

UNIVERSIDADE DE PASSO FUNDO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS AMBIENTAIS

***EFEITOS ENDÓCRINOS E COMPORTAMENTAIS DO ESTRADIOL
EM ZEBRAFISH***

ANDRÉIA BENETTI MORAES

Passo Fundo, RS, Brasil

2020

ANDRÉIA BENETTI MORAES

EFEITOS ENDÓCRINOS E COMPORTAMENTAIS DO ESTRADIOL EM ZEBRAFISH

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Ambientais do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Passo Fundo, como requisito parcial para obtenção de título de Mestre em Ciências Ambientais.

Orientador:

Dr. Ana Cristina V. V. Giacomini

Coorientador:

Dr. Murilo Sander de Abreu

Passo Fundo

2020

CIP – Catalogação na Publicação

M827e Moraes, Andréia Benetti
Efeitos endócrinos e comportamentais do estradiol em
Zebrafish [recurso eletrônico] / Andréia Benetti Moraes. –
2020.
2 MB ; PDF.

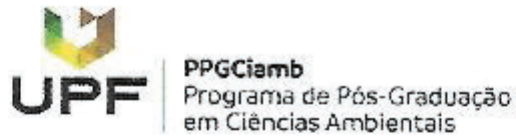
Orientadora: Profa. Dra. Ana Cristina V. V. Giacomini.
Coorientador: Prof. Dr. Murilo Sander de Abreu.
Dissertação (Mestrado em Ciências Ambientais) –
Universidade de Passo Fundo, 2020.

1. Emoções em animais. 2. Ansiedade. 3. Comportamento
social. 4. Cortisol. 5. Efeitos endócrinos - Meio Ambiente.
I. Giacomini, Ana Cristina Vendrametto Varrone, orientadora.
II. Abreu, Murilo Sander de, coorientador. III. Título.

CDU: 504.03

Catalogação: Bibliotecária Jucelei Rodrigues Domingues - CRB 10/1569

ATA DE DEFESA DE DISSERTAÇÃO



ATA DE DEFESA DE DISSERTAÇÃO

A Banca Examinadora, abaixo assinada, aprova a Dissertação:

"Efeitos Endócrinos e Comportamentais do Estradiol em Zebrafish"

Elaborada por

ANDRÉIA BENETTI MORAES

Como requisito parcial para a obtenção do grau de
"Mestre em Ciências Ambientais"

Aprovado em: 17/09/2020
Pela Banca Examinadora

Profa. Dra. Ana Cristina Vendrametto V. Giacomini
Presidente da Comissão Examinadora - UPF/PPGCiamb

Prof. Dr. Leonardo Jose Gil Barcellos
Universidade de Passo Fundo - UPF/PPGCiamb

Profa. Dra. Carmen Silvia Busin

DEDICATÓRIA

Dedico esse trabalho ao meu esposo Carlos Eduardo da Silva Moraes que sempre me incentivou e acreditou na minha capacidade de realizar esse sonho.

Certamente, seu exemplo de dedicação, estudo e colaboração foram fundamentais para tudo acontecer.

E aos meus filhos Bruno e Mateus que me possibilitaram conhecer o verdadeiro sentido da vida e do que é o amor incondicional.

AGRADECIMENTOS

A realização desse trabalho não seria possível sem o apoio e colaboração de inúmeras pessoas. Gostaria de agradecer todos àqueles que de uma forma ou outra contribuíram para que eu pudesse concluir esse importante trabalho.

Em primeiro lugar, e mais importante de tudo, gostaria de agradecer a Deus, a minha família (esposo, filhos, pais, irmãos, cunhados), a orientadora professora Dr. Ana Cristina V.V. Giacomini, coorientador professor Murilo Sander de Abreu, a funcionária laboratorista Sirlei Cazarotto, equipe de bolsistas e pesquisadores do laboratório de Ciências Fisiológicas do IBC/UPF, aos professores PPGCiamb/UPF, aos colegas de turma do mestrado, aos amigos (as) que a vida me deu, a equipe diretiva e colegas da EMEF Zeferino Demétrio Costi/ZDC e Secretaria Municipal de Educação/SME de Passo Fundo.

A realização desse trabalho somente foi possível com o apoio financeiro da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS). Menciono aqui também o meu agradecimento ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Ambientais/PPGCiamb/UPF e os colaboradores de todos os setores da instituição envolvidos neste processo.

EPÍGRAFE

A ciência sem a religião é manca, a religião sem a ciência é cega!

Albert Einstein

RESUMO

O consumo de hormônios estrogênicos pela população humana tem aumentado nos últimos anos e, conseqüentemente, sua presença em águas superficiais, subterrâneas e em efluentes também cresce. Além disso, esses hormônios presentes no ambiente exercem efeitos de interrupção endócrina, desencadeando alterações comportamentais e fisiológicas. O estradiol (17 β -estradiol, E₂) é o hormônio estrogênico que regula comportamentos cognitivos, sociais e afetivos. No entanto, a complexidade dos efeitos do E₂ sobre o sistema nervoso central (SNC), incluindo sua atividade em machos, é pouco conhecida. *Zebrafish* é um organismo modelo amplamente utilizado em biomedicina, incluindo pesquisas neurocomportamentais e neurofarmacológicas, uma vez que demonstra uma elevada homologia genética e fisiológica comparada a mamíferos. *Zebrafish* também possuem receptores estrogênicos e enzimas de síntese e inativação altamente conservados semelhantes aos mamíferos. O presente estudo avaliou os efeitos da exposição de 24 horas ao E₂ (20 μ g/L) em respostas comportamentais e endócrinas em *zebrafish* machos adultos. Foram realizados dois experimentos: no experimento 1, foi avaliado comportamento de cardume (n = 8 por grupo) e interação social (n = 32) e; no experimento 2, foram avaliados o comportamento de ansiedade (n = 12) e níveis de cortisol. O E₂ exerceu efeito pró-social no teste de preferência social e reduziu níveis de cortisol, elevou a exploração no teste de tanque novo e aumentou o tamanho do cardume no teste de cardume, indicativo de perfil ansiolítico. Apoiando as crescentes evidências sobre o papel do E₂ na regulação comportamental em humanos e roedores, os efeitos pró-sociais e ansiolíticos observados da exposição aguda ao E₂ em *zebrafish* machos reforçam o uso desse organismo aquático em estudos sobre os comportamentos sociais e afetivos mediados por hormônios esteroides.

Palavras-chave: 1. Comportamento emocional. 2. Comportamento social. 3. Cortisol. 4. Ansiedade. 5. Interruptores endócrinos.

ABSTRACT

The consumption of estrogenic hormones by human population has increased in recent years and, consequently, its presence in surface, groundwater and effluents also grows. In addition, these hormones present in the environment exert endocrine disruption effects, triggering behavioral and physiological changes. Estradiol (17 β -estradiol, E₂) is an estrogen that regulates cognitive, social and affective behaviors. However, the complexity of the effects of E₂ on the central nervous system (CNS), including its activity in males, is little known. Zebrafish is a model organism widely used in biomedicine, including neurobehavioral and neuropharmacological research, as it demonstrates a high genetic and physiological homology compared to mammals. Zebrafish also have highly conserved mammalian estrogen receptors and synthesis and inactivation enzymes. The present study evaluated the effects of 24-hour exposure to E₂ (20 μ g / L) on behavioral and endocrine responses in adult male zebrafish. Two experiments were carried out: in experiment 1, shoaling behavior (n = 8 per group) and social interaction (n = 32) and; in experiment 2, anxiety behavior (n = 12) and cortisol levels were evaluated. E₂ exerted a pro-social effect in the social preference test and reduced cortisol levels, increased exploration in the new tank test and increased the size of the shoal in the shoaling test, indicative of the anxiolytic profile. Supporting the growing evidence on the role of E₂ in behavioral regulation in humans and rodents, the prosocial and anxiolytic effects observed from acute exposure to E₂ in male zebrafish reinforce the use of this aquatic organism in studies on hormone-mediated social and affective behaviors steroids.

Key words: 1. Emotional behavior. 2. Social behavior. 3. Cortisol. 4. Anxiety. 5. Endocrine disruptors.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 - Delineamento experimental do estudo 1, avaliando os efeitos do E₂ sobre o comportamento social de *zebrafish* machos adultos 23
- Figura 2 - Delineamento experimental do estudo 2, avaliando os efeitos do E₂ sobre o comportamento de ansiedade em *zebrafish* machos adultos..... 24
- Figura 3 - Efeitos do E₂ sobre o comportamento de *zebrafish* machos adultos no teste de cardume (n = 8 cardumes) e no teste de preferência social individual subsequente (n = 32). Os dados são expressos como média + SEM, * p <0,05, teste post hoc de Dunn para dados significativos de Kruskal-Wallis. 26
- Figura 4 - Efeitos do E₂ sobre o comportamento de ansiedade em *zebrafish* machos adultos (testado no teste de tanque novo de 6 minutos, n = 12 por grupo) e sobre os níveis de cortisol no corpo inteiro (n = 6, 2 cérebros agrupados por amostra). Dados são expressos como média + SEM, * p <0,05, ** p <0,01, teste U vs. controles. 27

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

ACTH	Hormônio adrenocorticotrópico
ARs	Receptores androgênicos
BPA	Bisfenol A
CaCO ₃	Carbonato de Cálcio
CRF	Corticotropina
E ₂	17β-estradiol
EE ₂	17α-etinilestradiol
ERs	Receptores de estrogênio
GnRH	Hormônio Liberador de Gonadotrofina
HHA	Hipotálamo-hipófise-adrenal
HHI	Hipotalâmico-hipófise-inter-renal
L	Litro
mg / L	Miligrama por litro
n	Número
ng/g	Nanogramas por grama
ng / mL	Nanogramas por mililitro
PBBs	Bifenilos polibromados
PCBs	Bifenilos policlorados
SNC	Sistema nervoso central
TRs	Receptores de tireoide
μg / L	Micrograma por litro
μM	Micrômetro
vol/vol	Volume

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	13
2	REVISÃO DA LITERATURA	14
2.1	Contaminação ambiental por interruptores endócrinos estrogênicos	14
2.2	Estradiol	16
2.3	<i>Zebrafish</i> como modelo para experimentação animal	18
3	OBJETIVOS	20
4	MATERIAIS E MÉTODOS	20
5	RESULTADOS	26
6	DISCUSSÃO	28
	CONSIDERAÇÕES FINAIS	33
	REFERÊNCIAS	34
	ANEXOS ou APÊNDICES	48

1 INTRODUÇÃO

A contaminação ambiental por compostos estrogênicos tem sido alvo de muitos estudos, visto que pode desencadear alterações neuroendócrinas comprometendo a homeostasia dos seres vivos expostos a esses contaminantes. No entanto, a complexidade dos efeitos do E₂ sobre o SNC, incluindo sua atividade em machos, é pouco conhecida.

A presente dissertação contempla uma breve revisão da literatura sobre a contaminação ambiental por compostos estrogênicos, problematizando e contextualizando sobre “**Os efeitos endócrinos e comportamentais do estradiol em *zebrafish***”. Descreve os objetivos da pesquisa, a metodologia, os resultados e a discussão, estabelecendo relação com a literatura. Ao final apresenta as considerações finais e as referências bibliográficas.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Contaminação ambiental por interruptores endócrinos estrogênicos

Os seres vivos estão expostos a contaminantes ambientais os quais causam um conjunto de alterações neuroendócrinas comprometendo a homeostasia. Esses contaminantes chamados de interruptores endócrinos podem ter diversas fontes de origem, sendo considerados como naturais (excretados por seres vivos) ou sintéticos de origem industrial ou doméstica, os quais apresentam em comum, efeitos estrogênicos já identificados em diferentes espécies (ARIS; SHAMSUDDIN; PRAVEENA, 2014; BERGER et al., 2015; CHEN et al., 2015). Os interruptores endócrinos com função estrogênica incluem fitoestrógenos, bifenilos policlorados (PCBs), bifenilos polibromados (PBBs), dioxinas, bisfenol A (BPA), diclorodifeniltricloroetano, vinclozolina, dietilestilbestrol (KABIR; RAHMAN; RAHMAN, 2015; MUSTIELES et al., 2015; YOU et al., 2015).

