

**UNIVERSIDADE DE PASSO FUNDO
FACULDADE DE AGRONOMIA E MEDICINA VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
BIOEXPERIMENTAÇÃO**

Risperidona diminui a resposta ao estresse em peixe-zebra (*Danio rerio*)

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Renan Idalencio

**Passo Fundo, RS, Brasil
2015**

Risperidona diminui a resposta ao estresse em peixe-zebra (*Danio rerio*)

Renan Idalencio

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Bioexperimentação, Área de Concentração em Bioexperimentação, da Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária da Universidade de Passo Fundo (UPF), como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Bioexperimentação**.

Orientador: Prof. Dr. Leonardo José Gil Barcellos

**Passo Fundo, RS, Brasil
2015**

**UNIVERSIDADE DE PASSO FUNDO
FACULDADE DE AGRONOMIA E MEDICINA VETERINÁRIA
PROGRAMA DE MESTRADO EM BIOEXPERIMENTAÇÃO**

A comissão examinadora, abaixo assinada, aprova a Dissertação de Mestrado

Risperidona diminui a resposta ao estresse em peixe-zebra (*Danio rerio*)

Elaborada por
Renan Idalencio

Como requisito parcial para obtenção do grau de
Mestre em Bioexperimentação

Comissão Examinadora

**Leonardo José Gil Barcellos, Dr. UPF
(Orientador)**

Ângelo Luis Stapassoli Piato, Dr. UFRGS

Michele Fagundes, Dr. UPF

**Passo Fundo, RS, Brasil
2015**

CIP – Catalogação na Publicação

I18r Idalencio, Renan

Risperidona diminui a resposta ao estresse em peixe-zebra
(Danio rerio) / Renan Idalencio. – 2015.
39 f. : il., color. ; 30 cm.

Orientador: Prof. Dr. Leonardo José Gil Barcellos.
Dissertação (Mestrado em Bioexperimentação) –
Universidade de Passo Fundo, 2015.

1. Recursos hídricos – Contaminação. 2. Peixe de água
doce – Efeito do estresse. 3. Peixe-zebra. I. Barcellos,
Leonardo José Gil, orientador. II. Título.

CDU: 639.3

Catalogação: Bibliotecária Schirlei T. da Silva Vaz - CRB 10/1364

AGRADECIMENTOS

Há alguns anos atrás, durante minhas atividades de Médico Veterinário, ouvi um conselho de um colega, que na época considerava um exemplo de profissional, que dizia: “trace um objetivo e não perca o foco”. Posso dizer que naquele momento comecei a encarar cada desafio como uma oportunidade.

Agradeço a todas as pessoas que de alguma maneira participaram da minha formação, mas em especial aquelas que me desafiaram, ou melhor, me deram uma oportunidade. Meus agradecimentos se estendem aos Professores Maria Isabel Botelho Vieira e Carlos Bondan pela indicação e convite em dar aula ao curso de Medicina Veterinária da Universidade de Passo Fundo.

Após iniciar como professor da instituição despertou em mim a vontade de realmente me tornar um professor, de seguir em frente e encarar o Mestrado em Bioexperimentação. Agradeço aos meus alunos que também me desafiaram em cada aula e em cada dúvida solicitada.

Aos professores pelas trocas de conhecimentos, pelos elogios e pelas críticas que proporcionaram meu crescimento profissional e pessoal. Aos colegas de mestrado, pelo companheirismo, parcerias e verdadeiras amizades desenvolvidas durante esses dois anos de estudos, alegrias e tristezas.

Aos colegas do Laboratório de Fisiologia de Peixes agradeço por terem me acolhido, pelo auxílio no desenvolvimento do experimento, pela ajuda em encontrar respostas, hipóteses e discussões e pelos longos turnos de extração de cortisol. Agradeço em especial as professoras Heloísa Barcellos e Michele Fagundes pelo apoio e por serem colegas de disciplinas na Universidade de Passo Fundo.

Ao Professor Leonardo José Gil Barcellos, exemplo de pesquisador e professor e que aceitou a orientação no Mestrado em Bioexperimentação, me propôs novos “grandes” desafios, os quais não possuía o mínimo de conhecimento, a não ser o fato de que o peixe Paulistinha, que já havia criado, era o grande Zebrafish.

Por fim, não mais nem menos importante, agradeço a toda minha família e amigos especiais, responsáveis pela minha formação pessoal e meu caráter como ser humano e médico veterinário, mesmo que distantes muitas vezes, mas presente em pensamento, telefonemas e mensagens de carinho, conforto e amor.

DEDICATÓRIA

O esforço desempenhado durante esses dois anos de atividades e o presente trabalho é resultado do amor, confiança e apoio incondicional oferecidos a mim, durante toda a minha vida, por minha família, e é aos meus familiares que dedico mais um objetivo alcançado.

EPIGRAFE

“Chegará o dia em que os homens conhecerão o íntimo dos animais e nesse dia, um crime contra um animal será considerado um crime contra a humanidade.”

Leonardo Da Vinci

ÍNDICE

LISTA DE FIGURAS.....	viii
LISTA DE TABELAS.....	ix
LISTA DE ABREVIATURAS.....	x
RESUMO.....	xi
ABSTRACT	xii
1. INTRODUÇÃO	13
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	15
3. CAPÍTULO 1.....	19
Waterborne risperidone decreases stress response in zebrafish.....	19
Abstract.....	20
Introduction	21
Materials and Methods	21
Results	24
Discussion.....	26
Referências Bibliográficas.....	30
4. CONCLUSÕES.....	34
5. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	35
6. REFERÊNCIAS	36
7. ANEXO	39

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1. Zebrafish (<i>Danio rerio</i>)	17
CAPÍTULO 1	
FIGURA 1. Whole-body cortisol concentrations in zebrafish exposed to risperidone followed by an acute stress test and respective controls	29
FIGURA 2. Behavioral parameters of zebrafish in the novel tank test followed by an acute stress protocol.....	29

LISTA DE TABELAS

TABLE 1. Results of analysis of variance (ANOVA) for cortisol levels	24
TABLE 2. Results of analysis of variance (ANOVA) for the behavioral tests	26

LISTA DE ABREVIATURAS

µg	Micrograma
°C	Graus Celsius
CaCO ₃	Carbonato de cálcio
CEUA	Comitê de Ética para o Uso de Animais
CONCEA	Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal
FAMV	Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária
g	Gramas
h	Hora
HPI	Hipotálamo-Hipófise-Interrenal
L	Litro
mg	Miligrama
min	Minuto
PBS	Solução Salina Fosfatada
p.m.	Pos meridiano
RS	Rio Grande do Sul
SF	Short Fin
UFRGS	Universidade Federal do Rio Grande do Sul
UPF	Universidade de Passo Fundo

RESUMO

**Dissertação de Mestrado
Programa de Pós-Graduação em Bioexperimentação
Universidade de Passo Fundo**

Risperidona diminui a resposta ao estresse em peixe-zebra (*Danio rerio*)

Autor: Renan Idalencio

Orientador: Leonardo José Gil Barcellos

Passo Fundo, 30 de Julho de 2015

A contaminação de recursos hídricos sejam eles efluentes municipais ou águas de superfície, por fármacos e/ou seus metabólitos, tem sido relatada desde a década de 70, colocando em risco a população usuária desses recursos assim como o habitat aquático. A risperidona, um antipsicótico atípico, usada para o tratamento de pacientes com esquizofrenia, psicoses, Alzheimer e autismo, foi encontrada nas águas residuais na concentração ambiental de 0,00034 μ g/L. Este medicamento possui poder ansiolítico e antidepressivo porém até o desenvolvimento deste experimento não se sabia ao certo se poderia estar de alguma forma interferindo no sistema neuroendócrino de estresse dos peixes. A ativação do eixo hipotálamo-hipofise-interrenal (HPI) e consequente elevação do cortisol nos peixes ocorrem quando em contato a um agressor, seja ele predador, redução de oxigênio ou contaminação por fármacos. No zebrafish a resposta ao estresse apresenta similaridade aos dos vertebrados terrestres no que envolve consumo e transferência de oxigênio, mobilização de energia, crescimento, reprodução e efeitos nas funções imunes. O zebrafish foi utilizado devido ao seu rápido crescimento e facilidade de manutenção, assim como sua homologia com seres humanos, crescentes estudos com toxicologia, farmacologia e comportamento. O presente trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Fisiologia de Peixes, Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária (FAMV), Universidade de Passo Fundo (UPF), avaliou primeiramente os níveis de cortisol frente a cinco diferentes concentrações (0,00034, 85, 170, 340 e 680 μ g/L) de risperidona e em quatro diferentes tempos (-15, 15, 60 e 240'), com exposição aguda ao fármaco (15'). Como resultado constatou-se que a presença da risperidona na água interfere no eixo HPI na concentração de 170 μ g/L no tempo de 15 minutos após estresse, dando continuidade então para a segunda parte do experimento onde o comportamento do zebrafish foi avaliado na concentração de efeito. Os parâmetros observados foram a distância percorrida, a velocidade média, o ângulo absoluto de virada, o número de cruzamentos entre os compartimentos inferior, médio e superior e o tempo de permanência nos compartimentos inferior, médio e superior. No teste de comportamento os animais permaneceram maior tempo no fundo comparando estresse com estresse mais risperidona, podendo ser considerada, a risperidona, um ansiolítico.

