



Modelo de zebrafish (*Danio rerio*) para intoxicação fetal por deltametrina

Zebrafish (*Danio rerio*) model for fetal intoxication by deltamethrin

Modelo de pez cebrá (*Danio rerio*) para intoxicación fetal por deltametrina

Jadson Freitas da Silva¹, Paula Raíza Alves Cavalcante¹, Renatta Priscilla Ferreira Silva², Andressa Raphaely de Lima Silva¹, Sergio Clementino da Costa¹, Matheus Victor Viana de Melo¹, Renata Meireles Oliveira Padilha¹, Samara da Silva Gomes¹, Amanda Rodrigues dos Santos Magnabosco¹, Pabyton Gonçalves Cadena¹⁻².

RESUMO

Objetivo: Propor o zebrafish (*Danio rerio*) como um modelo animal de intoxicação fetal pela exposição a deltametrina (DM) avaliando a concentração e tempo, considerando que as primeiras 24 h deste modelo equivalem ao primeiro trimestre de desenvolvimento fetal humano. **Métodos:** Embriões foram expostos as concentrações 100 - 1000 µg/L (DM). Foram realizados três experimentos onde a epibolia foi avaliada a 8 h e os efeitos teratogênicos e mortalidade foram avaliados após 22 e 46 h de exposição. **Resultados:** Foi observado atraso na epibolia (61,41, 55,05 e 50,87%) nos grupos expostos a DM de forma dose dependente. A exposição a DM por 22 h foi suficiente para induzir efeitos teratogênicos nos embriões como edemas de pericárdio e saco vitelino e deformação de coluna e cauda. Já a exposição por 46 h também induziu os efeitos relatados acima, porem ocasionou maior mortalidade dos animais. A exposição a 1000 µg/L ocasionou a mortalidade de 100% dos animais. **Conclusão:** Concluímos que a concentração de 500 µg/L e 22 h de exposição produziu alterações na epibolia e efeitos teratogênicos que podem ser avaliados durante o desenvolvimento embrionário e se mostrou a melhor para ser usada em estudos futuros em pesquisa de saúde.

Palavras-chave: Embriotoxicidade, Peixe, Modelo Animal, Epibolia, Efeito teratogênico.

ABSTRACT

Objective: To propose the zebrafish (*Danio rerio*) as an animal model of fetal intoxication by exposure to deltamethrin (DM) evaluating concentration and time, assuming that the first 24 h of this model is equivalent to the first trimester of human fetal development. **Methods:** Embryos were exposed to concentrations of 100 - 1000 µg/L (DM). Three experiments were carried out where percent epiboly was evaluated at 8 h and teratogenic effects and mortality were evaluated after 22 and 46 h of exposure. **Results:** A delay in epiboly (61.41, 55.05, and 50.87%) was observed in groups exposed to DM in a dose-dependent manner. Exposure to DM for 22 h was sufficient to induce teratogenic effects in embryos such as pericardial and yolk sac edema

¹ Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE), Recife - PE.

² Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), Recife - PE.

and spine and tail deformations. Exposure for 46 h also induced the effects reported above but caused a higher mortality rate. Exposure to 1000 µg/L caused 100% mortality of the animals. **Conclusion:** We conclude that the concentration of 500 µg/L and 22 h of exposure produced alterations in percent epiboly and teratogenic effects that can be evaluated during embryonic development and proved to be the best to be used in future studies in health research.

Keywords: Embryotoxicity, Fish, Animal model, Epiboly, Teratogenic effect.

RESUMEN

Objetivo: Proponer al pez cebra (*Danio rerio*) como modelo animal de intoxicación fetal por exposición a deltametrina (DM) evaluando la concentración y el tiempo, considerando que las primeras 24 h de este modelo equivalen al primer trimestre del desarrollo fetal humano. **Métodos:** Los embriones fueron expuestos a 100 - 1000 µg/L (DM). Se realizaron tres experimentos donde se evaluó la epibolia a las 8 h y los efectos teratogénicos y la mortalidad a las 22 y 46 h de exposición. **Resultados:** Se observó un retraso en el epibolismo (61,41, 55,05 y 50,87%) en los grupos expuestos a DM de forma dosis-dependiente. La exposición a DM durante 22 h fue suficiente para inducir efectos teratogénicos en embriones como edema pericárdico y del saco vitelino y deformación de la columna y la cola. La exposición durante 46 h también indujo los efectos informados anteriormente, pero causó una mayor mortalidad animal. La exposición a 1000 µg/L provocó la mortalidad del 100% de los animales. **Conclusión:** Concluimos que la concentración de 500 µg/L y 22 h de exposición produjo cambios en la epibolia y efectos teratogénicos que pueden ser evaluados durante el desarrollo embrionario y resultó ser el mejor para ser utilizado en futuros estudios en investigación en salud.

Palabras clave: Embriotoxicidad, Peces, Modelo animal, Epibolia, Efecto teratogénico.

INTRODUÇÃO

A exposição humana a inseticidas é considerada um fator de risco para a saúde da gestante e do feto, e os efeitos decorrentes vem sendo estudados com o passar dos anos. Devido às características físico-químicas destes inseticidas, estes podem ser absorvidos pela gestante por via dérmica, oral ou inalatória (FERNÁNDEZ-CRUZ T, et al., 2020) o que pode afetar diretamente o feto.

Devido a placenta ser um órgão fundamental para nutrição e fornecimento de oxigênio ao feto pelo sistema circulatório, a transferência transplacentária pode ser considerada uma via de risco para a exposição aos inseticidas (FERNÁNDEZ-CRUZ T, et al., 2020).