Os efeitos dos interruptores endócrinos estão associados à alteração do funcionamento normal do sistema endócrino evidenciado em humanos e animais, ou seja, modificam processos, como metabolismo, desenvolvimento sexual, crescimento, resposta ao estresse, comportamento de gênero, reprodução e desenvolvimento fetal (KABIR; RAHMAN; RAHMAN, 2015; RYBACKA et al., 2015). As ações dos interruptores endócrinos ocorrem principalmente pela interação direta com receptores nucleares de hormônios que incluem receptores de estrogênios (ERs), receptores androgênicos (ARs), receptores de progesterona, receptores de tireoide (TRs) e receptores de retinoides (KABIR; RAHMAN; RAHMAN, 2015; RYBACKA et al., 2015). Assim, os interruptores endócrinos podem modular a atividade estrogênica e/ou antiandrogênica (BERGER et al., 2015; MUSTIELES et al., 2015), bem como modular a metilação do DNA do indivíduo exposto, perpetuando esse efeito de forma epigenética para as próximas gerações (CHEN et al., 2015).

A presença dos contaminantes interruptores endócrinos com função estrogênica no ambiente decorre da produção industrial, do descarte indevido e por meio da eliminação via excreção humana e animal, bem como, de sua persistência durante os diferentes sistemas de tratamento de água e efluentes. Os sistemas de tratamento de água, como floculação, sedimentação, filtração e cloração, não são capazes de eliminar na totalidade os contaminantes estrogênicos da água (KABIR; RAHMAN; RAHMAN, 2015; ROCHA; CRUZEIRO; PARDAL, 2015; SILVA; OTERO; ESTEVES, 2012). Além disso, os compostos estrogênicos excretados no ambiente na forma inativa podem tornar-se ativos por meio da degradação bacteriana em sistemas de tratamento que utilizam plantas (NIKOLAOU; MERIC; FATTA, 2007; WEIGEL et al., 2004).

O impacto ambiental dos compostos estrogênicos é atribuído à alta resistência ao processo de degradação, à tendência a absorver matéria orgânica, à capacidade de concentração em sedimentos (ARIS; SHAMSUDDIN; PRAVEENA, 2014; SALLA et al., 2016; YOU et al., 2015) e por sua bioacumulação em tecidos animais como músculos e plasma de peixes (ARIS; SHAMSUDDIN; PRAVEENA, 2014; KABIR.; RAHMAN; RAHMAN, 2015). Dessa forma, os seres vivos em contato com esses recursos acabam sendo expostos com frequência a esses contaminantes, e conseqüentemente, apresenta um risco a esses organismos (COLMAN et al., 2009). Estudos mostram que a exposição pré-natal aos estrogênios naturais ou sintéticos está associada com aumento de linfoma, leucemia, tumores de mama, vagina e útero em humanos e animais (BERENBAUM; BELTZ, 2011) e às alterações comportamentais como depressão, ansiedade, hiperatividade, déficit de atenção e agressividade (BERENBAUM.; BELTZ, 2011; CRISTINA; MARIA; CARMEN, 2012; XU, 2012). Com isso, estudar os efeitos comportamentais e endócrinos dos interruptores endócrinos estrogênicos sobre os organismos modelo, representam importante ferramenta para compreender melhor seu impacto sobre o ambiente em contato.

2.2 Estradiol

O estradiol (17 β -estradiol, E₂) é um importante hormônio esteroide estrogênico produzido por fêmeas e machos de vertebrados (PORSERYD et al., 2017). A produção de estradiol está relacionada com o eixo hipotálamo-hipófise-gonadal no qual o hormônio liberador de gonadotrofina (GnRH), produzido pelo hipotálamo, estimula a produção de LH e FSH pela hipófise. Esses hormônios hipofisários atuam nos ovários e testículos estimulando a produção de hormônios esteroides, dentre eles o E₂ (GUYTON; HALL, 2017).

Em fêmeas o E₂ regula o desenvolvimento das características sexuais secundárias femininas, puberdade, ciclo menstrual, reprodução e composição corporal (BROWN; CLEGG, 2010; CUI; SHEN; LI, 2013; IORGA et al., 2017). O papel do E₂ em vários processos cerebrais e comportamentais também está recebendo crescente reconhecimento (BALTHAZART; BALL, 1998; MCCARTHY, 2008; WALF; FRYE, 2009). O E₂ afeta significativamente os comportamentos sociais, cognitivos e emocionais de humanos (CLAYTON; NINAN, 2010; MCEWEN; ALVES, 1999) e roedores (AREVALO et al., 2010). O E₂ pode aumentar a plasticidade sináptica e a neuroproteção (GREEN; SIMPKINS, 2000; VILLA; VEGETO; POLETTI; MAGGI, 2016; WALF; FRYE, 2008), melhorando a integridade dos circuitos cognitivos e emocionais para evitar déficits comportamentais (MARTIN et al., 2010). Por outro lado, seus níveis decrescentes durante a menopausa podem contribuir para déficits afetivos em mulheres (CLAYTON; NINAN, 2010). Além disso, ERs são amplamente distribuídos no sistema límbico, agindo como alvos para o E₂, pois modulam a ansiedade animal (BORROW; HANDA, 2017; IMWALLE; GUSTAFSSON; RISSMAN, 2005; KRĘŻEL et al., 2001; ROCHA et al., 2005; ROSSOUW, 2002; WALF; FRYE, 2008) e comportamentos sexuais (MAZZUCCO et al., 2008; WALF; FRYE, 2008).

No entanto, a desregulação de E₂ evidenciada no caso da esteroidogênese pré-natal elevada pode ser prejudicial, comprometendo o desenvolvimento do cérebro e

causando distúrbios relacionados ao neurodesenvolvimento, como o autismo (BARON-COHEN et al., 2019). E₂ também tem sido implicado na regulação dos comportamentos social e de agressividade em ambos os sexos (DAITZMAN; ZUCKERMAN, 1980; DENSON et al., 2018; TRAINOR; KYOMEN; MARLER, 2006). Homens adultos jovens, geralmente mais agressivos que mulheres, mostram níveis mais baixos de E₂ (CARRÉ; MCCORMICK; HARIRI, 2011), enquanto que o tratamento com E₂ pode aumentar a reatividade emocional na tarefa observacional de aprendizado do medo (OLSSON et al., 2016).

A complexidade dos efeitos do E₂ sobre o SNC permanece pouco compreendida, necessitando de mais estudos. Assim, modelos animais são uma ferramenta valiosa para estudar as funções e disfunções cerebrais (LUINE, 2014; MCCARTHY, 2008) e, portanto, vários modelos experimentais têm sido utilizados para examinar os efeitos fisiológicos do E₂ (BÉDARD; BOUCHER; DAIGLE; DI PAOLO, 1985; GILL-SHARMA et al., 2001; HEIMOVICS; TRAINOR; SOMA, 2015; LUINE, 2016). Comumente investigado em fêmeas, os efeitos do E₂ sobre o SNC incluem a melhora no desempenho cognitivo (LOWRY et al., 2010) e efeitos neuroprotetores-neurotóxicos dependentes da dose (INGBERG; THEODORSSON; THEODORSSON; STRÖM, 2016). Da mesma forma, após exposição aguda ao E₂, fêmeas também apresentam melhora na memória espacial (ALONSO et al., 2010) e no condicionamento contextual do medo (BARHA; DALTON; GALEA, 2010), enquanto que a exposição crônica ao E₂ aumenta a interação social (TANG et al., 2005) e causa efeitos ansiolíticos/antidepressivos em ratas ovariectomizadas (WALF; FRYE, 2009). Ademais, há também um reconhecimento crescente do papel do E₂ em machos (KITAY, 1963; LEAVY et al., 2017; MAURER; GORSKI, 1997). O E₂ causa feminilização e reduz os níveis de testosterona no plasma em roedores machos (PATISAUL; ADEWALE, 2009). Por outro lado, camundongos machos submetidos a nocaute de receptores de estrógeno (ER α e ER β) apresentam agressividade elevada (OGAWA et al., 2000; SCORDALAKES; RISSMAN, 2003), reforçando o papel estrogênico na modulação das respostas comportamentais em ambos os sexos.

É importante ressaltar que o E₂ interfere com outros hormônios esteroides, atuando sobre receptores estrogênicos ER α em neurônios hipotalâmicos que expressam kisspeptina, neurocinina e dinorfina para modular o hormônio liberador de gonadotrofina (GnRH) em ratos (MITTELMAN-SMITH et al., 2012) e na produção de gonadotrofina hipofisária em humanos (FINKELSTEIN; O'DEA; WHITCOMB; CROWLEY JR, 1991; ROCHIRA et al., 2006). Os estrógenos também interagem com os hormônios glicocorticoides, relacionados ao estresse incluindo cortisol em humanos e peixes e corticosterona em roedores (JONES; GUPTON; CURTIS, 2016). Os glicocorticoides também estão relacionados ao eixo hipotálamo-hipófise. Frente a estímulos estressores o hipotálamo secreta o hormônio liberador de corticotropina (CRH) o qual estimula a produção do hormônio adrenocorticotrópico (ACTH) pela hipófise. Esse, por sua vez, atua na glândula adrenal estimulando a produção de cortisol que ativa respostas fisiológicas e comportamentais de enfrentamento ao estímulo estressor em diferentes espécies (GUYTON; HALL, 2017). Em mulheres o E₂ reduz os níveis de cortisol (GRANT; PAVLATOS; FORSHAM, 1965), porém em roedores aumenta (BURGESS; HANDA, 1992) ou diminui (JONES; GUPTON; CURTIS, 2016) os níveis de corticosterona em ratas. Isso, por sua vez, reforça ainda mais o papel do E₂ e outros estrogênios em comportamentos relacionados ao estresse e seus déficits. Os efeitos comportamentais e neuroendócrinos do E₂ ainda são pouco compreendidos (JASUJA et al., 2013; KACKER; TRAISH; MORGENTALER, 2012; MULLER et al., 2003; SHARMA et al., 2014), e requerem mais estudos em uma ampla gama de modelos animais.