Palavras-Chave: cortisol, *zebrafish*, estresse, antipsicóticos, risperidona.

ABSTRACT**Dissertação de Mestrado
Programa de Pós-Graduação em Bioexperimentação
Universidade de Passo Fundo****Risperidone decrease the stress response in zebrafish (*Danio rerio*)**

Autor: Renan Idalencio

Orientador: Leonardo José Gil Barcellos

Passo Fundo, 30 de Julho de 2015

Contamination of water resources by municipal wastewater or surface water, by drugs and their metabolites have been reported since the 70s, endangering the user population of these resources as well as the aquatic habitat. Risperidone, an atypical antipsychotic used to treat patients with schizophrenia, psychosis, Alzheimer's disease and autism found in wastewater in environmental concentration $0,00034\mu\text{g/L}$. This drug possesses anxiolytic and antidepressant power but to the development of this experiment are not sure if it could be somehow interfering with the neuroendocrine system of fish stress. The activation of the hypothalamic-pituitary-interrenal axis (HPI) and consequent elevation of cortisol in fish occur when exposed to an attacker, be it predator, reduced oxygen or contamination by drugs. In zebrafish the stress response has similarity to those of terrestrial vertebrates in that it involves consumption and oxygen transfer, energy mobilization, growth, reproduction and effects on immune functions. The zebrafish was used because of its rapid growth and ease of maintenance, as well as its homology with humans, more studies with toxicology, pharmacology and behavior. This study was conducted at the Fish Physiology Laboratory, Faculty of Agronomy and Veterinary Medicine (FAMV), University of Passo Fundo (UPF), first evaluated front cortisol levels to five different concentrations ($0,00034$, 8 , 170 , 340 and $680\mu\text{g/L}$) and risperidone on four different times (-15 , 15 , 60 and $240'$), with acute drug exposure ($15'$). As result is found is that risperidone in the presence of water interferes with the HPI axis at a concentration of $170\mu\text{g/L}$ in time 15 minutes after stress, continuing then to the second part of the experiment where the zebrafish behavior was evaluated in concentration effect. The observed parameters were the distance traveled, average speed, the absolute angle turn, the number of intersections between the lower compartments, secondary and higher and the length of stay in the lower compartments, secondary and higher. In animal behavior test remained along the bottom of comparing the stress with the stress more risperidone, can be considered, risperidone, an anxiolytic.

Keywords: cortisol, zebrafish, stress, antipsychotics, risperidone.

1. INTRODUÇÃO

Em peixes-zebra a ansiedade e o estresse apresentam resposta similar aos dos vertebrados terrestres (1). Esses eventos caracterizam-se por alterações comportamentais e fisiológicas com ameaça a homeostase deste organismo (2).

A ativação do eixo neuroendócrino hipotálamo-hipófise-interrenal (HPI) de peixes e a liberação de corticosteróides podem ser reflexas a exposição a um agressor, esse agressor pode ser uma alteração química na água pela redução de oxigênio ou contaminação por fármacos e ainda física como alta densidade populacional (3). Como consequências a hipersecreção de cortisol afeta o equilíbrio homeostático, refletindo no que se refere ao crescimento, metabolismo, reprodução e função imune, estes eventos podem afetar os peixes, e são considerados importantes biomarcadores de poluição ambiental devido a grande importância fisiológica e endócrina (4, 5).

A presença de contaminantes em águas superficiais e efluentes municipais vem sendo descrita a mais de quatro décadas, onde foram estudados os primeiros casos de resíduos de fármacos em ambiente aquático. A contaminação desses recursos pode provocar impactos tanto nos organismos aquáticos quanto na população usuária dos mesmos (6-16).

Os medicamentos antipsicóticos, atualmente, são os mais prescritos para pacientes com distúrbios psíquicos como esquizofrenia, Alzheimer, doença bipolar e autismo, principalmente os antipsicóticos atípicos como a risperidona, que possui uma maior segurança em relação aos seus efeitos colaterais (17-20). Devido sua crescente prescrição médica, não se sabe ao certo a relação de seus resíduos com o meio ambiente, e esta preocupação também aumenta em relação à contaminação das águas superficiais (10).

O zebrafish (*Danio rerio*) conhecido popularmente no Brasil como peixe zebra ou paulistinha é um pequeno peixe de esqueleto ósseo (3-4cm), de água doce, que nos últimos anos, ganha espaço entre os pesquisadores como modelo experimental para o estudo de numerosas doenças humanas, despertando interesse nas pesquisas de descoberta de novos medicamentos, bem como ação dos fármacos sobre aspectos fisiológicos, neuroendócrinos e comportamentais (21-23). Pode ser considerado o modelo animal vertebral ideal, devido à facilidade de desenvolvimento, crescimento, agrupamento, reprodução e baixo custo (24).

A presença de fármacos de ocupação humana em águas superficiais devido ao descarte incorreto ou até mesmo da excreção pelo organismo e seus impactos nos corpos naturais de águas ou em populações naturais está em crescente investigação, justificando o interesse e desenvolvimento desta pesquisa que teve como principal objetivo avaliar alterações nos níveis de cortisol de corpo inteiro, frente a diferentes concentrações do antipsicótico risperidona presentes nos tanques de teste, após estresse agudo, utilizando o modelo experimental zebrafish. Como atividade complementar fora realizado um estudo de comportamento avaliando especificamente a ansiedade no mesmo modelo experimental.

A dissertação esta composta por resumo, breve introdução ao estudo proposto e revisão de literatura, os resultados obtidos nos experimentos e discussões acerca destes, foram dispostos no primeiro capítulo que constitui um artigo científico intitulado “Waterborne risperidone decreases stress response in zebrafish”, submetido para publicação no periódico Plos One.

2. REVISÃO DE LITERATURA

O estresse caracteriza-se por alterações fisiológicas, comportamentais e bioquímicas em consequência a ameaça da homeostase do organismo, frente à ação de estímulos intrínsecos denominados estressores, sendo a hipersecreção de cortisol e corticosterona uma das primeiras alterações observadas (2).

A ansiedade pode ser relacionada como comportamento frente a uma ameaça em potencial, podendo ser a relação com um predador, mudanças químicas na água, estímulo aversivo no ambiente ou ainda um novo ambiente (25, 26).

Em peixes-zebra a resposta ao estresse e ansiedade apresenta similaridades aos dos vertebrados terrestres, até mesmo na função, que envolve a estimulação de consumo e transferências de oxigênio, mobilização de substratos energéticos, diminuição do uso de energia para crescimento e reprodução e principalmente efeitos supressivos de funções imunes (1).

A ativação do eixo neuroendócrino hipotálamo-hipófise-interrenal (HPI) e consequentemente elevação do cortisol no peixe ocorre quando o contato com o agressor acontece, podendo ser considerado como uma situação de estresse que, além das alterações comportamentais, pode induzir respostas fisiológicas secundárias ao estresse. Essa ativação pode ocorrer a partir do contato direto com o agressor, seja ele uma alteração química na água pela redução de oxigênio, contaminação por fármacos ou atividade agroindustrial ou físico como alta densidade populacional (3).

