

CAPÍTULO VII

O Modelo *Zebrafish* e sua Contribuição ao Meio Ambiente

*Monica Lopes-Ferreira, Maria Alice Pimentel Falcão, Geonildo Rodrigo Disner,
Carla Lima

Unidade Imunorregulação, Laboratório de Toxinologia Aplicada, Instituto Butantan.
São Paulo-SP, Brasil

*monica.lopesferreira@butantan.gov.br

<https://doi.org/10.4322/978-65-86819-07-6-07>

RESUMO

A demanda crescente por água tem solidificado o seu reuso planejado, racional e eficiente a fim de evitar danos à saúde animal e de humanos. A água residual após o uso doméstico, comercial e industrial tem suas características naturais alteradas e necessita atender aos requisitos legais para que seja despejada como livre de poluentes e micropoluentes. A falta ou a ineficiência de tratamento das águas residuais pode acarretar queda da qualidade da água dos rios com comprometimento da fauna e flora. O *zebrafish* é uma ferramenta biológica de monitoramento de efeitos tóxicos integrada à química analítica, podendo gerar dossiês mais abrangentes e compreensivos das águas de bacias hidrográficas, represas, efluentes de águas residuais e de plantas de tratamentos de água, e principalmente de águas após desastres ambientais. Transparência no estágio embrio/larval, rápido desenvolvimento e alta taxa reprodutiva, ensaios em larga-escala e homologia genética com o ser humano fazem do *zebrafish* um excelente organismo-modelo. Este capítulo descreve as contribuições do *zebrafish* no monitoramento ambiental para grupos de poluentes, ratificando as contribuições do *zebrafish* para a ecotoxicologia.

Palavras chave: *Danio rerio*; Poluição; Ecotoxicologia; Ensaios Agudos; Desenvolvimento embrio-larval

INTRODUÇÃO

A ecotoxicologia se concentra na análise dos efeitos tóxicos sobre organismos vivos de substâncias químicas descartadas que alcançam o meio ambiente. Os estudos ecotoxicológicos englobam a compreensão da toxicidade de produtos químicos no ambiente terrestre e principalmente aquático, pois inevitavelmente as substâncias químicas presentes no solo são carregadas para os meios aquáticos pela chuva ou lixiviação e ainda os diversos resíduos domésticos e industriais são descartados diretamente nos corpos hídricos.

Em consequência à exposição aguda e principalmente de longo prazo a poluentes presentes na água, nos sedimentos e nos alimentos, espécies de peixes, incluindo as utilizadas na alimentação humana, vêm sendo afetadas apresentando significativas mudanças na atividade reprodutiva, no desenvolvimento embrionário e mudanças comportamentais. Esses efeitos tóxicos podem também ser vistos em humanos em decorrência do consumo de águas e de espécies aquáticas contaminadas (Swan et al., 2005; Jacobson et al., 2015).

As pesquisas ecotoxicológicas buscam entender os efeitos tóxicos em populações, comunidades e ecossistemas por meio da realização de testes padronizados que são capazes de prever pela avaliação de risco a utilização de compostos tóxicos novos ou reavaliar a utilização dos que estão em uso de acordo com a legislação ambiental. A avaliação ecotoxicológica, além de incluir o monitoramento dos níveis das substâncias e seus metabólitos em diversos estratos da cadeia alimentar em rios e estuários poluídos, inclui testes que determinam a toxicidade em modelos biológicos vivos como bactérias, algas, crustáceos e peixes (BTS, 2020).

Os peixes com seu papel próprio na cadeia trófica possuem capacidade de acumular substâncias tóxicas e são sensíveis a baixas dosagens de substâncias mutagênicas, características que os distinguem como sentinelas das alterações do ambiente aquático (Hussain et al., 2018). Estas características associadas ao fato de serem constituintes importantes da dieta humana vêm fazendo dos peixes modelos biológicos relevantes em testes de ecotoxicidade para estudos ambientais e de regulamentação.

O *zebrafish*, peixe tropical teleósteo da família *Cyprinidae* (*Danio rerio*), é um modelo vertebrado proeminente para o estudo de doenças humanas. Além de contribuir para a determinação da biossegurança de produtos farmacêuticos tornou-se um organismo-modelo para o rastreamento toxicológico de poluentes fornecendo resultados em um curto período de tempo, com alta rastreabilidade por menor custo comparativo. Além disso, o uso de embriões de *zebrafish* atende aos princípios de redução, substituição e refinamento proposto para o uso racional de animais experimentais, conhecido como Princípio dos 3R's (*Replacement, Reduction and Refinement*), definido originalmente por Russel & Burch em 1959.

Os principais benefícios do uso do *zebrafish* como modelo toxicológico em relação a outras espécies de vertebrados são: o seu tamanho, a facilidade de manejo e criação e o desenvolvimento precoce (Fig. 1). O pequeno tamanho do peixe juvenil (14 mm) e adulto (de 4 a 5 cm) reduz muito o espaço de acomodação e os custos de criação.

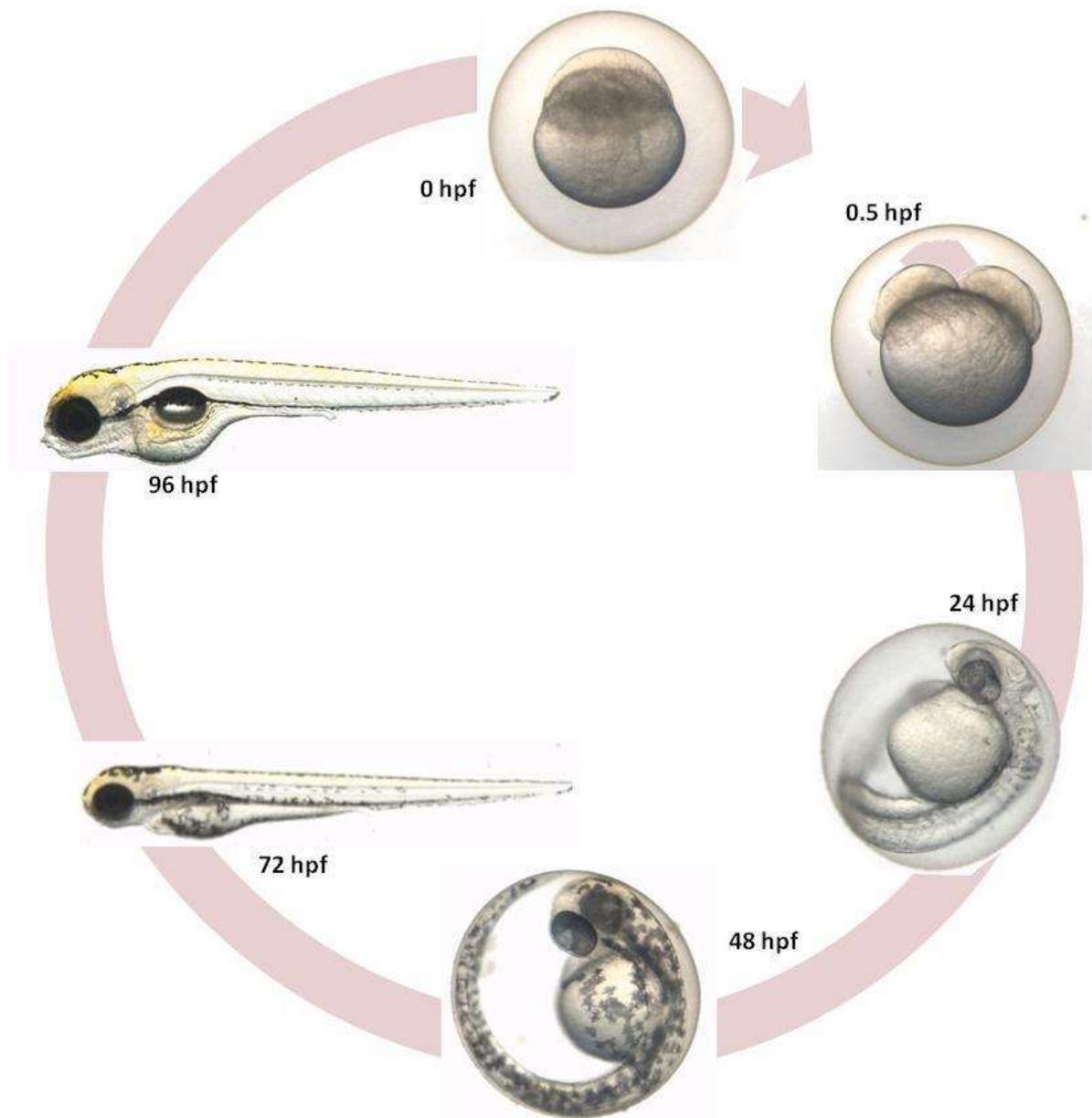


Fig. 1. Representação resumida do ciclo de vida embrio-larval do *zebrafish*. O *zebrafish* se desenvolve rapidamente a partir de um zigoto de uma célula. A gastrulação começa aproximadamente 6 horas após a fertilização (hpf), eclodindo após 2 dias como larvas de natação livre. Fotos: Plataforma *Zebrafish*®.

Em contraste com espécies maiores, o tamanho diminuto dos embriões (3,3 mm) e larvas (7,8 mm) de *zebrafish* minimiza os custos através do uso de baixas quantidades de soluções-teste (produtos químicos experimentais, drogas, poluentes) e, assim, cria volumes limitados de resíduos também para o descarte. Além disso, permite que várias amostras sejam testadas em paralelo usando uma única placa de cultura de células ou uma série de placas de Petri para fornecer várias repetições experimentais ao mesmo tempo (Fan et al., 2010).

As fêmeas podem desovar cerca de trezentos embriões por acasalamento, atribuindo alta fecundidade à espécie (Westerfield, 1995). Os embriões, assim como as larvas, são transparentes tornando a microscopia de luz uma útil ferramenta de análise (Meyers, 2018). A embriogênese ocorre *ex vivo* e se completa com 3 dias após a fertilização (Murayama et al., 2006). Sua transparência óptica permite fácil acompanhamento do desenvolvimento, identificação de características fenotípicas normais ou alteradas durante a triagem e avaliação dos pontos finais da toxicidade durante o teste de toxicidade.

