



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA – UnB
FACULDADE DE SAÚDE
DEPARTAMENTO DE FARMÁCIA

MAICON ROBERTO SANTOS SILVA

**AVALIAÇÃO DO EFEITO OBESOGÊNICO DO COMPOSTO AMETRINA EM
MODELO ANIMAL DE PEIXE-ZEBRA (*DANIO RERIO*)**

BRASÍLIA

2025

Maicon Roberto Santos Silva

Avaliação do efeito obesogênico do composto Ametrina em modelo animal do peixe-zebra (*Danio rerio*)

Trabalho de conclusão de curso apresentado à universidade de Brasília (UnB) como requisito para obtenção do título de bacharel em ciências Farmacêuticas.

Orientador: Prof. Dr. Alexandre de Goes Martini

BRASÍLIA

2025

Avaliação do efeito obesogênico do composto Ametrina em modelo animal do peixe-zebra (*Danio rerio*)

Trabalho de conclusão de curso apresentado à universidade de Brasília (UnB) como requisito para obtenção do título de bacharel em ciências Farmacêuticas.

Orientador: Prof. Dr. Alexandre de Goes Martini

BANCA EXAMINADORA

Prof^a Dr^a Alexandre de Góes Martini (UnB) – Presidente

Prof Dra. Flora Aparecida Milton

RESUMO

Introdução: A produção agrícola em larga escala, especialmente em sistemas de monocultura como a cana-de-açúcar, depende amplamente do uso de herbicidas para controlar pragas e plantas invasoras, sendo a ametrina uma das triazinas mais utilizadas devido à sua eficácia, baixo custo e longa persistência no solo. Contudo, seu uso intensivo suscita preocupações ambientais, e já foi associado a efeitos tóxicos em diversas espécies aquáticas, além de possuir propriedades compatíveis com as de disruptores endócrinos, capazes de interferir em sistemas hormonais, inclusive aqueles relacionados ao metabolismo energético e à formação de tecido adiposo. Evidências crescentes demonstram que certos EDCs contribuem para alterações metabólicas e podem participar do desenvolvimento da obesidade, fenômeno que cresce globalmente. **Metodologia:** Para investigar esse possível efeito obesogênico *in vivo*, peixes-zebra adultos foram distribuídos em três grupos: controle negativo, controle positivo tratado com rosiglitazona (40 µg/L), agonista total de PPAR γ , e grupo experimental exposto à ametrina (0,125 µg/L) por 21 dias. Após a eutanásia, foi coletado tecido hepático para extração de RNA e quantificação da expressão do gene *Fabp11a*, análogo ao humano *FABP4*, envolvido na adipogênese. **Resultados e Discussão:** Os resultados indicaram apenas uma tendência de aumento da expressão de *Fabp11a* no grupo exposto à ametrina, porém com alta variabilidade e ausência de significância estatística, enquanto o controle positivo apresentou redução inesperada da expressão, comprometendo a interpretação do estudo. Muitos fatores podem ter interferido para esses resultados. As dimensões reduzidas dos peixes, culminado com randomização e alocação de animais com comprimento muito variado entre os aquários. Ademais, não avaliamos a expressão gênica de PPAR γ entre as amostras, cuja resultados poderiam explicar a ausência de resposta à rosiglitazona. Por fim, vias alternativas como estresse oxidativo, disfunção mitocondrial ou mecanismos epigenéticos, poderiam ser ativadas de forma diferente pela ametrina, gerando resultados diferentes dos esperados. **Conclusão:** Nossos dados, ainda preliminares não indicam que a ametrina exerça efeito obesogênico no modelo *in vivo* de peixe-zebra, reforçando a necessidade de novos experimentos para gerar conclusões mais robustas.

Palavras-chave: Ametrina; Disruptores endócrinos; Obesidade; Adipogênese.

ABSTRACT

Introduction: Large-scale agricultural production, especially in monoculture systems such as sugarcane, relies heavily on the use of herbicides to control pests and invasive plants. Ametryn is one of the most widely used triazines due to its effectiveness, low cost, and long persistence in soil. However, its intensive use raises environmental concerns and has already been associated with toxic effects in several aquatic species. Ametryn is an endocrine disruptor, substances that hamper hormonal systems, including those related to energy metabolism and adipose tissue formation. Growing evidence shows that certain endocrine disruptors contribute to metabolic dysfunction and might play a role in the development of obesity, which is increasing globally. **Methodology:** To interrogate this potential obesogenic effect *in vivo*, adult zebrafish were allocated into three groups: a negative control, a group exposed to rosiglitazone (40 µg/L), a total PPAR γ , and an experimental group exposed to ametryn (0.125 µg/L) for 21 days. After euthanasia, liver tissue was collected for RNA extraction and *Fabp11a* gene expression was assessed by RT-qPCR. **Results and Discussion:** The results showed a trend in the *Fabp11a* gene expression in the ametryn-exposed group, with high variability and no statistical significance, while the positive control group exhibited an unexpected reduction in expression, compromising the study. Different factors may have interfered with these results. The small fishes size, combined with randomization and allocation of animals with very divergent lengths among the aquariums. Furthermore, we did not evaluate the gene expression of PPAR γ among the samples, the results of which could explain the lack of response to rosiglitazone. Finally, alternative pathways such as oxidative stress, mitochondrial dysfunction, or epigenetic mechanisms could be activated differently by ametryn, generating results different from those expected. **Conclusion:** Thus, the data showed that ametryn does not exert an obesogenic effect in zebra-fish, but new experiments are required to attain robust conclusions.