Os corticosteróides possuem importante papel nos processos homeostáticos como crescimento, metabolismo, reprodução e função imune, sendo que qualquer impacto no seu eixo neuroendócrino de controle pode potencialmente afetar o animal, e devido a esta grande importância fisiológica, alterações neste eixo são consideradas importantes biomarcadores de poluição ambiental (4).

O peixe com uma resposta ao estresse prejudicada tem sua capacidade de elevar o cortisol plasmático reduzido significativamente, desta forma se torna fisiologicamente comprometido, não respondendo aos estressores comuns de forma adequada. Este déficit de resposta ao estresse torna o animal mais susceptível, e em nível populacional, pode interferir na taxa de sobrevivência (4, 5).

A resposta na alteração dos níveis de cortisol pode ser bloqueada ou diminuída por ação de tóxicos que diminuem a capacidade do tecido interrenal de produzir cortisol, ou que afetam outros pontos do eixo Hipotálamo-Hipófise-Interrenal (HPI),

deixando o tecido interrenal sem o estímulo necessário para síntese deste hormônio (27).

A contaminação química dos recursos hídricos, provocada pela presença de resíduos de fármacos nos efluentes municipais, tem sido bastante estudada desde a década de 70 quando foi identificada pela primeira vez (6-10, 12-15). Há inúmeros relatos da presença de fármacos e seus metabólitos em águas de superfície e efluentes municipais em diferentes países (7-10, 12, 13, 16).

Esse tipo de contaminação provoca impactos negativos tanto na população humana usuária desses recursos, quanto nos organismos aquáticos que compõe esses ecossistemas e tornou-se prioridade para as agências reguladoras envolvidas na avaliação de risco humano e ecológico (6-13, 15).

A resposta ao estresse em peixes deve ser caracterizada em três respostas, a primária que compreende a liberação massiva de catecolaminas e corticosteróides, secundária em que ocorre a canalização das ações e dos efeitos desses hormônios no sangue e tecidos e terciária em nível de população, refletindo em crescimento, reprodução e resposta imune (28). De acordo com (1), o cortisol é o indicador mais utilizado para avaliar estresse agudo em peixes.

Os fármacos antipsicóticos como ansiolíticos, sedativos, antidepressivos e hipnóticos estão sendo as mais prescritas nos dias de hoje, e sua relação com o ambiente pode estar comprometida. A detecção destas substâncias em águas superficiais, residuais e subterrâneas de acordo com (10), é uma crescente preocupação.

Os antipsicóticos estão sendo muito utilizadas para o tratamento de sintomas psicóticos e agitação em pacientes com uma variedade de desordens cerebrais, como a esquizofrenia, doença bipolar e Alzheimer (17, 18, 20). As diferentes ações terapêuticas e efeitos colaterais de antipsicóticos típicos como a clorpromazina e haloperidol e atípicos como a risperidona, têm sido explicados baseados nas ações de seus receptores específicos. Antipsicóticos atípicos como a risperidona, aripiprazol, olanzapina e quetiapina, possuem afinidade por muitos receptores incluindo, dopaminérgicos, serotoninérgicos, muscarínicos e histamínicos (19).

Segundo (29) os antipsicóticos atípicos possuem aspectos em comum como a capacidade de promover a ação antipsicótica em doses que não produzam, de modo significativo, sintomas extrapiramidais, além dessa característica, esses medicamentos incluem:

ausência de hiperprolactinemia; maior eficácia nos sintomas positivos, negativos e de desorganização; e ausência de discinesia tardia após a administração.

A risperidona possui mecanismo de ação desconhecido, porém acredita-se que sua atividade seja devido a um bloqueio combinado dos receptores dopaminérgicos D2 e dos receptores serotoninérgicos S2 (5-HT_{2A})(antagonista dopaminérgico-serotoninérgico), além do bloqueio dos receptores alfa 2-adrenérgicos e histaminérgicos H1 (29).

Em um estudo com ratos, a risperidona em contraste com o haloperidol, apresentou melhora no efeito ansiolítico (30). Outro estudo demonstrou que os antipsicóticos atípicos (risperidona, olanzapina e quetiapina) têm sido utilizados para tratamento de ansiedade, além do uso em psicose, justificando o efeito ansiolítico observado após tratamento com olanzapina em ratos (31).

A utilização de zebrafish em estudo de preferência claro-escuro, de acordo com (32) a risperidona modificou apenas o parâmetro motor com a diminuição do número de alternâncias em uma dose próxima a 0,5mg/L, onde foram testadas as doses 0,1mg/L, 0,25mg/L e 0,5mg/L. A buspirona, clordiazepóxido e diazepam usadas em um teste de tanque novo, onde a buspirona e o diazepam mostraram efeito ansiolítico, ao contrário do clordiazepóxido que apresentou apenas efeito sedativo (33).

O *Danio rerio* conhecido popularmente no Brasil como zebrafish, peixe zebra ou paulistinha (Figura 1), pertence à família Cyprinidae e é um pequeno peixe teleósteo (3-4cm), de água doce, caracterizado por um padrão de coloração baseado em listras horizontais, claras e escuras. Vem sendo utilizado, nos últimos anos, como modelo experimental para o estudo de numerosas doenças humanas, toxicologia, pesquisas transgênicas, evolução do genoma vertebrado, teratologia (23), mutagênese, neurociências (21) e estudos farmacológicos e comportamentais (22).



Figura 1. Zebrafish (*Danio rerio*).
Fonte: Philippe Mourrain, 2007.

O zebrafish é o modelo animal vertebrado ideal, devido às várias características como rápido desenvolvimento, facilidade de agrupamento dos exemplares,

disponibilidade de aquisição e aplicabilidade, sendo sua manutenção de baixo custo se comparado a modelos experimentais tradicionais, como roedores. A transparência óptica durante a embriogênese do peixe zebra facilita a detecção de anormalidades morfológicas, além de já se saber seu seqüenciamento genético e possuir homólogos em mamíferos humanos e roedores, o que propicia um leque de possibilidades para as pesquisas dos fenótipos produzidos por determinadas mutações (24).

Devido ao fato de o zebrafish atingir a maturidade sexual muito rapidamente (três meses) e reproduzir-se durante o ano inteiro, suas características morfológicas e fisiológicas, esta espécie desperta interesse em pesquisas para acelerar o processo de descoberta de novas drogas, bem como estudar mecanismos de ação dos fármacos sobre aspectos fisiológicos e comportamentais (34).

3. CAPÍTULO 1

Waterborne risperidone decreases stress response in zebrafish

Renan Idalencio^{1,2&}, Fabiana Kalichak^{3&}, João Gabriel Santos Rosa^{3&}, Tiago Acosta de Oliveira^{3&}, Gessi Koakoski^{3&}, Darlan Gusso^{2&}, Murilo Sander de Abreu^{3&}, Heloísa Helena de Alcântara Barcellos^{2,3&}, Ana Cristina Varrone Giacomini^{3&}, Ângelo L. Piato⁴, Leonardo José Gil Barcellos^{1,2,3*}

(Artigo submetido ao periódico Plos One – 2015)

¹ Programa de Pós-Graduação em Bioexperimentação, Universidade de Passo Fundo (UPF), Passo Fundo, RS, Brasil

² Laboratório de Fisiologia de Peixes, Universidade de Passo Fundo (UPF), Passo Fundo, RS, Brasil

³ Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), Santa Maria, RS, Brasil

⁴ Laboratório de Psicofarmacologia e Comportamento (LAPCOM), Programa de Pós-Graduação em Farmacologia e Terapêutica, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, RS, Brasil

* Corresponding author

E-mail: lbarcellos@upf.br (LJGB)

¶ These authors contributed equally to this work.

& These authors also contributed equally to this work.

Abstract

The presence of drugs and their metabolites in surface waters and municipal effluents has been reported in several studies, but its impacts on aquatic organisms are not yet well understood. This study investigated the effects of acute exposure to the antipsychotic risperidone on the stress and behavioral responses in zebrafish. It became clear that intermediate concentration of risperidone inhibited the hypothalamic-pituitary-interrenal axis and displayed anxiolytic-like effects in zebrafish. The data presented here suggest that the presence of this antipsychotic in aquatic environments can alter neuroendocrine and behavior profiles in zebrafish.