O genoma do *zebrafish* completamente conhecido é composto de 25 pares de cromossomos contendo 26.000 genes codificantes de proteínas (Howe et al., 2013). O sequenciamento do genoma de *zebrafish* mostra aproximadamente 70% de homologia com genes humanos, porém 84% dos genes associados a doenças humanas possuem homologia em *zebrafish*, suportando o valor translacional do modelo de *zebrafish*.

Desde 1981, quando Streisinger e colaboradores (Streisinger et al., 1981) produziram um diplóide homozigoto para análises genéticas do desenvolvimento, o *zebrafish* vem sendo utilizado como um organismo-modelo para o estudo da frequência de mutações em resposta a contaminantes ambientais com potencial carcinogênico e teratogênico, bem como para descobrir os mecanismos de ação e efeitos específicos de contaminantes.

A Organização Internacional de Normatização (*International Organization for Standardization* - ISO) publicou pela primeira vez o teste de toxicidade em *zebrafish* em 1984. Posteriormente, vários países promulgaram sua própria lei de normatização do teste de toxicidade usando *zebrafish* de

acordo com a ISO 7346-1996, como o padrão britânico BS/EN/ISO 7346-3-1998, o padrão alemão DIN/EN/ISO 7346-3-1998 e o padrão chinês GB/T 13267-91. No Brasil, a Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT), responsável pelo desenvolvimento de protocolos de testes de toxicidade, padronizou o uso de peixes pertencentes à família *Cyprinidae* em 2016 como *Pimephalis promelas* e *Danio rerio* (NBR 15088:2016) para testes de toxicidade aguda.

De 1984 até hoje, o uso do *zebrafish* em estudos sobre poluentes ambientais vem crescendo, o que contribui para a ampliação da nossa compreensão sobre os poluentes, principalmente a bioacumulação, toxicidade e interação com outros contaminantes ambientais. Uma busca na base de dados *Pubmed* para os termos *zebrafish and environmental* (*zebrafish* e meio ambiente) gerou 6.542 artigos e demonstrou que desde a publicação do primeiro artigo em 1977 esse número só vem crescendo, sendo 1.016 artigos publicados no ano de 2019 e 467 até Maio de 2020, quando foi realizada a busca (Fig. 2).

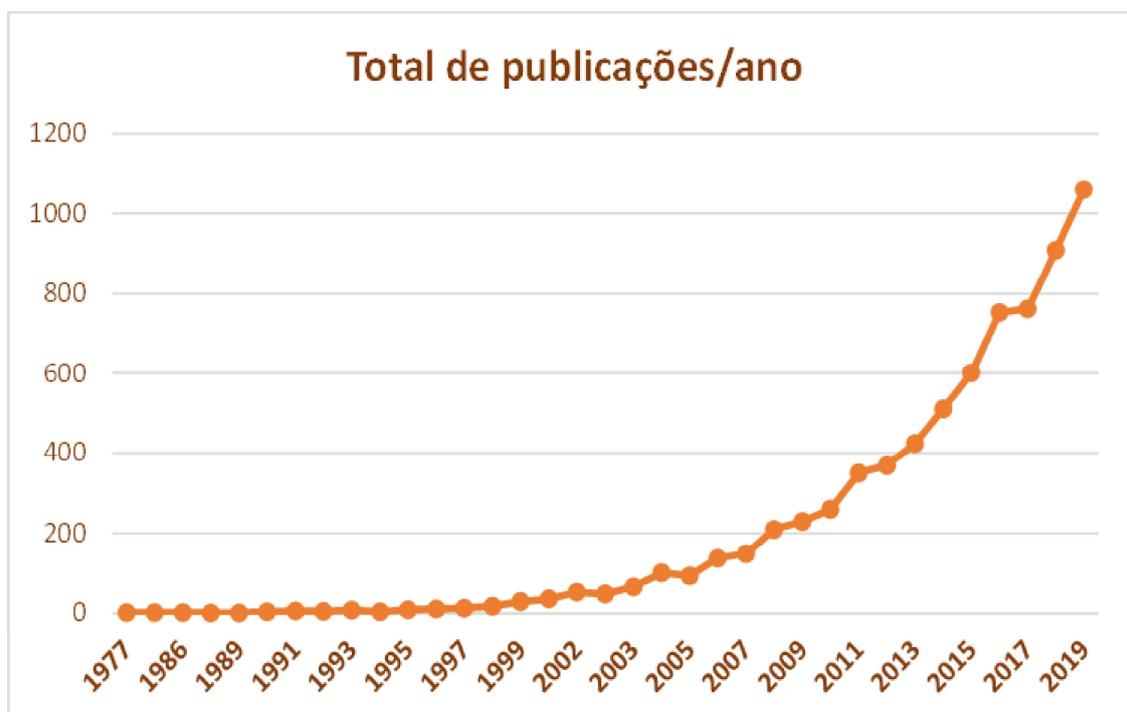


Fig. 2. Aumento das pesquisas com *zebrafish* em estudos ambientais. Pesquisa feita em 20 de Maio de 2020 na base de dados *Pubmed* com os termos de busca "*zebrafish and environmental*" mostrou uma curva ascendente no número de publicações de artigos.

Zebrafish em ensaios ecotoxicológicos para desreguladores endócrinos

Uma grande variedade de produtos químicos sintéticos denominados desreguladores endócrinos podem danificar diretamente um órgão endócrino, alterar a sua função, interagir com receptores de hormônios ou alterar o metabolismo de hormônios endógenos. A ação destes compostos naturais ou sintéticos no sistema endócrino produz efeitos adversos no desenvolvimento, na reprodução e em funções neurológicas e imunológicas, tanto em seres humanos quanto em animais. A presença desses compostos no ambiente aquático está associada à distúrbios reprodutivos, particularmente em peixes (Li et al., 2019; Guo et al., 2019).

Vários estudos até o momento investigaram os efeitos endócrinos de produtos químicos poluentes sobre estrogênio, androgênio ou receptores tireoidianos, com foco em parâmetros específicos, como por exemplo a perturbação da diferenciação sexual (Santos, Luzio & Coimbra, 2017). O modelo *zebrafish* tem uma aplicação potencial nesses estudos porque sua biologia e comportamento reprodutivo estão bem descritos. Nas últimas décadas foi estabelecido que o sexo do *zebrafish* é determinado por fatores genéticos em uma base poligênica, pois vários genes candidatos do dimorfismo sexual bem como *loci* ligados ao sexo foram identificados em diferentes linhagens de *zebrafish* (Liew et al., 2012). No entanto, ficou evidenciado que a determinação do sexo nessa espécie também é influenciada por fatores ambientais como a temperatura (Abozaid, Wessels & Hörstgen-Schwark, 2011; Villamizar et al., 2012). A relação sexual desequilibra, com 25,5% a mais de machos em condições de alta temperatura, resultantes da masculinização gonadal (Hosseini et al., 2019).

O estrogênio sintético 17α -etinilestradiol é um dos contraceptivos orais mais utilizados na clínica ginecológica (com pílulas contendo de 30 a 50 μg) sendo tipicamente encontrado em concentrações abaixo de $\text{ng}\cdot\text{L}^{-1}$ nos efluentes das estações de tratamento, o que já é suficiente para alterar o desenvolvimento sexual e reprodutivo de peixes (Luzio et al., 2016). Estudos demonstraram que a exposição de peixes a estrógenos esteróides durante o início da vida, notadamente durante o período de diferenciação sexual gonadal, resulta na indução do aparecimento de oócitos no tecido testicular em machos,

distorções na proporção sexual e reduções na capacidade reprodutiva funcional mais tarde na vida (Coe et al., 2010).

Fenske e colaboradores (2005) realizaram na Alemanha um estudo onde uma população de *zebrafish* composta totalmente por fêmeas geradas através da exposição precoce a 17 α -etinilestradiol na concentração de 3 ng.L⁻¹ apresentou apenas 26% de diferenciação para machos quando mantidos em meio livre do estrogênio por 58 dias (Fig. 3). Este efeito pode ser parcialmente revertido, porém foi observado comprometimento da capacidade reprodutiva. Ao contrário, a exposição crônica causou feminização em 100% dos peixes expostos e, assim, impedindo a reprodução.

As conclusões destes estudos corroboram a noção de que o *zebrafish* possui um mecanismo genético de determinação do sexo altamente sensível a fatores ambientais, como aos poluentes, e mostram que é essencial estudar os efeitos de contaminantes da água em diferentes cenários climáticos, a fim de entender possíveis impactos futuros nos organismos.

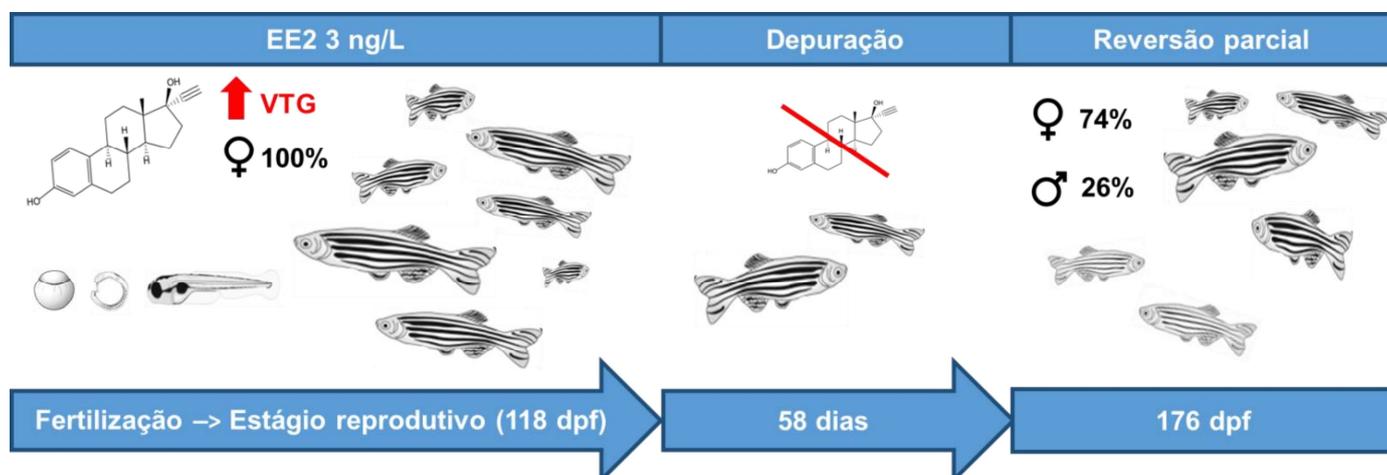


Fig. 3. Esquema ilustrativo dos procedimentos utilizados para avaliar a ecotoxicidade de desreguladores endócrinos na água. Fenske e colaboradores (2005) expuseram os peixes *Danio rerio* desde a fertilização até o 118º dia ao 17-ethinylestradiol na concentração de 3 ng.L⁻¹. Eles observaram aumento da vitelogenina (VTG) e todos os indivíduos se desenvolveram fenotipicamente como fêmeas. Após serem mantidos em uma condição de depuração livre do estrógeno por 58 dias houve uma reversão para machos de 26%, indicando que a exposição crônica ao xenoestrógeno leva a feminização de toda a população de *zebrafish* impedindo a reprodução e desenvolvimento normal.