Como exemplo, foi relatado em estudo anterior a presença do inseticida piretróide deltametrina (DM) no sangue de agricultores, pois estes muitas vezes não têm acesso aos procedimentos para uso de inseticidas ou acesso a equipamentos de proteção individual (AFATA TN et al., 2021). Devido a característica lipofílica da DM, pode também ser absorvida pela placenta (LUO H, et al., 2019).

Outros estudos também encontraram DM no mecônio de bebês (FERNÁNDEZ-CRUZ T, et al., 2020) leite materno (PALMA DCA, et al., 2014) e urina de gestantes (FERNÁNDEZ SF, et al., 2020). O período embrionário é crítico para o desenvolvimento de órgãos vitais, por isso qualquer distúrbio nesta fase pode ser um fator de risco para o embrião, causando modificações fenotípicas e trazendo problemas futuros para a vida (RANJANI TS, et al 2020).

Durante muito tempo, inseticidas como a DM foram considerados seguros, mas recentemente seu uso tem sido relacionado ao surgimento de doenças em humanos (PETROVICI A, et al., 2022) como câncer, asma e diabetes, doença de Parkinson e Alzheimer (SABARWAL A, et al., 2018; KIM KH, et al., 2017).

Outro estudo observou prejuízos no desenvolvimento embrionário em ratos expostos a DM, como um modelo de intoxicação fetal, ocasionando mortalidade e alterações eletrofisiológicas nos cardiomiócitos (LUO H, et al., 2019). Efeitos subletais como redução da frequência cardíaca, alterações na morfologia do coração

e deformação de coluna também foram observados em modelo de embriões de *zebrafish* (*Danio rerio*) quando expostos a DM (LI M, et al., 2019).

Estudos *in vitro* podem ser utilizados como testes rápidos para a avaliação da toxicidade de pesticidas, mas eles ainda não podem substituir os modelos animais (KIRLA KT, et al., 2021). Pois, estudos complexos de toxicidade do desenvolvimento como a intoxicação fetal ainda necessitam dos ditos modelos e grupos taxonômicos mais simples que mamíferos podem ser usados para responder estas perguntas. Por isso, propomos o *zebrafish* como um modelo para estudo intoxicação fetal a inseticidas.

Mesmo o *zebrafish* sendo um animal de vida aquática, tem a sua fisiologia bem conservada, com a maioria de seus órgãos exercendo as mesmas funções observadas nos mamíferos. Isto o torna comparável aos humanos em seu metabolismo e fisiologia, principalmente durante os primeiros dias de vida (MACRAE CA e PETERSON RT, 2015).

O *zebrafish* possui fecundação externa e ovos opticamente transparentes sendo possível visualizar o embrião de forma não invasiva (CADENA PG, et al., 2020a; SARASAMMA S, et al., 2017, FERNANDES Y, et al., 2015).

Ainda, após 24 horas pós-fertilização, o que representa no *zebrafish* o fim da segmentação e início do estágio embrionário de farínghula, isto é correspondente a aproximadamente o fim do primeiro trimestre do desenvolvimento fetal humano (FERNANDES Y, et al., 2015).

Isto é diferencial comparado aos modelos murinos, pois a utilização de murinos para estudos no período pré-natal pode trazer danos a mãe. Luo H, et al. (2019) observou o aumento da taxa de mortalidade de camundongos grávidas, quando recebiam DM por gavagem e a administração intranasal do piretróide cipermetrina em camundongos fêmeas grávidas produziu aumento no sofrimento materno no início do período pós-natal (LAUGERAY A, et al., 2017).

Diante dessas dificuldades o nosso modelo de intoxicação fetal pode apresentar vantagens aos modelos murinos, pois a administração dos compostos aos embriões de *zebrafish* é feita por imersão evitando assim processos invasivos, além de não submeter as mães a condições de estresse para estudo do desenvolvimento embrionário. Isto também é bioeticamente aceitável, pois se torna um excelente modelo para se avaliar a intoxicação fetal. Ainda, o *zebrafish* compartilha com os humanos uma vasta semelhança genômica, com cerca de 82% de genes ortólogos relacionados a doenças (HOWE K, et al. 2013).

Finalmente, atende a um dos principais objetivos da pesquisa científica, o princípio dos 3Rs (reduzir, refinar e substituir) onde evidenciamos a substituição de mamíferos na pesquisa científica reduzindo o nível de complexidade do grupo taxonômico e refinamento da experimentação garantindo o bem-estar animal (CANEDO A, et al., 2022).

Diante do exposto, utilizamos o *zebrafish* com o objetivo de desenvolver um modelo de intoxicação fetal a DM já que esta é encontrada em gestantes humanas. A fim de avaliar os possíveis efeitos tóxicos causados pela exposição a DM durante o desenvolvimento inicial, desde a fase de gastrulação até a fase larval, avaliamos a epibolia e o desenvolvimento embrionário e larval tentando encontrar o melhor tempo de exposição e concentração de DM para uso em nosso modelo.

MÉTODOS

Os experimentos foram realizados no Laboratório de Ecofisiologia e Comportamento Animal (LECA) da Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE), biotério cadastrado na plataforma do Conselho Nacional de Experimentação Animal (CIUCA-CONCEA). Os protocolos utilizados foram previamente aprovados pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UFRPE, protocolo número 6861290622.

Os animais adultos (1 ano de idade) de *zebrafish* (*Danio rerio*) utilizados na pesquisa, de linhagem selvagem do plantel do Biotério do LECA foram mantidos em aquários de 80 litros em sistema de recirculação de água constante com filtro.

Os parâmetros abióticos foram temperatura de 26 ± 1 °C, pH $7,5 \pm 0,5$, oxigênio dissolvido de 11 mg/L e fotoperíodo 14/10 h (claro/escuro) de acordo com as normas da OCDE 236 (2013). Os animais adultos foram alimentados duas vezes ao dia com ração extrusada comercial (30% de proteína bruta) e artêmia (*Artemia* spp.) congelada. Todas as condições físico-químicas da água, fotoperíodo e alimentação descritas acima foram mantidas constantes durante todos os experimentos para garantir o bem-estar dos animais.