Key words: behavior, cortisol, zebrafish, stress, antipsychotic, risperidone.

Introduction

The contamination of water resources like natural water bodies or urban effluents by pharmaceutical drugs and/or its metabolites has been reported since the 1970's, consequently increasing the concern with health consequences for human population as well as for the aquatic life [1-9]. Risperidone, an atypical antipsychotic, has high affinity for serotonin type 2 (5-HT₂) and dopamine type 2 (D₂) receptors. This drug is widely used for the treatment of schizophrenia and bipolar disorder. In people with schizophrenia in maintenance treatment, risperidone induces relatively few extrapyramidal syndromes (EPS), especially less akathisia and tremor, as compared to typical antipsychotic haloperidol. As expected, due to its high prescription rates and off-label uses [10-13], risperidone has been detected in urban water wastes [3].

The activation of the hypothalamus-pituitary-interrenal (HPI) axis and the consequent cortisol elevation is an important reaction of the organism against physical stressors, predator encounters, and chemical stressors such as drug contaminations, aiming to restore the homeostasis [14-18] with generalized effects in metabolism, growth, immune system and osmoregulation processes [19-21]. Thus, pollutants that interfere with the fish stress response can adversely affect their survival [22-23].

We hypothesized that risperidone residues, due its central effects, might alter the functioning of the stress neuroendocrine axis, impairing the general response of the fish residing in contaminated water bodies. We tested our hypothesis using zebrafish (*Danio rerio*) as the experimental model, since this species presents many advantages such as easy handling and maintenance as well as shows high genetic homology with humans [24-26]. Several recent studies have reinforced its use as an organism model for stress research [26-32].

Materials and Methods

Ethical note

This study followed the guidelines of Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) and was approved by the Ethics Commission for Animal Use (CEUA) at Universidade de Passo Fundo, UPF, Passo Fundo, RS, Brazil (Protocol # 7/2013 – CEUA). The use of this method was justified to avoid potential confounding factors while interpreting data regarding the effects of risperidone on the stress response axis.

Animals

A population of approximately 500 mixed-sex, adult wild-type zebrafish (*Danio rerio*) short-fin (SF) strain, weighing 0.7 to 0.9 g were held in glass aquaria with constant aeration and equipped with biological filtering under a natural photoperiod (approximately 14 h light: 10 h dark). Water was maintained at 26 ± 2 °C and pH 7.0, with dissolved oxygen levels at 6 ± 0.5 mg/L, total ammonia levels at 0.01 mg/L, total hardness at 6 mg/L, and alkalinity at 22 mg/L CaCO₃. Behavioral testing was performed during the afternoon.

Experiment 1 – acute stress challenge

Zebrafish were distributed in 36 glass aquaria (30 x 30 x 30 cm, six fish per tank), acclimatized for seven days and fed with commercial food flakes (Tetra Min, Tetra, Melle, Germany). Twenty-four hours later, fish were exposed to risperidone for 15 minutes. Fish were then stressed by chasing them with a net for two minutes [28], and sampled after 0, 15, 60 and 240 minutes for whole-body cortisol analysis. Similarly, groups of fish were exposed to risperidone without stress (sampled at the same time points), aiming to evaluate an eventual stress effect of the risperidone *per se*. A basal situation, i.e. without drug exposure and stress test was performed as control. We used five risperidone concentrations (with or without stress) plus the controls (with or without stress). Thus, we have 12 glass aquaria with six fish each. We repeated this setup 3 times, using two fish from each aquaria in each replication, totalizing a final sample of 6 fish (n=6).

Risperidone (Risperidon, 1 mg/mL, Laboratório EMS, Hortolândia, SP) was used in five concentrations: 0.00034 µg/L, 85 µg/L, 170 µg/L, 340 µg/L and 680 µg/L. The lower concentration was already detected in the environment [3] while the highest concentration was calculated based on the concentration that produced effect zebrafish behavior [33]. The environmental concentration was then multiplied by 250,000, 500,000, 1,000,000 and 2,000,000 to reach the intermediate concentrations of 85, 170, 340 and 680 µg/L, respectively.

Experiment 2 – novel tank test

We performed a behavioral test (novel tank test [26, 27]) using risperidone at the concentration of 170 µg/L, which impaired cortisol response in experiment 1 (see results section, Fig.1). For this purpose, 24 zebrafish not exposed in the experiment 1, were distributed

in four groups: (1) control (no exposure to risperidone, no stress), (2) risperidone exposed, (3) stress and (4) risperidone exposed + stress. After 15 min of exposure, fish were individually transferred to the novel tank (4 x 20 x 20 cm) and video recorded for 5 minutes, 15 min after stressor application. The videos were then analyzed using AnyMaze® video tracking system (Stoelting, CO, USA) and the following parameters were analyzed: total distance (m), mean speed (m/s), absolute turn angle, number of crossings between different compartments of the tank (upper, middle and bottom) and the time spent in upper, middle and bottom compartments.

Procedures – whole-body cortisol extraction and analysis

Fish were captured and immediately frozen in liquid nitrogen for 10–30 s, followed by storage at -20°C until cortisol extraction. Whole-body cortisol was extracted using the method described by Oliveira et al. [28]. Tissue extracts were resuspended in 1mL PBS, and whole-body cortisol levels were measured in duplicate for each extraction using a commercially available enzyme-linked immune sorbent assay kit (EIAgen CORTISOL test, Bio Chem Immuno Systems). This kit was fully validated for zebrafish tissue extracts using the methodology described by Sink et al. [34].

Statistics

Whole-body cortisol levels were analyzed by three-way Analysis of Variance (ANOVA) with treatment, stress and sampling time as the independent variables, followed by two-way ANOVAs restricted to each stress condition. Differences at each time point were analyzed by Bonferroni post-hoc test. Behavioral parameters were analyzed by two-way ANOVAs with treatment and stress as the independent variables, followed by Tukey's multiple range post-hoc test. For both data sets, the homogeneity of variance was determined using Hartley's test, and normality was determined using the Kolmogorov-Smirnov test. Data were expressed as means \pm standard error of mean (S.E.M). Significance level was set at $p < 0.05$.

Results

Experiment 1 – acute stress challenge

The acute stress protocol increased cortisol levels in zebrafish. There was a significant interaction among treatment, stress and time. Zebrafish exposed to 170 mg/L of risperidone and submitted to the acute stress test had a reduced cortisol response to an acute stressor at 15, 60 and 240 minutes after stress (Fig. 1). Significant effects were observed in the analysis restricted to non-stressed animals, but cortisol levels in these groups are within the normal range reported in the literature. Table 1 summarizes the results yielded by the statistical analysis.

Fig. 1. Whole-body cortisol concentrations in zebrafish exposed to risperidone followed by an acute stress test and respective controls.

The values are expressed as the mean \pm standard error of mean of 5-6 fish. Different small letters indicate significant group differences in each sampling time. The insert shows graphical demonstration of U-shaped dose response curve at the time of cortisol peak. S- and S+ refer to non-stressed and stressed fish, respectively.

Table 1. Results of analysis of variance (ANOVA) for cortisol levels

Analysis	Effects	F-value	DF	P-value
3-way ANOVA	Treatment	29.650	5,233	0.0001
	Stress	421.812	1,233	0.0001
	Time	165.849	3,233	0.0001
	Treatment \times stress	16.413	5,233	0.0001
	Treatment \times time	5.598	15,233	0.0001
	Stress \times time	169.065	3,233	0.0001
	Treatment \times stress \times time	6.667	15,233	0.0001
2-way ANOVA: S-	Treatment	16.687	5,116	0.0001
	Time	10.144	3,116	0.0001
	Treatment \times time	6.355	15,116	0.0001
2-way ANOVA: S+	Treatment	23.401	5,117	0.0001
	Time	188.867	3,117	0.0001
	Treatment \times time	5.792	15,117	0.0001

The table summarizes the main effects of and the interaction between treatment, stress and time, as well as the restricted ANOVAs to each stress condition. DF refers to degrees of freedom. Significant effects ($p < 0.05$) are given in bold font.

