

DESENVOLVIMENTO EMBRIONÁRIO DO *Danio rerio* – zebrafish PARA AVALIAR TOXICIDADE POR POLUENTES ANTRÓPICOS

Gabriela Claudia Cangahuala-Inocente¹

Alice Da Silva Gonçalves²

Suzymeire Baroni³

Palavras-Chave: Microplásticos; Nanopartículas; Efluentes industriais; Agrotóxicos.

INTRODUÇÃO

Os poluentes antrópicos têm uma série de efeitos adversos nos organismos aquáticos, afetando sua saúde, reprodução, comportamento e, em casos extremos, levando à morte. Esses efeitos variam dependendo do tipo e da concentração do poluente, bem como da sensibilidade das espécies expostas (Reish *et al.*, 1992). Os peixes são biomarcadores valiosos para o monitoramento da poluição ambiental devido à sua sensibilidade nas fases iniciais da vida (ovos, larvas e alevins), capacidade de bioacumulação e ampla distribuição (Rozmánková *et al.*, 2020; Ribeiro *et al.*, 2024).

O *Danio rerio*, popularmente conhecido como *zebrafish*, é uma espécie de peixe empregada em diversas investigações toxicológicas, sendo reconhecido como modelo biológico para a análise dos efeitos de diferentes agentes químicos e fatores ambientais sobre seu crescimento e desenvolvimento (Gao; Yang, 2023; Barreto *et al.*, 2023). Além disso, em 2013, o genoma do *zebrafish* foi integralmente sequenciado, revelando-se que aproximadamente 70% dos genes humanos possuem ao menos um gene homólogo ao desse organismo. Tal descoberta reforça a relevância desse modelo experimental para o estudo e a compreensão de doenças humanas (Howe *et al.*, 2013; Dooley; Zon, 2000).

Portanto, este trabalho tem como objetivo abordar o uso de embriões de *Danio rerio* para avaliação da toxicidade de poluentes antrópicos.

¹ Programa de Pós-Graduação em Ambiente e Tecnologias Sustentáveis, Universidade Federal da Fronteira Sul (UFFS), gcangahu@hotmail.com.

² Programa de Pós-Graduação em Ambiente e Tecnologias Sustentáveis, Universidade Federal da Fronteira Sul (UFFS), alice.goncalves@estudante.uffs.edu.br

³ Programa de Pós-Graduação em Ambiente e Tecnologias Sustentáveis, Universidade Federal da Fronteira Sul (UFFS), suzymeire.baroni@uffs.edu.br

METODOLOGIA

Diversos experimentos são realizados no Laboratório de Genética da UFFS, *Campus Cerro Largo*. Os protocolos utilizados são submetidos ao Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UFFS, e seguem toda regulamentação do CONCEA. Animais adultos de *D. rerio* (1 ano de idade) são obtidos de uma loja comercial da cidade de Cerro Largo, mantidos em aquários de 20 litros em sistema de recirculação de água constante com filtro, separados em machos e fêmeas. Os parâmetros abióticos são temperatura de 26 ± 1 °C, pH $8,0 \pm 0,2$, condutividade elétrica $54,04 \pm 2,4$ us/cm e fotoperíodo 12/12 h (claro/escuro) de acordo com as normas da OCDE 236 (2013). Os animais adultos são alimentados duas vezes ao dia com ração extrusada comercial (30% de proteína bruta).

Para obtenção dos embriões, os animais adultos são separados em aquários de desova (Zeb Clean, Alesco) na proporção de 2:1 macho:fêmea, um dia antes e separados por uma lâmina de acrílico. Na manhã seguinte, ao amanhecer, é retirada a lâmina de acrílico, mantendo as luzes desligadas para a desova e fecundação. Os ovos são coletados 45 min após o acasalamento e observados a viabilidade dos ovos em estereomicroscópio. Os ovos não fertilizados (<20%) e aqueles embriões com irregularidades de clivagem ou lesões são descartados.

Ovos fertilizados com observação de blastômeros são expostos ao controle positivo (3,4 dicloroanilina, 3,7 mg/L em água do cultivo), ao controle negativo (água do aquário), e aos diferentes tratamentos. O teste é realizado com 72 embriões por exposição, divididos em 3 replicatas em placas tipo Elisa (Wuxi Nest Biotechnology) de 24 poços (1 embrião por poço da placa). Um total de 20 poços são preenchidos com 2 mL das soluções (controle ou tratamentos). Os 4 poços restantes de cada placa compreendem o controle interno da placa e são preenchidos com 2 mL de água do próprio sistema dos peixes de acordo com o protocolo 236 descrito pelo OCDE (2013) (Fig 1). Após a exposição, as placas contendo os embriões são colocadas aleatoriamente em estufa incubadora Eletrolab a 26°C com fotoperíodo de 12h claro/escuro.

O desenvolvimento embrionário é avaliado nos períodos de 24, 48, 72 e 96 hpf com auxílio do estereoscópio OLYMPUS SZ51 e de acordo ao desenvolvimento normal descrito por Kimmel *et al* (1995). A mortalidade é verificada diariamente.

Os parâmetros avaliados, segundo o protocolo da OCDE nº 236 (OCDE, 2013), para letalidade observa-se: ovo coagulado, cauda não desprendida, ausência de somitos e batimentos cardíacos; Sub-letalidade: desenvolvimento dos olhos, movimentos espontâneos, circulação sanguínea, pigmentação e inflação da bexiga natatória e teratogenicidade: edema de pericárdio (EC), mancha de sangue (MS), edema de saco vitelínico (ESV), malformação geral (MF), deformação de coluna (DC), deformação de cauda (CT), ausência pigmentação (SP) e atraso no desenvolvimento (AD).