Keywords: Ametryn; Endocrine disruptors; Obesity; Adipogenesis.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	7
2 OBJETIVOS.....	12
2.1 Objetivo geral.....	12
2.2 Objetivos específicos.....	12
3 METODOLOGIA.....	12
3.1 Modelo <i>in vivo</i>	12
3.2 Delineamento experimental.....	12
3.3 Extração de RNA e PCR quantitativo por transcrição reversa.....	14
3.4 Análise histológica.....	16
3.5 Análise estatística.....	16
4 RESULTADOS.....	17
4.1 Efeito da ametrina sobre a expressão mRNA do <i>Fabp11</i> em tecido hepático de peixe-zebra.....	17
4.1.1 Análise da eficiência relativa dos primers (validação dos primers).....	17
4.1.2 Análise da especificidade dos primers.....	18
4.1.3 Análise do efeito da ametrina na expressão de mRNA de <i>Fabp11</i>	19
5 DISCUSSÃO.....	20
6 CONCLUSÃO.....	25
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	26

1 Introdução

A produção agrícola massiva em monocultura encontra vários desafios, dentre eles a proliferação exacerbada de pragas, ervas daninhas e fungos. O uso de herbicidas/agrotóxicos é essencial para o controle destas ameaças. Entretanto, a utilização indiscriminada dessas substâncias elenca dúvidas concernentes a proteção dos ecossistemas, segurança das lavouras e os impactos na própria saúde humana [BRUNO RAMOS et al, 2023]. Por exemplo, a Ametrina, um herbicida seletivo pertencente à família das triazinas. Ela inibe a fotossíntese, ao bloquear o transporte de elétrons, levando à acumulação de espécies reativas que causam peroxidação lipídica, culminado em necrose e morte das plantas daninhas. Extremamente efetiva e de baixo custo, usado durante décadas no combate a gramíneas e plantas invasoras [Y. LIU et al, 2017] [STARA et al, 2012]. As triazinas compreendem cerca de 30% da produção mundial de pesticidas [CABRAL et al., 2003].

Também conhecido pelo nome químico, N₂-ethyl-N₄-isopropyl-6-methylthio-1,3,5-triazine-2,4-diamine [ANVISA, 2024], apresentam um anel benzeno heterocíclico, derivada do isômero s-triazin. Possui grande solubilidade em compostos orgânicos, mas moderada em água. Permanece por longo tempo em solos, sendo tóxico para os mamíferos e um irritante reconhecido [LEWIS E WARNER E GREEN et al, 2016]. Todavia, são eficazes e seletivos em culturas de cana-de-açúcar, milho, banana, trigo, abacaxi, sendo sua persistência no solo, entre 10 a 110 dias, outra vantagem para sua aplicação [SUMEKAR. Y, 2023].

Desta forma, o uso excessivo gera consequências tanto para o solo como para as bacias hidrográficas adjacentes. Os produtos oriundos da ametrina já foram detectados em águas superficiais e subterrâneas, graças a sua capacidade de lixiviar em corpos d'água adjacentes às áreas de cana-de-açúcar, desencadeando risco para os organismos aquáticos

[Y. LIU et al, 2017; ROLAND E RACHEL MARCELLA et al, 2023; MOURA et al, 2018]. Ademais, esses resíduos e metabólitos da ametrina são absorvidos pelas raízes das plantas, encontradas em brotos de trigo, alfafa, milho, azevém [Y. LIU et al, 2017] e tubérculos como a mandioca e o inhame [SANTOS et al, 2015], tendo consequências para animais expostos como os anfíbios presentes nas lavouras de cana-de-açúcar [MOUTINHO et al, 2020]. A morte de girinos cercada por campos de cana-de-açúcar é sabidamente consistente com a contaminação por pesticidas [MOUTINHO et al, 2020].

Em mamíferos, estudos em ratos demonstram uma série de lesões generalizadas, por exemplo: genotoxicidade, stress oxidativo, redução no sistema antioxidante e fibrose hepática. Em cães e coelhos, observou-se hepatomegalia [SANTOS et al, 2015], além de mutagênese em linfócitos humanos cultivados *in vitro* [SEVERI-AGUIAR et al., 2013]. Em animais aquáticos, como enguias, observou-se alterações histopatológicas, hemorragias puntiformes em fígado e cérebro, e necrose tubular renal [HASAN et al, 2019]. Já, em peixes zebra, durante a embriogênese, constatou-se defeitos na organogêneses por acúmulo de espécies reativas de oxigênio, aumento do stress oxidativo, disfunção mitocondrial e interferência na expressão gênica pós-transcricional [NAYOUNG MIN, 2022].

O Brasil, além de ser o maior consumidor de agrotóxicos no mundo, também é o maior produtor de cana-de-açúcar. Essa monocultura sozinha é responsável pelo uso de até 12% de todas as vendas de agrotóxicos no país. Dentre os sete herbicidas mais utilizados nessa lavoura, a ametrina está em terceiro. Outrossim, o uso em épocas de chuvas corrobora para maior frequência de disseminação dos herbicidas para águas de rios e bacias hidrográficas [MOUTINHO et al, 2020].

Desta forma, estudos que investiguem os efeitos de diferentes agrotóxicos são imprescindíveis para determinar os riscos de toxicidade em alimentos e água potável. Interessantemente, algumas dessas substâncias podem interferir em mecanismos hormonais

fisiológicos. São denominados como produtos químicos desreguladores endócrinos (EDCs) pois sua fórmula química estrutural é semelhante a hormônio endógenos, o que pode interferir diretamente em sistemas hormonais. Assim, são capazes de interagir, ativar ou antagonizar receptores hormonais, alterar sua expressão, transdução de sinal, síntese e distribuição, além de induzir modificações epigenéticas [HEINDEL, 2022].