Experiment 2 – novel tank test

Figure 2 shows the effects of risperidone (170 $\mu\text{g/L}$) in the novel tank test. A significant main effect of treatment was observed for time in the bottom and upper, and a significant interaction between treatment and stress was observed for time in the upper. Table 2 summarizes the results yielded by the statistical analysis for each behavioral parameter evaluated. Post hoc analysis revealed that risperidone increased time spent in the upper in stressed fish. Total distance, mean speed, absolute turn angle, and number of crossings did not differ among experimental groups.

Fig. 2. Behavioral parameters of zebrafish in the novel tank test followed by an acute stress protocol.

Total distance (A), mean speed (B), crossings between compartments (C), absolute turn angle (D), time spent in the bottom (E), and time in the upper (F). The data are expressed as the mean \pm standard error of mean of 5-6 fish. *= $p < 0.05$ compared to Risp 0, S- group; #= $p < 0.05$ compared to Rips 0, S+ group. S- and S+ refer to non-stressed and stressed fish, respectively.

Table 2. Results of analysis of variance (ANOVA) for the behavioral tests

Dependent variable	Effects	F-value	DF	P-value
Total distance	Treatment	0.302	1,19	0.589
	Stress	0.103	1,19	0.751
	Treatment × stress	0.405	1,19	0.532
Crossings	Treatment	0.175	1,19	0.680
	Stress	0.084	1,19	0.775
	Treatment × stress	0.637	1,19	0.435
Mean speed	Treatment	0.300	1,19	0.591
	Stress	0.100	1,19	0.756
	Treatment × stress	0.401	1,19	0.534
Absolute turn angle	Treatment	0.074	1,19	0.788
	Stress	1.536	1,19	0.230
	Treatment × stress	0.530	1,19	0.476
Time in the bottom	Treatment	5.559	1,19	0.029
	Stress	0.212	1,19	0.650
	Treatment × stress	2.432	1,19	0.135
Time in the middle	Treatment	0.189	1,19	0.668
	Stress	0.661	1,19	0.426
	Treatment × stress	0.230	1,19	0.637
Time in the upper	Treatment	9.029	1,19	0.007
	Stress	1.145	1,19	0.298
	Treatment × stress	4.469	1,19	0.048

The table summarizes the main effects of and the interaction between treatment and stress. DF refers to degrees of freedom. Significant effects ($p < 0.05$) are given in bold font.

Discussion

Here we showed that acute exposure to an intermediate concentration of risperidone of 170 $\mu\text{g/L}$ impaired the stress axis response, since the exposed zebrafish had lower cortisol levels than control fish, when exposed to an acute stress challenge. We also showed that zebrafish exposed to this concentration of risperidone decreased the time spent in the bottom compartment of the tank when compared with stressed fish, reinforcing the anxiolytic effect of this drug [35-38]. To our knowledge, this is the first report about risperidone effects on the

stress neuroendocrine axis in zebrafish.

The risperidone mechanism is yet unclear, but it acts directly on the central nervous system, more specifically in dopaminergic and serotonergic receptors, probably without any direct effect on interrenal tissue [13, 39]. The serotonergic system plays an essential role in the fish stress response [40].

Considering the concentrations used, the HPI impairing effect was verified only in the intermediate concentration of 170 $\mu\text{g/L}$. The lowest (0.00034 $\mu\text{g/L}$ and 85 $\mu\text{g/L}$) and highest (340 $\mu\text{g/L}$ and 680 $\mu\text{g/L}$) concentrations did not block the cortisol elevation after the acute stress challenge. Thus, the dose-response curve presented a U-shaped response (see the insert in the figure 1). This type of response was verified previously for the effects of diazepam [41] and ethanol [28] on stress response and behavior [42]. Similar U-shaped curve was also found for the cortisol effects on human memory [43].

The biological meaning of the minor cortisol fluctuations induced by risperidone in non-stressed animals remains to be elucidated. Nevertheless, the risperidone concentration that blunted the cortisol increase in stressed animals did not alter cortisol in non-stressed, control animals, suggesting that risperidone does not influence basal hormonal levels per se, but rather it modulates the response elicited by stress.

Regarding the novel tank test, zebrafish exposed to risperidone showed a decrease in the time spent in the tank bottom and stressed fish exposed to risperidone spent more time in the upper part of the tank, demonstrating its anxiolytic effects. This anxiolytic-like effect of atypical antipsychotics was also verified in mammals [44-45]. The risperidone effect on zebrafish behavior was previously verified using a light-dark test, where the drug decreased the number of crossing between light and dark compartments [33]. In this study, we analyzed the zebrafish behavior at 15 minutes after stress. Thus, we cannot discard that more clear behavioral effects of risperidone exposure could be detected if analyzed earlier than 15 minutes after stress exposure.

The anxiolytic effect of risperidone is not well understood since the exact mechanisms by which it blocks the HPI functioning in response to a stress challenge are still unclear. Despite the unclear mechanism, a fish with an impaired capacity to respond and cope with stress lost its ability to maintain homeostasis against stressors by reducing the ability to promote the necessary adjustments [22-23, 46-47]. Also, the behavioral changes produced by risperidone exposure may reduce the caution in predator inspection and consequently increase the risk of predation [48]. Combining the neuroendocrine and behavioral results and considering that these effects were detected in a concentration much higher than the one found in the environment,

the consequences of an environmental contamination with risperidone are difficult to predict.

The concentration of 170 µg/L of risperidone is unexpected in natural environments. However, aquatic organisms may be exposed to accidental spills of pollutants, incorrect discharges of substances or contaminants already present in the water. Such contamination may cause biomagnification, in which concentrations much higher than those found in the environment may be observed. This phenomenon has been reported for the presence of pesticides [49-51].

Our results highlight that the presence of risperidone residues in aquatic ecosystems may blunt the cortisol response to stress as well the fish behavior with consequences on fish survival and welfare.

