

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PAMPA

LUCIA EMANUELI SCHIMITH

**USO DO PEIXE-ZEBRA *Danio rerio* (Hamilton, 1822) COMO MODELO
ALTERNATIVO PARA AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE DE NOVOS COMPOSTOS
COM AÇÃO ANTIMICROBIANA**

São Gabriel

2018

LUCIA EMANUELI SCHIMITH

**USO DO PEIXE-ZEBRA *Danio rerio* (Hamilton, 1822) COMO MODELO
ALTERNATIVO PARA AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE DE NOVOS COMPOSTOS
COM AÇÃO ANTIMICROBIANA**

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado ao Curso de Biotecnologia
da Universidade Federal do Pampa, como
requisito parcial para obtenção do Título
de Bacharel em Biotecnologia.

Orientador: Dr. Jeferson Luis Franco

Coorientador: Dr^a Thaís Posser

**São Gabriel
2018**

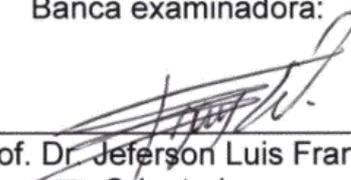
LUCIA EMANUELI SCHIMITH

**USO DO PEIXE-ZEBRA *Danio rerio* (Hamilton, 1822) COMO MODELO
ALTERNATIVO PARA AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE DE NOVOS COMPOSTOS
COM AÇÃO ANTIMICROBIANA**

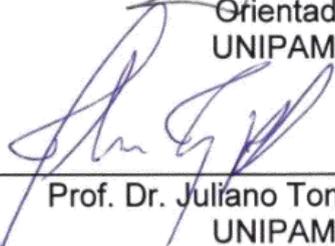
Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado ao Curso de Biotecnologia
da Universidade Federal do Pampa, como
requisito parcial para obtenção do Título
de Bacharel em Biotecnologia.

Trabalho de Conclusão de Curso defendido e aprovado em: 4 de dezembro de 2018.

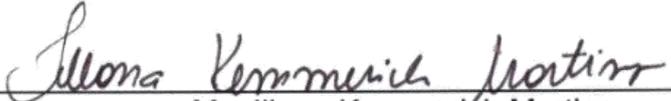
Banca examinadora:



Prof. Dr. Jeferson Luis Franco
Orientador
UNIPAMPA



Prof. Dr. Juliano Tomazzoni Boldo
UNIPAMPA



Ms. Illana Kemmerich Martins
UNIPAMPA

Ficha catalográfica elaborada automaticamente com os dados fornecidos
pelo(a) autor(a) através do Módulo de Biblioteca do
Sistema GURI (Gestão Unificada de Recursos Institucionais).

S335u Schimith, Lucia Emanuelli

Uso do peixe-zebra *Danio rerio* (Hamilton, 1822) como modelo alternativo para avaliação da toxicidade de novos compostos com ação antimicrobiana / Lucia Emanuelli Schimith.

41 p.

Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação) --
Universidade Federal do Pampa, BIOTECNOLOGIA, 2018.
"Orientação: Jeferson Luis Franco".

Peixe-zebra. 2. Embriotoxicidade . 3. Comportamento. 4.
Resistência antimicrobiana

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, que permitiu que tudo isso se realizasse.

Aos meus pais, Afonsinho e Adriane, pelos sacrifícios, dedicação e apoio incondicional. Devo tudo o que sou a vocês e, se cheguei até aqui é porque sei que vieram segurando minha mão. Espero algum dia poder retribuir ao menos parte de tudo que vocês fizeram por mim.

Ao Prof. Dr. Jeferson Luis Franco e a Prof^a Dr^a Thaís Posser por terem me acolhido no grupo de pesquisa e por todo conhecimento passado.

Aos colegas do GPEOSCEL, ou melhor, meu muito obrigada à família GPEOSCEL! Grata por todos os momentos que compartilhamos durante estes anos, pelo apoio, conselhos e, principalmente, pela amizade. Levarei vocês sempre comigo.

Aos meus amigos e familiares pela compreensão e suporte.

A banca examinadora deste trabalho pela disponibilidade e contribuições.

A Universidade Federal do Pampa pela oportunidade de cursar Biotecnologia e também ao CNPq pela bolsa de iniciação científica e recursos financeiros concedidos.

RESUMO

A descoberta dos antibióticos é considerada uma das principais revoluções científicas da humanidade pois permitiu aumentar significativamente a expectativa de vida e possibilitou a existência de terapêutica efetiva para infecções que até então eram fatais. A negligência social no uso de antibióticos contribui diretamente para o surgimento de um grande problema na área da saúde pública, a resistência antimicrobiana. A escassez de novos agentes antimicrobianos para substituir os já ineficazes torna urgente o desenvolvimento de novos fármacos. O uso de anéis heterocíclicos tem apresentado vantagens para a síntese de compostos farmacêuticos com diferentes atividades farmacológicas. Estudos recentes revelaram que derivados indólicos e pirazólicos possuem amplo espectro de atividades biológicas, sendo destacado o seu potencial antimicrobiano. Recentemente, o peixe-zebra (*Danio rerio*), em sua fase embrio-larval, tem surgido como modelo eficiente para a caracterização das propriedades toxicológicas de novos compostos. Seu alto grau de homologia com mamíferos permite a extrapolação dos resultados a humanos de forma mais direta do que os demais modelos invertebrados e de maneira mais econômica em relação aos roedores. O estudo teve como objetivo usar embriões de peixe-zebra para avaliar a toxicidade de dois novos compostos sintéticos heterocíclicos que apresentam potencial para o desenvolvimento de novos agentes antimicrobianos, derivados estes de compostos indólicos e pirazólicos. Embriões com 3 horas pós-fertilização (hpf) foram expostos por imersão às concentrações de 0 (Controle), 1, 8 e 32 µg/mL dos compostos, diluídos em DMSO (0,005%), de maneira estática por 7 dias. A mortalidade e taxa de eclosão foram avaliadas diariamente e, ao final do período de exposição, as larvas foram submetidas ao ensaio comportamental exploratório do tipo *Novel Tank*. Os embriões expostos aos compostos apresentaram aumento significativo na mortalidade, quando comparados ao grupo controle. Esse efeito foi concentração-dependente. Diminuições significativas na taxa de eclosão também foram evidentes nas concentrações mais altas testadas. Foi possível observar alterações no comportamento exploratório dos embriões ao final da exposição, mesmo na menor concentração testada (1 µg/mL), em relação ao controle. Nossos resultados demonstram de forma rápida e satisfatória os efeitos embriotóxicos de diferentes compostos candidatos a novos fármacos, sobre o desenvolvimento de peixe-zebra.

Desse modo, *D. rerio* se mostra como um modelo correlativo preditivo, para o estudo de novas moléculas com potencial antimicrobiano, capaz de apresentar complexidade de um animal vertebrado com as vantagens de um invertebrado.

Palavras-Chave: Peixe-zebra. Embriotoxicidade. Comportamento. Resistência antimicrobiana. Novos fármacos.

ABSTRACT

The discovery of antibiotics is considered one of the major scientific revolutions of mankind because it allowed a significant increase in life expectancy and made possible the existence of effective therapy for infections that until then were fatal. Social neglect in the use of antibiotics contributes directly to the emergence of a major problem in the area of public health, antimicrobial resistance. The scarcity of new antimicrobial agents to replace those already ineffective makes the development of new drugs urgently. The use of heterocyclic rings has shown advantages for the synthesis of pharmaceutical compounds with different pharmacological activities. Recent studies have revealed that indole and pyrazole derivatives have a broad spectrum of biological activities, and their antimicrobial potential is highlighted. Recently, zebrafish (*Danio rerio*), in its embryo-larval stage, has emerged as an efficient model for the characterization of the toxicological properties of new compounds. Its high degree of homology with mammals allows the extrapolation of the results to humans more directly than the other invertebrate models and in a more economical way in relation to rodents. The study aimed to use zebrafish embryos to evaluate the toxicity of two new heterocyclic synthetic compounds that present potential for the development of new antimicrobial agents derived from indole and pyrazole compounds. Embryos with 3 hours post-fertilization (hpf) were exposed by immersion at concentrations of 0 (Control), 1, 8 and 32 $\mu\text{g/mL}$ of the compounds, diluted in DMSO (0.005%), statically for 7 days. Mortality and hatch rate were evaluated daily and, at the end of the exposure period, the larvae were submitted to the Novel Tank exploratory behavioral test. Embryos exposed to the compounds had a significant increase in mortality, when compared to the control group. This effect was concentration-dependent. Significant decreases in hatching rate were also evident at the highest concentrations tested. It was possible to observe changes in the exploratory behavior of the embryos at the end of the exposure, even at the lowest concentration tested (1 $\mu\text{g/mL}$), in relation to the control. Our results quickly and satisfactorily demonstrate the embryotoxic effects of different candidate drug compounds on the development of zebrafish. Thus, *D. rerio* is shown as a predictive correlative model for the study of new molecules with antimicrobial potential capable of presenting the complexity of a vertebrate animal with the advantages of an invertebrate.