O debate sobre os riscos dos EDCs data desde a década de 90, na Declaração de Wingspread, que identificou a possível função desreguladora hormonal de produtos químicos. Em 1996, seu conceito foi formalmente introduzido na Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos da América [YLMAZ, TEREKECEI, SANDAL et al, 2020] e, por fim, a Sociedade de Endocrinologia definiu o termo como "um produto químico exógeno, ou mistura de produtos químicos, que podem interferir em qualquer aspecto de ação hormonal" [ZOELLER et al, 2012].

Atualmente, cerca de 1000 produtos químicos são designados como EDCs. Esses químicos estão envolvidos na atividade industrial ou agrícola e na fabricação de produtos farmacêuticos, dioxinas, pesticidas e plastificantes. Portanto, os seres humanos estão frequentemente expostos aos EDCs em seu cotidiano, estimando-se que até 90% da exposição desses químicos venha da ingestão alimentar e/ou contaminações ambientais [YLMAZ et al, 2020; GRUPTA et al, 2020].

Nesse contexto, vários estudos demonstram que algumas dessas substâncias provocam alterações no metabolismo e no controle do peso corporal. Outrora, a obesidade era entendida como uma equação entre “calorias consumidas versus ingeridas” reforçada por sedentarismo e maus hábitos alimentares. Atualmente, a obesidade é definida como uma doença crônica multifatorial com aspectos variados tais como: genéticos, epigenéticos, ambientais, estresse emocional e disbiose intestinal. Ademais, evidências crescentes demonstram que determinados compostos químicos apresentam potencial obesogênico,

interferindo no desenvolvimento e na função do tecido adiposo, fígado, pâncreas, trato gastrointestinal e cérebro [HEINDEL, 2022].

Em paralelo a esses conceitos, a obesidade figura como a epidemia do século XXI, um desafio de saúde pública para a sociedade, com incidência elevada em todo o globo (Fig 1). Possui alta morbimortalidade, sendo fator de risco para cardiopatias, vasculopatias e diabetes mellitus. Algumas previsões recentes estimam que até 2035, a população obesa em países em desenvolvimento chegará a 51% [KOLIAKI, 2023].

Obesity in adults, 2022

Estimated prevalence of obesity¹, based on general population surveys and statistical modeling. Obesity is a risk factor² for chronic complications, including cardiovascular disease, and premature death.

Our World
in Data

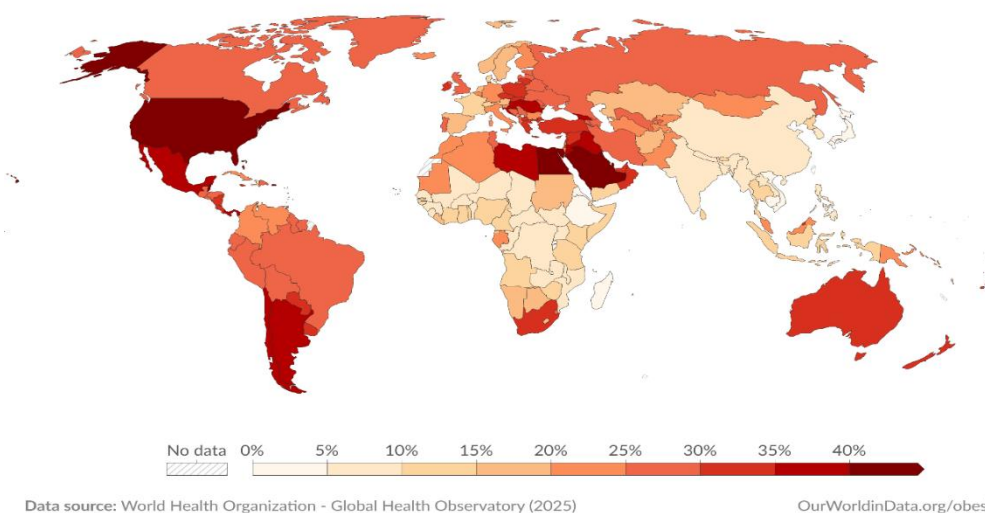


Figura 1- Obesidade em adultos, 2022. Estimativa de prevalência de obesidade. Fonte: Organização Mundial de Saúde

Em âmbito nacional, a Vigilância de Fatores de Risco e Proteção para Doenças Crônicas por Inquérito Telefônico (VIGITEL) conduziu uma pesquisa, publicada em 2024, na qual se verificou um incremento significativo na proporção de adultos com obesidade, que passou de 11,8% em 2006 para 24,3% em 2023.

Ademais, o estudo demonstrou que o aumento das taxas de mortalidade atribuídas à obesidade se manifesta de forma mais expressiva nas faixas etárias avançadas, particularmente, entre indivíduos idosos. Este grupo frequentemente apresenta outras comorbidades, como doenças cardiovasculares, diabetes mellitus, hipertensão arterial

sistêmica, dislipidemias, tornando-se uma questão de saúde pública relevante (BRASIL, 2024).

