



**Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia Goiano – Campus Urutaí**  
Programa de Pós-Graduação em Conservação de  
Recursos Naturais do Cerrado

# **EFEITOS COMPORTAMENTAIS DE CONCENTRAÇÃO AMBIENTAL DE FLUOXETINA EM ZEBRAFISH**

**JULIENE DE BRITO FERREIRA**

**Orientador: Prof. Dr. André Luis da Silva Castro**

Urutaí, 28 de fevereiro de 2020



**Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia Goiano**

*Reitor*

Prof. Dr. Elias de Pádua Monteiro

*Pró-Reitor de Pesquisa e Pós-Graduação e Inovação*

Prof. Dr. Alan Carlos da Costa

**Campus Urutaí**

*Diretor Geral*

Prof. Dr. Paulo César Ribeiro da Cunha

*Diretor de Pesquisa, Pós-Graduação e Inovação*

Prof. Dr. Anderson Rodrigo da Silva

**Programa de Pós-Graduação em Conservação de Recursos Naturais do  
Cerrado**

*Coordenador*

Prof. Dr. Daniel de Paiva Silva

Urutaí, 28 de fevereiro de 2020

**JULIENE DE BRITO FERREIRA**

**EFEITOS COMPORTAMENTAIS DE CONCENTRAÇÃO  
AMBIENTAL DE FLUOXETINA EM ZEBRAFISH**

*Orientador(a)*

Prof. Dr. André Luis da Silva Castro

Dissertação apresentada ao Instituto Federal Goiano –  
Campus Urutaí, como parte das exigências do Programa  
de Pós-Graduação em Conservação de Recursos Naturais  
do Cerrado para obtenção do título de Mestre.

**URUTAÍ (GO)  
2020**

Os direitos de tradução e reprodução reservados.

Nenhuma parte desta publicação poderá ser gravada, armazenada em sistemas eletrônicos, fotocopiada ou reproduzida por meios mecânicos ou eletrônicos ou utilizada sem a observância das normas de direito autoral.

ISSN XX-XXX-XXX

Sistema desenvolvido pelo ICMC/USP  
Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)  
**Sistema Integrado de Bibliotecas - Instituto Federal Goiano**

FF383e Ferreira, Juliene de Brito  
Efeitos comportamentais de concentração ambiental  
de fluoxetina em zebrafish / Juliene de Brito  
Ferreira; orientador André Luis da Silva Castro. --  
Urutaí, 2020.  
43 p.

Dissertação ( Programa de Pós-Graduação em  
Conservação de Recursos Naturais do Cerrado) --  
Instituto Federal Goiano, Campus Urutaí, 2020.

1. Ansiedade. 2. Agressividade. 3. Danio rerio.  
4. Ecotoxicologia. 5. Fármaco. I. Castro, André Luis  
da Silva, orient. II. Título.


Responsável: Johnathan Pereira Alves Diniz - Bibliotecário-Documentalista CRB-1 n°2376

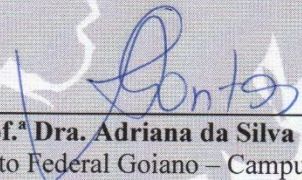


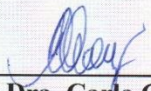
### FICHA DE APROVAÇÃO DA DISSERTAÇÃO

Título da dissertação:	Efeitos comportamentais de concentrações ambiental de fluoxetina em zebrafish
Orientador:	<b>Prof. Dr. André Luis da Silva Castro</b>
Autora:	<b>Juliene de Brito Ferreira</b>

Dissertação de Mestrado **APROVADA** em **28 de fevereiro de 2020**, como parte das exigências para obtenção do Título de **MESTRA EM CONSERVAÇÃO DE RECURSOS NATURAIS DO CERRADO**, pela Banca Examinadora especificada a seguir:

  
\_\_\_\_\_  
**Prof. Dr. André Luis da Silva Castro**  
Instituto Federal Goiano – Campus Urutaí

  
\_\_\_\_\_  
**Prof.ª Dra. Adriana da Silva Santos**  
Instituto Federal Goiano – Campus Urutaí

  
\_\_\_\_\_  
**Prof.ª Dra. Carla Cristina Braz Louly**  
Instituto Federal Goiano – Campus Urutaí



**INSTITUTO FEDERAL**

Goiano

**Repositório Institucional do IF Goiano - RIIF Goiano  
Sistema Integrado de Bibliotecas**

**TERMO DE CIÊNCIA E DE AUTORIZAÇÃO PARA DISPONIBILIZAR PRODUÇÕES  
TÉCNICO-CIENTÍFICAS NO REPOSITÓRIO INSTITUCIONAL DO IF GOIANO**

Com base no disposto na Lei Federal nº 9.610/98, AUTORIZO o Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia Goiano, a disponibilizar gratuitamente o documento no Repositório Institucional do IF Goiano (RIIF Goiano), sem ressarcimento de direitos autorais, conforme permissão assinada abaixo, em formato digital para fins de leitura, download e impressão, a título de divulgação da produção técnico-científica no IF Goiano.

**Identificação da Produção Técnico-Científica**

- Tese  Artigo Científico  
 Dissertação  Capítulo de Livro  
 Monografia – Especialização  Livro  
 TCC - Graduação  Trabalho Apresentado em Evento  
 Produto Técnico e Educacional - Tipo: \_\_\_\_\_

Nome Completo do Autor: Juliene de Brito Ferreira

Matrícula: 2018101330940137

Título do Trabalho: Efeitos comportamentais de concentração ambiental de fluoxetina em zebrafish

**Restrições de Acesso ao Documento**

Documento confidencial:  Não  Sim, justifique: \_\_\_\_\_

Informe a data que poderá ser disponibilizado no RIIF Goiano: 06/04/

O documento está sujeito a registro de patente?  Sim  Não

O documento pode vir a ser publicado como livro?  Sim  Não

**DECLARAÇÃO DE DISTRIBUIÇÃO NÃO-EXCLUSIVA**

O/A referido/a autor/a declara que:

1. o documento é seu trabalho original, detém os direitos autorais da produção técnico-científica e não infringe os direitos de qualquer outra pessoa ou entidade;
2. obteve autorização de quaisquer materiais inclusos no documento do qual não detém os direitos de autor/a, para conceder ao Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia Goiano os direitos requeridos e que este material cujos direitos autorais são de terceiros, estão claramente identificados e reconhecidos no texto ou conteúdo do documento entregue;
3. cumpriu quaisquer obrigações exigidas por contrato ou acordo, caso o documento entregue seja baseado em trabalho financiado ou apoiado por outra instituição que não o Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia Goiano.

Urutaí, 06/04/2020.

Local Data

Assinatura do Autor e/ou Detentor dos Direitos Autorais

Ciente e de acordo:

Assinatura do orientador

*“A gente só cuida do que ama,  
e só ama o que conhece.”  
(Fernando Fernandez)*

## AGRADECIMENTOS

A Deus pela generosidade, sabedoria, saúde, força e por tornar tudo isso possível.

Ao Instituto Federal Goiano - Campus Urutaí, que me proporcionou desenvolvimento acadêmico, profissional por meio do Programa de Pós-Graduação em Recursos Naturais do Cerrado.

Ao meu orientador Prof. Dr. André Luis da Silva Castro pela oportunidade e confiança em desenvolver este trabalho e de fazer parte da sua equipe. Agradeço pela orientação, paciência, confiança e apoio.

Aos membros da banca examinadora, Prof<sup>a</sup>. Dra. Adriana da Silva Santos e Prof<sup>a</sup>. Dra. Carla Cristina Braz Louly, que tão gentilmente aceitaram participar e contribuir com esta dissertação.

Aos professores e servidores do PPG-CRENAC, aos colegas de curso pelo companheirismo e colaboração.

À minha família que me apoiou e se dedicou imensamente para que essa conquista profissional fosse possível, compreendendo minhas ausências nas reuniões. Em especial aos meus pais Diná e Erci (*in memoriam*) que me proporcionaram toda a estrutura e suporte para realização de todos meus sonhos.

À Priscila que tem sido meu presente de Deus, sempre me dando apoio, incentivo, calma, força e carinho para concluir essa caminhada.

Aos amigos do Laboratório de Zoologia do Instituto Federal Goiano - Campus Urutaí (Camila, Caroliny, Daniele, Gercino, Marcelo e Sindoval) pela parceria, apoio, colaboração, conversas e amizade. Em especial ao Sindoval por me ajudar a realizar todo o processo deste trabalho sempre com muito carinho, apoio, ensinamentos e conselhos.

Ao CNPq pelo financiamento do projeto de pesquisa.

A todas as pessoas que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho.



## SUMÁRIO

<b>LISTA DE FIGURAS .....</b>	<b>IX</b>
<b>RESUMO.....</b>	<b>XI</b>
<b>ABSTRACT.....</b>	<b>XII</b>
<b>1. INTRODUÇÃO.....</b>	<b>1</b>
<b>2. MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>3</b>
2.1. Modelo experimental.....	3
2.2. Design experimental.....	4
2.3. Concentração e administração do fármaco.....	4
2.4. Avaliação de parâmetros comportamentais.....	5
2.4.1. Ansiedade.....	6
2.4.1.1. Teste de preferência claro/escuro (escototaxia).....	6
2.4.1.2. Teste campo aberto (tigmotaxia).....	7
2.4.1.2. Teste tanque novo (geotaxia).....	8
2.4.2. Teste do espelho (agressividade).....	9
2.5. Análise estatística.....	9
2.6. Questões éticas.....	9
<b>3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>10</b>
3.1. Ansiedade.....	10
3.2. Agressividade.....	20
<b>4. CONCLUSÃO.....</b>	<b>24</b>
<b>5. REFERÊNCIAS.....</b>	<b>24</b>

## LISTA DE FIGURAS

<b>Tabela 1-</b> Parâmetros físico-químicos da água dos aquários durante os experimentos.....	3
<b>Figura 1-</b> Grupos controle (sem adição de fluoxetina), fluoxetina (0,54 µg/L) concentração ambiental e fluoxetina (5,4 µg/L) concentração dez vezes ambiental nas exposições aguda e crônica.....	4
<b>Figura 2-</b> Cronograma dos experimentos indicando duração da exposição à fluoxetina durante o período de realização dos testes comportamentais na exposição aguda (A), crônica (B) tempo de cada teste de habituação e duração (C).....	5
<b>Figura 3-</b> Esquema do aparato do teste de preferência claro/escuro para avaliar o comportamento de escototaxia.....	6
<b>Figura 4-</b> Esquema do aparato do teste de campo aberto para avaliar o comportamento de tigmotaxia.....	8
<b>Figura 5-</b> Esquema do aparato do teste de preferência fundo/topo para avaliar o comportamento de geotaxia.....	8
<b>Figura 6-</b> Esquema do teste do espelho para avaliar a agressividade.....	9
<b>Figura 7-</b> Comportamentos preditivos de ansiedade no teste de preferência claro/escuro durante 15 minutos na exposição aguda nos grupos Controle (não exposto à fluoxetina) e grupos expostos à fluoxetina (Flu), Flu 0,54 µg/L e Flu 5,4 µg/L, a 0h (pré-tratamento), 24h, 72h e 120h.....	11
<b>Figura 8-</b> Comportamentos preditivos de ansiedade no teste de preferência claro/escuro durante 15 minutos na exposição crônica nos grupos Controle (não exposto à fluoxetina) e grupos expostos à fluoxetina (Flu), Flu 0,54 µg/L e Flu 5,4 µg/L, nos dias 0 (pré-tratamento), 1, 7, 14 e 21.....	12
<b>Figura 9-</b> Comportamentos preditivos de ansiedade no teste campo aberto durante 5 minutos na exposição aguda na exposição aguda nos grupos Controle (não exposto à fluoxetina) e grupos expostos à fluoxetina (Flu), Flu 0,54 µg/L e Flu 5,4 µg/L, a 0h (pré-tratamento), 24h, 72h e 120h.....	14
<b>Figura 10-</b> Comportamentos preditivos de ansiedade no teste de campo aberto durante 5 minutos na exposição crônica nos grupos nos grupos Controle (não exposto à fluoxetina) e	

grupos expostos à fluoxetina (Flu), Flu 0,54 µg/L e Flu 5,4 µg/L, nos dias 0 (pré-tratamento), 1, 7, 14 e 21.....15

**Figura 11-** Comportamentos preditivos de ansiedade no teste de tanque novo avaliado pela preferência pelo topo/fundo durante seis minutos na exposição aguda nos grupos Controle (não exposto à fluoxetina) e grupos expostos à fluoxetina (Flu), Flu 0,54 µg/L e Flu 5,4 µg/L, a 0h (pré-tratamento), 24h, 72h e 120h.....18

**Figura 12-** Comportamentos preditivos de ansiedade no teste de tanque novo avaliado pela preferência pelo topo/fundo durante seis minutos na exposição crônica nos grupos Controle (não exposto à fluoxetina) e grupos expostos à fluoxetina (Flu), Flu 0,54 µg/L e Flu 5,4 µg/L, nos dias 0 (pré-tratamento), 1, 7, 14 e 21.....19

**Figura 13-** Comportamentos preditivos de ansiedade no teste do espelho durante cinco minutos na exposição aguda nos grupos Controle (não exposto à fluoxetina) e grupos expostos à fluoxetina (Flu), Flu 0,54 µg/L e Flu 5,4 µg/L, a 0h (pré-tratamento), 24h, 72h e 120h.....21

**Figura 14-** Comportamentos preditivos de ansiedade no teste do espelho durante cinco minutos na exposição crônica nos grupos Controle (não exposto à fluoxetina) e grupos expostos à fluoxetina (Flu), Flu 0,54 µg/L e Flu 5,4 µg/L, nos dias 0 (pré-tratamento), 1, 7, 14 e 21.....22

# EFEITOS COMPORTAMENTAIS DE CONCENTRAÇÃO AMBIENTAL DE FLUOXETINA EM ZEBRAFISH

## RESUMO

A fluoxetina é um dos fármacos mais consumidos em todo o mundo e prescrito como ansiolítico, principalmente para o tratamento da depressão e tem sido encontrada em baixas concentrações em diferentes ambientes aquáticos. Os efeitos da contaminação aquática por fluoxetina em organismos são pobremente conhecidos. O objetivo do estudo foi avaliar os efeitos da fluoxetina nos comportamentos preditivos de ansiedade e agressividade em zebrafish (*Danio rerio*). Foram utilizados 108 peixes adultos não sexados, alocados em seis grupos experimentais (n=18): controle, fluoxetina em concentração ambiental (0,54 µg/L) e fluoxetina em concentração dez vezes superior à ambiental (5,40 µg/L) submetidos à exposição aguda e crônica, como forma de avaliar possíveis efeitos do aumento da concentração ambiental do fármaco. Foi realizado testes comportamentais individuais, para avaliação de comportamentos preditivos de ansiedade e agressividade, a 0, 24, 72 e 120 horas (exposição aguda) e 0, 1, 7, 14, 21 dias (exposição crônica). As concentrações 0,54 e 5,4 µg/L de fluoxetina causaram alterações nos comportamentos preditivos de ansiedade e de agressividade em zebrafish adultos nas exposições aguda e crônica. As alterações comportamentais causadas pela contaminação da fluoxetina em organismos não alvo são preocupantes, uma vez que podem desencadear efeitos ecológicos relevantes nas comunidades aquáticas.