Figure 1

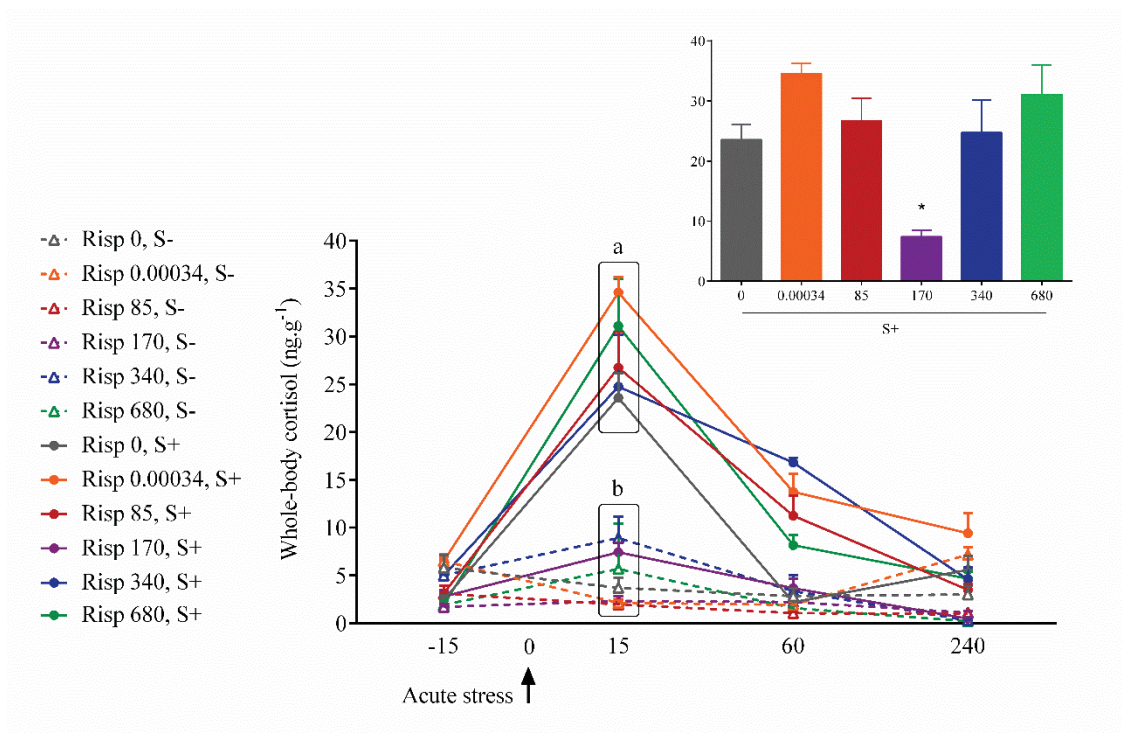
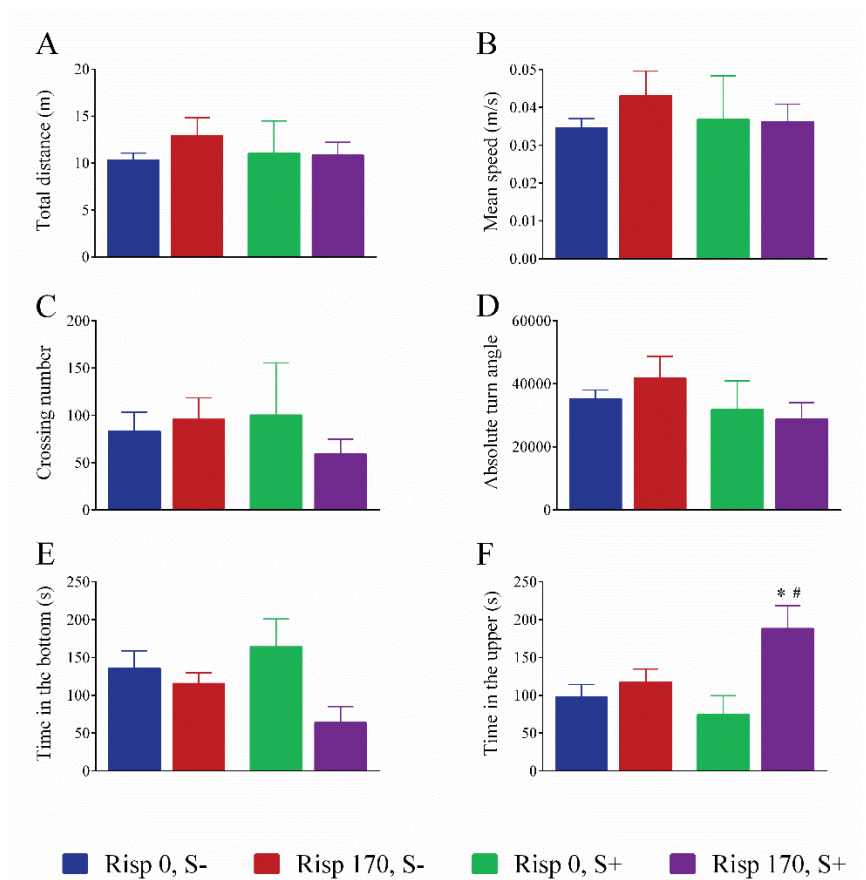


Figure 2



References

- [1] Hignite C, Azarnoff DL (1977) Drugs and drug metabolites as environmental contaminants: chloro phenoxyisobutyrate and salicylic acid in sewage water effluent. *Life Sci* 20: 337-341.
- [2] Brooks BW, Chambliss CK, Stanley JK, Ramirez A, Banks KE, Johnson RD, Lewis RJ. (2005) Determinations of Select Antidepressant in Fish From An Effluent – Dominated Stream. *Environm Toxicol Chem* 24: 464-469.
- [3] Calisto V, Esteves VI (2009) Psychiatric pharmaceuticals in the environment. *Chemosphere* 77: 1257-1274.
- [4] Alonso AG, Catala M, Maroto RR, Gil JL, de Miguel AG, Valcarcel Y. (2010) Pollution by psychoactive pharmaceuticals in the Rivers of Madrid metropolitan area (Spain). *EnvironmInternat* 36:195-201.
- [5] Jones OA, Lester JN, Voulvoulis N (2005) Pharmaceuticals: a threat to drinking water? *Trends Biotechnol* 23: 163-167.
- [6] Calisto V, Domingues MRM, Esteves VI (2011) Photodegradation of Psychiatric pharmaceuticals in aquatic environments – Kinetics and photodegradation products. *Water Res* 45: 6097- 6106.
- [7] Heberer T (2002) Tracing persistent pharmaceutical residues from municipal sewage to drinking water. *J Hydrol* 266: 175-189.
- [8] Calamari D, Zuccato E, Castiglioni S, Bagnati R, Fanelli R. (2003). Strategic Survey of therapeutic Drugs in the Rivers PO and Lambro in Northern Italy. *Environm Sci Technol* 37: 1241-1248.
- [9] Brodin T, Fick J, Jonsson M, Klaminder J. (2013) Dilute Concentration of a Psychiatric Drug Alter Behavior of Fish from Natural Populations. *Science* 339: 814-815.
- [10] Baldessarini RJ (2000) A plea for integrity of the bipolar disorder concept. *Bipolar Dis* 2: 3–7.
- [11] Bascunana H, Villarreal I, Alfonso S, Bernabeu M, Terr'e R. (2000) Agitation in head injury. I. Definition and treatment with anxiolytic neuroleptics and antiepileptic drugs. *Rev Neurol* 30: 850–854.
- [12] Daniel DG (2000) Antipsychotic treatment of psychosis and agitation in the elderly. *J Clin Psychiatry* 61: 49–52.
- [13] Oliveira IR (2000) Antipsicóticos atípicos: farmacologia e uso clínico. *Rev Bras Psiquiatr* 22: 38-40.
- [14] Blanchard DC, Blanchard RJ (1988) Ethoexperimental approaches to the biology of emotion. *Ann Rev Psychol* 39: 43 – 68.

- [15] Blanchard RJ, Hori KM, Mayer SI, Rodgers RJ, Blanchard DC. (1990) Anethopharmacological approach to the biology of anxiety. In: Morato S, Carobrez AP, Lima TCM. Neurosciences & Behavior – 2. Ribeirão Preto: Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, p. 125-141, 1990.
- [16] Graeff FG, Zangrossi Jr H (2010) The hypothalamic-pituitary-adrenal axis in anxiety and panic. *Psychol Neurosci* 3: 3 – 8.
- [17] Mariano WS, Oba ET, Santos LRB, Fernandes MN. Physiological responses in jeju (*Hoplerhythrinus unitaeniatus*) to atmospheric air exposure. *Rev. Bras. Saúde Prod. An.*, v.10, n.1, p.210-223, 2009.
- [18] Barton BA (2002) Stress in fishes: a diversity of responses with particular reference to changes in circulating corticosteroids. *Integr Comp Biol* 42: 517–525.
- [19] Chrousos GP, Gold PW (1992) The Concepts of Stress and stress System Disorders. Overview of Physical and Behavioral Homeostasis. *JAMA* 4; 267(9):1244-52.
- [20] Wendelaar Bonga SE (1997) The stress response in fish. *Physiol Rev* 77:591-625.
- [21] Mancera MJ, Carrión RL, Martín DP, Río DM (2002) Osmoregulatory action of PRL, GH and cortisol in the gilthead seabream (*Sparus aurata* L). *Gen Comp Endocrinol* 129: 95–103.
- [22] Cericato L, Neto JGM, Fagundes M, Kreutz LC et al. (2008) Cortisol response to acute stress in jundia *Rhamdia quelen* acutely exposed to sub-lethal concentrations of agrichemicals. *Comp Biochem Physiol C* 148: 281–286.
- [23] Cericato L, Neto JGM, Kreutz LC, Quevedo RM et al. (2009) Responsiveness of the interrenal tissue of Jundia (*Rhamdia quelen*) to an in vivo ACTH test following acute exposure to sublethal concentrations of agrichemicals. *Comp Biochem Physiol C* 149: 363–367.
- [24] Barbazuk WB, Korf I, Kadavi C, Heyen J, Tate S et al. (2000) The synthetic relationship of the zebrafish and human genomes. *Genome Res* 10: 1351–1358.
- [25] Goldsmith P (2004) Zebrafish as a pharmacological tool: the how, why and when. *Curr Opin Pharmacol* 4: 504–12.
- [26] Egan R, Bergner CL, Hart PC, Cachat JM, Canavello PR et al. (2009) Understanding behavioral and physiological phenotypes of stress and anxiety in zebrafish. *Behav Brain Res* 205: 38–44
- [27] Cachat J, Stewart A, Grossman L, Gaikwad S, Kadri F et al. (2010) Measuring behavioral and endocrine responses to novelty stress in adult zebrafish. *Nature Prot* 5(11): 1786–1799.
- [28] Oliveira TA, Koakoski G, Kreutz LC, Ferreira D et al. (2013) Alcohol Impairs Predation Risk Response and Communication in Zebrafish. *PLOS ONE* 8(10):e75780. doi:10.1371/journal.pone.0075780.
- [29] Barcellos LJG, Ritter F, Kreutz LC, Quevedo RM, Silva LB et al. (2007) Whole body

