios neurológicos em organismos não-alvos ou na população humana.

A enzima GST, por sua vez, pertence a uma família multifuncional de proteínas e está envolvida em processos de eliminação dos efeitos danosos de compostos xenobióticos, como poluentes ambientais. Essa enzima catalisa a conjugação da GSH com compostos endógenos ou exógenos, tornando-os menos tóxicos, mais solúveis em água e mais fáceis de serem eliminados e protegendo as células, principalmente, da toxicidade gerada pela formação de radicais livres (Armiliato, 2014; Carletti *et al.*, 2008). No presente estudo, o aumento da atividade de GST, em adultos expostos a VLX, foi identificado nas amostras de cabeça, após exposição crônica à concentração de 0,2 µg/L; também nas amostras musculares, após exposição aguda à concentração de 100000 µg/L. A exposição aguda também foi capaz de induzir a redução da atividade enzimática, nas concentrações de 25000, 50000 e 100000 µg/L de VLX, conforme indicado nas amostras provenientes da cabeça de *Danio rerio* adulto. Nas amostras provenientes das larvas, a atividade de GST foi reduzida após exposição (168 horas) às concentrações de 2, 1000 e 25000 µg/L de VLX. A redução e o aumento da atividade de GST, nas amostras larvais e dos adultos, após exposição aguda e crônica, podem indicar que a exposição à VLX gerou um desequilíbrio nas vias de desintoxicação celular (Huber & Almeida, 2008). Tal desequilíbrio resultou em alterações na atividade enzimática (aumento ou redução), após exposição à VLX, em concentrações similares do medicamento, em estágios diferentes de vida do organismo modelo.

Outros estudos utilizando peixes como organismo modelo, assim como nós, detectaram alterações diferentes na atividade de GST, dependendo do tecido analisado do organismo, após exposição a contaminantes ambientais. Por exemplo, peixes *Metynnis argenteus* (pacu prata) expostos cronicamente (28 dias) ao agroquímico fungicida paclobutrazol, tiveram aumento estatístico na atividade de GST, no tecido hepático, mas não no tecido muscular (Jonsson *et al.*, 2002). A mistura do agroquímico fungicida tebuconazol e do inseticida λ-cialotrina foi detectada em amostras teciduais de *Cyprinus carpio* (Carpa) cultivadas em cultura de arroz. Esses compostos bioacumularam nos tecidos desses animais, cujas amostras de brânquias, fígado e cérebro estavam com níveis significativamente aumentados de GST, em comparação

com o grupo controle, mas as amostras de músculo não mostraram a mesma tendência (Clasen *et al.*, 2018). Esse padrão é condizente com os nossos resultados, em que também encontramos aumento da atividade de GST, nas amostras provenientes da cabeça, mas não nas amostras dos tecidos musculares, após exposição crônica. Por outro lado, a exposição aguda foi capaz de aumentar GST nos tecidos musculares. A atividade de GST celular pode ser maior ou menor dependendo do tecido que essa célula forma; portanto, tecidos diferentes podem apresentar atividades enzimáticas distintas (Lee *et al.*, 2019; Huber & Almeida, 2008).

Em relação às alterações em GST causadas pela exposição à VLX, um estudo de expressão gênica indicou que a exposição à VLX foi capaz de alterar a expressão da atividade da enzima GST, em larvas de *D. rerio*. As larvas tiveram redução na expressão do gene *gstp2*, após 96 horas de exposição às concentrações de 0,3 e 30 µg/L do fármaco (Hodkovicova *et al.*, 2020). A administração de VLX à camundongos reduziu significativamente os níveis de atividade de GST em neurônios do hipocampo (Abdel-Wahab & Salama, 2011), ao passo que, em peixes *Argyrosomus regius* (corvina), a exposição a esse mesmo medicamento mostrou aumento estatisticamente significativo em amostras cerebrais e musculares (Maulvault *et al.*, 2018). Resultados similares foram encontrados por nós no presente estudo, uma vez que a exposição à VLX também se mostrou capaz de aumentar a atividade de GST, em amostras musculares, após exposição aguda, e em amostras da cabeça, após exposição crônica, além de redução de GST, na exposição no estágio larval.

O padrão da exposição sofrido por um organismo a determinada substância pode gerar ativação de vias de sinalização celulares distintas (Chen *et al.*, 2019; Kovács *et al.*, 2016; Magalhães & Ferrão-Filho, 2008). Dessa forma, os testes de toxicidade aguda nos permitiram avaliar uma resposta severa e rápida dos organismos aquáticos após exposição à VLX (96 horas, adultos e 168 horas, larvas), em comparação com o teste crônico, que revelou alterações fisiológicas a um estímulo contínuo de exposição (28 dias, adultos) a esse mesmo fármaco. Por essa razão, a resposta fisiológica desencadeada nesse organismo modelo, pela exposição (larval ou adulta) pode ter sido distinta da resposta desencadeada pela exposição aguda, o que ajuda a explicar o porquê da atividade de GST encontrar-se reduzida ou aumentada nas diferentes modalidades de exposição.

No presente estudo, a alteração da atividade de GST, após a exposição crônica e aguda do organismo modelo à VLX, sugere que, desde as altas concentrações até as concentrações subletais e ambientalmente relevantes, esse fármaco, provavelmente, promoveu distúrbios no controle celular de estresse oxidativo e desintoxicação celular, uma vez que a GST pode ser utilizada pela célula na inativação de fármacos (Huber & Almeida, 2008), e a sua alteração, nas

amostras, pode ser um provável indicativo, da tentativa das células de eliminação desse fármaco pela ativação de vias de desintoxicação celular, processos de biotransformação e correção dos efeitos deletérios (de Freitas, Vaz Junior & Masuda, 2008). Por isso, as alterações da enzima GST encontradas nesse trabalho, em embriões e organismos adultos à VLX, indicam que as células estão mais susceptíveis a alterações no combate ao estresse oxidativo, mecanismo que, sabidamente, pode levar a maior geração de radicais livres, que, por sua vez, implicam em danos às biomoléculas, como o DNA (Wigner *et al.*, 2020; Loureiro, Di Mascio & Medeiro, 2002). Contudo, é importante salientar que a enzima GST faz parte de um sistema de defesa integrado e que a eficiência desse sistema depende da ação combinada de outras enzimas do sistema antioxidante, bem como de transportadores que facilitem a eliminação dos produtos formados a partir das reações por ela catalisadas (Chatterjee & Gupta, 2018). Dessa maneira, a avaliação de outros biomarcadores bioquímicos de estresse oxidativo é necessária para uma descrição mais detalhada sobre prováveis efeitos de estresse oxidativo causados pela exposição à VLX.

No presente estudo, interessantes também foram os resultados da avaliação do biomarcador de estresse celular, a enzima LDH. A atividade dessa enzima, em todos os estágios de vida (adulto e larva) e em tempos distintos de exposição (crônico e agudo), se mostrou, significativamente aumentada em relação ao grupo controle. Nas larvas, houve aumento da atividade de LDH após exposição à concentração de 100000 µg/L de VLX durante 168 horas, e, nos adultos, essa enzima também estava com atividade aumentada, nas amostras provenientes da cabeça, após exposição aguda (96 horas) à mesma concentração (100000 µg/L) e após exposição crônica (28 dias) à concentração de 1000 µg/L de VLX. Instigante perceber que o aumento da atividade de LDH se deu após exposição à concentração de 100000 µg/L de VLX, tanto no estágio larval como no adulto, o que indica um padrão similar de resposta fisiológica do controle dessa enzima, em diferentes estágios de vida de *Danio rerio*. Essa enzima glicolítica é muito importante, ela está em diversos tecidos e controla vias anaeróbicas de produção de energia celular. Estudos indicam que aumento da atividade de LDH, após exposição a um agente contaminante, está diretamente relacionado com a produção e o fornecimento de energia celular adicional para lidar com a exposição a essas substâncias (Rodrigues *et al.*, 2015). Adicionalmente, a medição de LDH fornece informações sobre dano celular pois, por se tratar de uma enzima intracelular, ela se eleva no tecido, quando há lesão membranar, o que pode levar a lise celular e dano tecidual (Djelić *et al.*, 2019; de Oliveira, *et al.*, 2018), sendo, portanto, um bom indicador de estresse celular após exposição a um contaminante (Yang *et al.*, 2017).

Apresentaram alterações enzimáticas de LDH amostras teciduais renais provenientes de truta-arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*) juvenil, expostas às concentrações de 0,2 e 1 µg/L de

VLX, por sete dias (Best *et al.*, 2014). A exposição a outros medicamentos antidepressivos também se mostra capaz de alterar a atividade dessa enzima: aumento de sua atividade em caranguejos (*Carcinus maenas*), expostos à concentração de 500 µg/L de sertralina, após sete dias de exposição (Rodrigues *et al.*, 2015); redução da atividade em larvas de peixes-zebra, após sete dias de exposição à concentração de 0,6 µg/L de bupropiona (Franco *et al.*, 2019); aumento da atividade em amostras sanguíneas de Truta-arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*), expostas de maneira aguda (96 horas) à carbamazepina nas concentrações de 5 a 30 mg/L (Li *et al.*, 2011); e em amostras teciduais de fígado de peixes-zebra expostos cronicamente (63 dias) à concentração de 10 mg/L, ao mesmo tempo que a atividade de LDH se mostrou reduzida nas amostras de músculo e brânquias provenientes da mesma exposição (Santos *et al.*, 2018). O presente estudo, ao descrever o aumento da atividade de LDH em diferentes estágios de vida do *Danio rerio*, após exposição à VLX, de maneira pioneira, agrega, ao conhecimento científico, informações sobre a toxicidade desse fármaco aos seres vivos, contribuindo para o melhor entendimento dos efeitos de antidepressivos no meio ambiente.

O aumento de LDH, nas amostras de larvas e adultos, sugere que, mesmo em estágios diferentes do seu ciclo de vida, peixes *Danio rerio*, após a exposição à VLX, passaram a utilizar de maneira similar, com maior frequência, a via anaeróbica para obtenção de energia, em detrimento da via aeróbia. Esse aumento da LDH, nas diferentes amostras, sugere que, provavelmente, a via anaeróbica de produção de energia foi aumentada pela necessidade de maior aporte energético celular para os processos de desintoxicação (Li *et al.*, 2011; Levesque *et al.*, 2002) ativados pela exposição à VLX, uma vez que o metabolismo da glicose, nos peixes, pode ser alterado sob condições tóxicas por meio da alteração da atividade das enzimas que atuam nessa via (Yang *et al.*, 2017). A LDH é uma enzima chave na via da glicólise anaeróbica, desempenhando papel fundamental na glicólise, ao catalisar a conversão de piruvato em lactato (Ramesh *et al.*, 2018). Em condições anaeróbicas, o lactato é o produto final das vias glicolíticas e é por isso, inclusive, que a taxa de produção de lactato é um índice de estresse fisiológico animal (Thomas, Guénette & Thomson, 2018; Brancaccio, Lippi & Maffulli, 2010;). Assim, os resultados do presente estudo, sugerem que a glicólise anaeróbica foi significativamente aumentada em peixes-zebra após a exposição à VLX, como resultado da toxicidade desse fármaco e da, provável, necessidade de maior produção de energia para a eliminação celular dessa substância, resultando no aumento de LDH nas amostras analisadas.

Como já mencionado, por se tratar de uma enzima intracelular, o aumento da atividade enzimática de LDH pode indicar dano tecidual como consequência da ruptura da membrana, causando a liberação dessa enzima (Osman *et al.*, 2010), dano esse, que pode variar entre leve

até a severa necrose celular (Franco *et al.*, 2019). Uma vez que o aumento de LDH atua como um marcador de lesão tecidual, e, em nossos resultados bioquímicos, as larvas expostas à concentração de 100000 $\mu\text{g/L}$ de VLX apresentaram aumento na atividade de LDH, é admissível supor que esse efeito pode estar relacionado com a mortalidade das larvas no teste de toxicidade com embriões (FET), nas concentrações, mais elevadas, de 177900; 237300; 316400; 421800; 562500; 750000 e 1000000 $\mu\text{g/L}$ de VLX. O aumento da LDH no tecido das larvas somado aos resultados de mortalidade pelo teste FET ajuda a explicar a mortalidade dos organismos expostos à VLX. A toxicidade à VLX, possivelmente, desencadeou desregulação de vias enzimáticas necessárias para geração de energia para eliminar essa substância, o que culminou na morte dessas células, gerando o aumento de LDH e, conseqüentemente, a mortalidade das larvas

6.2.3. Exposição aguda e crônica à VLX e efeitos genotóxicos em *Danio rerio*

Estudos indicam que alguns antidepressivos podem ser genotóxicos. Como a imipramina que, em concentrações maiores que 5.000 ng/mL no plasma sanguíneo de pacientes, aumentou o número de aberrações cromossômicas nas células sanguíneas periféricas (Saxena & Ahuja, 1988); a duloxetina que, após administração por 24, 48 e 72 h nas concentrações de 2, 20 e 200 mg/kg, foi capaz de aumentar a formação de micronúcleos em eritrócitos de camundongos (Madrigal-Bujaidar *et al.*, 2015); e a sertralina que, no mesmo organismo modelo, após exposição às concentrações de 10, 40 e 80 mg/kg, durante 28 dias, também resultou em aumento da frequência de micronúcleos em células sanguíneas (Battal *et al.*, 2013).

O teste do micronúcleo e anormalidade nucleares permite identificar danos cromossômicos gerados pela exposição a alguma substância ou componente ambiental, uma vez que essas alterações celulares são formadas quando fragmentos de cromossomos, ou cromossomos inteiros são anormalmente segregados durante a divisão celular (Madrigal-Bujaidar *et al.*, 2015). A exposição, por 24 e 48 horas, *in vitro*, de linfócitos humanos às concentrações de 25, 50 e 100 $\mu\text{g/mL}$ de VLX, foi capaz de induzir a formação de micronúcleo, alterações estruturais cromossômicas e células binucleadas, o que indica o potencial genotóxico desse antidepressivo em cultura celular. Em contrapartida, nosso estudo, ao utilizar um modelo *in vivo*, indicou que a exposição ao antidepressivo VLX não é capaz de aumentar o número de micronúcleos e outras anormalidades nucleares em eritrócitos de *Danio rerio*, conforme mostrado no ensaio agudo e crônico. Modelos experimentais, *in vivo*, possuem mecanismos fisiológicos de absorção, reconhecimento e eliminação de compostos tóxicos mais complexos, em comparação com a cultura celular, além disso os modelos *in vivo* têm perfil de exposição distinto do modelo *in*

vitro, gerando respostas fisiológicas e de sinalização celular distintas (Bemis *et al.*, 2016) que, por sua vez podem explicar o porquê de a VLX ser genotóxica *in vitro* mas não *in vivo*. Outros trabalhos científicos corroboram nossos resultados, posto que também não identificaram efeitos genotóxicos de antidepressivos, tanto em modelo *in vitro*, para a doxepina, escitalopram (Cobanoglu *et al.*, 2018) e sertralina (Istifli *et al.*, 2018) como em modelo *in vivo*, para a fluoxetina (de Farias, 2020).

Corroboram também nossos resultados, que indicam que VLX não é genotóxica, estudo com cultura de células de pacientes com depressão, no qual foi detectado que, a utilização de tal fármaco antidepressivo, na verdade, tem efeito protetor no material genético, ao diminuir a quantidade de danos no DNA (Ahmadimanesh *et al.*, 2019). Tal estudo indica que o quadro depressivo, nos pacientes, gera maior produção de radicais livres endógena, que, por sua vez, irão promover, nas células sanguíneas, danos no DNA (indicado pelo tamanho da cauda no teste do cometa) em maior quantidade, em comparação com pacientes sem depressão. O uso da VLX por esses pacientes, diminui esse parâmetro ao final de 15 dias consecutivos de administração, o que sugere um efeito protetor da VLX aos danos oxidativos, e conseqüentemente, aos danos no DNA. Esse efeito protetor da VLX ao DNA, como resultado da proteção ao estresse oxidativo, foi verificado também em camundongos (Abdel-Wahab & Salama, 2011). Apesar de não ser possível afirmar que tal função seja desempenhada pelo antidepressivo, com base nos resultados do presente trabalho, ao realizarmos o teste do cometa em células sanguíneas de *Danio rerio*, também não encontramos aumento de dano ao DNA no tratamento agudo e crônico. A duloxetine, que assim como a VLX é um antidepressivo ISRSN, também não foi genotóxica a camundongos, após avaliação das células sanguíneas pelo teste do cometa (Pereira *et al.*, 2009). O teste do cometa, ao quantificar e detectar fragmentação do DNA nas células que sofreram essa lesão, por uma determinada razão, possibilita a avaliação do potencial genotóxico de uma determinada substância (Imanikia *et al.*, 2016). Nesse sentido, em nossos resultados, os testes de micronúcleo e cometa são complementares, quanto as informações que geram, para a avaliação genotóxica da VLX: tal antidepressivo não foi capaz de induzir danos no DNA em *Danio rerio*. Esses resultados sugerem que esse antidepressivo não é mutagênico e genotóxico para tal organismo modelo.

6.2.4. Modificações morfométricas em órgãos bioindicadores de toxicidades, após exposição crônica de *Danio rerio* à VLX

Antidepressivos, ao serem absorvidos por animais, podem se acumular em seus tecidos (Nowakowska *et al.*, 2020; Muir *et al.*, 2017; Du *et al.*, 2014), portanto a análise de parâmetros histológicos nos órgãos desses organismos contaminados é mais uma das ferramentas que

auxiliam na avaliação das alterações biológicas desencadeadas pela exposição a poluentes emergentes como a VLX. Aqui, avaliamos as alterações morfométricas induzidas pela exposição crônica, a concentrações subletais e ambientalmente relevantes, de VLX, nas brânquias e no intestino de peixes-zebra, dado que, esses órgãos ficam em contato direto com poluentes.

As brânquias, nos peixes, são os primeiros órgãos a serem afetados por contaminantes no ambiente, pois são pontos de contato direto com a água. No epitélio branquial se localizam as células de cloro, responsáveis pelo balanço iônico entre a água e o plasma sanguíneo, e as células secretoras de muco (células mucosas), as quais possuem papel fundamental na proteção contra substâncias tóxicas (Araújo *et al.*, 2001). O presente estudo mostrou que peixes-zebra expostos durante 28 dias às concentrações de 0,2 e 1000 µg/L do antidepressivo VLX, tiveram redução significativa do tamanho das lamelas secundárias branquiais, em comparação ao grupo controle. No referido organismo modelo, as brânquias são formadas por vários arcos branquiais, e cada arco possui duas fileiras de filamentos. Cada filamento é formado pela união de múltiplas lamelas e são nelas que o sangue flui em direção oposta ao da água, que ao passar entre as lamelas, permite as trocas gasosas nos peixes (Rotta, 2003). Tais estruturas, por apresentarem uma grande superfície de contato com o meio externo, são particularmente sensíveis às mudanças químicas e físicas do ambiente aquático (Flores-Lopes & Thomaz, 2011), propensas a sofrer respostas rápidas, altamente sensíveis a poluentes, mesmo em baixas concentrações, podendo sofrer alterações estruturais inespecíficas, dependendo da dose e da duração da exposição, principalmente nos casos dos níveis subletais de poluentes aquáticos (Rodrigues *et al.*, 2017). Pelas citadas razões, a análise dessas estruturas, pós-exposição, é empregada para monitoramento da toxicidade de diversos poluentes ambientais, como metais pesados (Abalaka *et al.*, 2020; Hassaninezhad *et al.*, 2014), herbicidas (Yu *et al.*, 2017; Samanta *et al.*, 2016; Blahova *et al.*, 2014), inseticidas (Oladokun, Sogbanmu & Anikwe, 2020), fertilizantes químicos (Dutra *et al.*, 2017) e também, medicamentos como antibióticos (Rodrigues *et al.*, 2017) e, inclusive, antidepressivos (Vaclavik *et al.*, 2020).

A exposição à sertralina - antidepressivo capaz de inibir a recaptção de serotonina, assim como a VLX - foi capaz de aumentar o número de deformações nas lamelas branquiais e a multiplicação de células mucinosas, como uma resposta inflamatória, em truta (*Oncorhynchus mykiss*), após 28 dias de exposição à concentração, ambientalmente relevante, de 4.4 µg/kg (Vaclavik *et al.*, 2020). O presente estudo, ao realizar análises morfométricas das lamelas branquiais após exposição à VLX, aduz informações inéditas sobre o contexto ecotoxicológico desse poluente emergente, pois não há, na literatura científica, até a presente data, qualquer

estudo que avalie biomarcadores morfométricos histológicos após exposição à VLX. No presente estudo, foi verificado que o contato direto das brânquias com o medicamento dissolvido na água dos aquários danificou a lamela secundária, levando a uma redução progressiva do tamanho dessas estruturas, à medida que a concentração de VLX aumentou. Tal constatação nos permite afirmar que a exposição a esse antidepressivo causou alterações morfométricas branquiais nos organismos, o que, por sua vez, permite-nos inferir, que essa exposição afeta, em *Danio rerio*, os processos fisiológicos de osmorregulação e respiração, desempenhados pelas brânquias (Shah *et al.*, 2020). Essa redução do tamanho lamelar, identificado no presente trabalho, após exposição à VLX, pode caracterizar uma reação de defesa básica do organismo, que, ao promover a diminuição das brânquias, diminui conseqüentemente a área se superfície vulnerável ao contaminante (Azadbakht *et al.*, 2019; Evans, 1987).

Uma vez que a VLX se mostrou capaz de bioacumular em peixes, e que a quantidade acumulada era proporcional ao aumento da concentração da molécula na água (Qu *et al.*, 2019), podemos questionar se essa redução das lamelas branquiais também não poderia estar relacionada ao acúmulo desse medicamento nesses tecidos, pois a redução das lamelas foi maior na concentração maior (1000 µg/L) de exposição. Há estudos que mostram a relação entre o acúmulo tecidual de um poluente e a degradação histológica desse tecido (Oladokun, Sogbanmu & Anikwe, 2020; Shah *et al.*, 2020); entretanto, para a verificação de tal hipótese, análises de quantificação tecidual de VLX em peixe-zebra precisam ser realizadas.

Alterações histológicas branquiais podem ser decorrentes de um cenário de estresse oxidativo e que, ao gerarem espécies reativas de oxigênio, podem interagir com estruturas celulares, resultando em conseqüências deletérias, incluindo danos em níveis celulares e teciduais (Wang *et al.*, 2013; Ramachandran *et al.*, 2002); essa constatação científica nos possibilita levantar uma hipótese que integra os dados do presente estudo. No teste crônico, as enzimas biomarcadoras GST (após exposição a 0,2 µg/L) e LDH (após exposição a 1000 µg/L), que são bioindicadores de estresse oxidativo e lesão tecidual, respectivamente, estavam aumentadas nas amostras da cabeça, em comparação com o grupo controle. Nas análises morfométricas das brânquias, dos organismos tratados nessas mesmas concentrações (0,2 e 1000 µg/L), houve redução no tamanho das lamelas secundárias. Nesse sentido, baseado nas ideias citadas no início do parágrafo, é plausível supor que a exposição crônica à VLX gerou, nessas células, aumento do estresse oxidativo, verificado pelo aumento de GST. Esses radicais livres, por sua vez, podem ter desencadeado danos celulares e teciduais, o que, progressivamente (28 dias, ao final do teste crônico), culminou na redução do tamanho lamelar;

tais danos celulares e ruptura membranar, resultaram no aumento de LDH, também verificado nas mesmas amostras. Sabidamente, as amostras de cabeça contam com outras estruturas além das brânquias, e, para validar tal hipótese, seria necessário fazer análises complementares em que os biomarcadores fossem verificados exclusivamente nas brânquias; entretanto, a maneira como os dados se mostra, nos leva a pormenorizar tal provável situação.

Em peixes, como método de avaliação da toxicidade causada pela exposição à um determinado composto, as dimensões intestinais: altura do epitélio, largura e área de superfície das vilosidades intestinais, podem ser utilizadas, uma vez que essas estruturas, em diferentes trabalhos, mostram-se plásticas e capazes de sofrer modificações (Minghetti *et al.*, 2017; Ferreira *et al.*, 2016; Moldal *et al.*, 2014), frente à exposição a um determinado composto fornecendo informações importantes sobre os efeitos desse composto aos animais. Em nosso trabalho, a altura do epitélio e a largura e altura das vilosidades, foram reduzidas pela exposição do peixe-zebra às concentrações de 0,2 e 1000 µg/L de VLX, durante 28 dias, o que indica que esse antidepressivo foi capaz de gerar alterações morfológicas nesse organismo modelo mesmo em concentrações subletais. Como o intestino é o órgão responsável pela absorção de nutrientes, íons e água, além de auxiliar na osmorregulação (Rotta, 2003), alterações morfológicas nesse órgão interferem negativamente na absorção de nutrientes e água, entre outras funções fisiológicas desempenhadas pelo órgão, além de, conseqüentemente, interferir na sobrevivência, reprodução, crescimento e qualidade de vida dos peixes (Moldal *et al.*, 2014).

Diferentes estudos apontam que a redução morfométrica de vilosidades intestinais parece ser resultado de um processo inflamatório pelo qual esse animal está passando frente à exposição. Em humanos, por exemplo, vilosidades intestinais encurtadas e inflamação no intestino delgado, ocorrem em pacientes com doença celíaca causada pela reação alérgica às proteínas do glúten (Lebwohl, Sanders & Green, 2018). Em leitões desmamados, a suplementação dietética com óleo de peixe aumentou a altura das vilosidades no intestino delgado combinada com diminuição nos níveis de transcrição de genes relacionados à inflamação e menor infiltração de linfócitos na mucosa, em comparação com os que tiveram uma dieta com óleo de milho (Liu *et al.*, 2012). No salmão do Atlântico (*Salmo salar*), o encurtamento das vilosidades intestinais (porção distal) acompanhado da infiltração de leucócitos na lâmina própria, foram relatados, repetidamente, durante dietas ricas em proteínas inflamatórias (ervilha e soja) (Penn *et al.*, 2011; Baeverfjord & Krogdahl, 1996; van den Ingh *et al.*, 1991). Tal espécie também apresentou vilosidades intestinais significativamente menores e mais curtas no intestino médio e distal, respectivamente, em todos os grupos alimentados com óleos vegetais (mais inflamatório) em comparação com o grupo alimentado com óleo de peixe

(menos inflamatório) (Moldal *et al.*, 2014), indicando que diferentes substâncias ingeridas pelo peixe têm o potencial de causar alterações nas vilosidades intestinais. Lambarís (*Astyanax altiparanae*) também apresentaram maior área de absorção intestinal à medida que os níveis de inflamação reduziram, após suplementação alimentar com óleo de orégano (Ferreira *et al.*, 2016).

Além da rotina alimentar influenciar na morfologia do intestino de peixes, diferentes tipos de poluentes, dispersos nos ecossistemas aquáticos, podem ser ingeridos pelos animais e por isso, também se mostram capazes de alterar a morfologia desse órgão. A redução do epitélio e da altura das vilosidades intestinais já foi associada ao aumento de apoptose celular nessas estruturas, seguido da redução da proliferação celular, em salmões do Atlântico exposto à mercúrio (Berntssen *et al.*, 2004). A exposição à microplásticos, persistentes no ambiente, também foi capaz de induzir alterações intestinais, acompanhadas de processo inflamatório nesse órgão e expressão aumentada de genes de vias inflamatórias em peixes-zebra (Limonta *et al.*, 2019). Outros contaminantes ambientais como inseticidas (Chang *et al.*, 2020) e fertilizantes químicos (Yu *et al.*, 2021) também se mostraram capazes de promover alterações na morfologia intestinal, acompanhadas por processos inflamatórios na região.

Trutas-marrom (*Salmo trutta*) de áreas poluídas do rio Krka (Croácia) apresentaram medidas intestinais significativamente menores, em comparação com os indivíduos de mesma espécie, de outras áreas desse mesmo rio que não recebiam descarte direto de esgoto municipal (Barišić *et al.*, 2018). Nessa conjuntura, o antidepressivo VLX, por ser descartado nos ecossistemas aquáticos, configura-se como um poluente (Fernandes *et al.*, 2020) que pode vir a causar desdobramentos histológicos aos peixes expostos, segundo os achados do presente estudo, ao verificar as alterações morfométricas nos peixes expostos de maneira crônica.

Uma vez que a problemática da presença dos fármacos antidepressivos no ambiente aquático começou a ser discutida recentemente, escassos são os estudos que avaliam os efeitos da exposição a essa classe de medicamentos na morfologia dos órgãos dos animais expostos. A fluoxetina, antidepressivo que está entre os 100 medicamentos mais prescritos anualmente, em todo o mundo, administrada cronicamente (28 dias) à peixes-zebra, em concentrações ambientalmente relevantes (0,01 µg/L), foi capaz de promover a diminuição da altura do epitélio e alterações na altura das vilosidades (de Farias *et al.*, 2020). Nesse cenário, os resultados do presente estudo, adicionam informações pertinentes sobre os prováveis efeitos dessa classe de fármacos à fauna dos ecossistemas aquáticos. Apesar de não haver estudos científicos que avaliem os danos da exposição à VLX ao intestino de peixes, um estudo que também utiliza como um vertebrado organismo modelo apresentou resultados que corroboram

os resultados do presente estudo, pois indica que esse antidepressivo pode desencadear processos inflamatórios intestinais. Dois grupos de camundongos, um exposto a dose única (350mg/kg) e outro exposto por 30 dias (100 mg/kg/dia) à VLX, apresentaram alterações na mucosa do estômago: edemas na mucosa gástrica, numerosas úlceras superficiais na mucosa, glândulas gástricas com células vacuoladas e infiltração de células inflamatórias na submucosa (Paulis *et al.*, 2018). No presente estudo, foi verificado que a exposição do peixe-zebra à venlafaxina (0,2 e 1000 µg/L) durante 28 dias, foi capaz de causar redução no tamanho e na altura do epitélio, bem como na altura da vilosidade, o que indica que alterações morfológicas podem ser desencadeadas nesses organismos, mesmo em concentrações muito baixas e similares às encontradas no ambiente. É possível ponderar que tais alterações no intestino desses animais podem ser resultado de um processo de inflamação desencadeado pela exposição ao antidepressivo, uma vez que diversos estudos mostram a relação entre alteração intestinal e processo inflamatório (Yu *et al.*, 2021; Chang *et al.*, 2020; Limonta *et al.*, 2019; Ferreira *et al.*, 2016; Berntssen *et al.*, 2004); entretanto, para validação dessa ponderação, experimentos que avaliem e quantifiquem parâmetros inflamatórios após à exposição à VLX são necessários.

Os resultados das análises morfométricas de brânquia e intestino indicam que a VLX tem efeito adverso, significativo, na alteração da morfometria dessas estruturas dos peixes, mesmo em concentrações muito baixas, o que, do ponto de vista ambiental, é bastante inquietante. Além disso, o peixe-zebra é utilizado como organismo modelo para elucidar diversos processos fisiológicos e doenças inflamatórias intestinais humanas por ter respostas fisiológicas similares às encontradas nos seres humanos (Brugman, 2016). Por essa razão, relevantes são as ponderações sobre os efeitos da VLX nos ecossistemas aquáticos utilizados para o uso da população, uma vez que esse antidepressivo não se degrada rapidamente, como mostrado no presente trabalho, nas análises de HPLC, e pode acabar sendo ingerido pelos seres humanos ao consumirem água que contém resíduos desse fármaco.

Como o consumo de antidepressivos está aumentando globalmente, está claro que há uma carga crescente sobre os organismos aquáticos por meio dos resíduos desses medicamentos (Castillo-Zacarías *et al.*, 2021). Portanto, é importante o esclarecimento dos efeitos desses fármacos aos seres vivos, com o intuito de monitorar, continuamente, esse e outros antidepressivos, buscando melhorar, ao máximo, a eliminação deles no ambiente aquático.

6.2.5. Padrões locomotores e comportamentais em *Danio rerio* após exposição crônica à VLX

O comportamento natatório pode ser um indicador sensível de estresse químico (Warner *et al.*, 1966), e essas alterações comportamentais podem levar a importantes consequências

ecológicas, devido fatores como alteração da relação predador-presa, diminuição da vantagem competitiva, captura de alimento, relações interespecíficas e reprodução, por exemplo (Domingues *et al.*, 2016; Little & Finger, 1990). Nesse cenário, o teste de MTN permite avaliar alterações comportamentais de peixes, após exposição a uma determinada substância, e se baseia na tendência natural do peixe de mergulhar inicialmente no fundo de um novo tanque experimental, com aumento gradual da atividade vertical ao longo do tempo, até que ele se aclimate gradualmente ao novo ambiente e sinta-se seguro para começar a explorar e nadar nas partes superiores do tanque (Pilehvar, Town & Blust, 2020). Assim, *endpoints* como latência para entrar nas zonas superiores do tanque, tempo gasto, distância percorrida e número de entrada nas zonas superiores do aquário são considerados indicadores de comportamentos do tipo ansioso em peixes, e alterações nessas variáveis indicam alterações em mecanismos básicos de sobrevivência desses animais (Levin, Bencan & Cerutti, 2007). Além da avaliação de comportamento do tipo “ansioso”, o teste MTN avalia também parâmetros locomotores dos peixes, ao analisar a distância total percorrida, o ângulo absoluto de virada e a velocidade máxima dos animais no aquário.