Para obtenção dos embriões, os animais adultos foram separados em aquários de desova (Zeb Clean, Alesco) na proporção de 2:1 macho: fêmea (WESTERFIELD M, 2000). Os ovos foram coletados 30 min após a fecundação que foi realizada no início da manhã.

Os viáveis foram selecionados e os inviáveis (não fecundados ou com lesões no córion) foram descartados do estudo. Para a padronização do *zebrafish* como modelo de intoxicação fetal por deltametrina (Lote # 0003-21-10200, registro CAS 52918-63-5) foram utilizadas concentrações nominais de 100, 500 e 1000 µg/L de DM dissolvida em meio embrionário (WESTERFIELD M, 2000), pois equivalem as concentrações encontradas no sangue de agricultores (AFATA TN, et al., 2021) e podem representar valores reais de intoxicação fetal para gestantes. Os animais foram divididos em 3 grupos experimentais e grupo controle mantido em meio embrionário alocados em potes estéreis de poliestireno de 80 mL.

Para o estudo do efeito da concentração de DM sobre a epibolia (Experimento 1 da Figura 1), evento que se inicia no fim da blástula onde ocorre o afinamento e expansão do embrião sobre o vitelo (KIMMEL CB, et al., 1995), os grupos descritos acima ($n = 35$ animais x 4 grupos = 140 embriões) foram expostos a DM por imersão durante a clivagem (KIMMEL CB, et al., 1995) de 2 até 8 hpf (horas pós-fertilização) (CADENA PG, et al., 2020b).

Para a fixação dos embriões, foi utilizado solução de paraformaldeído a 4% (p/v) em tampão fosfato de sódio 100 mM, pH 7,4 durante 24 h. Depois, os embriões foram lavados 3 vezes com tampão fosfato seguido para a mensuração da epibolia pela captura de imagens com auxílio do microscópio BEL Solaris-T e câmera HAYEAR HY-2307.

As medições foram feitas pela distância entre o polo animal à margem do blastoderma dividido pela distância entre o polo animal e o polo vegetal (CADENA PG, et al., 2020b; KIMMEL CB, et al., 1995) com o auxílio do software Image J (versão 1.52p, National Institutes of Health, USA).

Para o estudo do efeito da concentração e tempo de exposição da DM durante o desenvolvimento embrionário e larval, os animais foram expostos por imersão as concentrações de DM descritas acima em 2 hpf e mantidos até 24 hpf (Experimento 2 da Figura 1 com 22 h de exposição) ou 48 hpf (Experimento 3 da Figura 1 com 46 h de exposição) (RANJANI TS, et al., 2020).

Para isto foram formados grupos com 10 réplicas ($n = 15$ por réplica) sendo controle ($n = 150$ animais) e grupos experimentais expostos as três concentrações (100, 500 e 1000 µg/L) durante dois tempos de exposição (22 e 46 h) ($n = 150 \times 3$ concentrações x 2 tempos = 900 animais).

O desenvolvimento embrionário foi avaliado nos períodos de 24, 48, 72 e 144 hpf sendo as imagens obtidas com auxílio do microscópio BEL Solaris-T e câmera HAYEAR HY-2307. A mortalidade foi verificada diariamente (OCDE 236, 2013).

Os efeitos teratogênicos avaliados foram edema de pericárdio (EP), edema de saco vitelínico (ESV), deformação de coluna (DCL), deformação de cauda (DCA), coagulação (CG) (SILVA MCG, et al., 2019; CADENA PG et al., 2020a), ausência pigmentação (PIG) (SHABNAM KR e PHILIP GH, 2018) e atraso no desenvolvimento (AD) (LIU X, et al., 2018). O animal foi considerado afetado quando apresentava ao menos, um dos efeitos letal ou teratogênico avaliados, já que estes efeitos não foram observados no grupo controle (CADENA PG, et al., 2020b).

Figura 1 - Esquema do design experimental demonstrando a exposição do *zebrafish* como modelo animal de intoxicação fetal a deltametrina e a avaliação da epibolia (experimento 1) e desenvolvimento embrionário e larval (experimentos 2 e 3).



Fonte: Silva JF, et al., 2023.