Larsen e colaboradores (2008) demonstraram que o *zebrafish* macho que se desenvolve a partir de fêmeas fenotípicas após o tratamento com

estrogênio no início da vida apresenta comportamentos de acasalamento alterados como redução do sucesso reprodutivo em cenários competitivos de desova e a escolha de parceiros, podendo gerar mudanças na demografia e dinâmica da população.

Outro exemplo de desregulador endócrino é o bisfenol A (2,2-bis(4-hidroxifenil) propano), extensamente utilizado na produção de plásticos, em particular os policarbonatos e em resinas epóxi. O policarbonato é utilizado para a produção de mamadeiras e copos infantis dentre outros itens como garrafas retornáveis de água mineral, adesivos, tubulações, produtos eletrônicos e embalagens. A exposição humana principalmente durante a vida intrauterina a esse composto é considerável e sua atividade estrogênica tem sido muito relatada devido à similaridade do componente com o hormônio feminino e o da tireoide (Le Fol et al., 2017).

Chen e colaboradores (2017) avaliaram os efeitos de níveis ambientalmente relevantes de bisfenol A em *zebrafish* durante os estágios larval e adulto e verificaram que a exposição altera a produção espermática e o sucesso reprodutivo em todos os estágios de desenvolvimento e ainda foi evidenciado por outros autores redução da fertilização e alterações na transcrição de genes envolvidos na função reprodutiva e processos epigenéticos (Laing et al., 2016; Olsvik et al., 2019).

No Brasil, a importação e fabricação de mamadeiras que contenham bisfenol A está proibida desde Janeiro de 2012 (ANVISA, 2020).

Zebrafish em ensaios ecotoxicológicos para fármacos e substâncias químicas

Diversos produtos químicos são comercializados e novos compostos são introduzidos a cada ano. A catalogação de substâncias químicas pela indústria é feita pela *Chemical Abstracts Service*- CAS através do seu registro CAS. O registro CAS é atualizado diariamente com as variantes das substâncias a partir de dados oriundos da literatura científica indexada (<https://www.cas.org/about/cas-content>).

Dados obtidos até 2011 demonstraram que menos que 20% dos produtos químicos com alto volume de produção (450 toneladas por metro

cúbico por ano) e de uso mais amplo em produtos de consumo nos EUA haviam sido avaliados quanto ao seu potencial de alterar o desenvolvimento humano ou causar doenças em crianças (Landrigan & Goldman, 2011). Assim, é fundamental o uso de testes que possibilitem a identificação dos níveis mínimos de moléculas químicas que sejam capazes de afetar o desenvolvimento.

O banco de dados *ECOTOXicology knowledgebase* (ECOTOX) criado e mantido pela Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos- U.S.EPA tem o papel de coletar informações e divulgar o que já se sabe sobre os potenciais efeitos deletérios de alguns compostos químicos em uso. A ECOTOX é uma base abrangente e disponível ao público que fornece dados de testes de toxicidade ambiental de compostos químicos sobre a vida aquática, plantas terrestres e animais selvagens reunindo resultados de pesquisas científicas desde 1915. Nela estão disponíveis informações sobre dados de testes de substâncias químicas poluentes oriundas de trabalhos científicos indexados. E nesta plataforma podemos ainda selecionar os efeitos documentados exclusivamente em *zebrafish* (Fig. 4).

Os efeitos descritos na plataforma de dados ECOTOX podem ser categorizados em diferentes grupos: celulares (célula, genético e histológico), mortalidade, crescimento (desenvolvimento, crescimento e morfologia), bioquímicos (bioquímica, enzimas e hormônios), comportamentais (evasão, comportamento e comportamento alimentar), reprodução, fisiológicos (injúrias, imunológico, intoxicação e fisiologia), acumulação, efeitos múltiplos e populacionais.



Fig. 4. Efeitos deletérios de alguns compostos químicos em uso em *zebrafish*. Busca realizada na base de dados *ECOTOXicology knowledgebase* (ECOTOX) no dia 19 de Maio de 2020 gerou resultados de efeitos tóxicos de moléculas poluentes em *zebrafish*. Foram encontradas evidências de toxicidade através de resultados celulares, de mortalidade, crescimento, fisiológico entre outros.

A ocorrência e o destino de compostos farmacêuticos no ambiente aquático tem sido reconhecidos como um problema emergente na toxicologia ambiental. Medicamentos, de uma forma geral, são eliminados na forma inalterada, conjugada ou metabólitos, com ou sem atividade, pela urina e fezes, podendo ser detectados em corpos hídricos e nas estações de tratamento de água municipais (Peng et al., 2016). Várias investigações mostram evidências de que substâncias de origem farmacêutica geralmente não são eliminadas durante o tratamento de águas residuais e também não são biodegradadas (Ternes, 1998), representando risco para o ecossistema aquático.

Logo, estudos adicionais são urgentemente necessários sobre o destino ambiental dos vários medicamentos e outros produtos farmacêuticos no ambiente aquático e a classificação de seus efeitos tóxicos em organismos.

Nowakowska e colaboradores (2020) da Universidade de Warsaw, na Polônia, avaliaram os efeitos dos antidepressivos sertralina, paroxetina, fluoxetina e mianserina no desenvolvimento dos embriões de *zebrafish*. Seguindo os protocolos da OECD 236 (Fig. 5), 10 embriões foram colocados em cada poço de placas de 6 poços e expostos aos antidepressivos

individualmente nas concentrações de $10 \mu\text{g.mL}^{-1}$ cada um. Também foram testadas as misturas de todos eles em concentrações baixas ($5 \mu\text{g.mL}^{-1}$, MIX5), médias ($10 \mu\text{g.mL}^{-1}$, MIX10) e altas ($25 \mu\text{g.mL}^{-1}$, MIX25). Como controle negativo foi utilizado meio de cultura embrionário. Os resultados da avaliação dos efeitos desses antidepressivos na embriogênese demonstraram que as larvas de *zebrafish* sofreram deformações na coluna, indicativo de comprometimento do sistema nervoso, além de alterações hepáticas (uma vez que o fígado é órgão responsável pela metabolização de fármacos). Estes resultados ressaltam a importância do tratamento adequado de águas, uma vez que antidepressivos mesmo que em concentrações baixíssimas são capazes de causar danos ao desenvolvimento.

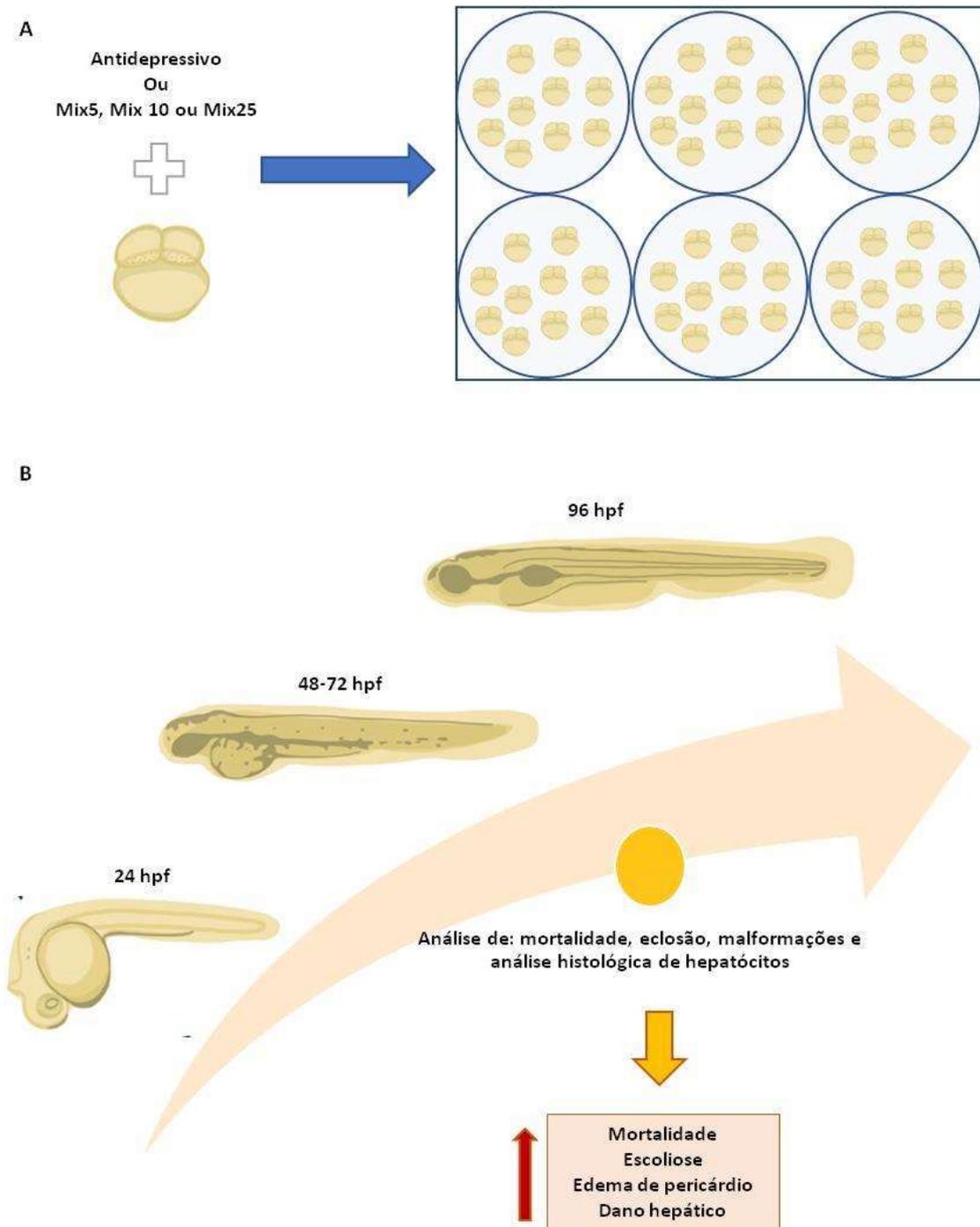


Fig. 5. Esquema ilustrativo dos procedimentos utilizados para avaliar a toxicidade de antidepressivos em embriões de *zebrafish*. Embriões de *zebrafish* ($n=10/\text{poço}$) foram expostos aos antidepressivos (sertralina, paroxetina, fluoxetina ou mianserina) individualmente a $10 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ou às misturas de todos nas concentrações de 5, 10 ou $25 \mu\text{g.mL}^{-1}$ (A). A cada 24 h, os animais foram avaliados quanto a mortalidade, eclosão e malformações e comparados aos animais não expostos (B). Adaptado de Nowakowska et al. (2020).