Os resultados comportamentais, provenientes do teste MTN, do presente trabalho, sugerem que a exposição à VLX causou, no peixe, efeitos ansiolíticos, pela exploração na área superior do aquário aumentada, juntamente com a redução do comportamento defensivo da espécie. Curiosamente, o fenótipo observado aqui é dependente da concentração, com aumento gradual dos comportamentos observados à medida que a concentração de VLX aumentou. Em geral, a exploração reduzida (menos transições para a parte superior) e movimentos erráticos aumentados se correlacionam com o alto estresse e ansiedade dos peixes (Egan *et al.*, 2009). Desta forma, no presente estudo, verificamos que a VLX age de modo a diminuir os níveis de ansiedade e estresse dos organismos, gerando tal efeito ansiolítico, o que ocasionou, nos peixes expostos, um comportamento mais "relaxado", fazendo com que eles fossem mais rapidamente para área superior do aquário e passassem mais tempo nessa área. Para o peixe, em condições naturais, esse padrão de comportamento representa risco para sua sobrevivência, uma vez que o organismo estaria mais suscetível aos predadores.

Pimephales promelas (peixinho), quando exposto às concentrações de 500, 2500 e 5000 ng/L de VLX (durante 5 dias) tiveram o período de latência antes da resposta de escape inicial prolongado e a resposta de escape total mais lenta em comparação com o grupo controle (Painter *et al.*, 2009), sendo que, o período de latência para a área superior foi cada vez menor à medida que a concentração de VLX era maior. Tal resultado, corrobora os do presente estudo, uma vez que também detectamos redução da latência para a área superior com o aumento da

concentração de VLX. No presente estudo, peixes-zebra adultos, expostos à VLX, tiveram aumento da exploração na parte superior do aquário e menor velocidade de nado. Resultados similares a esses foram encontrados em peixes corvinas (*Argyrosomus regius*) que, quando expostos à concentração de 20 µg/L de VLX, aumentaram o movimento de exploração na área superior do aquário, enquanto a sua atividade de nado foi reduzida, no teste de mergulho em tanque novo, além disso, a exposição ao antidepressivo reduziu a coesão do cardume (Maulvault *et al.*, 2018). A exposição à VLX, além de se mostrar capaz de alterar o comportamento de peixes adultos, também foi capaz de gerar tais modificações no estágio larval desses animais (Tang *et al.*, 2021; Rodrigues *et al.*, 2019; Thompson, Arnold & Vijayan, 2017); isso indica que esse antidepressivo é capaz de alterar o padrão comportamental de peixes em diferentes estágios do desenvolvimento. Resultados de tais estudos corroboram com os resultados encontrados no presente trabalho, uma vez que indicam que a exposição ao antidepressivo VLX causa, nos peixes, redução dos comportamentos ligados à ansiedade e ao instinto de sobrevivência. Além de peixes, a VLX se mostrou capaz de alterar o comportamento de diversos invertebrados aquáticos e anfíbios (Sehonova *et al.*, 2018).

Além das alterações no comportamento locomotor, a VLX mostrou-se capaz de alterar outros comportamentos primitivos de peixes. Robalos (*Morone saxatilis* e *Morone chrysops*) tiveram seu comportamento alimentar modificado após exposição às concentrações de 250 e 500 µg/L de VLX, por 5 dias, e demoraram mais tempo para capturar as presas em comparação com o grupo controle (Bisesi, Bridges & Klaine, 2014). A exposição à VLX também se mostrou capaz de causar alterações em comportamentos reprodutivos em peixes machos adultos de *Pimephales promelas* (peixinho), levando a aumento do comportamento de defesa de ninhos vazios e agressividade, após exposição à concentração de 88 µg/L do referido antidepressivo (Parrott & Metcalfe, 2018).

A redução da velocidade máxima de nado é um parâmetro que indica comprometimento multisistêmico nesses organismos (Painter *et al.*, 2009), e, portanto, no presente estudo, o achado da redução da velocidade máxima de nado, à medida que a concentração de VLX aumentava, nos leva a acreditar que a exposição crônica a tal antidepressivo pode ter desencadeado, nos peixes, alterações fisiológicas significativas que culminaram na queda da velocidade máxima de nado; essas alterações fisiológicas foram detectadas por nós, nas avaliações morfométricas feitas em brânquias e intestino. Detectamos também alterações em importantes enzimas biomarcadoras de toxicidade, bem como nos resultados da expressão gênica, em que 80 genes estavam diferencialmente expressos nos organismos expostos à VLX.

Sabidamente, existe uma forte correlação entre a distribuição anormal do neurotransmissor serotonina, no sistema nervoso, e alteração do comportamento animal (Weber *et al.*, 1991) e uma vez que a VLX é um antidepressivo que inibe a recaptação de serotonina, é plausível supor que as alterações comportamentais verificadas por nós, no presente estudo, possam ser resultado de desequilíbrios da recaptação desse neurotransmissor, como já sugerido em outros estudos (Dorelle *et al.*, 2020; Bisesi, Bridges & Klaine, 2014; Painter *et al.*, 2009; Levin, Bencan & Cerutti, 2007). A VLX, ao impedir a recaptação de serotonina, pode ter desencadeado nos animais expostos, a já descrita, síndrome da serotonina (SS), que está relacionada a alterações comportamentais no peixe-zebra pela modulação serotoninérgica (Stewart *et al.*, 2013; Stewart *et al.*, 2011), levando às alterações no nado verificadas no presente estudo. A latência reduzida para entrar no topo do aquário e “*surfacing behavior*” (comportamento de superfície) são os comportamentos principais relacionados à SS no peixe-zebra (Stewart *et al.*, 2013), e ambos foram identificados nesse estudo após exposição crônica à VLX, o que corrobora a hipótese da síndrome da serotonina para explicar as alterações comportamentais encontradas. Outro fato fisiológico que ajuda a explicar as mudanças comportamentais em *Danio rerio*, identificadas por nós, no presente estudo, é a alteração do hormônio do estresse, o cortisol que, como já demonstrado em estudos anteriores, tem a sua produção modificada, após exposição à VLX (Tang *et al.*, 2021; Best *et al.*, 2014;). Entretanto, para uma afirmação mais assertiva, experimentos que quantifiquem a serotonina extracelular e o cortisol, nos peixes expostos à VLX, precisariam ser realizados.

Estudos mostram que alterações no padrão locomotor de peixes são resultantes das alterações ocorridas no ciclo circadiano desses animais (Zheng *et al.*, 2021; Zvezdin *et al.*, 2019; Prokkola & Nikinmaa, 2018; Yang *et al.*, 2018; Vera *et al.*, 2009), e, inclusive, a exposição ao fármaco VLX segue tal padrão (Melvin, 2017). Nesse sentido, os nossos resultados de expressão gênica, ao revelarem que muitos genes reguladores do ciclo circadiano foram alterados pela exposição à VLX, podem ajudar a explicar as modificações nos padrões locomotores encontradas nos testes comportamentais, sugerindo que essas mudanças comportamentais, sejam agravadas também, além dos outros fatores já citados, da desregulação de importantes vias metabólicas de controle do ciclo circadiano. Um dos principais genes reguladores do ciclo circadiano em *Danio rerio* é o gene *nr1dl*, e tal gene estava com a expressão hiporegulada nas amostras cerebrais de peixes-zebra expostos às concentrações de 0,2 e 1000 µg/L de VLX, em comparação ao grupo controle. É sabido que *nr1dl* desempenha papel conservado na manutenção dos ritmos de atividade locomotora em *Danio rerio* (Huang *et al.*, 2016) e que organismos mutantes para *nr1dl* mostram ritmos interrompidos de atividades

locomotoras (Chung *et al.*, 2014). Dessa maneira, é possível supor que em nossos experimentos, a menor expressão de *nr1d1*, causada pela exposição à VLX, tenha resultado em menor quantidade desse produto gênico (proteína) circulante nas células neuronais, o que pode ter desencadeado as alterações comportamentais verificadas nesse trabalho.

Similarmente aos resultados desse trabalho, outro estudo também mostrou que a desregulação da expressão de genes do ritmo circadiano medeia alterações comportamentais em concentrações ambientais de fármacos neuropsiquiátricos (Oggier *et al.*, 2010). O ritmo circadiano é controlado diretamente pelo sistema neuroendócrino (Urbanski, 2011), e, por isso, a influência no padrão de atividade locomotora dos animais é consistente com o conhecido mecanismo de ação dos antidepressivos nas vias neuroendócrinas (Melvin, 2017). Portanto, *endpoints* como a análise comportamental são importantes para detectar se tais poluentes são capazes de gerar efeitos subletais tóxicos (Zheng *et al.*, 2021), e, por essa razão, estudos ecotoxicológicos que avaliam o comportamento dos indivíduos após a exposição se fazem cada vez necessários para o melhor esclarecimento da toxicidade de um determinado composto.

Em conjunto, nossos resultados sobre os efeitos da VLX no comportamento natatório, junto com o trabalho de outros cientistas, demonstram claramente que antidepressivos não podem ser considerados fármacos ambientalmente seguros. Há necessidade de mais pesquisas para esclarecer os efeitos comportamentais da exposição crônica aos antidepressivos em peixes e em outros organismos não-alvos bem como as consequências ecológicas dessas alterações comportamentais. Até porque, na natureza, os animais geralmente não são submetidos a apenas um antidepressivo de cada vez, mas sim a um mix de fármacos e seus metabólitos (Schlüsener *et al.*, 2015; Schultz *et al.*, 2010; Vasskog *et al.*, 2008) e, nesse cenário, em que efeitos aditivos são esperados, as consequências da exposição farmacêutica se tornam ainda mais difíceis de prever (Brodin *et al.*, 2014).

6.2.6. Expressão gênica em cérebros de *Danio rerio* após exposição crônica à VLX

O transcriptoma de um ser vivo representa todas as moléculas de RNA, incluindo o RNA mensageiro (mRNA), que constitui os blocos de construção para traduzir o DNA em aminoácidos para formar proteínas. A totalidade do mRNA é um espelho dos genes que são ativamente expressos em uma célula ou organismo em um determinado momento. Isso, por sua vez, permite deduzir como os organismos respondem às mudanças no ambiente externo frente a uma determinada exposição (Legradi *et al.*, 2018; Lettieri, 2016; Schirmer *et al.*, 2010), e, no presente estudo, justamente por prever essas mudanças, o perfil de expressão gênica em cérebros de *Danio rerio*, após a exposição crônica à venlafaxina foi avaliado. Tal análise

indicou o total de 80 genes diferencialmente expressos entre os grupos expostos (concentrações 0,2 e 1000 µg/L) e o grupo controle: sessenta deles entre os expostos à menor concentração (0,2 µg/L) e o controle, e quarenta e três entre os expostos à maior concentração (1000 µg/L) e o controle. A alteração nos perfis de expressão gênica, após exposição à VLX, não parece seguir um padrão concentração-dependente, uma vez que a concentração menor (0,2 µg/L) promoveu alteração em um número maior de genes em comparação com a maior concentração testada (1000 µg/L).

Em camundongos, por exemplo, a exposição à VLX (10 mg/kg/dia), durante cinco semanas interferiu na metilação de promotores de genes envolvidos no estresse oxidativo e nitrosativo, resultando em aumento na expressão dos seguintes genes: *SOD1*, *SOD2*, *NOS2*, nas células periféricas sanguíneas; *CAT*, *Gpx1*, *Gpx4* e *NOS1*, em células do hipocampo, mesencéfalo e gânglios da base; e *CAT*, no mesencéfalo e córtex cerebral (Wigner *et al.*, 2020). Entretanto, o efeito da exposição à VLX descartada no ambiente, em outros animais, ainda é indefinido. Nos ecossistemas, tal medicamento é absorvido e metabolizado por peixes, que pela sua homologia com muitos genes humanos, também acabam sofrendo alterações gênicas resultantes dessa exposição (Rodrigues *et al.*, 2020; Thomas & Klaper, 2012), o que, do ponto de vista ecotoxicológico, é bastante consternador.

A exposição aguda (144 horas) à VLX (concentrações de 0,3 e 30 µg/L) mostrou-se capaz de inibir a expressão de importantes genes do desenvolvimento do sistema nervoso, dos olhos, do coração e dos ossos (*nkx2.5*, *otx2*, *bmp4* e *pax 6*) (Sehonova *et al.*, 2019) e de genes de vias de biotransformação e metabolismo de fármacos (*abcb4*, *abcc1*, *pxr*, *cyp1a*, *cyp3a65* e *gstp2*) (Hodkovicova *et al.*, 2020) em larvas de *Danio rerio*. Tais estudo indicam que a exposição a esse antidepressivo pode afetar a expressão gênica de proteínas cruciais para o desenvolvimento e enzimas-chave de biotransformação em embriões de *D. rerio*, inclusive, em concentrações ambientalmente relevantes, prejudicando o processo de biotransformação desse composto, e podendo resultar em bioacumulação do fármaco no organismo juvenil. Tal redução da expressão de *gstp2* (após exposição à 30 µg/L) estudado por Hodkovicova e colaboradores (2020), corrobora os resultados encontrados por nós, no presente estudo, sobre a alteração da atividade da enzima GST em larvas; as quais também tiveram redução na atividade dessa enzima após 168 horas de exposição à VLX, em concentrações próximas (2 µg/L) a de Hodkovicova *et al.*, 2020. Larvas de peixe-zebra também mostraram alterações na expressão de genes pertencentes as vias serotoninérgicas, noradrenérgicas e dopaminérgicas, bem como nos receptores nucleares relacionados ao metabolismo de lipídios e drogas, após 80 horas de exposição às concentrações de 16, 80, 400, 2000 e 10000 ng/L do fármaco (Rodrigues *et al.*,

2020), reforçando a hipótese de que a exposição à VLX pode levar a graves consequências no desenvolvimento neuronal do animal, uma vez que há a desregulação de importantes genes envolvidos em tais vias. A exposição de larvas de *Danio rerio* à VLX também mostrou-se capaz de promover o aumento da expressão de genes de enzimas esteroidogênicas (*star*, *cyp11a1*, *cyp11b1*) (responsáveis pela regulação da produção de estrógenos), após 120 horas de exposição às concentrações de 1, 10 e 100 µg/L, o que culminou em aumento na produção de cortisol nos animais, alteração hormonal essa, que, sabidamente, irá impactar o comportamento e pode comprometer as respostas adaptativas dos animais no ambiente (Tang *et al.*, 2021).

Além de alterar a expressão gênica em larvas de peixes, estudos de expressão gênica com adultos, também mostram tal constatação. Cérebros de *Pimephales promelas* (peixinho), expostos por 18 dias à concentração de 50 µg/L de VLX, e tiveram alteração na expressão de grupos de genes relacionados aos transtornos do espectro do autismo em peixes, que são homólogos aos genes dos seres humanos (Thomas & Klaper, 2012) e também em conjuntos de genes conhecidos por estarem envolvidos no desenvolvimento, na regulação e crescimento neuronal, no controle das sinapses e na produção de neurotransmissores, também homólogos aos genes humanos (Thomas, Joshi & Klaper, 2011). Grupos de truta-arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*) juvenis, expostos às concentrações de 0,2 e 1 µg/L de VLX, por sete dias, apresentaram níveis aumentados na expressão de transcritos relacionados à produção de cortisol, à proteína reguladora aguda esteroidogênica (*StAR*) e à enzima mitocondrial *P450scc*, no tecido renal desses animais, demonstrando que a VLX, em níveis detectados no meio aquático, pode comprometer as respostas adaptativas na truta arco-íris, uma vez que, ao alterar a expressão gênica, modifica os processos fisiológicos do rim.

Uma vez que não há estudos que descrevam efeitos globais no conjunto gênico de uma espécie após exposição à VLX, o presente estudo, ao realizar a análise global dos transcritos de amostras cerebrais de peixes-zebra adultos, descreve informações ecotoxicológicas relevantes ao identificar 80 genes diferencialmente expressos nos grupos tratados com esse antidepressivo. Como esperado em uma análise em larga escala, muitos genes com funções abrangentes de homeostase celular aparecem com expressão diferenciada, o que, do ponto de vista biológico, pode não ser muito informativo quanto aos principais efeitos da exposição ao medicamento. Entretanto, ao realizarmos análises de enriquecimento funcional, conseguimos alocar esses genes em suas respectivas vias metabólicas, o que nos permite traçar um panorama mais específico dos efeitos da exposição à VLX ao organismo modelo, e, nesse panorama, uma das principais vias alteradas, para os dois grupos tratados (0,2 e 1000 µg/L) foi a de genes que atuam no ciclo circadiano.

Nos vertebrados, o ritmo circadiano é um sistema temporal interno que permite ao organismo alterar padrões em sua fisiologia de acordo com um intervalo de tempo de mais ou menos 24 horas, e assim, antecipar e se preparar para mudanças físicas no ambiente, as quais estão associadas com a noite e o dia (Dias *et al.*, 2017). Dessa forma, o ciclo circadiano promove, no animal, modificações diárias para lidar com desafios das mudanças ambientais, resultando em uma sincronização entre o organismo e o ambiente externo, o que é fundamental para sincronizar o comportamento, a fisiologia e o metabolismo do organismo com os fenômenos ambientais, garantindo a sua sobrevivência (Souza, Cruz-Machado e Tamura, 2008). Em *Danio rerio*, esse sistema biológico persiste sob condições ambientais constantes, com período de duração, de aproximadamente 24 horas (Veras *et al.*, 2013; Hurd *et al.*, 1998) e, quando são submetidos ao ciclo diário do fotoperíodo de luz/escuro, demonstram um padrão de atividade locomotora que nos permite classificá-los como diurnos (Hurd *et al.*, 1998). Este ciclo de luz/escuro tem sido considerado um dos mais importantes fatores ambientais sincronizadores do ritmo circadiano, junto com o ciclo alimentar e atividade locomotora (Prokkola & Nikinmaa, 2018). Mecanismos internos sincronizam a atividade dos sistemas do peixe com as variações de luminosidade e escuridão do meio ambiente. Tais variações são detectadas e processadas pelo sistema nervoso, promovendo a regulação de vias bioquímicas específicas (Noche *et al.*, 2011). Nos peixes, o neurohormônio melatonina, produzido pela retina e glândula pineal, parece ser a principal via bioquímica de controle dos relógios biológicos, conduzindo a informação rítmica a todo o organismo e resultando em variações fisiológicas e comportamentais no sujeito (Dias *et al.*, 2017; Elbaz *et al.*, 2013). Outra via importante para a regulação do ciclo circadiano é o controle neuroendócrino de neurotransmissores, principalmente a serotonina (5-HT), que é o principal neurotransmissor envolvido na regulação dos padrões de sono e vigília (Melvin, 2017).

Ciprinídeos, como o *Danio rerio*, possuem grande quantidade de células com receptores membranares para serotonina (5-HT), e a melatonina pode modular tal via serotoninérgica pois apresenta alta afinidade com esses receptores, diminuindo a captação de serotonina na fenda sináptica (Velarde, Delgado & Alosó-Gómez, 2010). A melatonina é produzida a partir de um precursor de 5-HT, o 5-Hidroxitriptofano (5-HTP), a partir de uma via enzimática específica (Souza, Cruz-Machado & Tamura, 2008), e antidepressivos são capazes de alterar a quantidade de 5-HT e 5-HTP em peixes, após exposição (Okada *et al.*, 1998). A VLX é um antidepressivo que tem como principal mecanismo de ação o bloqueio da ação dos transportadores de serotonina (SERT, 5-HTT) na fenda sináptica, e, dessa forma, impede a recaptação desse neurotransmissor nos neurônios (Suwała, Machowska & Wiela-Hojenska, 2019). Como

descrito na literatura científica, uma vez que sabemos que tanto a VLX como a melatonina são capazes de atuar nos receptores 5-HTT (Suwała, Machowska & Wiela-Hojenska, 2019; Velarde, Delgado & Alosó-Gómez, 2010), é plausível supor que a grande quantidade de genes do ciclo circadiano que se encontrara alterada, nos cérebros de peixes expostos à VLX (concentrações de 0,2 e 1000 µg/L), seja resultado de um processo de desequilíbrio da ligação da VLX e da melatonina endógena aos receptores 5-HTT. Também pode ser considerado resultado desse processo, o desequilíbrio na quantidade de substrato (serotonina) para a correta ação enzimática necessária para a conversão de 5-HT em melatonina, o que levou a uma descompensação tanto na regulação do neurotransmissor serotonina quanto da produção e captação da melatonina, para que, juntas essas duas vias pudessem realizar os papéis já descritos na regulação do ciclo circadiano (Veras *et al.*, 2013; Sousa, Cruz-Machado & Tamura, 2008;). Essa desregulação homeostática nessas importantes vias de controle do ciclo circadiano dos peixes, ao longo dos 28 dias de exposição, pode ter causado às alterações detectadas no presente estudo, nos perfis de expressão de genes do ciclo circadiano, como uma tentativa de reorganização metabólica. Entretanto, indiscutivelmente, para que pudéssemos afirmar tal argumento com mais assertividade e precisão, experimentos que avaliem os níveis de melatonina e serotonina após exposição à VLX, bem como avaliações enzimáticas nas amostras cerebrais se fazem necessárias.

Estudos que analisam os efeitos de antidepressivos no ritmo circadiano de peixes mostram resultados que corroboram os nossos, o que indica que, possivelmente, a alteração no ritmo circadiano, em peixes, seja um efeito subletal recorrente dos antidepressivos, tanto em nível comportamental como molecular, conforme revelam nossos dados. Peixes adultos (*Gambusia holbrooki*) expostos à VLX (100 µg/L), durante 168 horas, tiveram a ritmicidade circadiana significativamente alterada em comparação aos animais não expostos (Melvin, 2017), e essa exposição levou a alterações comportamentais desses animais. Tais alterações na ritmicidade circadiana identificadas por Melvin (2017), após exposição à VLX, corrobora os resultados moleculares do presente estudo, que detectou alterações no padrão de expressão de importantes proteínas envolvidas no controle do ciclo circadiano, o que pode ter resultado na alteração do fenótipo comportamental desses animais. Amostras cerebrais de peixes-zebra adultos, expostos a concentrações ambientalmente relevantes de diazepam (273 ng/L e 273 µg/L), apresentaram alteração transcricional de vários genes envolvidos com o ciclo circadiano, incluindo os genes *arntl1a*, *arntl1b*, *arntl2*, *nr1d4a*, *nr1d4b*, *rorcb*, *per1*, *per2*, *per3* e *per4*, que estavam com a exposição alterada nas amostras cerebrais dos peixes, após a exposição à VLX no presente trabalho. A avaliação do genoma de larvas de *Danio rerio* após exposição aos antidepressivos

amitriptilina e fluoxetina que, assim como a VLX, inibem a recaptação de serotonina, identificou a inibição dos genes relacionados ao controle do ciclo circadiano, os genes *nr1dl* e *per* (Wu et al., 2017). Tais genes também estão com expressão significativamente reduzida nas amostras cerebrais de peixes-zebra, após exposição por 28 dias à VLX, como apresentado no presente estudo, resultado indicador de que, provavelmente, o bloqueio da recaptação de serotonina, promovido pelos antidepressivos, resulte em desequilíbrio do ciclo circadiano em *Danio rerio*, em suas diferentes fases do ciclo de vida, o que leva a alterações na expressão gênica de importantes genes de controle desse ciclo biológico. Os ritmos circadianos refletem as adaptações, em larga escala, de um organismo ao seu ambiente (Melvin *et al.*, 2017), e alterações na regulação genética desse ciclo, após exposição à VLX, sugerem fortemente que essa exposição foi capaz de alterar múltiplos processos fisiológicos básicos para a homeostase dos peixes.

Em humanos, a maioria dos antidepressivos causa distúrbios no sistema cronológico, pois tem efeitos profundos na arquitetura do sono, principalmente no sono REM (do inglês: *Rapid Eye Movement*: "Movimento Rápido dos Olhos"). Os antidepressivos que inibem a recaptação da serotonina e de norepinefrina, como a VLX, são medicamentos conhecidos pela capacidade de induzir ou exacerbar bruxismo do sono e promover, no sono REM, o aumento na latência, supressão no tempo e perturbação da regulação do tônus muscular (Wichniak *et al.*, 2017; Quera-Salva, Lemoine & Guilleminault, 2010). Em ensaios clínicos, 24% dos pacientes com transtornos de ansiedade generalizada tratados com VLX relatam insônia e sonolência durante o tratamento (Wichniak *et al.*, 2017). Atualmente, é amplamente descrito que o uso de antidepressivos é capaz de alterar o ciclo circadiano dos pacientes (Boyce, 2010), e tais efeitos na perturbação do sono daqueles que fazem uso da VLX (Wichniak *et al.*, 2017) corroboram os resultados de expressão gênica do presente trabalho e fornecem mais evidências para a hipótese de que a exposição à VLX é capaz de causar alterações no ciclo circadiano.

Dada a natureza conservada (na sequência e função) e a homologia dos genes de peixes com os genes dos seres humanos, é razoável esperar a indução de perfis de expressão gênica em humanos semelhantes aos perfis verificados em peixes (Thomas & Klaper, 2012). Os nossos resultados, somados aos múltiplos estudos que apresentam resultados de expressão gênica após exposição à VLX, geram informações bastante preocupantes do ponto de vista ecotoxicológicos, uma vez que a contaminação da água potável por esse antidepressivo levará inevitavelmente a exposição de seres humanos a essa droga, o que, por sua vez, pode acarretar a modificação na expressão gênica dos indivíduos expostos, levando a consequências ainda desconhecidas, mas já premeditadas. Isso é feito por Thomas & Klaper (2012) e Kaushik *et al.*,

(2016) que indicam que VLX e outros antidepressivos nos ecossistemas aquáticos e, conseqüentemente, na água tratada, podem ser contaminantes que levem ao desenvolvimento de autismo idiopático em indivíduos geneticamente predispostos, como resultado dessa contaminação na vida uterina.

7. CONCLUSÕES

7.1. CONCLUSÕES GERAIS

O presente estudo mostra que os antidepressivos nortriptilina e venlafaxina, com diferentes modos de ação, podem afetar animais não-alvos em seus diferentes estágios de vida (larval e adulta). Em um panorama geral, podemos concluir que esses antidepressivos causaram efeitos letais e subletais em embriões e adultos de *D. rerio* em diferentes concentrações testadas, incluindo as similares às detectadas no ambiente. Os dois medicamentos não induziram a mortalidade do organismo-modelo em concentrações ambientalmente relevantes, apresentando tal efeito apenas em concentrações muito elevadas, que não são encontradas no ambiente. Importante pontuar que, para esse parâmetro, a NTP se mostrou mais tóxica em comparação com a VLX, pois causou a mortalidade dos organismos em concentrações mais baixas. Nenhum dos fármacos antidepressivos apresentou efeitos genotóxicos nas células sanguíneas de *Danio rerio*, após exposição crônica e aguda, o que nos leva a acreditar que, provavelmente, esses não devam ser uma consequência da toxicidade que os fármacos causam. Ao analisar parâmetros mais sensíveis de alterações celulares, verificamos que os antidepressivos, foram capazes de causar alterações na atividade de enzimas biomarcadores de toxicidade: AChE (após exposição à VLX e NTP) e GST e LDH (após exposição à VLX), em concentrações similares às encontradas no ambiente e, também, em altas concentrações. Ao analisar os efeitos histológicos em organismos adultos expostos cronicamente (28 dias), a NTP não foi capaz de causar alterações histopatológicas nas brânquias, fígado e rins; em comparação com a VLX, que foi capaz de causar reduções morfométricas no intestino e nas brânquias. Todos os dois antidepressivos, NTP e VLX, causaram, em concentrações superiores às registradas nos ecossistemas, comportamento fenotípico semelhante aos apresentados por indivíduos em SS, incluindo comportamento de superfície e hipolocomoção, típicos de organismos expostos à antidepressivos inibidores seletivos da recaptação da serotonina. Em contraste, na alteração expressão de mRNA de importantes genes relacionados ao controle do comportamento locomotor e controle das vias oxidativas, se mostraram, como as principais vias alteradas após exposição à NTP; enquanto que a principal via gênica alterada após exposição à VLX, foi aquela relacionada ao ciclo circadiano. Ambientalmente relevante pontuar que peixes expostos às concentrações muito baixas, de NTP e VLX, tiveram genes dessas vias desregulados, indicando o potencial tóxico de tais medicamentos mesmo em concentrações muito baixas. A análise, então, desses resultados em conjunto, leva-nos a concluir que animais não-alvo, como

peixes que estão vivendo em ambientes contaminados com resíduos de fármacos antidepressivos, podem ser negativamente afetados de múltiplas maneiras, como demonstrado pelas nossas avaliações. De fato, a maior quantidade de alterações, no organismo-modelo, após exposição aconteceu em concentrações mais elevadas dos fármacos, entretanto, concentrações mais baixas e ambientalmente relevantes também foram capazes de causar importantes modificações fisiológicas, como: alterações na atividade de biomarcadores enzimáticos, morfometria de órgãos, comportamento locomotor e expressão gênica (Figura 44).

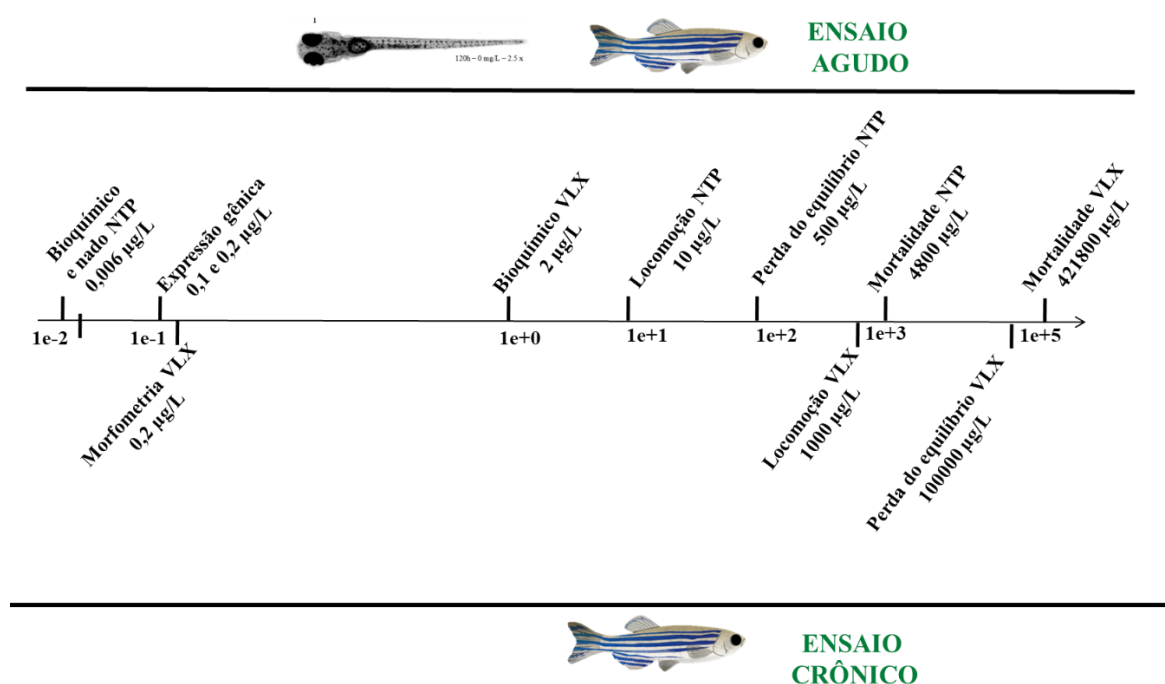


Figura 44. Resumo das principais alterações detectadas em *Danio rerio* após exposição aguda e crônica, nos diferentes estágios de vida, aos fármacos psiquiátricos NTP e VLX.

Os resultados do presente estudo fornecem novos dados científicos para a avaliação das potenciais consequências para a segurança dos organismos não-alvos expostos a esses antidepressivos, NTP e VLX, no meio ambiente e também para a saúde humana, pela homologia das vias do organismo modelo com as da nossa espécie. Isso indica que alguns dos efeitos que verificamos no peixe-zebra, como resultado da exposição, podem também ocorrer de maneira similar nos seres humanos. Como a NTP e a VLX são normalmente encontradas em meio a uma mistura de produtos farmacêuticos, em efluentes de águas residuais municipais, incluindo outros antidepressivos, o potencial para efeitos aditivos, sinérgicos ou antagônicos é uma consideração importante para a avaliação de risco ambiental.

Nosso estudo é inédito e pode contribuir para uma melhor compreensão dos possíveis efeitos adversos da NTP e VLX em organismos aquáticos. Por último, o peixe-zebra se mostrou um excelente modelo animal para avaliar a toxicidade de antidepressivos.

7.2. CONCLUSÕES ESPECÍFICAS

Em relação ao antidepressivo tricíclico NTP, que inibe a recaptação da noradrenalina e serotonina, é possível concluir que a exposição foi capaz de

Em embriões/larvas de peixe zebra:

- No teste de toxicidade em embriões (duração de 168 h), com concentrações de 500; 1100; 2300; 4800; 10300; 22000; 46900 µg/L de NTP, apresentar toxicidade dependente do tempo de exposição; e a CL₅₀ delimitada ao final do experimento foi de 1800 µg/L. Além disso, induziu malformações da cauda e do coração.
- Causar a perda do equilíbrio, após 96 horas de exposição às concentrações 1100; 2300 e 4800 µg/L de NTP; após 144 horas de exposição às concentrações de 500; 1100; 2300 µg/L de NTP; e após 168 horas de exposição à concentração de 1100 µg/L de NTP.
- Reduzir a frequência cardíaca das larvas expostas por 48 horas, à concentração de 10300 µg/L de NTP.
- Diminuir a atividade da AChE (na concentração de 500 µg/L após 120 e 144 horas de exposição; nas concentrações de 0,088; 1,58 e 500 µg/L, após 168 horas de exposição) indicando um provável padrão de efeito tempo-dependência do medicamento na atividade enzimática.
- Alterar os padrões de comportamento locomotor, após 120, 144 e 168 horas de exposição à NTP, nas concentrações de 0,006; 0,088; 1,58; 28,12 e 500 µg/L, na avaliação da distância total percorrida, tempo total de nado e distâncias curtas e longas percorridas, em múltiplas das concentrações testadas.