2.3 Zebrafish como modelo para experimentação animal

Complementando os modelos experimentais de roedores, vários organismos aquáticos têm sido amplamente utilizados para avaliar os efeitos do E₂ na fisiologia (CELINO-BRADY et al., 2019; CZARNY et al., 2017; PINTO; ESTÊVÃO; POWER, 2014) e no comportamento (ABREU et al., 2018; BOLIS et al., 2001; GERHARDT, 2007; MATSUI, 2017). Um pequeno peixe teleosteo de água doce, o *zebrafish* (*Danio*

rerio) está rapidamente se tornando um novo organismo modelo em biomedicina, para pesquisas neurocomportamentais e neurofarmacológicas (DE ABREU et al., 2019; KALUEFF; STEWART; GERLAI, 2014; OLIVEIRA, 2013), incluindo o estudo de vários comportamentos afetivos e sociais (DE ABREU et al., 2020; KALUEFF; STEWART; GERLAI, 2014; STEWART et al., 2014) visto que, seu rico repertório comportamental já está bem caracterizado e descrito (KALUEFF et al., 2013). *Zebrafish* também exhibe comportamentos semelhantes à ansiedade que podem ser avaliados no teste baseado na reação a um ambiente novo, conhecido como teste do tanque novo (DEMIN et al., 2020; EGAN et al., 2009; KYSIL et al., 2017). Em geral, o comportamento de ansiedade do *zebrafish* também é paralelo ao dos mamíferos, sendo a sensibilidade a fatores ansiogênicos e ansiolíticos bidirecional em ambos (CACHAT et al., 2011; DEMIN et al., 2020; MAXIMINO et al., 2010). Em relação ao comportamento social, *zebrafish* passam a maior parte do tempo nadando em cardume, demonstrando forte preferência por coespecíficos, comportamento que pode ser avaliado em testes de sociabilidade (CANZIAN et al., 2017; GIACOMINI et al., 2016; PHAM et al., 2012). Além disso, *zebrafish* possuem um eixo hipotalâmico-hipófise-inter-renal (HHI) bem desenvolvido o qual regula respostas comportamentais e fisiológicas ao estresse de maneira similar ao eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (HHA) de humanos e roedores (ALSOP; VIJAYAN, 2008; ALSOP; VIJAYAN, 2009; DEMIN et al., 2020). Demonstrando alta homologia genética e fisiológica com seres humanos e roedores (HOWE et al., 2013), *zebrafish* também possuem ERs e enzimas de síntese e inativação altamente conservados (LASSITER; KELLEY; LINNEY, 2002; MENUET et al., 2002) de E₂ (CLELLAND; PENG, 2009). Juntas, essas evidências indicam que *zebrafish* podem ser considerados como um importante modelo para estudar os efeitos dos estrógenos na regulação comportamental e fisiológica em pesquisas que buscam avaliar o impacto de contaminantes ambientais sobre os ecossistemas aquáticos. Do ponto de vista translacional, podem também auxiliar o entendimento dos possíveis efeitos dos contaminantes ambientais à população humana e na elucidação dos mecanismos envolvidos nesses efeitos. No entanto, o papel do E₂ nos fenótipos sociais e afetivos em *zebrafish*, especialmente em machos, necessitam de mais estudos.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

- Analisar os efeitos da exposição de 24 horas de E₂ sobre comportamentos sociais e emocionais, bem como nos níveis de cortisol em *zebrafish* machos.

3.2 Objetivos específicos

- Avaliar se a exposição ao E₂ interfere nos comportamentos de preferência social e ansiedade em *zebrafish*;
- Verificar se a exposição ao E₂ modula os níveis de cortisol em *zebrafish* machos;
- Correlacionar os efeitos comportamentais com os níveis de cortisol decorrentes da exposição ao E₂.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Animais

Um total de 120 peixes adultos (~ 1 ano de idade) machos obtidos de um fornecedor comercial (Mundo Aquático, Passo Fundo, Brasil) foram alojados em uma densidade de um peixe / L, em tanques de alojamento de 50 L equipados com filtros biológicos, sob aeração constante e um fotoperíodo natural (14h claro: 10h escuro - luzes acesas às 7h da manhã). A temperatura da água foi mantida em $28 \pm 0,5$ °C; pH $7,0 \pm 0,1$, oxigênio dissolvido mantido em $6 \pm 0,3$ mg / L, amônia total em $<0,01$ mg / L, dureza total em 6 mg / L e alcalinidade em 22 mg / L de CaCO₃. O presente estudo utilizou machos, devido ao conhecimento limitado dos efeitos de E₂ em *zebrafish* machos, além de evitar possíveis variações nos níveis basais de estradiol feminino (devido à fase do ciclo reprodutivo). O estudo foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (Protocolo 09/2019, anexo A), Universidade de Passo Fundo (Passo

Fundo, Brasil) e aderiu totalmente às diretrizes nacionais e internacionais sobre experimentação e cuidados com animais.

4.2 Manipulação e exposição ao E₂

Zebrafish foram expostos em todos os experimentos ao E₂ diretamente administrado na água. O E₂ foi obtido para este estudo na Fagron (Shangai, China). A partir dos tanques de alojamento, os animais foram distribuídos aleatoriamente em todos os grupos e tanques (usando o método de alocação aleatório e uma ferramenta de randomização (Research Randomizer on-line, www.randomizer.org/#randomize)) para evitar viés experimental. A ordem de exposição ao fármaco foi contrabalanceada entre os peixes. A concentração de 20 µg/L foi escolhida para este estudo foi baseada em relatos sobre os efeitos fisiológicos do E₂ em peixes (*Oryzias latipes*) adultos (FORAN; BENNETT; BENSON, 2000). Embora essa concentração não seja comumente encontrada no ambiente natural, pode ser encontrada em alguns ambientes específicos, como em locais próximos a estações de tratamento de águas residuais e em águas subterrâneas em todo o mundo (ADEEL et al., 2017; LI et al., 2010), além disso, essa concentração também foi considerada adequada para o estudo, dada a propriedade de bioacumulação do E₂ em peixes (HUANG et al., 2015; HUANG et al., 2013; SCHOLZ; MAYER, 2008), sugerindo que as concentrações efetivas desse hormônio *in vivo* podem ser maiores que a dose ambiental relatada *per se*. Para dissolver E₂ em água, foi utilizado etanol 0,00002% como solvente nos tanques de exposição de 10 L e, portanto, para avaliar o possível efeito do etanol sobre o comportamento do *zebrafish*, testamos um grupo adicional no estudo 1, demonstrando que a concentração utilizada (0,00002% vol/vol) é comportamentalmente inerte, de forma semelhante ao evidenciado por HALLARE; NAGEL; KÖHLER; TRIEBSKORN (2006). O tempo de tratamento de 24 horas é o padrão comumente utilizado em estudos de triagem de medicamentos em *zebrafish* (GENARIO et al., 2019; GENARIO et al., 2020; RAWASHDEH et al., 2007), bem como pela evidência de que a captação de E₂ em *zebrafish* é tempo/dose-depende, o que pode aumentar 10 a 50 vezes entre 1-24 horas (SOUDER; GORELICK,

2017). A pré-seleção de peixes machos para este estudo foi inicialmente realizada de maneira visual, e posteriormente à análise comportamental confirmada, de acordo com GUPTA; MULLINS (2010), dissecando o animal e examinando suas gônadas usando um estereomicroscópio Stemi-2000 (Zeiss AG, Oberkochen, Alemanha), como em GENARIO et al. (2020).

4.3 Testes comportamentais e análise de cortisol

No estudo 1 foi avaliado o comportamento de grupo (avaliando o cardume, $n = 8$ por grupo) e interação social ($n = 32$), expondo *zebrafish* adultos machos ao E_2 ($20 \mu\text{g} / \text{L}$) e veículo (etanol) por 24 h. Cada grupo de quatro peixes ($0,4$ peixes / L), foi alojado em oito tanques de vidro de 10 L (25 altura \times 35 comprimento 15 largura, cm). Como mostrado na Figura 1, primeiramente foi avaliado o comportamento de cardume de *zebrafish* ($n = 8$ cardumes por grupo) e em seguida, esses peixes foram testados individualmente no teste de preferência social ($n = 32$ por grupo). O teste de cardume foi realizado inserindo um grupo de quatro peixes no tanque teste (24 comprimento \times 20 altura \times 8 largura, cm) e filmado por 5 minutos. Os vídeos foram analisados posteriormente usando o software Image-J 1.49 (Institutos Nacionais de Saúde, Bethesda, EUA), e os fenótipos de cardume foram avaliados por meio de capturas de tela feitas a cada 15s durante o período de teste (com um total de 20 capturas de tela por grupo), para calcular os seguintes parâmetros: média da distância entre peixes, distância do coespecíficos mais próximo *versus* do mais distante e a dispersão geral do grupo (tamanho do cardume), de acordo com CANZIAN et al., (2017).

No teste de interação social (Figura 1), os peixes foram transferidos individualmente para o tanque teste (30 comprimento \times 10 profundidade \times 15 altura, cm) posicionado entre dois tanques semelhantes, um somente com água e outro contendo um grupo de 15 coespecíficos. Os animais foram aclimatados ao tanque teste por 30 segundos e depois filmados por 10 segundos (GIACOMINI et al., 2016) por uma câmera HD Webcam C525 (Logitech, Romanel-sur-Morges, Suíça). Os vídeos foram analisados usando o software ANY-maze® (Stoelting Co, Wood Dale, EUA),

calculando a distância percorrida, entradas e tempo gasto na zona próxima ao coespecíficos (30 comprimento \times 10 profundidade \times 15 altura, cm) como descrito em GIACOMINI et al. (2016).

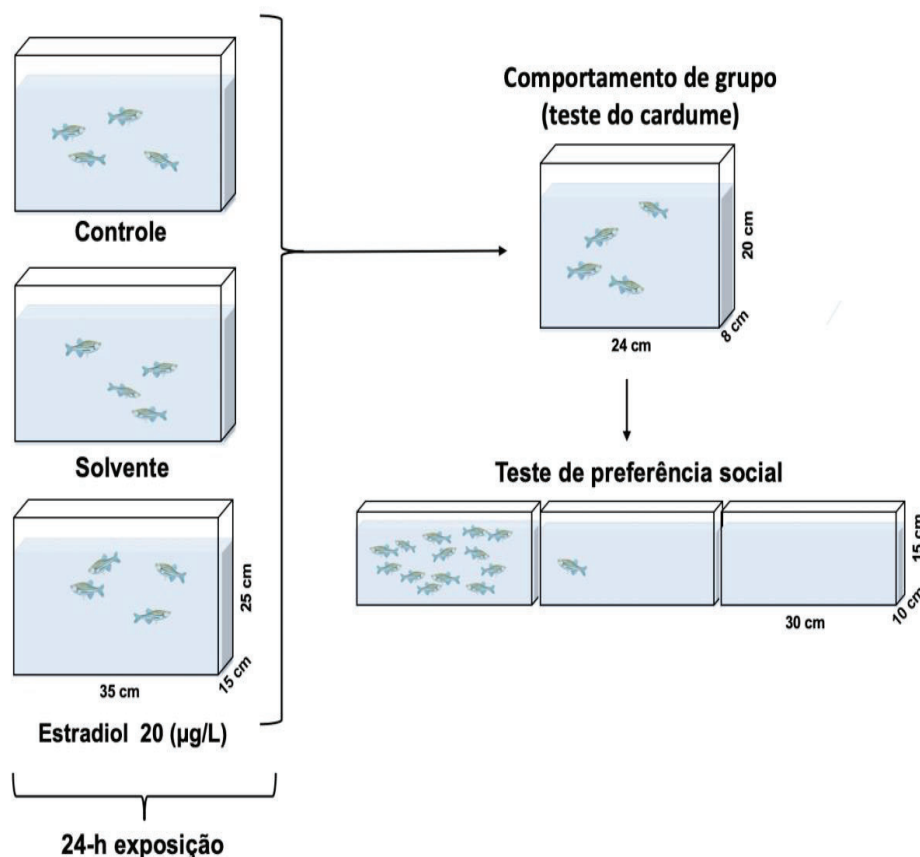


Figura 1. Resumo esquemático do delineamento experimental do estudo 1, avaliando os efeitos do E₂ sobre o comportamento social de *zebrafish* machos adultos. Fonte: A autora.

O estudo 2 examinou os efeitos da exposição aguda ao E₂ (20 µg / L) sobre o comportamento de ansiedade (n = 12 por grupo) e níveis de cortisol de corpo inteiro em *zebrafish* machos (Figura 2). Como a concentração de solvente foi comportamental e fisiologicamente inerte (estudo 1), o grupo etanol não foi incluído, aderindo ao princípio dos 3Rs (*Replacement, Reduction, Refinement*) da experimentação animal. Peixes de ambos os grupos foram tratados por 24 horas com E₂ ou não tratados (grupo controle) e, posteriormente, testados individualmente no teste do tanque novo, selecionado por ser

um dos testes mais sensíveis para avaliar comportamentos emocionais de *zebrafish* (KYSIL et al., 2017). O aparato utilizado consiste em um tanque de vidro retangular (24 comprimento × 8 profundidade × 20 altura, cm), dividido virtualmente por uma linha horizontal na metade do aquário, criando uma zona superior e outra inferior (EGAN et al., 2009). Os peixes foram gravados individualmente por 6 minutos usando uma câmera Logitech HD Webcam C525 e os vídeos foram analisados usando o software ANY-maze®, calculando (1) a distância total percorrida (m), (2) o número e (3) duração dos episódios de imobilidade (imobilidade > 1 s), (4) o número de entradas e o (5) tempo gasto na metade superior do tanque, conforme descrito em EGAN et al. (2009); GIACOMINI et al. (2016).