Os EDCs têm se destacado por inúmeras razões. Podem ativar receptores hormonais envolvidos no desenvolvimento de adipócitos brancos levando a adipogênese [EGUSQUIZA E BLUMBERG, 2020]. Exibem efeitos transgeracionais, principalmente quando a exposição ocorre em fase crítica do desenvolvimento, perpetuando patologias tireoidianas, imunológicas (doenças autoimunes), neurodegenerativas (déficit cognitivo) e metabólicas (obesidade, diabetes mellitus e síndrome metabólica) [KUMAR et al, 2020; GIULIVO, 2016]. Não obstante, se os EDCs estão relacionados com a epidemia de obesidade, crescente desde a década de 90, é uma questão dubitável, com terreno fértil para pesquisas vindouras que possam trazer um real esclarecimento.

Desta forma, a Ametrina e outros triazinas evidenciaram *in vitro* desregulação da esteroidogênese [MAXIM et al, 2024]. Em conformidade com estes resultados, estudos conduzidos no laboratório de farmacologia molecular (Farmol) da Universidade de Brasília demonstram aumento da diferenciação de adipócitos frente a exposição de determinados agrotóxicos, em culturas celulares de pré-adipócitos (células 3T3-L1). As células foram expostas a concentrações crescentes de ametrina, bitertanol, carbosulfona e óxido de fembutatina, respectivamente. Posteriormente, foram coradas com Oil Red O (ORO), uma técnica histológica amíúde usada para detectar lipídeos em células e tecidos [Du et al, 2023]. Interessantemente, a ametrina apresentou o maior efeito obesogênico *in vitro*, em um padrão de curva dose-resposta (dados não publicados). Desta forma, nosso trabalho objetiva avaliar o potencial obesogênico da ametrina em modelo *in vivo* de peixe-zebra.

2 Objetivos

2.1 Objetivo geral:

O objetivo deste trabalho é avaliar o efeito adipogênico do pesticida triazinico Ametrina *in vivo*, através de estudos em peixe-zebra.

2.2 Objetivos específicos:

- Demonstrar maior ativação transcricional de genes ligados à adipogênese nos peixes expostos à ametrina;
- Correlacionar as expressões gênicas encontradas com um fenótipo de maior conteúdo de lipídeos através da coloração de Oil Red O, além das alterações morfológicas por hematoxilina & eosina.

3 Metodologia

3.1 Modelo *in vivo*

Atualmente, o *Danio rerio* tornou-se um modelo de referência para realização de experimentos *in vivo* para avaliação da toxicidade em embriões, larvas e adultos [ADRIAN J HILL, TERAOKA, PETERSON et al, 2005]. Representam modelo mais econômico do que o murino, de fácil manutenção e manuseio, além de alta semelhança fisiológica com os mamíferos, com cerca de 70% de semelhança entre ambos os genótipos [ZANG, L., SHIMADA, Y. & NISHIMURA, 2017; Howe et al, 2013; BRADFORD et al, 2017].

3.2 Delineamento experimental

Os peixes-zebra (*Danio rerio*) provenientes do Biotério Aquático do Departamento de Genética e Morfologia (GEM), do Instituto de Biologia (IB) da Universidade de Brasília utilizados nessa pesquisa foram mantidos em aquários de vidros com água de peixe e enriquecimento ambiental conforme descrito em The Zebrafish Information Network (<https://zfin.org/>).

Os peixes foram divididos em 3 grupos de 6 indivíduos por aquário, com igual proporção entre machos e fêmeas. Em um dos aquários, os peixes foram expostos à 0.125 µg/L de ametrina (Sigma-Aldrich), conforme concentrações habitualmente encontradas em águas de fluviais [BRITTO F, PEREIRA et al, 2012; GOV.BR (<https://www.gov.br/saude/pt-br/composicao/svsa/saude-do-trabalhador/renast/vspea>)]. Os outros dois aquários foram usados como controles, um negativo, pois não sofreu nenhuma exposição a fármacos, enquanto o terceiro aquário foi exposto à rosiglitazona 40 µg/L, como controle positivo. Por ser uma agonista de PPAR γ (receptor ativado por proliferador de peroxissoma gamma), age diretamente na adipogênese [ROSEN, SARRAF, TROY et al, 1999].

Os aquários foram mantidos em uma sala com ciclos alternados de 12h entre claro e escuro, com alimentação regular diária com ração comercial para peixes (Alcon BASIC) conforme mostrado na Figura 2. Eles eram continuamente aerados, mantidos em temperatura controlada de $27^{\circ} \pm 2^{\circ}\text{C}$ e pH da água entre 7,0 a 7,2. O projeto foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA/ UnB), SEI nº 23106.066256/2023-00. Findo o período de exposição, os peixes foram eutanasiados com cloridrato de lidocaína a 400 mg/L [COLLYMORE et al, 2016]. Os tecidos foram dissecados e o tecido hepático foi congelado rapidamente em nitrogênio líquido a -200°C . Os tecidos adiposos não foram visualizados, devido dimensões reduzidas dos peixes. O restante do fígado foi colocado em solução de formalina tamponada a 10% (formol), para fixação [SMOLIŃSKA, K., SOBCZYŃSKI, J., SZOPA, A. et al, 2024].