Em peixes-zebra adultos:

- Apresentar uma CL₅₀ de 1100 µg/L, pelo teste de toxicidade aguda (96 horas) na avaliação das concentrações de 500, 600, 800, 1100, 1400, 1800 e 2000 µg/L de NTP.
- Reduzir a atividade da AChE, no teste de toxicidade aguda (96 horas), nas amostras da cabeça de peixes submetidos às concentrações de 500; 600; 800; 1100 µg/L, e nos músculos à concentração de 1100 µg/L de NTP.
- Não induzir alterações na estrutura do DNA das células sanguíneas, pela análise do teste do cometa e micronúcleo, após exposição aguda (96 horas), às concentrações 500, 600, 800, 1100 µg/L de NTP.

- Não causar danos ao DNA das células sanguíneas, pela análise do teste do cometa e micronúcleo, após exposição crônica (28 dias), nas concentrações de 0,1 e 10 µg/L de NTP.
- Não alterar a atividade enzimática de AChE, nas amostras musculares e da cabeça, após exposição crônica (28 dias), às concentrações de 0,1 e 10 µg/L de NTP.
- Não causar alterações histopatológicas no fígado, rim e brânquias dos animais expostos cronicamente (28 dias) à concentração de 0,1 e 10 µg/L de NTP.
- Causar alterações no padrão locomotor dos animais expostos cronicamente (28 dias) à concentração de 10 µg/L de NTP, ao aumentar o tempo de nado dos animais nas camadas superiores do aquário.
- Desregular a expressão de 243 genes, nas amostras cerebrais, após exposição crônica (28 dias), às concentrações de 0,1 e 10 µg/L de NTP. Na exposição à concentração de 0,1 µg/L de NTP, 66 genes estavam com expressão diferente em comparação ao grupo controle, a maior parte deles, de vias de transcrição de ligação ao DNA, ligação ao íon cálcio e atividade de oxidoredutases; e a exposição à concentração de 10 µg/L de NTP, resultou na expressão diferencial de 184 genes em comparação ao grupo controle, e a maior parte desses genes estão envolvidos em vias de controle de oxidoredução, transportadores de, geração de metabólitos precursores e energia, resposta imune, organização mitocondrial e regulação da locomoção.

Em relação ao antidepressivo venlafaxina, inibidor da recaptção de serotonina e noradrenalina, a exposição foi capaz de

Em embriões/larvas de peixe zebra:

- Interferir na sobrevivência das larvas, em altas concentrações, uma vez que a CL₅₀, ao final do teste de toxicidade em embriões (168 horas e nas concentrações de 100000; 177900; 237300; 316400; 421800; 562500; 750000; 1000000 µg/L de VLX), foi de 274100 µg/L.
- Causar a perda do equilíbrio, após 96 horas, nas concentrações 100000; 237400; 316400; 421800; 562500 de µg/L de VLC; após 120 horas, nas concentrações 316400; 421800 e 562500 µg/L de VLX; após 144 horas, nas concentrações de 316400 e 421800 µg/L de VLX; e após 168 horas, nas concentrações 237400 e 316400 µg/L de VLX.
- Reduzir a frequência cardíaca das larvas expostas por 48 horas, às concentrações de 562500; 421800; 316400 e 237300 µg/L de VLX.
- Reduzir a atividade da enzima AChE, após 168 horas de exposição, às concentrações de 1000, 25000 e 100000 µg/L de VLX.

- Reduzir a atividade da enzima GST, após 168 horas de exposição, às concentrações de 2, 1000 e 25000 $\mu\text{g/L}$ de VLX.
- Aumentar a atividade da enzima LDH, após 168 horas de exposição, à concentração de 100000 $\mu\text{g/L}$.

Em peixes-zebra adultos:

- Não causar mortalidade de 100% dos organismos nas concentrações de 1000, 25000, 50000, 75000 e 100000 $\mu\text{g/L}$ de VLX, expostos por 96 horas, o que indica que, provavelmente, a CL_{50} , é um valor superior a 100000 $\mu\text{g/L}$.
- Não induzir alterações na estrutura do DNA das células sanguíneas, pela análise do teste do cometa e micronúcleo, após exposição aguda (96 horas) às concentrações de 1000, 25000, 50000, 75000 e 100000 $\mu\text{g/L}$ de VLX.
- Não alterar a atividade da AChE, nas amostras da cabeça e músculos de peixes expostos às concentrações de 1000, 25000, 50000, 75000 e 100000 $\mu\text{g/L}$ de VLX, no teste de toxicidade aguda (96 horas).
- Alterar a atividade de GST após exposição aguda (96 horas), causando redução da atividade enzimática, nas amostras de cabeça, nos grupos expostos às concentrações de 25000, 50000 e 100000 $\mu\text{g/L}$ de VLX e, aumento da atividade dessa enzima nas amostras musculares no grupo exposto à 100000 $\mu\text{g/L}$ de VLX.
- Aumentar a atividade da LDH nas amostras de cabeça, após exposição por 96 horas à concentração de 100000 $\mu\text{g/L}$ de VLX.
- Não promover danos do DNA nas células sanguíneas, pela análise do teste do cometa e do micronúcleo, após exposição crônica (28 dias) às concentrações de 0,2 e 1000 $\mu\text{g/L}$ de VLX.
- Não afetar a atividade da enzima AChE, nas amostras musculares e da cabeça, após exposição crônica (28 dias) às concentrações de 0,2 e 1000 $\mu\text{g/L}$ de VLX.
- Aumentar a atividade da enzima GST, nas amostras de cabeça dos grupos expostos à concentração de 0,2 $\mu\text{g/L}$ de VLX, após a exposição crônica (28 dias).
- Aumentar a atividade da LDH nas amostras de cabeça, após exposição à concentração de 1000 $\mu\text{g/L}$ de VLX, durante 28 dias.
- Alterar as dimensões do intestino, após exposição crônica, ao reduzir a altura do epitélio intestinal, na concentração de 1000 $\mu\text{g/L}$; e a largura e altura das vilosidades intestinais, nas concentrações de 0,2 e 1000 $\mu\text{g/L}$.

- Reduzir o tamanho das lamelas secundárias das brânquias nos grupos expostos às concentrações de 0,2 e 1000 $\mu\text{g/L}$ de VLX, durante 28 dias.
- Alterar o padrão locomotor dos animais expostos cronicamente (28 dias) à concentração de 1000 $\mu\text{g/L}$ de VLX, causando redução na velocidade máxima de nado, aumento no tempo e na distância percorrida na área superior do aquário e redução da latência para área superior.
- Provocar, após exposição crônica, a expressão diferencial em 80 genes, dos quais 37 estão diferencialmente expressos entre a menor concentração (0,2 $\mu\text{g/L}$) e o controle, e 43 genes estão diferencialmente expressos entre a maior concentração (1000 $\mu\text{g/L}$) e o controle. Em ambas as exposições, a maior parte dos genes diferencialmente expressos está envolvida com controle do ciclo circadiano.

8. REFERÊNCIAS

- Abalaka, S. E., Enem, S. I., Idoko, I. S., Sani, N. A., Tenuche, O. Z., Ejeh, S. A., & Sambo, W. K. (2020). Heavy metals bioaccumulation and health risks with associated histopathological changes in *Clarias gariepinus* from the Kado fish market, Abuja, Nigeria. *Journal of Health and Pollution*, 10(26), 1–12. <https://doi.org/10.5696/2156-9614-10.26.200602>
- Abe, F. R., Soares, A. M. V. M., Oliveira, D. P. d., & Gravato, C. (2018). Toxicity of dyes to zebrafish at the biochemical level: Cellular energy allocation and neurotoxicity. *Environmental Pollution*, 235, 255–262. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2017.12.020>
- Abdel-Wahab, B. A., & Salama, R. H. (2011). Venlafaxine protects against stress-induced oxidative DNA damage in hippocampus during antidepressant testing in mice. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 100(1), 59–65. <https://doi.org/10.1016/j.pbb.2011.07.015>
- Ahmadimanesh, M., Abbaszadegan, M. R., Morshedi Rad, D., Moallem, S. A., Mohammadpour, A. H., Ghahremani, M. H., Farid Hosseini, F., Behdani, F., Akhondpour Manteghi, A., Jowsey, P., Shabani Behbahani, F., Moallem, S. M. H., & Etemad, L. (2019). Effects of selective serotonin reuptake inhibitors on DNA damage in patients with depression. *Journal of Psychopharmacology*, 33(11), 1364–1376. <https://doi.org/10.1177/0269881119874461>
- Albinati, A. C. L., Moreira, E. L. T., Albinati, R. C. B., Carvalho, J. V., Lira, A. D. de, Santos, G. B., & Vidal, L. V. O. (2009). Biomarcadores histológicos: toxicidade crônica pelo Roundup em piaçu (*Leporinus macrocephalus*). *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, 61(3), 621–627. <https://doi.org/10.1590/s0102-09352009000300015>
- Ali, S., Champagne, D. L., Spaink, H. P., & Richardson, M. K. (2011). Zebrafish embryos and larvae: A new generation of disease models and drug screens. *Birth Defects Research Part C - Embryo Today: Reviews*, 93(2), 115–133. <https://doi.org/10.1002/bdrc.20206>
- Almansour, M. I., Jarrar, Y. B., & Jarrar, B. M. (2018). In vivo investigation on the chronic hepatotoxicity induced by sertraline. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 61, 107–115. <https://doi.org/10.1016/j.etap.2018.05.021>
- Almeida de, C. A. A., Oliveira, M. S., Mallmann, C. A., & Martins, A. F. (2015). Determination of the psychoactive drugs carbamazepine and diazepam in hospital effluent and identification of their metabolites. *Environmental Science and Pollution Research*, 22(21), 17192–17201. <https://doi.org/10.1007/s11356-015-4948-y>
- Al-Zaidan, A. S., Al-Sarawi, H. A., Massoud, M. S., Al-Enezi, M., Smith, A. J., Bignell, J. P., Green, M. J., Askem, C., Bolam, T. P. C., Barber, J. L., Bersuder, P., & Lyons, B. P. (2015). Histopathology and contaminant concentrations in fish from Kuwait's marine environment. *Marine Pollution Bulletin*, 100(2), 637–645. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2015.07.030>

- Amaral, I. C. C., Carvalho, L. V. B. de, Pimentel, J. N. da S., Pereira, A. C., Vieira, J. A., Castro, V. S. de, Borges, R. M., Alves, S. R., Nogueira, S. M., Tabalipa, M. de M., Otero, U. B., Oliveira, K. M. P. G. de, Corrêa, S. M., Fonseca, A. S. A., Moreira, J. C., Peres, F., Teixeira, L. R., Menezes, M. A. C., Mattos, R. de C. O. da C., Larentis, A. L. (2017). Avaliação ambiental de BTEX (benzeno, tolueno, etilbenzeno, xilenos) e biomarcadores de genotoxicidade em trabalhadores de postos de combustíveis. *Revista Brasileira de Saúde Ocupacional*, 42(suppl 1), 1–14. <https://doi.org/10.1590/2317-6369000124515>
- Américo, J., Isique, W., Minillo, A., Carvalho, S., & Torres, N. (2012). Fármacos em Uma Estação de Tratamento de Esgoto na Região Centro-Oeste do Brasil e os Riscos aos Recursos Hídricos. *Revista Brasileira de Recursos Hídricos*, 17(3), 61–67. <https://doi.org/10.21168/rbrh.v17n3.p61-67>
- Amorim, L. C. A. (2003). Os biomarcadores e sua aplicação na avaliação da exposição aos agentes químicos ambientais. *Revista Brasileira de Epidemiologia*, 6(2), 158–170. <https://doi.org/10.1590/S1415-790X2003000200009>
- Anderson, D., Yu, T., Phillips, B., & Schmezer, P. (1994). Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis The effect of various antioxidants and other modifying agents on oxygen-radical-generated DNA damage in human lymphocytes in the COMET assay. *Mutation Research*, 307(1), 261–271. [https://doi.org/10.1016/0027-5107\(94\)90300-x](https://doi.org/10.1016/0027-5107(94)90300-x)
- Andrade, T. S., de Oliveira, R., da Silva, M. L., Von Zuben, M. V., Grisolia, C. K., Domingues, I., Caldas, E. D., & Pic-Taylor, A. (2018). Exposure to ayahuasca induces developmental and behavioral alterations on early life stages of zebrafish. *Chemico-Biological Interactions*, 293, 133–140. <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2018.08.001>
- Araújo, E. J. de A., Oscar, J., Morais, R. De, De, P. R., & Maria, S. (2001). Efeito de poluentes químicos cumulativos e mutagênicos durante o desenvolvimento ontogenético de *Poecilia vivipara*. *Acta Scientiarum*, 23(2), 391–399. <https://doi.org/https://doi.org/10.4025/actasciobiolsci.v23i0.2694>
- Armiliato, N. (2014). Toxicidade celular e bioquímica do glifosato sobre os ovários do peixe *Danio rerio* [Universidade Federal de Santa Catarina]. <https://repositorio.ufsc.br/xmlui/handle/123456789/129277>
- Arouca, C. L. C., Maciel, M. P., Aiura, F. S., Barbosa, M. M., Botelho, L. F. R., Pereira, F. M., & Pereira, F. M. (2012). Performance, organs morphometry and intestinal histology of pigs in the late finishing fed cane sugar. *Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal*, 13(4), 1074–1083. <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1590/S1519-99402012000400021>
- Ayabaktı, S., & Yavuz Kocaman, A. (2020). Cytogenotoxic effects of venlafaxine hydrochloride on cultured human peripheral blood lymphocytes. *Drug and Chemical Toxicology*, 43(2), 192–199. <https://doi.org/10.1080/01480545.2018.1486410>
- Azadbakht, F., Shirali, S., Ronagh, M. T., & Zamani, I. (2019). Assessment of gill pathological responses in yellowfin sea bream (*Acanthopagrus latus*) under *Aeromonas*

hydrophila exposure. *Archives of Razi Institute*, 74(1), 83–89.
<https://doi.org/10.22092/ari.2017.114702.1139>

Azrina, M. Z., Yap, C. K., Rahim Ismail, A., Ismail, A., & Tan, S. G. (2006). Anthropogenic impacts on the distribution and biodiversity of benthic macroinvertebrates and water quality of the Langat River, Peninsular Malaysia. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 64(3), 337–347. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2005.04.003>

Babbini, M., Gaiardi, M., & Bartoletti, M. (1976). Effects of combined treatment with nortriptyline and lorazepam on conflict behavior and motility of rats. *Psychopharmacology*, 48(17), 251–254. <https://doi.org/10.1007/BF00496857>

Bachour, R. L., Golovko, O., Kellner, M., & Pohl, J. (2020). Behavioral effects of citalopram, tramadol, and binary mixture in zebrafish (*Danio rerio*) larvae. *Chemosphere*, 238, 124587. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2019.124587>

Baeverfjord, G., & Krogdahl, Å. (1996). Development and regression of soybean meal induced enteritis in Atlantic salmon, *Salmo salar* L., distal intestine: A comparison with the intestines of fasted fish. *Journal of Fish Diseases*, 19(5), 375–387. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2761.1996.tb00376.x>

Baker, D. R., Barron, L., & Kasprzyk-Hordern, B. (2014). Illicit and pharmaceutical drug consumption estimated via wastewater analysis. Part A: Chemical analysis and drug use estimates. *Science of the Total Environment*, 487(1), 629–641. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2013.11.107>

Balvanera, P., Pfisterer, A. B., Buchmann, N., He, J. S., Nakashizuka, T., Raffaelli, D., & Schmid, B. (2006). Quantifying the evidence for biodiversity effects on ecosystem functioning and services. *Ecology Letters*, 9(10), 1146–1156. <https://doi.org/10.1111/j.1461-0248.2006.00963.x>

Bambino, K., & Chu, J. (2017). Zebrafish in Toxicology and Environmental Health. In *Curr Top Dev Biol*. (Vol. 124, pp. 331–367). <https://doi.org/10.1016/bs.ctdb.2016.10.007>

Barbosa, K. B. F., Costa, N. M. B., De Cássia Gonçalves Alfenas, R., De Paula, S. O., Minim, V. P. R., & Bressan, J. (2010). Estresse oxidativo: Conceito, implicações e fatores modulatórios. *Revista de Nutrição*, 23(4), 629–643. <https://doi.org/10.1590/S1415-52732010000400013>

Barišić, Josip, Marijić, Vlatka Filipović, Mijošek, Tatjana, Čož-Rakovac, Rozelindra, Dragun, Zrinka, Krasnići, Nesrete, Ivanković, Dušica, Kružlicová, Dáša, Erk, M. (2018). Evaluation of architectural and histopathological biomarkers in the intestine of brown trout (*Salmo trutta Linnaeus*, 1758) challenged with environmental pollution. *Science of the Total Environment*, 642, 656–664. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.06.045>

Bartlett, D. (2017). Drug-Induced Serotonin Syndrome. 37(1), 49–55. <https://doi.org/https://doi.org/10.4037/ccn2017169>

- Barreto, T. de R. (2006). Alterações morfofuncionais e metabólicas no teleósteo de água doce matrinxã, *Brycon cephalus* (Günther, 1869) exposto ao organofosforado metil paration (FOLISUPER 600 BR®) [Universidade Federal de São Carlos].
<https://repositorio.ufscar.br/handle/ufscar/1285>
- Barry, M. J. (2013). Effects of fluoxetine on the swimming and behavioural responses of the Arabian killifish. *Ecotoxicology*, 22(2), 425–432. <https://doi.org/10.1007/s10646-012-1036-7>
- Baršienė, J., Dedonyte, V., Rybakovas, A., Andreikenaite, L., & Andersen, O. K. (2006). Investigation of micronuclei and other nuclear abnormalities in peripheral blood and kidney of marine fish treated with crude oil. *Aquatic Toxicology*, 78(SUPPL.), 99–104.
<https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2006.02.022>
- Battal, D., Aktas, A., Sungur, M. A., Kadioglu, E., Derici Eker, E., Sahin, N. O., & Saygi, S. (2013). In vivo genotoxicity assessment of sertraline by using alkaline comet assay and the cytokinesis-block micronucleus assay. *Basic and Clinical Pharmacology and Toxicology*, 113(5), 339–346. <https://doi.org/10.1111/bcpt.12095>
- Bemis, J. C., Wills, J. W., Bryce, S. M., Torous, D. K., Dertinger, S. D., & Slob, W. (2016). Comparison of in vitro and in vivo clastogenic potency based on benchmark dose analysis of flow cytometric micronucleus data. *Mutagenesis*, 31(3), 277–285.
<https://doi.org/10.1093/mutage/gev041>
- Bemvenuti, M. de A., & Rodrigues, F. L. (2002). Análise comparativa entre técnicas morfométricas aplicadas a *Odontesthes bonariensis* (Valenciennes) e *Odontesthes humensis* De Buen (Osteichthyes, Atherinopsidae). *Revista Brasileira de Zoologia*, 19(3), 789–796.
<https://doi.org/10.1590/s0101-81752002000300017>
- Benotti, Mark J., Trenholm, Rebecca A., Vanderford, Brett J., Stanford, Benjamin D., Snyder, S. A. (2009). Pharmaceuticals and Endocrine Disrupting Compounds in U.S. Drinking Water. *Environmental Science and Technology*, 43(3), 597–603. <https://doi.org/10.1021/es801845a>
- Bernet, D., Schmidt, H., Meier, W., Burkhardt-Holm, P., Wahli, T., Kueng, C., Segner, H., Dutra, F. M., Rinnau, M., Sponchiado, D., Forneck, S. C., Freire, C. A., Ballester, E. L. C., Kipfer, S., Segner, H., Wenger, M., Wahli, T., Bernet, D., Luzio, A., Cáceres-Vélez, P. R. (1999). Gonadal alterations in male whitefish *Coregonus fatioides*: No evidence for genetic damage reducing viability in early life stages. *Diseases of Aquatic Organisms*, 61(1), 25–34.
<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0166445X16300674%0Ahttp://dx.doi.org/10.1016/j.aquatox.2017.04.003>
- Berntssen, M. H. G., Hylland, K., Julshamn, K., Lundebye, A. K., & Waagbø, R. (2004). Maximum limits of organic and inorganic mercury in fish feed. *Aquaculture Nutrition*, 10(2), 83–97. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2095.2003.00282.x>
- Bertoletti, E. (2012). A presunção ambiental e a ecotoxicologia aquática. *Revista Das Águas*, 2–11. <https://www.researchgate.net/publication/317014698>

- Best, C., Melnyk-Lamont, N., Gesto, M., & Vijayan, M. M. (2014). Environmental levels of the antidepressant venlafaxine impact the metabolic capacity of rainbow trout. *Aquatic Toxicology*, 155, 190–198. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2014.06.014>
- Bhasi, K., Zhang, L., Zhang, A., & Ramanathan, M. (2004). Analysis of Pharmacokinetics, Pharmacodynamics, and Pharmacogenomics Data Sets Using VizStruct, A Novel Multidimensional Visualization Technique. *Pharmacological Research*, 21(5), 777–780. <https://doi.org/10.1023/b:pham.0000026427.30177.61>
- Bidel, F., Di Poi, C., Budzinski, H., Pardon, P., Callewaert, W., Arini, A., Basu, N., Dickel, L., Bellanger, C., & Jozet-Alves, C. (2016). The antidepressant venlafaxine may act as a neurodevelopmental toxicant in cuttlefish (*Sepia officinalis*). *NeuroToxicology*, 55, 142–153. <https://doi.org/10.1016/j.neuro.2016.05.023>
- Bisesi, J. H., Bridges, W., & Klaine, S. J. (2014). Effects of the antidepressant venlafaxine on fish brain serotonin and predation behavior. *Aquatic Toxicology*, 148, 130–138. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2013.12.033>
- Blahova, J., Modra, H., Sevcikova, M., Marsalek, P., Zelnickova, L., Skoric, M., & Svobodova, Z. (2014). Evaluation of biochemical, haematological, and histopathological responses and recovery ability of common carp (*Cyprinus carpio* L.) after acute exposure to atrazine herbicide. *BioMed Research International*, 2014, 980948. <https://doi.org/10.1155/2014/980948>
- Blair, B., Zimny-Schmitt, D., & Rudd, M. A. (2017). U.S. News Media Coverage of Pharmaceutical Pollution in the Aquatic Environment: A Content Analysis of the Problems and Solutions Presented by Actors. *Environmental Management*, 60(2), 314–322. <https://doi.org/10.1007/s00267-017-0881-9>
- Blaser, R. E., & Rosemberg, D. B. (2012). Measures of anxiety in zebrafish (*Danio rerio*): Dissociation of black/white preference and novel tank test. *PLoS ONE*, 7(5), 1–8. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0036931>
- Bolognesi, C., Cirillo, S., & Chipman, J. K. (2019). Comet assay in ecogenotoxicology: Applications in *Mytilus* sp. *Mutation Research - Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 842, 50–59. <https://doi.org/10.1016/j.mrgentox.2019.05.004>
- Bolognesi, C., & Hayashi, M. (2011). Micronucleus assay in aquatic animals. *Mutagenesis*, 26(1), 205–213. <https://doi.org/10.1093/mutage/geq073>
- Borm, P. J. A., Fowler, P., & Kirkland, D. (2018). An updated review of the genotoxicity of respirable crystalline silica. *Particle and Fibre Toxicology*, 15(1), 1–17. <https://doi.org/10.1186/s12989-018-0259-z>
- Borova, V. L., Maragou, N. C., Gago-Ferrero, P., Pistos, C., & Thomaidis, N. S. (2014). Highly sensitive determination of 68 psychoactive pharmaceuticals, illicit drugs, and related human metabolites in wastewater by liquid chromatography-tandem mass spectrometry.

Analytical and Bioanalytical Chemistry, 406(17), 4273–4285. <https://doi.org/10.1007/s00216-014-7819-3>

Bottoni, P., Grenni, P., Lucentini, L., & Caracciolo, A. B. (2013). Terbutylazine and other triazines in Italian water resources. *Microchemical Journal*, 107, 136–142. <https://doi.org/10.1016/j.microc.2012.06.011>

Bownik, A. (2020). Physiological endpoints in daphnid acute toxicity tests. *Science of the Total Environment*, 700, 134400. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.134400>

Boyce, P., & Barriball, E. (2010). Circadian rhythms and depression. *Australian Family Physician*, 39(5), 307–310. https://doi.org/10.1007/978-3-642-72637-8_23

Brambilla, G., Mattioli, F., & Martelli, A. (2009). Genotoxic and carcinogenic effects of antipsychotics and antidepressants. *Toxicology*, 261(3), 77–88. <https://doi.org/10.1016/j.tox.2009.04.056>

Brancaccio, P., Lippi, G., & Maffulli, N. (2010). Biochemical markers of muscular damage. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*, 48(6), 757–767. <https://doi.org/10.1515/CCLM.2010.179>

Brandão, F. P., Rodrigues, S., Castro, B. B., Gonçalves, F., Antunes, S. C., & Nunes, B. (2013). Short-term effects of neuroactive pharmaceutical drugs on a fish species: Biochemical and behavioural effects. *Aquatic Toxicology*, 144–145, 218–229. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2013.10.005>

Brandão, F. P., Pereira, J. L., Gonçalves, F., & Nunes, B. (2011). The impact of paracetamol on selected biomarkers of the mollusc species *Corbicula fluminea*. *Environmental Toxicology*, 29(1), 74–83. <https://doi.org/10.1002/tox.20774>

Brausch, J. M., Connors, K. A., Brooks, B. W., & Rand, G. M. (2012). Human pharmaceuticals in the aquatic environment: A review of recent toxicological studies and considerations for toxicity testing. *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology*, 218, 1–98. https://doi.org/10.1007/978-1-4614-3137-4_1

Brennan, F. J. (1980). Electrophysiologic effects of imipramine and doxepin on normal and depressed cardiac Purkinje fibers. *American Journal of Cardiology*, 46(4), 599–606. [https://doi.org/10.1016/0002-9149\(80\)90509-3](https://doi.org/10.1016/0002-9149(80)90509-3)

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. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 29(6), 1311–1318. <https://doi.org/10.1002/etc.157>

Brodin, T., Fick, J., Jonsson, M., & Klaminder, J. (2013). Dilute concentrations of a psychiatric drug alter behavior of fish from natural populations. *Science*, 339(6121), 814–815. <https://doi.org/10.1126/science.1226850>

- Brodin, T., Piovano, S., Fick, J., Klaminder, J., Heynen, M., & Jonsson, M. (2014). Ecological effects of pharmaceuticals in aquatic systems—impacts through behavioural alterations. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 369(1656), 20130580. <https://doi.org/10.1098/rstb.2013.0580>
- Brooks, B. W., Chambliss, C. K., Stanley, J. K., Ramirez, A., Banks, K. E., Johnson, R. D., & Lewis, R. J. (2005). Determination of select antidepressants in fish from an effluent-dominated stream. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 24(2), 464–469. <https://doi.org/10.1897/04-081R.1>
- Brown, K. H., Dobrinski, K. P., Lee, A. S., Gokcumen, O., Mills, R. E., Shi, X., Chong, W. W. S., Chen, J. Y. H., Yoo, P., David, S., Peterson, S. M., Raj, T., Choy, K. W., Stranger, B. E., Williamson, R. E., Zon, L. I., Freeman, J. L., & Lee, C. (2012). Extensive genetic diversity and substructuring among zebrafish strains revealed through copy number variant analysis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 109(2), 529–534. <https://doi.org/10.1073/pnas.1112163109>
- Brugman, S. (2016). The zebrafish as a model to study intestinal inflammation. *Developmental and Comparative Immunology*, 64, 82–92. <https://doi.org/10.1016/j.dci.2016.02.020>
- Brunger, A. T., Choi, U. B., Lai, Y., Leitz, J., & Zhou, Q. (2018). Molecular Mechanisms of Fast Neurotransmitter Release. *Annual Review of Biophysics*, 47(20), 469–497. <https://doi.org/10.1146/annurev-biophys>
- Bundschuh, M., Schulz, R., Schäfer, R. B., Allen, C. R., & Angeler, D. G. (2017). Resilience in ecotoxicology: Toward a multiple equilibrium concept. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 36(10), 2574–2580. <https://doi.org/10.1002/etc.3845>
- Byeon, E., Park, J. C., Hagiwara, A., Han, J., & Lee, J. S. (2020). Two antidepressants fluoxetine and sertraline cause growth retardation and oxidative stress in the marine rotifer *Brachionus koreanus*. *Aquatic Toxicology*, 218, 105337. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2019.105337>
- Cáceres-Vélez, P. R. (2017). Nanopartículas de prata na presença de ácido húmico em meio aquoso: caracterização físico-química e avaliação toxicológica em modelo zebrafish (*Danio rerio*) [Univeridade de Brasília]. <https://repositorio.unb.br/handle/10482/23509>
- Cáceres-Vélez, P. R. (2013). Uso de biomarcadores de genotoxicidade e histopatológicos para avaliação de toxicidade de vermiculita expandida magnética e vermiculita expandida em peixes *Danio rerio*. Universidade de Brasília.
- Campos, D. Y. F. (2007). Análise das respostas citogenotóxicas e histopatológicas do peixe *Trematomus newnesi* exposto à água do mar diante da Estação Antártica Brasileira - Comandante Ferraz- Ilha Rei George, Antártica. [Universidade de São Paulo]. <https://teses.usp.br/teses/disponiveis/21/21131/tde-06112007-161016/pt-br.php>

- Campos, M. A. A. (2013). Teste Cometa: Validação Do Método E Avaliação Da Exposição Ocupacional Ao Benzeno Presente Na Gasolina Através Dos Biomarcadores De Exposição E Genotoxicidade [Universidade Federal de Minas Gerais].
<https://repositorio.ufmg.br/handle/1843/EMCO-97NHNL>
- Carboni, L., Becchi, S., Piubelli, C., Mallei, A., Giambelli, R., Razzoli, M., Mathé, A. A., Popoli, M., & Domenici, E. (2010). Early-life stress and antidepressants modulate peripheral biomarkers in a gene-environment rat model of depression. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*, 34(6), 1037–1048.
<https://doi.org/10.1016/j.pnpbp.2010.05.019>
- Carletti, E., Sulpizio, M., Bucciarelli, T., Del Boccio, P., Federici, L., & Di Ilio, C. (2008). Glutathione transferases from *Anguilla anguilla* liver: Identification, cloning and functional characterization. *Aquatic Toxicology*, 90(1), 48–57.
<https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2008.07.015>
- Carrasco, K. R., Tilbury, K. L., & Myers, M. S. (1990). Assessment of the Piscine Micronucleus Test as an in situ Biological indicator of Chemical Contaminant Effects. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 47(11), 2123–2136.
<https://doi.org/10.1139/f90-237>
- Carter, L. J., Harris, E., Williams, M., Ryan, J. J., Kookana, R. S., & Boxall, A. B. A. (2014). Fate and Uptake of Pharmaceuticals in Soil–Plant Systems. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 62(4), 814–825. <https://doi.org/10.1021/jf404282y>
- Castillo-Zacarías, C., Barocio, M. E., Hidalgo-Vázquez, E., Sosa-Hernández, J. E., Parra-Arroyo, L., López-Pacheco, I. Y., Barceló, D., Iqbal, H. N. M., & Parra-Saldívar, R. (2021). Antidepressant drugs as emerging contaminants: Occurrence in urban and non-urban waters and analytical methods for their detection. *Science of the Total Environment*, 757, 143722.
<https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.143722>
- Castro, J. S., França, C. L., Fernandes, J. F. F., Silva, J. S., Carvalho-Neta, R. N. F., & Teixeira, E. G. (2018). Biomarcadores histológicos em brânquias de *Sciades herzbergii* (Siluriformes, Ariidae) capturados no Complexo Estuarino de São Marcos, Maranhão. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, 70(2), 410–418.
<https://doi.org/10.1590/1678-4162-9906>
- Caveney, S., Cladman, W., Verellen, L. A., & Donly, C. (2006). Ancestry of neuronal monoamine transporters in the Metazoa. *Journal of Experimental Biology*, 209(24), 4858–4868. <https://doi.org/10.1242/jeb.02607>
- Chang, X., Wang, X., Feng, J., Su, X., Liang, J., Li, H., & Zhang, J. (2020). Impact of chronic exposure to trichlorfon on intestinal barrier, oxidative stress, inflammatory response and intestinal microbiome in common carp (*Cyprinus carpio* L.). *Environmental Pollution*, 259, 113846. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2019.113846>