Keywords: Zebrafish. Embryotoxicity. Behavior. Antimicrobial resistance. New drugs.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Fórmula estrutural indol.....	14
Figura 2 – Fórmula estrutural pirazol.....	16
Figura 3 – Peixe-zebra adulto	17
Figura 4 – Desenho esquemático das etapas do desenvolvimento do peixe-zebra.	19
Figura 5 – Estágios do desenvolvimento embrionário de peixe-zebra	20
Figura 6 – Curva de sobrevivência	26
Figura 7 – Avaliação da taxa de eclosão.....	27
Figura 8 – Ensaio comportamental exploratório das larvas expostas ao composto A1	28
Figura 9 – Ensaio comportamental exploratório das larvas expostas ao composto A2	29

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Hpf – Horas pós fertilização

Dpf – Dias pós fertilização

DMSO – Dimetilsulfóxido

CEUA – Comissão de Ética no Uso de Animais

pH – Potencial Hidrogeniônico

μ S – microSiemens

BOD – Demanda Bioquímica de Oxigênio

ELISA – Enzyme-Linked Immunosorbent Assay

μ g/mL – micrograma por mililitro

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	13
1.1	Antimicrobianos	13
1.2	Resistência Antimicrobiana	13
1.3	Compostos Indólicos	14
1.4	Compostos Pirazólicos	15
1.5	Modelos Tradicionais	16
1.6	Peixe-zebra (<i>Danio rerio</i>)	17
2	JUSTIFICATIVA	21
3	OBJETIVOS	22
3.1	Objetivo Geral	22
3.2	Objetivos Específicos	22
4	METODOLOGIA	23
4.1	Manutenção de Peixes-zebra e Obtenção de Embriões	23
4.2	Curva Concentração-resposta	23
4.3	Taxa de Sobrevivência	24
4.4	Taxa de Eclosão	24
4.5	Ensaio Comportamental Exploratório	24
4.6	Análise Estatística	24
5	RESULTADOS	26
5.1	Exposição aos compostos A1 e A2 afetam a sobrevivência dos embriões de peixe-zebra	26
5.2	Exposição aos compostos A1 e A2 afetam a eclosão dos embriões de peixe-zebra	26
5.3	Exposição aos compostos A1 e A2 induzem alterações comportamentais	27
6	DISCUSSÃO	30
7	CONSIDERAÇÕES FINAIS	32
	REFERÊNCIAS	33

1 INTRODUÇÃO

1.1 Antimicrobianos

Os antimicrobianos são uma classe de fármacos que revolucionaram o tratamento de doenças infecciosas e reduziram mundialmente as taxas de morbidade e mortalidade associadas a estas infecções (CRAIG, 2004; FUCHS, 2004; COSTA; SILVA JUNIOR, 2017). Este tipo de droga difere das demais classes de fármacos quanto as suas propriedades físico-químicas, farmacológicas, além do espectro e mecanismos de ação (BAPTISTA, 2013).

Para que um antimicrobiano seja considerado ideal, o mesmo deve apresentar ação bactericida ou bacteriostática rápida, possuir um alvo seletivo, estreito espectro de ação — para que a microbiota saprófita não seja afetada, apresente baixo nível de toxicidade e reações adversas, aliado a elevados níveis terapêuticos, ampla distribuição no local infectado, ser um antibiótico que não conteste o sistema imunológico do hospedeiro, possua uma boa relação custo/eficácia e não induza resistência (BAPTISTA, 2013).

Os antibióticos correspondem a cerca de 12% de todas as prescrições ambulatoriais (MCCAIG; HUGHES, 1995). A alta frequência das infecções e o consequente consumo dos medicamentos para tratá-las acabam acarretando em muitos erros de prescrição, associados a incerteza diagnóstica e pouco conhecimento farmacológico. É recorrente o não conhecimento de que antimicrobianos são medicamentos específicos e, sendo assim, apenas eficazes para determinados agentes infecciosos (WANNMACHER, 2004). Portanto, o mau uso desses fármacos estimula o processo natural de resistência dos microrganismos aos antimicrobianos, uma vez que no ambiente natural esses são produzidos pelas populações de microrganismos como ferramenta de competição por recursos nutricionais e espaço (COSTA; SILVA JUNIOR, 2017).

1.2 Resistência Antimicrobiana

A resistência microbiana diz respeito a cepas de microrganismos que possuem a capacidade de multiplicar-se na presença de concentrações de antimicrobianos mais altas do que as doses terapêuticas dadas a humanos. Esses microrganismos podem ser intrinsecamente resistentes a certos fármacos, como

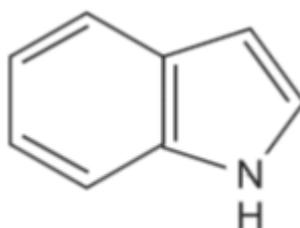
também podem adquirir resistência a antimicrobianos através de mutações em genes cromossômicos e por meio de transferência horizontal de genes. A resistência intrínseca de determinada espécie de microrganismo a um antimicrobiano específico é definida como a capacidade de resistir à ação desse antibiótico, como resultado de características estruturais ou funcionais inerentes (BLAIR *et al.*, 2015).

Segundo o *World Economic Forum Global Risks* (2013), a resistência microbiana é considerada uma das grandes ameaças à saúde humana, uma vez que se tornou um problema de saúde pública que tem estado presente nos sistemas de saúde do mundo todo. Essas cepas resistentes reduzem o tempo de vida da droga, levando à urgência o desenvolvimento de novos agentes antimicrobianos (SINGH *et al.*, 2008). Sendo assim, torna-se cada vez mais relevante visualizar a resistência antimicrobiana de uma forma multidisciplinar para que sejam desenvolvidos o maior número possível de estratégias de ação.

1.3 Compostos Indólicos

Os compostos indólicos pertencem a uma extensa família de compostos presentes em bactérias, plantas e animais. Estes compostos estão frequentemente relacionados ao metabolismo do aminoácido triptofano e por fazerem parte da estrutura essencial do neurotransmissor serotonina (CANO *et al.*, 2003). Os alcaloides indólicos apresentam anel indólico em sua estrutura (Figura 1), uma estrutura heterocíclica versátil que pode apresentar substituições em diferentes posições, descoberta em 1866 e encontrada em um número considerável de produtos derivados de plantas (KATCHAMART; WILLIAMS, 2001).

Figura 1 – Fórmula estrutural indol. Composto orgânico aromático heterocíclico. Apresenta estrutura bicíclica, constituída por um anel benzênico acoplado a um anel de pirrol.



Fonte: <https://bit.ly/2Qo0n6m>

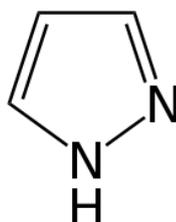
Estudos recentes revelaram que os derivados indólicos apresentam amplo espectro de atividades biológicas, como atividade antimicrobiana (SCRIBNER et al., 2009), analgésica (RADWAN et al., 2007), contra o câncer (SOLOMON; HUA; BIOORGAN, 2010), asma (VELANKAR et al., 2010), Alzheimer (CATTO et al., 2010), malária (CHIYANZU et al., 2005), antidiabética (LAMOTTE et al., 2010), anti-hipertensiva (KIM et al., 2007), anti-inflamatórias (MEHNDIRATTA et al., 2016) e citotóxicas (LIEW et al., 2014). Tais importâncias biológicas de heterocíclicos indólicos, além do seu potencial farmacológico e médico, os tornam alvos de pesquisa bastante atraentes. Essas características têm motivado vários pesquisadores a estudarem sua síntese e propriedades farmacológicas (SUNDBERG, 1996).

1.4 Compostos Pirazólicos

Compostos pirazólicos e seus derivados pertencem a uma classe de heterocíclicos de nitrogênio bastante conhecidos. Ocupam uma posição privilegiada na química medicinal por apresentarem uma ampla gama de atividades farmacológicas, como atividades antimicrobiana (TANITAME et al., 2004-2005), anti-inflamatória (ELGUERO et al., 2002), hipoglicêmica (MOMOSE et al., 2001), antiangiogênica (DUGI; MARK; HIMMELSBACH, 2009), além da inibição de diferentes enzimas, como ciclooxigenases-2 (RIDA et al., 2009), p38 MAPK (REGAN et al., 2002) e quinases dependentes de ciclina-2 (BRASCA et al., 2007; PEVARELLO et al., 2006).

O uso de anéis heterocíclicos, em particular o anel pirazólico (Figura 2), apresentam vantagens para a síntese de compostos farmacêuticos com diferentes atividades e bons perfis de segurança. Estruturas pirazólicas estão sendo amplamente utilizadas também no planejamento de medicamentos com foco em tratamentos de malignidade, particularmente na estrutura de diferentes inibidores de proteína-quinase (VIALE et al., 2013). O arcabouço pirazólico se comporta como uma importante estrutura na modulação da intensidade e ação de seus efeitos biológicos, sendo a seletividade dos alvos relacionada de maneira direta com os tipos de substituintes periféricos do anel (HAWASH et al., 2017).

Figura 2 – Fórmula estrutural pirazol. Composto aromático pentagonal, possui dois átomos de nitrogênio nas posições 1 e 2.



Fonte: <https://bit.ly/2D904c9>

1.5 Modelos Tradicionais

O desenvolvimento de novos fármacos exige a realização de conjuntos de estudos toxicológicos pré-clínicos — estabelecendo uma relação dose-resposta, por meio de sistemas *in vitro* ou em animais *in vivo*, com o objetivo de obter o maior número de informações que certifiquem a segurança dos novos compostos nos ensaios clínicos e, posteriormente, na sua comercialização (FAQI, 2013).

O uso de modelos tradicionais, como coelhos e roedores em geral, é considerado uma estratégia bastante eficaz para o estudo da ação de fármacos. No entanto, tais modelos possuem alto custo de manutenção, demandam tempo e muitas vezes são difíceis de serem replicados. Modelos tradicionais apresentam grandes dificuldades em análises em grande escala, sendo assim, torna-se complexa a avaliação de centenas de compostos (REZENDE, 2013). Foi levando em consideração estes fatores que grande parte da descoberta de novos fármacos tem sido direcionada para estudos *in vitro* (BUTCHER; BERG; KUNKEL, 2004). Contudo, pesquisas recentes têm buscado desenvolver métodos para estudos em grande escala utilizando modelos alternativos, como o peixe-zebra (KOKEL et al., 2012).