RESULTADOS, AVANCOS E REFLEXÕES

Diversos estudos são desenvolvidos utilizando o protocolo da OCDE n° 236 (OCDE, 2013) para o modelo biológico de *D. rerio*. Assim, os efeitos do antibiótico Ceftriaxona no desenvolvimento de embriões e larvas de *D. rerio* em diferentes concentrações (0,05 -100 mg/L) não provocaram efeitos letais e subletais (Oliveira e Bernardes, 2022).



A toxicidade de nanopartículas como zinco foi reportado por Wehmas *et al* (2015), onde a toxidade depende do estágio em que se encontra o *zebrafish*. Além disso, a toxicidade em 24 h aumentou muito quando a exposição ao *zebrafish* começou na fase de vida larval em comparação com a toxicidade de 24 h após a exposição embrionária.

Estudos realizados com o agrotóxico Roundup® (princípio ativo – glifosato) durante a embriogênese do *zebrafish*, utilizando o protocolo FET (OCDE, 2013),

constatou-se que a concentração que mata 50% dos embriões é de 25 mg/L. Também, foi observado alteração morfológica em embriões viáveis após o FET na bexiga natatória do embrião (Panetto *et al.*, 2019).

Amostras brutas de efluente de uma estação de tratamento de águas residuárias causou 100% de letalidade nos embriões de *Danio rerio*, mas a taxa de letalidade foi reduzida ao longo dos processos de tratamento da estação, porém ainda foram observados efeitos subletais nos embriões, principalmente edema de saco vitelínico (Liu *et al.*, 2022). Além disso, Lahnsteiner (2008), ao avaliar a toxicidade de diferentes efluentes industriais provenientes de diversos processos como produção de papel e papelão, curtimento de peles, produção de fertilizantes inorgânicos, galvanização de metais, tratamento de carcaças e tratamento de esgoto, demonstrou que os embriões de *zebrafish* apresentaram forte correlação quanto a resposta da toxicidade aguda comparada a peixes adultos da mesma espécie, sendo uma alternativa valiosa para a realização dos testes de toxicidade aguda.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Esta metodologia e modelo biológico apresenta-se adequada para avaliar a toxicidade de diversas substâncias produzidas pelo homem. Atualmente, estão sendo utilizadas em projetos de dissertação a ser desenvolvidas no Programa de Pós-graduação em Ambientes e Tecnologias Sustentáveis da Universidade Federal da Fronteira Sul – campus Cerro Largo.

REFERENCIAS

- BARRETO, A. *et al.* Cocktail effects of emerging contaminants on zebrafish: nanoplastics and the pharmaceutical diphenhydramine. *Nanoimpact*, v. 30, p. 100456, 2023.
- DOOLEY, K., ZON, L. I. Zebrafish: a model system for the study of human disease. *Current Opinion In Genetics & Development*, v. 10, n. 3, p. 252-256, 2000.
- GAO, Y.; YANG, P. The impaired swim bladder via ROS-mediated inhibition of the Wnt / Hedgehog pathway in Zebrafish embryos exposed to eight toxic chemicals and binary chemical mixtures. *Chemosphere*, v. 338, 2023.
- HOWE, K. *et al.* The zebrafish reference genome sequence and its relationship to the human genome. *Nature*, v. 496, n. 7446, p. 498-503, 2013.
- KIMMEL, C.B. *et al.* Stages of Embryonic Development of the Zebrafish *Developmental Dynamics* v. 203, p. 253-310, 1995.

LAHNSTEINER, F. The Sensitivity and Reproducibility of the Zebrafish (*Danio rerio*) Embryo Test for the Screening of Waste Water Quality and for Testing the Toxicity of Chemicals. *Atla*, v. 28, p. 299-311, 2008.

LIU, Y. *et al.* Bioassay-based identification and removal of target and suspect toxicants in municipal wastewater: Impacts of chemical properties and transformation. *Journal of Hazardous Materials*, v. 437, p. 129426, 2022.

OECD. Test No. 236: Fish Embryo Acute Toxicity (FET) Test. OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, 2013.

OLIVEIRA, E.M.; Bernardes M.F.F. Avaliação da toxicidade embrio-larval do fármaco veterinário de caso ceftriaxona no peixe *Danio rerio* (Zebrafish) Anais do 24 Simpósio de TCC do Centro universitário - ICESP vol. 24, 859-866, 2022.

PANETTO, O.S. *et al.* Os efeitos do Roundup® no desenvolvimento embrionário e metabolismo energético do peixe zebra (*Danio rerio*). Congresso Técnico Científico da Engenharia e da Agronomia - CONTECC Palmas/TO 17 a 19 de setembro de 2019.

REISH, D.J. *et al.* Effects of pollution on saltwater organisms. *Water environment research*, vol. 64, n. 4, p. 599 – 610, 1992.

RIBEIRO, O.M. *et al.* *Embriões de peixe-zebra (Danio rerio)*. *Revista Ciência Elemental*, v.12(1), 003, 2024. <http://doi.org/10.24927/rce2024.003>

ROZMÁNKOVÁ, E. *et al.* Environmentally relevant mixture of S-metolachlor and its two metabolites affects thyroid metabolism in *zebrafish* embryos. *Aquatic Toxicology*, v.221, 105444, 2020.

WEHMAS, L.C. *et al.* Comparative metal oxide nanoparticle toxicity using embryonic zebrafish *Toxicology Reports* 2 702–715, 2015
<http://dx.doi.org/10.1016/j.toxrep.2015.03.015>.