- Chappey, O., Testylier, G., Gourmelon, P., Galonnier, M., Bourre, J. M., Fatome, M., Scherrmann, J. M., & Viret, J. (1990). In Vivo Spectrophotometric Determination of Striatal Acetylcholinesterase Activity: The Modulation Induced by the Antidepressant Amitriptyline. *Journal of Neurochemistry*, 54(1), 333–338. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.1990.tb13318.x>
- Chatterjee, A., & Gupta, S. (2018). The multifaceted role of glutathione S-transferases in cancer. *Cancer Letters*, 433, 33–42. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2018.06.028>
- Chen, H., Zeng, X., Mu, L., Hou, L., Yang, B., Zhao, J., Schlenk, D., Dong, W., Xie, L., & Zhang, Q. (2018). Effects of acute and chronic exposures of fluoxetine on the Chinese fish, topmouth gudgeon *Pseudorasbora parva*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 160, 104–113. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2018.04.061>
- Chen, H., Gu, X., Zeng, Q., & Mao, Z. (2019). Acute and chronic toxicity of carbamazepine on the release of chitinase, molting, and reproduction in *Daphnia similis*. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 16(2), 209. <https://doi.org/10.3390/ijerph16020209>
- Choi, J. W., Zhao, Y., Bediako, J. K., Cho, C. W., & Yun, Y. S. (2018). Estimating environmental fate of tricyclic antidepressants in wastewater treatment plant. *Science of the Total Environment*, 634(1), 52–58. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.03.278>
- Chung, S., Lee, E. J., Yun, S., Choe, H. K., Park, S. B., Son, H. J., Kim, K. S., Dluzen, D. E., Lee, I., Hwang, O., Son, G. H., & Kim, K. (2014). Impact of circadian nuclear receptor REV-ERB α on midbrain dopamine production and mood regulation. *Cell*, 157(4), 858–868. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2014.03.039>
- Clasen, B., Loro, V. L., Murussi, C. R., Tiecher, T. L., Moraes, B., & Zanella, R. (2018). Bioaccumulation and oxidative stress caused by pesticides in *Cyprinus carpio* reared in a rice-fish system. *Science of the Total Environment*, 626, 737–743. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.01.154>
- Cobanoglu, H., Coskun, M., Çayir, A., & Coskun, M. (2018). In vitro genotoxic and cytotoxic effects of doxepin and escitalopram on human peripheral lymphocytes. *Drug and Chemical Toxicology*, 41(2), 238–244. <https://doi.org/10.1080/01480545.2017.1365885>
- Coimbra, R. dos S. C., Santos, C. R. dos, Saraiva, V. B., & Oliveira, M. M. (2013). Biomarkers as tools in quality assessment of fish contaminated with trace metals. *Boletim Do Observatório Ambiental Alberto Ribeiro Lamego*, 7(1), 153–172. <https://doi.org/10.5935/2177-4560.20130011>
- Collins, A. R., Oscoz, A. A., Brunborg, G., Gaivão, I., Giovannelli, L., Kruszewski, M., Smith, C. C., & Štětina, R. (2008). The comet assay: Topical issues. *Mutagenesis*, 23(3), 143–151. <https://doi.org/10.1093/mutage/gem051>

- Colombi, J. dos S. (2009). Avaliação da acetilcolinesterase como biomarcador em experimentos de contaminação in vitro com MeHg E HgCl₂ em *Hoplias malabaricus* (Block, 1794). [Universidade Estadual do Norte Fluminense].
<https://uenf.br/posgraduacao/biociencias-biotecnologia/>
- Comber, S., Gardner, M., Sörme, P., Leverett, D., & Ellor, B. (2018). Active pharmaceutical ingredients entering the aquatic environment from wastewater treatment works: A cause for concern? *Science of the Total Environment*, 613–614, 538–547.
<https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.09.101>
- Correia, B., Freitas, R., Figueira, E., Soares, A. M. V. M., & Nunes, B. (2016). Oxidative effects of the pharmaceutical drug paracetamol on the edible clam *Ruditapes philippinarum* under different salinities. *Comparative Biochemistry and Physiology Part - C: Toxicology and Pharmacology*, 179, 116–124. <https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2015.09.006>
- Costa, C. R., Olivi, P., Botta, C. M. R., & Espindola, E. L. G. (2008). A toxicidade em ambientes aquáticos: Discussão e métodos de avaliação. *Química Nova*, 31(7), 1820–1830.
<https://doi.org/10.1590/S0100-40422008000700038>
- Cui, C., Han, Q., Jiang, L., Ma, L., Jin, L., Zhang, D., Lin, K., & Zhang, T. (2018). Occurrence, distribution, and seasonal variation of antibiotics in an artificial water source reservoir in the Yangtze River delta, East China. *Environmental Science and Pollution Research*, 25(20), 19393–19402. <https://doi.org/10.1007/s11356-018-2124-x>
- Damasceno, D. Z. (2016). Efeito de diferentes concentrações de arginina, no fígado e intestino médio de jundiá (*Rhamdia quelen*), a partir de análises morfométricas [Universidade Federal do Paraná]. https://acervodigital.ufpr.br/bitstream/handle/1884/47556/DAYANE_ZANERATO_DAMASCENO.pdf?sequence=1&isAllowed=y
- Datta, S., Ghosh, D., Saha, D. R., Bhattacharaya, S., & Mazumder, S. (2009). Chronic exposure to low concentration of arsenic is immunotoxic to fish: Role of head kidney macrophages as biomarkers of arsenic toxicity to *Clarias batrachus*. *Aquatic Toxicology*, 92(2), 86–94. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2009.01.002>
- de Farias, N. O., Oliveira, R., Moretti, P. N. S., e Pinto, J. M., Oliveira, A. C., Santos, V. L., Rocha, P. S., Andrade, T. S., & Grisolia, C. K. (2020). Fluoxetine chronic exposure affects growth, behavior and tissue structure of zebrafish. *Comparative Biochemistry and Physiology Part - C: Toxicology and Pharmacology*, 237, 108836.
<https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2020.108836>
- de Freitas, D. R. J., Vaz Junior, I. da S., & Masuda, A. (2008). Expressão e atividade enzimática de glutationa s-transferase em tecidos de fêmeas de *Boophilus microplus*. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, 17(2), 99–104. <https://doi.org/10.1590/s1984-29612008000200007>

- de Jesus, T. B., & de Carvalho, C. E. V. (2008). Utilização de biomarcadores em peixes como ferramenta para avaliação de contaminação ambiental por mercúrio (Hg). *Oecologia Australis*, 12(4), 680–693. <https://doi.org/10.4257/oeco.2008.1204.07>
- de Oliveira, H. A., Antonio, E. L., Silva, F. A., de Carvalho, P. de T. C., Feliciano, R., Yoshizaki, A., Vieira, S. de S., de Melo, B. L., Leal-Junior, E. C. P., Labat, R., Bocalini, D. S., Silva Junior, J. A., Tucci, P. J. F., & Serra, A. J. (2018). Protective effects of photobiomodulation against resistance exercise-induced muscle damage and inflammation in rats. *Journal of Sports Sciences*, 36(20), 2349–2357. <https://doi.org/10.1080/02640414.2018.1457419>
- de Oliveira, P. R. dos S., Costa, M. J. dos S., A. C. A., Silva-Zacarín, E. C. M., & Nunes, B. (2020). Neurotoxic and respiratory effects of human use drugs on a Neotropical fish species, *Phalloceros harpagos*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part - C: Toxicology and Pharmacology*, 230, 108683. <https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2019.108683>
- Demin, K. A., Kolesnikova, T. O., Khatsko, S. L., Meshalkina, D. A., Efimova, E. V., Morzherin, Y. Y., & Kalueff, A. V. (2017). Acute effects of amitriptyline on adult zebrafish: Potential relevance to antidepressant drug screening and modeling human toxidromes. *Neurotoxicology and Teratology*, 62, 27–33. <https://doi.org/10.1016/j.ntt.2017.04.002>
- Derry, S., Wiffen, P. J., Aldington, D., Moore, R. A. (2015). Nortriptyline for neuropathic pain in adults (Review). *Cochrane Database of Systematic Reviews*, 1(1), CD011209. <https://doi.org/10.1002/14651858.CD011209.pub2>
- Di Poi, C., Costil, K., Bouchart, V., & Halm-Lemeille, M. P. (2018). Toxicity assessment of five emerging pollutants, alone and in binary or ternary mixtures, towards three aquatic organisms. *Environmental Science and Pollution Research*, 25(7), 6122–6134. <https://doi.org/10.1007/s11356-017-9306-9>
- Dias, C. A. G. de M., Fecury, A. A., Oliveira, E. de, Santos, B. R. dos, Mansur, B. de M., Dendasck, C. V., & Junior, A. G. (2017). Melatonina e Peixes: Uma Revisão. *Revista Científica Multidisciplinar Núcleo Do Conhecimento*, 04(9), 140–158. <https://doi.org/10.32749/nucleodoconhecimento.com.br/biologia/melatonina-e-peixes>
- Díaz, A. O., García, A. M., Devinenti, C. V., & Goldemberg, A. L. (2001). Mucous cells in *Micropogonias furnieri* gills: Histochemistry and ultrastructure. *Anatomia, Histologia, Embryologia*, 30(3), 135–139. <https://doi.org/10.1046/j.1439-0264.2001.00316.x>
- Djelić, N., Radaković, M., Borozan, S., Dimirišević-Srećković, V., Pajović, N., Vejnović, B., Borozan, N., Bankoglu, E. E., Stopper, H., & Stanimirović, Z. (2019). Oxidative stress and DNA damage in peripheral blood mononuclear cells from normal, obese, prediabetic and diabetic persons exposed to adrenaline in vitro. *Mutation Research - Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 843, 81–89. <https://doi.org/j.mrgentox.2019.01.013>
- Domingos, F. X. V. (2006). Biomarcadores de contaminação ambiental em peixes e ostras de três estuários brasileiros e cinética de derivados solúveis do petróleo em peixes (Issue

September 2016) [Universidade Federal do Paraná].

<https://acervodigital.ufpr.br/handle/1884/7850>

Domingues, I., Oliveira, R., Soares, A. M. V. M., & Amorim, M. J. B. (2016). Effects of ivermectin on *Danio rerio*: a multiple endpoint approach: behaviour, weight and subcellular markers. *Ecotoxicology*, 25(3), 491–499. <https://doi.org/10.1007/s10646-015-1607-5>

Dorelle, L. S., Da Cuña, R. H., Sganga, D. E., Rey Vázquez, G., López Greco, L., & Lo Nostro, F. L. (2020). Fluoxetine exposure disrupts food intake and energy storage in the cichlid fish *Cichlasoma dimerus* (Teleostei, Cichliformes). *Chemosphere*, 238, 124609. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2019.124609>

Du, B., Haddad, S. P., Luek, A., Scott, W. C., Saari, G. N., Kristofco, L. A., Connors, K. A., Rash, C., Rasmussen, J. B., Chambliss, C. K., Brooks, B. W., & Brooks, B. W. (2014). Bioaccumulation and trophic dilution of human pharmaceuticals across trophic positions of an effluent-dependent wadeable stream. *Philosophical Transactions of the Royal Society*, 369(1656), 20140058. <https://doi.org/10.1098/rstb.2014.0058>.

Dutra, F. M., Rönnau, M., Sponchiado, D., Forneck, S. C., Freire, C. A., & Ballester, E. L. C. (2017). Histological alterations in gills of *Macrobrachium amazonicum* juveniles exposed to ammonia and nitrite. *Aquatic Toxicology*, 187, 115–123. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2017.04.003>

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. *Behavioural Brain Research*, 205(1), 38–44. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2009.06.022>

Eimon, P. M., & Rubinstein, A. L. (2009). The use of in vivo zebrafish assays in drug toxicity screening. *Expert Opin. Drug Metab. Toxicol*, 5(4), 393–401. <https://doi.org/10.1517/17425250902882128>

Elbaz, I., Foulkes, N. S., Gothilf, Y., & Appelbaum, L. (2013). Circadian clocks, rhythmic synaptic plasticity and the sleep-wake cycle in zebrafish. *Frontiers in Neural Circuits*, 7, 1–7. <https://doi.org/10.3389/fncir.2013.00009>

El-Demerdash, E., & Mohamadin, A. M. (2004). Does oxidative stress contribute in tricyclic antidepressants-induced cardiotoxicity? *Toxicology Letters*, 152(2), 159–166. <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2004.04.041>

Ellman, G., Courtney, K., Andres, V. Jr., & Featherstone, R. (1961). A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochemical Pharmacology*, 7, 88–95. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/13726518>

Elmorsy, E., Al-Ghafari, A., Almutairi, F. M., Aggour, A. M., & Carter, W. G. (2017). Antidepressants are cytotoxic to rat primary blood brain barrier endothelial cells at high

therapeutic concentrations. *Toxicology in Vitro*, 44, 154–163.

<https://doi.org/10.1016/j.tiv.2017.07.011>

Embry, M. R., Belanger, S. E., Braunbeck, T. A., Galay-Burgos, M., Halder, M., Hinton, D. E., Léonard, M. A., Lillicrap, A., Norberg-King, T., & Whale, G. (2010). The fish embryo toxicity test as an animal alternative method in hazard and risk assessment and scientific research. *Aquatic Toxicology*, 97(2), 79–87. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2009.12.008>

Ergene, S., Çavaş, T., Çelik, A., Köleli, N., Kaya, F., & Karahan, A. (2007). Monitoring of nuclear abnormalities in peripheral erythrocytes of three fish species from the Goksu Delta (Turkey): Genotoxic damage in relation to water pollution. *Ecotoxicology*, 16(4), 385–391. <https://doi.org/10.1007/s10646-007-0142-4>

Evans, D. H. (1987). The fish gill: Site of action and model for toxic effects of environmental pollutants. *Environmental Health Perspectives*, Vol. 71(8), 47–58.

<https://doi.org/10.1289/ehp.877147>

Falás, P., Wick, A., Castronovo, S., Habermacher, J., Ternes, T. A., & Joss, A. (2016). Tracing the limits of organic micropollutant removal in biological wastewater treatment. *Water Research*, 95, 240–249. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2016.03.009>

Falkenberg, J. M., Golzio, J. E. S. A., Pessanha, A., Patrício, J., Vendel, A. L., & Lacerda, A. C. F. (2019). Gill parasites of fish and their relation to host and environmental factors in two estuaries in northeastern Brazil. *Aquatic Ecology*, 53(1), 109–118.

<https://doi.org/10.1007/s10452-019-09676-6>

Farmacêutica, F. (n.d.). Bula Cloridrato de Venlafaxina (p. 2). EMS S/A.

https://www.ems.com.br/arquivos/produtos/bulas/bula_cloridrato_de_venlafaxina_11251_1486.pdf

Fatta, D., Achilleos, A., Nikolaou, A., & Meriç, S. (2007). Analytical methods for tracing pharmaceutical residues in water and wastewater. *TrAC - Trends in Analytical Chemistry*, 26(6), 515–533. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2007.02.001>

Feito, R., Valcárcel, Y., & Catalá, M. (2013). Preliminary data suggest that venlafaxine environmental concentrations could be toxic to plants. *Chemosphere*, 90(7), 2065–2069. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2012.09.028>

Felis, E., Kalka, J., Sochacki, A., Kowalska, K., Bajkacz, S., Harnisz, M., & Korzeniewska, E. (2020). Antimicrobial pharmaceuticals in the aquatic environment - occurrence and environmental implications. *European Journal of Pharmacology*, 866, 172813.

<https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2019.172813>

Fenech, M., Bonassi, S., Turner, J., Lando, C., Ceppi, M., Chang, W. P., Holland, N., Kirsch-Volders, M., Zeiger, E., Bigatti, M. P., Bolognesi, C., Cao, J., De Luca, G., Di Giorgio, M., Ferguson, L. R., Fucic, A., Lima, O. G., Hadjidekova, V. V., Hrelia, P., Zijno, A. (2003). Intra- and inter-laboratory variation in the scoring of micronuclei and nucleoplasmic bridges

in binucleated human lymphocytes: Results of an international slide-scoring exercise by the HUMN project. *Mutation Research - Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 534(1–2), 45–64. [https://doi.org/10.1016/S1383-5718\(02\)00248-6](https://doi.org/10.1016/S1383-5718(02)00248-6)

Fent K., & Sumpter J.P. (2011). Progress and promises in toxicogenomics in aquatic toxicology: is technical innovation driving scientific innovation? *Aquat Toxicol*, 105:25-39.

Ferguson, H. W., Morrison, D., Ostland, V. E., Lumsden, J., & Byrne, P. (1992). Responses of mucus-producing cells in gill disease of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Journal of Comparative Pathology*, 106(3), 255–265. [https://doi.org/10.1016/0021-9975\(92\)90054-X](https://doi.org/10.1016/0021-9975(92)90054-X)

Fernandes, M. J., Paíga, P., Silva, A., Llaguno, C. P., Carvalho, M., Vázquez, F. M., & Delerue-Matos, C. (2020). Antibiotics and antidepressants occurrence in surface waters and sediments collected in the north of Portugal. *Chemosphere*, 239, 124729. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2019.124729>

Fernández, I., Gavaia, P. J., Laizé, V., & Cancela, M. L. (2018). Fish as a model to assess chemical toxicity in bone. *Aquatic Toxicology*, 194, 208–226. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2017.11.015>

Fernández-Rubio, J., Rodríguez-Gil, J. L., Postigo, C., Mastroianni, N., López de Alda, M., Barceló, D., & Valcárcel, Y. (2019). Psychoactive pharmaceuticals and illicit drugs in coastal waters of North-Western Spain: Environmental exposure and risk assessment. *Chemosphere*, 224, 379–389. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2019.02.041>

Fernández-Rubio, J., Rodríguez-Gil, J. L., Postigo, C., Mastroianni, N., López de Alda, M., Barceló, D., & Valcárcel, Y. (2019). Psychoactive pharmaceuticals and illicit drugs in coastal waters of North-Western Spain: Environmental exposure and risk assessment. *Chemosphere*, 224, 379–389. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2019.02.041>

Ferreira, P. M. F., Caldas, D. W., Salaro, A. L., Sartori, S. S. R., Oliveira, J. M., Cardoso, A. J. S., & Zuanon, J. A. S. (2016). Intestinal and liver morphometry of the Yellow Tail Tetra (*Astyanax altiparanae*) fed with oregano oil. *Anais Da Academia Brasileira de Ciências*, 88(2), 911–922. <https://doi.org/10.1590/0001-3765201620150202>

Figueiredo-Fernandes, A., Ferreira-Cardoso, J. V., Garcia-Santos, S., Monteiro, S. M., Carrola, J., Matos, P., & Fontainhas-Fernandes, A. (2007). Histopathological changes in liver and gill epithelium of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*, exposed to waterborne copper. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, 27(3), 103–109. <https://doi.org/10.1590/s0100-736x2007000300004>

Fišar, Z. (2005). Interactions between tricyclic antidepressants and phospholipid bilayer membranes. *General Physiology and Biophysics*, 24(2), 161–180.

Flores-Lopes, F., & Thomaz, A. (2011). Histopathologic alterations observed in fish gills as a tool in environmental monitoring. *Brazilian Journal of Biology*, 71(1), 179–188. <https://doi.org/10.1590/s1519-69842011000100026>

- Flores-Serrano, A. G., Zaldívar-Rae, J., Salgado, H., & Pineda, J. C. (2015). Immobility time during the forced swimming test predicts sensitivity to amitriptyline, whereas traveled distance in the circular corridor indicates resistance to treatment in female *Wistar rats*. *NeuroReport*, 26(5), 233–238. <https://doi.org/10.1097/WNR.0000000000000324>
- Fong, P. P., Bury, T. B., Dworkin-Brodsky, A. D., Jasion, C. M., & Kell, R. C. (2015). The antidepressants venlafaxine (“Effexor”) and fluoxetine (“Prozac”) produce different effects on locomotion in two species of marine snail, the oyster drill (*Urosalpinx cinerea*) and the starsnail (*Lithopoma americanum*). *Marine Environmental Research*, 103, 89–94. <https://doi.org/10.1016/j.marenvres.2014.11.010>
- Fonseca, L. A., Fagundes, V., Girardi, F. M., Maia, N. L., Pimentel, F. G., Braga, F. R., Hiura, E., & Santos, M. R. D. (2015). Atividade da colinesterase plasmática como biomarcador de impacto ambiental em tartarugas verdes (*Chelonia mydas*) no litoral do Arquipélago de Fernando de Noronha, Pernambuco. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, 35(4), 385–389. <https://doi.org/10.1590/S0100-736X2015000400012>
- Fontana, B. D., Cleal, M., Clay, J. M., & Parker, M. O. (2019). Zebrafish (*Danio rerio*) behavioral laterality predicts increased short-term avoidance memory but not stress-reactivity responses. *Animal Cognition*, 22(6), 1051–1061. <https://doi.org/10.1007/s10071-019-01296-9>
- Fox, M. A., Jensen, C. L., French, H. T., Stein, A. R., Huang, S. J., Tolliver, T. J., & Murphy, D. L. (2008). Neurochemical, behavioral, and physiological effects of pharmacologically enhanced serotonin levels in serotonin transporter (SERT)-deficient mice. *Psychopharmacology*, 201(2), 203–218. <https://doi.org/10.1007/s00213-008-1268-7>
- Fracácio, R. (2001). Utilização de bioensaios ecotoxicológicos com *Danio rerio* (Cypriniformes, Cyprinidae) e análises limnológicas para a avaliação ambiental dos reservatórios do Médio e Baixo Tietê (SP). [Universidade de São Paulo]. <https://teses.usp.br/teses/disponiveis/18/18139/tde-25012017-155146/pt-br.php>
- Franco, M. B., Andrade, T. S., Sousa-Moura, D., Lopes da Silva, M., Machado Ferraz, I. B., Camargo, N. S., Domingues, I., Oliveira, R., & Grisolia, C. K. (2019). Exposure to dilute concentrations of bupropion affects zebrafish early life stages. *Chemosphere*, 222, 175–183. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2019.01.141>
- Freitas, F. M. de, Zamoner, W., Garms, D. S. de S., Oliveira, M. G. de, Balbi, A. L., & Ponce, D. (2017). The use of antimicrobials in septic patients with acute kidney injury. *Jornal Brasileiro de Nefrologia: órgão Oficial de Sociedades Brasileira e Latino-Americana de Nefrologia*, 39(3), 323–328. <https://doi.org/10.5935/0101-2800.20170055>
- Freixa, A., Acuña, V., Gutierrez, M., Sanchís, J., Santos, L. H. M. L. M., Rodriguez-Mozaz, S., Farré, M., Barceló, D., & Sabater, S. (2018). Fullerenes influence the toxicity of organic micro-contaminants to river biofilms. *Frontiers in Microbiology*, 9, 1426. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.01426>

- Friedberg, E. C. (2003). DNA damage and repair. *Nature*, 421(6921), 436–440.
<https://doi.org/10.1038/nature01408>
- Friedman, G. D., Udaltsova, N., Chan, J., Quesenberry, C. P., & Habel, L. A. (2009). Screening pharmaceuticals for possible carcinogenic effects: Initial positive results for drugs not previously screened. *Cancer Causes and Control*, 20(10), 1821–1835.
<https://doi.org/10.1007/s10552-009-9375-2>
- Fu, H., Xia, Y., Chen, Y., Xu, T., Xu, L., Guo, Z., Xu, H., Xie, H. Q., & Zhao, B. (2018). Acetylcholinesterase Is a Potential Biomarker for a Broad Spectrum of Organic Environmental Pollutants. *Environmental Science and Technology*, 52(15), 8065–8074.
<https://doi.org/10.1021/acs.est.7b04004>
- Galus, M., Jeyaranjan, J., Smith, E., Li, H., Metcalfe, C., & Wilson, J. Y. (2013a). Chronic effects of exposure to a pharmaceutical mixture and municipal wastewater in zebrafish. *Aquatic Toxicology*, 132–133, 212–222. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2012.12.016>
- 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. *Aquatic Toxicology*, 132–133, 200–211.
<https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2012.12.021>
- Ganguilhet, G. (2019). Avaliação dos parâmetros hematológicos e bioquímicos de *Mugil liza* e *Mugil curema* como possíveis biomarcadores de impactos antrópicos na estação ecológica de carijós [Universidade Federal de Santa Catarina].
<https://repositorio.ufsc.br/handle/123456789/197728>
- Gauthier, L., Tison-Rosebery, J., Morin, S., & Mazzella, N. (2020). Metabolome response to anthropogenic contamination on microalgae: a review. *Metabolomics*, 16(1), 1–13.
<https://doi.org/10.1007/s11306-019-1628-9>
- Gaworecki, K. M., & Klaine, S. J. (2008). Behavioral and biochemical responses of hybrid striped bass during and after fluoxetine exposure. *Aquatic Toxicology*, 88(4), 207–213.
<https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2008.04.011>
- Gebara, R. C., Alho, L. de O. G., Rocha, G. S., Mansano, A. da S., & Melão, M. da G. G. (2020). Zinc and aluminum mixtures have synergic effects to the algae *Raphidocelis subcapitata* at environmental concentrations. *Chemosphere*, 242, 125231.
<https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2019.125231>
- Gillman, P. K. (2007). Tricyclic antidepressant pharmacology and therapeutic drug interactions updated. *British Journal of Pharmacology*, 151(6), 737–748.
<https://doi.org/10.1038/sj.bjp.0707253>
- Gillman, P. K. (2004). Comment on: Serotonin syndrome due to co-administration of linezolid and venlafaxine. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 54(4), 844–845.
<https://doi.org/10.1093/jac/dkh404>

- Giménez, V., & Nunes, B. (2019). Effects of commonly used therapeutic drugs, paracetamol, and acetylsalicylic acid, on key physiological traits of the sea snail *Gibbula umbilicalis*. *Environmental Science and Pollution Research*, 26(21), 21858–21870. <https://doi.org/10.1007/s11356-019-04653-w>
- Godoy, A. A. (2014). Cloridrato de propranolol e losartana potássica, em ação individual e combinada, na macrófita *Lemna minor* (1753). [Universidade Federal de Alfenas]. http://bdtd.ibict.br/vufind/Record/UNIFAL_7ee048268b37d4785161e653e55fdf57
- Gomes, A. R., Justino, C., Rocha-Santos, T., Freitas, A. C., Duarte, A. C., & Pereira, R. (2017). Review of the ecotoxicological effects of emerging contaminants to soil biota. *Journal of Environmental Science and Health - Part A Toxic/Hazardous Substances and Environmental Engineering*, 0(0), 1–16. <https://doi.org/10.1080/10934529.2017.1328946>
- Gonçalves, C. R., Marins, A. T., do Amaral, A. M. B., Leitemperger, J., Severo, E. S., Moraes, B. S., Zanella, R., & Loro, V. L. (2018). Biochemical Responses in Freshwater Fish Exposed to Insecticide Propoxur. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 100(4), 524–528. <https://doi.org/10.1007/s00128-018-2285-9>
- Gontijo, Á. D. M. C. M., Barreto, R. E., Speit, G., Valenzuela, V. A. R., Volpato, G. L., & Salvadori, D. M. F. (2003). Anesthesia of fish with benzocaine does not interfere with comet assay results. *Mutation Research - Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 534(1–2), 165–172. [https://doi.org/10.1016/S1383-5718\(02\)00276-0](https://doi.org/10.1016/S1383-5718(02)00276-0)
- Goodman & Gilman: As Bases Farmacológicas da Terapêutica. (2012) 12^a ed. Rio de Janeiro: McGraw-Hill.
- Grabicova, K., Grabic, R., Blaha, M., Kumar, V., Cerveny, D., Fedorova, G., & Randak, T. (2014). Presence of pharmaceuticals in benthic fauna living in a small stream affected by effluent from a municipal sewage treatment plant. *Water Research*, 72, 145–153. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2014.09.018>
- Grenni, P., Ancona, V., & Barra Caracciolo, A. (2018). Ecological effects of antibiotics on natural ecosystems: A review. *Microchemical Journal*, 136, 25–39. <https://doi.org/10.1016/j.microc.2017.02.006>
- Gros, M., Ahrens, L., Levén, L., Koch, A., Dalahmeh, S., Ljung, E., Lundin, G., Jönsson, H., Eveborn, D., & Wiberg, K. (2020). Pharmaceuticals in source separated sanitation systems: Fecal sludge and blackwater treatment. *Science of the Total Environment*, 703, 135530. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.135530>
- Grossman, L., Utterback, E., Stewart, A., Gaikwad, S., Chung, K. M., Suciú, C., Wong, K., Elegante, M., Elkhayat, S., Tan, J., Gilder, T., Wu, N., DiLeo, J., Cachat, J., & Kalueff, A. V. (2010). Characterization of behavioral and endocrine effects of LSD on zebrafish. *Behavioural Brain Research*, 214(2), 277–284. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2010.05.039>

- Grover, C. A., Flaherty, B., Lung, D., & Pageler, N. M. (2012). Significant toxicity in a young female after low-dose tricyclic antidepressant ingestion. *Pediatric Emergency Care*, 28(10), 1066–1069. <https://doi.org/10.1097/PEC.0b013e31826cebfb>
- Guiloski, Izonete Cristina, da Silva, Eliz Guimarães, Nishikawa, Celise Mayumi, de Assis, H. C. da S. (2010). Atividade da colinesterase em cérebro e músculo de *Corydoras paleatus* (Pisces, Teleostei) expostos ao carbaril. *Revista Acadêmica Ciências Agrárias e Ambientais*, 8(4), 461–468. <https://doi.org/10.7213/cienciaanimal.v8i4.11012>
- Güner, Utku, Muranlı, F. D. (2011). Micronucleus Test, Nuclear Abnormalities and Accumulation of Cu and Cd on *Gambusia affinis* (Baird & Girard, 1853). *Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 11(4), 615–622. https://doi.org/10.4194/1303-2712-v11_4_16
- 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. *Environmental Science and Technology*, 42(15), 5807–5813. <https://doi.org/10.1021/es8005173>
- Haddad, P. M., & Dursun, S. M. (2008). Neurological complications of psychiatric drugs: clinical features and management. *Human Psychopharmacology Clinical and Experimental*, 23(1), 15–26. <https://doi.org/10.1002/hup.918>
- Haghani, S., Karia, M., Cheng, R. K., & Mathuru, A. S. (2019). An Automated Assay System to Study Novel Tank Induced Anxiety. *Frontiers in Behavioral Neuroscience*, 13(August), 1–13. <https://doi.org/10.3389/fnbeh.2019.00180>
- Hassanane, M. S., Hafiz, N., Radwan, W., & El-Ghor, A. A. (2012). Genotoxic evaluation for the tricyclic antidepressant drug, amitriptyline. *Drug and Chemical Toxicology*, 35(4), 450–455. <https://doi.org/10.3109/01480545.2011.642382>
- Hassaninezhad, L., Safahieh, A. R., Salamat, N., Savari, A., & Majd, N. E. (2014). Assessment of gill pathological responses in the tropical fish yellowfin seabream of Persian Gulf under mercury exposure. *Toxicology Reports*, 1, 621–628. <https://doi.org/10.1016/j.toxrep.2014.07.016>
- Haverinen, J., Hassinen, M., Dash, S. N., & Vornanen, M. (2018). Expression of calcium channel transcripts in the zebrafish heart: dominance of T-type channels. *Journal of Experimental Biology*, 221(10), 1–10. <https://doi.org/10.1242/jeb.179226>
- Hawk, J. D., & Abel, T. (2011). The role of *NR4A* transcription factors in memory formation. *Brain Research Bulletin*, 85(1–2), 21–29. <https://doi.org/10.1016/j.brainresbull.2011.02.001>
- Heath, B. A. G. (1997). *Water Pollution and Fish Physiology* (2nd Edition). <https://doi.org/10.1201/9780203718896>
- Heddle, J. A., Hite, M., Kirkhart, B., Mavournin, K., MacGregor, J. T., Newell, G. W., & Salamone, M. F. (1983). The induction of micronuclei as a measure of genotoxicity. A report

of the U.S. environmental protection agency Gene-Tox program. *Mutation Research/Reviews in Genetic Toxicology*, 123(1), 61–118. [https://doi.org/10.1016/0165-1110\(83\)90047-7](https://doi.org/10.1016/0165-1110(83)90047-7)

Henares, M. N. P., Cruz, C., Gomes, G. R., Pitelli, R. A., & Machado, M. R. F. (2008). Toxicidade Aguda e Histopatologia do Herbicida Reward® na Brânquia e no Fígado do Pacu (*Piaractus mesopotamicus*). *Journal of the Brazilian Society of Ecotoxicology*, 3(1), 41–45. <https://doi.org/10.5132/jbse.2008.01.006>

Hodkovicova, N., Sehonova, P., Blahova, J., Faldyna, M., Marsalek, P., Mikula, P., Chloupek, P., Dobsikova, R., Vecerek, V., Vicenova, M., Vosmerova, P., & Svobodova, Z. (2020). The effect of the antidepressant venlafaxine on gene expression of biotransformation enzymes in zebrafish (*Danio rerio*) embryos. *Environmental Science and Pollution Research*, 27(2), 1686–1696. <https://doi.org/10.1007/s11356-019-06726-2>

Hollister, L. E. (1981). Current Antidepressant Drugs: Their Clinical Use. *Drugs*, 22(2), 129–152. <https://doi.org/10.2165/00003495-198122020-00003>

Hong, X., & Zha, J. (2019). Fish behavior: A promising model for aquatic toxicology research. *Science of the Total Environment*, 686, 311–321. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.06.028>

Howe, K., Clark, M. D., Torroja, C. F., Torrance, J., Berthelot, C., Muffato, M., Collins, J. E., Humphray, S., McLaren, K., Matthews, L., McLaren, S., Sealy, I., Caccamo, M., Churcher, C., Scott, C., Barrett, J. C., Koch, R., Rauch, G. J., White, S., Stemple, D. L. (2013). The zebrafish reference genome sequence and its relationship to the human genome. *Nature*, 496(7446), 498–503. <https://doi.org/10.1038/nature12111>

Huang, G., Zhang, F., Ye, Q., & Wang, H. (2016). The circadian clock regulates autophagy directly through the nuclear hormone receptor Nr1d1/Rev-erb α and indirectly via Cebpb/(C/ebp β) in zebrafish. *Autophagy*, 12(8), 1292–1309. <https://doi.org/10.1080/15548627.2016.1183843>

Huang, I. J., Sirotkin, H. I., & McElroy, A. E. (2019). Varying the exposure period and duration of neuroactive pharmaceuticals and their metabolites modulates effects on the visual motor response in zebrafish (*Danio rerio*) larvae. *Neurotoxicology and Teratology*, 72, 39–48. <https://doi.org/10.1016/j.ntt.2019.01.006>

Huber, P. C., Almeida, W. P., & De Fátima, Â. (2008). Glutathione e enzimas relacionadas: Papel biológico e importância em processos patológicos. *Química Nova*, 31(5), 1170–1179. <https://doi.org/10.1590/S0100-40422008000500046>