O uso de modelos animais com alta semelhança genética com a espécie humana em pesquisas biomédicas, toxicológicas, comportamentais, entre outras áreas é indispensável e de extrema importância. Entretanto, várias agências e organizações governamentais, em razão às questões éticas, passaram a restringir o uso de animais como roedores (OLSON et al., 2000). Sendo assim, além de facilitar

a realização de estudos em grande escala, o peixe-zebra é capaz de suprir essa demanda.

1.6 Peixe-zebra (*Danio rerio*)

O peixe-zebra, *Danio rerio* (Hamilton, 1822), é um peixe teleósteo de água doce que pertence à família *Cyprinidae*, nativo do sul e sudeste asiático, regiões que apresentam clima tropical (WESTERFIELD, 2000) (Figura 3). Caracteriza-se por ser um modelo animal que vem se destacando no ponto de vista científico em todas as suas fases de desenvolvimento, tanto usado para pesquisas sobre o potencial farmacológico de novas drogas (GOLDSMITH, 2004), como na toxicologia de contaminantes ambientais (SULUKAN et al., 2017), embriologia (PAARDEKOOPE OVERMAN; DEN HERTOOG, 2014), biologia do comportamento (COLWILL; CRETON, 2011), entre várias outras.

Figura 3 – Peixe-zebra adulto. Teleósteo, pertencente à família *Cyprinidae*, amplamente utilizado como modelo experimental alternativo em diversas áreas de pesquisa.



Fonte: <https://bit.ly/2RHa5ku>

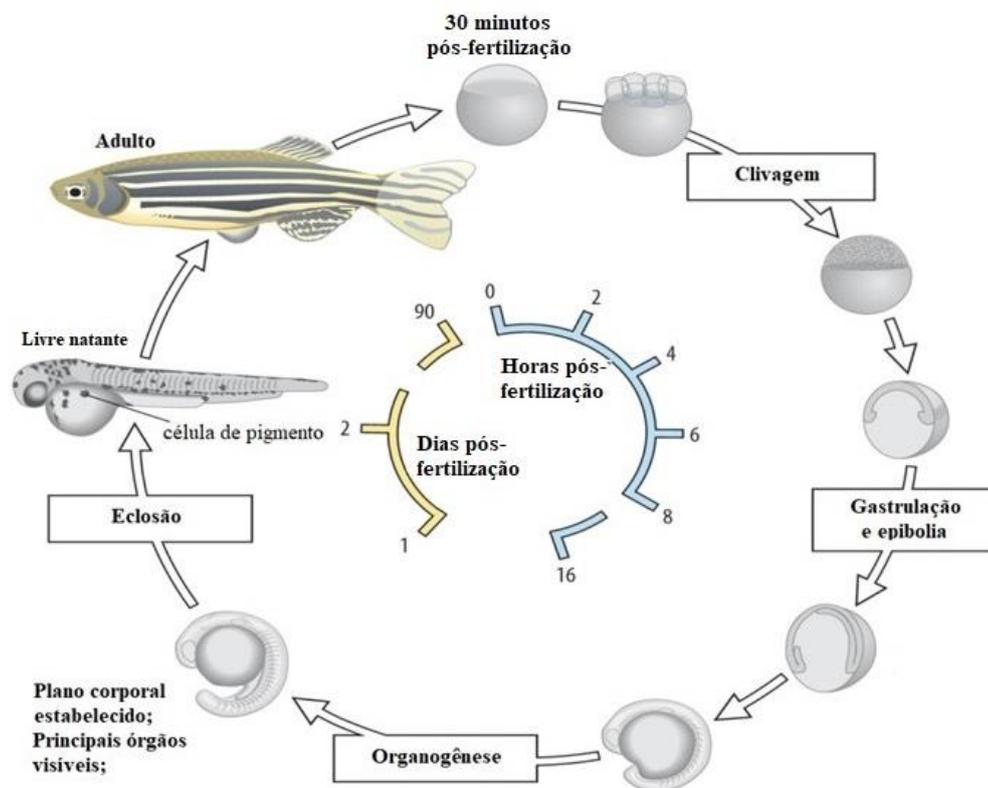
O uso do peixe-zebra como modelo experimental ganhou relevância na década de 80 quando George Streisinger buscava um animal vertebrado diploide para a aplicação de técnicas de genética molecular recém desenvolvidas (STREISINGER et al., 1981). Após alguns anos, o peixe-zebra se destacou como modelo experimental com o primeiro projeto em grande escala para a identificação de mutações em vertebrados (GRANATO; NÜSSLEIN-VOLHARD, 1996).

O peixe-zebra apresenta as vantagens de modelos invertebrados (e.g., *Drosophila melanogaster*), tais como alta taxa reprodutiva e tamanho pequeno, cerca de 3-4 centímetros quando adulto, facilidade de manejo e manutenção. Ao passo que, por ser vertebrado, possui maior afinidade com mamíferos que animais invertebrados, apresentando grande similaridade morfológica e genética (ABLAIN; ZON, 2013; CACHAT, 2013). Além dessas vantagens, o peixe-zebra possui desenvolvimento embrionário rápido e externo, os embriões são transparentes, tornando-o um modelo alternativo complementar excelente para os mais variados campos da pesquisa (LIESCHKE; CURRIE, 2007).

O estudo do genoma do peixe-zebra foi concluído em 2013 e demonstrou que 71% dos genes que codificam proteínas no genoma humano são relacionados a genes encontrados no genoma do peixe-zebra, sendo que 84% destes genes, conhecidos por serem associados a doenças humanas, possuem um gene relacionado também no peixe-zebra (HOWE et al., 2013).

O modelo tem se destacado em sua fase embrionária na descoberta de novas drogas por possuir a capacidade de se desenvolver de forma rápida (Figura 4). Os precursores de todos os órgãos já estão presentes 36 horas pós-fertilização (hpf). No quinto dia pós-fertilização (dpf), a maioria dos tecidos já se encontra desenvolvida e a larva já é capaz de apresentar características comportamentais independentes, como atividade locomotora vigorosa e comportamento predatório (KIMMEL et al., 1995). O fato de os embriões serem transparentes possibilitam a visualização do seu desenvolvimento desde as primeiras horas pós-fertilização, bem como diferentes *endpoints* como mortalidade, frequência cardíaca, formação de somitos, alterações morfológicas, taxa de eclosão, entre outras (DAI et al., 2014; HILL et al., 2005; IRONS et al., 2013; PEREIRA; CAMPOS; BOGO, 2016).

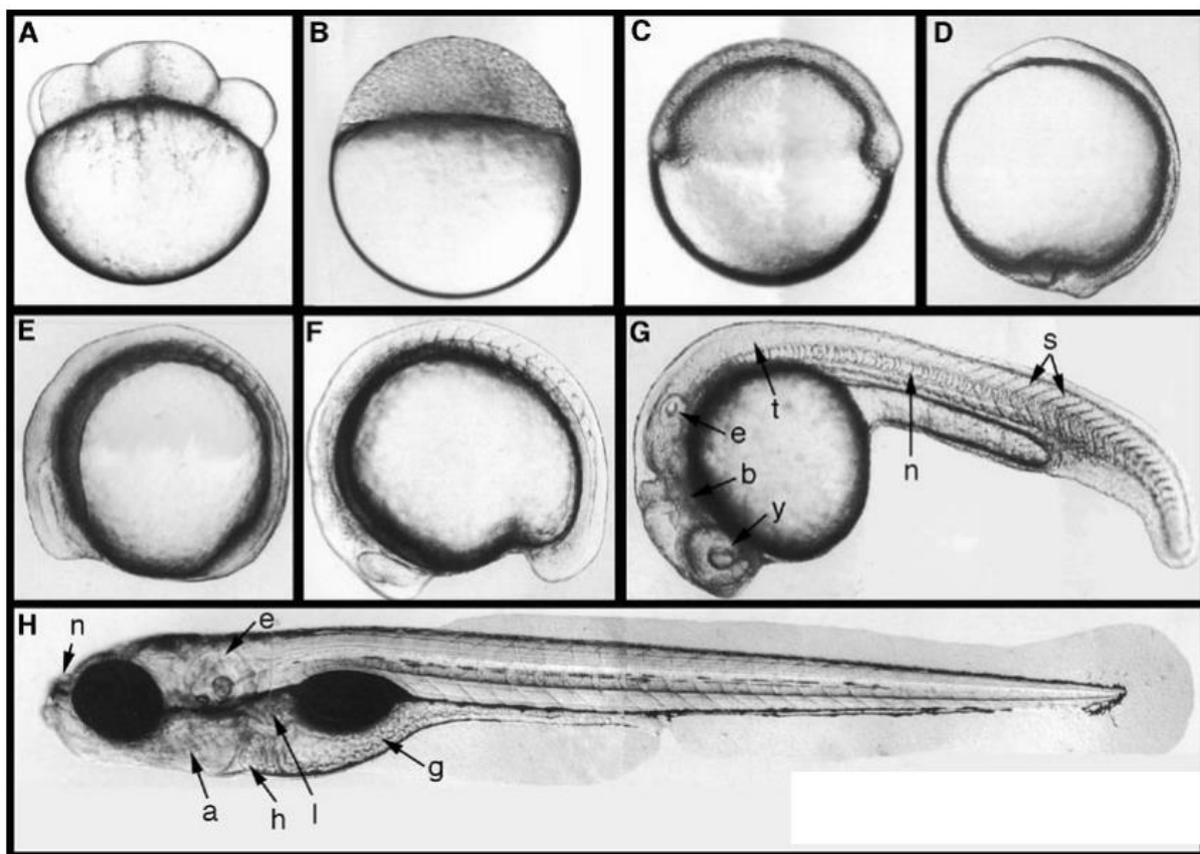
Figura 4 – Desenho esquemático das etapas do desenvolvimento do peixe-zebra.