**Palavras-chave:** ansiedade, agressividade, *Danio rerio*, ecotoxicologia, fármaco.

# BEHAVIORAL EFFECTS OF ENVIRONMENTAL CONCENTRATION OF FLUOXETINE IN ZEBRAFISH

## ABSTRACT

Fluoxetine is one of the drugs consumed worldwide and prescribed as an anxiolytic, mainly for the treatment of depression and has been found in low concentrations in different aquatic environments. The effects of aquatic contamination by fluoxetine on organisms are poorly known. The aim of the study was to evaluate the effects of fluoxetine on predictive behaviors of anxiety and aggression in zebrafish (*Danio rerio*). We used 108 non-sexed adult fish, allocated in one of the experimental groups (n = 18): control, fluoxetine in environmental concentration (0.54 µg / L) and fluoxetine in concentration ten times higher than the environmental one (5.40 µg / L) submitted to acute and chronic exposure, as a way to evaluate possible effects of the increase in the environmental concentration of the drug. We conducted individual behavioral tests to assess predictive behaviors of anxiety and aggression at 0, 24, 72 and 120 hours (acute exposure) and 0, 1, 7, 14, 21 days (chronic exposure). The concentrations of 0.54 and 5.4 µg / L of fluoxetine caused changes in the predictive behaviors of anxiety and aggression in adult zebrafish in acute and chronic exposures. Behavioral changes caused by contamination of fluoxetine in non-target organisms are of concern, since they can trigger ecological effects in aquatic communities.

**Keywords:** anxiety, aggressiveness, *Danio rerio*, ecotoxicology, drug.

## 1. INTRODUÇÃO

Nos últimos anos houve um aumento do consumo de fármacos no mundo todo, dentre esses destacam-se os antidepressivos. Esse aumento pode estar relacionado ao crescimento populacional, avanços tecnológicos e ao aumento da expectativa de vida. Um grupo farmacológico que apresenta aumento considerável de consumo é o de medicamentos psiquiátricos, dos quais 57% são relacionadas a transtornos de ansiedade (OECD, 2014; 2017). Os fármacos destinados ao tratamento de doenças psiquiátricas abrangem o grupo dos ansiolíticos, antidepressivos, sedativos e hipnóticos (Ford et al., 2018; Ford; Fong, 2016; Calisto & Esteves, 2009; Gebauer et al., 2011; Borrely et al., 2012).

Entre as drogas psiquiátricas mais consumidas no mundo está a fluoxetina (Brodin et al., 2014; Abreu et al., 2014; Margiotta-Casaluci et al., 2014; Stewart et al., 2014), destinada principalmente ao tratamento de depressão, ansiedade e distúrbios de personalidade (Stewart et al., 2012;2014; Kalueff et al., 2014; Theodoridi et al., 2017). A fluoxetina é um inibidor seletivo de receptação de serotonina (ISRS), atuando na fenda sináptica, inibindo a receptação de serotonina e aumentando sua disponibilidade na fenda sináptica (Brooks et al., 2003; Styryshave et al., 2011).

A serotonina é um neurotransmissor presente nos mamíferos, mas também encontrada em peixes (Margiotta-Casaluci et al., 2014; Kalueff et al., 2016) e de grande importância para o reino animal, pois é responsável na regulação do estresse, modulando comportamento de interação social, agressividade (Perreault et al., 2003), alimentação (Mennigen et al., 2010; Clift et al., 2014), ousadia (Gebauer et al., 2011) e ansiedade (Stewart et al., 2014).

A fluoxetina pode ser encontrada em ambientes aquáticos de todos os continentes (Brooks et al. 2003; Fent, et al., 2006), sendo 0,54 µg/L a maior concentração já encontrada no mundo no Canadá (Weston et al., 2001). A meia vida da fluoxetina por fotólise em água natural é de 30 dias, esse processo pode se acelerar em águas superficiais pois a fluoxetina se bioacumula em sedimentos (Kwon & Armbrust, 2006). No Brasil, recentemente a fluoxetina foi quantificada em 0,01 µg/L na baía de Santos (Laranjeira, 2019), o que corresponde ao limite permitido para o fármaco, segundo o Programa de Investigação de Produtos Químicos (Sumpter, et al., 2014; Gardner et al. 2012).

A principal forma de poluição ambiental por fármacos ocorre por meio das águas residuais, pois o tratamento de esgoto convencional é ineficiente na remoção de resíduos farmacológicos (Cervený et al., 2020; Fernandes et al., 2020; Kim et al., 2007; Martínez Bueno

et al., 2007; Verlicchi et al, 2012). Estudos revelam que a poluição ambiental de águas superficiais, subterrâneas e marinhas ocorrem em baixas concentrações, geralmente abaixo 0,1 µg/L e que os resíduos farmacológicos também podem ser encontrados em tecidos musculares de alguns organismos (Fent et al, 2006; Vystavna et al., 2012; Whitlock et al., 2019).

Os fármacos em contato com o meio ambiente podem afetar organismos e causar diversos efeitos toxicológicos nos ambientes aquáticos (Brodin et al., 2014; Fent et al., 2006; Rand-Weaver et al., 2013). Além disso, muitos resíduos farmacológicos são solúveis em água e resistentes à biodegradação, podendo bioacumular e causar diversas alterações fisiológicas e comportamentais nos seres vivos (Barry 2013; Sehonova et al., 2018; Borrely et al, 2012).

Diante disso, surgiu a necessidade de se estudar os efeitos de substâncias contaminantes ao meio ambiente, com propósito de analisar seus efeitos, especialmente em baixas concentrações, podendo subsidiar o desenvolvimento de estratégias de prevenção e tratamento de contaminantes (Borrely et al., 2012; Fent et al., 2006; Margiotta-Casaluci et al., 2014). Os estudos ecotoxicológicos com peixes propiciam condição semelhante para comparação desses efeitos nos humanos.

Em peixes, quando expostos às concentrações terapêuticas de fluoxetina podem apresentar alterações na agressividade, comportamento hierárquico, resposta à fuga e ousadia (Theodoridi et al., 2017; Brodin et al., 2014; Brooks et al., 2003). Uma espécie muito utilizada nestes estudos é o *Danio rerio* (zebrafish), um modelo experimental adequado devido alta homologia genética e fisiológica com os seres humanos (Stewart et al., 2015; 2014; Egan et al., 2009; Maximino et al, 2011a; Newman et al, 2011; Kalueff et al., 2016).

O comportamento é ótimo indicador de impactos ambientais, pois as alterações comportamentais precedem as fisiológicas. Um dos primeiros sinais de que existe algo alterado no organismo podem ser expressos por manifestações comportamentais, precedidas de alterações fisiológicas. Dessa forma, espera-se primeiramente que apareça alguns sinais de alterações nos parâmetros comportamentais antes de qualquer outra alteração no organismo (Dzieweczynski; Hebert, 2012; Brodin et al., 2014; Stewart et al., 2014; 2015).

Os fármacos que podem alterar o comportamento de organismos aquáticos representando riscos, que variam de uma escala em que afeta desde a espécie até toda a comunidade (Brodin et al., 2014; Abreu et al., 2014). Neste sentido, o presente trabalho teve como objetivo analisar os efeitos comportamentais da exposição em baixas concentrações ambientais aguda e crônica de fluoxetina, em zebrafish. Nosso estudo pode contribuir para o conhecimento sobre as alterações comportamentais em organismos aquáticos submetidos a

poluição pontual ou contínua de fluoxetina em concentrações preditivas e ambientalmente relevantes.

## 2. MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1. Modelo experimental

O experimento foi realizado no Laboratório de Zoologia do Instituto Federal Goiano - Campus Urutaí. Utilizamos 108 zebrafish (*Danio rerio*), adultos, de ambos os sexos (6 a 8 meses), adquiridos de viveiro comercial de Goiânia-GO. Os peixes foram aclimatados em laboratório por um período mínimo de 15 dias, mantidos em grupos de até 20 indivíduos em aquários de vidro com 40L (45 cm de altura x 50 cm de largura x 30 cm de comprimento) com água desclorada naturalmente via aerador. O fotoperíodo foi de 14h claro/10h escuro (Gebauer et al., 2011), temperatura controlada ( $26 \pm 2$  °C) e a alimentação oferecida duas vezes ao dia com ração comercial (Poytara Tropicais Flocos) *ad libitum*.

Todos os aquários foram oxigenados por aeradores, os parâmetros físico-químicos da água dos aquários foram monitorados a cada 3 dias (Tabela 1) e estiveram dentro dos valores recomendados para a espécie (Abreu et al., 2016; Fontana et al., 2018). A temperatura foi medida por um termômetro digital (Digital Thermometer); a amônia foi testada por um kit comercial (Amônia Tóxica - LabconTeste); o oxigênio dissolvido foi medido pelo kit comercial (O<sub>2</sub> Dissolvido - LabconTeste) e o pH pelo kit comercial (Teste de pH água doce - Mydor).

Tabela 1. Parâmetros físico-químicos da água dos aquários durante os experimentos.

<b>Exposição aguda</b>				
<b>Valores</b>	<b>Temperatura (°C)</b>	<b>pH</b>	<b>Amônia Total (ppm)</b>	<b>Oxigênio Total (ppm)</b>
Mínimo e máximo	26,0 – 27,2	6,8 – 7,0	0,25	9,0-11,0
Média	26,50	7,00	0,25	10,8
<b>Exposição crônica</b>				
<b>Valores</b>	<b>Temperatura (°C)</b>	<b>pH</b>	<b>Amônia Total (ppm)</b>	<b>Oxigênio Total (ppm)</b>
Mínimo e máximo	26,2 – 28,0	6,8 – 7,2	0,25 – 3,00	8,0-11,0
Média	27,21	7,04	0,8	10,5



## 2.2. Design experimental

Os peixes foram transferidos para os aquários de vidro (40 L) em grupos de 6 indivíduos, durante os experimentos em ambas as exposições, aguda e crônica. Os aquários foram revestidos no fundo e nas laterais por plástico azul para evitar aversão dos peixes, conforme recomendado por Park et al., (2016).

O delineamento experimental consistiu na formação de 3 grupos experimentais (n=18): 1) Grupo Controle (C 0,0 µg/L de fluoxetina): sem adição de fluoxetina; e 2) grupos com diferentes concentrações de fluoxetina. 2) Grupo Flu 0,54 µg/L: fluoxetina na concentração já encontrada em ambientes aquáticos - 0,54 µg/L (Weston et al., 2001) e 3) Grupo Flu 5,4 µg/L de fluoxetina: 10 vezes superior à encontrada em ambientes aquáticos (Figura 1), como forma de avaliar possíveis efeitos do aumento da concentração ambiental de fluoxetina. A exposição aguda teve duração de 5 dias (120h) e a exposição crônica duração de 21 dias (2.904h). Todos os peixes foram aclimatados por 24h horas às condições experimentais e, posteriormente, receberam os respectivos tratamentos.

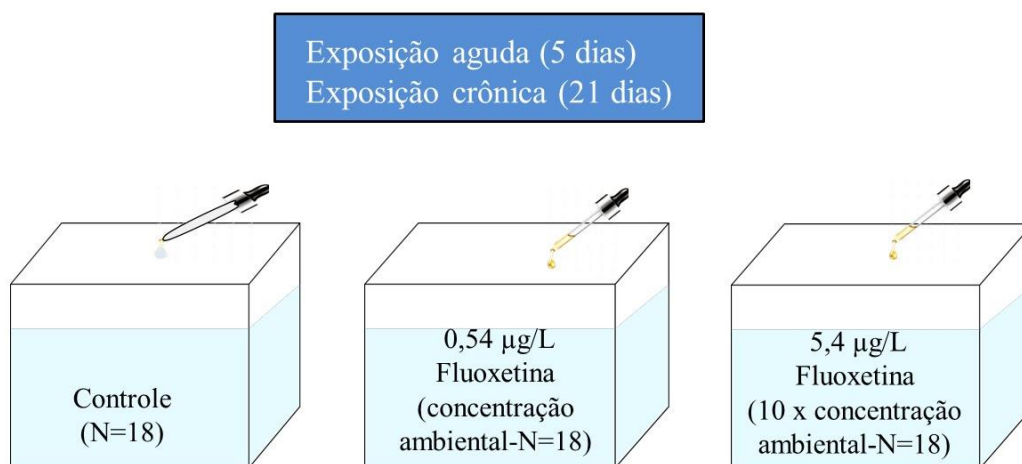


Figura 1. Grupo controle (sem adição de fluoxetina), fluoxetina (0,54 µg/L) concentração ambiental e fluoxetina (5,4 µg/L) em concentração dez vezes superior à ambiental, nas exposições aguda e crônica.

## 2.3. Concentrações e administração do fármaco

Nos grupos expostos à fluoxetina foi utilizado o cloridrato de fluoxetina (pureza > 98.0%; CAS: 56296-78-7; Fagron) diluído em água desclorada no momento da exposição em cada aquário teste (Facciol et al., 2017). As concentrações de fármaco utilizadas são nominais e se referem à quantidade de substância na água e não à quantidade biodisponível para o peixe.

No experimento de exposição aguda, os grupos Fluoxetina 0,54 e Fluxetina 5,4 µg/L foram expostos a única dose de fluoxetina, ao início do tratamento, considerada exposição

estática. Para garantir a qualidade da água, como oxigênio dissolvido e a comunicação química dos animais durante a exposição crônica, foi realizada a troca parcial de água a cada 7 dias, em que 50% do volume de água do aquário foi substituído por água desclorada. A exposição aguda foi estática (sem renovação do fármaco) e a crônica semi-estática (com renovação do fármaco a cada 7 dias), de forma a representar diferentes cenários de exposição como pontual e contínua.

## 2.4. Avaliação de parâmetros comportamentais

Os testes comportamentais avaliaram o comportamento preditivo de ansiedade e agressividade dos peixes. Todos os testes foram realizados entre às 08:00 e 16:00 horas e filmados por câmeras HD da Intelbras® com resolução de 1080p com intervalos para reduzir o estresse pelo manuseio e possíveis efeitos de um teste para o outro. Na exposição aguda os testes comportamentais foram filmados em 0h (denominado pré-tratamento), 24h, 48h, 72h e 120h de exposição à fluoxetina, conforme Figura 1. Já na exposição crônica os testes comportamentais foram filmados no 0º dia (denominado pré-tratamento), 1º dia, 7º dia, 14º dia e 21º dia de exposição à fluoxetina (Figura 2), com intervalos

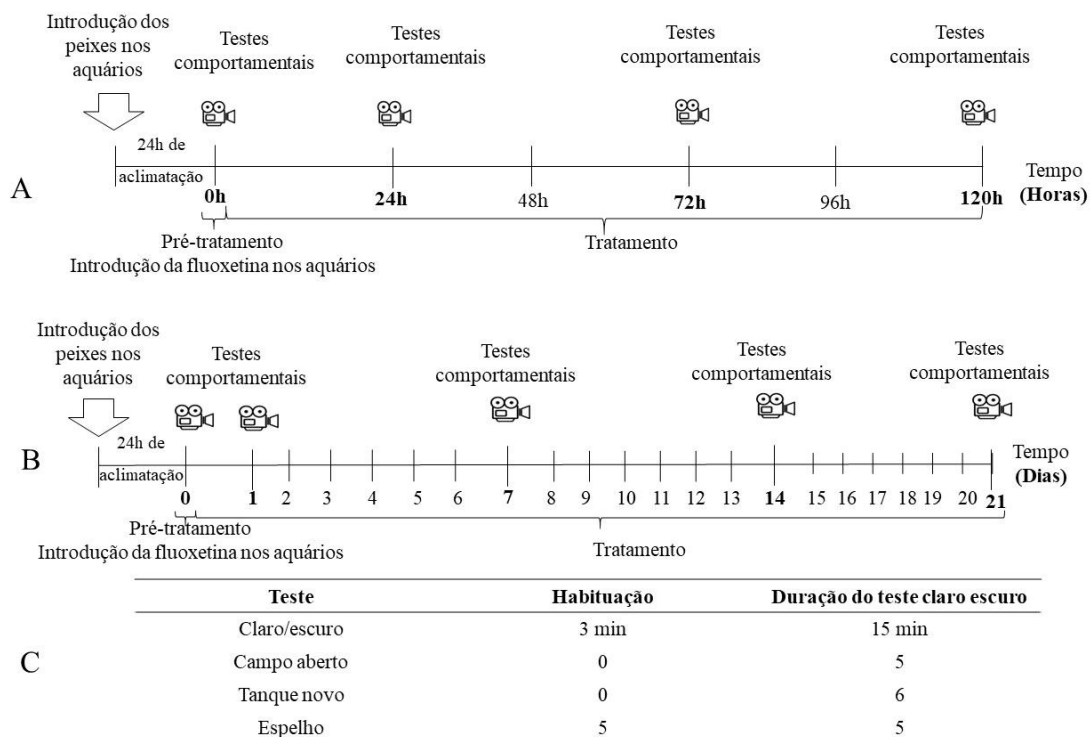


Figura 2. Cronograma dos experimentos indicando duração da exposição à fluoxetina durante o período de realização dos testes comportamentais na exposição aguda (A), crônica (B) e período de habituação e duração dos testes comportamentais (C).