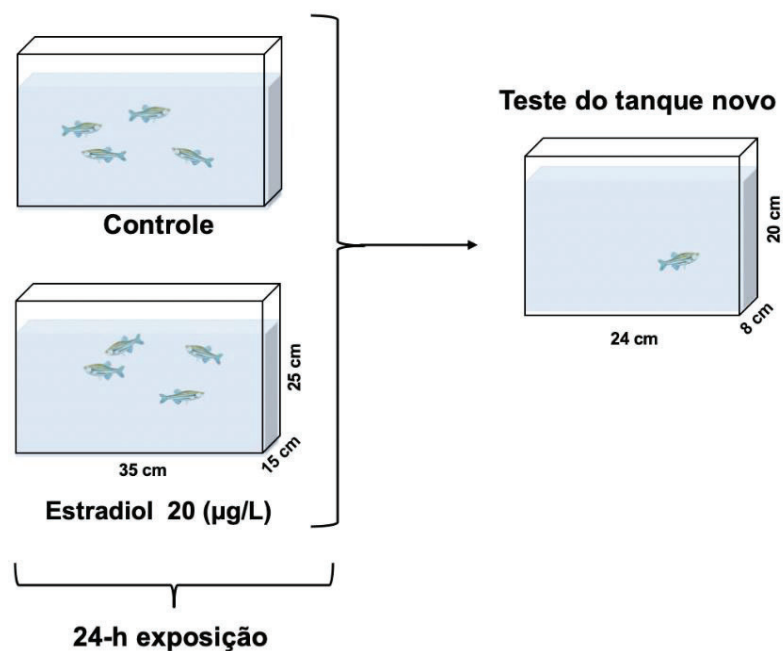


Figura 2. Resumo esquemático do delineamento experimental do estudo 2, avaliando os efeitos do E₂ sobre o comportamento de ansiedade em *zebrafish* machos adultos. Fonte: A autora.

Ao término das análises comportamentais, os peixes foram eutanasiados por crioanestesia, seguida de decapitação (após a interrupção dos movimentos operculares),

ponderados (para medir o peso corporal) e armazenados a -20°C para posterior determinação do sexo e análise de cortisol de corpo inteiro. O cortisol de corpo inteiro foi extraído em éter de acordo com SINK; LOCHMANN; FECTEAU (2008), no qual foram utilizados dois peixes (*pool*) por amostra e avaliados por kit de cortisol comercialmente disponível (kit Cortisol ELISA, Diagnostic Biochem Canada DBC Inc., Londres, Canadá). A precisão foi testada calculando-se as recuperações de amostras adicionadas com quantidades conhecidas de cortisol (50, 25 e 12,5 ng / mL), com a detecção média de amostras adicionadas atingindo 95%. Todos os valores de cortisol foram ajustados para recuperação (valor de cortisol = valor medido \times 1,05) e posteriormente normalizados com base no peso das respectivas amostras de corpo inteiro, os resultados de cortisol de corpo inteiro são apresentados em concentrações absolutas de cortisol em ng/g de peso corporal.

4.4 Análise de dados

A normalidade dos dados foi avaliada pelo teste de Kolmogorov-Smirnov. No Experimento 1, os grupos experimentais foram comparados usando o Teste de Kruskal-Wallis (KW, fator - tratamento), seguido pelo teste post-hoc de Dunn para dados significativos de KW. No estudo 2, os grupos foram comparados usando o teste de Mann-Whitney. P foi definido como <0,05 em todas as análises. Todos os animais foram incluídos nas análises sem remoção externa. A avaliação dos grupos experimentais, durante os ensaios comportamentais e de cortisol, foi realizada de forma cega, onde o pesquisador não conhecia qual grupo estava avaliando. As análises comportamentais foram realizadas por experimentadores treinados (confiabilidade intra/interexaminadores > 0,85, conforme avaliado pela correlação de Spearman).

5. RESULTADOS

No estudo 1, avaliamos a modulação do E₂ sobre o comportamento social em *zebrafish*. No teste de preferência social, *zebrafish* expostos a E₂ por 24 horas passaram mais tempo próximos ao tanque contendo coespecíficos (H = 9,26; p = 0,0098), demonstrando um comportamento pró-social (Figura 3) sem alterar a distância total percorrida (H = 4,09; p = 0,13) ou o número de entradas na zona próxima aos coespecíficos (H = 2,36; p = 0,31; n₂ = 0,012; d = 0,22). No teste de cardume, 24 horas de exposição ao E₂, aumentou a área de dispersão do cardume (H = 8,29; p = 0,016) (Figura 1), mas não alterou a distância entre os peixes (H = 4,99; p = 0,083), a distância do peixe mais próximo (H = 0,67; p = 0,72) ou a distância do peixe mais distante (H = 4,36; p = 0,11), demonstrando um comportamento tipo ansiolítico.

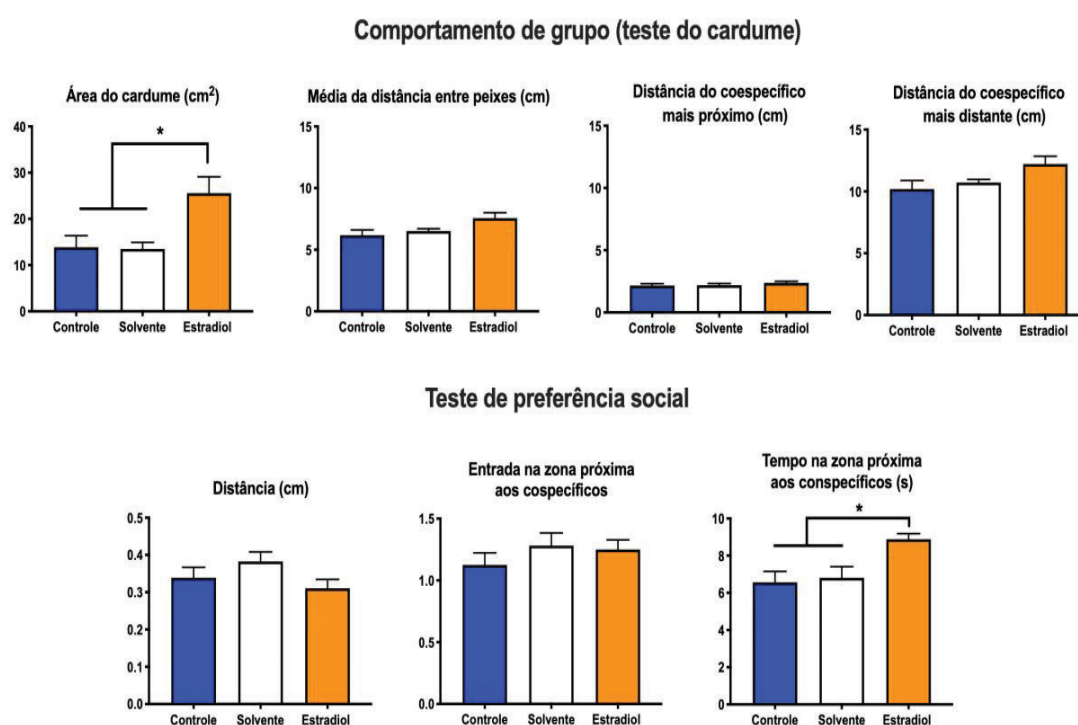


Figura 3. Efeitos do E₂ sobre o comportamento de *zebrafish* machos adultos no teste de cardume (n = 8 cardumes) e no teste de preferência social individual subsequente (n = 32). Os dados são expressos como média + SEM, * p < 0,05, teste post hoc de Dunn para dados significativos de Kruskal-Wallis.

No estudo 2, como apresentado na figura 4, *zebrafish* machos expostos ao E₂ apresentaram maior número de entradas e no tempo gasto na metade superior do tanque novo, indicando comportamento tipo ansiolítico, em paralelo com a redução dos níveis de cortisol no corpo inteiro comparado ao grupo controle.

Comportamento de ansiedade e níveis de cortisol no corpo inteiro

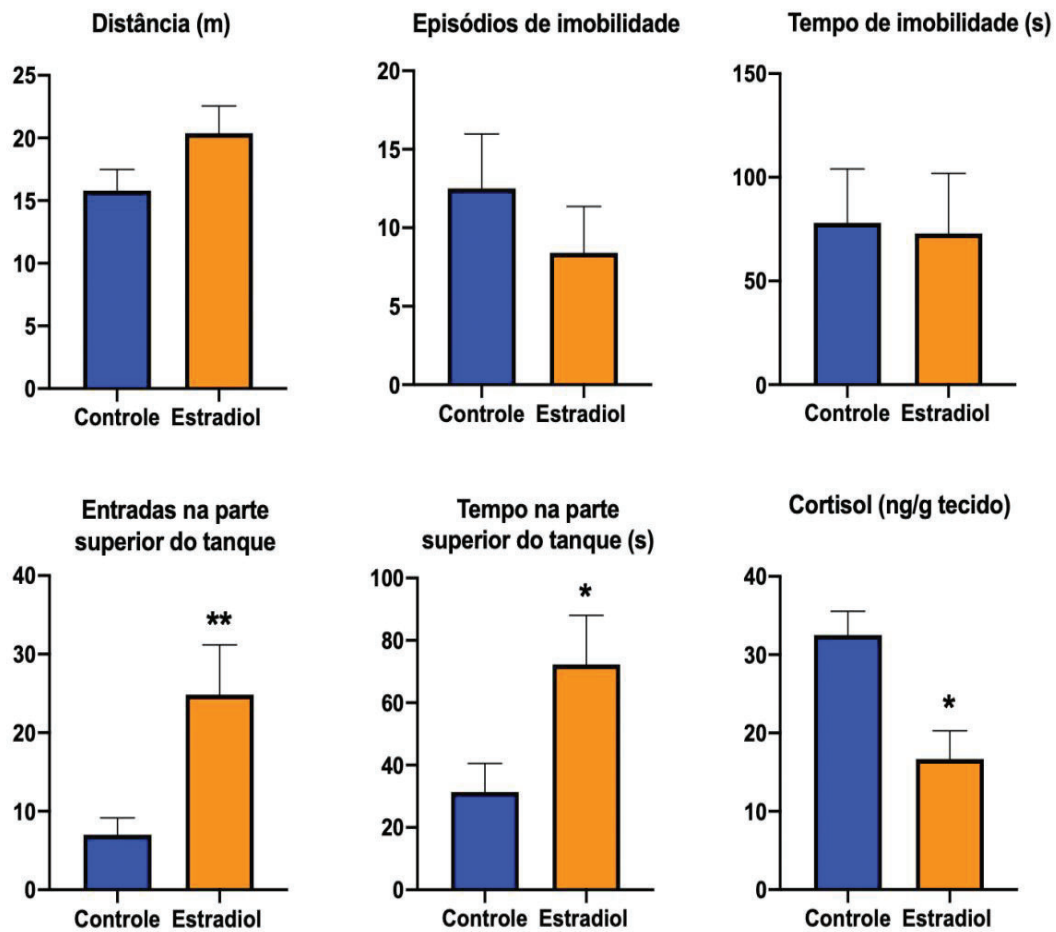


Figura 4. Efeitos do E₂ sobre o comportamento de ansiedade em *zebrafish* machos adultos (testado no teste de tanque novo de 6 minutos, n = 12 por grupo) e sobre os níveis de cortisol no corpo inteiro (n = 6, 2 cérebros agrupados por amostra). Dados são expressos como média + SEM, * p < 0,05, ** p < 0,01, teste U vs. controles.