Fonte: Adaptado de <https://bit.ly/2zOlaJe>

No estudo de fármacos, o peixe-zebra tem sido utilizado principalmente para estudos que objetivam o processo de “screening” e estudos pré-clínicos de toxicidade e segurança (KOKEL; PETERSON, 2008; HILL et al., 2005). Tais estudos farmacológicos geralmente preconizam o uso de larvas devido ao seu rápido desenvolvimento, apresentando a maioria dos órgãos que estão presentes na fase adulta (Figura 5). O uso da larva ainda é capaz de reduzir a quantidade de fármaco utilizado e a necessidade de grandes espaços físicos, uma vez que cada larva de peixe-zebra pode ser acondicionada em um volume de apenas 50 μL de solução (REZENDE, 2013). Além disso, no estágio larval a absorção das moléculas dissolvidas no meio é rápida. Até 14 dpf o oxigênio dissolvido na água é transportado, principalmente, através de difusão pelo tegumento e essa parece ser a rota usual de absorção de moléculas pequenas, já que as escamas desenvolvem posteriormente a este período (SCHWERTE, 2003; ROMBOUGH, 2002).

Figura 5 – Estágios do desenvolvimento embrionário de peixe-zebra. (A) 1,25 hpf. (B) 4 hpf. (C) 6 hpf. (D) 10 hpf. (E) 11,5 hpf. (F) 16 hpf. (G) Embrião com 24 hpf. Abreviações: b, encéfalo; e, ouvido; n, notocorda; s, somitos; t, tubo neural; y, olho. (H) Larva com 120 hpf. Abreviações: a, arcos branquiais; e, ouvido; g, intestino; h, coração; l, fígado; n, poço nasal.



Fonte: Ingham, 1997.

2 JUSTIFICATIVA

Tendo em vista o uso inadequado de antimicrobianos e o problema complexo de saúde pública que se tornou a resistência antimicrobiana, faz-se necessário o desenvolvimento de novos fármacos. A avaliação da segurança toxicológica e farmacológica é uma etapa crucial nos ensaios pré-clínicos de desenvolvimento de fármacos, sendo que análises de triagens em grande escala podem aumentar a compreensão sobre o mecanismo de ação, bem como acelerar o processo de descoberta e chegada dessas drogas ao consumidor. Sendo assim, o peixe-zebra possui grande potencial como ferramenta no estudo de caracterização da toxicidade de novos compostos antimicrobianos.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Avaliar a potencial toxicidade de novos compostos heterocíclicos, derivados de compostos indólicos e pirazólicos, em embriões de peixe-zebra (*Danio rerio*).

3.2 Objetivos Específicos

- Determinar as concentrações com potencial toxicológico sobre a sobrevivência;
- Avaliar os efeitos sobre o desenvolvimento embrionário através da avaliação da taxa de eclosão dos embriões;
- Observar potenciais efeitos toxicológicos dos compostos, em concentrações não letais, sobre o padrão comportamental das larvas de peixe-zebra.

4 METODOLOGIA

4.1 Manutenção de Peixes-zebra e Obtenção de Embriões

A criação e manutenção de peixes-zebra em biotério foi aprovada e regulamentada pelo CEUA – Unipampa (protocolo nº 003/2016). Indivíduos adultos de peixe-zebra (*Danio rerio*), linhagem selvagem, foram adquiridos de um fornecedor local, mantidos sob condições adequadas em sistema de recirculação Zebtec®, seguindo parâmetros considerados essenciais para uma boa qualidade de vida da espécie em biotério. Água filtrada através de filtros de osmose reversa, com pH 7,2, condutividade de 400 µS, temperatura 28 °C, com fotoperíodo de 14 horas claro e 10 horas escuro, alimentados com ração comercial flocada e alimento vivo (*Artemia salina* e/ou microvermes) quatro vezes ao dia, de acordo com protocolos previamente estabelecidos (WESTERFIELD, 2000). Os embriões de peixe-zebra utilizados foram obtidos por meio de reprodução dos espécimes adultos. Após reprodução e manutenção, os embriões foram mantidos em incubadora BOD a 28 °C até o momento da exposição e período posterior de experimento.

4.2 Curva Concentração-resposta

Os dois compostos candidatos a novos agentes antimicrobianos foram obtidos através de parceria com o Departamento de Produção de Matéria-Prima da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFGRS). Embriões com 3 hpf foram expostos, em placas ELISA (24 poços), às concentrações de 1, 8 e 32 µg/mL dos compostos para a determinação da curva concentração-resposta. A exposição foi realizada de maneira estática durante o período de 7 dias. Todos os agentes tiveram como veículo DMSO 0,005%, seguindo as concentrações seguras apresentadas por Chen e colaboradores (2011). Como grupo controle foram usados embriões expostos apenas a água do sistema Zebtec®, uma vez que a concentração do composto utilizado como veículo é inferior a 0,01%, valor este relatado na literatura como apropriado para estudos de toxicidade que objetivam a avaliação de *endpoints* como taxa de sobrevivência, eclosão, alterações morfológicas e análise comportamental (CHEN; WANG; WU, 2011). Os embriões foram mantidos em incubadora BOD, tendo parâmetros de temperatura e fotoperíodo supervisionados durante todo o período de exposição. Os compostos foram nomeados, de maneira

aleatória, como A1 e A2, devido ao interesse de patente por parte da universidade parceira UFGRS.

4.3 Taxa de Sobrevivência

A taxa de sobrevivência dos embriões foi avaliada diariamente durante o período de exposição sob microscópio estéreo Carl Zeiss Stemi 2000C. A viabilidade dos indivíduos foi analisada por observação da coagulação dos embriões e ausência de batimento cardíaco (OECD, 2006).

4.4 Taxa de Eclosão

A taxa de eclosão foi avaliada entre o período de 72 e 96 hpf e quantificada com base na porcentagem de indivíduos vivos, sendo expressa em porcentagem do controle (DAMMSKI et al., 2011).

4.5 Ensaio Comportamental Exploratório

O ensaio comportamental exploratório foi realizado ao final do período de exposição, sendo submetidas ao ensaio apenas as larvas expostas à concentração de 1 µg/mL dos compostos, as quais resistiram até o período final de exposição e não sofreram alterações morfológicas. O teste utilizado foi o teste de *Novel Tank* adaptado de Rosemberg e colaboradores (2011). Cada larva foi avaliada individualmente por 300 segundos. As análises comportamentais foram filmadas, através de uma lupa digital acoplada a um computador, e analisadas pelo software ANY-maze® (Stoelting CO, USA). O aparato foi dividido em duas regiões, área central e área periférica. Foram avaliados parâmetros motores como distância percorrida, ângulo de giro absoluto e imobilidade, bem como parâmetros não-motores que podem estar relacionadas a comportamentos de caráter ansioso, onde o animal tende a deixar a área periférica, procurando a área central do aparato.

4.6 Análise Estatística

Os dados foram submetidos aos testes de normalidade de D'Agostino & Pearson, Shapiro-Wilk e Kolmogorov Smirnov. Para análises de comparação entre grupos dos compostos usou-se o teste bidirecional (Two-way ANOVA) e *post hoc* de Tukey de múltiplas comparações. Os resultados foram expressos como média ± erro

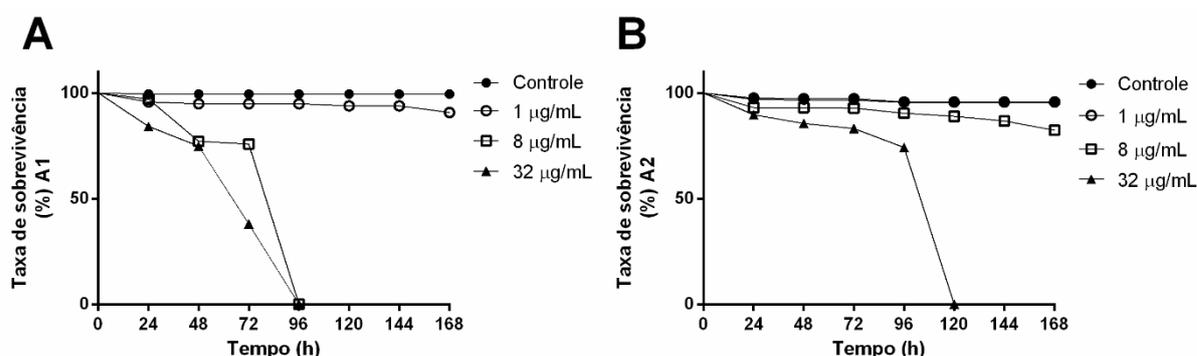
padrão (S.E.M.). Dados não paramétricos foram analisados através do teste de Mann-Whitney, expressos como mediana \pm intervalo interquartil e representados pela forma de *box plot*. Já os dados paramétricos foram submetidos ao teste *t*, expressos como média \pm erro padrão (S.E.M.) e representados na forma de barras. Considerou-se significativos os resultados em que $p \leq 0,05$. Todas as análises foram realizadas utilizando o software GraphPad Prism 6.0[®].