### 2.4.1. Ansiedade

Para identificar comportamentos preditivos de ansiedade, foram utilizados os testes de claro/escuro (escototaxia) como forma de avaliar o paradigma de medo ou curiosidade, apresentando o comportamento de explorar ou se esconder no lado escuro (Araujo et al., 2012; Facciol et al., 2017); teste de campo aberto utilizado para identificar comportamento de preferência pelas periferias do aparato (tigmotaxia) como forma de proteção (Cachat et al., 2013; Grossman et al., 2010) e de tanque novo, utilizado para avaliar comportamentos preditivos de ansiedade ao permanecer na região do fundo do aparato (geotaxia) como medida de proteção a predadores (Gebauer et al. 2011; Egan et al. 2009). Estes testes podem se apresentar qualitativamente diferentes e podem se diferenciar na sensibilidade às drogas ansiolíticas (Hope et al., 2019).

#### 2.4.1.1. Teste de preferência claro/escuro (escototaxia)

Para avaliarmos se a exposição de fluoxetina altera comportamentos preditivos de ansiedade, um dos testes realizados foi o claro/escuro, para avaliar comportamentos preditivos de ansiedade por meio do paradigma medo/curiosidade (Maximino et al., 2010; 2014; Araujo et al., 2012). O aparato do teste de escototaxia consiste em um aquário de vidro com 15 cm altura x 10 cm de largura x 45 cm de comprimento com divisão igualitária entre paredes e fundos claro e escuro, preenchidos com 4,5 L de água. No centro tem duas portas deslizantes com a cor do respectivo lado do aquário, medindo 15 cm altura x 10 cm de largura x 10 cm de comprimento (Figura 3).

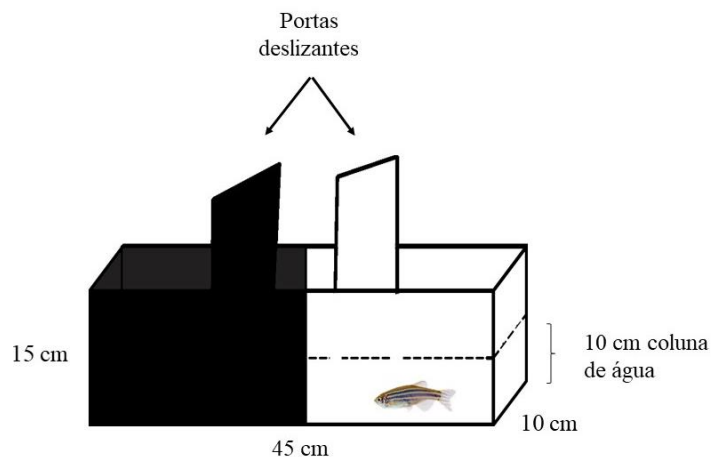


Figura 3. Esquema do aparato do teste de preferência claro/escuro para avaliar o comportamento de escototaxia.

Durante o teste de escototaxia os três primeiros minutos foram considerados como período de habituação dos peixes no centro do aparato e, após isso, as portas centrais foram removidas, permitindo que o peixe nadasse livremente no aparato. As gravações ocorreram durante 15 minutos por uma câmera suspensa, conforme Maximino et al. (2010a; b) e Araújo et al., (2012). O teste de escototaxia foi realizado individualmente, com troca de água e lavagem da arena após cada teste.

Neste teste avaliamos o tempo gasto no compartimento claro, a latência para a primeira entrada no compartimento claro (tempo gasto para a primeira entrada na parte clara do aparato, o número de cruzamentos (claro-escuro ou escuro-claro), frequência de avaliação de risco (ato de entrar parcialmente ou por completo no compartimento claro do aparato, seguido de aversão da parte mais iluminada, retornando para o lado escuro) e frequência de movimentos erráticos (definido como nado em zigue zague, em alta velocidade e curso imprevisível) seguindo o protocolo preconizado pelos autores Araújo et al., (2012); Maximino et al., (2010a; 2010b; 2013).

Para a iluminação uniforme deste teste foi utilizada lâmpada fluorescente a 80 cm acima do aparato, com iluminação média da parte escura de  $202 \pm 34$  lúmens, e da parte clara com  $298 \pm 63$  lúmens por meio do software Luxímetro. O aparato era girado a um ângulo de  $180^\circ$ , alternando a cada dia de filmagem a posição da parte clara, para eliminar possíveis efeitos espaciais (Maximino et al., 2010;2014; Araujo et al., 2012).

#### **2.4.1.2. Teste de campo aberto (tigmotaxia)**

Além do teste de claro escuro, outro teste foi utilizado neste estudo para avaliar comportamento preditivo de ansiedade, conhecido como campo aberto, que avalia o comportamento de tigmotaxia, ou seja, preferência por regiões periféricas (Cachat et al., 2013; Grossman et al., 2010).

O aparato para o teste de campo aberto consiste em um recipiente com formato de cilindro (plástico), medindo 21 cm de diâmetro e 24 cm de altura, com coluna de água de 12 cm de altura, delimitando região central que corresponde a raio de 50% de circunferência da região do aparato e região periférica com 50% de área, conforme Figura 4, seguindo protocolos preestabelecidos por Cachat et al. (2013).

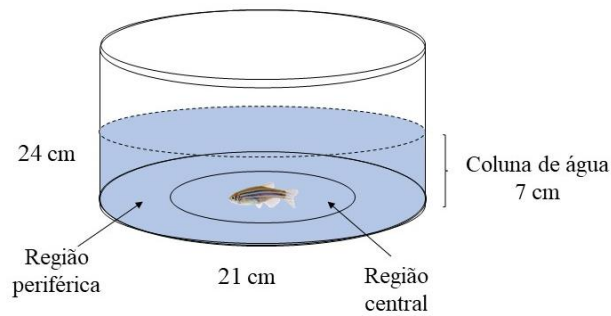


Figura 4. Esquema do aparato do teste de campo aberto para avaliar o comportamento de tigmotaxia.

Os peixes foram filmados por 5 minutos avaliando o tempo de permanência dos peixes na região periférica, a frequência de entradas na região central, tempo de congelamento, frequência de congelamento e movimentos erráticos. O aparato foi lavado e a água trocada após cada teste (Cachat et al., 2013; Grossman et al., 2010).

#### 2.4.1.2. Teste de tanque novo (geotaxia)

Outro teste utilizado para avaliar comportamentos preditivos de ansiedade ao mensurar a exploração vertical e horizontal dos animais. O aparato de tanque novo utilizado é de vidro, em formato de trapézio, com 23,9 cm de fundo x 28,9 cm de topo x 15,9 cm de altura ao longo do lado diagonal, 7,4 cm de largura no topo e afunilado para 6 cm no fundo (Figura 5), preenchido com 1,5L de água dividido horizontalmente o meio separando em duas áreas, topo e de fundo, com uma distância de 40 cm da filmadora. A filmadora estava a uma distância de 40 cm do aparato, registrando as gravações durante 6 minutos, avaliando o tempo de permanência na região superior do aparato (topo), a latência para explorar o topo, as frequências de transições para o topo, tempo de congelamento (quando ocorre a ausência de movimentos, exceto dos olhos e arcos branquiais por mais de 3 segundos), frequência de congelamento e movimentos erráticos conforme protocolo preestabelecido por Rosemberg et al., (2011). O aparato do teste de tanque novo foi lavado e a água trocada após cada teste.

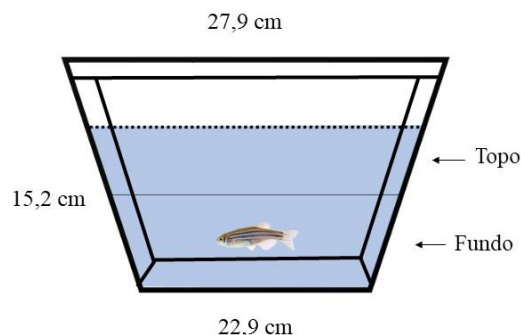


Figura 5. Esquema do aparato do teste de preferência fundo/topo para avaliar o comportamento de geotaxia.

#### 2.4.2. Teste do espelho (agressividade)

Para avaliar se a exposição à fluoxetina altera comportamentos preditivos de agressividade, foi utilizado o teste de espelho. O teste de agressividade baseado na imagem espelhada estimula o comportamento preditivo de agressão, uma vez que desperta ações de ataque à sua imagem no espelho (Holmberg et al., 2011; Cachat et al., 2013).

Para a realização do teste, um espelho foi posicionado por 5 minutos à lateral esquerda do aquário, em ângulo de 90°, e o comportamento foi filmado e analisadas a frequência e duração de ataques ao espelho, permanência nas zona 1 (zona de aversão, 17,5 cm do espelho) e zona 2 (zona de aproximação, 2,5 cm do espelho), conforme figura 6 (Cachat et al., 2013; Pham et al., 2012).

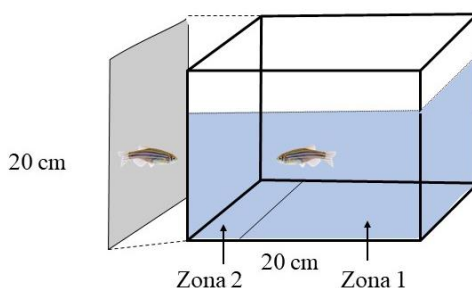


Figura 6. Esquema do teste do espelho para avaliar a agressividade.

#### 2.5. Análise estatística

As análises estatísticas foram realizadas no software livre BioEstat (Ayres & Junior Ayres, 2000). Os valores *outliers* foram retirados e substituídos pela média uma única vez (considerando média  $\pm 2x$  desvio padrão) (Leys et al., 2013). A normalidade residual dos dados foi verificada utilizando o teste de Shapiro-Wilk e a homogeneidade pelo teste de Bartlett. Para comparar o grupo controle e os grupos de fluoxetina em cada período da exposição aguda: 0h, 24h, 72h e 120h e exposição crônica: 0 dia, 1º dia, 7º dia, 14º dia e 21º dia, os dados paramétricos foram submetidos à *one-way* ANOVA e pós-teste LSD e os dados não paramétricos submetidos ao Kruskal-Wallis e pós-teste de Dunn. O nível de significância para todas as análises foi de 5%.

#### 2.6. Questões éticas

O projeto foi previamente aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) do Instituto Federal Goiano, sob o protocolo nº 8029030717.

### **3. RESULTADOS E DISCUSSÃO**

#### **3.1. Ansiedade**

Nossos resultados para o teste de claro escuro, que é amplamente utilizado para avaliar o comportamento natural de explorar ou se esconder no lado escuro (Araujo et al., 2012; Facciol et al., 2017), evidenciaram que a exposição à fluoxetina em concentrações ambientalmente relevantes, alteraram parâmetros comportamentais preditivos de ansiedade. Com base nos resultados aqui registrados, houve aumento na preferência pela parte clara do aparato nas exposições aguda e crônica, portanto, é possível inferir que a fluoxetina induziu efeitos ansiolíticos.

Na exposição aguda, a fluoxetina alterou o comportamento de escototaxia na concentração 0,54 e 5,4  $\mu\text{g/L}$ , de forma que os peixes permaneceram mais tempo no lado claro no teste de claro/escuro, o que indica efeito ansiolítico, conforme Figura 7A. Houve ainda um aumento na frequência de transição para o lado claro do aparato, em 72h na concentração de 5,4  $\mu\text{g/L}$  (Figura 7E) e diminuição da latência para acessar pela primeira vez o lado claro do aparato também em 72 horas na concentração 5,4  $\mu\text{g/L}$  (Figura 7C). Não houve diferença significativa na frequência de avaliação de risco (Figura 7B) e de movimentos erráticos (Figura 7D). Já na exposição crônica, a fluoxetina também teve efeito ansiolítico, pois nos grupos das duas concentrações houve aumento do tempo gasto na parte clara do aparato no 14 e 21º dia (Figura 8A), diminuiu a latência para acessar pela primeira vez o lado claro do aparato no 14º dia em ambas concentrações 0,54 e 5,4  $\mu\text{g/L}$ , conforme Figura 8C. Não houve diferença estatística entre os grupos na frequência de avaliação de risco (Figura 8B), cruzamento (Figura 8E) e movimentos erráticos (Figura 8D).