6. DISCUSSÃO

O presente estudo é o primeiro a demonstrar os efeitos pró-sociais, ansiolíticos e neuroendócrinos (redução dos níveis de cortisol), da exposição ao E₂ por 24 horas em *zebrafish* machos adultos. Enquanto *zebrafish* machos expostos ao E₂ aumentaram a preferência social (percorrendo mais tempo próximos ao tanque contendo coespecíficos), eles também demonstraram um aumento na área de dispersão do cardume, considerada uma resposta associada a comportamentos ansiolíticos em *zebrafish* (STEWART et al., 2012), e consistente com o aumento da exploração da parte superior do tanque observado no teste de tanque novo e com a redução nos níveis de cortisol. É importante ressaltar, que a crescente evidência animal sugere que os esteroides sexuais, incluindo E₂, podem modular potentemente o eixo HHA (LIU et al., 2012; MAENG; MILAD, 2015; SHARMA et al., 2014) e, portanto, é provável que afetem o eixo HHI em *zebrafish*. Paralelamente às nossas descobertas, o E₂ evoca comportamentos ansiolíticos e antidepressivos em roedores (CARRIER et al., 2015; ROMANO-TORRES; FERNÁNDEZ-GUASTI, 2010; WALF; FRYE, 2009) e humanos (BORROW; HANDA, 2017). Por exemplo, mulheres jovens apresentam menores níveis de cortisol comparado a homens jovens (DAVIS; EMORY, 1995; KIRSCHBAUM et al., 1999; KUDIELKA et al., 2004), nos quais E₂ reduz respostas simpáticas a um estressor mental (DEL RIO et al., 1994). E₂ também facilita o *feed back* negativo na secreção do ACTH mediado por cortisol em homens e mulheres idosos estressados (SHARMA et al., 2014), enquanto que camundongos fêmeas ovariectomizadas tratadas com agonista de receptores de estrógeno (ER β) exibem menores níveis de corticosterona plasmática e ACTH induzidas por estresse (OYOLA et al., 2012).

De acordo com nossos resultados, *zebrafish* machos expostos ao E₂ exibem uma resposta embotada do cortisol a qual pode estar relacionada com uma menor expressão do gene do fator de liberação de corticotropina (CRF) também evidenciada por FUZZEN; BERNIER; VAN DER KRAAK, 2011. Essas evidências suportam a utilização do *zebrafish* como um modelo para rastrear os efeitos dos estrogênios sobre as respostas fisiológicas e comportamentais relacionadas ao estresse, e também podem

ser relevantes para investigar os potenciais efeitos de interruptores endócrinos *in vivo* (JARQUE et al., 2019). Além disso, nossos resultados em *zebrafish* corroboram com alguns dados clínicos que implicam a sinalização E₂ nos transtornos de ansiedade. Por exemplo, a ansiedade generalizada e a fobia estão relacionadas aos polimorfismos dos receptores ERβ e ERα, respectivamente, os quais podem ser atenuados por terapia com estrogênio (RYAN et al. 2011). Existe também, uma relação bidirecional entre ansiedade e níveis de E₂ em mulheres, sendo uma correlação positiva para níveis elevados e negativa para níveis reduzidos de E₂ (GRAHAM; SHIN, 2018), exigindo, assim, mais estudos sobre o papel do E₂ nos transtornos de ansiedade.

Estudos sugerem que pode haver efeitos dose dependentes do E₂ *in vivo*, visto que em dose baixa o E₂ (0,005 μM) aumenta e, em dose elevada (1 μM) o E₂ diminui a atividade cardíaca em larvas de *zebrafish* (ULHAQ; KISHIDA, 2018). Além disso, larvas expostas a E₂ aumentam a atividade locomotora e a expressão dos genes *per1a* (gene do sistema circadiano) e *nr1d2a* (receptores nucleares subfamília 1 grupo D membro 2a, atua na regulação do ritmo circadiano) (ZHAO; ZHANG; FENT, 2018), ambos respondendo predominantemente à sinalização de glicocorticóides (BASS, 2012), reforçando a relação entre esteroides e cortisol. Tanto a elevação, quanto a depleção dos níveis de cortisol também são importantes para os fenótipos comportamentais e fisiológicos em *zebrafish*. A redução do cortisol induzida por metirapona diminui a atividade locomotora em *zebrafish* (VERA-CHANG et al., 2018). Por outro lado, o tratamento com cortisol em *zebrafish* expostos previamente à fluoxetina (fármaco ansiolítico) aumentaram os níveis de cortisol e a atividade locomotora quando comparado com peixes não tratados (VERA-CHANG et al., 2018). Nesse sentido, a exposição ao E₂ em nosso estudo pode ter aumentado os níveis de E₂ em *zebrafish* machos, causando efeitos pró-sociais e ansiolíticos.

Nossos resultados, corroboram evidências crescentes que implicam sinalização de E₂ na regulação do comportamento social em várias espécies (ERVIN et al., 2015; GARCIA et al., 2017; NAKATA; ÅGMO; SAGOSHI; OGAWA, 2018). Em roedores

machos o nocaute de receptores ER β promove hierarquia social e agressões (CLIPPERTON ALLEN et al., 2010; NAKATA; ÅGMO; SAGOSHI; OGAWA, 2018; TSUDA; YAMAGUCHI; NAKATA; OGAWA, 2014), enquanto que o tratamento agudo e crônico com E₂ induzem maior preferência social (TANG et al., 2005). Da mesma forma, a variabilidade nos níveis de E₂ nas mulheres está ligada ao aumento da sensibilidade emocional ao estresse psicossocial (GORDON et al., 2016), problemas com interações sociais, assim como depressão e ansiedade (DEEKS; MCCABE, 2004; LANZA et al., 2012; UGUZ; SAHINGOZ; GEZGINC; AYHAN, 2011).

É importante ressaltar que o *zebrafish* continua emergir como um modelo animal que geralmente se sobrepõe a mamíferos, mas também pode diferir deles. Ao contrário dos roedores, a exposição ao E₂ inibe a neurogênese em *zebrafish* machos adultos, diminuindo a proliferação e migração celular no telencéfalo e no hipotálamo mediobasal (DIOTEL et al., 2013). Além da diversidade de respostas entre espécies, há evidências que apontam divergência de efeitos entre os hormônios estrogênicos. A exposição a outro estrógeno, o 17 α -etinilestradiol (EE₂) o qual apresenta uma menor solubilidade quando comparado ao E₂, mas uma maior afinidade de ligação aos receptores estrogênicos (NASH; KIME; WESTER, 2004; THORPE et al., 2003; TILTON; FORAN; BENSON, 2005), também é responsável por modular o comportamento de vertebrados. Ao contrário do E₂, a exposição ao EE₂ durante o desenvolvimento, aumenta a ansiedade e a coesão dos cardumes em ambos os sexos (VOLKOVA et al., 2015). O EE₂ em níveis ambientalmente relevantes podem alterar a agressão e a sociabilidade, e o sucesso reprodutivo no *zebrafish* machos (COLMAN et al., 2009). Em *zebrafish* machos adultos o EE₂ reduz a agressão e reverte o domínio social (LÄNGE et al., 2001). A exposição ao EE₂ compromete a resposta ao estresse, regulando os níveis de hormônios específicos e provocando uma resposta ansiolítica, aumentando a agressão e reduzindo a preferência social em *zebrafish* (FENSKE et al., 2020). *Zebrafish* machos expostos agudamente ao EE₂ apresentam maior ansiedade no teste de escototaxia (PORSERYD et al., 2017) e esses efeitos podem ser abolidos por fármaco ansiolítico, como o inibidor seletivo da recaptação da serotonina - citalopram

(PORSERYD et al., 2017). Além disso, os efeitos do estrogênio também podem ser transgeracionais, pois as proles de *zebrafish* tratados cronicamente com EE₂ apresentam ansiedade elevada em comparação com peixes não expostos (VOLKOVA et al., 2015).

Juntamente com nossos resultados, as evidências reforçam o uso de *zebrafish* para estudar os efeitos de diferentes estrogênios sobre SNC. Uma limitação dos estudos sobre os estrogênios em *zebrafish* é a capacidade de translacionabilidade de seus dados para mamíferos, uma vez que podem haver diferenças nas afinidades/atividades de ER em peixes quando comparados aos de mamíferos, bem como diferenças na ação estrogênica, visto que *zebrafish* expressam três genes ER (*esr1*, *esr2a* e *esr2b*) comparado a somente dois genes ER (ER α e ER β) em mamíferos (MENUET et al., 2002). Além disso, *zebrafish* produzem vitelogenina (uma proteína precursora do vitelo), enquanto que os mamíferos não, representando assim um claro processo dependente de estrogênio (VAN DER VEN et al., 2003; ZHONG et al., 2014) que difere dos mamíferos.

O presente estudo concentrou-se na seleção de comportamentos não reprodutivos e a expansão da gama de testes comportamentais e seus respectivos domínios-alvo. Considerando o impacto dos estrogênios sobre a agressividade em machos de várias espécies de mamíferos, aves e peixes (FRITZ; SENA; BECKER; KATZ, 2019; HEIMOVICS et al., 2018; HEIMOVICS; TRAINOR; SOMA, 2015; HILAKIVI-CLARKE; RAYGADA; CHO, 1997; NAKATA; ÅGMO; SAGOSHI; OGAWA, 2018), o rastreamento do comportamento de agressividade em *zebrafish*, poderá beneficiar estudos subsequentes. Além disso, examinamos apenas uma concentração de E₂ administrada por 24 horas, e embora comportamentalmente ativa, pode ser necessário testar uma faixa de concentração mais ampla desse hormônio e em períodos de tratamento mais curtos ou mais longos em *zebrafish* machos, bem como realizar análises das concentrações nominais de E₂ na solução de exposição, bem como a captação de E₂ no cérebro e/ou em amostras de corpo inteiro.

No geral, o presente estudo reforça evidências obtidas em estudos anteriores em roedores machos que demonstram o aumento da socialidade (FILICE et al., 2018) e redução da ansiedade (OYOLA et al., 2012; WALF; FRYE, 2009) após o tratamento com E₂, implicando esse hormônio como um potencial agente pró-social e ansiolítico. Conforme discutido recentemente, E₂ e ERs podem afetar comportamentos semelhantes à ansiedade em humanos e em modelo animal por meio de múltiplos mecanismos putativos, incluindo modulação direta dos componentes centrais do eixo HHA, bem como dos sistemas serotoninérgico e ocitocinérgico (BORROW; HANDA, 2017). Assim, mecanismos semelhantes, também podem ser possíveis no *zebrafish*, merecendo ser elucidados. Além disso, verificar uma modulação semelhante de comportamentos emocionais e sociais em *zebrafish* também sugere uma provável natureza evolutiva conservada, tal como a regulação E₂, e, portanto, tendo potencial translacional como modelo de doenças do SNC usando esta espécie. Assim, espera-se que futuros estudos possam elucidar os mecanismos adicionais relacionados aos efeitos agudos e crônicos do E₂ sobre o SNC. Finalmente, considerando o potencial de alto rendimento dos testes em *zebrafish*, essa espécie também pode ser útil para rastrear novos medicamentos que atuam no SNC relacionados ao E₂, investigando suas interações medicamentosas, propriedades potenciais de desreguladores endócrinos, bem como examinar os efeitos de vários hormônios esteroides sobre as respostas emocionais.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

O presente estudo reforça evidências obtidas em estudos anteriores em roedores machos que demonstram o aumento da sociabilidade (FILICE et al., 2018) e redução da ansiedade (OYOLA et al., 2012; WALF; FRYE, 2009) após o tratamento com E₂, demonstrando que esse hormônio pode ser um potencial agente pró-social e ansiolítico. Embora a concentração de 20 µg/L de E₂ não seja comumente encontrada no ambiente, essa pode ser considerada relevante devido à bioacumulação documentada em peixes após uma exposição a longo prazo, sugerindo que as concentrações efetivas desse hormônio *in vivo* podem ser maiores que a dose ambiental relatada *per se*.