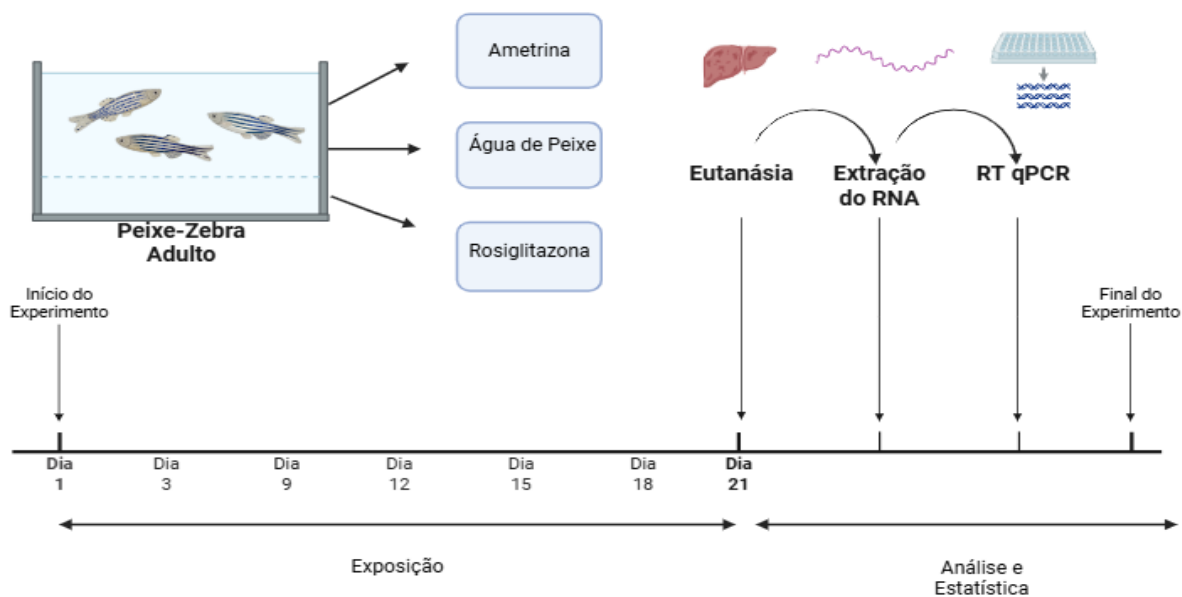


Figura 2: O esquema representa, de forma cronológica, as etapas e procedimentos conduzidos ao longo do delineamento realizado com peixes-zebra adultos, distribuídos em três grupos: um controle negativo (Água de Peixe), um grupo exposto à ametrina 0,125 µg/L, e o controle positivo (Rosiglitazona 40 µg/L). A exposição ocorreu por 21 dias, seguida pela eutanásia dos animais. Depois, procedemos com a extração e análise de expressão por RT-PCR.

3.3 Extração de RNA e PCR quantitativo por transcrição reversa (RT-PCRq)

A extração do RNA total das células foi realizada com o reagente TRIzol® (Sigma-Aldrich) e o RNeasy Mini Kit (Qiagen), seguindo as normas do fabricante. Brevemente, após a obtenção de RNA íntegro, a quantificação e o grau de pureza das amostras de RNA total foram determinados por espectrofotometria, utilizando-se o aparelho NanoDrop One (Thermo Scientific). A quantificação foi realizada no comprimento de onda de 260 nm e expressa em µg/µL. O grau de contaminação por proteínas foi verificado por meio da razão entre as leituras os comprimentos de onda 260 e 280 nm. Valores na faixa de 1.8 a 2.2 foram considerados adequados.

A transcrição reversa e amplificação por PCR quantitativo foram realizados sincronicamente, através do kit Power SYBR® Green RNA-to-Ct 1-Step (Applied Biosystems, CA, EUA), seguindo normas do fabricante. As reações foram preparadas em

placas de 96 poços, para um volume final de 10 µL, com os seguintes reagentes (para uma reação): 0,08 µL de enzima transcriptase reversa (RT), 5 µL Power SYBR® Green RT-PCR, 0,2 µL de cada primer (Forward e Reverse) e 10ng de RNA. O volume foi completado com água livre de DNA e RNA.

O gene *Fabp11a* (Fatty Acid Binding Protein 11a) é ortólogo ao *FABP4* humano. Eles codificam uma proteína que se liga a ácidos graxos, sendo crucial na regulação adipocitária (<https://zfin.org/ZDB-GENE-040912-132#summary>). O gene *Gapdh* (Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase) é um gene constitutivo, geralmente usado na normalização de experimentos de PCR e Western-Blot [REBOUÇAS, COSTA, PASSOS & SILVA, 2013]. Outrossim, os primers forward e reverso para *Fabp11a* e *Gapdh* foram confeccionados usando ferramentas disponíveis no website The National Center for Biotechnology Information (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov>). Um PCR *in silico*, com os primer supracitados no website Genome Browser (<https://genome.ucsc.edu>) evidenciou a especificidade dos primers. Eles foram, então, sintetizados pela Integrated DNA Technologies (IDT, Brasil). As sequências utilizadas para o *Fabp11a* foram: R 5' ACA AGT TTG CCG TTC TCG 3' e F 5' TCA GAG CAC CTT CAA AAC CA 3'; para o *Gapdh*: R 5' TAA TGT TGG CTG GGT CCC TC 3' e F 5' CGGA CTC CAC CCA TGG AAA GT 3'. O gene constitutivo de *Gapdh* foi usado como controle endógeno.

As condições da reação foram as mesmas para todos os experimentos de RT-PCRq: 30 minutos a 48°C para realização da reação de transcrição reversa; 10 minutos a 95°C para ativação da enzima DNA polimerase; 40 ciclos de 95°C por 15 segundos para desnaturação e 60°C por 1 minuto para anelamento do primer e extensão.

Todos os experimentos de RT-PCRq foram realizados no equipamento Applied Biosystems StepOnePlus™ Real-Time PCR Systems, versão 2.3.3, e os dados obtidos foram analisados pelo método descrito por [Livak et al, 2001].

3.4 Análise histológica

Os fígados de peixe foram fixados em formalina tamponada a 10% por um dia, mantidas em álcool 70%, até o emblocamento em parafina. Colorações em hematoxilina & eosina, Oil Red O em cortes de 5 μ M foram solicitadas. Resultados ainda não disponíveis.