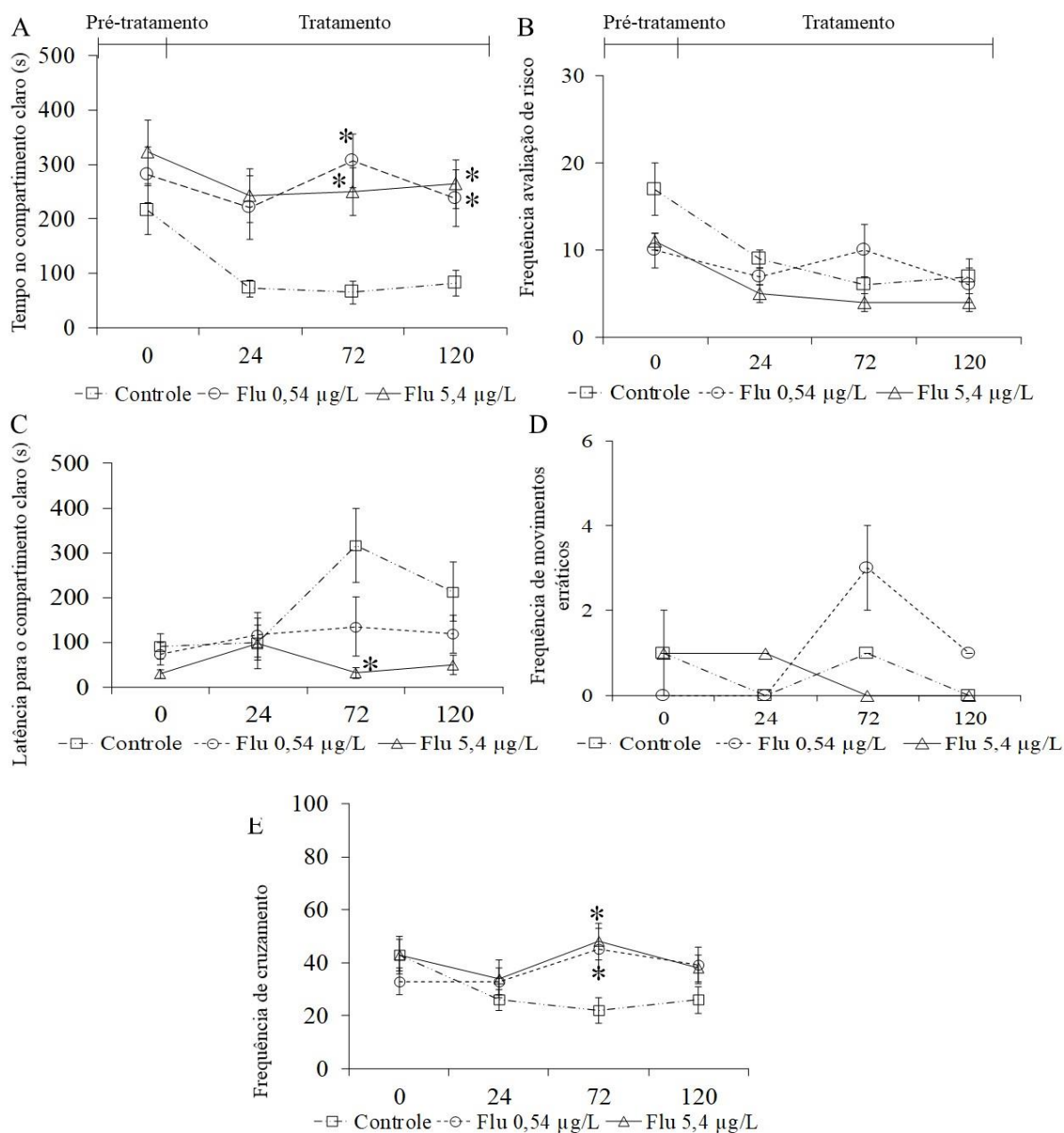


Figura 7. Comportamentos preditivos de ansiedade no teste de preferência claro/escuro durante 15 minutos na exposição aguda nos grupos Controle (não exposto à fluoxetina) e grupos expostos à fluoxetina (Flu), Flu 0,54 µg/L e Flu 5,4 µg/L, a 0h (pré-tratamento), 24h, 72h e 120h. (A) Tempo no compartimento escuro (em segundos). (B) Frequência de avaliação de risco. (C) Latência para o compartimento claro (em segundos). (D) Frequência de movimentos erráticos (E) Frequência de cruzamentos da linha média. Média ± erro padrão (n = 18). Os dados paramétricos foram submetidos à ANOVA one-way (pós-teste de LSD) e os dados não paramétricos foram submetidos ao teste de Kruskal-Wallis (pós-teste Dunn), comparando os grupos em cada período (\* $P < 0,05$ ), ao nível de probabilidade de 5%. Sumário estatístico: (A) 0h:  $F=1,08$ ,  $p=0,3$ ; 24h:  $H=3,09$ ,  $p=0,1$ ; 72h:  $H=13,19$ ,  $p=0,001$ ; 120h:  $H=9,75$ ,  $p=0,007$ . (B) 0h:  $F=2,22$ ,  $p=0,1$ ; 24h:  $F=2,36$ ,  $p=0,1$ ; 72h:  $H=0,63$ ,  $p=0,7$ ; 120h:  $H=1,22$ ,  $p=0,5$ . (C) 0h:  $H=0,87$ ,  $p=0,6$ ; 24h:  $F=0,04$ ,  $p=0,9$ ; 72h:  $H=9,28$ ,  $p=0,009$ ; 120h:  $H=4,97$ ,  $p=0,08$ . (D) 0h:  $H=2,73$ ,  $p=0,2$ ; 24h:  $H=1,92$ ,  $p=0,3$ ; 72h:  $H=0,95$ ,  $p=0,6$ ; 120h:  $H=1,24$ ,  $p=0,5$ . (E) 0h:  $F=1,09$ ,  $p=0,3$ ; 24h:  $F=0,63$ ,  $p=0,5$ ; 72h:  $F=4,11$ ,  $p=0,02$ ; 120h:  $F=2,59$ ,  $p=0,08$ .



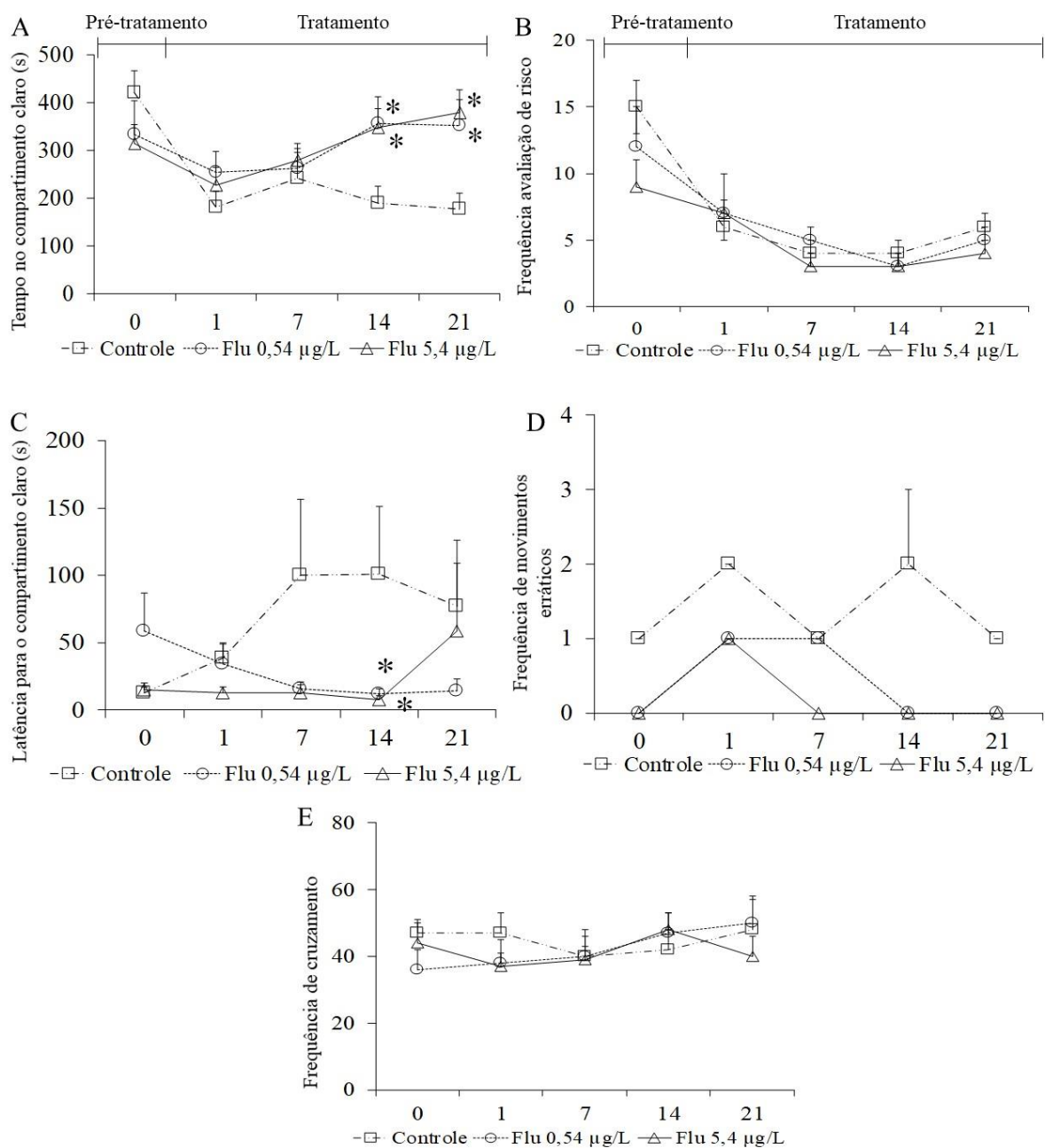


Figura 8. Comportamentos preditivos de ansiedade no teste de preferência claro/escuro durante 15 minutos na exposição crônica nos grupos Controle (não exposto à fluoxetina) e grupos expostos à fluoxetina (Flu), Flu 0,54 µg/L e Flu 5,4 µg/L, nos dias 0 (pré-tratamento), 1, 7, 14 e 21. (A) Tempo no compartimento escuro (em segundos). (B) Frequência de avaliação de risco. (C) Latência para o compartimento claro (em segundos). (D) Frequência de movimentos erráticos (E) Frequência de cruzamentos da linha média. Barras de erro representam erro padrão (n = 18). Os dados paramétricos foram submetidos à ANOVA one-way (pós-teste de LSD) e os dados não paramétricos foram submetidos ao teste de Kruskal-Wallis (pós-teste Dunn), comparando os grupos em cada período (\* $P < 0,05$ ), ao nível de probabilidade de 5%. Sumário estatístico: (A) 0 Dia:  $H=1,31$ ,  $p=0,2$ ; 1º Dia:  $F=0,94$ ,  $p=0,6$ ; 7º Dia:  $F=0,18$ ,  $p=0,8$ ; 14º Dia:  $F=4,65$ ,  $p=0,01$ ; 21º Dia:  $F=5,76$ ,  $p=0,005$ . (B) 0 Dia:  $F=1,66$ ,  $p=0,1$ ; 1º Dia:  $H=0,68$ ,  $p=0,7$ ; 7º Dia:  $H=0,95$ ,  $p=0,6$ ; 14º Dia:  $F=0,06$ ,  $p=0,9$ ; 21º Dia:  $F=0,39$ ,  $p=0,6$ . (C) 0 Dia:  $H=0,41$ ,  $p=0,8$ ; 1º Dia:  $H=4,30$ ,  $p=0,1$ ; 7º Dia:  $H=2,16$ ,  $p=0,3$ ; 14º Dia:  $H=11,15$ ,  $p=0,003$ ; 21º Dia:  $H=3,86$ ,  $p=0,1$ . (D) 0 Dia:  $H=2,02$ ,  $p=0,3$ ; 1º Dia:  $H=4,91$ ,  $p=0,08$ ; 7º Dia:  $H=4,12$ ,  $p=0,1$ ; 14º Dia:  $H=3,30$ ,  $p=0,1$ ; 21º Dia:  $H=4,32$ ,  $p=0,1$ . (E) 0 Dia:  $H=1,65$ ,  $p=0,4$ ; 1º Dia:  $H=1,99$ ,  $p=0,4$ ; 7º Dia:  $F=0,002$ ,  $p=0,9$ ; 14º Dia:  $F=0,7$ ,  $p=0,46$ ; 21º Dia:  $F=0,46$ ,  $p=0,6$ .

Com o resultado do teste claro/escuro é possível inferir que a fluoxetina induziu efeito ansiolítico ao aumentar a ousadia, pois identificamos aumento na exploração ao passar mais tempo no lado claro do aparato, aumento de transição para o lado claro e diminuição da latência. A escototaxia representa o comportamento pela preferência por áreas escuras, sendo um parâmetro muito utilizado para estudos com drogas ansiolíticas e ansiogênicas (Blaser, et al., 2010), como medida para avaliar comportamento preditivo ansiedade ao fazer analogia ao comportamento na natureza (Quadros et al., 2016; Maximino et al. 2011a), já que esse parâmetro é sensível aos ISRSs (Fontana et al. 2018; Maximino et al., 2010; 2011a; 2012).

Nossos resultados são semelhantes aos obtidos por Maximino et al., (2011; 2010b), que também encontram efeito ansiolítico usando fluoxetina em concentrações superiores à nossa e em diferentes vias de administração, alterando o estado de ansiedade, afetando comportamentos como tempo no lado claro do aparato, frequência de transição, latência e avaliação de risco que estão relacionados à ousadia. Quando ocorre esse aumento da ousadia nos peixes, é possível que gere riscos ecológicos, pois estes organismos estão mais suscetíveis à predação ao ficarem mais expostos, conforme identificamos em nossos dados pelo aumento no tempo na parte clara e de transição (De Abreu et al., 2014; Maximino et al., 2010).

Nos grupos controles das exposições aguda e crônica, os peixes permaneceram maior parte do tempo no lado escuro do aparato, conforme Figuras 7A e 8A. Esta aversão à luminosidade do zebrafish adulto confere maior segurança, pois diminui riscos de predação no ambiente escuro, como forma de comportamento de defesa ao evitar ser visto por outros organismos aquáticos (Blaser et al., 2010; 2012; Kysil et al., 2017; Maximino et al., 2010; Zahid et al., 2018). Segundo Blaser & Rosemberg (2012) e Kysil et al., (2017), alterações no padrão de comportamento exploratório dos ambientes podem culminar em sérios problemas ecológicos ao afetar a capacidade de procura por parceiros, aumentar os riscos de predação e dificultar a busca de alimento e abrigo.

Conforme os dados deste presente trabalho, os zebrafish expostos à fluoxetina mesmo em baixas concentrações tiveram o comportamento de permanecer maior parte do tempo no lado claro e com mais frequência de cruzamento, confirmando a preferência pela região clara, após tratamento com a fluoxetina. Já a preferência dos peixes pelo compartimento escuro, tendência natural desta espécie no ambiente natural, foi observada apenas no grupo controle. Outros trabalhos com concentrações mais elevadas do que as utilizadas neste estudo e com forma de administração do fármaco via intraperitoneal, constataram a alteração desta

preferência do escuro por influência de alguns estressores, para avaliar a ansiedade (Kysil et al., 2017; Mezzomo et al., 2016), ao evitar a região clara do aparato o peixe demonstra comportamento de excitação, ansiedade e estresse, que com o uso de ansiolíticos aumenta o tempo de permanência na região clara (Maximino, et al. 2011a).

Para o teste de campo aberto, em que avaliamos comportamento preditivo de tigmotaxia, ou seja, quando o animal tem preferência pelas periferias do aparato (Cachat et al., 2013; Grossman et al., 2010), nossos resultados evidenciam maior preferência pela periferia na exposição aguda, como podemos ver na Figura 9A, mas não houve nenhuma diferença significativa para exposição crônica (Figura 10A). Essa preferência pelas periferias é uma das medidas de ansiedade mais confiáveis, pois permite diferentes interpretações de acordo com o fármaco administrado, podendo apresentar um efeito ansiolítico e/ou ansiogênico (Richendrfer et al., 2012; Schnörr et al., 2012), conforme avaliamos em nosso estudo, apresentando efeito ansiogênico na exposição aguda e ansiolítico na exposição crônica.