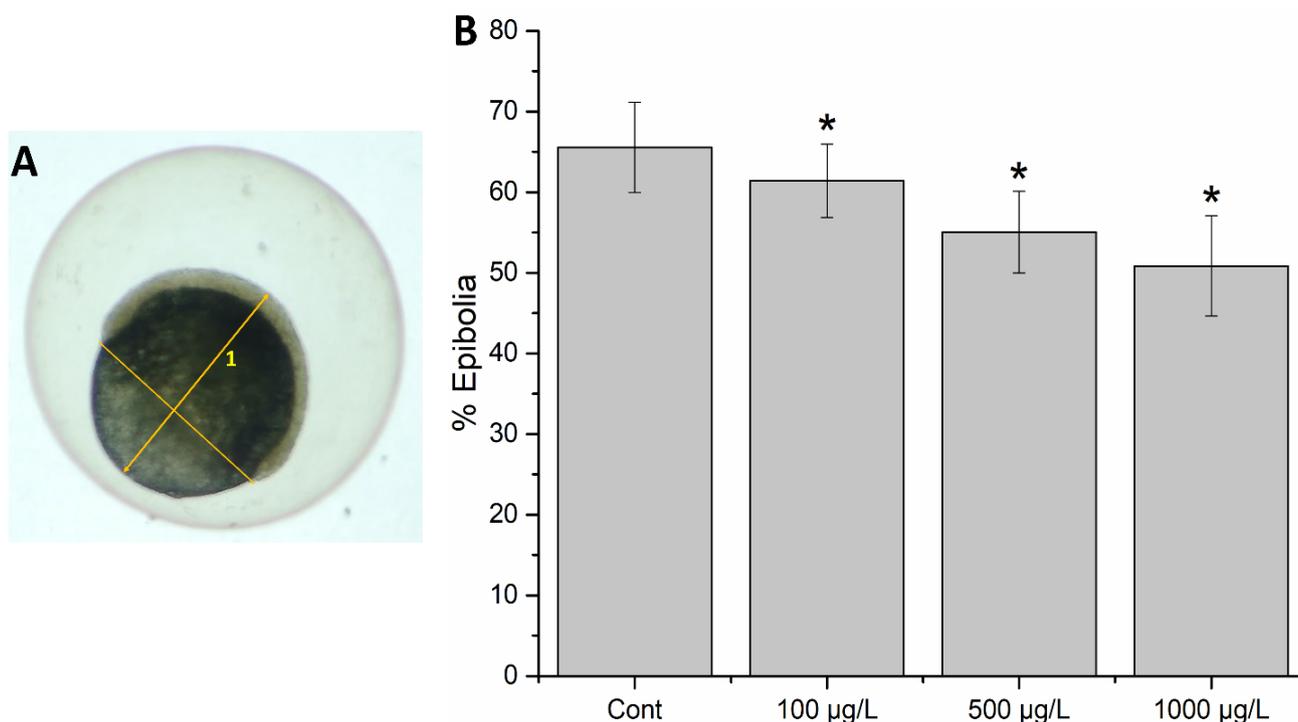
Os resultados de epibolia e efeitos teratogênicos foram expressos na forma de média e desvio padrão e os grupos comparados por *one-way* ANOVA seguido pelo teste de Tukey ($p < 0,05$) (CADENA PG, et al., 2020b).

A mortalidade foi analisada por *two-way* ANOVA considerando o grupo e o tempo como variáveis seguido pelo teste de Tukey ($p < 0,05$). Foi utilizado para as análises estatísticas o software Origin Pro Academic 2015 (Origem Lab. Northampton, MA, EUA).

RESULTADOS

A epibolia foi avaliada na fase de gástrula (KIMMEL et al., 1995) em 8 hpf (**Figura 2**). Foi possível observar uma redução do percentual de epibolia nos embriões expostos a DM em todas as concentrações testadas. Como observado (**Figura 2**), a redução da epibolia nos embriões expostos a DM foi dose dependente.

Figura 2 - Exemplo de medição da epibolia (A) do polo animal ao polo vegetal (1) e percentual da epibolia (B) de embriões de *zebrafish* avaliados a 8 hpf expostos a deltametrina durante 6 h.



Legenda: * Representa diferença significativa ($p < 0,05$) em comparação ao grupo controle.

Fonte: Silva JF, et al., 2023.

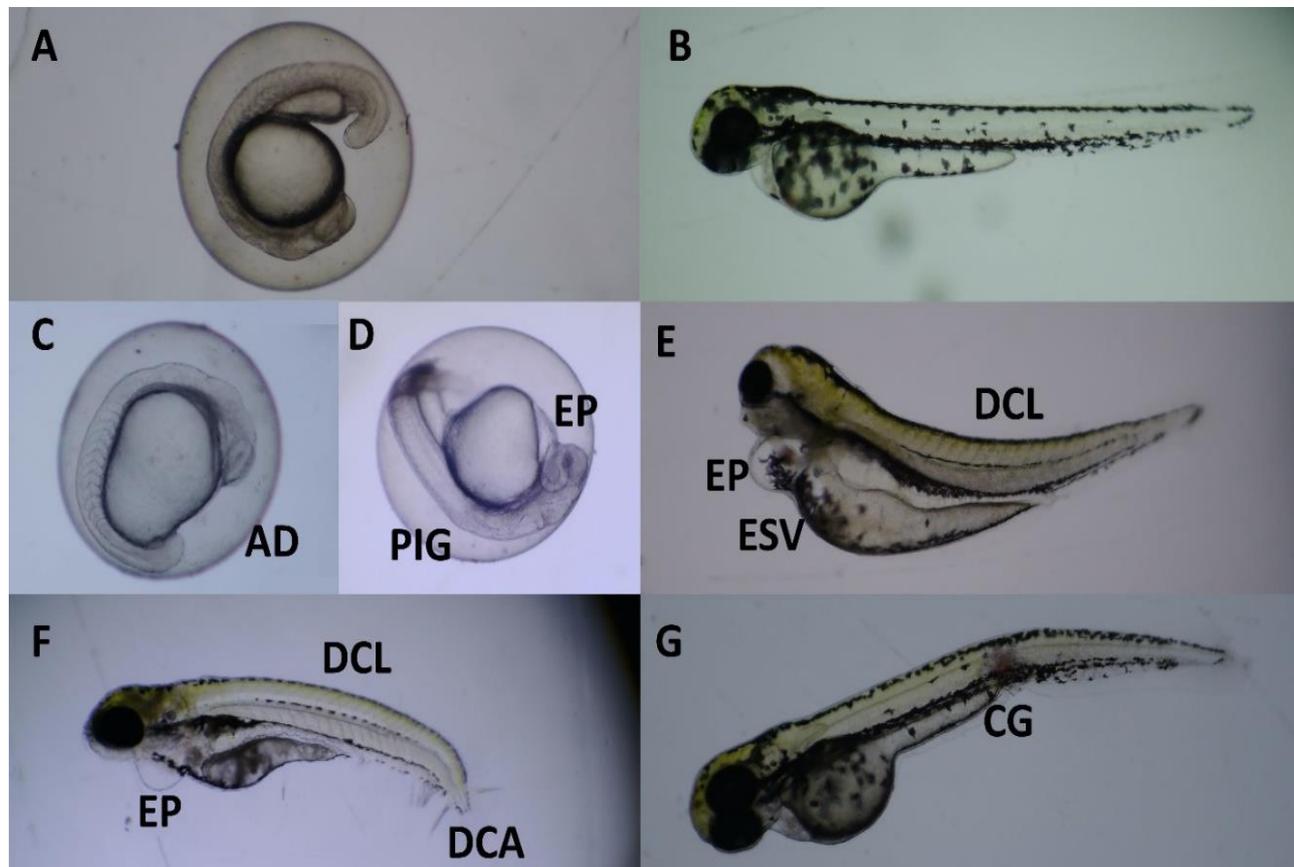
A exposição a DM durante 22 e 46 horas iniciais do desenvolvimento embrionário foi suficiente para provocar todos os efeitos teratogênicos avaliados como atraso no desenvolvimento, edema de pericárdio, edema de saco vitelínico, deformação de cauda, deformação de coluna, ausência de pigmentação e coagulação (**Figura 3**).