Os antibióticos são um dos grupos mais importantes de produtos farmacêuticos e têm sido considerados poluentes emergentes devido ao seu uso contínuo e persistente descarte no ecossistema aquático mesmo em baixas concentrações. Resultado de uma remoção ineficaz pelos métodos de tratamento convencionais, eles têm sido detectados em estações de tratamento de água (Luo et al., 2014), elevando as preocupações dos efeitos adversos na biota aquática.

Zhou e colaboradores (2018) demonstraram que a exposição crônica de embriões de *zebrafish* à sulfametoxazole (CAS: 723-46-6) um antibiótico do grupo das sulfonamidas com atividade bacteriostática e à oxitetraciclina (CAS: 79-57-2) um antibiótico de largo-espectro de eficácia contra infecções por bactérias gram-positivas e gram-negativas induziu aumento da razão metabólica causando maior taxa de mortalidade quando estes embriões foram subsequentemente expostos ao patógeno *Aeromonas hydrophila*. Ainda evidenciaram que a exposição crônica a ambos os antibióticos alterou a funcionalidade intestinal, diminuindo o número das células de *goblet* e a produção de enzimas fosfatases e de antioxidantes. Pesquisas têm demonstrado que a exposição crônica de adultos de *zebrafish* a antibióticos altera a estrutura e a diversidade das comunidades bacterianas de seu intestino (Almeida et al., 2019a; López Nadal et al., 2019; Almeida et al., 2019b). Em conjunto esses dados indicam que a presença de resíduos de antibióticos na água é um risco potencial à saúde dos organismos e aquáticos e para humanos.

Os difenil éteres polibromados (*polybrominated diphenyl ethers* – PBDEs) ou retardantes de chama bromados são hidrocarbonetos bromados nos quais 2-10 átomos de bromo estão ligados à estrutura molecular. Os PBDEs são usados como retardadores de chama em uma ampla variedade de produtos, incluindo plásticos, móveis, estofados, equipamentos elétricos, dispositivos eletrônicos, têxteis e outros produtos domésticos. Esses compostos têm sido amplamente utilizados desde a década de 1970 e no entanto existe uma preocupação crescente com sua persistência no meio ambiente, já que essas substâncias são estruturalmente semelhantes aos

bifenilos policlorados (PCB), descritas como persistentes, lipofílicas e bioacumulativas (Siddiqi et al., 2003).

Esses poluentes têm sido detectados nos sedimentos, águas superficiais, peixes e outros animais marinhos, entrando no ambiente através de emissões dos processos de fabricação, volatilização de vários produtos que os empregam, resíduos de reciclagem e lixiviados de resíduos em locais de descarte.

Em muitas espécies a reprodução e o desenvolvimento embrionário são especialmente sensíveis à contaminação por retardantes de chama. Nyholm e colaboradores (2008) mediram as concentrações dos PBDEs em embriões de *zebrafish* após a exposição parental por 42 dias através da dieta. Os peixes foram expostos a 11 retardantes de chama estruturalmente diversos. Desses, oito foram detectados nas fêmeas de *zebrafish* e a transferência maternal para os embriões foi evidenciada para todos os oito compostos. Isso é muito sério para a saúde da população, uma vez que esses compostos são de difícil degradação, podendo ser transferidos e permanecer acumulando-se entre as gerações por prolongados períodos, desencadeando efeitos tóxicos indesejados.

Um estudo similar investigou o Deca-PBDE (BDE-209), que era até aquele momento a única mistura de PBDE cujo uso era permitido e que havia sido detectado em altos níveis em amostras humanas. No entanto, poucos estudos exploravam seus efeitos no desenvolvimento, reprodução ou comportamento em modelos animais. O trabalho de He e colaboradores (2011) demonstrou que *zebrafish* expostos cronicamente a baixas doses de deca-BDE (0,001-1 μM) tiveram o desenvolvimento geral e gonadal alterados na geração F0 com diminuída quantidade de gametas nos machos e atraso na eclosão e no desenvolvimento neuro-motor, perda de fibra muscular e comportamento de locomoção lento da geração F1.

Uma outra classe de compostos químicos com preocupação emergente na questão ambiental são os nanomateriais. Estes compreendem uma diversa classe de substâncias que possuem componentes estruturais menores que 100 nanômetros (nm) em pelo menos uma das dimensões, incluindo nanopartículas que apresentam de 1 e 100 nm em pelo menos duas dimensões. Eles podem

ser categorizados em três tipos: partículas ultra-finas naturais, incidentais ou sintéticas. Estes últimos produzidos industrialmente são usados em ampla variedade de aplicações, incluindo remediação ambiental, sensores de poluição, energia fotovoltaica, na área médica, de medicamentos e cosméticos e utensílios domésticos (Djurisic et al., 2015).

Os nanomateriais sintéticos agregados com outras nanopartículas ou com minerais naturais e coloides orgânicos podem ser liberados no meio ambiente aquático diretamente através das descargas industriais ou pela disposição de efluentes de tratamento de águas residuais ou indiretamente através do escoamento superficial dos solos. Por fim, os nanomateriais aquáticos agregados tendem a se acumular no sedimento (Batley, Kirby, McLaughlin, 2013).

Uma série de estudos vêm sendo realizados usando testes de toxicidade aguda em *zebrafish* com a finalidade de avaliar os efeitos adversos possivelmente ocasionados por nanomateriais metálicos quando dispersos no ambiente aquático. Bar-Ilan e colaboradores (2009) avaliaram em embriões de *zebrafish* os efeitos tóxicos de nanopartículas coloidais de ouro (cAu) e prata (cAg) de variados tamanhos. Os dados revelam uma alta taxa de mortalidade para as nanopartículas cAg (100%) se comparados à baixíssima mortalidade induzida pelas nanopartículas cAu. Além disso, as nanopartículas cAg provocaram uma variedade de malformações morfológicas, independente dos tamanhos.

Embora o teste de toxicidade aguda em *zebrafish* possa refletir os efeitos tóxicos de um poluente em condições de curta duração e alta dose, a maioria dos produtos químicos ambientais existe apenas em um estado altamente diluídos. Portanto, são necessários testes de toxicidade crônica sob baixas concentrações. O *zebrafish* como modelo de toxicidade crônica tem uma vantagem significativa: possui um ciclo de vida relativamente curto e pode ser utilizado para realizar experiências de exposição ao longo do ciclo de vida e até testes transgeracionais para detectar efeitos tóxicos a longo prazo de nanomateriais (Pecoraro et al., 2017).

Atualmente existem várias diretrizes para o teste de toxicidade crônica de nanopartículas em *zebrafish*, como GB/T 21808-2008 (Peixe, Teste

Prolongado de Toxicidade: estudo de 14 dias), OECD TG 229 (Teste de Reprodução de Curto Prazo em Peixes), TG 210 (Teste de Toxicidade em Estágio Inicial) e TG 234 (Teste de Desenvolvimento Sexual de Peixes).

Recentemente, Horie e colaboradores (2017) testaram 20 nanomateriais em embriões de *zebrafish* por até 8 dias após a fertilização e observaram a indução de efeito letal para 16 dos 20 produtos químicos em teste e uma correlação positiva foi encontrada entre a alteração da frequência cardíaca e a mortalidade. Também descobriram que a exposição aos produtos químicos em teste em concentrações inferiores à concentração letal induziu efeitos subletais como edema, curvatura corporal e ausência de inflação da bexiga natatória.

A exposição crônica à nanopartículas Ag em fêmeas adultas de *zebrafish* resultou em acúmulo significativo em tecidos das guelras e na carcaça eviscerada, persistindo nos tecidos por até 4 dias após a remoção da prata do sistema. A alta concentração de nanopartículas Ag resultou em alterações significativas no perfil global de expressão gênica, principalmente genes associados ao reparo de danos ao DNA, reestruturação celular e processos de desenvolvimento (Griffitt et al., 2013).

Nanopartículas de óxido de ferro (Fe_2O_3) também apresentaram toxicidade em embriões de *zebrafish* em altas concentrações, provocando mortalidade, atraso na eclosão e malformações (Zhu et al., 2012). Análises celulares e com embriões de *zebrafish* utilizando nanopartículas de óxido de magnésio (MgO) evidenciaram indução de apoptose celular e produção de espécies reativas de oxigênio, e ainda diminuição dose-dependente da taxa de eclosão e sobrevivência embrionária. Os embriões expostos a esta nanopartícula apresentaram edema de pericárdio e edema de saco vitelínico (Ghobadian et al., 2015).