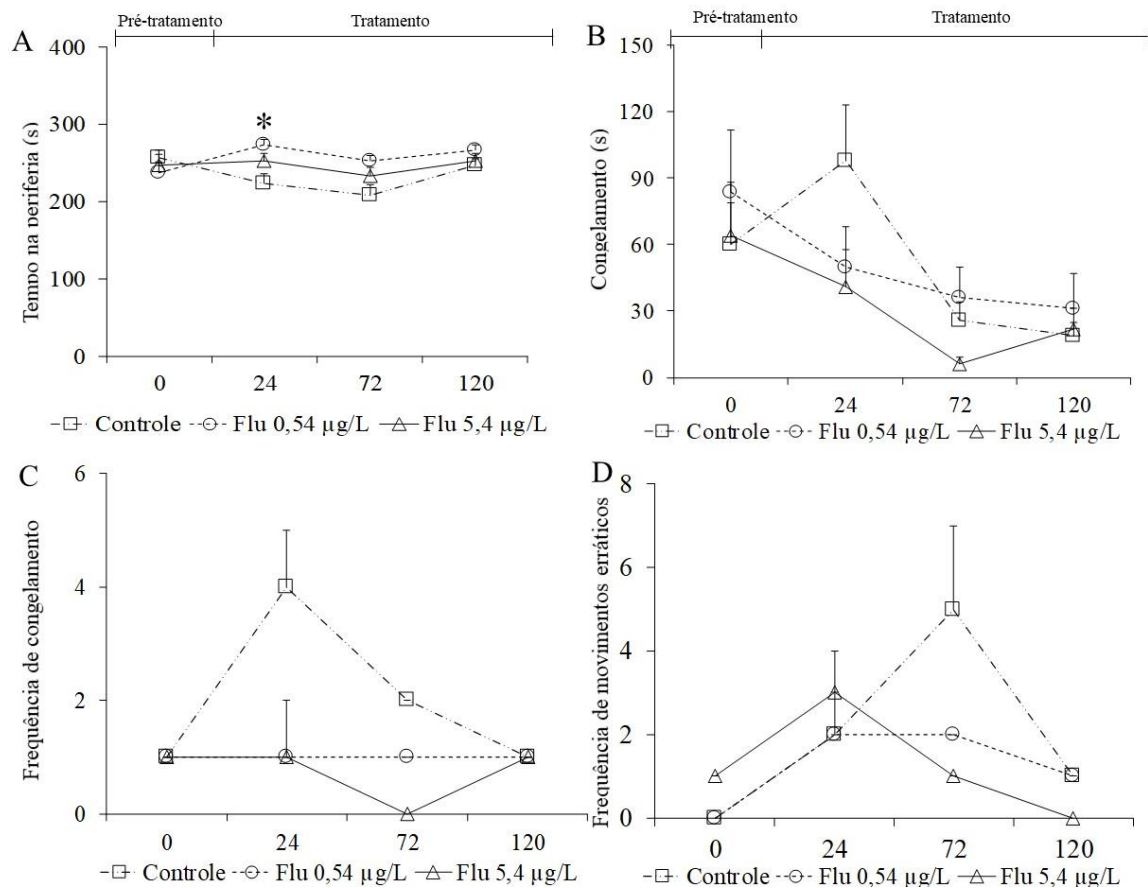


Figura 9. Comportamentos preditivos de ansiedade no teste campo aberto durante 5 minutos na exposição aguda na exposição aguda nos grupos Controle (não exposto à fluoxetina) e grupos expostos à fluoxetina (Flu), Flu 0,54 µg/L e Flu 5,4 µg/L, a 0h (pré-tratamento), 24h, 72h e 120h. (A) Tempo na periferia (em segundos). (B) Congelamento (em segundos). (B) Frequência de congelamento. (D) Frequência de movimentos erráticos. Barras

de erro representam erro padrão (n = 18). Os dados paramétricos foram submetidos à ANOVA one-way (pós-teste de LSD) e os dados não paramétricos foram submetidos ao teste de Kruskal-Wallis (pós-teste Dunn), comparando os grupos em cada período (\* $P < 0,05$ ), ao nível de probabilidade de 5%. Sumário estatístico: (A) 0h:  $F=0,57$ ,  $p=0,5$ ; 24h:  $H=9,41$ ,  $p=0,009$ , 72h:  $F=5,86$ ,  $p=0,05$ ; 120h:  $F=1,45$ ,  $p=0,2$ . (B) 0h:  $F=0,27$ ,  $p=0,7$ ; 24h:  $F=2,29$ ,  $p=0,1$ ; 72h:  $H=3,04$ ,  $p=0,2$ ; 120h:  $H=0,8$ ,  $p=0,6$ . (C) 0h:  $F=0,28$ ,  $p=0,7$ ; 24h:  $H=5,69$ ,  $p=0,05$ ; 72h:  $H=3,56$ ,  $p=0,1$ ; 120h:  $F=1,08$ ,  $p=0,3$ . (D) 0h:  $H=1,21$ ,  $p=0,5$ ; 24h:  $H=0,22$ ,  $p=0,8$ ; 72h:  $H=4,14$ ,  $p=0,1$ ; 120h:  $H=1,17$ ,  $p=0,5$ .

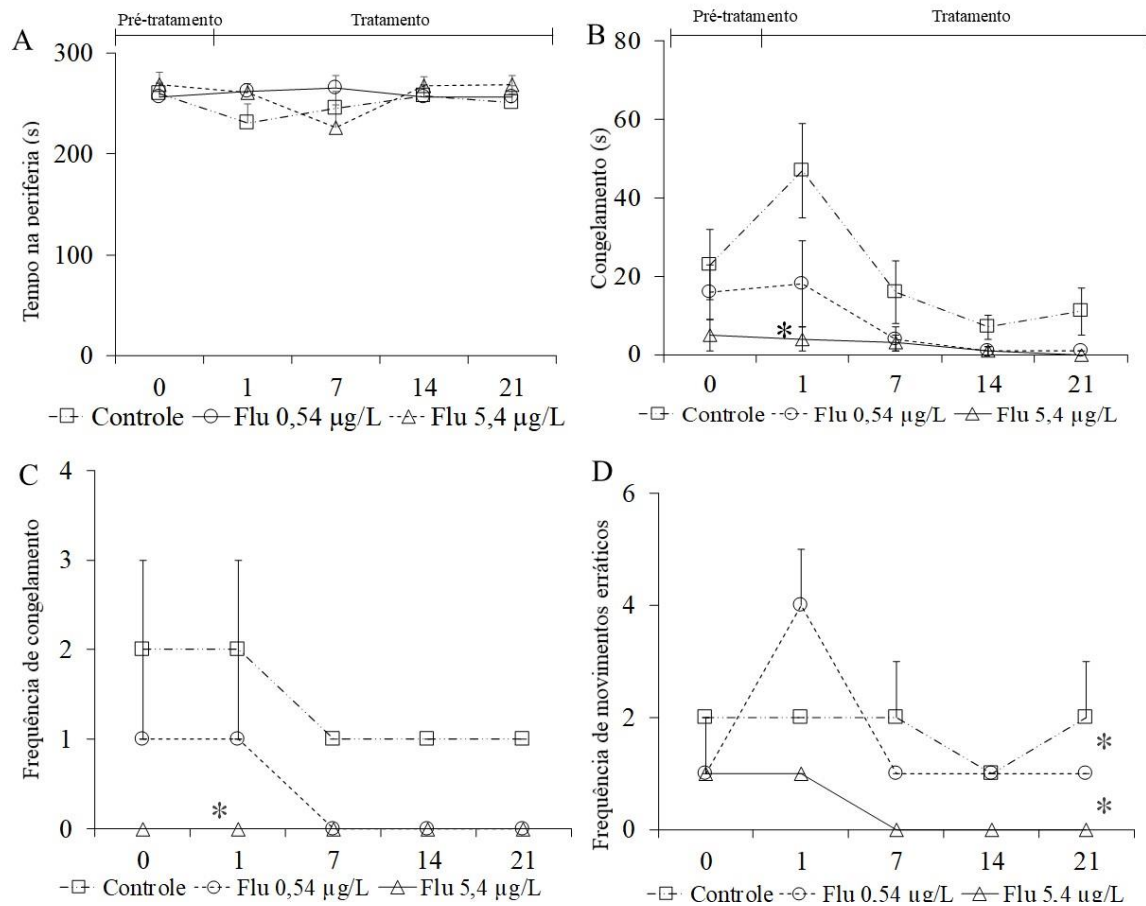


Figura 10. Comportamentos preditivos de ansiedade no teste de campo aberto durante 5 minutos na exposição crônica nos grupos Controle (não exposto à fluoxetina) e grupos expostos à fluoxetina (Flu), Flu, 0,54 µg/L e Flu 5,4 µg/L, nos dias 0 (pré-tratamento), 1, 7, 14 e 21. (A) Tempo na periferia (em segundos). (B) Congelamento (em segundos). (C) Frequência de congelamento. (D) Frequência de movimentos erráticos. Barras de erro representam erro padrão (n = 18). Os dados paramétricos foram submetidos à ANOVA one-way (pós-teste de LSD) e os dados não paramétricos foram submetidos ao teste de Kruskal-Wallis (pós-teste Dunn), comparando os grupos em cada período (\* $P < 0,05$ ), ao nível de probabilidade de 5%. Sumário estatístico: (A) 0 Dia:  $F=0,27$ ,  $p=0,7$ ; Dia 1º:  $H=0,60$ ,  $p=0,7$ ; 7º Dia:  $F=1,23$ ,  $p=0,2$ ; 14º Dia:  $F=0,41$ ,  $p=0,61$ ; 21º Dia:  $F=0,87$ ,  $p=0,5$ . (B) 0 Dia:  $H=2,26$ ,  $p=0,6$ ; 1º Dia:  $H=8,13$ ,  $p=0,01$ ; 7º Dia:  $H=1,33$ ,  $p=0,5$ ; 14º Dia:  $H=1,33$ ,  $p=0,3$ ; 21º Dia:  $H=3,17$ ,  $p=0,1$ . (C) 0 Dia:  $H=2,26$ ,  $p=0,6$ ; 1º Dia:  $H=8,13$ ,  $p=0,01$ ; 7º Dia:  $H=1,33$ ,  $p=0,5$ ; 14º Dia:  $H=1,33$ ,  $p=0,3$ ; 21º Dia:  $H=3,17$ ,  $p=0,1$ . (D) 0 Dia:  $H=2,00$ ,  $p=0,3$ ; 1º Dia:  $H=7,62$ ,  $p=0,02$ ; 7º Dia:  $H=2,30$ ,  $p=0,3$ ; 14º Dia:  $H=1,80$ ,  $p=0,3$ ; 21º Dia:  $H=3,24$ ,  $p=0,1$ .

No teste de campo aberto, foi observado que a exposição aguda à fluoxetina aumentou o tempo na periferia em 24 horas na concentração 0,54 µg/L (Figura 9A), mas não apresentou diferenças estatísticas no tempo em congelamento (Figura 9B), frequência de congelamento (Figura 9C) e frequência de movimentos erráticos (Figura 9D). Já na exposição crônica à

fluoxetina identificamos uma diminuição do tempo no comportamento de congelamento no 1º dia de exposição na concentração 5,4 µg/L (Figura 10B), frequência de congelamento na concentração 5,4 µg/L de fluoxetina, conforme Figura 10C e frequência de movimentos erráticos no 21º dia de exposição em ambas concentrações (Figura 10D). Não houve diferença significativa no tempo na periferia do aparato (Figura 10A).

Os resultados do teste de campo aberto evidenciam alterações comportamentais preditivas de ansiedade ao aumentar o tempo na periferia do aparato na exposição aguda e ao reduzir o tempo de congelamento, a frequência de congelamento e movimentos erráticos. Essas alterações comportamentais identificadas em nosso trabalho são preocupantes, pois em ambientes naturais o zebrafish tende a permanecer na periferia do aparato para proteção, apresentando um comportamento de congelamento e movimentos erráticos em situações de medo, para fugir de situações perigosas como por exemplo, a fuga de um predador. (Grossman et al., 2010). Essas alterações comportamentais são ecologicamente importantes, pois a tigmotaxia é caracterizada pela permanência nas periferias, proporcionando um comportamento defensivo que pode ser evidenciado em ambientes novos, aversivos e perigosos, ambientes que gere um desconforto ao peixe (Gerlai, 2010; Gebauer et al., 2011).

Há uma observação interessante dos resultados neste estudo em relação ao comportamento de permanecer na periferia do aparato comparando os resultados do teste campo aberto. Na exposição aguda do teste campo aberto em baixa dosagem, temos um resultado ansiogênico, entretanto, no mesmo teste na exposição crônica, independente da concentração da fluoxetina, não há diferença estatística no tempo de permanência na periferia. Esse resultado corrobora com estudos anteriores utilizando o zebrafish em exposições agudas e crônicas com dosagens mais elevadas e diferente via de administração, confirmando que os efeitos podem ser divergentes, conforme o tempo de exposição e dosagem (Maximino et al., 2013; 2014).

Segundo Maximino et al., (2013; 2014a) que também encontrou esse resultado ansiogênico em seus estudos com zebrafish em concentrações mais elevadas do que as utilizadas em nosso trabalho e via intraperitoneal, mesmo que os ISRS tenham um efeito esperado de diminuição da ansiedade, em baixas dosagens ou em exposições de curto período, podem representar um efeito no aumento da ansiedade, contrariando o efeito farmacológico provavelmente esperado. Como por exemplo, em camundongos, a fluoxetina é indicada para redução da ansiedade, esse resultado ansiolítico geralmente é observado, mas em zebrafish, em

baixa dosagens ou em exposição aguda pode apresentar um efeito ansiogênico (Maximino et al., 2010a, 2014a; Stewart et al., 2014).

O teste de tanque novo, em que avalia o comportamento natural de permanecer na região do fundo do aparato, mergulhando, congelando e com poucas entradas na metade superior do aparato, como medida de proteção (Gebauer et al. 2011; Cachat et al. 2010; Egan et al. 2009), nossos resultados para exposição aguda à fluoxetina identificou alterações comportamentais ansiolíticas ao diminuir o tempo de congelamento na concentração 5,4  $\mu\text{g/L}$  em 72 horas (Figura 11D), na frequência de congelamento na concentração 0,54  $\mu\text{g/L}$  em 72 horas (Figura 11E), movimentos erráticos em 24 horas na concentração ambiental e em 72 horas em ambas concentrações (Figura 11F). Não houve diferença significativa na latência para o topo (Figura 11C) e no tempo no todo do aparato (Figura 11A). Já na exposição crônica à fluoxetina, o teste de tanque novo demonstra o mesmo efeito ansiolítico ao aumentar o tempo no topo do aparato no 1 ao 21º dia de exposição na concentração de 5,4  $\mu\text{g/L}$  e no 21º dia na concentração 0,54  $\mu\text{g/L}$  conforme ilustra a Figura 12A, aumento na frequência de transição na concentração 5,4  $\mu\text{g/L}$  no 1 e 14º (Figura 12B) e na latência para acessar o topo do aparato pela primeira vez na concentração 5,4  $\mu\text{g/L}$  no 1º ao 14º dia de exposição conforme ilustra a Figura 12C. Não houve diferença estatística no congelamento, frequência de congelamento e movimento errático, conforme Figuras 12D, E e F, respectivamente.