Huerta-Fontela, M., Galceran, M. T., & Ventura, F. (2011). Occurrence and removal of pharmaceuticals and hormones through drinking water treatment. *Water Research*, 45(3), 1432–1442. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2010.10.036>

- Hurd, M. W., Debruyne, J., Straume, M., & Cahill, G. M. (1998). Circadian rhythms of locomotor activity in zebrafish. *Physiology and Behavior*, 65(3), 465–472. [https://doi.org/10.1016/S0031-9384\(98\)00183-8](https://doi.org/10.1016/S0031-9384(98)00183-8)
- Imanikia, S., Galea, F., Nagy, E., Phillips, D. H., Stürzenbaum, S. R., & Arlt, V. M. (2016). The application of the comet assay to assess the genotoxicity of environmental pollutants in the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 45, 356–361. <https://doi.org/10.1016/j.etap.2016.06.020>
- Irons, T. D., MacPhail, R. C., Hunter, D. L., & Padilla, S. (2010). Acute neuroactive drug exposures alter locomotor activity in larval zebrafish. *Neurotoxicology and Teratology*, 32(1), 84–90. <https://doi.org/10.1016/j.ntt.2009.04.066>
- Istifli, E. S., Çelik, R., Hüsün, M. T., Çetinel, N., Demirhan, O., & İla, H. B. (2018). In vitro cytogenotoxic evaluation of sertraline. *Interdisciplinary Toxicology*, 11(3), 181–188. <https://doi.org/10.2478/intox-2018-0015>
- Izaguirre, V., Fernández-Fernández, J. M., Ceña, V., & González-García, C. (1997). Tricyclic antidepressants block cholinergic nicotinic receptors and ATP secretion in bovine chromaffin cells. *FEBS Letters*, 418(1–2), 39–42. [https://doi.org/10.1016/S0014-5793\(97\)01343-4](https://doi.org/10.1016/S0014-5793(97)01343-4)
- Jabeen, G., Manzoor, F., Javid, A., Azmat, H., Arshad, M., & Fatima, S. (2018). Evaluation of Fish Health Status and Histopathology in Gills and Liver Due to Metal Contaminated Sediments Exposure. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 100(4), 492–501. <https://doi.org/10.1007/s00128-018-2295-7>
- Jähkel, M., Oehler, J., & Schumacher, H. E. (1994). Influence of nootropic and antidepressive drugs on open field and running wheel behavior in spontaneously high and low active mice. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*, 49(2), 263–269. [https://doi.org/10.1016/0091-3057\(94\)90419-7](https://doi.org/10.1016/0091-3057(94)90419-7)
- Jardim, A. N. O., & Caldas, E. D. (2009). Exposição humana a substâncias químicas potencialmente tóxicas na dieta e os riscos para saúde. *Química Nova*, 32(7), 1898–1909.
- Jeon, S. H., Jaekal, J., Lee, S. H., Choi, B. H., Kim, K. S., Jeong, H. S., Han, S. Y., & Kim, E. J. (2011). Effects of nortriptyline on QT prolongation: A safety pharmacology study. *Human and Experimental Toxicology*, 30(10), 1649–1656. <https://doi.org/10.1177/0960327110396528>
- Jones, O. A. H., Voulvoulis, N., & Lester, J. N. (2002). Aquatic environmental assessment of the top 25 English prescription pharmaceuticals. *Water Research*, 36(20), 5013–5022. [https://doi.org/10.1016/S0043-1354\(02\)00227-0](https://doi.org/10.1016/S0043-1354(02)00227-0)
- Jonsson, C. M., Ferracini, V. L., Paraíba, L. C., Rangel, M., & Aguiar, S. R. (2002). Alterações bioquímicas e acúmulo em pacus (*Metynnis argenteus*) expostos ao paclobutrazol. *Scientia Agricola*, 59(3), 441–446. <https://doi.org/10.1590/S0103-90162002000300005>

- Kamstra, J. H., Aleström, P., Kooter, J. M., & Legler, J. (2015). Zebrafish as a model to study the role of DNA methylation in environmental toxicology. *Environmental Science and Pollution Research*, 22(21), 16262–16276. <https://doi.org/10.1007/s11356-014-3466-7>
- Kang, S. H., Kwon, J. Y., Lee, J. K., & Seo, Y. R. (2013). Recent Advances in In Vivo Genotoxicity Testing: Prediction of Carcinogenic Potential Using Comet and Micronucleus Assay in Animal Models. *Journal of Cancer Prevention*, 18(4), 277–288. <https://doi.org/10.15430/jcp.2013.18.4.277>
- Kar, Supratik & Roy, K. (2012). Risk assessment for ecotoxicity of pharmaceuticals -- an emerging issue. *Expert Opinion of Drug Safety*, 11(2), 235–274. <https://doi.org/10.1517/14740338.2012.644272>
- Kasprzyk-Hordern, B., Dinsdale, R. M., & Guwy, A. J. (2008). The occurrence of pharmaceuticals, personal care products, endocrine disruptors and illicit drugs in surface water in South Wales, UK. *Water Research*, 42(13), 3498–3518. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2008.04.026>
- Katoh, F., Tresguerres, M., Kyung, M. L., Kaneko, T., Aida, K., & Goss, G. G. (2006). Cloning of rainbow trout SLC26A1: Involvement in renal sulfate secretion. *American Journal of Physiology - Regulatory Integrative and Comparative Physiology*, 290(5), 1468–1478. <https://doi.org/10.1152/ajpregu.00482.2005>
- Katsumata, C. P. (2014). Degradação de fármacos em meio aquoso por meio de fotólise e peroxidação fotoassistida [Universidade de São Paulo]. https://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/3/3137/tde-24042015-155745/publico/Dissertacao_Caroline_Pereira.pdf
- Kaushik, G., & Thomas, M. A. (2019). The potential association of psychoactive pharmaceuticals in the environment with human neurological disorders. *Sustainable Chemistry and Pharmacy*, 13, 100148. <https://doi.org/10.1016/j.scp.2019.100148>
- Kaushik, G., Xia, Y., Yang, L., & Thomas, M. A. (2016). Psychoactive pharmaceuticals at environmental concentrations induce in vitro gene expression associated with neurological disorders. *BMC Genomics*, 17(Suppl 3), 277–314. <https://doi.org/10.1186/s12864-016-2784-1>
- Kellner, M., Porseryd, T., Hallgren, S., Porsch-Hällström, I., Hansen, S. H., & Olsén, K. H. (2016). Waterborne citalopram has anxiolytic effects and increases locomotor activity in the three-spine stickleback (*Gasterosteus aculeatus*). *Aquatic Toxicology*, 173, 19–28. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2015.12.026>
- Kim, H. J., Koedrith, P., & Seo, Y. R. (2015). Ecotoxicogenomic approaches for understanding molecular mechanisms of environmental chemical toxicity using aquatic invertebrate, *Daphnia* model organism. *International Journal of Molecular Sciences*, 16(6), 12261–12287. <https://doi.org/10.3390/ijms160612261>

- Kim, J. J., Kim, Y. S., & Kumar, V. (2019). Heavy metal toxicity: An update of chelating therapeutic strategies. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*, 54, 226–231. <https://doi.org/10.1016/j.jtemb.2019.05.003>
- Kimmel, C. B., Ballard, W. W., Kimmel, S. R., Ullmann, B., & Schilling, T. F. (1995). Stages of embryonic development of the zebrafish. *Developmental Dynamics*, 203(3), 253–310. <https://doi.org/10.1002/aja.1002030302>
- Kerr, G. W., McGuffie, A. C., & Wilkie, S. (2001). Tricyclic antidepressant overdose: A review. *Emergency Medicine Journal*, 18(4), 236–241. <https://doi.org/10.1136/emj.18.4.236>
- Klüver, N., König, M., Ortmann, J., Massei, R., Paschke, A., Kühne, R., & Scholz, S. (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. *Environmental Science & Technology*, 49(11), 7002–7011. <https://doi.org/10.1021/acs.est.5b01910>
- Koeneman, B. A., Zhang, Y., Westerhoff, P., Chen, Y., Crittenden, J. C., & Capco, D. G. (2010). Toxicity and cellular responses of intestinal cells exposed to titanium dioxide. *Cell Biology and Toxicology*, 26(3), 225–238. <https://doi.org/10.1007/s10565-009-9132-z>
- Kohler, J. G., Mangan, B. P., Kodra, C., Drako, L., Long, E., & Simpson, H. (2012). Decreased aggressive and locomotor behaviors in *Betta splendens* after exposure to fluoxetine. *Psychological Reports*, 110(1), 51–62. <https://doi.org/10.2466/02.13.PR0.110.1.51-62>
- Kosmehl, T., Hallare, A. V., Braunbeck, T., & Hollert, H. (2008). DNA damage induced by genotoxicants in zebrafish (*Danio rerio*) embryos after contact exposure to freeze-dried sediment and sediment extracts from Laguna Lake (The Philippines) as measured by the comet assay. *Mutation Research - Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 650(1), 1–14. <https://doi.org/10.1016/j.mrgentox.2007.09.009>
- Kovács, R., Bakos, K., Urbányi, B., Kövesi, J., Gazsi, G., Csepeli, A., Appl, Á. J., Bencsik, D., Csenki, Z., & Horváth, Á. (2016). Acute and sub-chronic toxicity of four cytostatic drugs in zebrafish. *Environmental Science and Pollution Research*, 23(15), 14718–14729. <https://doi.org/10.1007/s11356-015-5036-z>
- Kulaksiz-Erkmen, G., Dalmizrak, O., Dincsoy-Tuna, G., Dogan, A., Ogus, I. H., & Ozer, N. (2013). Amitriptyline may have a supportive role in cancer treatment by inhibiting glutathione S-transferase pi (GST- π) and alpha (GST- α). *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, 28(1), 131–136. <https://doi.org/10.3109/14756366.2011.639017>
- Kumar, M., Mathur, N., Singh, A., & Sharma, P. (2014). Genotoxic Hazard of healthcare Wastewaters: A Review. *Int.J.Curr.Microbiol.App.Sci*, 3(10), 409–418. <http://www.ijcmas.com>

- Lajeunesse, A., Gagnon, C., & Sauvé, S. (2008). Determination of basic antidepressants and their N-desmethyl metabolites in raw sewage and wastewater using solid-phase extraction and liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Analytical Chemistry*, 80(14), 5325–5333. <https://doi.org/10.1021/ac800162q>
- Lam, P. K. S., & Gray, J. S. (2003). The use of biomarkers in environmental monitoring programmes. *Marine Pollution Bulletin*, 46(2), 182–186. [https://doi.org/10.1016/S0025-326X\(02\)00449-6](https://doi.org/10.1016/S0025-326X(02)00449-6)
- Lanças, F. M., & Lanças Editor, F. M. (2009). Cromatografia líquida (lc) / espectrometria de massas. *Scientia Chromatographica*, 1(2), 35–61. www.scientiachromatographica.com
- Lange, C., Rost, F., MacHate, A., Reinhardt, S., Lesche, M., Weber, A., Kuscha, V., Dahl, A., Rulands, S., & Brand, M. (2020). Single cell sequencing of radial glia progeny reveals the diversity of newborn neurons in the adult zebrafish brain. *Development (Cambridge)*, 147(1), 185595. <https://doi.org/10.1242/dev.185595>
- Lapworth, D. J., Baran, N., Stuart, M. E., & Ward, R. S. (2012). Emerging organic contaminants in groundwater: A review of sources, fate and occurrence. *Environmental Pollution*, 163, 287–303. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2011.12.034>
- Lebwohl, B., Sanders, D. S., & Green, P. H. R. (2018). Coeliac disease. *The Lancet*, 391(10115), 70–81. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(17\)31796-8](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(17)31796-8)
- Lee, J. W., Choi, H., Hwang, U. K., Kang, J. C., Kang, Y. J., Kim, K. Il, & Kim, J. H. (2019). Toxic effects of lead exposure on bioaccumulation, oxidative stress, neurotoxicity, and immune responses in fish: A review. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 68(February), 101–108. <https://doi.org/10.1016/j.etap.2019.03.010>
- Legradi, J. B., Di Paolo, C., Kraak, M. H. S., van der Geest, H. G., Schymanski, E. L., Williams, A. J., Dingemans, M. M. L., Massei, R., Brack, W., Cousin, X., Begout, M. L., van der Oost, R., Carion, A., Suarez-Ulloa, V., Silvestre, F., Escher, B. I., Engwall, M., Nilén, G., Keiter, S. H., Hollert, H. (2018). An ecotoxicological view on neurotoxicity assessment. *Environmental Sciences Europe*, 30(1), 1–34. <https://doi.org/10.1186/s12302-018-0173-x>
- Lettieri, T. (2006). Recent applications of DNA microarray technology to toxicology and ecotoxicology. *Environmental Health Perspectives*, 114(1), 4–9. <https://doi.org/10.1289/ehp.8194>
- Leusch, F. D. L., Neale, P. A., Arnal, C., Aneck-Hahn, N. H., Balaguer, P., Bruchet, A., Escher, B. I., Esperanza, M., Grimaldi, M., Leroy, G., Scheurer, M., Schlichting, R., Schriks, M., & Hebert, A. (2018). Analysis of endocrine activity in drinking water, surface water and treated wastewater from six countries. *Water Research*, 139, 10–18. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2018.03.056>
- Levesque, H. M., Moon, T. W., Campbell, P. G. C., & Hontela, A. (2002). Seasonal variation in carbohydrate and lipid metabolism of yellow perch (*Perca flavescens*) chronically exposed

to metals in the field. *Aquatic Toxicology*, 60(3–4), 257–267. [https://doi.org/10.1016/S0166-445X\(02\)00012-7](https://doi.org/10.1016/S0166-445X(02)00012-7)

Levin, E. D., Bencan, Z., & Cerutti, D. T. (2007). Anxiolytic effects of nicotine in zebrafish. *Physiology and Behavior*, 90(1), 54–58. <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2006.08.026>

Li, H., Sumarah, M. W., & Topp, E. (2013). Persistence of the tricyclic antidepressant drugs amitriptyline and nortriptyline in agriculture soils. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 32(3), 509–516. <https://doi.org/10.1002/etc.2112>

Li, H., Yu, S., Cao, F., Wang, C., Zheng, M., Li, X., & Qiu, L. (2018). Developmental toxicity and potential mechanisms of pyraoxystrobin to zebrafish (*Danio rerio*). *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 151, 1–9. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2017.12.061>

Li, J. B., Li, Y. Y., Shen, Y. P., Zhu, M., Li, X. H., & Qin, Z. F. (2020). 2,2',4,4'-tetrabromodiphenyl ether (BDE-47) disrupts gonadal development of the Africa clawed frog (*Xenopus laevis*). *Aquatic Toxicology*, 221, 105441. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2020.105441>

Li, X. Y., Zhou, J., Yu, M., Wang, J. J., & Pei, Y. C. (2009). Toxic effects of 1-methyl-3-octylimidazolium bromide on the early embryonic development of the frog *Rana nigromaculata*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 72(2), 552–556. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2007.11.002>

Li, Z. H., Zlabek, V., Velisek, J., Grabic, R., Machova, J., Kolarova, J., Li, P., & Randak, T. (2011). Acute toxicity of carbamazepine to juvenile rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*): Effects on antioxidant responses, hematological parameters and hepatic EROD. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 74(3), 319–327. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2010.09.008>

Lima, D. L. D., Silva, C. P., & Otero, M. (2018). Dispersive liquid-liquid microextraction for the quantification of venlafaxine in environmental waters. *Journal of Environmental Management*, 217, 71–77. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2018.03.060>

Limonta, G., Mancina, A., Benkhalqui, A., Bertolucci, C., Abelli, L., Fossi, M. C., & Panti, C. (2019). Microplastics induce transcriptional changes, immune response and behavioral alterations in adult zebrafish. *Scientific Reports*, 9(1), 1–11. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-52292-5>

Lin, K. Y., Chang, W. T., Lai, Y. C., & Liao, I. (2014). Toward functional screening of cardioactive and cardiotoxic drugs with zebrafish in vivo using pseudodynamic three-dimensional imaging. *Analytical Chemistry*, 86(4), 2213–2220. <https://doi.org/10.1021/ac403877h>

Lin, P. I., Tai, Y. T., Chan, W. P., Lin, Y. L., Liao, M. H., & Chen, R. M. (2018). Estrogen/ER α signaling axis participates in osteoblast maturation via upregulating

chromosomal and mitochondrial complex gene expressions. *Oncotarget*, 9(1), 1169–1186. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.23453>

Lindsey, B.W., Smith, F.M., & Croll, R.P. (2010). From inflation to flotation: contribution of the swimbladder to whole-body density and swimming depth during development of the zebrafish (*Danio rerio*). *Zebrafish* 7, 85–96. <https://doi.org/10.1089/zeb.2009.0616>.

Lins, J. A. P. N., Kirschnik, P. G., Queiroz, V. D. S., & Cirio, S. M. (2017). Uso de peixes como biomarcadores para monitoramento ambiental aquático. *Revista Acadêmica: Ciência Animal*, 8(4), 469. <https://doi.org/10.7213/cienciaanimal.v8i4.11018>

Lionetto, M. G., Caricato, R., Calisi, A., Giordano, M. E., & Schettino, T. (2013). Acetylcholinesterase as a biomarker in environmental and occupational medicine: New insights and future perspectives. *BioMed Research International*, 2013, 321213. <https://doi.org/10.1155/2013/321213>

Little, E. E., & Finger, S. E. (1990). Swimming behavior as an indicator of sublethal toxicity in fish. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 9(1), 13–19. <https://doi.org/10.1002/etc.5620090103>

Liu, B., Zhang, S., & Chang, C.-C. (2018). Emerging Pollutants - Part II: Treatment. *Water Environment Research*, 90(10), 1792–1820. <https://doi.org/10.2175/106143018x15289915807443>

Liu, Y., Chen, F., Odle, J., Lin, X., Jacobi, S. K., Zhu, H., Wu, Z., & Hou, Y. (2012). Fish Oil Enhances Intestinal Integrity and Inhibits TLR4 and NOD2 Signaling Pathways in Weaned Pigs after LPS Challenge. *The Journal of Nutrition*, 142(11), 2017–2024. <https://doi.org/10.3945/jn.112.164947>

Liu, Z. H., Li, Y. W., Hu, W., Chen, Q. L., & Shen, Y. J. (2020). Mechanisms involved in tributyltin-enhanced aggressive behaviors and fear responses in male zebrafish. *Aquatic Toxicology*, 220, 105408. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2020.105408>

Lopes, J. S., Abril-De-Abreu, R., & Oliveira, R. F. (2015). Brain transcriptomic response to social eavesdropping in zebrafish (*Danio rerio*). *PLoS ONE*, 10(12), 1–21. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0145801>

Loureiro, A. P. M., Di Mascio, P., & Medeiros, M. H. G. (2002). Formação de adutos exocíclicos com bases de DNA: implicações em mutagênese e carcinogênese. *Química Nova*, 25(5), 777–793. <https://doi.org/10.1590/s0100-40422002000500014>

Luo, Y., Guo, W., Ngo, H. H., Nghiem, L. D., Hai, F. I., Zhang, J., Liang, S., & Wang, X. C. (2014). A review on the occurrence of micropollutants in the aquatic environment and their fate and removal during wastewater treatment. *Science of the Total Environment*, 473–474, 619–641. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2013.12.065>

Ma, L. dan, Li, J., Li, J. jun, Liu, M., Yan, D. zhi, Shi, W. yan, & Xu, G. (2018). Occurrence and source analysis of selected antidepressants and their metabolites in municipal wastewater

and receiving surface water. *Environmental Science: Processes and Impacts*, 20(7), 1020–1029. <https://doi.org/10.1039/c8em00077h>

Ma, X. Y., Li, Q., Wang, X. C., Wang, Y., Wang, D., & Ngo, H. H. (2018). Micropollutants removal and health risk reduction in a water reclamation and ecological reuse system. *Water Research*, 138, 272–281. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2018.03.059>

Madrigal-Bujaidar, E., Álvarez-González, I., Madrigal-Santillán, E. O., & Morales-González, J. A. (2015). Evaluation of duloxetine as micronuclei inducer in an acute and a subchronic assay in mouse. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 38(8), 1245–1249. <https://doi.org/10.1248/bpb.b15-00152>

Madrigal-Bujaidar, E., Madrigal-Santillán, E. O., Alvarez-Gonzalez, I., Baez, R., & Marquez, P. (2008). Micronuclei induced by imipramine and desipramine in mice: A subchronic study. *Basic and Clinical Pharmacology and Toxicology*, 103(6), 569–573. <https://doi.org/10.1111/j.1742-7843.2008.00328.x>

Magalhães, D. de P., & Ferrão-Filho, A. da S. (2008). A ecotoxicologia como ferramenta no biomonitoramento de ecossistemas aquáticos. *Oecologia Australis*, 12(3), 355–381. <https://doi.org/10.4257/oeco.2008.1203.02>

Malki, K., Tosto, M. G., Mouriño-Talín, H., Rodríguez-Lorenzo, S., Pain, O., Jumhaboy, I., Liu, T., Parpas, P., Newman, S., Malykh, A., Carboni, L., Uher, R., McGuffin, P., Schalkwyk, L. C., Bryson, K., & Herbster, M. (2017). Highly polygenic architecture of antidepressant treatment response: Comparative analysis of SSRI and NRI treatment in an animal model of depression. *American Journal of Medical Genetics, Part B: Neuropsychiatric Genetics*, 174(3), 235–250. <https://doi.org/10.1002/ajmg.b.32494>

Mansano, A. S., Moreira, R. A., Pierozzi, M., Oliveira, T. M. A., Vieira, E. M., Rocha, O., & Regali-Selegim, M. H. (2016). Effects of diuron and carbofuran pesticides in their pure and commercial forms on *Paramecium caudatum*: The use of protozoan in ecotoxicology. *Environmental Pollution*, 213, 160–172. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2015.11.054>

Marchetti, L., Lauria, M., Caberlotto, L., Musazzi, L., Popoli, M., Mathé, A. A., Domenici, E., & Carboni, L. (2020). Gene expression signature of antidepressant treatment response/non-response in Flinders Sensitive Line rats subjected to maternal separation. *European Neuropsychopharmacology*, 31, 69–85. <https://doi.org/10.1016/j.euroneuro.2019.11.004>

Marcon, M., Herrmann, A. P., Mocelin, R., Rambo, C. L., Koakoski, G., Abreu, M. S., Conterato, G. M. M., Kist, L. W., Bogo, M. R., Zanatta, L., Barcellos, L. J. G., & Piato, A. L. (2016). Prevention of unpredictable chronic stress-related phenomena in zebrafish exposed to bromazepam, fluoxetine and nortriptyline. *Psychopharmacology*, 233(21–22), 3815–3824. <https://doi.org/10.1007/s00213-016-4408-5>

Martin, J. M., Saaristo, M., Tan, H., Bertram, M. G., Nagarajan-Radha, V., Dowling, D. K., & Wong, B. B. M. (2019). Field-realistic antidepressant exposure disrupts group foraging

dynamics in mosquitofish. *Biology Letters*, 15(11), 20190615.
<https://doi.org/10.1098/rsbl.2019.0615>

Martínez-Morcillo, S., Rodríguez-Gil, J. L., Fernández-Rubio, J., Rodríguez-Mozaz, S., Míguez-Santiyán, M. P., Valdes, M. E., Barceló, D., & Valcárcel, Y. (2020). Presence of pharmaceutical compounds, levels of biochemical biomarkers in seafood tissues and risk assessment for human health: Results from a case study in North-Western Spain. *International Journal of Hygiene and Environmental Health*, 223(1), 10–21.
<https://doi.org/10.1016/j.ijheh.2019.10.011>

Maulvault, A. L., Camacho, C., Barbosa, V., Alves, R., Anacleto, P., Pousão-Ferreira, P., Rosa, R., Marques, A., & Diniz, M. S. (2019). Living in a multi-stressors environment: An integrated biomarker approach to assess the ecotoxicological response of meagre (*Argyrosomus regius*) to venlafaxine, warming and acidification. *Environmental Research*, 169, 7–25. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2018.10.021>

Maulvault, A. L., Santos, L. H. M. L. M., Paula, J. R., Camacho, C., Pissarra, V., Fogaça, F., Barbosa, V., Alves, R., Ferreira, P. P., Barceló, D., Rodríguez-Mozaz, S., Marques, A., Diniz, M., & Rosa, R. (2018). Differential behavioural responses to venlafaxine exposure route, warming and acidification in juvenile fish (*Argyrosomus regius*). *Science of the Total Environment*, 634, 1136–1147. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.04.015>

Mavanji, V., & Datta, S. (2002). Clomipramine treatment in neonatal rats alters the brain acetylcholinesterase activity in adulthood. *Neuroscience Letters*, 330(1), 119–121.
[https://doi.org/10.1016/S0304-3940\(02\)00725-5](https://doi.org/10.1016/S0304-3940(02)00725-5)

Mayer, T., Kopitz, J., Plaschke, K., Weiss, J., Seidling, H. M., & Haefeli, W. E. (2016). Limitations of the Anticholinergic Activity Assay and Assay-Based Anticholinergic Drug Scales. *American Journal of Geriatric Psychiatry*, 24(12), 1182–1188.
<https://doi.org/10.1016/j.jagp.2016.07.024>

Melo, T. G., Izídio, G. S., Ferreira, L. S., Sousa, D. S., Macedo, P. T., Cabral, A., Ribeiro, A. M., & Silva, R. H. (2012). Antidepressants differentially modify the extinction of an aversive memory task in female rats. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*, 37(1), 33–40. <https://doi.org/10.1016/j.pnpbp.2012.01.012>

Melvin, S. D. (2017). Effect of antidepressants on circadian rhythms in fish: Insights and implications regarding the design of behavioural toxicity tests. *Aquatic Toxicology*, 182, 20–30. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2016.11.007>

Mennigen, J. A., Sassine, J., Trudeau, V. L., & Moon, T. W. (2010). Waterborne fluoxetine disrupts feeding and energy metabolism in the goldfish *Carassius auratus*. *Aquatic Toxicology*, 100(1), 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. *Neurochemical Research*, 43(6), 1191–1199. <https://doi.org/10.1007/s11064-018-2536-5>
- Messiha, F. S. (1990). Effects of amitriptyline and nortriptyline on cerebral activity of the CDF-1 mouse strain. *General Pharmacology*, 21(6), 955–959. [https://doi.org/10.1016/0306-3623\(90\)90462-U](https://doi.org/10.1016/0306-3623(90)90462-U)
- Meston, C. M., & Frohlich, P. F. (2000). The neurobiology of sexual function. *Archives of General Psychiatry*, 57(11), 1012–1030. <https://doi.org/10.1001/archpsyc.57.11.1012>
- Metcalfe, 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. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 22(12), 2881–2889. <https://doi.org/10.1897/02-627>
- Minghetti, M., Drieschner, C., Bramaz, N., Schug, H., & Schirmer, K. (2017). A fish intestinal epithelial barrier model established from the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) cell line, RTgutGC. *Cell Biology and Toxicology*, 33(6), 539–555. <https://doi.org/10.1007/s10565-017-9385-x>
- Miranda, Maria Adriana, S. de P. (2006). Micronúcleos e outras alterações nucleares: um teste de predição para o câncer bucal. [Universidade Federal do Ceará]. http://www.repositorio.ufc.br/bitstream/riufc/1882/1/2006_dis_maspmiranda.pdf
- Mitra, T., Mahanty, A., Ganguly, S., & Mohanty, B. P. (2020). Transcriptomic responses to pollution in natural riverine environment in *Rita rita*. *Environmental Research*, 186, 109508. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2020.109508>
- Mohanty, B. P. (2020). Transcriptomic responses to pollution in natural riverine environment in *Rita rita*. *Environmental Research*, 186, 109508. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2020.109508>
- Moldal, T., Løkka, G., Wiik-Nielsen, J., Austbø, L., Torstensen, B. E., Rosenlund, G., Dale, O. B., Kaldhusdal, M., & Koppang, E. O. (2014). Substitution of dietary fish oil with plant oils is associated with shortened mid intestinal folds in Atlantic salmon (*Salmo salar*). *BMC Veterinary Research*, 10, 60. <https://doi.org/10.1186/1746-6148-10-60>
- Moreno, Ricardo Alberto, Moreno, Doris Hupfeld e Soares, M. B. de M. (1999). Psicofarmacologia de antidepressivos. *Brazilian Journal of Psychiatry*, 21(1), 24–40. <https://doi.org/https://doi.org/10.1590/S1516-44461999000500006>
- Mousel, D., Bastian, D., Firk, J., Palmowski, L., & Pinnekamp, J. (2021). Removal of pharmaceuticals from wastewater of health care facilities. *Science of the Total Environment*, 751, 141310. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.141310>
- Mu, X., Chai, T., Wang, K., Zhang, J., Zhu, L., Li, X., & Wang, C. (2015). Occurrence and origin of sensitivity toward difenoconazole in zebrafish (*Danio reio*) during different life stages. *Aquatic Toxicology*, 160, 57–68. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2015.01.001>

- Muir, D., Simmons, D., Wang, X., Peart, T., Villella, M., Miller, J., & Sherry, J. (2017). Bioaccumulation of pharmaceuticals and personal care product chemicals in fish exposed to wastewater effluent in an urban wetland. *Scientific Reports*, 7(1), 1–11. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-15462-x>
- Naderi, M., Salahinejad, A., Attaran, A., Chivers, D. P., & Niyogi, S. (2020). Chronic exposure to environmentally relevant concentrations of bisphenol S differentially affects cognitive behaviors in adult female zebrafish. *Environmental Pollution*, 261, 114060. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2020.114060>
- 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(5), 865–873. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2007.06.089>
- Natasha, Shahid, M., Khalid, S., Bibi, I., Bundschuh, J., Khan Niazi, N., & Dumat, C. (2020). A critical review of mercury speciation, bioavailability, toxicity and detoxification in soil-plant environment: Ecotoxicology and health risk assessment. *Science of the Total Environment*, 711, 134749. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.134749>
- Noche, R. R., Lu, P. N., Goldstein-Kral, L., Glasgow, E., & Liang, J. O. (2011). Circadian rhythms in the pineal organ persist in zebrafish larvae that lack ventral brain. *BMC Neuroscience*, 12(1), 7. <https://doi.org/10.1186/1471-2202-12-7>
- Nowakowska, K., Giebułtowiec, J., Kamaszewski, M., Adamski, A., Szudrowicz, H., Ostaszewska, T., Solarska-Dzięciołowska, U., Nałęcz-Jawecki, G., Wroczyński, P., & Drobniewska, A. (2020). Acute exposure of zebrafish (*Danio rerio*) larvae to environmental concentrations of selected antidepressants: Bioaccumulation, physiological and histological changes. *Comparative Biochemistry and Physiology Part - C: Toxicology and Pharmacology*, 229, 108670. <https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2019.108670>
- Nunes, B. (2010). Fármacos no ambiente: implicações ecotoxicológicas. *CAPTAR Ciência e Ambiente Para Todos*, 2(1), 9–20. <https://doi.org/https://doi.org/10.34624/captar.v2i1.14590>
- Nunes, B., Pinto, G., Martins, L., Gonçalves, F., & Antunes, S. C. (2014). Biochemical and standard toxic effects of acetaminophen on the macrophyte species *Lemna minor* and *Lemna gibba*. *Environmental Science and Pollution Research*, 21(18), 10815–10822. <https://doi.org/10.1007/s11356-014-3059-5>
- Nunes-Tavares, N., Nery Da Matta, A., Batista E Silva, C. M., Araújo, G. M. N., Louro, S. R. W., & Hassón-Voloch, A. (2002). Inhibition of acetylcholinesterase from *Electrophorus electricus* (L.) by tricyclic antidepressants. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, 34(9), 1071–1079. [https://doi.org/10.1016/S1357-2725\(02\)00027-4](https://doi.org/10.1016/S1357-2725(02)00027-4)
- OECD Test No. 203: Fish, Acute Toxicity Test. OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 2, OECD Publishing, Paris, France. 2013. doi:10.1787/9789264069961-en

OECD Test No. 236: Fish Embryo Acute Toxicity (FET) Test. OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 2, OECD Publishing, Paris, France. 2013.
doi:10.1787/9789264203709-en

Oggier, M. D., Weisbrod, J. C., Stoller, M. A., Zenker, K. A., & Fent, K. (2010). Effects of Diazepam on Gene Expression and Link to Physiological Effects in Different Life Stages in Zebrafish *Danio rerio*. *Environmental Science and Technology*, 44(19), 7685–7691.
<https://doi.org/10.1021/es100980r>

Okada, M., Hirano, T., Mizuno, K., Kawata, Y., Wada, K., Murakami, T., Tasaki, H., & Kaneko, S. (1998). Effects of carbamazepine on hippocampal serotonergic system. *Epilepsy Research*, 31(3), 187–198. [https://doi.org/10.1016/S0920-1211\(98\)00025-4](https://doi.org/10.1016/S0920-1211(98)00025-4)

Oladokun, E. I., Sogbanmu, T. O., & Anikwe, J. C. (2020). Sublethal concentrations of dichlorvos and paraquat induce genotoxic and histological effects in the *Clarias gariepinus*. *Environmental Health and Toxicology*, 35(3), 1–9. <https://doi.org/10.5620/eaht.2020013>

Rezende, K. O. F., da Silva Neto, G. M., e Pinto, J. M., & Salvo, L. M. (2016). Hepatic Parameters of Marine Fish *Rachycentron canadum* (Linnaeus, 1766) Exposed to Sublethal Concentrations of Water-Soluble Fraction of Petroleum. *Journal of Marine Biology & Oceanography*, 5(2). <https://doi.org/10.4172/2324-8661.1000156>