Do ponto de vista ecológico o aumento da sociabilidade é importante para o comportamento de cardume o que viabiliza reprodução, acesso ao alimento e proteção. Por outro lado, o efeito ansiolítico do E₂ pode promover um comportamento de ousadia aumentando a vulnerabilidade frente a predadores presentes no ambiente e, da mesma forma, a redução dos níveis basais de cortisol pode comprometer a resposta ao estresse visto que a elevação do cortisol amplifica a capacidade de percepção de sinais estressores e de predadores.

Do ponto de vista translacional, o aumento da sociabilidade associado à redução da ansiedade e cortisol evidenciado em *zebrafish* machos adultos são achados importantes para rastrear novos medicamentos do SNC relacionados ao E₂, investigando as diferenças nas respostas entre diferentes esteroides, suas interações medicamentosas, bem como examinar os efeitos dos hormônios esteroides sobre as respostas emocionais.

Os estudos futuros podem ter como alvo trajetórias transgeracionais/epigenéticas de desenvolvimento para examinar como os efeitos do E₂ se alteram com a idade. Finalmente, diferenças potenciais específicas de linhagem e individuais nas respostas comportamentais e fisiológicas ao E₂, seu impacto na neurotransmissão, expressão de

genes cerebrais, bem como biomarcadores moleculares e genéticos/genômicos de neuroinflamação e/ou micróglia e astrócitos, merecem um estudo mais aprofundado.

REFERÊNCIAS

- ABREU, M. S. et al. Estradiol shapes mutualistic behaviour of female cleaner fish (*Labroides dimidiatus* - Valenciennes, 1839): Potential implications of environmental disturbance. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 157, n. November 2017, p. 244–248, 2018.
- ADEEL, M. et al. Environmental impact of estrogens on human, animal and plant life: A critical review. **Environment International**, v. 99, p. 107–119, 2017.
- ALONSO, A. et al. Acute effects of 17 β -estradiol and genistein on insulin sensitivity and spatial memory in aged ovariectomized female rats. **Age**, v. 32, n. 4, p. 421–434, 2010.
- ALSOP, D.; VIJAYAN, M.M. Development of the corticosteroid stress axis and receptor expression in zebrafish. **American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, v. 294, p. R711–R719, 2008.
- ALSOP, D.; VIJAYAN, M. The zebrafish stress axis: molecular fallout from the teleost specific genome duplication event. **Gen. Comp. Endocrinol**, v. 161, p. 62–66, 2009.
- AREVALO, M. A. et al. Actions of estrogens on glial cells: Implications for neuroprotection. **Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects**, v. 1800, n. 10, p. 1106–1112, 2010.
- ARIS, A. Z.; SHAMSUDDIN, A. S.; PRAVEENA, S. M. Occurrence of 17 α -ethynylestradiol (EE2) in the environment and effect on exposed biota: A review. **Environment International**, v. 69, p. 104–119, 2014.
- BALTHAZART, J.; BALL, G. F. New insights into the regulation and function of brain estrogen synthase (aromatase). **Trends Neurosci**, v. 21, p. 243–249, 1998.
- BARHA, C.K.; DALTON, G.L.; GALEA, L. Low doses of 17 α -estradiol and 17 β -estradiol facilitate, whereas higher doses of estrone and 17 α - and 17 β -estradiol impair, contextual fear conditioning in adult female rats. **Neuropsychopharmacology : official publication of the American College of**

Neuropsychopharmacology, v. 35, p. 547–559, 2010.

BARON-COHEN, S. et al. Foetal oestrogens and autism. **Molecular Psychiatry**, 2019.

BASS, J. Circadian topology of metabolism. **Nature**, v. 491 (7424), p. 38, 2012.

BÉDARD, P.J.; BOUCHER, R.; DAIGLE, M.; DI PAOLO, T. Physiological doses of estradiol can increase lingual dyskinesia and cerebrospinal fluid homovanillic acid in monkeys. **Neuroscience Letters**, v. 58, p. 327–331, 1985.

BERENBAUM, S.A.; BELTZ, A. M. Sexual differentiation of human behavior: effects of prenatal and pubertal organizational hormones. **Front. Neuroendocrinol**, v. 32 (2), p. 183–200, 2011.

BERGER, E. et al. Effect-directed identification of endocrine disruptors in plastic baby teethers. **Journal of Applied Toxicology**, v. 35, n. 11, p. 1254–1261, 2015.

BOLIS, C. L. et al. Fish as model in pharmacological and biological research. **Pharmacological Research**, v. 44, n. 4, p. 265–280, 2001.

BORROW, A.P.; HANDA, R. J. . Estrogen Receptors Modulation of Anxiety-Like Behavior. Vitamins and hormones. **Vitamins and hormones**, v. 103, p. 27–52, 2017.

BROWN, L. M.; CLEGG, D. J. Central effects of estradiol in the regulation of food intake, body weight, and adiposity. **Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology**, v. 122, n. 1–3, p. 65–73, 2010.

BURGESS, L.H.; HANDA, R. J. Chronic estrogen-induced alterations in adrenocorticotropin and corticosterone secretion, and glucocorticoid receptor-mediated functions in female rats. **Endocrinology**, v. 131, p. 1261–1269, 1992.

CACHAT et al. Modeling stress and anxiety in zebrafish, Zebrafish models in neurobehavioral research. Springer. **Nature Protocols**, p. 73–88, 2011.

CANZIAN, J. et al. Conspecific alarm substance differently alters group behavior of zebrafish populations: Putative involvement of cholinergic and purinergic signaling in anxiety- and fear-like responses. **Behavioural Brain Research**, v. 320, p. 255–263, 2017.

CARRÉ, J. M.; MCCORMICK, C. M.; HARIRI, A. R. The social neuroendocrinology of human aggression. **Psychoneuroendocrinology**, v. 36, n. 7, p. 935–944, 2011.

CARRIER, N. et al. The Anxiolytic and Antidepressant-like Effects of Testosterone and Estrogen in Gonadectomized Male Rats. **Biological Psychiatry**, v. 78, n. 4, p. 259–269, 2015.

CELINO-BRADY, F. T. et al. Early-life exposure to 17 β -estradiol and 4-nonylphenol impacts the growth hormone/insulin-like growth-factor system and estrogen receptors in Mozambique tilapia, *Oreochromis mossambicus*. **Aquatic Toxicology**, v. 217, n. October, p. 105336, 2019.

CHEN, J. et al. The mechanism of environmental endocrine disruptors (DEHP) induces epigenetic transgenerational inheritance of cryptorchidism. **PLoS ONE**, v. 10, n. 6, p. 1–16, 2015.

CLAYTON, A.H.; NINAN, P. T. Depression or menopause? Presentation and management of major depressive disorder in perimenopausal and postmenopausal women. **Primary care companion to the Journal of clinical psychiatry**, v. 12, p. PCC.08r00747-PCC.00708r00747, 2010.

CLELLAND, E.; PENG, C. Endocrine/paracrine control of zebrafish ovarian development. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 312, n. 1–2, p. 42–52, 2009.

CLIPPERTON ALLEN, A. E. et al. Agonistic behavior in males and females: Effects of an estrogen receptor beta agonist in gonadectomized and gonadally intact mice. **Psychoneuroendocrinology**, v. 35, n. 7, p. 1008–1022, 2010.

COLMAN, J. R. et al. Effects of the synthetic estrogen, 17 α -ethinylestradiol, on aggression and courtship behavior in male zebrafish (*Danio rerio*). **Aquatic Toxicology**, v. 91, n. 4, p. 346–354, 2009.

CRISTINA, P.; MARIA, C.U; CARMEN, V. Endocrine disruptors in the environment and their impact on human health. **Environ. Eng. Manage. J.**, v. 11, p. 160–170, 2012.

CUI, J.; SHEN, Y.; LI, R. Estrogen synthesis and signaling pathways during aging: From periphery to brain. **Trends in Molecular Medicine**, v. 19, n. 3, p. 197–209, 2013.

CZARNY, K. et al., The impact of estrogens on aquatic organisms and methods for their determination. **Critical reviews in environmental science and technology**, v. 47, p. 909–963, 2017.

DAITZMAN, R.; ZUCKERMAN, M. Disinhibitory sensation seeking, personality and gonadal hormones. **Personality and Individual Differences**, v. 1, n. 2, p. 103–110, 1980.

DAVIS, M.; EMORY, E. Sex differences in neonatal stress reactivity. **Child Development**, v. 66, p. 14–27, 1995.

DE ABREU, M. S. et al. Neuropharmacology, pharmacogenetics and pharmacogenomics of aggression: The zebrafish model. **Pharmacological Research**, v. 141, n. November 2018, p. 602–608, 2019.

DE ABREU, M. S. et al. Emotional behavior in aquatic organisms? Lessons from crayfish and zebrafish. **Journal of Neuroscience Research**, v. 98, n. 5, p. 764–779, 2020.

DEEKS, A.A.; MCCABE, M. P. Well-being and menopause: an investigation of purpose in life, self-acceptance and social role in premenopausal, perimenopausal and postmenopausal women. **Quality of Life Research**, v. 13, p. 389–398, 2004.

DEL RIO, G. et al. Effect of estradiol on the sympathoadrenal response to mental stress in normal men. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 79, p. 836–840, 1994.

DEMIN, K.A. et al. Understanding neurobehavioral effects of acute and chronic stress in zebrafish. **Stress**, p. 1–48, 2020.

DENSON, T. F. et al. Aggression in women: Behavior, brain and hormones. **Frontiers in Behavioral Neuroscience**, v. 12, n. May, p. 1–20, 2018.

DIOTEL, N. et al. Effects of estradiol in adult neurogenesis and brain repair in zebrafish. **Hormones and Behavior**, v. 63, n. 2, p. 193–207, 2013.

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.

ERVIN, K. S. J. et al. Estrogen involvement in social behavior in rodents: Rapid and long-term actions. **Hormones and Behavior**, v. 74, p. 53–76, 2015.

FENSKE, L. et al. 17 α Ethinylestradiol modulates endocrine and behavioral responses to stress in zebrafish Environmental Science and Pollution Research. **Environmental Science and Pollution Research International**, v. 27 (23), p. 29341–29351, 2020.

FILICE, F. et al. 17- β estradiol increases parvalbumin levels in Pvalb heterozygous mice and attenuates behavioral phenotypes with relevance to autism core symptoms. **Molecular Autism**, v. 9, n. 1, p. 1–13, 2018.

FINKELSTEIN, J.S.; O'DEA, L.S.L.; WHITCOMB, R.W.; CROWLEY JR, W. . Sex steroid control of gonadotropin secretion in the human male. II. Effects of estradiol administration in normal and gonadotropin-releasing hormone-deficient men. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 73, p. 621–628, 1991.

FORAN, C.M.; BENNETT, E.R.; BENSON, W. H. . Exposure to environmentally relevant concentrations of different nonylphenol formulations in Japanese medaka. **Marine Environmental Research**, v. 50, p. 135–139, 2000.

FRITZ, W.F.; SENA, L.S.; BECKER, S.E.; KATZ, L. S. Differential effects of androgens, estrogens and socio-sexual context on sexual behaviors in the castrated male goat. **Hormones and Behavior**, v. 109, p. 10–17, 2019.

FUZZEN, M.L.M.; BERNIER, N.J.; VAN DER KRAAK, G. Differential effects of 17 β -estradiol and 11-ketotestosterone on the endocrine stress response in zebrafish (*Danio rerio*). **General and comparative endocrinology**, v. 170, p. 365–373, 2011.