Como podemos observar na **Figura 4**, quanto maior o tempo de exposição e concentração, maior foi o percentual de animais afetados. A exposição a DM por 22 h foi tóxica para os embriões, afetando significativamente os animais a partir de 24 hpf de forma dose dependente (**Figura 4A**). Para a padronização do modelo de intoxicação fetal por DM, também foi realizado a exposição embrionária por 46 h.

Como observado na **Figura 4B**, o percentual de animais afetados com efeitos teratogênicos aumentou principalmente no grupo exposto a 500 µg/L de DM. No decorrer do desenvolvimento embrionário, o percentual de animais afetados foi crescente, observando-se uma mais comumente edemas de pericárdio e saco vitelínico e deformações de cauda e coluna.

Os efeitos teratogênicos observados nos animais nestes grupos experimentais foram semelhantes aos grupos expostos por 22 h, porém foi observado um maior percentual de animais afetados em 72 hpf (**Figura 4C**) e 144 hpf (**Figura 4D**). A concentração de 1000 µg/L, foi a mais tóxica independente do tempo de exposição.

Figura 3 - Efeitos teratogênicos típicos observados em *zebrafish* expostos a deltametrina onde se observa animal controle hígido em vista lateral a 24 hpf (A) e 72 hpf (B), animal exposto a deltametrina com efeitos teratogênicos em 24 hpf (C), 48 hpf (D) e 144 hpf (E, F e G).



Legenda: AD - atraso no desenvolvimento, EP - edema de pericárdio, ESV - edema de saco vitelínico, DCL - deformação de coluna, DCA - deformação de cauda, PIG - ausência de pigmentação e CG – coagulação.

Fonte: Silva JF, et al., 2023.

Durante todo o experimento, a mortalidade do grupo controle foi inferior a 10%, o que atende aos critérios de validação da OCDE 236 (2013) para testes de toxicidade com *zebrafish*. Isto valida nossos resultados experimentais. Se observa na **Tabela 1** que a mortalidade foi significativa a partir de 500 µg/L independente do tempo de exposição chegando a 100% de mortalidade com 1000 µg/L.

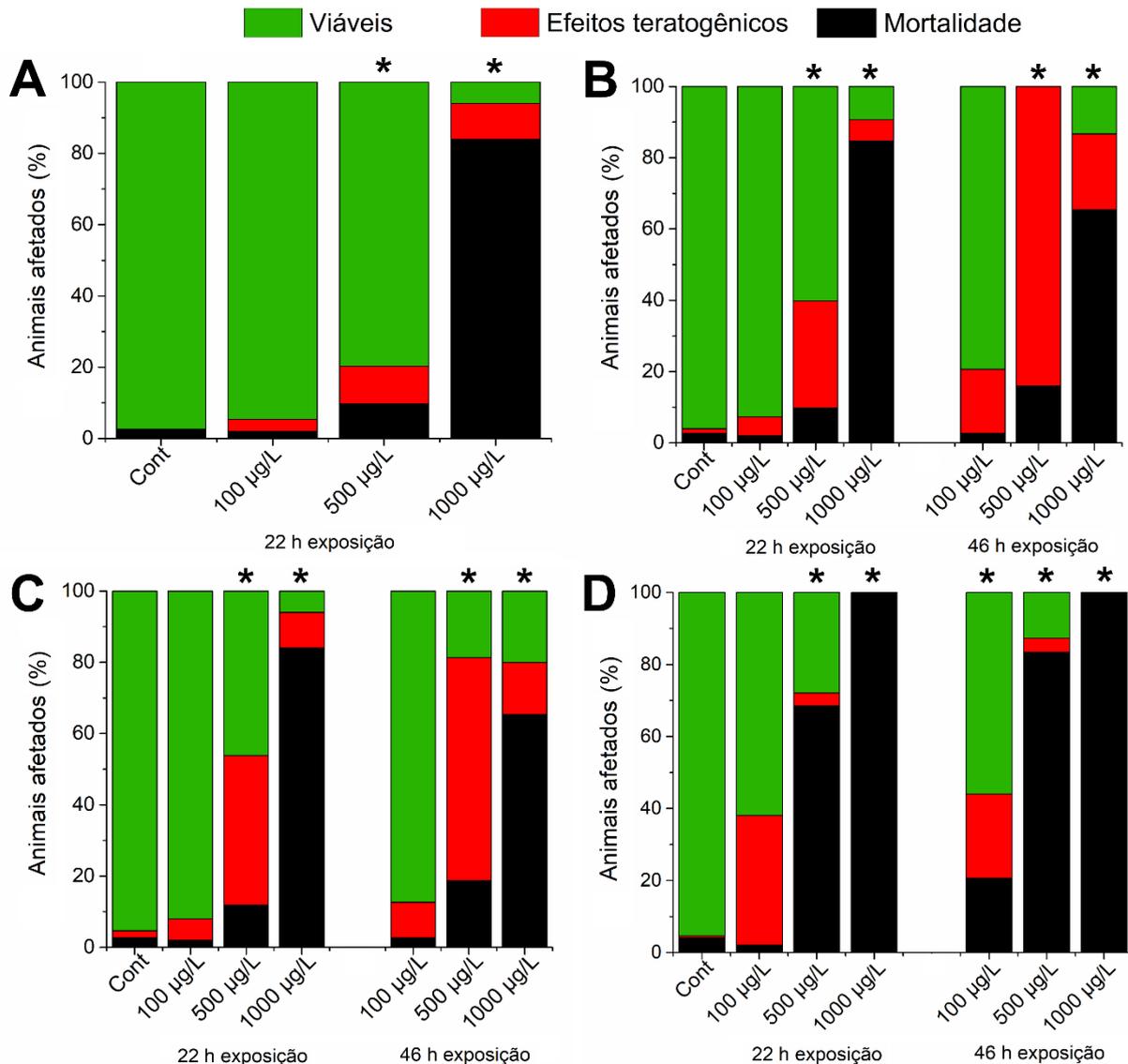
Tabela 1 - Taxa de mortalidade em 144 hpf de *zebrafish* (*Danio rerio*) expostos as concentrações de 100, 500 e 1000 µg/L de deltametrina por 22 e 46 horas.