5 RESULTADOS

5.1 Exposição aos compostos A1 e A2 afetam a sobrevivência dos embriões de peixe-zebra

Ambos os compostos apresentaram diminuição significativa da taxa de sobrevivência ao longo do período de exposição nas concentrações de 8 e 32 $\mu\text{g/mL}$ (Figura 6). O composto A1 apresentou maior toxicidade sobre a sobrevivência em relação ao composto A2, sendo observada uma diminuição da taxa de sobrevivência a partir das primeiras 24 horas e total mortalidade após as 96 horas de exposição nas duas concentrações mais altas, em relação ao grupo controle (Figura 6A). Foi observada uma diminuição também na taxa de sobrevivência dos embriões expostos a concentração de 32 $\mu\text{g/mL}$ do composto A2, sendo constatada a mortalidade total dos indivíduos em 120 horas de exposição. A concentração de 8 $\mu\text{g/mL}$ do composto A2 causou uma diminuição significativa da mortalidade, quando comparada ao grupo controle, contudo não foi capaz de causar a mortalidade total no final do tempo de exposição (Figura 6B).

Figura 6 – Curva de sobrevivência das diferentes exposições estáticas realizadas no período de 7 dias (168h) dos compostos (A) A1, (B) A2, diluídos em DMSO (0,005%).



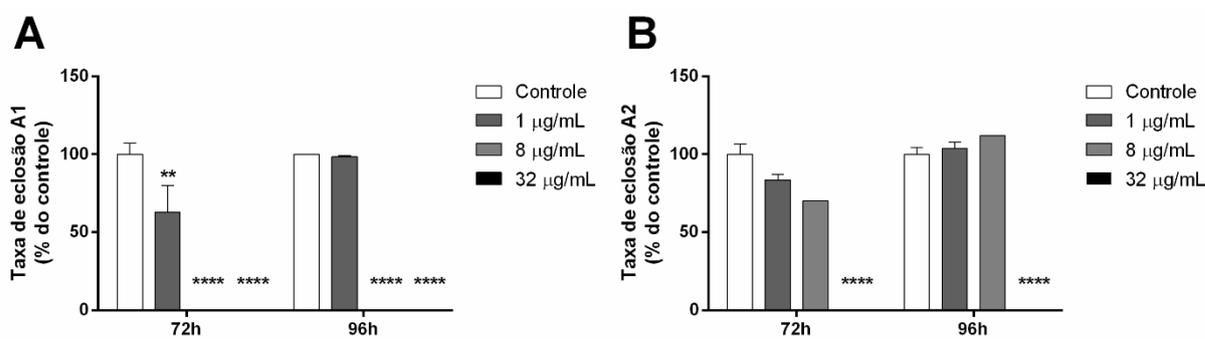
Fonte: O autor.

5.2 Exposição aos compostos A1 e A2 afetam a eclosão dos embriões de peixe-zebra

Ambos os compostos, na concentração de 32 $\mu\text{g/mL}$, impediram a eclosão dos embriões expostos, quando comparados ao grupo controle (Figura 7; Figura 7B). Do mesmo modo, os embriões expostos à concentração de 8 $\mu\text{g/mL}$ do composto A1 também apresentaram comprometimento da taxa de eclosão. O composto A1 foi

capaz de afetar o desenvolvimento dos embriões expostos a concentração de 1 $\mu\text{g/mL}$, uma vez que, no período de 72 horas, houve uma diminuição significativa no número de eclosões destes, quando comparado ao grupo controle. Porém, no período de 96 horas, foi possível observar a normalização da taxa de eclosão do grupo exposto a concentração de 1 $\mu\text{g/mL}$ do composto em relação ao controle (Figura 7A).

Figura 7 – Avaliação da taxa de eclosão dos embriões expostos, no período de 72 a 96 horas, quantificada com base na porcentagem de indivíduos vivos. Grupos foram submetidos ao teste estatístico Two-way ANOVA. Dados expressos como porcentagem do controle e média \pm SEM, sendo considerados significativos quando * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; **** $p < 0,0001$.

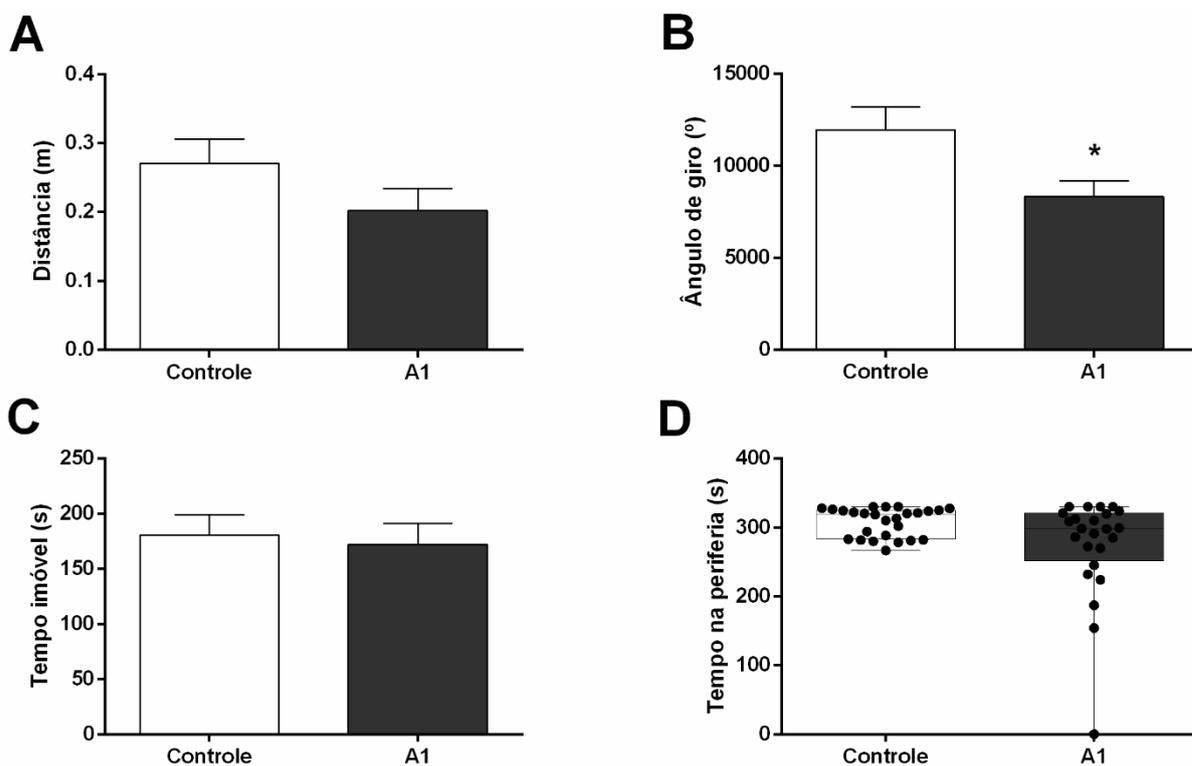


Fonte: O autor.

5.3 Exposição aos compostos A1 e A2 induzem alterações comportamentais

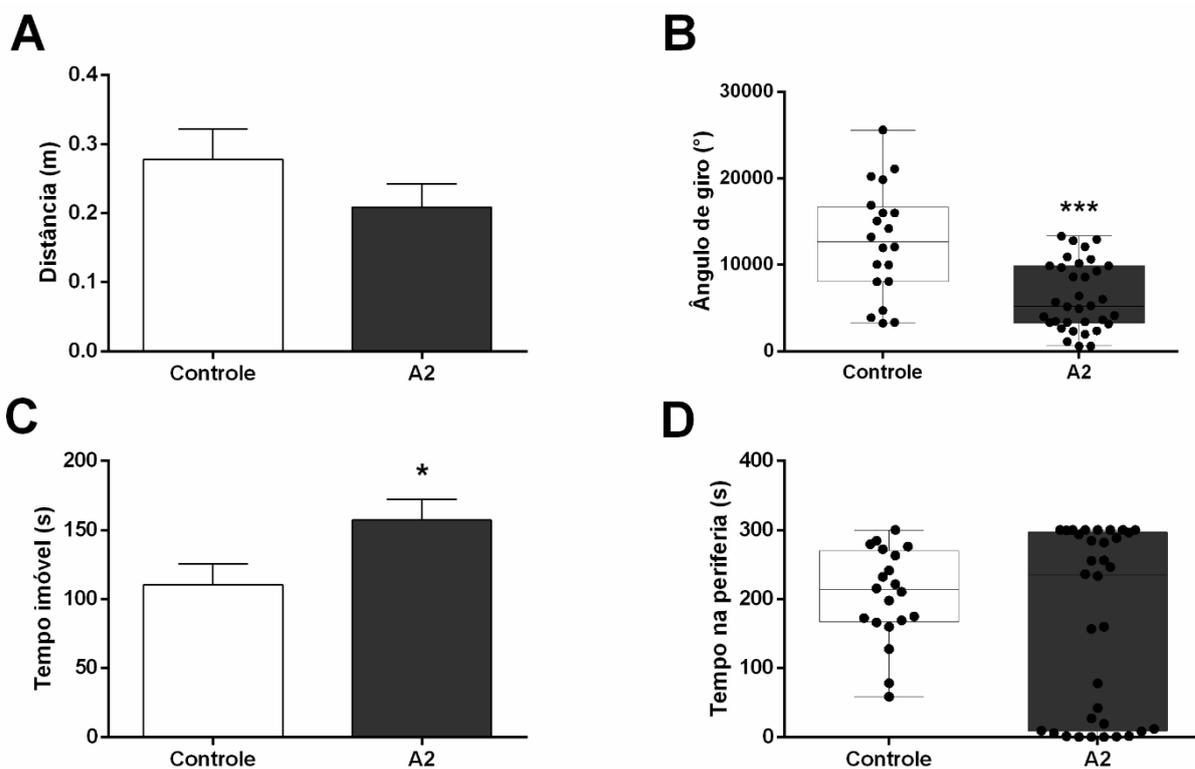
A exposição aos compostos A1 e A2 foi capaz de afetar, de maneira significativa, quando comparado ao grupo controle, apenas os parâmetros motores analisados por meio do ensaio comportamental exploratório (Figura 8 e 9, respectivamente). As larvas expostas ao composto A1 apresentaram uma diminuição do ângulo de giro absoluto, em comparação ao controle (Figura 8B). Já as larvas expostas ao composto A2, além de apresentarem o ângulo de giro diminuído, permaneceram imóveis por um período significativamente maior, quando comparadas ao grupo controle (Figura 9B e 9C, respectivamente).