GARCIA, A.N. et al. The effects of long-term estradiol treatment on social behavior and gene expression in adult female rats. **Hormones and behavior**, v. 87, p. 145–154, 2017.

GENARIO et al. The evolutionarily conserved role of melatonin in CNS disorders and behavioral regulation: Translational lessons from zebrafish. **Neuroscience & Biobehavioral**, v. 99, p. 117–127, 2019.

GENARIO et al. Sex differences in adult zebrafish anxiolytic-like responses to diazepam and melatonin. **Neuroscience Letters**, v. 714, p. 134548, 2020.

GERHARDT, A. Aquatic behavioral ecotoxicology—prospects and limitations. **Human and Ecological Risk Assessment**, v. 13, p. 481–491, 2007.

GIACOMINI, A. et al. Fluoxetine and diazepam acutely modulate stress induced-behavior. **Behavioural Brain Research**, v. 296, p. 301–310, 2016.

GILL-SHARMA, M.K. et al. Antifertility effects of estradiol in adult male rats. **Journal of Endocrinological Investigation**, v. 24, p. 598–607, 2001.

GORDON, J. L. et al. Estradiol variability, stressful life events and the emergence of depressive symptomatology during the Menopause Transition. **Menopause (New York, NY)**, v. 23, p. 257–266, 2016.

GRAHAM, B.M.; SHIN, G. Estradiol moderates the relationship between state-trait

anxiety and attentional bias to threat in women. **Psychoneuroendocrinology**, v. 93, p. 82–89, 2018.

GRANT, S.D.; PAVLATOS, F.C.; FORSHAM, P. H. Effects of Estrogen Therapy on Cortisol Metabolism. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 25, p. 1057–1066, 1965.

GREEN, P.S.; SIMPKINS, J. W. Neuroprotective effects of estrogens: potential mechanisms of action. **International Journal of Developmental Neuroscience**, v. 18, p. 347–358, 2000.

GUPTA, T.; MULLINS, M. C. Dissection of organs from the adult zebrafish. **Journal of Visualized Experiments**, n. 37, p. 3–7, 2010.

GUYTON, A.C.; HALL, J. E. **Medical Physiology**. [s.l: s.n.]. v. 13

HALLARE, A.; NAGEL, K.; KÖHLER, H.-R.; TRIEBSKORN, R. Comparative embryotoxicity and proteotoxicity of three carrier solvents to zebrafish (*Danio rerio*) embryos. **Ecotoxicology and environmental safety**, v. 63, p. 378–388, 2006.

HEIMOVICS, S.A. et al. Rapid effects of 17 β -estradiol on aggressive behavior in songbirds: Environmental and genetic influences. **Hormones and behavior**, v. 104, p. 41–51, 2018.

HEIMOVICS, S.A.; TRAINOR, B.C.; SOMA, K. K. Rapid Effects of Estradiol on Aggression in Birds and Mice: The Fast and the Furious. **Integrative and comparative biology**, v. 55, p. 281–293, 2015.

HILAKIVI-CLARKE, L.; RAYGADA, M.; CHO, E. Serum estradiol levels and ethanol-induced aggression. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 58, p. 785–791, 1997.

HOWE et al. The zebrafish reference genome sequence and its relationship to the human genome. **Nature**, v. 496, p. 498–503, 2013.

HUANG, B. et al. Effects and bioaccumulation of 17 β -estradiol and 17 α -ethynylestradiol following long-term exposure in crucian carp. **Ecotoxicol Environ Saf**, v. 112, p. 169–176, 2015.

HUANG, B. et al. Occurrence, removal and bioaccumulation of steroid estrogens in Dianchi Lake catchment, China. **Environ Int**, v. 59, p. 262–273, 2013.

IMWALLE, D.B.; GUSTAFSSON, J.-Å.; RISSMAN, E. F. Lack of functional estrogen receptor β influences anxiety behavior and serotonin content in female mice.

Physiology & behavior, v. 84, p. 157–163, 2005.

INGBERG, E., THEODORSSON, E., THEODORSSON, A., STRÖM, J. O. Effects of high and low 17 β -estradiol doses on focal cerebral ischemia in rats. **Scientific Reports**, v. 6, p. 20228, 2016.

IORGA, A. et al. The protective role of estrogen and estrogen receptors in cardiovascular disease and the controversial use of estrogen therapy. **Biology of sex differences**, v. 8, n. 1, p. 33, 2017.

JARQUE, S. et al. Multiplex analysis platform for endocrine disruption prediction using zebrafish. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 20, n. 7, 2019.

JASUJA, G. K. et al. Circulating estrone levels are associated prospectively with diabetes risk in men of the framingham heart study. **Diabetes Care**, v. 36, n. 9, p. 2591–2596, 2013.

JONES, A.B.; GUPTON, R.; CURTIS, K. S. Estrogen and voluntary exercise interact to attenuate stress-induced corticosterone release but not anxiety-like behaviors in female rats. **Behavioural brain research**, v. 311, p. 279–286, 2016.

KABIR, E.R.; RAHMAN, M.S.; RAHMAN, I. Review on endocrine disruptors and their possible impacts on human health. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 40, p. 241–258, 2015.

KACKER, R.; TRAISH, A.M.; MORGENTALER, A. Estrogens in men: clinical implications for sexual function and the treatment of testosterone deficiency. **The journal of sexual medicine**, v. 9, p. 1681–1696, 2012.

KALUEFF, A.V. et al. Towards a comprehensive catalog of zebrafish behavior 1.0 and beyond. **Zebrafish**, v. 10, p. 70–86, 2013.

KALUEFF, A.V., STEWART, A.M., GERLAI, R. Zebrafish as an emerging model for studying complex brain disorders. **Trends in pharmacological sciences**, v. 35, p. 63–75, 2014.

KIRSCHBAUM, C. et al. Impact of gender, menstrual cycle phase, and oral contraceptives on the activity of the hypothalamus-pituitary-adrenal axis. **Psychosomatic medicine**, v. 61, p. 154–162, 1999.

-
- KITAY, J. I. Effects of Estradiol on Pituitary-Adrenal Function in Male and Female Rats1. **Endocrinology**, v. 72, p. 947–954, 1963.
- KREŽEL, W. et al. Increased anxiety and synaptic plasticity in estrogen receptor β -deficient mice. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 98, p. 12278–12282, 2001.
- KUDIELKA, B. M. et al. HPA axis responses to laboratory psychosocial stress in healthy elderly adults, younger adults, and children: Impact of age and gender. **Psychoneuroendocrinology**, v. 29, n. 1, p. 83–98, 2004.
- KYSIL, E.V. et al. Comparative Analyses of Zebrafish Anxiety-Like Behavior Using Conflict-Based Novelty Tests. **Zebrafish**, v. 14, p. 197–208, 2017.
- LÄNGE, R. et al. Effects of the synthetic estrogen 17 α -ethinylestradiol on the life-cycle of the fathead minnow (*Pimephales promelas*). **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 20, n. 6, p. 1216–1227, 2001.
- LANZA DI SCALEA, T. et al. Role stress, role reward, and mental health in a multiethnic sample of midlife women: results from the Study of Women's Health Across the Nation (SWAN). **Journal of women's health**, v. 21, p. 481–489, 2012.
- LASSITER, C. S.; KELLEY, B.; LINNEY, E. Genomic structure and embryonic expression of estrogen receptor beta a (ER β a) in zebrafish (*Danio rerio*). **Gene**, v. 299, n. 1–2, p. 141–151, 2002.
- LEAVY, M. et al. Effects of Elevated β -Estradiol Levels on the Functional Morphology of the Testis - New Insights. **Scientific Reports**, v. 7, n. September 2016, p. 1–11, 2017.
- LI, Y. et al. State Key Laboratory of Water Environment Simulation, School of Environment, Beijing Normal University, Beijing 100875, China² Institute of Geographical Sciences and Natural Resources Research, CAS, Beijing 100101, China; Excretion of estrogens in the liv. **Acta Ecologica Sinica** 4, v. 4, 2010.
- LIU, J., et al. Intrahypothalamic estradiol modulates hypothalamus-pituitary-adrenal-axis activity in female rats. **Endocrinology**, v. 153, p. 3337–3344, 2012.
- LOWRY, N. C. et al. Effects of long-term treatment with 17 β -estradiol and medroxyprogesterone acetate on water maze performance in middle aged female rats. **Hormones and Behavior**, v. 58, n. 2, p. 200–207, 2010.
-

LUINE, V. Estradiol: Mediator of memories, spine density and cognitive resilience to stress in female rodents. **Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology**, v. 160, p. 189–195, 2016.

LUINE, V. N. Estradiol and cognitive function: Past, present and future. **Hormones and Behavior**, v. 66, n. 4, p. 602–618, 2014.

MAENG, L. Y.; MILAD, M. R. Sex differences in anxiety disorders: Interactions between fear, stress, and gonadal hormones. **Hormones and Behavior**, v. 76, p. 106–117, 2015.

MARTIN, E. I. et al. The Neurobiology of Anxiety Disorders: Brain Imaging, Genetics, and Psychoneuroendocrinology. **Clinics in Laboratory Medicine**, v. 30, n. 4, p. 865–891, 2010.

MATSUI, H. The use of fish models to study human neurological disorders. **Neuroscience Research**, v. 120, p. 1–7, 2017.

MAURER, R.A.; GORSKI, J. Effects of Estradiol-17 β and Pimozide on Prolactin Synthesis in Male and Female Rats1. **Endocrinology**, v. 101, p. 76–84, 1997.

MAXIMINO, C. et al. Measuring anxiety in zebrafish: A critical review. **Behavioural Brain Research**, v. 214, n. 2, p. 157–171, 2010.

MAZZUCCO, C. A. et al. ER α , but not ER β , mediates the expression of sexual behavior in the female rat. **Behavioural Brain Research**, v. 191, n. 1, p. 111–117, 2008.

MCCARTHY, M. M. Estradiol and the developing brain. **Physiological reviews**, v. 88, p. 91–124, 2008.

MCEWEN, B.S.; ALVES, S. E. Estrogen actions in the central nervous system. **Endocrine reviews**, v. 20, p. 279–307, 1999.

MENUET, A. et al. Molecular characterization of three estrogen receptor forms in zebrafish: binding characteristics, transactivation properties, and tissue distributions. **Biology of reproduction**, v. 66, p. 1881–1892, 2002.

MITTELMAN-SMITH, M.A. et al. Arcuate kisspeptin/neurokinin B/dynorphin (KNDy) neurons mediate the estrogen suppression of gonadotropin secretion and body weight. **Endocrinology**, v. 153, p. 2800–2812, 2012.

MULLER, M. et al. Sex hormones and male health: Effects on components of the frailty syndrome. **Trends in Endocrinology and Metabolism**, v. 14, n. 6, p. 289–296, 2003.

MUSTIELES, V. et al. Bisphenol A: Human exposure and neurobehavior. **NeuroToxicology**, v. 49, p. 174–184, 2015.

NAKATA, M.; ÅGMO, A.; SAGOSHI, S.; OGAWA, S. The Role of Estrogen Receptor β (ER β) in the Establishment of Hierarchical Social Relationships in Male Mice. **Frontiers in Behavioral Neuroscience**, v. 12, p. 245, 2018.

NASH, J.; KIME, D.; WESTER, P. Long-term exposures to environmental concentrations of the pharmaceutical ethynylestradiol causes reproductive failure in fish. **Environmental Health Perspectives**, v. 112 (17), p. 1725–1733, 2004.

NIKOLAOU, A.; MERIC, S.; FATTA, D. Occurrence patterns of pharmaceuticals in water and wastewater environments. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 387, n. 4, p. 1225–1234, 2007.

OGAWA, S. et al. Abolition of male sexual behaviors in mice lacking estrogen receptors α and β ($\alpha\beta$ ERKO). **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 97, n. 26, p. 14737–14741, 2000.