3.5 Análise estatística

Utilizamos o One-way ANOVA, com teste não paramétrico de Kruskal- Wallis, assumindo distribuição de dados não gaussianas, seguido do teste *post hoc* de Dunn's.

Valores de $p < 0.05$ foram considerados estatisticamente significativos. Todas as análises estatísticas foram realizadas no Software GraphPad Prism, versão 8.4.3 para Mac.

4 Resultados

4.1 Efeito da ametrina sobre a expressão mRNA do *Fabpa11* em tecido hepático de peixe-zebra

4.1.1 Análise da eficiência relativa dos primers (validação dos primers)

A análise da expressão gênica relativa pela técnica de PCR, utilizando-se o método de comparação $\Delta\Delta C_t$ [LIVAK et al, 2001], requer que as eficiências de amplificação do gene alvo e do gene endógeno sejam equivalentes. Dessa forma, inicialmente, uma curva de diluição seriada foi realizada para cada par de primers, para confecção da curva-padrão. Em seguida, os valores dos C_t obtidos para cada diluição foram utilizados para determinar a equivalência da eficiência de amplificação, por meio de sua representação gráfica (log da diluição x ΔC_t) (figura 3). A equivalência foi determinada pela inclinação da reta gerada ao se comparar a eficiência do gene alvo (*Fabpa11*) com a do gene controle (*Gapdh*). Pela equação obtida, pode ser calculada a eficiência da reação. Os valores compreendidos entre 90% e 115%, são consistentes com reações de PCR eficientes.

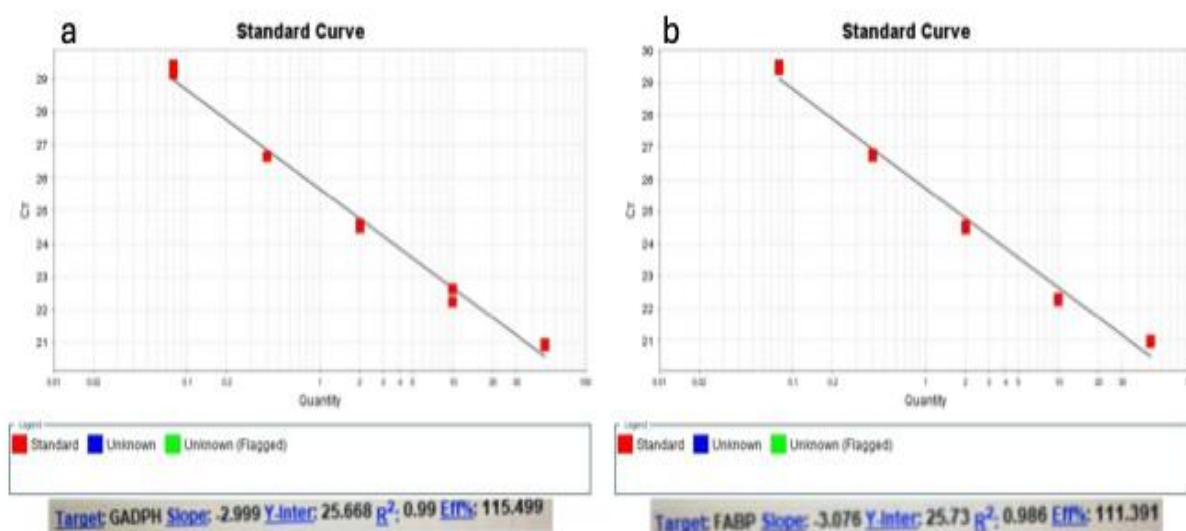


Figura 3. Curva padrão dos primers *Gapdh* e *Fabpa11*. **a.** No painel a, observamos a curva padrão do *Gapdh*, cuja eficiência de reação foi de 115.499%. **b.** No painel b, temos a mesma curva para o *Fabpa11*, cuja eficiência foi de 111.391%.

4.1.2 Análise da especificidade dos primers

O fluoróforo presente no sistema SYBR® Green para a detecção da amplificação liga-se a qualquer molécula de DNA fita-dupla. Assim, a presença de produtos inespecíficos de amplificação ou a formação de dímeros de primers podem comprometer os resultados de quantificação relativa do gene de interesse. Considerando-se esses aspectos, os primers foram avaliados quanto a sua especificidade por meio da curva de dissociação do produto de amplificação (curva de melting). A presença de apenas um pico, de aspecto linear e pico único revelam a presença de um único fragmento de DNA e ausência de dímeros de primers ou DNA contaminante (figura 4).