Oliveira, A. C., Fascineli, M. L., Andrade, T. S., Sousa-Moura, D., Domingues, I., Camargo, N. S., Oliveira, R., Grisolia, C. K., & Villacis, R. A. R. (2021). Exposure to tricyclic antidepressant nortriptyline affects early-life stages of zebrafish (*Danio rerio*). *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 210, 111868. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2020.111868>

Oliveira, M. C. de, & Souza, V. H. E. de. (2006). Utilização de biomarcadores de estresse oxidativo no monitoramento ambiental. *Revista UNINGÁ*, 10(1), 167–175.
<https://repositorio.unesp.br/handle/11449/22556>

Omar, W. A., Saleh, Y. S., & Marie, M. A. S. (2014). Integrating multiple fish biomarkers and risk assessment as indicators of metal pollution along the Red Sea coast of Hodeida, Yemen Republic. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 110, 221–231.
<https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2014.09.004>

Osman, A. G. M., Reheem, A.-E. –Baset M. A. El, AbuefFadl, K. Y., & Rab, A. G. G.-. (2010). Enzymatic and histopathologic biomarkers as indicators of aquatic pollution in fishes. *Natural Science*, 02(11), 1302–1311. <https://doi.org/10.4236/ns.2010.211158>

Özkan, F., Gül Gündüz, S., Berköz, M., & Hunt, A. Ö. (2011). Induction of micronuclei and other nuclear abnormalities in peripheral erythrocytes of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*, following exposure to sublethal cadmium doses. *Turk J Zool*, 35(4), 585–592.
<https://doi.org/10.3906/zoo-0907-77>

Painter, M. M., Buerkley, M. A., Julius, M. L., Vajda, A. M., Norris, D. O., Barber, L. B., Furlong, E. T., Schultz, M. M., & Schoenfuss, H. L. (2009). Antidepressants at

environmentally relevant concentrations affect predator avoidance behavior of larval fathead minnows (*Pimephales promelas*). *Environmental Toxicology and Chemistry*, 28(12), 2677. <https://doi.org/10.1897/08-556.1>

Palhares, D., & Grisolia, C. K. (2002). Comparison between the micronucleus frequencies of kidney and gill erythrocytes in tilapia fish, following mitomycin C treatment. *Genetics and Molecular Biology*, 25(3), 281–284. <https://doi.org/10.1590/S1415-47572002000300005>

Pan, C., Yang, M., Xu, H., Xu, B., Jiang, L., & Wu, M. (2018). Tissue bioconcentration and effects of fluoxetine in zebrafish (*Danio rerio*) and red crucian carp (*Carassius auratus*) after short-term and long-term exposure. *Chemosphere*, 205, 8–14. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2018.04.082>

Parajó, J. J., Macário, I. P. E., De Gaetano, Y., Dupont, L., Salgado, J., Pereira, J. L., Gonçalves, F. J. M., Mohamadou, A., & Ventura, S. P. M. (2019). Glycine-betaine-derived ionic liquids: Synthesis, characterization and ecotoxicological evaluation. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 184, 109580. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2019.109580>

Parezanović, G. Š., Lalic-Popovic, M., Golocorbin-Kon, S., Vasovic, V., Milijašević, B., Al-Salami, H., & Mikov, M. (2019). Environmental Transformation of Pharmaceutical Formulations: A Scientific Review. *Environmental Contamination and Toxicology*, 77(2), 155–161. <https://doi.org/10.1007/s00244-019-00630-z>

Park, J.-W., Heah, T. P., Gouffon, J. S., Henry, T. B., & Sayler, G. S. (2012). Global gene expression in larval zebrafish (*Danio rerio*) exposed to selective serotonin reuptake inhibitors (fluoxetine and sertraline) reveals unique expression profiles and potential biomarkers of exposure. *Environmental Pollution*, 167, 163–170. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2012.03.039>

Parolini, M., Ghilardi, A., De Felice, B., & Del Giacco, L. (2019). Environmental concentration of fluoxetine disturbs larvae behavior and increases the defense response at molecular level in zebrafish (*Danio rerio*). *Environmental Science and Pollution Research*, 26(34), 34943–34952. <https://doi.org/10.1007/s11356-019-06619-4>

Parrott, J. L., & Metcalfe, C. D. (2018). Nest-defense behaviors in fathead minnows after lifecycle exposure to the antidepressant venlafaxine. *Environmental Pollution*, 234, 223–230. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2017.11.049>

Parrott, J. L., & Metcalfe, C. D. (2017). Assessing the effects of the antidepressant venlafaxine to fathead minnows exposed to environmentally relevant concentrations over a full life cycle. *Environmental Pollution*, 229, 403–411. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2017.06.009>

Paulis, M. G., Hafez, E. M., El-Tahawy, N. F., & Aly, M. K. M. (2018). Toxicological Assessment of Venlafaxine: Acute and Subchronic Toxicity Study in Rats. *International Journal of Toxicology*, 37(4), 327–334. <https://doi.org/10.1177/1091581818777470>

- Pelster, B., & Egg, M. (2018). Hypoxia-inducible transcription factors in fish: expression, function and interconnection with the circadian clock. *Journal of Experimental Biology*, 221(13), 1–13. <https://doi.org/10.1242/jeb.163709>
- Pelster, B., & Schwerte, T. (2012). The paracrine role of 5-HT in the control of gill blood flow. *Respiratory Physiology and Neurobiology*, 184(3), 340–346. <https://doi.org/10.1016/j.resp.2012.05.014>
- Penn, M. H., Bendiksen, E. A., Campbell, P., & Krogdahl, A. S. (2011). High level of dietary pea protein concentrate induces enteropathy in Atlantic salmon (*Salmo salar L.*). *Aquaculture*, 310(3–4), 267–273. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2010.10.040>
- Pereira, P., Giancesini, J., da Silva Barbosa, C., Cassol, G. F., Von Borowski, R. G., Kahl, V. F. S., Cappelari, S. E., & Picada, J. N. (2009). Neurobehavioral and genotoxic parameters of duloxetine in mice using the inhibitory avoidance task and comet assay as experimental models. *Pharmacological Research*, 59(1), 57–61. <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2008.09.014>
- Perreault, H., Semsar, K., & Godwin, J. (2003). Fluoxetine treatment decreases territorial aggression in a coral reef fish. *Physiology & Behavior*, 79(4–5), 719–724. [https://doi.org/10.1016/S0031-9384\(03\)00211-7](https://doi.org/10.1016/S0031-9384(03)00211-7)
- Petrie, B., Barden, R., & Kasprzyk-Hordern, B. (2014). A review on emerging contaminants in wastewaters and the environment: Current knowledge, understudied areas and recommendations for future monitoring. *Water Research*, 72, 3–27. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2014.08.053>
- Petronilha, E. D. C., Pintob, A. C., & Villara, J. D. F. (2011). Acetilcolinesterase: Alzheimer e guerra química. *Ciência e Tecnologia*, 3–14. http://rmct.ime.eb.br/arquivos/revistas/RMCT_3_tri_2011.pdf#page=5
- Pilehvar, A., Town, R. M., & Blust, R. (2020). The effect of copper on behaviour, memory, and associative learning ability of zebrafish (*Danio rerio*). *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 188, 109900. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2019.109900>
- Piña B., & Barata C. A genomic and ecotoxicological perspective of DNA array studies in aquatic environmental risk assessment. *Aquat Toxicol.* 2011;105:40-49.
- Pivetta, R. C., Rodrigues-Silva, C., Ribeiro, A. R., & Rath, S. (2020). Tracking the occurrence of psychotropic pharmaceuticals in Brazilian wastewater treatment plants and surface water, with assessment of environmental risks. *Science of the Total Environment*, 727, 138661. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.138661>
- Pivetta, G. G., & Gastaldini, M. D. C. (2019). Presence of emerging contaminants in urban water bodies in southern Brazil. *Journal of Water and Health*, 17(2), 329–337. <https://doi.org/10.2166/wh.2019.092>

- Ploski, J. E., Monsey, M. S., Nguyen, T., DiLeone, R. J., & Schafe, G. E. (2011). The neuronal PAS domain protein 4 (Npas4) is required for new and reactivated fear memories. *PLoS ONE*, 6(8), 23760. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0023760>
- Podobnik, M., Frohnhöfer, H. G., Dooley, C. M., Eskova, A., Nüsslein-Volhard, C., & Irion, U. (2020). Evolution of the potassium channel gene *Kcnj13* underlies colour pattern diversification in Danio fish. *Nature Communications*, 11(1), 1–13. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-20021-6>
- Poleksić & Mitrović-Tutundžić, 1994. (1994). In Pollution and community effects. University of Belgrade.
- Prado, M. A. M. B. do, Francisco, P. M. S. B., & Barros, M. B. de A. (2017). Use of psychotropic medications in adults and elderly living in Campinas, São Paulo, Brazil: cross-sectional population-based study. *Epidemiologia e Serviços de Saúde: Revista Do Sistema Único de Saúde Do Brasil*, 26(4), 747–758. <https://doi.org/10.5123/S1679-49742017000400007>
- Prokkola, J. M., & Nikinmaa, M. (2018). Circadian rhythms and environmental disturbances - Underexplored interactions. *Journal of Experimental Biology*, 221(16), 1–9. <https://doi.org/10.1242/jeb.179267>
- Qu, H., Ma, R., Wang, B., Yang, J., Duan, L., & Yu, G. (2019). Enantiospecific toxicity, distribution and bioaccumulation of chiral antidepressant venlafaxine and its metabolite in loach (*Misgurnus anguillicaudatus*) co-exposed to microplastic and the drugs. *Journal of Hazardous Materials*, 370, 203–211. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2018.04.041>
- Quaak, M., van Schayck, C. P., Postma, D. S., Wagena, E. J., & van Schooten, F. J. (2012). Genetic variants in the serotonin transporter influence the efficacy of bupropion and nortriptyline in smoking cessation. *Addiction*, 107(1), 178–187. <https://doi.org/10.1111/j.1360-0443.2011.03534.x>
- Quera-Salva, M.-A., Lemoine, P., & Guilleminault, C. (2010). Impact of the novel antidepressant agomelatine on disturbed sleep-wake cycles in depressed patients. *Human Psychopharmacology: Clinical and Experimental*, 25(3), 222–229. <https://doi.org/10.1002/hup.1112>
- Rahman, M. F., Yanful, E. K., & Jasim, S. Y. (2009). Occurrences of endocrine disrupting compounds and pharmaceuticals in the aquatic environment and their removal from drinking water: Challenges in the context of the developing world. *Desalination*, 248(1–3), 578–585. <https://doi.org/10.1016/j.desal.2008.05.105>
- Ramachandran, A., Moellering, D. R., Ceaser, E., Shiva, S., Xu, J., & Darley-Usmar, V. (2002). Inhibition of mitochondrial protein synthesis results in increased endothelial cell susceptibility to nitric oxide-induced apoptosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99(10), 6643–6648. <https://doi.org/10.1073/pnas.102019899>

- Ramamoorthi, K., Fropf, R., Belfort, G. M., Fitzmaurice, H. L., McKinney, R. M., Neve, R. L., Otto, T., & Lin, Y. (2011). Npas4 regulates a transcriptional program in CA3 required for contextual memory formation. *Science*, 334(6063), 1669–1675. <https://doi.org/10.1126/science.1208049>
- Ramesh, M., Anitha, S., Poopal, R. K., & Shobana, C. (2018). Evaluation of acute and sublethal effects of chloroquine (C₁₈H₂₆ClN₃) on certain enzymological and histopathological biomarker responses of a freshwater fish *Cyprinus carpio*. *Toxicology Reports*, 5, 18–27. <https://doi.org/10.1016/j.toxrep.2017.11.006>
- 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. *Environmental Science and Technology*, 47(20), 11384–11395. <https://doi.org/10.1021/es402065a>
- Rehman, K., Fatima, F., Waheed, I., & Akash, M. S. H. (2018). Prevalence of exposure of heavy metals and their impact on health consequences. *Journal of Cellular Biochemistry*, 119(1), 157–184. <https://doi.org/10.1002/jcb.26234>
- Reis, A. B., de Mello Gonçalves Sant’Ana, D., de Azevedo, J. F., Merlini, L. S., & de Almeida Araújo, E. J. (2009). Alterações do epitélio branquial e das lamelas de tilápias (*Oreochromis niloticus*) causadas por mudanças do ambiente aquático em tanques de cultivo intensivo. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, 29(4), 303–311. <https://doi.org/10.1590/S0100-736X2009000400005>
- Rezende, K. F. O. (2011). Alterações morfológicas de Tilápias do Nilo (*Oreochromis niloticus*) (Linnaeus, 1758) expostas às águas da Represa Billings [Universidade de São Paulo]. <https://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/42/42134/tde-26012012-105551/pt-br.php>
- Riva, F., Zuccato, E., & Castiglioni, S. (2015). Prioritization and analysis of pharmaceuticals for human use contaminating the aquatic ecosystem in Italy. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 106, 71–78. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2014.10.003>
- Rivera-Utrilla, J., Sánchez-Polo, M., Ferro-García, Á., Prados-Joya, G., & Ocampo-Pérez, R. (2013). Pharmaceuticals as emerging contaminants and their removal from water. A review. *Chemosphere*, 93(7), 1268–1287. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2013.07.059>
- Rivero, C. L. G., (2007). Perfil da frequência de micronúcleos e de danos no DNA de diferentes espécies de peixes do lago Paranoá, Brasília-DF, Brasil. [Universidade de Brasília]. <https://repositorio.unb.br/handle/10482/2626>
- Rocha, R. M., Coelho, R. P., Montes, C. S., & Santos, Simone Socorro Dasmasceno, Ferreira, M. A. P. (2010). Avaliação histopatológica do fígado de *Brachyplatystoma rousseauxii* (Castelnaud, 1855) da baía do Guajará, Belém, Pará. *Ciência Animal Brasileira*, 11(1), 101–109. <https://www.revistas.ufg.br/vet/article/view/3028>

- Rodrigues, A., Borges, F. O., Pissarra, V., Luísa Maulvault, A., Paula, J. R., Bispo, R., & Rosa, R. (2019). First indication of deleterious impacts in white-seabream larvae (*Diplodus sargus*) survival and behaviour following acute venlafaxine exposure. *Ecotoxicology*, 28(6), 612–618. <https://doi.org/10.1007/s10646-019-02057-7>
- Rodrigues, A. P., Santos, L. H. M. L. M., Ramalhosa, M. J., Delerue-Matos, C., & Guimarães, L. (2015). Sertraline accumulation and effects in the estuarine decapod *Carcinus maenas*: Importance of the history of exposure to chemical stress. *Journal of Hazardous Materials*, 283, 350–358. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2014.08.035>
- Rodrigues, P., Cunha, V., Oliva-Teles, L., Ferreira, M., & Guimarães, L. (2020). Norfluoxetine and venlafaxine in zebrafish larvae: Single and combined toxicity of two pharmaceutical products relevant for risk assessment. *Journal of Hazardous Materials*, 400, 123171. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2020.123171>
- Rodrigues, P., Cunha, V., Oliva-Teles, L., Ferreira, M., & Guimarães, L. (2020). Effects of norfluoxetine and venlafaxine in zebrafish larvae: Molecular data. *Data in Brief*, 33, 106515. <https://doi.org/10.1016/j.dib.2020.106515>
- Rodrigues, S., Antunes, S. C., Nunes, B., & Correia, A. T. (2017). Histological alterations in gills and liver of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) after exposure to the antibiotic oxytetracycline. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 53, 164–176. <https://doi.org/10.1016/j.etap.2017.05.012>
- Rogers, E. D., Henry, T. B., Twiner, M. J., Gouffon, J. S., McPherson, J. T., Boyer, G. L., Saylor, G. S., & Wilhelm, S. W. (2011). Global gene expression profiling in larval zebrafish exposed to microcystin-LR and microcystis reveals endocrine disrupting effects of cyanobacteria. *Environmental Science and Technology*, 45(5), 1962–1969. <https://doi.org/10.1021/es103538b>
- Rotta, M. A. (2003). Aspectos Gerais da Fisiologia e Estrutura do Sistema Digestivo dos Peixes Relacionados à Piscicultura. *Journal of Chemical Information and Modeling*, 53(9), 1689–1699.
- Rubinstein, A. L. (2006). Zebrafish assays for drug toxicity screening. *Expert Opinion on Drug Metabolism & Toxicology*, 2(2), 231–240. <https://doi.org/10.1517/17425255.2.2.231>
- Rudorfer, M. V., & Potter, W. Z. (1997). The role of metabolites of antidepressants in the treatment of depression. *CNS Drugs*, 7(4), 273–312. <https://doi.org/10.2165/00023210-199707040-00003>
- Salgado, J., Parajó, J. J., Teijeira, T., Cruz, O., Proupín, J., Villanueva, M., Rodríguez-Añón, J. A., Verdes, P. V., & Reyes, O. (2017). New insight into the environmental impact of two imidazolium ionic liquids. Effects on seed germination and soil microbial activity. *Chemosphere*, 185, 665–672. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2017.07.065>

- Samanta, P., Mukherjee, A., Pal, S., Kole, D., & Ghosha, A. (2016). Toxic effects of glyphosate-based herbicide, Excel Mera 71 on gill, liver, and kidney of *Heteropneustes fossilis* under laboratory and field conditions. *Journal of Microscopy and Ultrastructure*, 4(3), 147. <https://doi.org/10.1016/j.jmau.2016.01.002>
- Samaras, A., & Pavlidis, M. (2020). Behavioural and physiological responses to a conditioning protocol for adult zebrafish, *Danio rerio*, held in groups. *Behavioural Processes*, 179, 104201. <https://doi.org/10.1016/j.beproc.2020.104201>
- Sanches, A. L. M., Daam, M. A., Freitas, E. C., Godoy, A. A., Meireles, G., Almeida, A. R., Domingues, I., & Espíndola, E. L. G. (2018). Lethal and sublethal toxicity of abamectin and difenoconazole (individually and in mixture) to early life stages of zebrafish. *Chemosphere*, 210, 531–538. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2018.07.027>
- Santarelli, L., Saxe, M., Gross, C., Surget, A., Battaglia, F., Dulawa, S., Weisstaub, N., Lee, J., Duman, R., Arancio, O., Belzung, C., & Hen, R. (2003). Requirement of hippocampal neurogenesis for the behavioral effects of antidepressants. *Science*, 301(5634), 805–809. <https://doi.org/10.1126/science.1083328>
- Santos Filho, F. M. dos, Rezende, K. F. O., Emerenciano, A. K., Moreira, L. M., Vila, V. B., Borges, R. M., & Pressinotti, L. N. (2014). Avaliação de biomarcadores histológicos em peixes coletados a montante e a jusante da mancha urbana. *Atas de Saúde Ambiental - ASA*, 2(1), 9–22.
- Santos, D. M. S. (2010). Qualidade da água e histopatologia de órgãos de peixes provenientes de criatórios do município de Itapecuru Mirim, Maranhão. [Universidade Estadual Paulista]. <https://repositorio.unesp.br/handle/11449/104634>
- Santos, H. B., Vieira, L., Alves, S. N., & Thomé, R. G. (2016). Análise do intestino delgado de *Danio rerio* exposto a organofosforado e detergente: um estudo histológico e morfométrico. *Conexão Ciência (Online)*, 11(2), 51–58. <https://doi.org/10.24862/cco.v11i2.432>
- Santos, L. H. M. L. M., Araújo, A. N., Fachini, A., Pena, A., Delerue-Matos, C., & Montenegro, M. C. B. S. M. (2010). Ecotoxicological aspects related to the presence of pharmaceuticals in the aquatic environment. *Journal of Hazardous Materials*, 175(1–3), 45–95. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2009.10.100>
- Santos, N. da S., Oliveira, R., Lisboa, C. A., Mona e Pinto, J., Sousa-Moura, D., Camargo, N. S., Perillo, V., Oliveira, M., Grisolia, C. K., & Domingues, I. (2018). Chronic effects of carbamazepine on zebrafish: Behavioral, reproductive and biochemical endpoints. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 164, 297–304. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2018.08.015>
- Saxena, R., & Ahuja, Y. R. (1988). Genotoxicity evaluation of the tricyclic antidepressants amitriptyline and imipramine using human lymphocyte cultures. *Environmental Mutagenesis*, 12(4), 421–430. <https://doi.org/10.1002/em.2860120410>

- Schaik, N. van, & Graf, U. (1991). Genotoxicity evaluation of five tricyclic antidepressants in the wing somatic mutation and recombination test in *Drosophila melanogaster*. *Mutation Research/Genetic Toxicology*, 260(1), 99–104. [https://doi.org/10.1016/0165-1218\(91\)90085-Z](https://doi.org/10.1016/0165-1218(91)90085-Z)
- Scholz, S., Sela, E., Blaha, L., Braunbeck, T., Galay-Burgos, M., García-Franco, M., Guinea, J., Klüver, N., Schirmer, K., Tanneberger, K., Tobor-Kapłon, M., Witters, H., Belanger, S., Benfenati, E., Creton, S., Cronin, M. T. D., Eggen, R. I. L., Embry, M., Ekman, D., Winter, M. J. (2013). A European perspective on alternatives to animal testing for environmental hazard identification and risk assessment. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 67(3), 506–530. <https://doi.org/10.1016/j.yrtph.2013.10.003>
- Schwab, B. W., Hayes, E. P., Fiori, J. M., Mastrocco, F. J., Roden, N. M., Cragin, D., Meyerhoff, R. D., D'Aco, V. J., & Anderson, P. D. (2005). Human pharmaceuticals in US surface waters: A human health risk assessment. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 42(3), 296–312. <https://doi.org/10.1016/j.yrtph.2005.05.005>
- Schirmer, K., Fischer, B. B., Madureira, D. J., & Pillai, S. (2010). Transcriptomics in ecotoxicology. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 397(3), 917–923. <https://doi.org/10.1007/s00216-010-3662-3>
- Schlüsener, M. P., Hardenbicker, P., Nilson, E., Schulz, M., Viergutz, C., & Ternes, T. A. (2015). Occurrence of venlafaxine, other antidepressants and selected metabolites in the *Rhine catchment* in the face of climate change. *Environmental Pollution*, 196, 247–256. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2014.09.019>
- 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. *Environmental Science and Technology*, 44(6), 1918–1925. <https://doi.org/10.1021/es9022706>
- Sehonova, P., Hodkovicova, N., Urbanova, M., Örn, S., Blahova, J., Svobodova, Z., Faldyna, M., Chloupek, P., Briedikova, K., & Carlsson, G. (2019). Effects of antidepressants with different modes of action on early life stages of fish and amphibians. *Environmental Pollution*, 254(Pt A), 112999. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2019.112999>
- Sehonova, P., Svobodova, Z., Dolezelova, P., Vosmerova, P., & Faggio, C. (2018). Effects of waterborne antidepressants on non-target animals living in the aquatic environment: A review. *Science of the Total Environment*, 631–632, 789–794. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.03.076>
- Sehonova, P., Plhalova, L., Blahova, J., Doubkova, V., Marsalek, P., Prokes, M., Tichy, F., Skladana, M., Fiorino, E., Mikula, P., Vecerek, V., Faggio, C., & Svobodova, Z. (2017). Effects of selected tricyclic antidepressants on early-life stages of common carp (*Cyprinus carpio*). *Chemosphere*, 185(1), 1072–1080. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2017.07.092>

- Shah, N., Khan, A., Ali, R., Marimuthu, K., Uddin, M. N., Rizwan, M., Rahman, K. U., Alam, M., Adnan, M., Muhammad, Jawad, S. M., Hussain, S., & Khisroon, M. (2020). Monitoring Bioaccumulation (in Gills and Muscle Tissues), Hematology, and Genotoxic Alteration in *Ctenopharyngodon idella* Exposed to Selected Heavy Metals. *BioMed Research International*, 2020, 6185231. <https://doi.org/10.1155/2020/6185231>
- Shastri, C. S., Shafeeqe, A. A., & Ashwathnarayana, B. J. (2013). Effect of combination of aripiprazole with carbamazepine and fluvoxamine on liver functions in experimental animals. *Indian Journal of Pharmacology*, 45(2), 121–125. <https://doi.org/10.4103/0253-7613.108280>
- Shin, J. T., & Fishman, M. C. (2002). From zebrafish to human: Modular medical models. *Annual Review of Genomics and Human Genetics*, 3(24), 311–340. <https://doi.org/10.1146/annurev.genom.3.031402.131506>
- Silva A. A., & Fernández-Guasti, A. (2019). The combination of mirtazapine plus venlafaxine reduces immobility in the forced swim test and does not inhibit female sexual behavior. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 187, 172817. <https://doi.org/10.1016/j.pbb.2019.172817>
- Silva, A. C. de A. (2016). Biomarcadores de contaminação ambiental [Universidade Fernando Pessoa]. https://bdigital.ufp.pt/bitstream/10284/5821/1/PPG_29729.pdf
- Silva, A. das G. (2004). Alterações histopatológicas de peixes como biomarcadores da contaminação aquática [Universidade Estadual de Londrina]. <http://www.uel.br/laboratorios/lefa/dissertacaoandressa.pdf>
- Silva, D. C. V. R. da., Pompêo, M., & Paiva, T. C. B. de. (2015). A ecotoxicologia no contexto atual no brasil. In M. Pompêo, V. Moschini-Carlos, P. Y. Nishimura, S. C. da Silva, & J. C. L. Doval (Eds.), *Ecologia de reservatórios e interfaces* (p. 14). Instituto de Biociências – IB/USP. <https://doi.org/https://doi.org/10.11606/97885585658526>
- Silva, J. D. A. (2007). O uso do ensaio cometa para o ensino de genética toxicológica. O uso do ensaio cometa para o ensino de genética toxicológica, 4. www.sbg.org.br
- Silva, L. C. R. da, Furuya, W. M., Natali, M. R. M., Schamber, C. R., Santos, L. D. dos, & Vidal, L. V. O. (2010). Desempenho e morfometria intestinal de juvenis de tilápia-do-nilo alimentados com dietas suplementadas com L-glutamina e L-glutamato. *Revista Brasileira de Zootecnia*, 39(6), 1175–1179. <https://doi.org/10.1590/s1516-35982010000600002>
- Sinyakova, N. A., Kulikova, E. A., Englevskii, N. A., & Kulikov, A. V. (2018). Effects of fluoxetine and potential antidepressant 8-trifluoromethyl 1,2,3,4,5-benzopentathiepin-6-amine hydrochloride (tc-2153) on behavior of *Danio rerio* fish in the novel tank test and brain content of biogenic amines and their metabolites. *Bulletin of Experimental Biology and Medicine*, 164(5), 620–623. <https://doi.org/10.1007/s10517-018-4045-6>

- Sivalakshmi, A., Vyas, K., Mahender Rao, S., & Om Reddy, G. (2002). A monoclinic polymorph of venlafaxine hydrochloride. *Acta Crystallographica Section E Structure Reports Online*, 58(10), o1072–o1074. <https://doi.org/10.1107/s160053680201588x>
- Slamon, K. A., Taylor, A. C., Metcalfe, N. B., & Gilmour, K. M. (2001). Effects of an environmental perturbation on the social behaviour and physiological function of brown trout. *Animal Behaviour*, 61(2), 325–333. <https://doi.org/10.1006/anbe.2000.1567>
- Smith, R. M. (2017). Advancing psychiatric pharmacogenomics using drug development paradigms. *Pharmacogenomics*, 18(15), 1459–1467. <https://doi.org/10.2217/pgs-2017-0104>
- Snyder, S. H., & Yamamura, H. I. (1977). Antidepressants and the muscarinic acetylcholine receptor. *Arch Gen Psychiatry*, 34(2), 236–239. <https://doi.org/10.1001/archpsyc.1977.01770140126014>
- Sodré, F. F., & Cavalcanti, C. M. P. (2018). Method development for assessing carbamazepine, caffeine, and atrazine in water sources from the Brazilian Federal District using UPLC-QTOF/MS. *International Journal of Analytical Chemistry*, 2018, 4593793. <https://doi.org/10.1155/2018/4593793>
- Sodré, F. F., Montagner, C. C., Locatelli, M. A. F., & Jardim, W. F. (2007). Ocorrência de interferentes endócrinos e produtos farmacêuticos em águas superficiais da região de Campinas (SP, Brasil). *Journal of the Brazilian Society of Ecotoxicology*, 2(2), 187–196. <https://doi.org/10.5132/jbse.2007.02.012>
- Sodré, F. F., & Sampaio, T. R. (2020). Development and application of a SPE-LC-QTOF method for the quantification of micropollutants of emerging concern in drinking waters from the Brazilian capital. *Emerging Contaminants*, 6, 72–81. <https://doi.org/10.1016/j.emcon.2020.01.001>
- Sousa-Moura, D. (2016). Avaliação ecotoxicológica de fármacos psicotrópicos e suas possíveis interações com nanomateriais usando embriões de peixe-zebra [Universidade de Brasília]. <https://repositorio.unb.br/handle/10482/20822>
- Sousa, C. E. C., Cruz-Machado, S. da S., & Tamura, E. K. (2008). The circadian rhythms and reproduction in mammals. *Boletim Do Centro de Biologia Da Reprodução*, 27(1/2), 15–20.
- Souza, M. L. R., Dourado, D. M., Machado, S. D., Buccini, D. F., Jardim, M. I. A., Matias, R., Correia, C., & Ferreira, I. C. (2003). Análise da pele de três espécies de peixes: histologia, morfometria e testes de resistência. *Revista Brasileira de Zootecnia*, 32(6 suppl 1), 1551–1559. <https://doi.org/10.1590/s1516-35982003000700003>
- Souza, Neyliane Costa de. (2011). Avaliação de micropoluentes emergentes em esgotos e águas superficiais [Universidade Federal do Ceará]. <http://www.repositorio.ufc.br/handle/riufc/2148>

- 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(1), 9–16. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2007.04.080>
- Steimer, W., Zöpf, K., Von Amelunxen, S., Pfeiffer, H., Bachofer, J., Popp, J., Messner, B., Kissling, W., & Leucht, S. (2004). Allele-specific change of concentration and functional gene dose for the prediction of steady-state serum concentrations of amitriptyline and nortriptyline in *CYP2C19* and *CYP2D6* extensive and intermediate metabolizers. *Clinical Chemistry*, 50(9), 1623–1633. <https://doi.org/10.1373/clinchem.2003.030825>
- Sternbach, H. (2003). Are antidepressants carcinogenic? A review of preclinical and clinical studies. *Clin Psychiatry*, 64(10):1153-62. <https://doi.org/10.4088/JCP.v64n1003>
- Stewart, A. M., Braubach, O., Spitsbergen, J., Gerlai, R., & Kalueff, A. V. (2014). Zebrafish models for translational neuroscience research: From tank to bedside. *Trends in Neurosciences*, 37(5), 264–278. <https://doi.org/10.1016/j.tins.2014.02.011>
- Stewart, A. M., Cachat, J., Gaikwad, S., Robinson, K. S. L., Gebhardt, M., & Kalueff, A. V. (2013). Perspectives on experimental models of serotonin syndrome in zebrafish. *Neurochemistry International*, 62(6), 893–902. <https://doi.org/10.1016/j.neuint.2013.02.018>
- Stewart, A., Wong, K., Cachat, J., Gaikwad, S., Kyzar, E., Wu, N., Hart, P., Piet, V., Utterback, E., Elegante, M., Tien, D., & Kalueff, A. V. (2011). Zebrafish models to study drug abuse-related phenotypes. *Reviews in the Neurosciences*, 22(1), 95–105. <https://doi.org/10.1515/RNS.2011.011>
- Suwala, J., Machowska, M., & Wiela-Hojeńska, A. (2019). Venlafaxine pharmacogenetics: A comprehensive review. *Pharmacogenomics*, 20(11), 829–845. <https://doi.org/10.2217/pgs-2019-0031>
- Tamin, H., Boivin, J. F., Hanley, J., Stang, M. R., & Collet, J. P. (2006). Risk of breast cancer in association with exposure to two different groups of tricyclic antidepressants. *Pharmacoepidemiology and Drug Safety*, 15(10), 689–697. <https://doi.org/10.1002/pds.1233>
- Tan, H., Polverino, G., Martin, J. M., Bertram, M. G., Wiles, S. C., Palacios, M. M., Bywater, C. L., White, C. R., & Wong, B. B. M. (2020). Chronic exposure to a pervasive pharmaceutical pollutant erodes among-individual phenotypic variation in a fish. *Environmental Pollution*, 263(Pt A), 114450. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2020.114450>
- Tang, Y., Mi, P., Li, M., Zhang, S., Li, J., & Feng, X. (2021). Environmental level of the antidepressant venlafaxine induces behavioral disorders through cortisol in zebrafish larvae (*Danio rerio*). *Neurotoxicology and Teratology*, 83, 106942. <https://doi.org/10.1016/j.ntt.2020.106942>
- Taylor, P., Li, Y., Camp, S., Rachinsky, T. L., Ekström, T., Getman, D., Fuentes, M. E., Vellom, D. C., & Radić, Z. (1993). Structure and regulation of expression of the

acetylcholinesterase gene. *Chemico-Biological Interactions*, 87(1–3), 199–207.
[https://doi.org/10.1016/0009-2797\(93\)90043-X](https://doi.org/10.1016/0009-2797(93)90043-X)

Thomas, J., Guénette, J., & Thomson, E. M. (2018). Stress axis variability is associated with differential ozone-induced lung inflammatory signaling and injury biomarker response. *Environmental Research*, 167, 751–758. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2018.09.007>

Thomas, M. A., Joshi, P. P., & Klaper, R. D. (2012). Gene-class analysis of expression patterns induced by psychoactive pharmaceutical exposure in fathead minnow (*Pimephales promelas*) indicates induction of neuronal systems. *Comparative Biochemistry and Physiology - C Toxicology and Pharmacology*, 155(1), 109–120.
<https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2011.05.014>