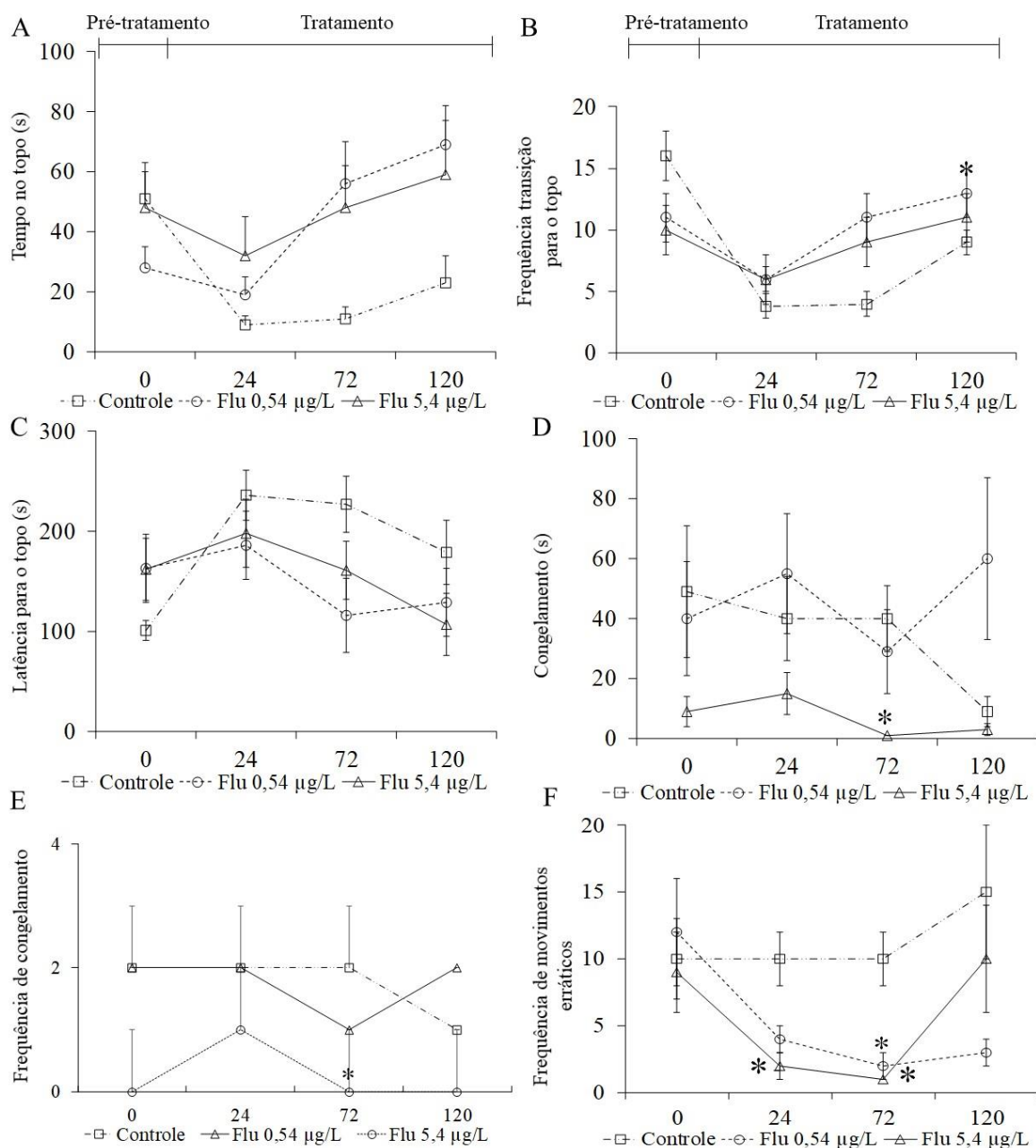


Figura 11. Comportamentos preditivos de ansiedade no teste de tanque novo avaliado pela preferência pelo topo/fundo durante seis minutos na exposição aguda nos grupos Controle (não exposto à fluoxetina) e grupos expostos à fluoxetina (Flu), Flu 0,54 µg/L e Flu 5,4 µg/L, a 0h (pré-tratamento), 24h, 72h e 120h. (A) Tempo no topo do aparato (em segundos). (B) Frequência de transição para o topo. (C) Latência para o topo (em segundos). (D) Congelamento (em segundos). (E) Frequência de congelamento. (F) Frequência de movimentos erráticos. Barras de erro representam erro padrão (n = 18). Os dados paramétricos foram submetidos à ANOVA one-way (pós-teste de LSD) e os dados não paramétricos foram submetidos ao teste de Kruskal-Wallis (pós-teste Dunn), comparando os grupos em cada período (\* $P < 0,05$ ), ao nível de probabilidade de 5%. Sumário estatístico: (A) 0h: 0h:  $F=3,29$ ,  $p=0,1$ ; 24h:  $F=0,71$ ,  $p=0,6$ ; 72h:  $H=6,07$ ,  $p=0,04$ ; 120h:  $H=4,40$ ,  $p=0,1$ . (B) 0h:  $H=2,03$ ,  $p=0,1$ ; 24h:  $H=0,58$ ,  $p=0,5$ ; 72h:  $H=3,89$ ,  $p=0,1$ ; 120h:  $F=3,58$ ,  $p=0,03$ . (C) 0h:  $F=1,27$ ,  $p=0,2$ ; 24h:  $F=0,70$ ,  $p=0,5$ ; 72h:  $F=3,08$ ,  $p=0,05$ ; 120h:  $F=1,28$ ,  $p=0,2$ . (D) 0h:  $H=0,95$ ,  $p=0,6$ ; 24h:  $H=3,18$ ,  $p=0,05$ ; 72h:  $H=4,76$ ,  $p=0,01$ ; 120h:  $H=3,78$ ,  $p=0,03$ . (E) 0h:  $H=2,82$ ,  $p=0,2$ ; 24h:  $H=1,40$ ,  $p=0,4$ ; 72h:  $H=8,53$ ,  $p=0,01$ ; 120h:  $H=2,07$ ,  $p=0,03$ . (F) 0h:  $F=0,13$ ,  $p=0,8$ ; 24h:  $H=9,87$ ,  $p=0,007$ ; 72h:  $H=15,28$ ,  $p=0,0005$ ; 120h:  $H=5,22$ ,  $p=0,07$ .

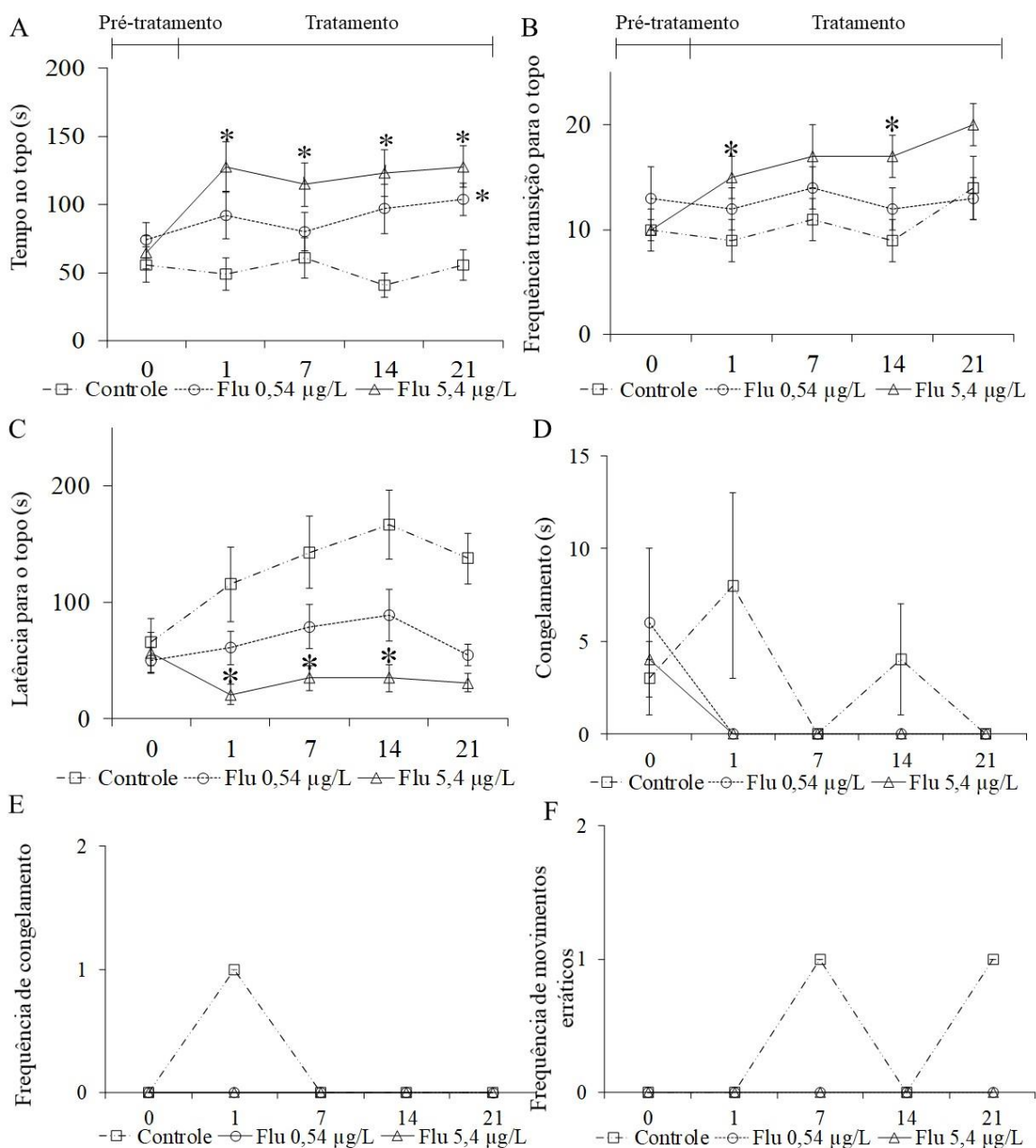


Figura 12. Comportamentos preditivos de ansiedade no teste de tanque novo avaliado pela preferência pelo topo/fundo durante seis minutos na exposição crônica nos grupos Controle (não exposto à fluoxetina) e grupos expostos à fluoxetina (Flu), Flu 0,54 µg/L e Flu 5,4 µg/L, nos dias 0 (pré-tratamento), 1, 7, 14 e 21. (A) Tempo no topo do aparato (em segundos). (B) Frequência de transição para o topo. (C) Latência para o topo (em segundos). (D) Congelamento (em segundos). (E) Frequência de congelamento. (F) Frequência de movimentos erráticos. Barras de erro representam erro padrão (n = 18). Os dados paramétricos foram submetidos à ANOVA one-way (pós-teste de LSD) e os dados não paramétricos foram submetidos ao teste de Kruskal-Wallis (pós-teste Dunn), comparando os grupos em cada período (\* $P < 0,05$ ), ao nível de probabilidade de 5%. Sumário estatístico: (A) 0 Dia:  $F=0,52$ ,  $p=0,60$ ; 1º Dia:  $F=5,96$ ,  $p=0,005$ ; 7º Dia:  $F=3,32$ ,  $p=0,04$ ; 14º Dia:  $H=12,66$ ,  $p=0,001$ ; 21º Dia:  $F=13,25$ ,  $p=0,001$ . (B) 0 Dia:  $F=0,97$ ,  $p=0,61$ ; 1º Dia:  $F=5,39$ ,  $p=0,06$ ; 7º Dia:  $F=1,49$ ,  $p=0,23$ ; 14º Dia:  $F=3,95$ ,  $p=0,02$ ; 21º Dia:  $F=2,79$ ,  $p=0,06$ . (C) 0 Dia:  $F=0,23$ ,  $p=0,79$ ; 1º Dia:  $H=10,72$ ,  $p=0,004$ ; 7º Dia:  $H=9,28$ ,  $p=0,009$ ; 14º Dia:  $H=14,39$ ,  $p=0,0007$ ; 21º Dia:  $H=08,01$ ,  $p=0,01$ . (D) 0 Dia:  $H=0,86$ ,  $p=0,64$ ; 1º Dia:  $H=2,26$ ,  $p=0,32$ ; 7º Dia:  $H=0,10$ ,  $p=0,94$ ; 14º Dia:  $H=0,80$ ,  $p=0,67$ ; 21º Dia:  $H=0,10$ ,  $p=0,94$ . (E) 0 Dia:  $H=1,39$ ,  $p=0,50$ ; 1º Dia:  $H=0,0004$ ,  $p=0,99$ ; 7º Dia:  $H=0,78$ ,  $p=0,67$ ; 14º Dia:  $H=1,74$ ,  $p=0,41$ ; 21º Dia:  $H=0,10$ ,  $p=0,94$ . (F) 0 Dia:  $H=0,47$ ,  $p=0,78$ ; 1º Dia:  $H=1,68$ ,  $p=0,43$ ; 7º Dia:  $H=2,29$ ,  $p=0,31$ ; 14º Dia:  $H=1,4$ ,  $p=0,41$ ; 21º Dia:  $H=5,14$ ,  $p=0,07$ .



A fluoxetina em exposição aguda e crônica neste teste de tanque novo alteraram comportamentos preditivos de ansiedade, causando uma diminuição da ansiedade, que podem gerar preocupações ecológicas relevantes, tendo em vista que, em ambiente natural, o zebrafish tende a permanecer mais tempo no fundo, comportamento chamado de geotaxia, apresentando congelamento e movimentos erráticos, como medidas de proteção em situação de perigo (Tran & Gerlai, 2016; Kysil et al., 2017; Egan et al., 2009; Wong et al., 2010). Alguns autores também observaram esse efeito ansiolítico em seus resultados no teste de tanque novo utilizando doses altas de fluoxetina em zebrafish, corroborando com os resultados obtidos em nosso estudo (Maximino et al. 2013; Cachat et al., 2010).

Nossos resultados dos testes de claro/escuro, campo aberto e tanque novo evidenciam que a fluoxetina mesmo em dosagens ambientalmente relevante altera alguns parâmetros de comportamentos preditivos de ansiedade. Neste sentido, segundo Margiotta-Casaluci et al., (2014), em seu trabalho com *Pimephales promelas*, peixe de água doce, identificou que com 38 µg/L de fluoxetina já induzia significativamente a resposta ansiolítica, demonstrando que a resposta comportamental é dependente da dose administrada. Ainda segundo a autora, as respostas ansiolíticas produzidas pela fluoxetina em peixes foram consideradas semelhantes aos efeitos terapêuticos em humanos, pois causaram diminuição da ansiedade, conforme testado no exposto a 72 µg/L de fluoxetina no teste de tanque novo, causando o comportamento de passar mais tempo na parte superior do tanque bem como maior frequência de transição.

### **3.2. Agressividade**

O teste de espelho, em que avalia o comportamento predito de agressividade, no qual a imagem espelhada representa para este animal como outro indivíduo, estabelecendo um conflito com o espelho (Mustafa et al., 2019; Zabegalov et al., 2019; Norton et al., 2011), nossos resultados não tiveram diferenças significativas na exposição aguda à fluoxetina no tempo na zona 1 (zona de aversão, 17,5 cm do espelho) conforme Figura 13B, tempo na zona 2 (zona de aproximação, 2,5 cm do espelho) (Figura 13A), tempo em ataques ao espelho e frequência de ataque conforme ilustra na Figura 13C e D, respectivamente. Entretanto, na exposição crônica houve aumento no tempo em ataque no espelho no 7º dia de exposição à fluoxetina na concentração 5,4 µg/L (Figura 14, C) e no tempo na zona 2 (zona de aproximação, 2,5 cm do espelho) (Figura 14A). Não houve diferença estatística no tempo na zona 1 (zona de aversão, 17,5 cm do espelho) e frequência de ataque conforme Figura 14B e D, respectivamente.