Figura 8 – Ensaio comportamental exploratório das larvas expostas ao composto A1. Ao final do sétimo dia de exposição, as larvas expostas ao composto A1 foram submetidas ao teste comportamental exploratório *Novel Tank*. Foram analisados parâmetros motores, como distância percorrida (A), ângulo de giro absoluto (B) e imobilidade (C), e parâmetros não-motores, como tempo na periferia (D). Dados paramétricos foram submetidos ao teste *t* e os não-paramétricos ao teste Mann-Whitney test. Dados expressos como média \pm SEM, em A, B e C, e como mediana \pm intervalo interquartil em D. Resultados considerados significativos quando $*p < 0,05$; $****p < 0,0001$.



Fonte: O autor.

Figura 9 – Ensaio comportamental exploratório das larvas expostas ao composto A2. Ao final do sétimo dia de exposição, as larvas expostas ao composto A2 foram submetidas ao teste comportamental exploratório *Novel Tank*. Foram analisados parâmetros motores, como distância percorrida (A), ângulo de giro absoluto (B) e imobilidade (C), e parâmetros não-motores, como tempo na periferia (D). Dados paramétricos foram submetidos ao teste *t* e os não-paramétricos ao teste Mann-Whitney test. Dados expressos como média \pm SEM, em A e C, e como mediana \pm intervalo interquartil em B e D. Resultados considerados significativos quando $*p < 0,05$; $****p < 0,0001$.



Fonte: O autor.

6 DISCUSSÃO

Nenhum estudo referente aos efeitos tóxicos, em embriões de peixe-zebra, de compostos indólicos e pirazólicos com ação antimicrobiana foi realizado até hoje. Sendo assim não são encontrados dados de taxa de sobrevivência frente a exposição a estes tipos de compostos. Somos o primeiro trabalho a mostrar que derivados indólicos e pirazólicos, com atividade antimicrobiana, afetam a taxa de sobrevivência, eclosão e parâmetros motores comportamentais em embriões de peixe-zebra.

Observamos um significativo atraso e baixa taxa de eclosão nos embriões de peixe-zebra expostos aos derivados indólicos e pirazólicos. Alguns efeitos similares foram encontrados em estudos feitos com outras classes de fármacos. Xia e colaboradores (2017) encontraram um atraso significativo na eclosão de embriões de peixe-zebra expostos ao ibuprofeno e ao diclofenaco. David e Pancharatna (2009) observaram que a exposição ao ibuprofeno aumentava o tempo até a eclosão ou a não ocorrência da mesma em embriões de peixe-zebra. O atraso ou mesmo a não eclosão podem estar associados ao atraso no desenvolvimento do embrião ou ainda à incapacidade dos embriões em romperem o córion (DU et al., 2012).

O comportamento motor no desenvolvimento do embrião de peixe-zebra já foi bem caracterizado, sendo a resposta natatória determinada como um dos principais pontos para o estudo quantitativo do comportamento do modelo (SAINT-AMANT; DRAPEAU, 1998). Observamos em nosso estudo que parâmetros motores são significativamente afetados na exposição de embriões de peixe-zebra a derivados indólicos e pirazólicos, mesmo que em concentrações que não causaram alterações morfológicas óbvias ou diminuição na taxa de sobrevivência dos embriões.

O ângulo de giro absoluto é caracterizado pelo cálculo do movimento global do animal em relação a um ponto central, levando em consideração também a mudança de direção nos movimentos (ANICHTCHIK et al., 2004). Segundo Blazina e colaboradores (2013), o ângulo de giro absoluto é uma medida sensível de coordenação motora, podendo ser afetado em tratamentos com drogas em concentrações que não causam dano locomotor. Constatamos uma diminuição significativa no ângulo de giro das larvas expostas a concentração de 1 µg/mL. Segundo Soares e colaboradores (2017), alterações de ângulo de giro podem envolver alterações do sistema dopaminérgico. Em nosso estudo analisamos

também o parâmetro de distância percorrida, onde não observamos alteração significativa que indicasse dano no sistema locomotor do animal. Constatamos que larvas expostas a concentração de 1 µg/mL dos derivados indólicos e pirazólicos permaneceram imóveis por um período mais longo durante o ensaio. O comportamento imóvel, ou também chamado de *freezing*, caracteriza-se pelo cessamento completo dos movimentos do peixe enquanto permanece no fundo do aquário, podendo indicar alto nível de estresse ou ansiedade (OLIVEIRA; SILVA; SIMOES, 2011). Desse modo, nossos resultados corroboram para o fato de que mudanças comportamentais são sensíveis e servem como fonte de informações suplementares para o estudo toxicológico tradicional.

7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A farmacologia sempre fez uso de animais como meio de estudo de efeitos fisiológicos de medicamentos. No entanto, como consequência da pressão para desenvolver novos fármacos e pela introdução de ferramentas de biologia molecular, a abordagem farmacológica migrou do estudo de fármacos por meio de fenótipos para uma abordagem direcionada ao alvo, fazendo uso de sistemas *in vitro*. Entretanto, alguns estudos exigem um nível mais complexo, dependendo da complexidade do sistema *in vivo*, dificultando o desenvolvimento e o estudo de fármacos *in vitro*. Logo, recentemente, tem-se explorado o desenvolvimento de novas metodologias que combinem vantagens já conhecidas dos estudos *in vivo* com o potencial de realizar experimentos em larga escala. Desse modo, modelos animais alternativos como o peixe-zebra tem se destacado, uma vez que preenchem grande parte desses requisitos.

Em conclusão, mostramos no presente trabalho que o peixe-zebra se faz um excelente modelo alternativo para a avaliação da toxicidade de fármacos em desenvolvimento. Nossos resultados demonstram de forma rápida e satisfatória, fazendo uso de ferramentas sensíveis como a análise comportamental, os efeitos embriotóxicos de candidatos a novos fármacos. Desse modo, o peixe-zebra apresenta grande potencial para seu uso em “screenings” farmacêuticos de forma a acelerar a descoberta de novos fármacos.

REFERÊNCIAS

ABLAIN, J.; ZON, L.I. Of fish and men: using zebrafish to fight human diseases. **Trends in Cell Biology**, v. 23, n. 12, p. 584-586. 2013.

ANICHTCHIK, O.V.; KASLIN, J.; PEITSARO, N.; SCHEININ, M., PANULA P. Neurochemical and behavioral changes in zebrafish *Danio rerio* after systemic administration of 6-hydroxydopamine and 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine. **J Neurochem**, v. 88, p. 443–453. 2004.

BALBI, A.; ANZALDI, M.; MAZZEI, M.; MIELE, M.; BERTOLOTTI, M.; OTTONELLO, L.; DALLEGRI, F. Synthesis and biological evaluation of novel heterocyclic ionone-like derivatives as anti-inflammatory agents. **Bioorg Med Chem**, v.14, p. 5152–5160. 2006.

BAPTISTA, M.G.F.M. Mecanismos de resistência aos antibióticos. Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologia. Lisboa. 2013.

BLAIR, J.M.; WEBBER, M.A.; BAYLAY, A.J.; OGBOLU, D.O.; PIDDOCK, L.J. Molecular mechanisms of antibiotic resistance. **Nature reviews Microbiology**, v. 13, n.1, p.42-51. 2015.

BLAZINA, A.R.; VIANNA, M.R.; LARA, D.R. The spinning task: a new protocol to easily assess motor coordination and resistance in zebrafish. **Zebrafish**, v.10, p. 480–485. 2013.

BRASCA, M.G., ALBANESE, C., AMICI, R., BALLINARI, D., CORTI, L., CROCI, V., FANCELLI, D., FIORENTINI, F., NESI, M., ORISINI, P., ORZI, F., PASTORI, W., PERRONE, E., PRESENTI, E., PEVARELLO, P., RICCARDI-SIRTORI, F., ROLLERO, F., ROUSSEL, P., VARASI, M., VULPETTI, A., MERCURIO, C. 6-Substituted pyrrolo[3,4-c]pyrazoles: an improved class of CDK2 inhibitors. **ChemMedChem**, v.2, n.6, p. 841-852. 2007.

BUTCHER, E. C.; BERG, E. L.; KUNKEL, E. J. Systems biology in drug discovery. **Nature biotechnology**, v. 22, n. 10, p. 1253–9. 2004.

CACHAT, J.; KYZAR, E.J.; COLLINS, C.; GAIKWAD, S.; GREEN, J.; ROTH, A.; EL-OUNSI, M.; DAVIS, A.; PHAM, M.; LANDSMAN, S.; STEWART, A.M.; KALUEFF, A.V. Unique and potent effects of acute ibogaine on zebrafish: the developing utility of novel aquatic models for hallucinogenic drug research. **Behav Brain Res**, v. 236, n.1, p. 258-269. 2013.