Grupos	22 Horas de exposição (%)	46 horas de exposição (%)
Controle	4,00	4,00
100 µg/L	2,00	20,67
500 µg/L	65,33*	83,33*
1000 µg/L	100,00*	100,00*

Legenda: * Representa diferença significativa ($p < 0,05$) em comparação ao grupo controle.

Fonte: Silva JF, et al., 2023.

Figura 4 - Percentual de *Zebrafish* (*Danio rerio*) afetados após exposição à deltametrina.



Legenda: (A) percentual de animais afetados com 22 horas de exposição durante 24 hpf; (B) percentual de animais afetados com 22 e 46 horas de exposição durante 48 hpf; (C) percentual de animais com 22 e 46 horas de exposição durante 72 hpf; (D) percentual de animais com 22 e 46 horas de exposição durante 144 hpf. * Representa diferença significativa ($p < 0,05$) em comparação ao grupo controle.

Fonte: Silva JF, et al., 2023.

DISCUSSÃO

Em nosso estudo, propomos o *zebrafish* como modelo de intoxicação fetal a DM avaliando como a concentração e o tempo de exposição interferiram no desenvolvimento embrionário e larval. O desenvolvimento inicial em mamíferos ocorre no útero, e é difícil avaliar os efeitos tóxicos de compostos químicos usando esses modelos (CADENA PG, et al., 2020b).

Baseado nos nossos resultados foi possível avaliar de forma não invasiva o desenvolvimento embrionário do *zebrafish* e entender possíveis efeitos tóxicos causados pela exposição a DM. O tempo de exposição escolhido para o nosso estudo é correspondente a fase embrionária do *zebrafish* (BARS C, et al., 2021). Este

modelo possui dentre os vertebrados muitos eventos epigenéticos de desenvolvimento similares aos mamíferos (BALASUBRAMANIAN S, et al., 2019), isso permite que muitos efeitos tóxicos observados no desenvolvimento embrionário do *zebrafish* também possam ser comparados a mamíferos.

O estudo da epibolia revelou redução no percentual em 8 hpf de forma dose dependente quando os animais foram expostos a DM. Com isso, o estudo da epibolia se mostrou uma importante ferramenta para avaliação do efeito da exposição a DM durante a fase inicial do desenvolvimento celular da clivagem a gastrulação (KIMMEL CB, et al., 1995).

Estudo realizado por Liu X, et al. (2018) também corrobora com nossas observações de redução do percentual da epibolia quando realizou a exposição do *zebrafish* a 100 µg/L de DM durante 10 hpf. Os mesmos autores sugerem que a DM pode interferir com a tensão superficial do córion levando a sua destruição o que poderia provocar retardos no desenvolvimento incluindo a epibolia. A gastrulação é a fase do desenvolvimento embrionário responsável pela geração das diferentes camadas germinativas e definição do plano corporal ligada à arquitetura do embrião, por isso efeitos tóxicos podem prejudicar o desenvolvimento embrionário do *zebrafish* (BRUCE AEE, 2016).

Devido a semelhança genética do *zebrafish* com humanos e as concentrações usadas no nosso estudo serem as mesmas encontradas no sangue de mulheres que trabalham no campo (AFATA TN, et al., 2021; ALI T, et al., 2017), isto levanta preocupações sobre o contato de gestantes com a DM.

Foi encontrado atraso no desenvolvimento embrionário em 24 hpf no nosso estudo, resultado semelhante também foi observado por Liu X, et al. (2018) em embriões de *zebrafish* expostos a 100 µg/L de DM. De acordo com o mesmo autor, isto pode estar relacionado com uma expressão gênica irregular provocada pela exposição a DM. Os efeitos teratogênicos observados foram dose dependente, ficando evidente que foram decorrentes da exposição a DM.