Os plásticos são onipresentes em ambientes aquáticos, respondendo por 50 a 80% dos detritos marinhos (Barnes et al., 2009), representando assim um dos principais contaminantes da modernidade. Embora o risco dos macroplásticos seja bem estudado, a degradação de detritos macroplásticos no oceano e na areia da praia em microplásticos e nanoplásticos tornou-se recentemente uma preocupação significativa e uma área de pesquisa cada vez mais importante (Andrady, 2011). Nanopartículas de poliestireno é uma das

formas mais abundantes de detritos plásticos encontrados no ambiente marinho. Em peixes adultos, a exposição à nanopartículas de poliestireno demonstrou induzir lesões hepáticas em *zebrafish* (Lu et al., 2016). O modelo *zebrafish* oferece uma oportunidade sem precedentes para investigar a toxicidade de microplásticos e nanoplásticos e contaminantes associados (Bhagat et al., 2020).

van Pomeroy e colaboradores (2017) relataram que nanopartículas de poliestireno não passam pelo cório de embriões do *zebrafish* em desenvolvimento, embora a exposição oral em peixes adultos desempenha um papel importante na absorção e distribuição. Ao contrário, Pitt e colaboradores (2018) demonstraram que nanopartículas de poliestireno com diâmetro de 51 nm se acumularam no saco vitelino em 24 hpf e migraram para o trato gastrointestinal, vesícula biliar, fígado, pâncreas, coração e cérebro durante o desenvolvimento (48-120 hpf). Ocorreu depuração da nanopartícula em todos os órgãos, exceto no pâncreas e no trato gastrointestinal. Notavelmente, a exposição a nanopartículas de poliestireno não induziu mortalidade significativa, deformidades ou alterações na bioenergética mitocondrial, mas alterou a função cardíaca dos animais.

Além disso, Veneman e colaboradores (2017) relataram que a injeção de nanopartículas de poliestireno (700 nm) no saco vitelino de *zebrafish* com 2 dpf resultou não apenas na distribuição de partículas na corrente sanguínea e acúmulo na região do coração, mas também na ativação de resposta imunológica, caracterizada por influxo de neutrófilos e macrófagos em torno das nanopartículas de poliestireno.

Tomados em conjunto, esses dados sugerem que pelo menos alguns nanoplásticos podem penetrar no cório de embriões do *zebrafish* em desenvolvimento, acumular-se nos tecidos e afetar a fisiologia e o comportamento, potencialmente afetando a aptidão orgânica em ecossistemas aquáticos contaminados.

A demanda crescente por água tem solidificado o seu reuso planejado, racional e eficiente a fim de evitar perdas e desperdícios e principalmente evitar danos à saúde animal e de humanos. A água residual após o uso doméstico, comercial e industrial tem suas características naturais alteradas e necessita

atender aos requisitos legais para que seja despejada em corpos d'água ou no sistema de esgoto como livre de poluentes e micropoluentes. A falta ou a ineficiência de tratamento das águas residuais pode acarretar queda da qualidade da água dos rios com comprometimento da fauna e flora.

Uma avaliação extensiva da presença de poluentes e micropoluentes em grandes bacias hidrográficas de rios e lagos é uma proposta necessária mas desafiadora para pesquisadores e agências reguladoras. Pesquisadores do Instituto Federal de Ciências Aquáticas e Tecnologia Suíço com capacidade para identificação de 252 micropoluentes por espectrometria de massas de alta resolução encontraram em 12 diferentes localizações do Lago Constance uma alta frequência das substâncias como diclofenaco, carbamazepina, sulfametoxazol, acesulfame, sucralose, benzotriazole e metilbenzotriazole. Sendo que diclofenaco, sulfametoxazol e carbamazepina em concentrações que excedem os níveis previstos (Moschet et al., 2013).

O uso do *zebrafish* como organismo-modelo na determinação da toxicidade de águas residuais pode ser um grande aliado dos centros de tratamento de águas, os quais realizam medições e monitoramento dos micropoluentes. Ampliando esta análise qualitativa/quantitativa, García-Camero e colaboradores (2019) utilizaram o *zebrafish* para análise de amostras de águas residuais após tratamento por dois tipos de processos de oxidação avançados responsáveis por diminuir aos valores recomendados os níveis de carbono orgânico total (*total organic carbon* – TOC) e a demanda de oxigênio químico (*chemical oxygen demand* – COD). Ao contrário do processo de ozonização, apenas o efluente sujeito a 120 minutos de oxidação fotocatalítica gerou água segura, incapaz de gerar em *zebrafish* alterações no desenvolvimento embrião-larval ou sua funcionalidade, sem efeitos comportamentais.

A avaliação toxicológica por *microarray* de efluentes descartados de duas plantas de tratamento de água na cidade de Pima no Arizona (EUA) feita expondo diretamente embriões de *zebrafish* selvagens ou transgênicos às águas revelou alterações na expressão de genes relacionados ao ciclo celular, metabolismo, sistemas nervoso, cardiovascular, hematológico, reprodutivo e hepático (Li et al., 2018).

Walter e colaboradores analisaram amostras de águas de cinco açudes da região do semi-árido de Campina Grande na Paraíba (Brasil), e verificaram que as águas testadas mostraram uma alta taxa de letalidade em embriões de *zebrafish*. E os animais que sobreviveram apresentaram malformações como ausência de boca, edema cardíaco e malformação da coluna. Além desses achados de toxicidade no organismo-modelo *zebrafish*, os pesquisadores confirmaram a presença de cianotoxinas na água (Walter et al., 2018).

Em condições normais, as águas já precisam de constante análise, mas após acidentes ou crimes ambientais esses estudos tornam-se essenciais. Foi o que Thompson e colaboradores (2020) fizeram, após o maior crime ambiental do Brasil, que foi o rompimento da barragem de Brumadinho, Minas Gerais, em 25 de Janeiro de 2019. Aproximadamente 12 milhões de m³ de rejeitos foram despejados no Rio Paraopeba e áreas vizinhas provocando 250 vítimas fatais, assim como a morte de animais domésticos e do ambiente aquático. Após o rompimento da barragem, os níveis de metais pesados como o mercúrio estavam acima (até 21 vezes) dos limites legais. Sabendo disso, os pesquisadores verificaram o impacto ecotoxicológicos das águas contaminadas (logo após o desastre e 4 meses depois) em embriões de *zebrafish*. Como resultado, os pesquisadores constataram que os embriões tiveram alta taxa de mortalidade ($\pm 85\%$), bem como apresentaram edema cardíaco e malformações na coluna. Os efeitos tóxicos foram maiores nas amostras coletadas em maio, provavelmente devido ao efeito cumulativo dos metais pesados ao longo dos meses.

Esses estudos demonstram quanta informação pode ser obtida usando o *zebrafish* como ferramenta biológica de monitoramento de efeitos tóxicos integrada à química analítica, podendo gerar dossiês mais abrangentes e compreensivos das águas de bacias hidrográficas, represas, efluentes de águas residuais e de plantas de tratamentos de água, e principalmente de águas após desastres ambientais.

Os agroquímicos também são um tema de grande interesse para a ecotoxicologia ambiental no Brasil. Nos últimos anos houve um aumento expressivo no número de novos produtos comercializados e registrados pelas agências competentes, sem contar que historicamente o país, devido à sua

forte econômica agrícola, baseada na monocultura, é um dos maiores consumidores de agrotóxicos do mundo (Disner et al., 2020). Diversos estudos e relatos de contaminação do ambiente e danos à saúde humana são reportados, inclusive da contaminação de leite materno e da água de abastecimento da maioria dos municípios brasileiros (Lermen et al., 2018; Santos et al., 2019).

De acordo com dados de monitoramento do Ministério da Saúde (Fig. 6), 1 em cada 4 das localidades avaliadas apresenta uma mistura de agrotóxicos. No período entre 2014 e 2017 as empresas de abastecimento de 1.396 municípios detectaram concentrações que excediam os níveis previstos de 27 pesticidas que são obrigados por lei a serem testados, e os relatórios com as informações fizeram parte de um esforço do Sistema de Informação de Vigilância da Qualidade da Água para Consumo Humano (SISAGUA) para monitorar a qualidade da água para além dos parâmetros usuais de potabilidade feitos pelas empresas de abastecimento (Agência Pública, 2019).

O levantamento demonstra que a contaminação da água que abastece a população está aumentando progressivamente. Em 2014, três quartos dos testes detectaram agrotóxicos, subindo para 84% em 2015, 88% em 2016 e alcançando 92% em 2017. Entre os pesticidas encontrados em mais de 80% das amostras, existem cinco classificados como “prováveis cancerígenos” pela EPA U.S. e seis apontados pela União Europeia como desreguladores endócrinos. O estado de São Paulo foi o recordista em número de municípios onde todos os 27 agrotóxicos testados estavam presentes na água, com mais de 500 cidades avaliadas. O Paraná foi o segundo colocado com o coquetel presente em 326 cidades, seguido por Santa Catarina e Tocantins (Agência Pública, 2019).