CANO, A., ALCARAZ, O., ARNAO, M.B. Free radical-scavenging activity of indolic compounds in aqueous and ethanolic media. **Anal Bioanal Chem**, v. 376, p. 33-37. 2003.

CATTO, M., ALIANO, R., CAROTTI, A., CELLAMARE, S., PALLUOTTO, F., PURGATORIO, R., de STRADIS, A., CAMPAGNA, F. Design, synthesis and biological evaluation of indane-2-aryldiazenylmethylene-3-ones as β -amyloid aggregation inhibitors. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v.45, p.1359-1366. 2010.

CHAUHAN, S.; PALIWAL, S.; CHAUHAN, R. Anticancer activity of pyrazole via different biological mechanisms. **Synth. Commun.**, v.44, p. 1333–1374. 2014.

CHEN, T.; WANG, Y.; WU, Y. Developmental exposures to ethanol or dimethylsulfoxide at low concentrations alter locomotor activity in larval zebrafish: Implications for behavioral toxicity bioassays. **Aquatic Toxicology**, v. 102, p. 162-166. 2011.

CHIYANZU, I.; CLARKSON, C.; SMITH, P.J.; LEHMAN, J.; GUT, J.; ROSENTHAL, P.J.; CHIBALE, K. Design, synthesis and anti-plasmodial evaluation in vitro of new 4-aminoquinoline isatin derivatives. **Bioorgan. Med. Chem.**, v. 13, p. 3249-3261. 2005.

CHO, N.; KAMAURA, M.; YOGO, T.; IMOTO, H. Preparation of pyrazole derivatives as improvement of insulin resistance. **PCT Int Appl**. 2009.

COLWILL, R. M.; CRETON, R. Imaging escape and avoidance behavior in zebrafish larvae. **Reviews in the Neurosciences**, v. 22, n. 1. 2011.

COSTA, A.L.P; SILVA JUNIOR, A.C.S. Resistência bacteriana aos antibióticos e Saúde Pública: uma breve revisão de literatura. *Estação Científica (UNIFAP)*, v. 7, n. 2, p. 45-47. 2017.

CRAIG, W.A. Antibacterial Therapy. In: *Cecil Textbook of Medicine*. **Saunders: Copyright**, p. 1853-926. 2004.

DAI, Y.J.; JIA, Y.F.; CHEN, N.; BIAN, W.P.; LI, Q.K.; MA, Y.B.; CHEN, Y.L.; PEI, D.S. Zebrafish as a model system to study toxicology. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 33, n. 1, p. 11–17. 2014.

DAMMSKI, A. P.; MULLER, B.R.; GAYA, C.; REGONATO, D. Zebrafish: Manual de criação em biotério. Curitiba, UFPR, p. 19. 2011.

DAVID, A.; PANCHARATNA, K. Developmental anomalies induced by a non-selective COX inhibitor (ibuprofen) in zebrafish (*Danio rerio*). **Environ. Toxicol. Pharmacol**, v. 27, n.3, p. 390-395. 2009.

DU, M.; ZHANG, D.; YAN, C.; ZHANG, X. Developmental toxicity evaluation of three hexabromocyclododecane diastereoisomers on zebrafish embryos. **Aquatic Toxicology**, v. 112-113, p. 1-10. 2012.

DUGI, K.; MARK, M.; HIMMELSBACH, F. Pharmaceutical composition comprising a pyrazole-O-glucoside derivative for treating diabetes. **PCT Int Appl**. 2009.

EL-MILIGY, M.M.M.; ABD EL RAZIK, H.A.; ABU-SERIE, M.M. Synthesis of piperazine-based thiazolidinones as anticancer tyrosine kinase inhibitors inducing apoptosis. **Future Med. Chem.**, v.9, p. 1709–1729. 2017.

ELGUERO, J.; GOYA, P.; JAGEROVIC, N.; SILVA, A.M.S. Pyrazoles as drugs: facts and fantasies. **Royal Society of Chemistry**, p. 52–98. 2002.

FAQI, A. S. A comprehensive guide to toxicology in preclinical drug development. **Elsevier**, p. 1. 2013.

FUCHS, P.C.; BARRY, A.L.; BROWN, S.D. In vitro activity of ertapenem (MK-0826) against clinical bacterial isolates from North American Medical Centers. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.45, p. 1915-1918. 2001.

GOLDSMITH, P. Zebrafish as a pharmacological tool: the how, why and when. **Current Opinion in Pharmacology**, v. 4, n. 5, p. 504–512. 2004.

GRANATO, M.; NÜSSLEIN-VOLHARD, C. Fishing for genes controlling development. **Current opinion in genetics & development**, v. 6, n. 4, p. 461-468. 1996.

HILL, A. J.; TERAOKA, H.; HEIDEMAN, W.; PETERSON, R.E. Zebrafish as a model vertebrate for investigating chemical toxicity. **Toxicological Sciences**, v. 86, n. 1, p. 6–19, jul. 2005.

HAWASH, M.M.A; KAHRAMAN, D.C.; EREN, F.; ATALAY, R.C.; BAYATAS, S.N. Synthesis and biological evaluation of novel pyrazolic chalcone derivatives as novel hepatocellular carcinoma therapeutics. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 129, p. 12-26. 2017.

HOWE, K.; CLARK, M.D.; TORROJA, C.F.; TORRANCE, J.; BERTHELOT, C.; MUFFATO, M. The zebrafish reference genome sequence and its relationship to the human genome. **Nature**. v. 496, n.7446, p. 498-503. 2013.

IRONS, T. D.; KELLY, P.E.; HUNTER, D.L; MACPHALI, R.C.; PADILLA, S. Acute administration of dopaminergic drugs has differential effects on locomotion in larval zebrafish. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 103, n. 4, p. 792–813. 2013.

INGHAM, P.W. Zebrafish Genetics and Its Implications for Understanding Vertebrate Development. **Human Molecular Genetics**, v. 6, n.10, p.1755-1760. 1997.

KATCHAMART, S., WILLIAMS, D.E. Indole-3-carbinol modulation of hepatic monooxygenases CYP1A1, CYP1A2 and FMO 1 in guinea pig, mouse and rabbit. **Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol**, v. 129, n.4, p. 377-384. 2001.

KIM, H.S.; KIM, Y.; DODDAREDDY, M.R.; SEO, S.H.; RHIM, H.; TAE, J.; PAE, A.N.; CHOO, H.; CHO, Y.S. Design, synthesis, and biological evaluation of 1,3-dioxoisindoline-5-carboxamide derivatives as T-type calcium channel blockers. **Bioorg. Med. Chem. Lett.**, v.17, p. 476-481. 2007.

KIMMEL, C. B.; BALLARD, W.W.; KIMMEL, S.R.; ULLMANN, B.; SCHILLING, T.F. Stages of embryonic development of the zebrafish. **Developmental dynamics**, v. 203, n. 3, p. 253–310. 1995.

KOKEL, D.; PETERSON, R. T. Chemobehavioural phenomics and behaviourbased psychiatric drug discovery in the zebrafish. **Briefings in functional genomics & proteomics**, v. 7, n. 6, p. 483–90. 2008.

KOKEL, D.; RENNEKAMP, A.J.; SHAH, A.H.; LIEBEL, U.; PETERSON, R.T. Behavioral barcoding in the cloud: embracing data-intensive digital phenotyping in neuropharmacology. **Trends in biotechnology**, v. 30, n. 8, p. 421–5. 2012.

KUMAR, H.; SAINI D.; JAIN, S.; JAIN, N. Pyrazole scaffold: a remarkable tool in the development of anticancer agents. **Eur. J. Med. Chem.**, v. 70, p. 248–258. 2013.

KUMAR, V.; KAUR, K.; GUPTA, G.K.; SHARMA, A.K. Pyrazole containing natural products: synthetic preview and biological significance. **Eur. J. Med. Chem.**, v. 69, p. 735–753. 2013.

KÜÇÜKGÜZEL, S.G.; SENKARDES, S. Recent advances in bioactive pyrazoles. **Eur. J. Med. Chem.**, v. 97, p. 786–815. 2015.

LAMOTTE, Y.; MARTRES, P.; FAUCHER, N.; LAROZE, A.; GRILLOT, D.; ANCELLIN, N.; SAINTILLAN, Y.; BENETON, V.; GAMPE, R.T. Synthesis and biological activities of novel indole derivatives as potent and selective PPAR γ modulators. **Bioorg. Med. Chem. Lett.**, v.20, p. 1399-1404. 2010.

LIESCHKE, G. J.; CURRIE, P. D. Animal models of human disease: zebrafish swim into view. **Nature reviews (Genetics)**, v. 8, n. 5, p. 353–67. 2007.

LIEW, S.Y., LOOI, C.Y., PAYDAR, M., CHEAH, F.K., LEONG, K.H., WONG, W.F., MUSTAFA, M.R., LITAUDON, M., AWANG, K. Subditine, a New Monoterpenoid Indole Alkaloid from Bark of *Nauclea subdita* (Korth.) Steud. Induces Apoptosis in Human Prostate Cancer Cells. **PLoS ONE**, v.9, n.2, p.872-886. 2014.

MCCAIG, L.F.; HUGHES, J.M. Trends in antimicrobial drug prescribing among office-based physicians in the United States. **JAMA**, v.273, p.214-219.1995.

MEHNDIRATTA, S., PAN, S.L., KUMAR, S., LIOU, J.P. Indole-3-ethylsulfamoylphenylacrylamides with Potent Anti-proliferative and Anti-angiogenic Activities. **Anticancer Agents Med Chem**, v. 16, n. 7, p. 907-913. 2016.