Os efeitos mais observados foram edema de pericárdio, edema de saco vitelínico, ausência de pigmentação e coagulação. Estudos corroboram com nossos achados, pois encontraram edema de pericárdio em *zebrafish* expostos a DM (LI M, et al., 2019; AWOYEMI OM, et al., 2019), além de redução de pigmentação nos animais expostos em 48 hpf (SHABNAM KR e PHILIP GH, 2018). A DM também provocou mortalidade no *zebrafish* de forma dose dependente. Outros estudos que avaliaram o desenvolvimento embrionário do *zebrafish* expostos a DM também observaram mortalidade (LI M, et al., 2019; LIU X, et al., 2018; PARLAK V, et al., 2018) corroborando com os nossos resultados.

A exposição a DM ocasionou efeitos como deformação de coluna e deformação de cauda que se estenderam até as 144 hpf. Estes efeitos teratogênicos foram observados com maior frequência nas maiores concentrações (500 e 1000 µg/L). Estudos também observaram efeitos teratogênicos semelhantes em *zebrafish* expostos a DM (PARLAK V 2018; LI M, et al., 2019).

Estes autores sugerem que as malformações observadas estão relacionadas com a inibição que a DM produz nos mecanismos enzimáticos de defesa antioxidante, aumentando a apoptose celular e malformações. Adicionalmente, Liu X, et al. (2018) avaliou o efeito tóxico da DM no desenvolvimento embrionário do *zebrafish* e observou que não houve expressão gênica de *shh* (*Sonic hedgehog*), sendo este um gene importante para a organogênese e desenvolvimento do tubo neural.

Este efeito tóxico também pode contribuir para o desenvolvimento de efeitos teratogênicos como observados no nosso trabalho. Ainda, este mesmo autor observou que também não houve expressão gênica de *ntl* (*no tail*). Este gene é importante para mediar o desenvolvimento mesodérmico durante a gastrulação (MORLEY RH, et al., 2009), além de participar do desenvolvimento da notocorda e da cauda (MORLEY RH, et al., 2009; SCHULTE-MERKER S, et al., 1994).

Finalmente, os mecanismos descritos acima podem explicar os efeitos de deformação de coluna e deformação de cauda observado em nosso modelo de intoxicação fetal por DM. A exposição a DM (500 µg/L) por 22 horas foi cardiotoxica para os animais pois observamos edema de pericárdio em 72 hpf. A cardiotoxicidade decorrente da exposição a DM foi associada a redução da expressão do gene *myl7* (*Myosin*

Atrial Light Chain-2) de maneira dose dependente, gene responsável pela modulação do desenvolvimento cardíaco no desenvolvimento inicial do *zebrafish* (LI M, et al., 2019). Ainda, esta cardiotoxicidade também pode ser relacionada aos efeitos de edema de saco vitelino e coagulação, pois todos tem relação com funções circulatórias. Observamos que para concentração de 100 µg/L induzir efeitos teratogênicos, foi necessário um período de exposição de 46 h. Entretanto, apenas 22 h de exposição a 500 µg/L de DM foi suficiente para induzir efeitos teratogênicos nos embriões. Esta última (exposição de 500 µg/L de DM por 22 h) pode ser utilizada para futuros estudos utilizando o *zebrafish* como modelo de intoxicação fetal por DM, pois se mostrou a menor concentração que induz o máximo de efeitos teratogênicos nos animais no menor tempo de exposição e equivale a aproximadamente o fim do primeiro trimestre do desenvolvimento fetal humano (FERNANDES Y, et al., 2015).

Ainda, este período do desenvolvimento embrionário possui morfologia muito similar a outros vertebrados (KIMMEL CB, et al., 1995). Estes achados nos mostraram que o *zebrafish* é um ótimo modelo de estudo para intoxicação fetal por DM e outros pesticidas. Estudos futuros podem ser realizados com este modelo para avaliar que substâncias químicas podem ser protetoras do embrião, reduzindo os efeitos tóxicos observados em nosso trabalho e que podem ser consumidas por gestantes no intuito de proteção do feto contra a ação de pesticidas.

CONCLUSÃO

O presente trabalho avaliou a exposição de *zebrafish* a deltametrina nas concentrações de 100, 500 e 1000 µg/L propondo um modelo de intoxicação fetal para reduzir o uso de mamíferos em pesquisa. Concluímos que a concentração de 500 µg/L e 22 h de exposição produziu alterações na epibolia e efeitos teratogênicos que podem ser avaliados durante o desenvolvimento embrionário e se mostrou a melhor para ser usada em estudos futuros. Porém este modelo deve ser usado antes de estudos com mamíferos, reduzido o uso deste último, mas não substituindo por completo. O modelo animal de *zebrafish* para intoxicação fetal poderá possibilitar a avaliação e triagem de fármacos que tenham potencial de proteção para o embrião afim de prevenir doenças causadas pela deltametrina sendo bioeticamente aceitável podendo substituir modelos murinos neste tipo de pesquisa de saúde.

AGRADECIMENTOS E FINANCIAMENTO

A Universidade Federal Rural de Pernambuco pelo apoio financeiro. A CAPES pelas bolsas de estudo para Jadson Silva, Paula Cavalcante, Andressa Silva, Matheus Melo, Samara Gomes e Amanda Santos Magnabosco. A FACEPE pela bolsa de Renatta Silva e ao CNPq pela bolsa de produtividade a Pabyton Cadena (306947/2020-0).