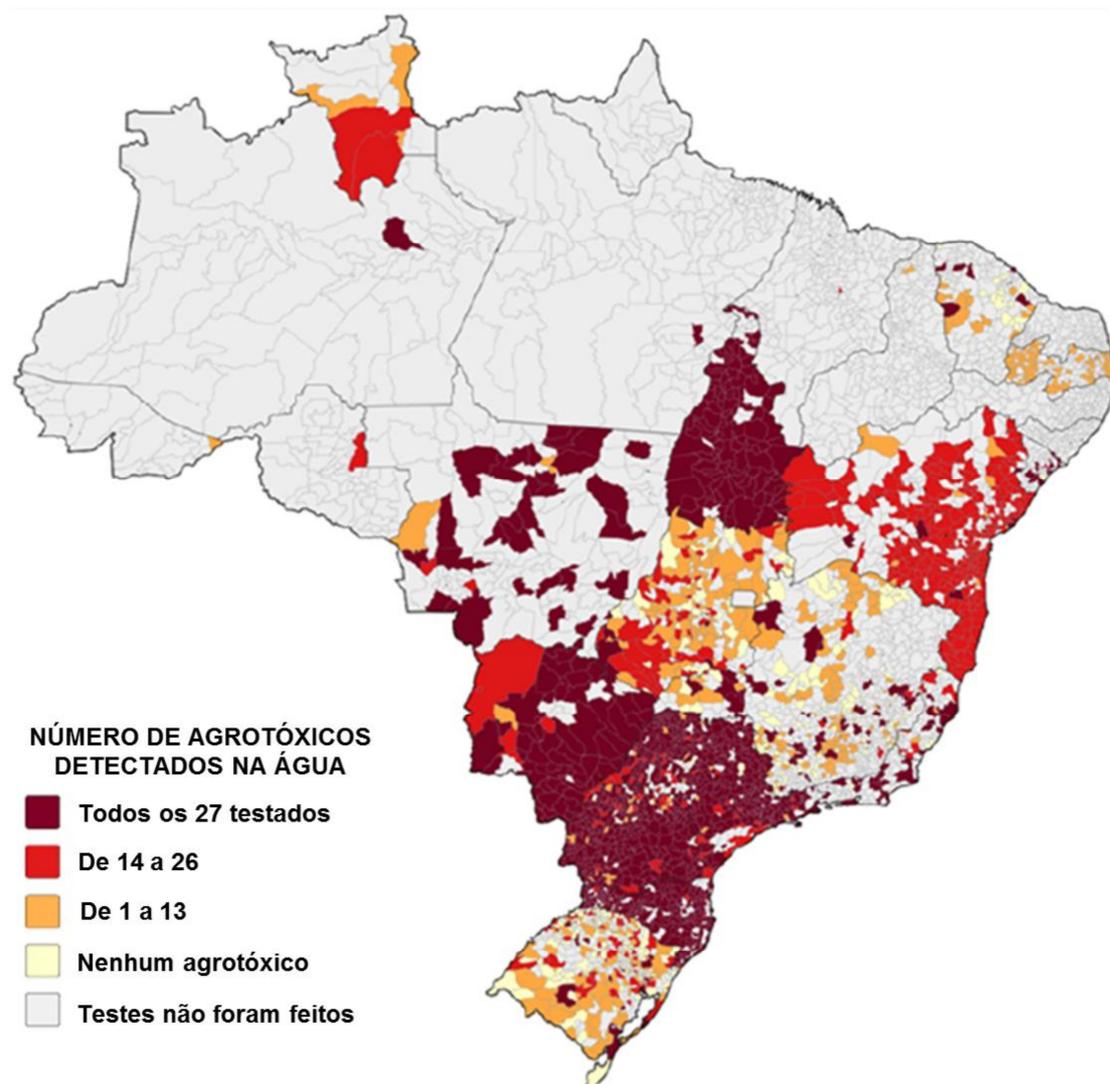


Fig. 6. Agrotóxicos no Brasil entre 2014-2017. Detecção e concentração de agrotóxicos de 2014 a 2017 de acordo com dados do Controle de Informações de Vigilância da Qualidade da Água para Consumo Humano (SISAGUA), do Ministério da Saúde. O mapa foi construído com base nos dados obtidos em abril de 2018, não refletem atualizações posteriores. Fonte: Sisagua.

Observamos no mapa que o monitoramento não é homogêneo ao longo do país, revelando uma compreensão apenas parcial dessa problemática. Muitas outras cidades devem apresentar dados tão ou mais preocupantes, no entanto não foram monitoradas.

Abaixo temos como exemplificação, avaliações ecotoxicológicas utilizando o *zebrafish* que objetivaram investigar efeitos tóxicos de três dos agrotóxicos que são regulados no Brasil para água potável, conforme mencionado no levantamento do Ministério da Saúde.

O primeiro estudo foi realizado por Levin e colaboradores (2003) com o inseticida Clorpirifós, que tem sido demonstrado interferir no desenvolvimento neuro-comportamental. O principal método de avaliação foi a função comportamental com aprendizagem da discriminação espacial em *zebrafish* a fim de diferenciar a latência da resposta e precisão da escolha, confirmando a neurotoxicidade desse pesticida. Foi verificado que a exposição à 10 ou 100 ng.mL⁻¹ de Clorpirifós durante o desenvolvimento causou alteração na discriminação espacial nos peixes quando adultos, submetidos a testes de aprendizado e memória espacial. Além disso, a maior dose, aumentou significativamente a taxa de mortalidade dos peixes entre 20-38 semanas de idade.

O seguinte estudo compreendeu a análise de genotoxicidade pelos níveis do marcador Glutathione S-Transferase (GST) em *zebrafish* expostos à Atrazina (Zhu et al., 2010). A GST é uma enzima de fase II do metabolismo com função determinante no processo de detoxificação, atua de maneira efetiva na conjugação de compostos tóxicos à glutathione, a fim de restabelecer a homeostase e reduzir o estresse oxidativo celular, prevenindo, conseqüentemente, danos a outras macromoléculas.

A atrazina atrai especial atenção devido a sua alta estabilidade e persistência em ambientes aquáticos. Esse herbicida foi introduzido nos anos 1950 e é extensivamente utilizado para suprimir o crescimento de ervas daninhas. Os pesquisadores chineses responsáveis por conduzirem este trabalho expuseram o *zebrafish* a três concentrações de Atrazina (0,01; 0,1 e 1 mg.L⁻¹) pelos períodos de 5, 10, 15, 20 e 25 dias. Os resultados indicaram que em machos, a atividade da GST foi marcadamente elevada nos tratamentos às duas menores concentrações comparados com o controle durante todo o experimento. Enquanto houve uma inibição na atividade dessa enzima no grupo tratado com 1 mg.L⁻¹ nos dias 5 e 15. Nas fêmeas, foi detectado um aumento da enzima em 0,1 mg.L⁻¹ nos dias 5 e 15 e em 0,01 no dia 20, demonstrando que as alterações bioquímicas ocorreram principalmente nas menores doses. O dano às moléculas de DNA foi avaliado usando o ensaio cometa, que mede quebras das moléculas ocasionadas pelos compostos

químicos. Foi verificado dano ao DNA após a exposição à Atrazina, de maneira dose-dependente (Zhu et al., 2010).

Outro exemplo de pesticida que é muito estudado é o Glifosato. Este é um composto organofosforado comercializado desde 1974 e o herbicida mais utilizado no mundo, sendo aplicado, nas maiores culturas agrícolas, como soja, milho, trigo, algodão e café. A discussão científica sobre a sua segurança ainda não chegou a um consenso e devido a sua expressiva comercialização e movimentação econômica as controvérsias a seu respeito seguem presentes. O modelo de estudo *zebrafish* também tem sido um aliado para a elucidação da toxicidade desse químico que tem, no Brasil, um limite máximo permitido de 5.000 vezes maior que o permitido na União Europeia (Bridi et al., 2017; Rodrigues et al., 2019).

Um estudo realizado por um grupo de pesquisa do Reino Unido e publicado na revista de Ciência e Tecnologia Ambiental buscou corroborar as evidências que sugerem que tanto o produto comercial (Roundup) quanto o ingrediente ativo (Glifosato) induzem estresse oxidativo em peixes e também são apontados como responsáveis por toxicidade reprodutiva em mamíferos. Para isso, Webster e colaboradores (2014) conduziram uma exposição de 21 dias durante a reprodução de *zebrafish*, onde os animais foram expostos a 0,01; 0,5 e 10 mg.L⁻¹ de Roundup e 10 mg.L⁻¹ de Glifosato. A exposição ao Glifosato reduziu a produção de embriões, mas não a taxa de fertilização. Tanto a maior concentração de Roundup quanto a de Glifosato aumentou a mortalidade dos embriões nos estágios iniciais e desencadeou a eclosão prematura. Além disso, análises transcriptômicas das gônadas revelaram que esta mesma condição induziu mudanças na expressão dos genes que codificam aromatase (*cyp19a1*) e receptor de estrógeno 1 (*esr1*) no ovário e 3β-hidroxiesteróide desidrogenase (*hsd3b2*), catalase (*cat*), e superóxido dismutase 1 (*sod1*) nos testículos. Esses genes são responsáveis pela conversão e reconhecimento de hormônios esteroides e regulação do balanço oxidativo. Desse modo, os resultados demonstram que esses compostos químicos desencadeiam toxicidade comprometendo a capacidade reprodutiva de *zebrafish*, associada à ruptura da via de biossíntese esteroidogênica e estresse oxidativo.

CONCLUSÃO

O *zebrafish* (*Danio rerio*) é um organismo-modelo promissor utilizado para a verificação de efeitos tóxicos em testes de toxicidade aguda e principalmente de longo prazo a poluentes presentes na água. Os testes toxicológicos padronizados utilizando o *zebrafish* podem fornecer resultados em um curto período de tempo, com alta rastreabilidade por menor custo comparativo. Além disso, o uso de embriões de *zebrafish* atende aos princípios de redução, substituição e refinamento proposto para o uso racional de animais experimentais. O teste de toxicidade aguda em *zebrafish* foi padronizado e normatizado em 1984 pela Organização Internacional de Normatização (ISO 7346) e no Brasil pela Associação Brasileira de Normas Técnicas em 2016 (ABNT-NBR 15088:2016). Desde então, o uso do *zebrafish* em ecotoxicologia vem crescendo, o que contribui para a ampliação da nossa compreensão sobre os poluentes principalmente a bioacumulação, toxicidade e interação com outros poluentes ambientais. Xenobióticos com potencial de interromper o desenvolvimento humano ou causar doenças em crianças como os produtos químicos sintéticos denominados desreguladores endócrinos, fármacos antidepressivos, antibióticos, produtos químicos industriais, nanomateriais metálicos e nanopartículas de poliestireno vem sendo estudadas em *zebrafish* e os resultados confirmam alterações no desenvolvimento embrio-larval, acumulação nos tecidos, alteração da fisiologia normal e do comportamento suportando o valor translacional do modelo *zebrafish*.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abozaid, H., Wessels, S., Hörstgen-Schwark, G. 2011. Effect of rearing temperatures during embryonic development on the phenotypic sex in zebrafish (*Danio rerio*). *Sex Dev.* 5(5):259-265.

Agência Nacional de Vigilância Sanitária- ANVISA. 2020. Bisfenol A. Disponível em: <<http://portal.anvisa.gov.br/alimentos/embalagens/bisfenol-a>>.

Agência Pública. 2019. “Coquetel” com 27 agrotóxicos foi achado na água de 1 em cada 4 municípios. Disponível em: <<https://apublica.org/2019/04/coquetel-com-27-agrotoxicos-foi-achado-na-agua-de-1-em-cada-4-municipios-consulte-o-seu/>>.

Almeida, A.R., Alves, M., Domingues, I., Henriques, I. 2019a. The impact of

antibiotic exposure in water and zebrafish gut microbiomes: A 16S rRNA gene-based metagenomic analysis. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 30;186:109771.

Almeida, A.R., Tacão, M., Machado, A.L., Golovko, O., Zlabek, V., Domingues, I., Henriques, I. 2019b. Long-term effects of oxytetracycline exposure in zebrafish: A multi-level perspective. *Chemosphere* 222:333-344.