Thomas, M. A., & Klaper, R. D. (2012). Psychoactive pharmaceuticals induce fish gene expression profiles associated with human idiopathic autism. *PLoS ONE*, 7(6), 1–8.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0032917>

Thompson, W. A., Arnold, V. I., & Vijayan, M. M. (2017). Venlafaxine in embryos stimulates neurogenesis and disrupts larval behavior in zebrafish. *Environmental Science and Technology*, 51(21), 12889–12897. <https://doi.org/10.1021/acs.est.7b04099>

Tiberi, M., & Lavoie, P. . (1985). Inhibition of the retrograde axonal transport of acetylcholinesterase by the anti-culmodulin agents amitriptyline and desipramine. *Journal of Neurobiology*, 16(3), 245–248. <https://doi.org/10.1002/neu.480160308>

Torres, M. C. L., Soares, N. de F. F., & Maia, J. F. (2004). Parâmetros cinéticos da Glutathione S-Transferase e sua ativação por extratos de vegetais. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, 24(2), 243–248. <https://doi.org/10.1590/s0101-20612004000200014>

Torres, Nádia Hortense, Américo, Juliana Heloísa Pinê, Ferreira, L. F., & Romanholo, Nazato, Carina, Maranhão, Lucineide Aparecida, Vilca, Franz Zirena e Tornisielo, V. L. (2012). Fármacos no Ambiente - Revisão. *Revista de Estudos Ambientais*, 14(4), 67–75.
<https://doi.org/ISSN 1983 1501>

Tovote, P., Fadok, J. P., & Lüthi, A. (2015). Neuronal circuits for fear and anxiety. *Nature Reviews Neuroscience*, 16(6), 317–331. <https://doi.org/10.1038/nrn3945>

Turibio, T. de O. (2018). Caracterização biológica do muco epidérmico da arraia de água doce *Paratrygon aiereba* [Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares].
http://bdtd.ibict.br/vufind/Record/USP_4b68c690b7874e0cb5f5c903d3482b32

Urbanski, H. F. (2011). Role of circadian neuroendocrine rhythms in the control of behavior and physiology. *Neuroendocrinology*, 93(4), 211–222. <https://doi.org/10.1159/000327399>

Vaclavik, J., Sehonova, P., Hodkovicova, N., Vecerkova, L., Blahova, J., Franc, A., Marsalek, P., Mares, J., Tichy, F., Svobodova, Z., & Faggio, C. (2020). The effect of foodborne sertraline on rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Science of the Total Environment*, 708, 135082. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.135082>

- Valente, D., Costa-Amaral, I. C., Carvalho, L. V. B. de, Santos, M. V. C. dos, Castro, V. S. de, Rodrigues, D. del R. F., Falco, A. De, Silva, C. B., Nogueira, S. M., Gonçalves, E. S., Moreira, J. C., André, L. C., Teixeira, L. R., Sarcinelli, P. de N., Sisenando, H. A., Oliveira, M. S. de, Perini, J. A., Mattos, R. de C. O. da C., & Larentis, A. L. (2017). Utilização de biomarcadores de genotoxicidade e expressão gênica na avaliação de trabalhadores de postos de combustíveis expostos a vapores de gasolina. *Revista Brasileira de Saúde Ocupacional*, 42(suppl 1), 1–21. <https://doi.org/10.1590/2317-6369000124415>
- Valenti, T. W., Pilar Perez-hurtado, I., Kevin Chambliss, C., & Brooks, B. W. (2009). Aquatic toxicity of sertraline to *Pimephales promelas* at environmentally relevant surface water pH. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 28(12), 2685–2694. <https://doi.org/10.1897/08-546.1>.
- van den Ingh, T. S. G. A. M., Krogdahl, Å., Olli, J. J., Hendriks, H. G. C. J. M., & Koninkx, J. G. J. F. (1991). Effects of soybean-containing diets on the proximal and distal intestine in Atlantic salmon (*Salmo salar*): a morphological study. *Aquaculture*, 94(4), 297–305. [https://doi.org/10.1016/0044-8486\(91\)90174-6](https://doi.org/10.1016/0044-8486(91)90174-6)
- van der Ven, K., Keil, D., Moens, L. N., Hummelen, P. Van, van Remortel, P., Maras, M., & De Coen, W. (2006). Effects of the antidepressant mianserin in zebrafish: Molecular markers of endocrine disruption. *Chemosphere*, 65(10), 1836–1845. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2006.03.079>
- van Schmidt, N. D., Cary, T. L., Ortiz-Santaliestra, M. E., & Karasov, W. H. (2012). Effects of chronic polybrominated diphenyl ether exposure on gonadal development in the northern leopard frog, *Rana pipiens*. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 31(2), 347–354. <https://doi.org/10.1002/etc.1702>
- Vasskog, T., Anderssen, T., Pedersen-Bjergaard, S., Kallenborn, R., & Jensen, E. (2008). Occurrence of selective serotonin reuptake inhibitors in sewage and receiving waters at Spitsbergen and in Norway. *Journal of Chromatography A*, 1185(2), 194–205. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2008.01.063>
- Velarde, E., Delgado, M. J., & Alonso-Gómez, A. L. (2010). Serotonin-induced contraction in isolated intestine from a teleost fish (*Carassius auratus*): Characterization and interactions with melatonin. *Neurogastroenterology and Motility*, 22(12), 364–373. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2982.2010.01605.x>
- Venkatakrishnan, K., Von Moltke, L. L., & Greenblatt, D. J. (2000). Effects of the antifungal agents on oxidative drug metabolism. Clinical relevance. *Clinical Pharmacokinetics*, 38(2), 111–180. <https://doi.org/10.2165/00003088-200038020-00002>
- Ventura, A. L. M., Abreu, P. A., Freitas, R. C. C., Sathler, P. C., Loureiro, N., & Castro, H. C. (2010). Cholinergic system: Revisiting receptors, regulation and the relationship with Alzheimer disease, schizophrenia, epilepsy and smoking. *Archives of Clinical Psychiatry*, 37(2), 66–72. <https://doi.org/10.1590/S0101-60832010000200007>

- Vera, L. M., Cairns, L., Sanchez-Vazquez, F. J., & Migaud, H. (2009). Circadian rhythms of locomotor activity in the Nile tilapia *Oreochromis niloticus*. *Chronobiology International*, 26(4), 666–681. <https://doi.org/10.1080/07420520902926017>
- Volpato, G. L. (2007). Considerações metodológicas sobre os testes de preferência na avaliação do bem-estar em peixes Methodological concerns on preference tests for assessment of fish welfare. *Revista Brasileira de Zootecnia*, 36(Suplemento especial), 53–61. <https://doi.org/https://doi.org/10.1590/S1516-35982007001000006>.
- Veras, G. C., Murgas, L. D. S., Zangeronimo, M. G., Oliveira, M. M., Rosa, P. V., & Felizardo, V. O. (2013). *Biological Rhythms and Photoperiod in Fish*. *Arch. Zootec*, 62(R), 25–43. <http://repositorio.ufla.br/jspui/handle/1/39204>
- Walker, C. H., Hopkin, S.P., Sibly, R.M., Peakall, D.B. (2006) Principles of ecotoxicology. 3. ed. New York: CRC Press.
- Walker, C. H. (1998). Biomarker strategies to evaluate the environmental effects of chemicals. *Environmental Health Perspectives*, 106(SUPPL. 2), 613–620. <https://doi.org/10.1289/ehp.98106613>
- Wang, J., Zhang, P., Shen, Q., Wang, Q., Liu, D., Li, J., & Wang, L. (2013). The effects of cadmium exposure on the oxidative state and cell death in the gill of freshwater crab *Sinopotamon henanense*. *PLoS ONE*, 8(5), 1–9. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0064020>
- Wang, L., Yang, Y., Chen, S., Ge, M., He, J., Yang, Z., Lin, P., & Wu, X. (2018). White matter integrity correlates with residual consciousness in patients with severe brain injury. *Brain Imaging and Behavior*, 12(6), 1669–1677. <https://doi.org/10.1007/s11682-018-9832-1>
- Wang, S.-M., Han, C., Bahk, W.-M., Lee, S.-J., Patkar, A. A., Masand, P. S., & Pae, C.-U. (2018). Addressing the side effects of contemporary antidepressant drugs: a comprehensive review. *Chonnam Medical Journal*, 54(2), 101–112. <https://doi.org/10.4068/cmj.2018.54.2.101>
- Warner, R. E., Peterson, K. K., & Borgman, L. (1966). Behavioural pathology in fish: a quantitative study of sublethal pesticide toxication. *The Journal of Applied Ecology*, 3, 223–247. <https://doi.org/10.2307/2401462>
- Weber, D. N., Russo, A., Seale, D. B., & Spieler, R. E. (1991). Waterborne lead affects feeding neurotransmitter levels of juvenile fathead minnows (*Pimephales promelas*). *Aquatic Toxicology*, 21(1–2), 71–80. [https://doi.org/10.1016/0166-445X\(91\)90006-U](https://doi.org/10.1016/0166-445X(91)90006-U)
- Wells, P. R., & Pinder, A. W. (1996). The respiratory development of Atlantic salmon: I. Morphometry of gills, yolk sac and body surface. *Journal of Experimental Biology*, 199(12), 2725–2736.
- WHO Library Cataloguing-in-Publication Data. (2012). Pharmaceuticals in drinking-water. https://www.who.int/water_sanitation_health/publications/2012/pharmaceuticals/en/

- Wichniak, A., Wierzbicka, A., Walęcka, M., & Jernajczyk, W. (2017). Effects of Antidepressants on Sleep. *Current Psychiatry Reports*, 19(9), 1–7. <https://doi.org/10.1007/s11920-017-0816-4>
- Wigner, P., Synowiec, E., Czarny, P., Bijak, M., Józwiak, P., Szemraj, J., Gruca, P., Papp, M., & Śliwiński, T. (2020). Effects of venlafaxine on the expression level and methylation status of genes involved in oxidative stress in rats exposed to a chronic mild stress. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 24(10), 5675–5694. <https://doi.org/10.1111/jcmm.15231>
- Wolf, J. C. (2018). Comparing apples and oranges and pears and kumquats: The misuse of index systems for processing histopathology data in fish toxicological bioassays. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 37(6), 1688–1695. <https://doi.org/10.1002/etc.4117>
- Wolf, J. C., Baumgartner, W. A., Blazer, V. S., Camus, A. C., Engelhardt, J. A., Fournie, J. W., Frasca, S., Groman, D. B., Kent, M. L., Khoo, L. H., Law, J. M., Lombardini, E. D., Ruehl-Fehlert, C., Segner, H. E., Smith, S. A., Spitsbergen, J. M., Weber, K., & Wolfe, M. J. (2015). Nonlesions, misdiagnoses, missed diagnoses, and other interpretive challenges in fish histopathology studies: a guide for investigators, authors, reviewers, and readers. *Toxicologic Pathology*, 43(3), 297–325. <https://doi.org/10.1177/0192623314540229>
- Wolf, J. C., & Wheeler, J. R. (2018). A critical review of histopathological findings associated with endocrine and non-endocrine hepatic toxicity in fish models. *Aquatic Toxicology*, 197, 60–78. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2018.01.013>
- Wolf, J. C., & Wolfe, M. J. (2005). A brief overview of nonneoplastic hepatic toxicity in fish. *Toxicologic Pathology*, 33(1), 75–85. <https://doi.org/10.1080/01926230590890187>
- Wu, C., Spongberg, A. L., Witter, J. D., & Sridhar, B. B. M. (2012). Transfer of wastewater associated pharmaceuticals and personal care products to crop plants from biosolids treated soil. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 85, 104–109. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2012.08.007>
- 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. *Aquatic Toxicology*, 192, 274–283. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2017.09.027>
- Wu, S., Li, X., Liu, X., Yang, G., An, X., Wang, Q., & Wang, Y. (2018). Joint toxic effects of triazophos and imidacloprid on zebrafish (*Danio rerio*). *Environmental Pollution*, 235, 470–481. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2017.12.120>
- Xie, Z., Lu, G., Li, S., Nie, Y., Ma, B., & Liu, J. (2015). Behavioral and biochemical responses in freshwater fish *Carassius auratus* exposed to sertraline. *Chemosphere*, 135, 146–155. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2015.04.031>

- Xu, J., Wei, D., Wang, F., Bai, C., & Du, Y. (2020). Bioassay: A useful tool for evaluating reclaimed water safety. *Journal of Environmental Sciences (China)*, 88, 165–176. <https://doi.org/10.1016/j.jes.2019.08.014>
- Yadav, A., Gopesh, A., S. Pandey, R., Rai, D. K., & Sharma, B. (2007). Fertilizer industry effluent induced biochemical changes in fresh water teleost, *Channa striatus* (Bloch). *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 79(6), 588–595. <https://doi.org/10.1007/s00128-007-9294-4>
- Yang, M., Ren, B., Qiao, L., Ren, B., Hu, Y., Zhao, R., Ren, Z., & Du, J. (2018). Behavior responses of zebrafish (*Danio rerio*) to aquatic environmental stresses in the characteristic of circadian rhythms. *Chemosphere*, 210, 129–138. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2018.07.018>
- Yang, M., Qiu, W., Chen, J., Zhan, J., Pan, C., Lei, X., & Wu, M. (2014). Growth inhibition and coordinated physiological regulation of zebrafish (*Danio rerio*) embryos upon sublethal exposure to antidepressant amitriptyline. *Aquatic Toxicology*, 151, 68–76. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2013.12.029>
- Yang, Y., Liu, W., Li, D., Qian, L., Fu, B., & Wang, C. (2017). Altered glycometabolism in zebrafish exposed to thifluzamide. *Chemosphere*, 183, 89–96. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2017.05.055>
- Yu, J., Wang, Y., Xiao, Y., Li, X., Xu, X., Zhao, H., Wu, L., & Li, J. (2021). Effects of chronic nitrate exposure on the intestinal morphology, immune status, barrier function, and microbiota of juvenile turbot (*Scophthalmus maximus*). *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 207, 111287. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2020.111287>
- Yu, J., Xu, E. G., Ren, Y., Jin, S., Zhang, T., Liu, J., & Li, Z. (2017). Mixture toxicity of bensulfuron-methyl and acetochlor to red swamp crayfish (*Procambarus clarkii*): Behavioral, morphological and histological effects. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 14(12), 1–15. <https://doi.org/10.3390/ijerph14121466>
- Yuan, S. Y., Cheng, C. L., Ho, H. C., Wang, S. S., Chiu, K. Y., Su, C. K., Ou, Y. C., & Lin, C. C. (2015). Nortriptyline induces mitochondria and death receptor-mediated apoptosis in bladder cancer cells and inhibits bladder tumor growth in vivo. *European Journal of Pharmacology*, 761, 309–320. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2015.06.007>
- Zagatto, P. A., Bertolotti, E. (2006). *Ecotoxicologia aquática: princípios e aplicações*. Editora Rima, São Carlos, SP. 478 p.
- Zenker, A., Cicero, M. R., Prestinaci, F., Bottoni, P., & Carere, M. (2014). Bioaccumulation and biomagnification potential of pharmaceuticals with a focus to the aquatic environment. *Journal of Environmental Management*, 133, 378–387. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2013.12.017>

- Zhang, M., Cao, G., Guo, X., Gao, Y., Li, W., & Lu, D. (2018). A Comet assay for DNA damage and repair after exposure to carbon-ion beams or X-rays in *Saccharomyces cerevisiae*. *Dose-Response: An International Journal*, 16(3), 1–9. <https://doi.org/10.1177/1559325818792467>
- Zheng, X., Zhang, K., Zhao, Y., & Fent, K. (2021). Environmental chemicals affect circadian rhythms: An underexplored effect influencing health and fitness in animals and humans. *Environment International*, 149, 106159. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2020.106159>
- Zhu, J. J., Xu, Y. Q., He, J. H., Yu, H. P., Huang, C. J., Gao, J. M., Dong, Q. X., Xuan, Y. X., & Li, C. Q. (2014). Human cardiotoxic drugs delivered by soaking and microinjection induce cardiovascular toxicity in zebrafish. *Journal of Applied Toxicology*, 34(2), 139–148. <https://doi.org/10.1002/jat.2843>
- Ziarrusta, H., Mijangos, L., Prieto, A., Etxebarria, N., Zuloaga, O., & Olivares, M. (2016). Determination of tricyclic antidepressants in biota tissue and environmental waters by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 408(4), 1205–1216. <https://doi.org/10.1007/s00216-015-9224-y>
- Zlatković, J., Todorović, N., Tomanović, N., Bošković, M., Djordjević, S., Lazarević-Pašti, T., Bernardi, R. E., Djurdjević, A., & Filipović, D. (2014). Chronic administration of fluoxetine or clozapine induces oxidative stress in rat liver: A histopathological study. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 59(1), 20–30. <https://doi.org/10.1016/j.ejps.2014.04.010>
- Zottis, A. D. (2005). Uso de biomarcadores de estresse oxidativo no diagnóstico ambiental em ostra, *Crassostrea gigas* e mexilhão, *Perna perna* de malacocultura da ilha de Santa Catarina [Universidade Federal de Santa Catarina]. <https://repositorio.ufsc.br/handle/123456789/102357>
- Zuccato, E., Castiglioni, S., Bagnati, R., Melis, M., & Fanelli, R. (2010). Source, occurrence and fate of antibiotics in the Italian aquatic environment. *Journal of Hazardous Materials*, 170, 1–3. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2010.03.110>
- Zvezdin, A. O., Pavlov, D. S., Kucheryavyy, A. V., & Tsimbalov, I. A. (2019). Circadian rhythms and locomotor activity of smolts of the european river *Lamprey lampetra fluviatilis* (L.). *Doklady Biological Sciences*, 484(1), 16–18. <https://doi.org/10.1134/S0012496619010034>

9. ANEXO

Tabela 1. Genes diferencialmente expressos na comparação da concentração de 0,1 µg/L de NTP com o controle.

ID do transcrito	0,1 µg/L NTP Avg (log2)	Controle Avg (log2)	Fold Change	p-valor	Gene (símbolo)	Gene (descrição)
13028076	4.56	5.95	-2.62	0.0058	<i>si:ch211-181d7.1</i>	<i>si:ch211-181d7.1</i>
13028086	4.52	5.87	-2.54	0.0034	<i>si:ch211-181d7.3</i>	<i>si:ch211-181d7.3</i>
13105945	6.17	7.35	-2.27	0.0209	<i>fosab</i>	<i>v-fos FBJ murine osteosarcoma viral oncogene homolog Ab</i>
13119789	3.71	4.8	-2.13	0.0128	<i>LOC103909502</i>	<i>uncharacterized LOC103909502</i>
13007367	3.58	4.65	-2.09	0.0283	<i>pcdh2aa1</i>	<i>protocadherin 2 alpha a 1</i>
13176186	1.77	2.79	-2.02	0.0028	<i>ighv8-3</i>	<i>immunoglobulin heavy variable 8-3</i>
13187989	3.89	4.87	-1.97	0.046	<i>LOC103910439</i>	<i>uncharacterized LOC103910439</i>
13162495	1.97	2.94	-1.96	0.0212	<i>cox5aa</i>	<i>cytochrome c oxidase subunit Vaa</i>
13255131	3.7	4.64	-1.92	0.041	<i>tbc1d10aa</i>	<i>TBC1 domain family, member 10Aa</i>
13015447	6.81	7.72	-1.88	0.0058	<i>npas4a</i>	<i>neuronal PAS domain protein 4a</i>
13183224	1.84	2.73	-1.86	0.0375	<i>znf1140</i>	<i>zinc finger protein 1140</i>
13112541	3.17	4.06	-1.85	0.0408	<i>wu:fc47d12</i>	<i>wu:fc47d12</i>
13194960	3.58	4.45	-1.83	0.0158	<i>lox12b</i>	<i>lysyl oxidase-like 2b</i>
13225025	3.4	4.24	-1.8	0.0139	<i>slc12a10.3</i>	<i>slc12a10.3 solute carrier family 12 (sodium/potassium /chloride transporters), member 10, tandem duplicate 3</i>
12993549	1.78	2.62	-1.79	0.0149	<i>LOC100005948</i>	<i>uncharacterized LOC100005948</i>
13143256	6.29	7.12	-1.78	0.0297	<i>zgc:175128</i>	<i>zgc:175128</i>

13007371	3.6	4.36	-1.69	0.006 1	LOC100535907	uncharacterized LOC100535907
13184164	3.67	4.4	-1.67	0.003 5	LOC103910881	uncharacterized LOC103910881
13182857	1.9	2.64	-1.66	0.003 3	si:dkeyp- 89c11.1	si:dkeyp-89c11.1
13066286	3.51	4.22	-1.64	0.039 9	btr29	bloodthirsty- related gene family, member 29
13169437	1.95	2.67	-1.64	0.024	il4r.1	interleukin 4 receptor, tandem duplicate 1
13000824	1.95	2.65	-1.63	0.010 8	si:ch211- 233m11.1	si:ch211- 233m11.1
13007436	4.09	4.79	-1.62	0.002 2	pcdh2ab7	protocadherin 2 alpha b 7
13207913	2.89	3.57	-1.6	0.041 7	si:rp71-36n21.1	si:rp71-36n21.1
12951779	2.73	3.4	-1.59	0.000 9	si:dkey- 222h21.8	si:dkey-222h21.8
13201622	5.34	5.99	-1.58	0.012	me2	malic enzyme 2, NAD(+)- dependent, mitochondrial
12982419	3.16	3.79	-1.55	0.027 8	LOC792903	recoverin-like
13112751	2.88	3.48	-1.51	0.013 8	zgc:136410	zgc:136410
13163667	1.78	2.37	-1.5	0.030 3	si:dkey- 234i14.9	si:dkey-234i14.9
12993278	4.88	4.29	1.51	0.015 2	si:ch211- 221j21.3	si:ch211-221j21.3
13191337	4.93	4.33	1.52	0.000 7	LOC101885466	uncharacterized LOC101885466;
					LOC101886157	uncharacterized LOC101886157;
					LOC101885907	uncharacterized LOC101885907;
					LOC103911615	uncharacterized LOC103911615
13255312	4.93	4.33	1.52	0.000 7	LOC101885466	uncharacterized LOC101885466;
					LOC101886157	uncharacterized LOC101886157;
					LOC101885907	uncharacterized LOC101885907;
					LOC103911615	uncharacterized LOC103911615
13096326	6.12	5.52	1.52	0.012 1	serpinb12	serpin peptidase inhibitor, clade B

13007403	7.18	6.56	1.54	0.030 9	<i>pcdh2ab11</i>	(ovalbumin), member 1, like 2 protocadherin 2 alpha b 11
13007360	6.87	6.24	1.55	0.003 6	<i>LOC100537710</i>	protocadherin beta-15-like
12969960	5.81	5.18	1.55	0.039 9	<i>smad9</i>	SMAD family member 9
13190865	5.49	4.85	1.56	0.032 4	<i>LOC101883574</i>	sterile alpha motif domain-containing protein 3-like
13178368	6.73	6.08	1.56	0.010 9	<i>soul5</i>	heme-binding protein soul5
13101458	4.74	4.09	1.57	0.002 2	<i>si:ch211- 223m11.2</i>	<i>si:ch211- 223m11.2</i>
13060975	4.06	3.41	1.57	0.022 9	<i>si:dkey- 151j17.4</i>	<i>si:dkey-151j17.4</i>
13119470	3.62	2.98	1.57	0.038 3	<i>si:dkey-20i20.2</i>	<i>si:dkey-20i20.2</i>
13191025	3.08	2.42	1.57	0.016 5	<i>znf1064</i>	zinc finger protein 1064
13156651	3.65	2.98	1.58	0.018	<i>cplx3a</i>	complexin 3a
13054893	2.38	1.71	1.59	0.008 5	<i>si:ch211- 235i11.6</i>	<i>si:ch211-235i11.6</i>
13090369	3.03	2.35	1.6	0.014 4	<i>tcra-v54</i>	Ig kappa chain V- III region POM
12948236	2.42	1.74	1.6	0.026 9	<i>zgc:172122</i>	<i>zgc:172122</i>
13143979	5.54	4.86	1.61	0.002 6	<i>LOC101882553</i> ; <i>LOC103910397</i>	sterile alpha motif domain-containing protein 3-like; uncharacterized <i>LOC103910397</i>
13130511	6.15	5.46	1.61	0.013 6	<i>si:dkey-87i10.3</i>	<i>si:dkey-87i10.3</i>
13124494	8.44	7.74	1.62	0.012	<i>cp</i>	ceruloplasmin novel immune-type receptor 3d; novel immune-type receptor 3b
13226499	2.98	2.28	1.62	0.019 3	<i>nitr3d; nitr3b</i>	novel immune-type receptor 3d; novel immune-type receptor 3b
13130523	5.55	4.83	1.64	0.002 2	<i>si:dkey-87i10.3</i>	<i>si:dkey-87i10.3</i>
13236428	4.15	3.42	1.66	0.012 2	<i>LOC101885004</i> ; <i>LOC103911378</i>	uncharacterized <i>LOC101885004</i> ; uncharacterized <i>LOC103911378</i>
13062964	4.27	3.53	1.67	0.049 1	<i>has3</i>	hyaluronan synthase 3
13190169	8.55	7.8	1.68	0.038 2	<i>zgc:171859</i>	<i>zgc:171859</i>

13225202	2.97	2.2	1.7	0.013 1	<i>si:dkey-28d5.13</i>	<i>si:dkey-28d5.13</i>
13007424	5.58	4.8	1.71	0.001 9	<i>pcdh2aa15</i>	<i>protocadherin 2 alpha a 15</i>
13130520	6.28	5.5	1.71	0.007 8	<i>si:dkey-87i10.3</i>	<i>si:dkey-87i10.3</i>
13171672	4.55	3.76	1.72	0.012 2	<i>LOC100005864</i>	<i>GTPase IMAP family member 8- like</i>
13191160	6.03	5.24	1.72	0.009	<i>LOC101882526</i>	<i>uncharacterized LOC101882526</i>
13132814	1.86	1.05	1.76	0.005 6	<i>LOC101882328</i>	<i>myosin-7B-like</i>
12975142	5.27	4.43	1.8	0.007 9	<i>alpl</i>	<i>alkaline phosphatase, liver/bone/kidney</i>
13022170	3.56	2.67	1.86	0.006 1	<i>wu:fb15h11</i>	<i>wu:fb15h11</i>
13106190	5.7	4.65	2.06	0.011 9	<i>LOC103911806</i>	<i>uncharacterized LOC103911806</i>
13260131	5.98	4.76	2.32	0.005 7	<i>si:ch211- 284a16.2</i>	<i>si:ch211-284a16.2</i>
13084587	3.91	2.69	2.34	0.006 6	<i>LOC101884471</i>	<i>SLAM family member 9-like</i>
13267184	5.56	4.22	2.54	0.005 8	<i>si:ch73-7i4.2</i>	<i>si:ch73-7i4.2</i>

Tabela 2. Genes diferencialmente expressos na comparação da concentração de 10 µg/L de NTP com o controle.

ID do transcrito	10 µg/L NTP Avg (log2)	Controle Avg (log2)	Fold Change	p-valor	Gene (símbolo)	Gene (descrição)
13028086	4.38	5.87	-2.8	0.0037	<i>si:ch211-181d7.3</i>	<i>si:ch211-181d7.3</i>
13028076	4.52	5.95	-2.69	0.0046	<i>si:ch211-181d7.1</i>	<i>si:ch211-181d7.1</i>
13175923	4.63	5.93	-2.48	0.0007	<i>aoc2</i>	<i>amine oxidase, copper containing 2</i>
13244667	2.05	3.32	-2.42	0.0206	<i>LOC103911497</i>	<i>uncharacterized LOC103911497</i>
13135722	2.81	4.07	-2.41	0.0469	<i>hoxc5a</i>	<i>homeobox C5a CKLF-like MARVEL</i>
13041111	2.72	3.93	-2.3	0.0472	<i>cmtm6</i>	<i>transmembrane domain containing 6</i>
13104088	6.14	7.31	-2.25	0.0361	<i>si:dkey-65b13.9</i>	<i>si:dkey-65b13.9</i>

13105654	6.94	8.03	-2.12	0.0499	<i>laptm4a</i>	lysosomal protein transmembrane 4 alpha lectin,
13178863	5.55	6.64	-2.12	0.0071	<i>lgals3bpb</i>	galactoside- binding, soluble, 3 binding protein b toll-like receptor
13260288	1.67	2.74	-2.1	0.0001	<i>tlr20.2</i>	20, tandem duplicate 2
13203420	5.27	6.27	-2.01	6.30E- 05	<i>LOC1018820 78</i>	uncharacterized <i>LOC101882078</i> <i>slc12a10.3</i> solute carrier family 12
13225025	3.23	4.24	-2.01	0.0024	<i>slc12a10.3</i>	(sodium/potassiu m/chloride transporters) member 10, tandem duplicate 3
13135344	7.32	8.32	-1.99	0.0295	<i>cd63</i>	CD63 molecule gastrula zinc finger protein
13184709	3.11	4.1	-1.99	0.0246	<i>LOC1039107 87</i>	<i>XICGF57.1</i> -like <i>finTRIM</i> family, member 19
13092326	3.59	4.55	-1.95	0.0206	<i>ftr19</i>	von Willebrand factor A domain containing 7
13059932	3.72	4.67	-1.94	0.0125	<i>vwa7</i>	adrenoceptor beta 2, surface a coiled-coil domain-
13016231	4.04	4.97	-1.91	0.0044	<i>adrb2a</i>	containing protein 106-like histone H2A;
12955701	3.55	4.49	-1.91	0.0001	<i>LOC1018829 55</i>	nascent polypeptide- associated complex subunit alpha, muscle-specific form-like
13233449	5.92	6.84	-1.9	0.0032	<i>LOC1001485 91; LOC1003294 23</i>	<i>si:ch211- 233m11.1</i>
13000824	1.73	2.65	-1.9	0.0059	<i>si:ch211- 233m11.1</i>	<i>si:ch211- 233m11.1</i>
13108460	2.62	3.52	-1.87	0.0049	<i>cd8a</i>	CD8a molecule cytochrome c oxidase subunit VIc
13216913	8.19	9.09	-1.87	0.023	<i>cox6c</i>	

13157417	4.21	5.11	-1.86	0.0129	<i>slc13a1</i>	<i>solute carrier family 13 (sodium/sulphate symporters), member 1</i>
13083160	4.83	5.71	-1.85	0.0016	<i>cbln13</i>	<i>cerebellin 13</i>
13235528	6.03	6.92	-1.85	0.0065	<i>fcrlg</i>	<i>Fc fragment of IgE, high affinity I, receptor for; gamma polypeptide</i>
13196962	5.5	6.38	-1.84	0.0122	<i>cxcl13</i>	<i>chemokine (C-X-C motif) ligand 13</i>
13210309	3.37	4.24	-1.83	0.0192	<i>aldh2.2; aldh2.1</i>	<i>aldehyde dehydrogenase 2 family (mitochondrial), tandem duplicate 2; aldehyde dehydrogenase 2 family (mitochondrial), tandem duplicate 1</i>
13084395	4.4	5.26	-1.81	0.0395	<i>si:ch211-165b10.3</i>	<i>si:ch211-165b10.3</i>
13159542	7.31	8.16	-1.8	0.0082	<i>fads2</i>	<i>fatty acid desaturase 2</i>
13076750	5.45	6.3	-1.8	0.0193	<i>grn1</i>	<i>granulin 1</i>
13249283	3.69	4.53	-1.8	0.0338	<i>zgc:77112</i>	<i>zgc:77112</i>
13041105	4.25	5.09	-1.79	0.003	<i>cmtm6</i>	<i>CKLF-like MARVEL transmembrane domain containing 6</i>
13119280	2.38	3.22	-1.79	0.0092	<i>zgc:171318</i>	<i>zgc:171318</i>
13245343	7.36	8.19	-1.77	0.0494	<i>sypa</i>	<i>synaptophysin a</i>
12944391	4.04	4.85	-1.76	0.0263	<i>cd2</i>	<i>CD2 molecule</i>
13041822	9.98	10.8	-1.76	0.0259	<i>gapdhs</i>	<i>glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, spermatogenic</i>
13265477	3.51	4.33	-1.76	0.0282	<i>si:dkey-103d23.5</i>	<i>si:dkey-103d23.5</i>
13151651	6.04	6.84	-1.75	0.0147	<i>ccl34b.1</i>	<i>chemokine (C-C motif) ligand 34b, duplicate 1</i>

13092640	4.19	5	-1.75	0.0015	<i>ccr12a</i>	<i>chemokine (C-C motif) receptor 12a</i>
13016105	5.69	6.5	-1.75	0.0075	<i>clic2</i>	<i>chloride intracellular channel 2</i>
12956529	3.56	4.37	-1.75	0.0184	<i>si:ch211-127n13.2</i>	<i>si:ch211-127n13.2</i>
13238529	8.88	9.68	-1.74	0.0089	<i>cd59</i>	<i>CD59 molecule, complement regulatory protein</i>
13237749	7.93	8.73	-1.73	0.0034	<i>cd81a</i>	<i>CD81 molecule a</i>
13242905	7.24	8.03	-1.73	0.0248	<i>LOC103911462</i>	<i>citron Rho-interacting kinase-like</i>
13035881	6.02	6.8	-1.72	0.0066	<i>cyp4t8</i>	<i>cytochrome P450, family 4, subfamily T, polypeptide 8</i>
13155410	7.64	8.42	-1.72	0.0247	<i>slc7a5</i>	<i>solute carrier family 7 (amino acid transporter light chain, L system), member 5</i>
13246528	6.55	7.31	-1.7	0.0102	<i>tmem189</i>	<i>transmembrane protein 189</i>
13252644	7.17	7.93	-1.69	0.0163	<i>gpr3711b</i>	<i>G protein-coupled receptor 37 like 1b</i>
13267794	4.98	5.73	-1.69	0.0221	<i>LOC101882851; LOC103911669</i>	<i>rho-associated protein kinase 1-like</i>
13072223	8.91	9.67	-1.69	0.0407	<i>si:ch211-133n4.4</i>	<i>si:ch211-133n4.4</i>
13105100	8.43	9.17	-1.68	0.0037	<i>clu</i>	<i>clusterin</i>
13194353	7.03	7.78	-1.68	0.0377	<i>gabarapa</i>	<i>GABA(A) receptor-associated protein a</i>
13109894	6.1	6.84	-1.68	0.0021	<i>neu3.5</i>	<i>sialidase 3 (membrane sialidase), tandem duplicate 5</i>
12960418	3.79	4.54	-1.68	0.024	<i>tor4aa</i>	<i>torsin family 4, member Aa</i>
13256483	8.01	8.74	-1.67	0.0364	<i>lgi3</i>	<i>leucine-rich repeat LGI family, member 3</i>