OLIVEIRA, R. F. Mind the fish: Zebrafish as a model in cognitive social neuroscience. **Frontiers in Neural Circuits**, v. 7, n. JUL, p. 1–15, 2013.

OLSSON, A. et al. Testosterone and estrogen impact social evaluations and vicarious emotions: A double-blind placebo-controlled study. **Emotion**, v. 16, n. 4, p. 515–523, 2016.

OYOLA, M.G. et al. Anxiolytic effects and neuroanatomical targets of estrogen receptor- β (ER β) activation by a selective ER β agonist in female mice. **Endocrinology**, v. 153, p. 837–846, 2012.

PATISAUL, H. B.; ADEWALE, H. B. Long-term effects of environmental endocrine disruptors on reproductive physiology and behavior. **Frontiers in Behavioral Neuroscience**, v. 3, n. JUN, p. 1–18, 2009.

PHAM, M. et al. Assessing social behavior phenotypes in adult zebrafish: Shoaling, social preference, and mirror biting tests, Zebrafish protocols for neurobehavioral research. **Springer**, v. 66, p. 231–246, 2012.

PINTO, P. I. S.; ESTÊVÃO, M. D.; POWER, D. M. Effects of estrogens and estrogenic

disrupting compounds on fish mineralized tissues. **Marine Drugs**, v. 12, n. 8, p. 4474–4494, 2014.

PORSERYD, T. et al. Combinatory effects of low concentrations of 17 α -ethinylestradiol and citalopram on non-reproductive behavior in adult zebrafish (*Danio rerio*). **Aquatic Toxicology**, v. 193, n. October, p. 9–17, 2017.

RAWASHDEH, O. et al. Melatonin suppresses nighttime memory formation in zebrafish. **Science**, v. 318, n. 5853, p. 1144–1146, 2007.

ROCHA, M. J.; CRUZEIRO, C.; REIS, M.; PARDAL, M. Â. R. E. Toxicological relevance of endocrine disruptors in the Tagus River estuary (Lisbon, Portugal). **Environmental Monitoring and Assessment**, v. v.187(8), p. 1–16, 2015.

ROCHA, B. A. et al. 17 β -Estradiol-induced antidepressant-like effect in the Forced Swim Test is absent in estrogen receptor- β knockout (BERKO) mice. **Psychopharmacology**, v. 179, n. 3, p. 637–643, 2005.

ROCHIRA, V. et al. Hypothalamic-pituitary-gonadal axis in two men with aromatase deficiency: Evidence that circulating estrogens are required at the hypothalamic level for the integrity of gonadotropin negative feedback. **European Journal of Endocrinology**, v. 155, n. 4, p. 513–522, 2006.

ROMANO-TORRES; M., FERNÁNDEZ-GUASTI, A. Estradiol valerate elicits antidepressant-like effects in middle-aged female rats under chronic mild stress. **Behav Pharmacol**, v. 21, p. 104–111, 2010.

ROSSOUW, J. E. Writing Group for the Women's Health Initiative Investigators. Risks and benefits of estrogen plus progestin in healthy postmenopausal women: principal results from the Women's Health Initiative randomized controlled trial. **Jama**, v. 288, p. 321–333, 2002.

RYAN, J. et al. Estrogen receptor gene variants are associated with anxiety disorders in older women. **Psychoneuroendocrinology**, v. 36, n. 10, p. 1582–1586, 2011.

RYBACKA, A. et al. Identifying potential endocrine disruptors among industrial chemicals and their metabolites - development and evaluation of in silico tools. **Chemosphere**, v. 139, p. 372–378, 2015.

SALLA et al. Impact of an environmental relevant concentration of 17 α -ethinylestradiol on the cardiac function of bullfrog tadpoles. **Chemosphere**, v. 144, p. 1862–1868, 2016.

SCHOLZ, S.; MAYER, I. Molecular biomarkers of endocrine disruption in small model fish. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 293, n. 1–2, p. 57–70, 2008.

SCORDALAKES, E. M.; RISSMAN, E. F. Aggression in male mice lacking functional estrogen receptor α . **Behavioral Neuroscience**, v. 117, n. 1, p. 38–45, 2003.

SHARMA, A.N. et al. Estradiol, but not testosterone, heightens cortisol-mediated negative feedback on pulsatile ACTH secretion and ACTH approximate entropy in unstressed older men and women. **American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, v. 306, p. R627–R635, 2014.

SILVA, C. P.; OTERO, M.; ESTEVES, V. Processes for the elimination of estrogenic steroid hormones from water: A review. **Environmental Pollution**, v. 165, p. 38–58, 2012.

SINK, T.D., LOCHMANN, R.T., FECTEAU, K. A. Validation, use, and disadvantages of enzyme-linked immunosorbent assay kits for detection of cortisol in channel catfish, largemouth bass, red pacu, and golden shiners. **Fish Physiology and Biochemistry**, v. 34, p. 95–101, 2008.

SOUDER, J. P.; GORELICK, D. A. Quantification of estradiol uptake in zebrafish embryos and larvae. **Toxicological Sciences**, v. 158, n. 2, p. 465–474, 2017.

STEWART, A. et al. Modeling anxiety using adult zebrafish: A conceptual review. **Neuropharmacology**, v. 62, n. 1, p. 135–143, 2012.

STEWART, A. M. et al. Zebrafish models for translational neuroscience research: From tank to bedside. **Trends in Neurosciences**, v. 37, n. 5, p. 264–278, 2014.

TANG, A. C. et al. Effects of long-term estrogen replacement on social investigation and social memory in ovariectomized C57BL/6 mice. **Hormones and Behavior**, v. 47, n. 3, p. 350–357, 2005.

THORPE, K.L. et al. Relative potencies and combination effects of steroidal estrogens in fish. **Environmental Science and Technology**, v. 37(9), p. 1142–1149, 2003.

TILTON, S.C.; FORAN, C.M.; BENSON, W. H. Relationship between ethinylestradiol-mediated changes in endocrine function and reproductive impairment in Japanese medaka (*Oryzias latipes*). **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 24(2), p. 352–359, 2005.

TRAINOR, B. C.; KYOMEN, H. H.; MARLER, C. A. Estrogenic encounters: How

interactions between aromatase and the environment modulate aggression. **Frontiers in Neuroendocrinology**, v. 27, n. 2, p. 170–179, 2006.

TSUDA, M.C.; YAMAGUCHI, N.; NAKATA, M.; OGAWA, S. Modification of female and male social behaviors in estrogen receptor beta knockout mice by neonatal maternal separation. **Frontiers in neuroscience**, v. 8, p. 274–274, 2014.

UGUZ, F.; SAHINGOZ, M.; GEZGINC, K.; AYHAN, M. G. Quality of life in postmenopausal women: the impact of depressive and anxiety disorders. **The International Journal of Psychiatry in Medicine**, v. 41, p. 281–292, 2011.

ULHAQ, Z. S.; KISHIDA, M. Brain aromatase modulates serotonergic neuron by regulating serotonin levels in zebrafish embryos and larvae. **Frontiers in Endocrinology**, v. 9, n. MAY, p. 1–13, 2018.

VAN DER VEN, L. T. M. et al. Vitellogenin expression in zebrafish *Danio rerio*: Evaluation by histochemistry, immunohistochemistry, and in situ mRNA hybridisation. **Aquatic Toxicology**, v. 65, n. 1, p. 1–11, 2003.

VERA-CHANG et al. Transgenerational hypocortisolism and behavioral disruption are induced by the antidepressant fluoxetine in male zebrafish in *Danio rerio*. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 115 (52), p. E12435–E12442, 2018.

VILLA, A.; VEGETO, E.; POLETTI, A.; MAGGI, A. Estrogens, neuroinflammation, and neurodegeneration. **Endocrine reviews**, v. 37, p. 372–402, 2016.

VOLKOVA, K. et al. Developmental exposure of zebrafish (*Danio rerio*) to 17 α -ethinylestradiol affects non-reproductive behavior and fertility as adults, and increases anxiety in unexposed progeny. **Hormones and Behavior**, v. 73, p. 30–38, 2015.

WALF, A.A.; FRYE, C. A. Rapid and estrogen receptor beta mediated actions in the hippocampus mediate some functional effects of estrogen. **Steroids**, v. 73, p. 997–1007, 2008.

WALF, A.A.; FRYE, C. A. Effects of two estradiol regimens on anxiety and depressive behaviors and trophic effects in peripheral tissues in a rodent model. **Gender medicine**, v. 6, p. 300–311, 2009.

WEIGEL, S. et al. Determination of selected pharmaceuticals and caffeine in sewage and seawater from Tromsø/Norway with emphasis on ibuprofen and its metabolites. **Chemosphere**, v. 56, p. 583–592, 2004.

XU, N. et al. Removal of estrogens in municipal wastewater treatment plants: a chinese perspective. **Environmental pollution**, v. 165, p. 215–224, 2012.

YOU, L. et al. Investigation of pharmaceuticals, personal care products and endocrine disrupting chemicals in a tropical urban catchment and the influence of environmental factors. **Science Total Environment**, v. 536, p. 955–963, 2015.

ZHAO, Y.; ZHANG, K.; FENT, K. Regulation of zebrafish (*Danio rerio*) locomotor behavior and circadian rhythm network by environmental steroid hormones. **Environmental Pollution**, v. 232, p. 422–429, 2018.

ZHONG, L. et al. Distribution of vitellogenin in zebrafish (*Danio rerio*) tissues for biomarker analysis. **Aquatic Toxicology**, v. 149, p. 1–7, 2014.

ANEXOS ou APÊNDICES

Anexo A. Protocolo 09/2019 de aprovação do estudo pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade de Passo Fundo, Passo Fundo, Brasil.



UNIVERSIDADE DE PASSO FUNDO
VICE-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS - CEUA

CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada “Efeitos comportamentais e neuroquímicos do estradiol em zebrafish”, registrada com o nº 009/2019 sob a responsabilidade de Ana Cristina Vendrametto Varrone Giacomini e que envolve a utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos) para fins de Pesquisa, encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794 de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899 de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovada pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS DA UNIVERSIDADE DE PASSO FUNDO (CEUA-UPF) em reunião de 25/04/19.

Finalidade: Pesquisa

Espécie/linhagem/raça: *Danio rerio* (Peixe Zebra)

Peso/idade: 0,3 a 0,6g - 90d Nº de animais: 240

Sexo: Machos

Origem: Fornecedor comum

Resumo: O estradiol é um hormônio sexual esteroide, encontrado em efluentes, águas superficiais e subterrâneas. O estradiol é responsável por controlar funções endócrinas fisiológicas, mas informações sobre seus efeitos como interruptor endócrino ainda são escassos. Os interruptores endócrinos são substâncias exógenas (por exemplo, contaminantes ambientais) que podem causar alterações comportamentais, neuroendócrinas, dentre outras. Assim, identificar e analisar as alterações desencadeadas por interruptores endócrinos é de extrema importância, pois as consequências da exposição a esses contaminantes podem causar alterações não somente no animal exposto, mas também em seu cardume e na comunidade, assim desencadeando um desequilíbrio no ecossistema. Serão utilizados 240 peixes (*Danio rerio*) machos, distribuídos em 4 grupos experimentais: controle e estradiol (2 g/L; 10 g/L e 20 g/L). Os peixes serão expostos ao tratamento durante 24 horas e, após esse período, serão submetidos à análise comportamental pelos testes do tanque novo, preferência social e cognição. Ao término dos testes, os peixes serão eutanasiados para análises de aminas biogênicas cerebrais (dopamina (DA) e ácido 3,4-dihidroxifenilacético (DOPAC)).

Passo Fundo, 26 de abril de 2019.

Prof. Dr. Rafael Frandoloso
Coordenador CEUA /UPF