REFERÊNCIAS

1. AFATA TN, et al. Evaluating the Level of Pesticides in the Blood of Small-Scale Farmers and Its Associated Risk Factors in Western Ethiopia. *Environmental Health Insights*. 2021; 15.
2. ALI T, et al. Pesticide genotoxicity in cotton picking women in Pakistan evaluated using comet assay. *Drug and Chemical Toxicology*. 2017; 41: 213-220.
3. AWOYEMI OM, et al. Behavioral, molecular and physiological responses of embryo-larval zebrafish exposed to types I and II pyrethroids. *Chemosphere*, 2019; 219: 526-537.
4. BALASUBRAMANIAN S, et al. Role of epigenetics in zebrafish development. *Gene*, 2019; 718: 144049.
5. BARS C, et al. Developmental Toxicity and Biotransformation of Two Anti-Epileptics in Zebrafish Embryos and Early Larvae. *International Journal of Molecular Sciences*, 2021; 22: 12696.
6. BRUCE AEE. Zebrafish epiboly: spreading thin over the yolk. *Developmental Dynamics*, 2016; 245.3: 244-258.
7. CADENA PG, et al. Folic acid reduces the ethanol-induced morphological and behavioral defects in embryonic and larval zebrafish (*Danio rerio*) as a model for fetal alcohol spectrum disorder (FASD). *Reproductive Toxicology*, 2020a; 96: 249-257.

8. CADENA PG, et al. Protective effects of quercetin, polydatin, and folic acid and their mixtures in a zebrafish (*Danio rerio*) fetal alcohol spectrum disorder model. *Neurotoxicology and Teratology*, 2020b; 82: 106928.
9. CANEDO A, et al. O peixe-zebra (*Danio rerio*) encontra a bioética: os princípios éticos dos 10Rs na pesquisa. *Ciência Animal Brasileira*, 2022; 23.
10. FERNÁNDEZ SF, et al. Biomonitoring of non-persistent pesticides in urine from lactating mothers: Exposure and risk assessment, *Science of the Total Environment*, 2020; 699: 134385.
11. FERNÁNDEZ-CRUZ T, et al. Prenatal exposure to organic pollutants in northwestern Spain using non-invasive matrices (placenta and meconium). *Science of The Total Environment*, 2020; 731: 138341.
12. FERNANDES Y, et al. Embryonic Alcohol Exposure Impairs the Dopaminergic System and Social Behavioral Responses in Adult Zebrafish. *International Journal of Neuropsychopharmacology*, 2015; 1–8.
13. HOWE K, et al. The zebrafish reference genome sequence and its relationship to the human genome. *Nature*, 2013; 496.7446: 498-503.
14. KIMMEL CB, et al. Stages of embryonic development of the zebrafish. *Developmental dynamics*, 1995; 203.3: 253-310.
15. KIM K, et al. Exposure to pesticides and the associated human health effects. *Science of the Total Environment*, 2017; 575: 525–535.
16. KIRLA KT, et al. Zebrafish early life stages as alternative model to study 'designer drugs': Concordance with mammals in response to opioids. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 2021; 419: 115483.
17. LAUGERAY A, et al. In utero and lactational exposure to low-doses of the pyrethroid insecticide cypermethrin leads to neurodevelopmental defects in male mice—An ethological and transcriptomic study. *PLoS one*, 2017; 12.10: e0184475.
18. LI M, et al. Cardiovascular toxicity and anxiety-like behavior induced by deltamethrin in zebrafish (*Danio rerio*) larvae. *Chemosphere*, 2019; 219: 155-164.
19. LIU X, et al. Developmental toxicity and neurotoxicity of synthetic organic insecticides in zebrafish (*Danio rerio*): A comparative study of deltamethrin, acephate, and thiamethoxam. *Chemosphere*, 2018; 199: 16-25.
20. LUO H, et al. Long term perinatal deltamethrin exposure alters electrophysiological properties of embryonic ventricular cardiomyocyte. *Current Medical Science*, 2019; 39.1: 21-27.
21. MACRAE CA e PETERSON RT. Zebrafish as tools for drug discovery. *Nature Reviews Drug Discovery*, 2015; 14: 721–731.
22. MORLEY RH, et al. A gene regulatory network directed by zebrafish No tail accounts for its roles in mesoderm formation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2009; 106.10: 3829-3834.
23. OCDE 236. OCDE GUIDELINES FOR THE TESTING OF CHEMICALS. OCDE. 2013; 236, p. 1-22.
24. PALMA DCA, et al. Simultaneous determination of different classes of pesticides in breast milk by solid-phase dispersion and GC/ECD. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, 2014; 25: 1419-1430.
25. PARLAK V. Evaluation of apoptosis, oxidative stress responses, AChE activity and body malformations in zebrafish (*Danio rerio*) embryos exposed to deltamethrin. *Chemosphere*, 2018; 207: 397-403.
26. PETROVICI A, et al. Toxicity of deltamethrin to zebrafish gonads revealed by cellular biomarkers. *Journal of marine science and engineering*, 2020; 8.2: 73.
27. RANJANI TS, et al. Phenotypic and transcriptomic changes in zebrafish (*Danio rerio*) embryos/larvae following cypermethrin exposure. *Chemosphere*, 2020; 249: 126148.
28. SABARWAL A. et al. Hazardous effects of chemical pesticides on human health—Cancer and other associated disorders. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 2018; 63: 103–114.
29. SARASAMMA S, et al. Zebrafish: A Premier Vertebrate Model for Biomedical Research in Indian Scenario, ZEBRAFISH, 2017.
30. SCHULTE-MERKER S, et al. no tail (ntl) is the zebrafish homologue of the mouse T (Brachyury) gene. *Development*, 1994; 120.4: 1009-1015.
31. SHABNAM KR e PHILIP GH. Developmental toxicity of deltamethrin and 3-Phenoxybenzoic acid in embryo-larval stages of zebrafish (*Danio rerio*). *Toxicology Mechanisms and Methods*, 2018; 28: 415-422.
32. SILVA MCG, et al. The complexation of steroid hormones into cyclodextrin alters the toxic effects on the biological parameters of zebrafish (*Danio rerio*). *Chemosphere*, 2019; 214: 330-340.
33. WESTERFIELD M. THE ZEBRAFISH BOOK, 5th Edition. Oregon: Eugene, 2000.