MOMOSE, Y.; MAEKAWA, T.; ODAKA, H.; KIMURA, H. Preparation of pyrazolyl- and pyrrolylalkanoic acid derivatives with hypoglycemic and hypolipidemic activity. **PCT Int Appl**. 2001.

NITULESCU, G.M.; DRAGHICI, C.; OLARU, O.T.; MATEI, L.; DRAGU, L.D.; BLEOTU, C. Synthesis and apoptotic activity of new pyrazole derivatives in cancer cell lines. **Bioorg. Med. Chem.**, v. 23, p. 5799–5808. 2015.

OECD. Current Approaches in the Statistical Analysis of Ecotoxicity Data: A Guidance to application. Series on Testing and Assessment, n. 54. 2006.

OLIVEIRA, R.F.; SILVA, J.F.; SIMOES, J.M. Fighting zebrafish: Characterization of aggressive behavior and winner-loser effects. **Zebrafish**, v. 8, p. 73–81. 2011.

OLSON, H.; BETTON, G.; ROBINSON, D.; THOMAS, K.; MONRO, A.; KOLAJA, G.; LILLY, P.; SANDERS, J.; SIPES, G.; BRACKEN, W.; DORATO, M.; VAN DEUN, K.; SMITH, P.; BERGER, B.; HELLER, A. Concordance of the toxicity of pharmaceuticals in humans and in animals. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, v. 32, n. 1, p. 56–67. 2000.

PAARDEKOOPE OVERMAN, J.; DEN HERTOOG, J. Zebrafish as a model to study PTPs during development. **Methods**, v. 65, n. 2, p. 247–253. 2014.

PEREIRA, T. C. B.; CAMPOS, M. M.; BOGO, M. R. Copper toxicology, oxidative stress and inflammation using zebrafish as experimental model. **Journal of Applied Toxicology**, v. 36, n. 7, p. 876–885. 2016.

PEVARELLO, P., FANCELLI, D., VULPETTI, A., AMICI, R., VILLA, M., PITTALÀ, V., VIANELLO, P., CAMERON, A., CIOMEI, M., MERCURIO, C., BISCHOFF, J.R., ROLETTA, F., VARASI, M., BRASCA, M.G. 3-Amino-1,4,5,6-tetrahydropyrrolo[3,4-c]pyrazoles: a new class of CDK2 inhibitors. **Bioorg Med Chem Lett**, v.16, n.4, p. 1084-1090. 2006.

RADWAN, M.A.A.; RAGAB, E.A.; SABRY, N.M.; EL-SHENAWY, S.M. Synthesis and biological evaluation of new 3-substituted indole derivatives as potential anti-inflammatory and analgesic agents. **Bioorg. Med. Chem.**, v.15, p. 3832-3841. 2007.

RIDA, S.M., SAUDO, M.N.S., YOUSSEF, A.M., HALIM, M.A. Synthesis and biological evaluation of the pyrazole class of cyclooxygenase-2-inhibitors. **Letters in Organic Chemistry**, v.6, p. 282-288. 2009.

REGAN, J., BREITFELDER, S., CIRILLO, P., GILMORE, T., GRAHAM, A.G., HICKEY, E., KLAUS, B., MADWED, J., MORIAK, M., MOSS, N., PARGELLIS, C., PAV, S., PROTO, A., SWINAMER, A., TONG, L., TORCELLINI, C. Pyrazole urea-based inhibitors of p38 MAP kinase: from lead compound to clinical candidate. **J Med Chem**, v.45, n. 14, p. 2994-3008. 2002.

REZENDE, V.B. Desenvolvimento de modelos animais alternativos para avaliação dos efeitos comportamentais e metabólicos de antipsicóticos. Belo Horizonte: UFMG, p. 47. 2013.

ROMBOUGH, P. Gills are needed for ionoregulation before they are needed for O₂ uptake in developing zebrafish, *Danio rerio*. **The Journal of experimental biology**, v. 205, p. 1787–94. 2002.

ROSEMBERG, D.B.; RICO, E.P.; MUSSULINI, B.H.M.; PIATO, Â.L.; CALCAGNOTTO, M.E.; BONAN, C.D.; DIAS, R.D.; BLASER, R.E.; SOUZA, D.O.; DE OLIVEIRA, D.L. Differences in spatio-temporal behavior of zebrafish in the open tank paradigm after a short-period confinement into dark and bright environments. **PLoS ONE**, v. 6, n. 5. 2011.

SAINT-AMANT, L.; DRAPEAU, P. Time course of the development of motor behaviors in 591 the zebrafish embryo. **J. Neurobiol**, v.37, n.4, p. 622-632.1998.
SINGH, G., KAPOOR, I.P.S., SING, P., de HELUANI, C.S., de LAMASONA, M.P., CATALAN, C.A.N. Chemistry, antioxidant and antimicrobial investigations on essential oil and oleoresins of *Zingiber officinale*. **Food Chem Toxicol**, v.46, p. 3295-3302. 2008.

SCHWERTE, T. Non-invasive imaging of blood cell concentration and blood distribution in zebrafish *Danio rerio* incubated in hypoxic conditions in vivo. **Journal of Experimental Biology**, v. 206, n. 8, p. 1299–1307. 2003.

SCRIBNER, A.; MOORE, J.A.; OUVRY, G.; FISHER, M.; WYVRATT, M.; LEAVITT, P.; LIBERATOR, P.; GURNETT, A.; BROWN, C.; MATHEW, J.; THOMPSON, D.; SCHMATZ, D.; BIFTU, T. Synthesis and biological activity of anticoccidial agents: 2,3-diarylindoles. **Bioorg. Med. Chem. Lett.**, v.19, p. 1517-1521. 2009.

SOARES, J.; PEREIRA, T.; COSTA, K.M.; MARASCHIN, T.; BOGO, M.R. Developmental neurotoxic effects of graphene oxide exposure in zebrafish larvae (*Danio rerio*). **Colloids Surf B Biointerfaces**, v. 157, p. 335-346. 2017.

SOLOMON, V.R.; HU, C.; LEE, H. Design and synthesis of anti-breast cancer agents from 4-piperazinylquinoline: a hybrid pharmacophore approach. **Bioorgan. Med. Chem.**, v.18, p.1563-1572. 2010.

STREISINGER, G.; WALKER, C.; DOWER, N.; KNAUBER, D.; SINGER, F. Production of clones of homozygous diploid zebra fish (*Brachydanio rerio*). **Nature**, v. 291, n. 5813, p. 293–296. 1981.

SUNDBERG, R.J. Chemical of Indoles, **Academic Press**, New York. 1996.

SULUKAN, E. KÖKTÜRK, M.; CEYLAN, H.; BEYDEMİR, S.; ISIK, M.; ATAMANALP, M.; CEYHUN, S.B. An approach to clarify the effect mechanism of glyphosate on body malformations during embryonic development of zebrafish (*Danio rerio*). **Chemosphere**, v. 180, p. 77–85. 2017.

SZABO, G.; FISCHER, J.; KIS-VARGA, A.; GYIRES, K. New celecoxib derivatives as anti-inflammatory agents. **J Med Chem**, v. 51, p. 142–147. 2008.

TANITAME, A.; OYAMADA, Y.; OFUJI, K.; FUJIMOTO, M.; SUZUKI, K.; UEDA, T.; TERAUCHI, H. Synthesis and antibacterial activity of novel and potent DNA gyrase inhibitors with azole ring. **Bioorg Med Chem**, v.12, p. 5515–5524. 2004.

TANITAME, A.; OYAMADA, Y.; OFUJI, K.; TERAUCHI, H.; KAWASAKI, M.; WACHI, M.; YAMAGISHI, J. Synthesis and antibacterial activity of a novel series of DNA gyrase inhibitors: 5-[(E)-2-arylvinyl]pyrazoles. **Bioorg Med Chem Lett**, v. 15, p. 4299–4303. 2005.

VELANKAR, A.D.; QUINTINI, G.; PRABHU, A.; WEBER, A.; HUNAEUS, G.; VOLAND, B.; WUEST, M.; ORJEDA, C.; HAREL, D.; VARGHESE, S.; GORE, V.; PATIL, M.; GAYKE, D.; HERDEMANN, M.; HEIT, I.; ZALIANI, A. Synthesis and biological evaluation of novel (4 or 5-aryl)pyrazolyl-indoles as inhibitors of interleukin-2 inducible T-cell kinase (ITK). **Bioorgan. Med. Chem.**, v.18, p. 4547-4559. 2010.

VIALE, M.; ANZALDI, M.; AIELLO, C.; FENOGLIO, C.; ALBICINI, F.; EMIONITE, L.; GANGEMI, R.; BALBI, A. Evaluation of the anti-proliferative activity of three new pyrazole compounds in sensitive and resistant tumor cell lines. **Pharmacological Reports**, v. 65, p. 717-723. 2013.

WANNMACHER, L. Uso indiscriminado de antibióticos e resistência microbiana: Uma guerra perdida? Uso racional de medicamentos: temas selecionados, v. 1, n. 4. Brasília. 2004.

WESTERFIELD, M. The zebrafish book: a guide for the laboratory use of zebrafish (*Danio rerio*). 2000.

XI, L.; ZHENG, L.; ZHOU, J.L. Effects of ibuprofen, diclofenac and paracetamol on hatch and motor behavior developing zebrafish (*Danio rerio*). **Chemosphere**. 2017.

XIA, L., ZHENG, L., ZHOU, J.L. Effects of ibuprofen, diclofenac and paracetamol on hatch and motor behavior in developing zebrafish (*Danio rerio*). **Chemosphere**, v.182, p.416-425. 2017.