Andrady, A.L. 2011. Microplastics in the marine environment. *Mar. Pollut. Bull.* 62(8):1596-1605.

Bar-Ilan, O., Albrecht, R.M., Fako, V.E., Furgeson, D.Y., 2009. Toxicity Assessments of Multisized Gold and Silver Nanoparticles in *Zebrafish* Embryos. *Small* 16, 1897–1910.

Barnes, D.K., Galgani, F., Thompson, R.C., Barlaz, M. 2009. Accumulation and fragmentation of plastic debris in global environments. *Philos Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* 27; 364(1526):1985-1998.

Batley, G.E., Kirby, J.K., McLaughlin, M.J. 2013. Fate and risks of nanomaterials in aquatic and terrestrial environments. *Acc. Chem. Res.* 19;46(3):854-862.

Bhagat, J., Zang, L., Nishimura, N., Shimada, Y. 2020. Zebrafish: An emerging model to study microplastic and nanoplastic toxicity. *Sci. Total Environ.* 14;728:138707.

Bridi, D., Altenhofen, S., Gonzalez, J.B., Reolon, G.K., & Bonan, C. D. 2017. Glyphosate and Roundup[®] alter morphology and behavior in zebrafish. *Toxicology*, 392, 32–39.

British Toxicology Society- BTS. 2020. Ecotoxicology. Disponível em: <<https://www.thebts.org/careers/ecotoxicology/>>. Acesso em: 17/05/2020

Meyers, J.R. 2018. Zebrafish: Development of a vertebrate model organism. *Current Protocols Essential Laboratory Techniques*, e19.

Chen, J., Saili, K.S., Liu, Y., Li, L., Zhao, Y., Jia, Y., Bai, C., Tanguay, R.L., Dong, Q., Huang, C., 2017. Developmental bisphenol A exposure impairs sperm function and reproduction in *zebrafish*. *Chemosphere* 169, 262-270.

Coe, T., Söffker, M., Filby, A., Hodgson, D., Tyler, C.R., 2010. Impacts of Early Life Exposure to Estrogen on Subsequent Breeding Behavior and Reproductive Success in *Zebrafish*. *Environ. Sci. Technol.* 44, 6481–6487.

Disner, G.R., Falcao, M.A.P., Andrade-Barros, A.I., Leite-Santos, N.V., Soares, A.B.S., Marcolino-Souza, M., Gomes, K.S., Lima, C., Lopes-Ferreira, M. 2020. The toxic effects of glyphosate, chlorpyrifos, abamectin, and 2,4-D on animal models: a systematic review of Brazilian studies. *Integr. Environ. Assess.*

Manag. In press. <https://doi.org/10.1002/ieam.4353>

Djurisic, A.B., Leung, Y.H., Ng, A.M., Xu, X.Y., Lee, P.K., Degger, N., Wu, R.S. 2015. Toxicity of metal oxide nanoparticles: Mechanisms, characterization, and avoiding experimental artefacts. *Small* 11(1), 26–44.

Fan CY, Cowden J, Simmons SO, Padilla S, Ramabhadran R. 2010. Gene expression changes in developing zebrafish as potential markers for rapid developmental neurotoxicity screening. *Neurotoxicol Teratol.* 32(1):91-98.

Fenske, M., Maack, G., Schafers, C., Segner, H., 2005. An environmentally relevant concentration of estrogen induces arrest of male gonad development in *zebrafish*, *Danio rerio*. *Environ. Toxicol. Chem.* 24 (5), 1088–1098.

García-Camero, J.P., Beltrán, F.J., Encinas, A., Rivas, F., Oropesa A.L. 2019. The added value of a zebrafish embryo–larval model in the assessment of wastewater tertiary treatments. *Environ. Sci.: Water Res. Technol.* 5, 2269-2279.

Ghobadian, M., Nabiuni, M., Parivar, K., Fathi, M., & Pazooki, J. 2015. Toxic effects of magnesium oxide nanoparticles on early developmental and larval stages of zebrafish (*Danio rerio*). *Ecotoxicology and environmental safety*, 122, 260–267.

Griffitt, R.J., Lavelle, C.M., Kane, A.S., Denslow, N.D., Barber, D.S. 2013. Chronic nanoparticulate silver exposure results in tissue accumulation and transcriptomic changes in zebrafish. *Aquat. Toxicol.* 15;130-131:192-200.

Guo Y, Chen L, Wu J, Jianguan H, Lihua Y, Qiangwei W, Wei Z, Jae-Seong L, Bingsheng Z. 2019. Parental co-exposure to bisphenol A and nano-TiO₂ causes thyroid endocrine disruption and developmental neurotoxicity in zebrafish offspring. *Sci Total Environ.* 950(Pt 1):557-565.

He, J., Yang, D., Wang, C., Liu, W., Liao, J., Xu, T., Bai, C., Chen, J., Lin, K., Huang, C., Dong, Q., 2011. Chronic *zebrafish* low dose decabrominated diphenyl ether (BDE-209) exposure affected parental gonad development and locomotion in F1 offspring. *Ecotoxicology* 20,1813–1822.

Horie, Y., Yamagishi, T., Takahashi, H., Shintaku, Y., Iguchi, T., Tatarazako, N. 2017. Assessment of the lethal and sublethal effects of 20 environmental chemicals in zebrafish embryos and larvae by using OECD TG 212. *J. Applied Toxicol.* 37(10), 1245– 1253.

Hosseini, S., Ha, N.T., Simianer, H., Falker-Gieske, C., Brenig, B., Franke, A., Hörstgen-Schwark, G., Tetens, J., Herzog, S., Sharifi, A.R. 2019. Genetic mechanism underlying sexual plasticity and its association with colour patterning in zebrafish (*Danio rerio*). *BMC Genomics* 6;20(1):341.

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., Chow, W., Kilian, B., Quintais, L.T., Guerra-Assunção, J.A., Zhou, Y., Gu, Y., Yen, J., Vogel, J.H., Eyre, T., Redmond, S., Banerjee, R., Chi, J., Fu, B., Langley, E., Maguire, S.F., Laird, G.K., Lloyd, D., Kenyon, E., Donaldson, S., Sehra, H., Almeida-King, J., Loveland, J., Trevanion, S., Jones, M., Quail, M., Willey, D., Hunt, A., Burton, J., Sims, S., McLay, K., Plumb, B., Davis, J., Clee, C., Oliver, K., Clark, R., Riddle, C., Elliot, D., Threadgold, G., Harden, G., Ware, D., Begum, S., Mortimore, B., Kerry, G., Heath, P., Phillimore, B., Tracey, A., Corby, N., Dunn, M., Johnson, C., Wood, J., Clark, S., Pelan, S., Griffiths, G., Smith, M., Glithero, R., Howden, P., Barker, N., Lloyd, C., Stevens, C., Harley, J., Holt, K., Panagiotidis, G., Lovell, J., Beasley, H., Henderson, C., Gordon, D., Auger, K., Wright, D., Collins, J., Raisen, C., Dyer, L., Leung, K., Robertson, L., Ambridge, K., Leongamornlert, D., McGuire, S., Gilderthorp, R., Griffiths, C., Manthavadi, D., Nichol, S., Barker, G., Whitehead, S., Kay, M., Brown, J., Murnane, C., Gray, E., Humphries, M., Sycamore, N., Barker, D., Saunders, D., Wallis, J., Babbage, A., Hammond, S., Mashreghi-Mohammadi, M., Barr, L., Martin, S., Wray, P., Ellington, A., Matthews, N., Ellwood, M., Woodmansey, R., Clark, G., Cooper, J., Tromans, A., Grafham, D., Skuce, C., Pandian, R., Andrews, R., Harrison, E., Kimberley, A., Garnett, J., Fosker, N., Hall, R., Garner, P., Kelly, D., Bird, C., Palmer, S., Gehring, I., Berger, A., Dooley, C.M., Ersan-Ürün, Z., Eser, C., Geiger, H., Geisler, M., Karotki, L., Kirn, A., Konantz, J., Konantz, M., Oberländer, M., Rudolph-Geiger, S., Teucke, M., Lanz, C., Raddatz, G., Osoegawa, K., Zhu, B., Rapp, A., Widaa, S., Langford, C., Yang, F., Schuster, S.C., Carter, N.P., Harrow, J., Ning, Z., Herrero, J., Searle, S.M., Enright, A., Geisler, R., Plasterk, R.H., Lee, C., Westerfield, M., de Jong, P.J., Zon, L.I., Postlethwait, J.H., Nüsslein-Volhard, C., Hubbard, T.J., Roest Crollius, H., Rogers, J., Stemple, D.L. 2013. The zebrafish reference genome sequence and its relationship to the human genome. *Nature* 25; 496(7446): 498-503.

Hussain, B., Sultana, T., Sultana, S., Masoud, M.S., Ahmed, Z., Mahboob, S. 2018. Fish eco-genotoxicology: Comet and micronucleus assay in fish erythrocytes as in situ biomarker of freshwater pollution. *Saudi J. Biol. Sci.* 25:393–398.

International Organization for Standardization. 1996. Water quality—Determination of the acute lethal toxicity of substances to a freshwater fish [*Brachydanio rerio* Hamilton-Buchanan (Teleostei, Cyprinidae)]— Part 1: Static method. ISO 7346-1. Geneva, Switzerland.

Jacobson, J.L., Muckle, G., Ayotte, P., Dewailly, E., Jacobson, S.W. 2015. Relation of prenatal methylmercury exposure from environmental sources to childhood IQ. *Environ. Health Perspect.* 123:827–833.

Laing, L.V., Viana, J., Dempster, E.L., Trznadel, M., Trunkfield, L.A., Uren Webster, T.M., van Aerle, R., Paull, G.C., Wilson, R.J., Mill, J., Santos, E.M.

2016. Bisphenol A causes reproductive toxicity, decreases dnmt1 transcription, and reduces global DNA methylation in breeding zebrafish (*Danio rerio*). *Epigenetics* 2;11(7):526-538.

Landrigan, P.J., Goldman, L.R. 2011. Children's vulnerability to toxic chemicals: a challenge and opportunity to strengthen health and environmental policy. *Health Affairs (Millwood)*. 30(5):842-850.

Larsen, M.G., Hansen, K.B., Henriksen, P.G., Baatrup, E. 2008. Male zebrafish (*Danio rerio*) courtship behaviour resists the feminizing effects of 17 α -ethinylestradiol—Morphological sexual characteristics do not. *Aquat. Toxicol.* 87, 234–244.