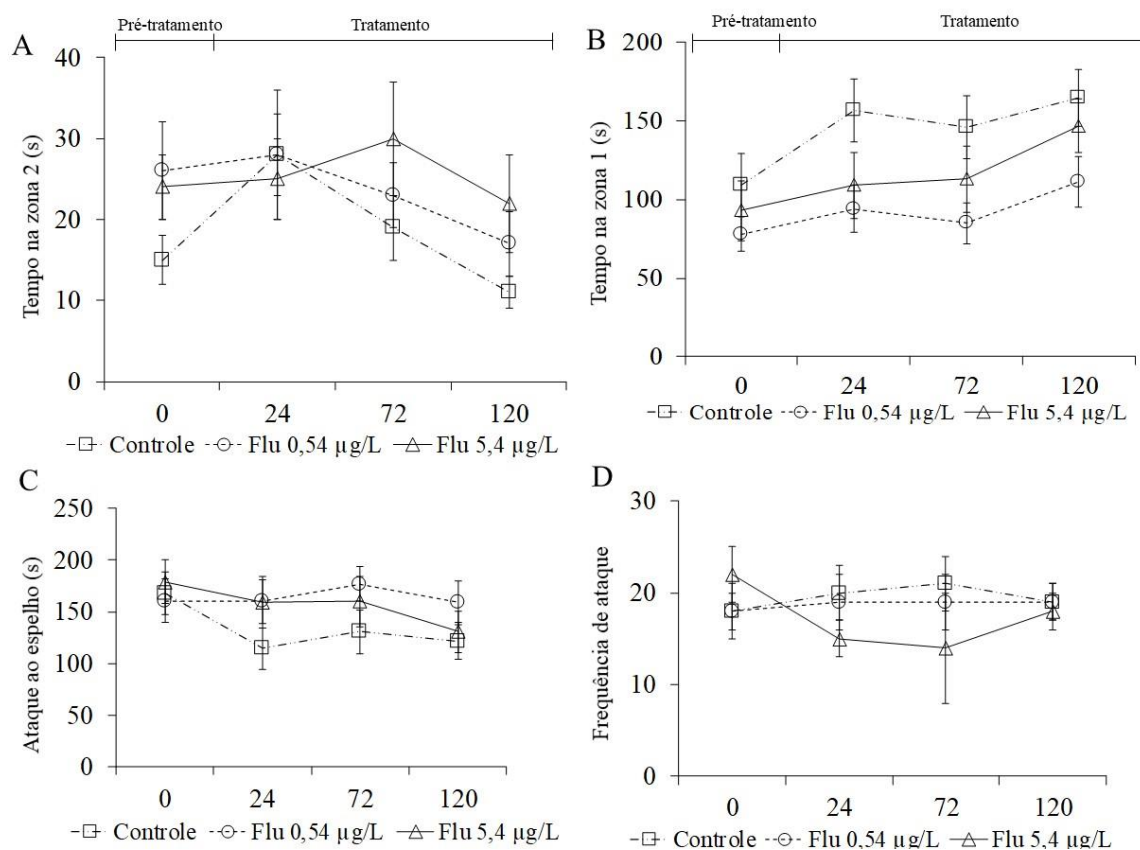


Figura 12. Comportamentos preditivos de ansiedade no teste do espelho durante cinco minutos na exposição aguda nos grupos Controle (não exposto à fluoxetina) e grupos expostos à fluoxetina (Flu), Flu 0,54 µg/L e Flu 5,4 µg/L, a 0h (pré-tratamento), 24h, 72h e 120h. (A) Tempo na zona 2 (Zona de aproximação; 2,5 cm do espelho) (em segundos). (B) Tempo na zona 1 (zona de aversão, 17,5 cm do espelho) (em segundos). (C) Ataques ao espelho (em segundos). (D) Frequência de ataques ao espelho. Barras de erro representam erro padrão (n = 18). Os dados paramétricos foram submetidos à ANOVA one-way (pós-teste de LSD) e os dados não paramétricos foram submetidos ao teste de Kruskal-Wallis (pós-teste Dunn), comparando os grupos em cada período ( $*P < 0,05$ ), ao nível de probabilidade de 5%. Sumário estatístico: (A) 0h:  $F=0,47$ ,  $p=0,5$ ; 24h:  $F=0,06$ ,  $p=0,9$ ; 72h:  $H=1,25$ ,  $p=0,5$ ; 120h:  $H=0,84$ ,  $p=0,6$ . (B) 0h:  $F=0,84$ ,  $p=0,5$ ; 24h:  $F=3,08$ ,  $p=0,05$ ; 72h:  $F=2,85$ ,  $p=0,06$ ; 120h:  $F=2,55$ ,  $p=0,08$ . (C) 0h:  $F=0,65$ ,  $p=0,5$ ; 24h:  $F=1,87$ ,  $p=0,3$ ; 72h:  $F=1,94$ ,  $p=0,1$ ; 120h:  $F=0,13$ ,  $p=0,8$ . (D) 0h:  $F=0,84$ ,  $p=0,5$ ; 24h:  $F=3,08$ ,  $p=0,05$ ; 72h:  $F=2,85$ ,  $p=0,06$ ; 120h:  $F=2,55$ ,  $p=0,08$ .

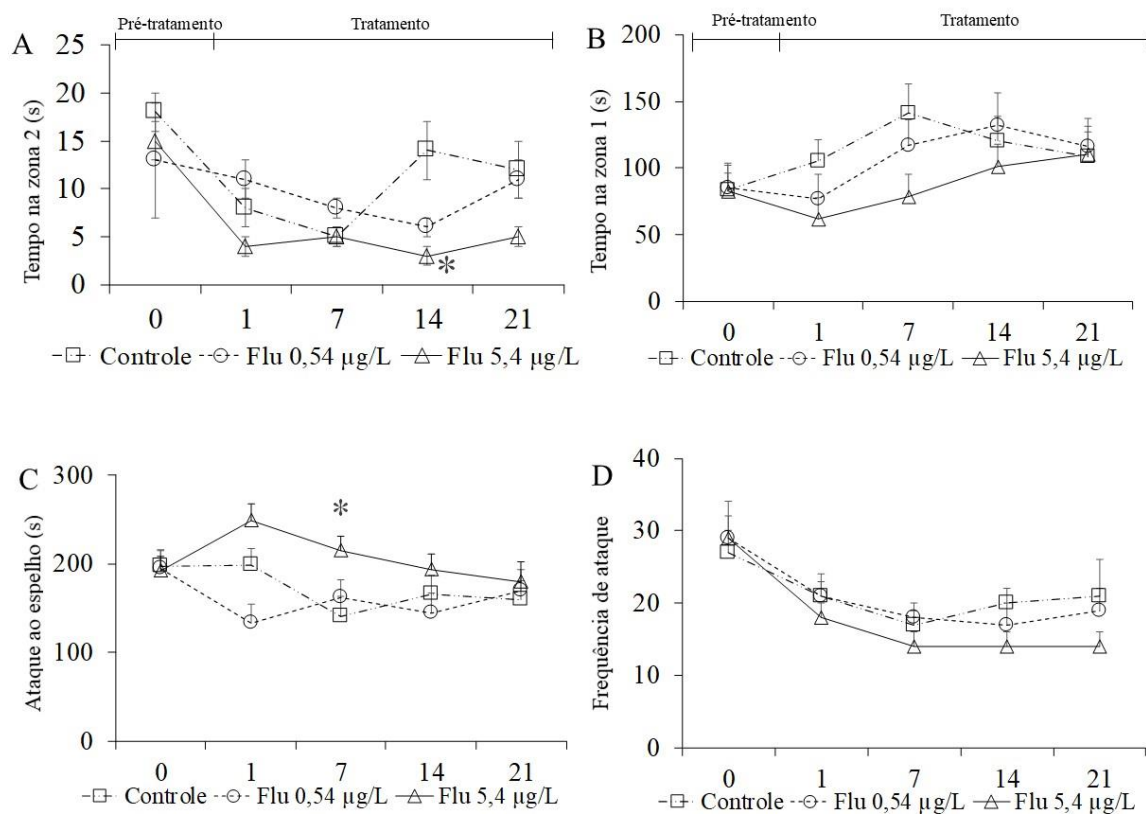


Figura 14. Comportamentos preditivos de ansiedade no teste do espelho durante cinco minutos na exposição crônica nos grupos Controle (não exposto à fluoxetina) e grupos expostos à fluoxetina (Flu), Flu 0,54 µg/L e Flu 5,4 µg/L, nos dias 0 (pré-tratamento), 1, 7, 14 e 21. (A) Tempo na zona 2 (Zona de aproximação; 2,5 cm do espelho) (em segundos). (B) Tempo na zona 1 (zona de aversão, 17,5 cm do espelho) (em segundos). (C) Ataques ao espelho (em segundos). (D) Frequência de ataques ao espelho. Barras de erro representam erro padrão (n = 18). Os dados paramétricos foram submetidos à ANOVA one-way (pós-teste de LSD) e os dados não paramétricos foram submetidos ao teste de Kruskal-Wallis (pós-teste Dunn), comparando os grupos em cada período (\* $P < 0,05$ ), ao nível de probabilidade de 5%. Sumário estatístico: (A) Dia:  $F=0,87$ ,  $p=0,57$ ; 1º Dia:  $H=6,54$ ,  $p=0,38$ ; 7º Dia:  $H=1,31$ ,  $p=0,27$ ; 14º Dia:  $H=8,58$ ,  $p=0,01$ ; 21º Dia:  $H=5,65$ ,  $p=0,05$ . (B) Dia 0:  $F=0,005$ ,  $p=0,99$ ; 1º Dia:  $F=1,72$ ,  $p=0,18$ ; 7º Dia:  $F=2,72$ ,  $p=0,07$ ; 14º Dia:  $F=0,59$ ,  $p=0,56$ ; 21º Dia:  $F=0,033$ ,  $p=0,96$ . (C) Dia 0:  $F=0,01$ ,  $p=0,98$ ; 1º Dia:  $F=1,04$ ,  $p=0,95$ ; 7º Dia:  $F=3,85$ ,  $p=0,02$ ; 14º Dia:  $F=1,51$ ,  $p=0,22$ ; 21º Dia:  $F=0,18$ ,  $p=0,83$ . (D) Dia 0:  $H=0,1$ ,  $p=0,94$ ; 1º Dia:  $F=0,57$ ,  $p=0,57$ ; 7º Dia:  $F=0,92$ ,  $p=0,59$ ; 14º Dia:  $F=1,84$ ,  $p=0,16$ ; 21º Dia:  $F=1,85$ ,  $p=0,39$ .

Segundo Cachat et al., (2013) e Theodoridi et al., (2017), esses parâmetros comportamentais que observamos em nosso estudo, como tempo em ataques ao espelho, frequência de ataques, tempo nas zonas de aproximação e aversão são comportamentos preditivos de agressividade e são sensíveis aos inibidores de recaptção de serotonina. Qualquer alteração na agressividade podem gerar consequências ecológicas pois a agressividade é um comportamento de suma importância ecológica para as espécies, influenciando diretamente na sobrevivência, defesa, sucesso evolutivo e na organização social, pois auxiliam na formação de hierarquia, em que os animais mais agressivos tendem a ser mais ousados e exploradores (Norton et al., 2011; Theodoridi et al., 2017; Zabegalov et al., 2019).

Apesar do zebrafish ser considerado uma espécie sociável, possui comportamento agressivo expresso no estabelecimento e manutenção hierárquica (Mustafa et al., 2019; Zabegalov et al., 2019; Norton et al., 2011). Porém, não está claro qual o motivo da manifestação dessa agressividade, se deve à hierarquia social ou à fatores genéticos, neurofisiológicos ou hormonais (Way et al., 2015). Esse aumento da agressividade, atacando à imagem espelhada, também foi identificado no trabalho de Norton et al., (2011) com zebrafish expostos a 3 µg/ml de fluoxetina em exposição aguda.

Portanto, em nossos resultados, identificamos aumento da agressividade na exposição crônica, no entanto, existe muita contradição nos resultados de aumento (Norton et al., 2011; Wolkers et al., 2016; McDonald et al., 2011) ou diminuição (Clotfelter et al., 2007) da agressividade quando se expõe organismos à fluoxetina e avalia parâmetros comportamentais preditivos de agressividade, pois espera-se que haja resposta farmacológica de redução de ansiedade (Clotfelter et al., 2007).

Essas divergências no comportamento preditivo de ansiedade podem ser explicadas por alguns autores pela metodologia, administração, dosagem e tempo de exposição à fluoxetina. Deve-se ressaltar que utilizamos a mesma proporção para machos e fêmeas em tamanho e idade uniforme, mas na literatura, a idade, o sexo e o status social podem afetar essa resposta. Apesar de se esperar que os ISRSs promovam diminuição da agressão, o estresse durante e após a perda de uma luta, também pode modular esse comportamento, ocasionando aumento da agressividade, para diminuir a submissão após a derrota social, de modo a diminuir a serotonina nos dominantes e aumentar nos subordinados (Rillich & Stevenson, 2018; Clotfelter et al., 2007). Outra explicação para o aumento da agressividade pode estar relacionada ao aumento da ousadia, uma vez que peixes mais ousados podem apresentar maior agressividade (Wolkers et al., 2017).

A ansiedade e o medo são emoções importantes para garantir a sobrevivência em situações de perigo ou vigilância. Os resultados obtidos após a exposição do zebrafish à fluoxetina causaram alterações comportamentais ao reduzir os comportamentos preditivos de ansiedade e agressividade, de forma que ficaram mais expostos à predação ao gastar mais tempo no topo e ao passar mais tempo no compartimento claro. Algumas estratégias são importantes no comportamento do zebrafish como o ato de congelar para que o animal fique em segurança e o movimento errático pode garantir uma fuga diante uma situação de perigo (Kysil et al. 2017; Meshalkina et al. 2017).

Os efeitos comportamentais aqui encontrados se referem ao tempo de exposição aguda e crônica, durante cinco dias e vinte e um dias, respectivamente. No entanto, fármacos dispostos nos ambientes aquáticos expõem os organismos durante toda a sua vida, com possibilidade de bioacumulação (Margiotta-Casaluci et al., 2014; Panlilio et al., 2016; Sumpter et al., 2014), podendo causar danos mais severos em função da exposição prolongada. Neste sentido, pequenas alterações provenientes de poluição farmacológica podem trazer problemas ecológicos negativos para o organismo, necessitando de estudos cada vez mais completos para avaliar a ecotoxicidade em ambientes aquáticos (Fent, et al., 2006; Brodin et al., 2013).

#### 4. CONCLUSÃO

Nosso estudo obteve resultados consistentes de que a fluoxetina em concentração ambiental e dez vezes superior, em exposição aguda e crônica, causa alterações comportamentais preditivas de ansiedade e agressividade em *Danio rerio*. Portanto, as alterações comportamentais aqui avaliadas são preocupantes ecologicamente, pois é possível que os efeitos encontrados em zebrafish possam ocorrer em outras espécies e grupos de vertebrados que vivem no ambiente aquático ou consomem água contaminada com o fármaco, podendo contaminar a comunidade aquática e impactar parâmetros que interferem na sobrevivência e reprodução dos organismos.

#### 5. REFERÊNCIAS

- ABREU, M. S. et al. The smell of “anxiety”: Behavioral modulation by experimental anosmia in zebrafish. **Physiology and Behavior**, v. 157, p. 67–71, 2016.
- ARAÚJO, J. et al. Behavioral and Pharmacological Aspects of Anxiety in the Light/Dark Preference Test. In: [s.l: s.n.]. p. 191–202.
- AYRES, M.; JUNIOR AYRES, M. BioEstat 2.0: aplicações estatísticas nas áreas das ciências biológicas e médicas. **BioEstat 2.0: aplicações estatísticas nas áreas das ciências biológicas e médicas**, 2000.
- BARRY, M. J. Effects of fluoxetine on the swimming and behavioural responses of the Arabian killifish. **Ecotoxicology**, v. 22, n. 2, p. 425–432, 2013.
- BLASER, R. E.; CHADWICK, L.; MCGINNIS, G. C. Behavioral measures of anxiety in zebrafish (*Danio rerio*). **Behavioural Brain Research**, v. 208, n. 1, p. 56–62, 2010.
- BRODIN, T. et al. Dilute concentrations of a psychiatric drug alter behavior of fish from natural populations. **Science**, v. 339, n. 6121, p. 814–815, 2013.