- cortisol increases after direct and visual contact with the predator in zebrafish, *Danio rerio*. *Aquaculture* 272: 774–778.
- [30] Barcellos LJG, Ritter F, Kreutz LC, Cericato L (2010) Can Zebrafish *Danio rerio* learn about predation risk? The effect of a previous experience on the cortisol response in subsequent encounters with a predator. *J Fish Biol* 76: 1032–1038.
- [31] Piato AL, Capiotti KM, Tamborski A, Osés JP, Barcellos LJG et al. (2011) Unpredictable chronic stress model in zebrafish (*Danio rerio*): Behavioral and physiological responses. *Progr Neuro-Psychopharm Biol Psychiatry* 35: 561–567.
- [32] Dal Santo G, Conterato GMM, Barcellos LJG, Rosemberg DB, Piato AL (2013) Acute restraint stress induces an imbalance in the oxidative status of the zebrafish brain. *Neurosci Lett* 558: 103–108.
- [33] Magno LD, Fontes A, Gonçalves BM, Gouveia A Jr. (2015) Pharmacological study of the light/dark preference test in zebrafish (*Danio rerio*): Waterborne administration. *Pharmacol Biochem Behav* 135:169-176.
- [34] Sink TD, Lochmann RT, Fecteau KA (2007) 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 Physiol Biochem* 75:165–171.
- [35] Blin O, Azorin JM, Bouhours P (1996) Antipsychotic and anxiolytic properties of risperidone, haloperidol, and methotrimeprazine in schizophrenic patients. *J Clin Psychopharmacol* 16: 38-44.
- [36] Rogóż Z, Skuza G (2011) Anxiolytic-like effects of olanzapine, risperidone and fluoxetine in the elevated plus-maze test in rats. *Pharmacol Rep* 63: 1547-52.
- [37] Sun T, He W, Hu G, Li M (2010) Anxiolytic-like property of risperidone and olanzapine as examined in multiple measures of fear in rats. *Pharmacol Biochem Behav* 95: 298-307.
- [38] Krishnamurthy S, Garabadu D, Joy KP (2013) Risperidone ameliorates post-traumatic stress disorder-like symptoms in modified stress re-stress model. *Neuropharmacol* 75: 62-77.
- [39] Cuesta MJ, Peralta V, Zarzuela A (2001) Effects of olanzapine and other antipsychotics on cognitive function in chronic schizophrenia: a longitudinal study. *Schizophr Res* 48: 17–28.
- [40] Winberg S, Nilsson A, Hylland P, et al. (1997) A serotonina como um regulador da actividade de eixo hipotálamo-hipófise-interrenal em peixes teleósteos. *Neurosci Lett* 230: 113-116.
- [41] Abreu MSd, Koakoski G, Ferreira D, Oliveira TA, Rosa JGSd, et al. (2014) Diazepam and Fluoxetine Decrease the Stress Response in Zebrafish. *PLoS ONE* 9(7): e103232. doi:10.1371/journal.pone.0103232
- [42] Gerlai R, Lahav M, Guo S, Rosenthal A (2000) Drinks like a fish: zebrafish (*Danio rerio*)

- as a behavior genetic model to study alcohol effects. *Pharmacol Biochem Behav* 67: 773–782.
- [43] Schilling TM, Kölsch M, Larra MF, Zech CM, Blumenthal TD. (2013) For whom the bell (curve) tolls: Cortisol rapidly affects memory retrieval by an inverted U-shaped dose-response relationship. *Psychoneuroendocrinol* 38: 1565–1572.
- [44] Nowakowska E, Chodera A, Kusk K, Rybakowski J. (1999) Some behavioral effects of risperidone in rats: comparison with haloperidol. *Euro Neuropsychopharmacol* 9: 421–426.
- [45] Sun T, He W, Hu G, Li M. (2010) Anxiolytic-like property of risperidone and olanzapine as examined in multiple measures of fear in rats. *Pharmacol Biochem Behav* 95: 298–307.
- [46] Hontela A (1998) Interrenal dysfunction in fish from contaminated sites: In Vivo and In Vitro Assessment. *Environ Toxicol Chem* 17: 44–48.
- [47] Pacheco M, Santos MA (2001) Biotransformation, endocrine and genetic responses of *Anguilla Anguilla* L. to petroleum distillate products and environmentally contaminated waters. *Ecotox Environm Saf* 49: 64–75.
- [48] Dugatkin LA (1992) Tendency to inspect predators predicts mortality risk in the guppy (*Poecilia reticulata*). *Behav Ecol* 3: 124–127.
- [49] Niethammer KR, White DH, Baskett TS, Sayre MW (1984) Presence and biomagnification of organochlorine chemical residues in oxbow lakes of Northeastern Louisiana. *Arc Environm Contam Toxicol* 13: 63–74.
- [50] Kelly BC, Ikonomou MG, Blair JD, Morin AE, Gobas FAPC (2007) Food web-specific biomagnification of persistent organic pollutants. *Science* 317: 236–239.
- [51] Goerke H, Weber K, Bornemann H, Ramdohr S, Plötz J (2004). Increasing levels and biomagnification of persistent organic pollutants (POPs) in Antarctic biota. *Mar Pollut Bull* 48: 295–302.

4. CONCLUSÕES

Com a crescente utilização de fármacos psicoativos, detecção dessas drogas de ocupação humana em águas superficiais e a preocupação de gerar impactos no ambiente aquático, o modelo experimental zebrafish foi utilizado como ferramenta para indicar a contaminação desses recursos hídricos através da mensuração de cortisol corporal. Com os resultados obtidos podemos afirmar que:

1. O cortisol é um importante biomarcador de poluição ambiental, ferramenta de estudo em nosso experimento de estresse agudo.
2. A presença do antipsicótico atípico risperidona, na água, foi suficiente para bloquear o eixo hipotálamo-hipófise-interrenal do peixe zebra, em uma dose intermediária às estudadas.
3. O comportamento do peixe é alterado com a presença da risperidona na água, onde o fato de termos um agente estressor, não significa estresse para o indivíduo, podendo este se tornar presa fácil ou ainda prejudicar reprodução, crescimento e interação social.
4. Com a crescente contaminação das águas, devido o aumento na prescrição de drogas antipsicóticas, surge a possibilidade de interferência também nos seres humanos usuários desses recursos contaminados.

5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

A contaminação dos recursos hídricos como efluentes municipais ou águas de superfície, por resíduos de fármacos e/ou metabólitos, tem sido relatada há muitos anos e com crescente preocupação com a população usuária desses recursos e organismos aquáticos deste habitat.

O diagnóstico de distúrbios psicóticos como esquizofrenia, Alzheimer e autismo é crescente na população mundial, desta forma novos medicamentos surgem na tentativa de tratamento específico dos sinais clínicos apresentados e diminuindo a apresentação de sinais adversos.

Frente a presença de novas drogas, sua crescente utilização pela população e consequente excreção, eliminação ou ainda descarte incorreto de seus resíduos, o ambiente aquático pode ser atingido e suas conseqüências se tornam imensuráveis. Estas drogas por possuírem poder ansiolítico e antidepressivo podem e estão interferindo o sistema neuroendócrino de estresse e comprometendo as respostas de defesa dos peixes, como visto nos resultados deste experimento.

Os riscos da presença de resíduos de medicações de ocupação humana sobre a biodiversidade de corpos naturais de água e suas populações é comprovada. As agências reguladoras devem adotar medidas de detecção destas drogas assim como medidas de tratamento dos efluentes municipais.