Le Fol, V., Aït-Aïssa, S., Sonavane, M., Porcher, J.M., Balaguer, P., Cravedi, J.P., Zalko, D., & Brion, F. 2017. In vitro and in vivo estrogenic activity of BPA, BPF and BPS in zebrafish-specific assays. *Ecotoxicology and environmental safety*, 142, 150–156.

Lermen, J., Bernieri, T., Rodrigues, I.S., Suyenaga, E. S., & Ardenghi, P. G. 2018. Pesticide exposure and health conditions among orange growers in Southern Brazil. *Journal of environmental science and health. Part. B, Pesticides, food contaminants, and agricultural wastes*, 53(4), 215–221.

Levin, E.D., Chrysanthis, E., Yacisin, K., Linney, E., 2003. Chlorpyrifos exposure of developing *zebrafish*: effects on survival and long-term effects on response latency and spatial discrimination. *Neurotoxicol. Teratol.* 25, 51–57.

Li, C., Chen, Q., Zhang, X., Snyder, S.A., Gong, Z., Lam, S.H. 2018. An integrated approach with the zebrafish model for biomonitoring of municipal wastewater effluent and receiving waters. *Water Res.* 15; 131:33-44.

Li, S., Wu, Q., Sun, Q., Coffin, S., Gui, W., Zhu, G. Parental exposure to tebuconazole causes thyroid endocrine disruption in zebrafish and developmental toxicity in offspring. *Aquat Toxicol.* 211:116-123.

Liew, W.C., Bartfai, R., Lim, Z., Sreenivasan, R., Siegfried, K.R., Orban, L. 2012. Polygenic sex determination system in zebrafish. *PLoS One* 7(4):e34397.

López Nadal, A., Peggs, D., Wiegertjes, G.F., Brugman, S. 2019. Corrigendum: Exposure to Antibiotics Affects Saponin Immersion-Induced Immune Stimulation and Shift in Microbial Composition in Zebrafish Larvae. *Front. Microbiol.* 3;10:1242.

Lu, Y., Zhang, Y., Deng, Y., Jiang, W., Zhao, Y., Geng, J., Ding, L., Ren, H. 2016. Uptake and Accumulation of Polystyrene Microplastics in Zebrafish (*Danio rerio*) and Toxic Effects in Liver. *Environ. Sci. Technol.* 5; 50(7):4054-4060.

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. *Sci. Total Environ.* 473–474: 619-641.

Luzio, A., Santos, D., Fontainhas-Fernandes, A.A., Monteiro, S.M., Coimbra, A.M. 2016. Effects of 17 α -ethinylestradiol at different water temperatures on zebrafish sex differentiation and gonad development. *Aquat. Toxicol.* 174:22-35.

Moschet, C., Götz, C., Longrée, P., Hollender, J., Singer, H. 2013. Multi-level approach for the integrated assessment of polar organic micropollutants in an international lake catchment: the example of Lake Constance. *Environ. Sci. Technol.* 2;47(13):7028-7036.

Murayama, E., Kissa, K., Zapata, A., Mordelet, E., Briolat, V., Lin, H.F., Handin, R.I., Herbomel, P. 2006. Tracing hematopoietic precursor migration to successive hematopoietic organs during zebrafish development. *Immunity* 25:963-975.

Nowakowska, K., Giebułtowicz, J., Kamaszewski, M., Adamski, A., Szudrowicz, H., Ostaszewska, T., Solarska-Dzięciołowska, U., Nałęcz-Jawecki, G., Wroczyński, P., Drobniwska, A. 2020. Acute exposure of zebrafish (*Danio rerio*) larvae to environmental concentrations of selected antidepressants: Bioaccumulation, physiological and histological changes. *Comp. Biochem. Physiol. C. Toxicol. Pharmacol.* 229:108670.

Nyholm, J.R., Norman, A., Norrgren, L., Haglund, P., Andersson, P.L., 2008. Maternal transfer of brominated flame retardants in zebrafish (*Danio rerio*). *Chemosphere* 73, 203–208.

Olsvik, P.A., Whatmore, P., Penglase, S.J., Skjærven, K.H., Anglès d'Auriac, M., Ellingsen, S. 2019. Associations Between Behavioral Effects of Bisphenol A and DNA Methylation in Zebrafish Embryos. *Front. Genet.* 8;10:184. Erratum in: *Front. Genet.* 2020 Feb 12;11:107.

Pecoraro, R., Marino, F., Salvaggio, A., Capparucci, F., Di Caro, G., Iaria, C., Salvo, A., Rotondo, A., Tibullo, D., Guerriero, G., Scalisi, E. M., Zimbone, M., Impellizzeri, G., & Brundo, M. V. 2017. Evaluation of Chronic Nanosilver Toxicity to Adult Zebrafish. *Frontiers in physiology*, 8, 1011.

Peng, Y., Hall, S., Gautam, L. 2016. Drugs of abuse in drinking water – a review of current detection methods, occurrence, elimination and health risks. *TrAC - Trends Anal. Chem.* 85:232–240.

Pitt, J.A., Kozal, J.S., Jayasundara, N., Massarsky, A., Trevisan, R., Geitner, N., Wiesner, M., Levin, E.D., Di Giulio, R.T. 2018. Uptake, tissue distribution, and toxicity of polystyrene nanoparticles in developing zebrafish (*Danio rerio*). *Aquat. Toxicol.* 194:185-194.

Rodrigues, L.B., Costa, G.G., Thá, E.L, Silva, L.R., Oliveira, R., Leme, D.M., Cestari, M.M., Grisolia, C.K., Valadares, M.C., Oliveira, G.A.R. 2019. Impact of the glyphosate-based commercial herbicide, its components and its metabolite AMPA on non-target aquatic organisms. *Mutat. Res. Genet. Toxicol. Environ. Mutagen.* 842: 94-101.

Russell, W.M.S., Burch, R.L., 1959. *The Principles of Humane Experimental Technique.* Methuen, London.

Santos, D., Luzio, A., Coimbra, A.M. 2017. Zebrafish sex differentiation and gonad development: A review on the impact of environmental factors. *Aquat Toxicol.* 191:141-163.

Santos, R., Piccoli, C., Cremonese, C., & Freire, C. 2019. Thyroid and reproductive hormones in relation to pesticide use in an agricultural population in Southern Brazil. *Environmental research*, 173, 221–231.

Siddiqi, M.A., Laessig, R.H., Reed, K.D. 2003. Polybrominated Diphenyl Ethers (PBDEs): New Pollutants-Old Diseases. *Clin. Med. Res.* 1(4):281-290.

Streisinger, G., Walker, C., Dower, N., Knauber, D., Singer, F. 1981. Production of clones of homozygous diploid zebra fish (*Brachydanio rerio*). *Nature* 291:293–296.

Swan, S.H., Main, K.M., Liu, F., Stewart, S.L., Kruse, R.L., Calafat, A.M., Mao, C.S., Redmon, J.B., Ternand, C.L., Sullivan, S., Teague, J.L. 2005. Study for Future Families Research Team. Decrease in anogenital distance among male infants with prenatal phthalate exposure. *Environ. Health Perspect.* 113(8):1056-1061.

Ternes, T.A. 1998. Occurrence of drugs in German sewage treatment plants and rivers. *Water Research*, 32(11):3245-3260.

Thompson, F., de Oliveira, B.C., Cordeiro, M.C., Mais, B.P., Rangel, T.P., Paz, P., Freitas, T., Lopes, G., Silva, B.S., Cabral, A.S., Soares, M., Lacerda, D., Dos Santos Vergilio, C., Lopes-Ferreira, M., Lima, C., Thompson, C., de Rezende, C.E. 2020. Severe impacts of the Brumadinho dam failure (Minas Gerais, Brazil) on the water quality of the Paraopeba River. *Sci. Total Environ.* 25;705:135914.

van Pomeran, M., Brun, N.R., Peijnenburg, W.J.G.M., Vijver, M.G. 2017. Exploring uptake and biodistribution of polystyrene (nano)particles in zebrafish embryos at different developmental stages. *Aquat. Toxicol.* 190:40-45.

Veneman, W.J., Spaink, H.P., Brun, N.R., Bosker, T., Vijver, M.G. 2017. Pathway analysis of systemic transcriptome responses to injected polystyrene particles in zebrafish larvae. *Aquat. Toxicol.* 190:112-120.

Villamizar, N., Ribas, L., Piferrer, F., Vera, L.M., Sánchez-Vázquez, F.J. 2012. Impact of daily thermocycles on hatching rhythms, larval performance and sex differentiation of zebrafish. PLoS One 7(12):e52153.

Walter, J.M., Lopes, F.A.C., Lopes-Ferreira, M., Vidal, L.M., Leomil, L., Melo, F., de Azevedo, G.S., Oliveira, R.M.S., Medeiros, A.J., Melo, A.S.O., De Rezende, C.E., Tanuri, A., Thompson, F.L. 2018. Occurrence of Harmful Cyanobacteria in Drinking Water from a Severely Drought-Impacted Semi-arid Region. Front. Microbiol. 9:176.

Webster, T.M.U., Laing, L.V., Florance, H., Santos E.M., 2014. Effects of Glyphosate and its Formulation, Roundup, on Reproduction in *Zebrafish (Danio rerio)*. Environ. Sci. Technol. 48, 1271–1279.

Westerfield, M. 1995. The Zebrafish Book: A Guide for the Laboratory Use of Zebrafish (*Brachydanio rerio*). University of Oregon Press, Eugene, OR.

Zhou, L., Limbu, S.M., Shen, M., Zhai, W., Qiao, F., He, A., Du, Z.Y., Zhang, M. 2018. Environmental concentrations of antibiotics impair zebrafish gut health. Environ. Pollut. 235:245-254.

Zhu, L., Dong, X., Xie, H., Wang, J., Wang, J., Su, J., Yu, C., 2010. DNA Damage and Effects on Glutathione-S-Transferase Activity Induced by Atrazine Exposure in *Zebrafish (Danio rerio)*. Environ. Toxicol. 26, 480-488.

Zhu, X., Tian, S., Cai, Z., 2012. Toxicity Assessment of Iron Oxide Nanoparticles in *Zebrafish (Danio rerio)* Early Life Stages. PLoS ONE 7, e46286.