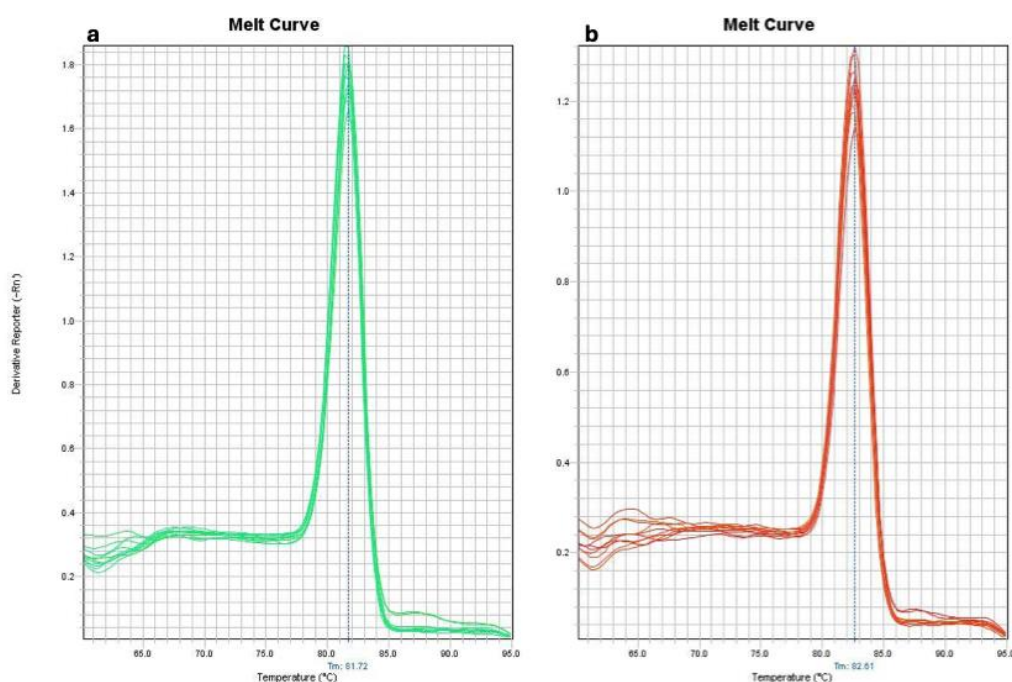


Figura 4. Curva Melt dos amplicons dos primers de *Gapdh* e *Fabpa11*. Em ambas as curvas, vemos um padrão linear, com um pico, que representa a temperatura de melt. **a.** No painel a, temos a temperatura do *Gapdh* em 81.72°C. **b.** No painel b, temos a temperatura de melt do *Fabpa11* em 82.61°C.

4.1.3 Análise do efeito da ametrina na expressão de mRNA de *Fabpa11*

Após a validação dos primers pelos resultados acima, analisamos a expressão mRNA de *Fabpa11* nos tecidos hepáticos dos peixes-zebra, na presença e ausência de exposição à ametrina na concentração Ametrina 0,125 µg/L, por 21 dias.

A exposição à ametrina teve uma tendência em aumentar a expressão de mRNA do gene *Fabpa11*, em relação ao controle negativo (figura 5). Entretanto, existe uma grande variabilidade nos resultados dos experimentos inerentes à ametrina (N=6, média 2.313, EP ± 2.1). Ademais, o controle positivo não aumentou a expressão de *Fabpa11*. Ao contrário, ocorreu uma diminuição de aproximadamente 50% nos peixes tratados com rosiglitazona 40 µg/L. Interessantemente nos grupos de controles positivo (N=6, média 0.477, EP ± 0.13) e controle negativo (N=5, média 1.3, EP ± 0.93), as variabilidades foram menores. Todavia, os resultados não são estatisticamente significativos.

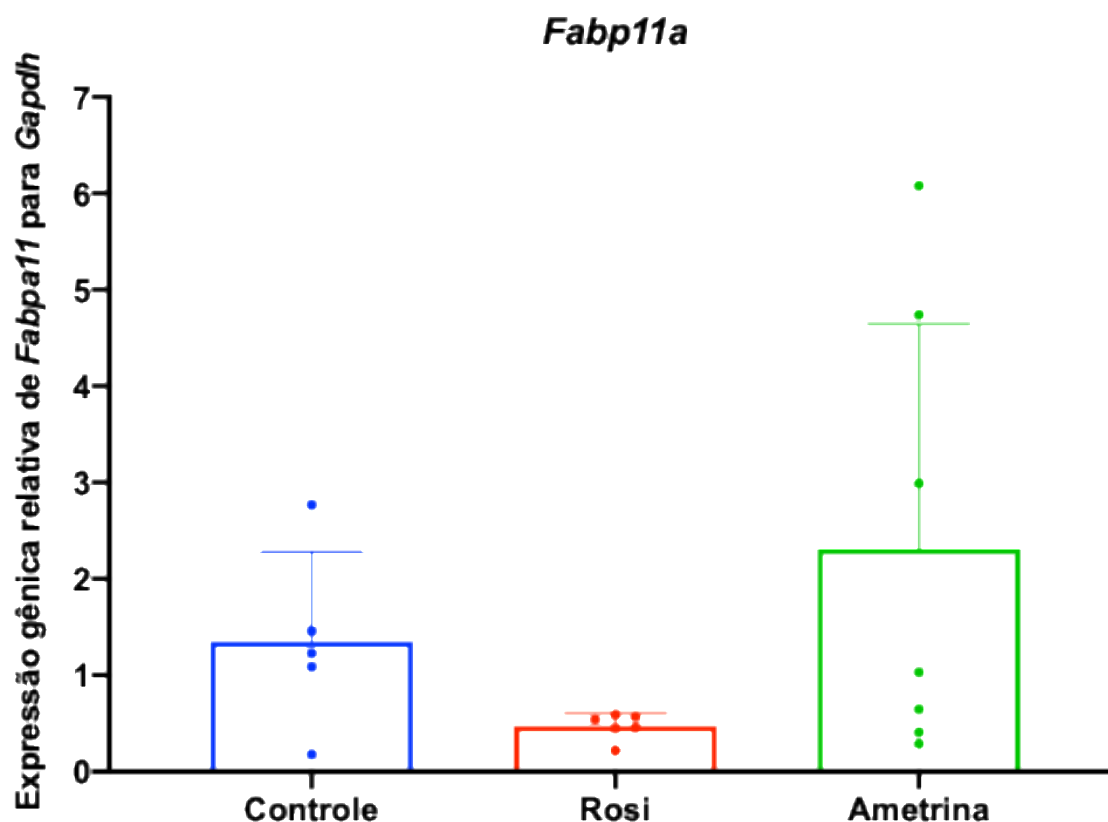


Figura 5. Expressão gênica relativa de mRNA de *Fabpa11* para *Gapdh* nos peixes-zebras após 3 semanas de experimento. Houve uma tendência da ametrina em aumentar a expressão

gênica, mas sem relevância estatística. Ademais, o controle positivo apresentou uma diminuição da expressão, ao contrário do esperado. Cada amostra é representada na figura por um ponto e representa a média dos Ct de 3 replicatas técnicas. Os dados são apresentados como Média \pm ER.