12952887	4.04	4.78	-1.67	0.001	<i>si:dkey-79f11.4</i>	<i>si:dkey-79f11.4</i>
13133976	5.82	6.55	-1.66	0.0136	<i>LOC101884450</i>	<i>uncharacterized LOC101884450</i>
13006039	5.1	5.83	-1.66	0.0239	<i>si:dkeyp-2e4.6</i>	<i>si:dkeyp-2e4.6</i>
13189292	7.33	8.06	-1.65	0.014	<i>atp5c1</i>	<i>ATP synthase, H+ transporting, mitochondrial F1 complex, gamma polypeptide 1</i>
13220129	5.52	6.24	-1.65	0.0334	<i>ephx4</i>	<i>epoxide hydrolase 4</i>
13007239	5.6	6.32	-1.65	0.0052	<i>hopx</i>	<i>HOP homeobox</i>
13112953	4.32	5.05	-1.65	0.0057	<i>wu:fj81e10</i>	<i>wu:fj81e10</i>
13095375	5.55	6.27	-1.65	0.0032	<i>zgc:193541</i>	<i>zgc:193541</i>
13244968	6.33	7.04	-1.64	0.0163	<i>magoh</i>	<i>mago homolog, exon junction complex core component</i>
13249546	4.78	5.49	-1.64	0.0173	<i>tmcc1</i>	<i>transmembrane and coiled-coil domain family 1</i>
13166416	4.3	5	-1.63	0.005	<i>arhgap27l</i>	<i>Rho GTPase activating protein 27, like</i>
13199490	5.08	5.79	-1.63	0.0362	<i>doc2b</i>	<i>double C2-like domains, beta</i>
13234239	4.5	5.21	-1.63	0.0137	<i>LOC565341</i>	<i>histone H1-like</i>
12958960	5.38	6.08	-1.63	0.0041	<i>si:ch211-286b5.5</i>	<i>si:ch211-286b5.5</i>
13238416	5.61	6.31	-1.63	0.0116	<i>slc7a10a</i>	<i>solute carrier family 7 (neutral amino acid transporter light chain, asc system), member 10a</i>
13126064	6.8	7.49	-1.62	0.0289	<i>LOC100334619</i>	<i>uncharacterized LOC100334619</i>
13267788	4.54	5.23	-1.62	0.0463	<i>LOC101882851; LOC103911669</i>	<i>rho-associated protein kinase 1-like</i>
13260335	5.19	5.88	-1.62	0.0218	<i>LOC101884148</i>	<i>rho-associated protein kinase 2-like</i>
13198013	7.03	7.71	-1.61	0.0202	<i>cox7c</i>	<i>cytochrome c oxidase, subunit VIIc</i>

13176428	6.11	6.8	-1.61	0.0051	<i>dctn5</i>	<i>dynactin 5</i>
13006815	6.07	6.75	-1.61	0.0147	<i>LOC562831</i>	<i>gamma-aminobutyric acid receptor subunit pi-like</i>
13113720	4.12	4.8	-1.61	0.0243	<i>LOC799156</i>	<i>proteinase-activated receptor 1-like</i>
13232426	5.56	6.25	-1.61	0.0258	<i>ostc</i>	<i>oligosaccharyltransferase complex subunit</i>
13236300	5.45	6.13	-1.61	0.0171	<i>ptgr1</i>	<i>prostaglandin reductase 1</i>
13160018	5.25	5.93	-1.61	0.0158	<i>si:ch211-286c4.6</i>	<i>si:ch211-286c4.6</i>
13032517	7.81	8.49	-1.6	0.0176	<i>acbd7</i>	<i>acyl-CoA binding domain containing 7</i>
13186193	8.34	9.02	-1.6	0.0281	<i>atp6v1e1b; cecr1b</i>	<i>ATPase, H⁺ transporting, lysosomal, VI subunit E1b; cat eye syndrome chromosome region, candidate 1b</i>
13187202	6.9	7.57	-1.6	0.0035	<i>podxl</i>	<i>podocalyxin-like</i>
12975431	6.12	6.79	-1.59	0.0023	<i>zgc:73111</i>	<i>zgc:73111</i>
13132860	7.03	7.69	-1.58	0.013	<i>cox4i2</i>	<i>cytochrome c oxidase subunit IV isoform 2</i>
13009959	4.64	5.3	-1.58	0.0268	<i>gm2a</i>	<i>GM2 ganglioside activator</i>
13086956	4.58	5.24	-1.58	0.0048	<i>gng12a</i>	<i>guanine nucleotide binding protein (G protein), gamma 12a</i>
13021088	6.72	7.39	-1.58	0.0084	<i>LOC101882500</i>	<i>uncharacterized LOC101882500</i>
13067244	1.41	2.07	-1.58	0.0238	<i>si:dkeyp-85e10.1</i>	<i>si:dkeyp-85e10.1</i>
13157500	4.39	5.05	-1.58	0.0169	<i>tmem17</i>	<i>transmembrane protein 17</i>
13090017	6.96	7.61	-1.57	0.0192	<i>atp6v0b</i>	<i>ATPase, H⁺ transporting, lysosomal V0 subunit b</i>
13013136	9.38	10.03	-1.57	0.0227	<i>cd74a</i>	<i>CD74 molecule, major</i>

13152854	8.18	8.83	-1.57	0.0114	<i>LOC570508</i>	<i>histocompatibility complex, class II invariant chain a novel pentaxin family domain containing protein</i>
13034573	9.23	9.88	-1.57	0.0044	<i>paqr6</i>	<i>progesterone and adiponectin receptor family member VI</i>
13226808	5.03	5.69	-1.57	0.0194	<i>wu:fb66f03</i>	<i>wu:fb66f03</i>
13000793	5.61	6.27	-1.57	0.0255	<i>wu:fj16a03</i>	<i>wu:fj16a03</i>
12999753	5.66	6.31	-1.57	0.0182	<i>zgc:158387</i>	<i>zgc:158387</i>
12948909	7.3	7.95	-1.57	0.0344	<i>zgc:56493</i>	<i>zgc:56493</i>
13176242	1.76	2.4	-1.56	0.0108	<i>ighv4-3; ighv4-6</i>	<i>immunoglobulin heavy variable 4-3; immunoglobulin heavy variable 4-6</i>
13140211	6.07	6.71	-1.56	0.0241	<i>sdf4</i>	<i>stromal cell derived factor 4</i>
13244524	1.35	1.99	-1.56	0.0123	<i>si:ch211-232d19.4</i>	<i>si:ch211-232d19.4</i>
12951452	1.54	2.19	-1.56	0.0159	<i>zgc:171452</i>	<i>zgc:171452</i>
13027185	4.23	4.86	-1.55	0.0022	<i>agmo</i>	<i>alkylglycerol monooxygenase</i>
13059017	3.64	4.27	-1.55	4.00E-05	<i>cyba</i>	<i>cytochrome b-245, alpha polypeptide family with</i>
13114161	9.36	9.99	-1.55	0.0109	<i>fam219aa</i>	<i>sequence similarity 219, member Aa</i>
13173240	7.37	8	-1.55	0.0334	<i>LOC798483</i>	<i>proline-rich transmembrane protein 2-like major</i>
13247429	7.14	7.78	-1.55	0.0069	<i>mhc2dab; zgc:123077; zgc:152682; si:busm1-266f07.1</i>	<i>histocompatibility complex class II DAB gene, zgc:123077; zgc:152682; si:busm1-266f07.1</i>
12985426	2.76	3.38	-1.54	0.0097	<i>capgb</i>	<i>capping protein (actin filament), gelsolin-like b</i>
13110895	6.42	7.04	-1.54	0.0069	<i>cox8a</i>	<i>cytochrome c oxidase subunit VIIIA (ubiquitous)</i>

13044501	8.9	9.52	-1.54	0.028	<i>fabp7a</i>	<i>fatty acid binding protein 7, brain, a</i>
13062359	5.58	6.2	-1.54	0.0124	<i>LOC101883206</i>	<i>uncharacterized LOC101883206</i>
13181782	3.16	3.78	-1.54	0.0065	<i>LOC101884897</i>	<i>uncharacterized LOC101884897</i>
12970635	6.02	6.64	-1.53	0.0491	<i>ei24</i>	<i>etoposide induced 2.4</i>
13225226	1.67	2.28	-1.53	0.0007	<i>LOC103911331</i>	<i>P-selectin-like novel protein similar to vertebrate valosin-containing protein (VCP) major</i>
13140463	4.46	5.07	-1.52	0.0079	<i>LOC565541</i>	<i>histocompatibility complex class I ZDA, major histocompatibility complex class I ZE gene</i>
12957792	7.8	8.4	-1.52	0.0385	<i>mhc1zda; mhc1ze</i>	<i>histocompatibility complex class I ZDA, major histocompatibility complex class I ZE gene</i>
13141092	4.91	5.51	-1.52	0.0416	<i>sst6</i>	<i>somatostatin 6</i>
13236583	4.92	5.53	-1.52	0.0334	<i>zgc:92664</i>	<i>zgc:92664 keratinocyte associated protein 2</i>
13031573	5.37	5.97	-1.51	0.0456	<i>krtcap2</i>	<i>keratinocyte associated protein 2</i>
13014824	4.52	5.11	-1.51	0.0278	<i>LOC100538111</i>	<i>uncharacterized LOC100538111</i>
13232257	3.03	3.62	-1.51	0.032	<i>LOC103911430</i>	<i>uncharacterized LOC103911430</i>
13032963	3.93	4.52	-1.51	0.0313	<i>LOC561000</i>	<i>tumor necrosis factor receptor superfamily member 5-like myxovirus (influenza virus) resistance E</i>
13267973	3.02	3.62	-1.51	0.0269	<i>mxe</i>	<i>(influenza virus) resistance E</i>
12964696	3.72	4.32	-1.51	0.0024	<i>si:ch211-215a9.5</i>	<i>si:ch211-215a9.5</i>
13261201	3.42	4.02	-1.51	0.0012	<i>si:dkey-216e24.9</i>	<i>si:dkey-216e24.9</i>
13250212	6.73	7.32	-1.51	0.0203	<i>tmem230b</i>	<i>transmembrane protein 230b vacuolar protein sorting 29 homolog (S. cerevisiae)</i>
13109065	7.23	7.82	-1.51	0.0251	<i>vps29</i>	<i>sorting 29 homolog (S. cerevisiae)</i>

13176352	5.05	5.64	-1.51	0.0497	<i>znfl1</i>	zinc finger-like gene 1
13166677	4.27	4.85	-1.5	0.048	<i>hoxb3a</i>	homeobox B3a
13162070	7.98	8.57	-1.5	0.0398	<i>ldha</i>	lactate dehydrogenase A4
13221589	5.29	5.88	-1.5	0.0219	<i>rgs4</i>	regulator of G-protein signaling 4
13004157	9.75	10.34	-1.5	0.0328	<i>rtn1a</i>	reticulon 1a
13110402	7.81	8.4	-1.5	0.0245	<i>si:dkey-17e16.10</i>	<i>si:dkey-17e16.10</i>
13095959	1.72	1.14	1.5	0.0235	<i>cyp2p9</i>	cytochrome P450, family 2, subfamily P, polypeptide 9
12973217	3.8	3.21	1.5	0.0057	<i>zgc:91850</i>	<i>zgc:91850</i>
12973260	6.63	6.04	1.51	0.0024	<i>LOC100004867</i>	E3 ubiquitin-protein ligase RBBP6-like
13232967	1.75	1.15	1.51	0.0054	<i>LOC100007225</i>	extracellular calcium-sensing receptor-like
13172570	4.58	3.98	1.51	0.0375	<i>LOC100334716</i>	interferon-induced guanylate-binding protein 2-like
13206252	4.33	3.72	1.53	0.0439	<i>ckma</i>	creatine kinase, muscle a
13148018	2.37	1.76	1.53	0.0078	<i>LOC100005096</i>	uncharacterized
13266883	4.74	4.12	1.53	0.015	<i>LOC101882121</i> ; <i>LOC103910242</i> ; <i>LOC103911384</i> ; <i>LOC103911826</i>	<i>LOC101882121</i> ; uncharacterized <i>LOC103910242</i> ; uncharacterized <i>LOC103911384</i> ; uncharacterized <i>LOC103911826</i>
13182998	1.69	1.07	1.53	0.0049	<i>tnni1d</i>	troponin I, skeletal, slow d
13184570	3.79	3.16	1.54	0.0434	<i>LOC101882767</i> ; <i>LOC103910242</i> ; <i>LOC103911101</i> ; <i>LOC103911682</i> ; <i>LOC103911826</i> ;	uncharacterized <i>LOC101882767</i>
13251422	5.21	4.58	1.55	0.0084	<i>LOC103911682</i> ; <i>LOC103911826</i> ;	uncharacterized <i>LOC103910242</i> ; uncharacterized <i>LOC103911101</i> ;

					<i>LOC103912008</i>	
					<i>LOC103911384;</i>	<i>uncharacterized</i>
					<i>LOC103911481</i>	<i>uncharacterized</i>
					<i>LOC103911682;</i>	<i>uncharacterized</i>
					<i>LOC103911826</i>	<i>uncharacterized</i>
					<i>LOC103912008</i>	<i>uncharacterized</i>
12965348	1.72	1.09	1.55	0.0003	<i>taar19b</i>	<i>trace amine associated receptor 19b</i>
13035348	2.86	2.19	1.58	0.0379	<i>LOC101886815</i>	<i>serine/threonine-protein kinase pim-2-like</i>
13177460	2.47	1.8	1.59	0.0223	<i>cyp3c2</i>	<i>cytochrome P450, family 3, subfamily c, polypeptide 2</i>
13143517	5.32	4.65	1.6	0.005	<i>LOC100334952</i>	<i>piezo-type mechanosensitive ion channel component 2-like</i>
13233846	2.35	1.67	1.6	0.03	<i>si:dkey-88n24.7</i>	<i>si:dkey-88n24.7</i>
13095944	3.43	2.74	1.61	0.0126	<i>cyp2p7</i>	<i>cytochrome P450, family 2, subfamily P, polypeptide 7</i>
13086597	5.08	4.39	1.61	0.014	<i>LOC100001550</i>	<i>uncharacterized</i>
13090369	3.03	2.35	1.61	0.0183	<i>tcrav54</i>	<i>Ig kappa chain V-III region POM</i>
13031301	3.57	2.88	1.62	0.0175	<i>hoxa9b</i>	<i>homeobox A9b</i>
13254921	3.51	2.81	1.62	0.0368	<i>LOC101886492;</i>	<i>uncharacterized</i>
					<i>LOC103909581;</i>	<i>uncharacterized</i>
					<i>LOC103911546</i>	<i>uncharacterized</i>
13198822	4.05	3.35	1.63	0.0058	<i>si:ch211-202f5.3</i>	<i>si:ch211-202f5.3</i>
12948236	2.45	1.74	1.63	0.0268	<i>zgc:172122</i>	<i>zgc:172122</i>
13111199	8.11	7.39	1.65	0.005	<i>si:ch211-166i24.1</i>	<i>si:ch211-166i24.1</i>
13035693	3.01	2.28	1.66	0.0132	<i>si:dkey-288i20.1</i>	<i>si:dkey-288i20.1</i>

13167625	5.12	4.38	1.67	0.0474	<i>si:dkey-13n23.3</i>	<i>si:dkey-13n23.3</i>
13117940	2.75	2	1.68	0.0192	<i>mate4</i>	<i>multidrug and toxin extrusion protein 1-like</i>
13022985	2.55	1.77	1.71	0.0109	<i>si:ch211-210b2.4</i>	<i>si:ch211-210b2.4</i>
13124830	8.56	7.77	1.74	0.0256	<i>LOC100334752</i>	<i>rootletin-like</i>
13024842	4.96	4.15	1.75	0.0119	<i>LOC103910299</i>	<i>uncharacterized LOC103910299</i>
12999117	4.96	4.15	1.75	0.0119	<i>LOC103911826;</i> <i>LOC101885325</i>	<i>uncharacterized LOC103911826;</i> <i>uncharacterized LOC101885325</i>
13191642	2.23	1.4	1.77	0.0014	<i>LOC100537972</i>	<i>mucin-2-like</i>
13027871	7.91	7.08	1.78	0.023	<i>slc36a4</i>	<i>solute carrier family 36 (proton/amino acid symporter), member 4</i>
13217020	2.53	1.68	1.8	0.0074	<i>LOC101883778</i>	<i>olfactory receptor 2M2-like</i>
13190408	5.24	4.37	1.83	0.0158	<i>zgc:174696</i>	<i>zgc:174696</i>
13027846	6.29	5.41	1.84	0.0309	<i>kcnj13</i>	<i>potassium inwardly-rectifying channel, subfamily J, member 13</i>
13105611	3.91	3.02	1.85	0.0257	<i>mixl1</i>	<i>Mix paired-like homeobox</i>
13247729	6.37	5.45	1.89	0.0006	<i>LOC101884513</i>	<i>uncharacterized LOC101884513</i>
13008830	3.37	2.44	1.91	0.0324	<i>LOC101886773</i>	<i>uncharacterized LOC101886773</i>
13195195	3.07	2.13	1.91	0.007	<i>LOC103911082</i>	<i>alpha-1-antitrypsin homolog</i>
13202652	3.93	2.99	1.92	0.0361	<i>LOC100151089</i>	<i>uncharacterized LOC100151089</i>
13191409	4.36	3.42	1.92	1.03E-05	<i>LOC101884732</i>	<i>oocyte zinc finger protein XICOF15-like</i>
13007712	6.09	5.15	1.92	0.0201	<i>LOC103912062</i>	<i>uncharacterized LOC103912062</i>
13120508	2.72	1.77	1.93	0.0035	<i>LOC100334996</i>	<i>SLAM family member 5-like</i>

13228501	5.67	4.7	1.96	0.0051	<i>si:dkey-61m24.1</i>	<i>si:dkey-61m24.1</i>
13161105	3.11	2.12	1.99	0.0369	<i>cyp2x8</i>	cytochrome P450, family 2, subfamily X, polypeptide 8
13202059	3.75	2.71	2.06	1.43E-05	<i>si:ch73-42k18.1; si:ch211-182e10.4</i>	<i>si:ch73-42k18.1; si:ch211-182e10.4</i>
13115448	2.37	1.24	2.2	0.0278	<i>or133-10</i>	odorant receptor, family H, subfamily 133, member 10
13232385	4.72	3.5	2.32	0.0102	<i>LOC101886861</i>	uncharacterized LOC101886861
13267184	5.94	4.22	3.3	0.002	<i>si:ch73-7i4.2</i>	<i>si:ch73-7i4.2</i>
13027822	7.36	5.63	3.32	0.0254	<i>si:ch211-281l24.3</i>	<i>si:ch211-281l24.3</i>

Tabela 3. Genes diferencialmente expressos na comparação da concentração de 0,2 µg/L de VLX com o controle.

ID do transcrito	0,2 µg/L VFX Avg (log2)	Controle Avg (log2)	Fold Change	p-valor	Gene (símbolo)	Gene (descrição)
13038260	3.96	7.99	-16.38	0.0133	<i>LOC100537037</i>	uncharacterized LOC100537037
13038255	2.79	5.21	-5.35	0.026	<i>LOC100536995</i>	RIIa domain-containing protein 1-like
13256910	5.94	8.12	-4.54	0.0011	<i>rho</i>	rhodopsin
13222622	3.57	5.75	-4.52	0.0399	<i>myhb</i>	myosin, heavy chain b
13038210	4.08	6.12	-4.11	0.028	<i>si:dkey-71b5.7</i>	<i>si:dkey-71b5.7</i>
13231584	2.68	4.64	-3.89	0.0138	<i>cdh1</i>	cadherin 1, type 1, E-cadherin (epithelial)
12951141	4.64	6.5	-3.63	0.0024	<i>mb</i>	myoglobin
13073160	4.62	6.41	-3.47	0.0018	<i>ciarta</i>	circadian associated repressor of transcription a
13032094	4.55	6.25	-3.24	0.0354	<i>prss59.1</i>	protease, serine, 59, tandem duplicate 1
12969773	5	6.67	-3.19	0.0002	<i>si:dkey-18a10.3</i>	<i>si:dkey-18a10.3</i>
12944296	4.08	5.74	-3.17	0.0025	<i>atp1a1a.4; atp1a1a.1</i>	ATPase, Na ⁺ /K ⁺ transporting,

						<i>alpha 1a polypeptide, tandem duplicate 4; ATPase, Na⁺/K⁺ transporting, alpha 1a polypeptide, tandem duplicate 1</i>
13166611	5.87	7.51	-3.12	0.0011	<i>nr1d1</i>	<i>nuclear receptor subfamily 1, group d, member 1</i>
12957409	4.75	6.35	-3.04	0.0029	<i>zgc:111983; zgc:56382</i>	<i>zgc:111983; zgc:56382 myosin, heavy polypeptide 1.2, skeletal muscle;</i>
13280054	4.81	6.42	-3.04	0.0043	<i>myhz1.2; myhz1.3; myhz2</i>	<i>myosin, heavy polypeptide 1.3, skeletal muscle; myosin, heavy polypeptide 2, fast muscle specific</i>
13014365	4.94	6.5	-2.95	5.83E-05	<i>dusp1</i>	<i>dual specificity phosphatase 1</i>
12976179	6.94	8.45	-2.85	0.0025	<i>per3</i>	<i>period circadian clock 3</i>
13079729	2.43	3.92	-2.8	0.0184	<i>LOC101882443</i>	<i>uncharacterized LOC101882443</i>
13231170	6.13	7.62	-2.8	0.0022	<i>per1b</i>	<i>period circadian clock 1b</i>
13049109	4.39	5.86	-2.76	0.0274	<i>actc1b</i>	<i>actin, alpha, cardiac muscle 1b</i>
13226131	4.64	6.09	-2.74	0.0004	<i>rhcga</i>	<i>Rh family, C glycoprotein a</i>
13153157	3.78	5.23	-2.74	0.0153	<i>smyhc2</i>	<i>slow myosin heavy chain 2</i>
13064979	5.48	6.9	-2.67	0.004	<i>si:ch211-132b12.7</i>	<i>si:ch211-132b12.7</i>
13204325	5.91	7.29	-2.62	0.046	<i>anxa1a</i>	<i>annexin A1a</i>
12959638	3.73	5.11	-2.61	0.0017	<i>si:zfos-2330d3.1</i>	<i>si:zfos-2330d3.1</i>
12964755	5.61	7	-2.61	0.0001	<i>ucp2</i>	<i>uncoupling protein 2</i>
13028475	4.96	6.34	-2.6	0.0273	<i>LOC101887132</i>	<i>uncharacterized LOC101887132</i>
13215895	8.49	9.84	-2.55	0.0002	<i>fkbp5</i>	<i>FK506 binding protein 5</i>
13121239	3.32	4.66	-2.54	0.008	<i>krt97; krt96</i>	<i>keratin 97; keratin 96</i>

13194057	3.66	5	-2.54	0.0022	<i>si:dkey-27p18.3</i>	<i>si:dkey-27p18.3</i>
13119012	3.29	4.64	-2.54	0.0157	<i>zgc:66156</i>	<i>zgc:66156</i>
13147061	5.37	6.7	-2.5	0.0005	<i>cebpd</i>	<i>CCAAT/enhancer binding protein (C/EBP), delta</i>
13194642	7.85	9.16	-2.48	0.0002	<i>klf9</i>	<i>Kruppel-like factor 9</i>
13037531	5.06	6.37	-2.47	0.0289	<i>gapdh</i>	<i>glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase</i>
13038470	3.79	5.07	-2.42	0.0062	<i>si:dkey-247k7.2</i>	<i>si:dkey-247k7.2</i>
13141648	4.54	5.8	-2.39	0.0128	<i>nr4a1</i>	<i>nuclear receptor subfamily 4, group A, member 1</i>
13050870	3.61	4.8	-2.29	0.0301	<i>coll10a1a</i>	<i>collagen, type X, alpha 1a</i>
13205220	4.23	5.42	-2.29	0.0019	<i>si:ch211-117m20.5</i>	<i>si:ch211-117m20.5</i>
13224924	3.13	4.3	-2.26	0.0439	<i>si:dkey-192d15.2</i>	<i>si:dkey-192d15.2</i>
13104588	2.47	3.59	-2.18	0.0283	<i>adgrf6</i>	<i>adhesion G protein-coupled receptor F6</i>
13120585	4.11	5.22	-2.16	0.0101	<i>LOC100535646</i>	<i>uncharacterized LOC100535646</i>
13225580	4.38	5.49	-2.15	0.034	<i>actn3b</i>	<i>actinin alpha 3b</i>
13178803	5.13	6.19	-2.08	2.94E-05	<i>socs3a</i>	<i>suppressor of cytokine signaling 3a</i>
13220058	3.78	4.83	-2.06	0.0077	<i>scinla</i>	<i>scinderin like a</i>
12990772	4.6	5.62	-2.03	0.0162	<i>pvalb3</i>	<i>parvalbumin 3</i>
13044316	7.82	8.84	-2.02	6.75E-05	<i>nfkbiab</i>	<i>nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells inhibitor, alpha b</i>
12967950	4.16	5.18	-2.02	0.0036	<i>si:dkey-242g16.2</i>	<i>si:dkey-242g16.2</i>
13139702	4.75	3.75	2.01	0.0055	<i>LOC100149863</i>	<i>hairy-related 4.1-like</i>
13017085	6.18	5.18	2.01	0.005	<i>si:ch211-276i12.9</i>	<i>si:ch211-276i12.9</i>
13062756	5.78	4.7	2.11	7.51E-06	<i>arntl2</i>	<i>aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator-like 2</i>
13197478	6.59	5.51	2.12	0.039	<i>LOC100535859</i>	<i>uncharacterized LOC100535859</i>

12969047	6.42	5.33	2.14	0.0013	<i>cnih2</i>	<i>cornichon family AMPA receptor auxiliary protein 2</i>
13150124	6.56	5.46	2.16	4.72E-05	<i>zgc:112332</i>	<i>zgc:112332</i>
13189918	4.01	2.87	2.21	0.0203	<i>LOC100150095</i>	<i>gastrula zinc finger protein xLCGF3.1-like</i>
13135716	4.31	3.16	2.23	0.0041	<i>hoxc6a</i>	<i>homeobox C6a</i>
13135722	5.02	3.82	2.31	0.0191	<i>hoxc5a</i>	<i>homeobox C5a</i>
13084637	7.01	5.79	2.34	4.07E-05	<i>rorcb</i>	<i>RAR-related orphan receptor C b</i>
13166690	6.14	4.87	2.4	0.0087	<i>hoxb5a</i>	<i>homeobox B5a</i>
12986023	5.73	4.44	2.44	0.0108	<i>hoxb5b</i>	<i>homeobox B5b</i>
13191622	7.25	5.9	2.55	0.0024	<i>zgc:153116</i>	<i>zgc:153116</i>
13119400	4.94	3.47	2.75	0.0493	<i>zgc:113397</i>	<i>zgc:113397</i>

Tabela 4. Genes diferencialmente expressos na comparação da concentração de 1000 µg/L de VLX com o controle.

ID do transcrito	1000 µg/L VLX Avg (log2)	Controle Avg (log2)	Fold Change	p-valor	Gene (símbolo)	Gene (descrição)
13073160	4.3	6.41	-4.33	0.0011	<i>ciarta</i>	<i>circadian associated repressor of transcription a</i>
12976179	6.5	8.45	-3.87	0.0009	<i>per3</i>	<i>period circadian clock 3</i>
12951141	4.67	6.5	-3.54	0.0138	<i>mb</i>	<i>myoglobin</i>
12968399	3.9	5.65	-3.37	0.026	<i>per1a</i>	<i>period circadian clock 1a</i>
12969773	4.93	6.67	-3.35	0.0002	<i>si:dkey-18a10.3</i>	<i>si:dkey-18a10.3</i>
13231170	5.93	7.62	-3.23	0.0008	<i>per1b</i>	<i>period circadian clock 1b</i>
13153157	3.55	5.23	-3.22	0.0256	<i>smyhc2</i>	<i>slow myosin heavy chain 2</i>
13032094	4.61	6.25	-3.11	0.0164	<i>prss59.1</i>	<i>protease, serine, 59, tandem duplicate 1</i>
13032100	4.93	6.55	-3.07	0.0056	<i>prss59.2</i>	<i>protease, serine, 59, tandem duplicate 2</i>
13166611	5.89	7.51	-3.06	0.0016	<i>nr1d1</i>	<i>nuclear receptor subfamily 1, group d, member 1</i>
13120585	3.65	5.22	-2.97	0.0026	<i>LOC100535646</i>	<i>uncharacterized LOC100535646</i>

13256910	6.57	8.12	-2.93	0.0216	<i>rho</i>	<i>rhodopsin</i>
13119012	3.1	4.64	-2.91	0.0382	<i>zgc:66156</i>	<i>zgc:66156</i>
13064979	5.37	6.9	-2.88	0.0018	<i>si:ch211-132b12.7</i>	<i>si:ch211-132b12.7</i>
13194642	7.73	9.16	-2.71	0.0002	<i>klf9</i>	<i>nuclear receptor subfamily 4, group A, member 1 Kruppel-like factor 9</i>
12944296	4.49	5.74	-2.38	0.0067	<i>atp1a1a.4; 1a1a.1</i>	<i>ATPase, Na⁺/K⁺ transporting, alpha 1a polypeptide tandem duplicate 4; ATPase, Na⁺/K⁺ transporting, alpha 1a polypeptide, tandem duplicate 1</i>
13142708	6.63	7.83	-2.3	0.0048	<i>stk35</i>	<i>serine/threonine kinase 35</i>
13215895	8.67	9.84	-2.25	0.0003	<i>fkbp5</i>	<i>FK506 binding protein 5</i>
12968377	4.35	5.44	-2.13	0.0013	<i>per1a</i>	<i>period circadian clock 1a</i>
13209204	7.25	8.34	-2.13	6.60E-05	<i>usp2b</i>	<i>ubiquitin specific peptidase 2b</i>
13057951	5.63	6.7	-2.11	0.0014	<i>ddb2</i>	<i>damage-specific DNA binding protein 2</i>
12956544	6.82	7.88	-2.09	0.0468	<i>LOC101882617</i>	<i>uncharacterized LOC101882617</i>
13148713	3.46	4.51	-2.06	0.0005	<i>cpb1</i>	<i>carboxypeptidase B1 (tissue)</i>
13068566	7.06	8.1	-2.06	0.001	<i>nr1d2b</i>	<i>nuclear receptor subfamily 1, group D, member 2b</i>
12995225	2.94	3.99	-2.06	0.0006	<i>pimr155</i>	<i>Pim proto-oncogene, serine/threonine kinase, related 155</i>
13173021	9.03	10.05	-2.04	9.56E-06	<i>nfil3-6</i>	<i>nuclear factor, interleukin 3 regulated, member 6</i>
13014365	5.49	6.5	-2.01	0.0056	<i>dusp1</i>	<i>dual specificity phosphatase 1</i>
13062760	5.7	4.7	2.01	0.0054	<i>arntl2</i>	<i>aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator-like 2</i>

13119789	4.46	3.37	2.12	0.0203	<i>LOC103909502</i>	<i>uncharacterized LOC103909502</i>
13139702	4.89	3.75	2.21	0.0004	<i>LOC100149863</i>	<i>hairy-related 4.1-like</i>
13135722	4.97	3.82	2.22	0.0151	<i>hoxc5a</i>	<i>homeobox C5a</i>
13197478	6.66	5.51	2.22	0.0226	<i>LOC100535859</i>	<i>uncharacterized LOC100535859</i>
12986023	5.61	4.44	2.24	0.0132	<i>hoxb5b</i>	<i>homeobox B5b</i>
13062758	5.12	3.96	2.25	3.91E-05	<i>arntl2</i>	<i>aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator-like 2</i>
13062754	5.94	4.71	2.35	0.0002	<i>arntl2</i>	<i>aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator-like 2</i>
13062756	5.99	4.7	2.45	3.24E-06	<i>arntl2</i>	<i>aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator-like 2</i>
13040381	4.25	2.92	2.51	0.0144	<i>LOC101885684</i>	<i>uncharacterized LOC101885684</i>
12977236	5.83	4.49	2.53	0.0032	<i>nr1d4b</i>	<i>nuclear receptor subfamily 1, group D, member 4b</i>
13218636	8.41	7.06	2.56	0.0001	<i>nfil3-5</i>	<i>nuclear factor, interleukin 3 regulated, member 5</i>
13173019	7.44	5.98	2.75	0.0004	<i>nfil3-2</i>	<i>nuclear factor, interleukin 3 regulated, member 2</i>
13084637	7.41	5.79	3.07	1.59E-05	<i>rorcb</i>	<i>RAR-related orphan receptor C b</i>
13265843	4.8	2.55	4.75	3.56E-06	<i>si:ch211-141e20.2</i>	<i>si:ch211-141e20.2</i>