- BRODIN, T. et al. Ecological effects of pharmaceuticals in aquatic systems—impacts through behavioural alterations. **Philosophical Transactions of The Royal Society B**, v. 369, p. 1–10, 2014.
- BROOKS, B. W. et al. Aquatic ecotoxicology of fluoxetine. **Toxicology Letters**, v. 142, n. 3, p. 169–183, 2003.
- CACHAT, J. et al. Measuring behavioral and endocrine responses to novelty stress in adult zebrafish. **Nature Protocols**, v. 5, n. 11, p. 1786–1799, 2010.
- CACHAT, J. et al. Unique and potent effects of acute ibogaine on zebrafish: The developing utility of novel aquatic models for hallucinogenic drug research. **Behavioural Brain Research**, v. 236, n. 1, p. 258–269, 2013.
- CALISTO, V.; ESTEVES, V. I. Psychiatric pharmaceuticals in the environment. **Chemosphere**, v. 77, n. 10, p. 1257–1274, 2009.
- CERVENY, D. et al. Bioconcentration and behavioral effects of four benzodiazepines and their environmentally relevant mixture in wild fish. **Science of the Total Environment**, v. 702, p. 134780, 2020.
- CLIFT, D. et al. High-Throughput Analysis of Behavior in Zebrafish Larvae: Effects of Feeding. **Zebrafish**, v. 11, n. 5, p. 455–461, 2014.
- DE ABREU, M. S. et al. Diazepam and fluoxetine decrease the stress response in zebrafish. **PLoS ONE**, v. 9, n. 7, p. 1–5, 2014.
- DZIEWECZYNSKI, T. L.; HEBERT, O. L. Fluoxetine alters behavioral consistency of aggression and courtship in male Siamese fighting fish, *Betta splendens*. **Physiology and Behavior**, v. 107, n. 1, p. 92–97, 2012.
- EGAN, R. J. et al. Understanding behavioral and physiological phenotypes of stress and anxiety in zebrafish. **Behavioural Brain Research**, v. 205, n. 1, p. 38–44, 2009.
- FACCIOL, A.; TRAN, S.; GERLAI, R. Re-examining the factors affecting choice in the light–dark preference test in zebrafish. **Behavioural Brain Research**, v. 327, p. 21–28, 1 jun. 2017.
- FENT, K.; WESTON, A. A.; CAMINADA, D. Ecotoxicology of human pharmaceuticals. **Aquatic Toxicology**, v. 76, n. 2, p. 122–159, 2006.
- FERNANDES, M. J. et al. Antibiotics and antidepressants occurrence in surface waters and sediments collected in the north of Portugal. **Chemosphere**, v. 239, 2020.
- FONTANA, B. D. et al. Taurine modulates acute ethanol-induced social behavioral deficits and fear responses in adult zebrafish. **Journal of Psychiatric Research**, v. 104, n. August, p. 176–182, 2018a.
- FONTANA, B. D. et al. The developing utility of zebrafish models of neurological and neuropsychiatric disorders: A critical review. **Experimental Neurology**, jan. 2018b.
- FORD, A. T. et al. The effects of fluoxetine on attachment and righting behaviours in marine (*Gibbula unibilicalis*) and freshwater (*Lymnea stagnalis*) gastropods. **Ecotoxicology**, v. 27, n.

4, p. 477–484, 1 maio 2018.

FORD, A. T.; FONG, P. P. The effects of antidepressants appear to be rapid and at environmentally relevant concentrations. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 35, n. 4, p. 794–798, 1 abr. 2016.

GEBAUER, D. L. et al. Effects of anxiolytics in zebrafish: Similarities and differences between benzodiazepines, buspirone and ethanol. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 99, n. 3, p. 480–486, 2011.

GERLAI, R. **Zebrafish antipredatory responses: A future for translational research?** **Behavioural Brain Research**, 5 mar. 2010.

GROSSMAN, L. et al. Characterization of behavioral and endocrine effects of LSD on zebrafish. **Behavioural Brain Research**, v. 214, n. 2, p. 277–284, 2010.

HOLMBERG, A. et al. Does waterborne citalopram affect the aggressive and sexual behaviour of rainbow trout and guppy? **Journal of Hazardous Materials**, v. 187, n. 1–3, p. 596–599, 2011.

HOPE, B. V.; HAMILTON, T. J.; HURD, P. L. Submerged plus maze: A novel test for studying anxiety-like behaviour in fish. **Behavioural Brain Research**, v. 362, n. August 2018, p. 332–337, 2019.

KALUEFF, A. V. et al. Zebrafish neurobehavioral phenomics for aquatic neuropharmacology and toxicology research. **Aquatic Toxicology**, v. 170, p. 297–309, jan. 2016.

KIM, S. D. et al. Occurrence and removal of pharmaceuticals and endocrine disruptors in South Korean surface, drinking, and waste waters. **Water Research**, v. 41, n. 5, p. 1013–1021, 2007.

KÜMMERER, K. From a problem to a business opportunity-design of pharmaceuticals for environmental biodegradability. **Sustainable Chemistry and Pharmacy**, v. 12, n. March, p. 100136, 2019.

KWON, J. W.; ARMBRUST, K. L. Laboratory persistence and fate of fluoxetine in aquatic environments. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 25, n. 10, p. 2561–2568, 2006.

KYSIL, E. V. et al. Comparative Analyses of Zebrafish Anxiety-Like Behavior Using Conflict-Based Novelty Tests. **Zebrafish**, v. 14, n. 3, p. 197–208, 2017.

LARANJEIRA, D. R. A. D. S. Avaliação do risco ambiental da fluoxeti a em sedimentos marinhos para invertebrados aquáticos. 2019. 115 p. **Tese (Doutorado em Tecnologia Nuclear), Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, IPEN-CNEN/SP, São Paulo.** Disponível em: <[www.teses.usp.br](http://www.teses.usp.br)>.

MARGIOTTA-CASALUCI, L. et al. Quantitative cross-species extrapolation between humans and fish: The case of the anti-depressant fluoxetine. **PLoS ONE**, v. 9, n. 10, 2014.

MARTÍNEZ BUENO, M. J. et al. Application of liquid chromatography/quadrupole-linear ion trap mass spectrometry and time-of-flight mass spectrometry to the determination of pharmaceuticals and related contaminants in wastewater. **Analytical Chemistry**, v. 79, n. 24, p. 9372–9384, 15 dez. 2007.

MAXIMINO, C. et al. Scototaxis as anxiety-like behavior in fish. **Nature Protocols**, v. 5, n. 2, p. 221–228, 2010a.

MAXIMINO, C. et al. Parametric analyses of anxiety in zebrafish scototaxis. **Behavioural Brain Research**, v. 210, n. 1, p. 1–7, 2010b.

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

MAXIMINO, C. et al. Possible role of serotonergic system in the neurobehavioral impairment induced by acute methylmercury exposure in zebrafish (*Danio rerio*). **Neurotoxicology and Teratology**, v. 33, n. 6, p. 727–734, 2011b.

MAXIMINO, C. et al. A comparison of the light/dark and novel tank tests in zebrafish. **Behaviour**, v. 149, p. 1099–1123, 2012.

MAXIMINO, C. et al. Role of serotonin in zebrafish (*Danio rerio*) anxiety: Relationship with serotonin levels and effect of buspirone, WAY 100635, SB 224289, fluoxetine and parachlorophenylalanine (pCPA) in two behavioral models. **Neuropharmacology**, v. 71, p. 83–97, 2013.

MAXIMINO, C. et al. Fluoxetine and WAY 100,635 dissociate increases in scototaxis and analgesia induced by conspecific alarm substance in zebrafish (*Danio rerio* Hamilton 1822). **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 124, p. 425–433, 2014.

MCDONALD, M. D.; GONZALEZ, A.; SLOMAN, K. A. Higher levels of aggression are observed in socially dominant toadfish treated with the selective serotonin reuptake inhibitor, fluoxetine. **Comparative Biochemistry and Physiology, Part C**, v. 153, p. 107112, 2011.

MENNIGEN, J. A. et al. Waterborne fluoxetine disrupts feeding and energy metabolism in the goldfish *Carassius auratus*. **Aquatic Toxicology**, v. 100, p. 128–137, 2010.

MESHALKINA, D. A. et al. Understanding zebrafish cognition. **Behavioural Processes**, v. 141, p. 229–241, 2017.

MEZZOMO, N. J. et al. The role of taurine on anxiety-like behaviors in zebrafish: A comparative study using the novel tank and the light-dark tasks. **Neuroscience Letters**, v. 613, p. 19–24, 2016.

MUSTAFA, A. et al. The aggressive spiegelanio, carrying a mutation in the *fgfr1a* gene, has no advantage in dyadic fights with zebrafish of the AB strain. **Behavioural Brain Research**, v. 370, n. February, p. 111942, 2019.

NEWMAN, M. et al. Zebrafish as a tool in Alzheimer's disease research. **Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease**, v. 1812, n. 3, p. 346–352, 2011.

NORTON, W. H. J. et al. Modulation of *fgfr1a* signaling in zebrafish reveals a genetic basis for the aggression-boldness syndrome. **Journal of Neuroscience**, v. 31, n. 39, p. 13796–13807, 2011.

OECD (2017), Health at a Glance 2017: OECD Indicators, **OECD Publishing**, Paris. [http://dx.doi.org/10.1787/health\\_glance-2017-em](http://dx.doi.org/10.1787/health_glance-2017-em)



OECD (2014), *Fit Mind, Fit Job: From Evidence to Practice in Mental Health and Work*, **OECD Publishing**. doi: 10.1787/9789264228283-en

PANLILIO, J. M. et al. Treatment with the selective serotonin reuptake inhibitor, fluoxetine, attenuates the fish hypoxia response. **Scientific Reports**, v. 6, n. June, p. 1–12, 2016.

PARK, J. S. et al. Innate color preference of zebrafish and its use in behavioral analyses. **Molecules and Cells**, v. 39, n. 10, p. 750–755, 1 out. 2016.

PERREAULT, H. A. N.; SEMSAR, K.; GODWIN, J. Fluoxetine treatment decreases territorial aggression in a coral reef fish. **Physiology and Behavior**, v. 79, n. 4–5, p. 719–724, 2003.

PHAM, M. et al. Zebrafish Protocols for Neurobehavioral Research. v. 66, n. June, 2012.

QUADROS, V. A. et al. Strain- and context-dependent behavioural responses of acute alarm substance exposure in zebrafish. **Behavioural Processes**, v. 122, p. 1–11, 2016.

RAND-WEAVER, M. et al. The read-across hypothesis and environmental risk assessment of pharmaceuticals. **Environmental Science and Technology**, v. 47, n. 20, p. 11384–11395, 2013.

RICHEHNDRFER, H. et al. On the edge: Pharmacological evidence for anxiety-related behavior in zebrafish larvae. **Behavioural Brain Research**, v. 228, p. 99–106, 2012.

ROSEMBERG, D. B. et al. Differences in spatio-temporal behavior of zebrafish in the open tank paradigm after a short-period confinement into dark and bright environments. **PLoS ONE**, v. 6, n. 5, 2011.

SCHNÖRR, S. J. et al. Measuring thigmotaxis in larval zebrafish. **Behavioural Brain Research**, v. 228, n. 2, p. 367–374, 17 mar. 2012.

SCHULTZ, M. M. et al. Selective uptake and biological consequences of environmentally relevant antidepressant pharmaceutical exposures on male fathead minnows. **Aquatic Toxicology**, v. 104, p. 38–47, 2011.

STEWART, A. M. et al. Aquatic toxicology of fluoxetine: Understanding the knowns and the unknowns. **Aquatic Toxicology**, v. 156, p. 269–273, 2014.

STEWART, A. M. et al. Molecular psychiatry of zebrafish. **Molecular Psychiatry**, v. 20, n. 1, p. 2–17, 2015.

STYRISHAVE, B.; HALLING-SØRENSEN, B.; INGERSLEV, F. Environmental risk assessment of three selective serotonin reuptake inhibitors in the aquatic environment: A case study including a cocktail scenario. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 30, n. 1, p. 254–261, 2011.

SUMPTER, J. P.; DONNACHIE, R. L.; JOHNSON, A. C. The apparently very variable potency of the anti-depressant fluoxetine. **Aquatic Toxicology**, v. 151, p. 57–60, 2014.

SUMPTER, J. P.; MARGIOTTA-CASALUCI, L. Are some invertebrates exquisitely sensitive to the human pharmaceutical Fluoxetine? **Aquatic Toxicology**, v. 146, p. 259–260, 2014.

THEODORIDI, A.; TSALAFOUTA, A.; PAVLIDIS, M. Acute Exposure to Fluoxetine Alters Aggressive Behavior of Zebrafish and Expression of Genes Involved in Serotonergic System Regulation. **Frontiers in Neuroscience**, v. 11, n. April, p. 1–9, 2017.

TRAN, S.; GERLAI, R. The Novel Tank Test: Handling Stress and the Context Specific Psychopharmacology of Anxiety. **Current Psychopharmacology**, v. 5, n. 2, p. 169–179, 3 jun. 2016.

VERLICCHI, P.; AL AUKIDY, M.; ZAMBELLO, E. Occurrence of pharmaceutical compounds in urban wastewater: Removal, mass load and environmental risk after a secondary treatment-A review. **Science of the Total Environment**, 1 jul. 2012.

VYSTAVNA, Y. et al. Pharmaceuticals in rivers of two regions with contrasted socio-economic conditions: Occurrence, accumulation, and comparison for Ukraine and France. **Water, Air, and Soil Pollution**, v. 223, n. 5, p. 2111–2124, jun. 2012.

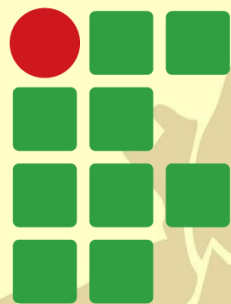
WANG, J. et al. Using a targeted ecopharmacovigilance intervention to control antibiotic pollution in a rural aquatic environment. **Science of the Total Environment**, v. 696, p. 134007, 2019.

WOLKERS, C. P. B. et al. Acute fluoxetine treatment increases aggressiveness in juvenile matrinxã (*Brycon amazonicus*). **Fish Physiology and Biochemistry**, v. 43, n. 3, p. 755–759, 2017.

WONG, K. et al. Analyzing habituation responses to novelty in zebrafish (*Danio rerio*). **Behavioural Brain Research**, v. 208, n. 2, p. 450–457, 2010.

ZABEGALOV, K. N. et al. Understanding zebrafish aggressive behavior. **Behavioural Processes**, v. 158, n. April 2018, p. 200–210, 2019.

ZAHID, H. et al. Diazepam fails to alter anxiety-like responses but affects motor function in a white-black test paradigm in larval zebrafish (*Danio rerio*). **Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry**, v. 83, n. January, p. 127–136, 2018.



**INSTITUTO  
FEDERAL**

Goiano

---

Campus  
Urutaí