6. REFERÊNCIAS

1. Wendelaar Bonga SE. The stress response in fish. *Physiol Rev.* 1997;77(3):591-625.
2. Chrousos GP, Gold PW. The concepts of stress and stress system disorders. Overview of physical and behavioral homeostasis. *JAMA.* 1992;267(9):1244-52.
3. Mariano WdS, Oba ET, Santos LRBd, Fernandes MN. Physiological responses in jeju, *Hoplerythrinus unitaeniatus*, (Characiformes, Erythrinidae), to atmospheric air exposure. *Respostas fisiológicas de jeju ("Hoplerythrinus unitaeniatus") expostos ao ar atmosférico.* *Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal.* 2009.
4. Pacheco M, Santos MA. Biotransformation, endocrine, and genetic responses of *Anguilla anguilla* L. to petroleum distillate products and environmentally contaminated waters. *Ecotoxicol Environ Saf.* 2001;49(1):64-75.
5. Hontela A. Interrenal dysfunction in fish from contaminated sites: In vivo and in vitro assessment. *Environmental Toxicology and Chemistry.* 1998;17(1):44-8.
6. Brodin T, Fick J, Jonsson M, Klaminder J. Dilute concentrations of a psychiatric drug alter behavior of fish from natural populations. *Science.* 2013;339(6121):814-5.
7. Brooks BW, Chambliss CK, Stanley JK, Ramirez A, Banks KE, Johnson RD, et al. Determination of select antidepressants in fish from an effluent-dominated stream. *Environ Toxicol Chem.* 2005;24(2):464-9.
8. Calamari D, Zuccato E, Castiglioni S, Bagnati R, Fanelli R. Strategic Survey of Therapeutic Drugs in the Rivers Po and Lambro in Northern Italy. *Environmental Science & Technology.* 2003;37(7):1241-8.
9. Calisto V, Domingues MR, Esteves VI. Photodegradation of psychiatric pharmaceuticals in aquatic environments--kinetics and photodegradation products. *Water Res.* 2011;45(18):6097-106.
10. Calisto V, Esteves VI. Psychiatric pharmaceuticals in the environment. *Chemosphere.* 2009;77(10):1257-74.
11. Daughton CG, Ternes TA. Pharmaceuticals and personal care products in the environment: agents of subtle change? *Environ Health Perspect.* 1999;107 Suppl 6:907-38.
12. Gonzalez Alonso S, Catala M, Maroto RR, Gil JL, de Miguel AG, Valcarcel Y. Pollution by psychoactive pharmaceuticals in the Rivers of Madrid metropolitan area (Spain). *Environ Int.* 2010;36(2):195-201.
13. Heberer T, Reddersen K, Mechlinski A. From municipal sewage to drinking water: fate and removal of pharmaceutical residues in the aquatic environment in urban areas. *Water Sci Technol.* 2002;46(3):81-8.
14. Hignite C, Azarnoff DL. Drugs and drug metabolites as environmental contaminants: chlorophenoxyisobutyrate and salicylic acid in sewage water effluent. *Life Sci.* 1977;20(2):337-41.

15. Jones OA, Lester JN, Voulvoulis N. Pharmaceuticals: a threat to drinking water? *Trends Biotechnol.* 2005;23(4):163-7.
16. Kolpin DW, Furlong ET, Meyer MT, Thurman EM, Zaugg SD, Barber LB, et al. Pharmaceuticals, hormones, and other organic wastewater contaminants in U.S. streams, 1999-2000: a national reconnaissance. *Environ Sci Technol.* 2002;36(6):1202-11.
17. Baldessarini RJ. A plea for integrity of the bipolar disorder concept. *Bipolar Disord.* 2000;2(1):3-7.
18. Bascunana H, Villarreal I, Alfonso S, Bernabeu M, Terre R. [Agitation in head injury. I. Definition and treatment with anxiolytic neuroleptics and antiepileptic drugs]. *Rev Neurol.* 2000;30(9):850-4.
19. Cuesta MJ, Peralta V, Zarzuela A. Effects of olanzapine and other antipsychotics on cognitive function in chronic schizophrenia: a longitudinal study. *Schizophr Res.* 2001;48(1):17-28.
20. Daniel DG. Antipsychotic treatment of psychosis and agitation in the elderly. *J Clin Psychiatry.* 2000;61 Suppl 14:49-52.
21. Becker CG, Becker T. Adult zebrafish as a model for successful central nervous system regeneration. *Restor Neurol Neurosci.* 2008;26(2-3):71-80.
22. Spence R, Gerlach G, Lawrence C, Smith C. The behaviour and ecology of the zebrafish, *Danio rerio*. *Biol Rev Camb Philos Soc.* 2008;83(1):13-34.
23. Yang L, Ho NY, Alshut R, Legradi J, Weiss C, Reischl M, et al. Zebrafish embryos as models for embryotoxic and teratological effects of chemicals. *Reprod Toxicol.* 2009;28(2):245-53.
24. Dahm R, Geisler R. Learning from small fry: the zebrafish as a genetic model organism for aquaculture fish species. *Mar Biotechnol (NY).* 2006;8(4):329-45.
25. Blanchard DC, Blanchard RJ. Ethoexperimental approaches to the biology of emotion. *Annu Rev Psychol.* 1988;39:43-68.
26. Graeff FG. Ansiedade, pânico e o eixo hipotálamo-pituitária-adrenal. *Revista Brasileira de Psiquiatria.* 2007;29:s3-s6.
27. Aluru N, Vijayan MM. Aryl hydrocarbon receptor activation impairs cortisol response to stress in rainbow trout by disrupting the rate-limiting steps in steroidogenesis. *Endocrinology.* 2006;147(4):1895-903.
28. Barton BA. Stress in Fishes: A Diversity of Responses with Particular Reference to Changes in Circulating Corticosteroids. *Integrative and Comparative Biology.* 2002;42(3):517-25.
29. Oliveira IR. Antipsicóticos atípicos: farmacologia e uso clínico. *Revista Brasileira de Psiquiatria.* 2000;22:38-40.

30. Nowakowska E, Chodera A, Kus K, Rybakowski J. Some behavioural effects of risperidone in rats: comparison with haloperidol. *Eur Neuropsychopharmacol.* 1999;9(5):421-6.
31. Sun T, He W, Hu G, Li M. Anxiolytic-like property of risperidone and olanzapine as examined in multiple measures of fear in rats. *Pharmacol Biochem Behav.* 2010;95(3):298-307.
32. MAGNO LDP. Validação farmacológica da preferência claro-escuro em *Danio rerio*. 2012.
33. Bencan Z, Sledge D, Levin ED. Buspirone, chlordiazepoxide and diazepam effects in a zebrafish model of anxiety. *Pharmacol Biochem Behav.* 2009;94(1):75-80.
34. Kabashi E, Brustein E, Champagne N, Drapeau P. Zebrafish models for the functional genomics of neurogenetic disorders. *Biochim Biophys Acta.* 2011;1812(3):335-45.

7. ANEXO 1. Parecer 007/2013, Comitê de Ética no Uso de Animais – CEUA/UPF

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

PARECER Nº 007/2013

A Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade de Passo Fundo, em reunião no dia 28/06/13, analisou o projeto de pesquisa **“Efeito de ansiolíticos sobre a relação presa-predador em peixes zebra (*Danio rerio*)”**, registro na CEUA Nº 006/2012, de responsabilidade do pesquisador **Leonardo José Gil Barcellos**.

Em relação aos aspectos éticos, a Comissão considerou o projeto relevante e com relação custo-benefício adequada. O pesquisador e seus colaboradores estão comprometidos com a observância dos procedimentos para o uso científico de animais estabelecidos na Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008.

Diante do exposto, a Comissão, de acordo com suas atribuições definidas na Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, manifesta-se pela aprovação do projeto de pesquisa na forma como foi proposto.

O pesquisador deverá apresentar relatório à CEUA ao final do estudo.

Situação: PROTOCOLO APROVADO

Passo Fundo, 01 de julho de 2013.

Prof. Ana Cristina Vendrametto V. Giacomini
Coordenadora – CEUA – UPF