5 Discussão

A idéia dos disruptores endócrinos químicos (EDCs) não é novidade. Ela se iniciou como resultado de acontecimentos tais como, o aparecimento de câncer no sistema reprodutivo de filhas de mulheres que usaram dietilestilbestrol na gravidez entre os anos de 1940 a 1970 [BIRKETT, J. W.; LESTER, J. N, 2003]; anomalias no sistema reprodutivo observadas em jacarés que habitavam um lago na Flórida contaminado com o pesticida DDT e seu metabólito DDE [GUILLETTE, PICKFORD, CRAIN et al, 1996] e um estudo na Dinamarca que relata o declínio da qualidade do sêmen de homens durante aproximadamente 50 anos, entre os anos de 1938 e 1990 [CARLSEN, E.; GIWERCMAN, A.; KEIDING, N.; SKAKKEBAEK, 1992]. A exposição cada vez mais frequente dos seres humanos a estas substâncias é uma realidade do novo milênio. Particularmente, os agrotóxicos/pesticidas assumem um papel de destaque neste panorama, pois sua atividade como EDC está bem documentada em diversos trabalhos. Interessantemente, esta crescente exposição a estes agentes coincide com o aumento exponencial da incidência de obesidade em praticamente todos os países do globo, incluindo mundo ocidental e oriental.

Atualmente, o conceito de obesidade se expandiu muito nas últimas 3 décadas. A incorporação de novos componentes à fisiopatologia desta enfermidade cada vez mais prevalente e incidente incluem mecanismos epigenéticos, stress oxidativo, inflamação por adipocinas, interferência mútua entre diversos órgãos e tecidos do corpo e o conceito de disbiose. No contexto relatado, os EDCs estariam plenamente inseridos nos novos insights sobre a obesidade. De fato, já existem estudos comprovando a correlação entre EDCs e aumento de gordura corporal [DARBRE PD, 2017].

Assim, nós hipotizamos que alguns desses EDCs teriam efeito obesogênico maior que outros. Estudos preliminares *in vitro* performados em nosso laboratório testaram vários EDCs e, utilizando-se uma linhagem celular precursora de adipócitos, 3T3-L1, elencamos alguns destes compostos tais como: Ametrina, Carbossulfan, Carbofurano, Simazina, Fenbutatina e Bitertanol. Interessantemente, a ametrina parecia o candidato mais promissor, de acordo com os ensaios de Oil-Red-O, que cora de vermelho os adipócitos maduros.

A Ametrina, promissor composto testado, passa por diferentes regulações pelo mundo, no Brasil ele é regulado pela ANVISA E MAPA e usado em larga escala na produção agrícola, na União Europeia foi banido em 2002, porém concentrações relevantes dele ainda são encontrados em rios próximos de plantações em países membros como França e Alemanha. Nos EUA ele é registrado na Environmental Protection Agency e sua toxicidade de classe III, sendo permitido para uso agrícola com restrições de uso, a nível global apesar da regulação temos seu uso em países com: Austrália, China, México, Argentina, Estados Unidos [W. YANG et al, 2020; M. WARNE et al, 2018; EPA US, 2017; R. SZEWCZYK et al, 2018].

Desta forma, objetivamos replicar os resultados similares *in vivo*. Neste intuito, utilizamos, o modelo de peixe-zebra, que vem adquirindo relevância exponencial em estudos de toxicidade e contaminantes ambientais. Nosso delineamento experimental incorporou 3 grupos, cada qual com 6 peixes por aquário. O primeiro não recebeu tratamento, o segundo foi tratado com rosiglitazona, 40 µg/L, visto ser uma agonista total do receptor nuclear PPAR γ , fundamental nos processos de adipogênese. E nosso último aquário, foi exposto à ametrina na dose normalmente encontrada em leitos fluviais, 0.125 µg/L. Nosso planejamento incluiu mostrar o efeito obesogênico por meio de expressão gênica, através de RT-PCR e, análise histológica, através de colorações como Oil-Red O e hematoxilina & eosina.

A priori, o tecido adiposo branco ou visceral deveria ser extraído após eutanásia para realização dos experimentos supracitados. Todavia, os peixes eram amiúde pequenos, em torno de 1 a 2 cm de comprimento, o que impossibilitava extração de tecido adiposo em quantidade suficiente para realização dos experimentos. Outrossim, extraímos o tecido hepático e prosseguimos com o planejamento.

Surpreendentemente, os peixes expostos a rosiglitazona tiveram uma redução da expressão gênica de *Fabp11*, gene ortólogo em humanos do *FABP4*, enquanto a ametrina apresentou uma tendência ao aumento, mas com grande variância e sem relevância estatística. Os tecidos extraídos para histologia foram fixados em formalina tamponada a 10% e, encaminhados para emblocamento com parafina. Ainda não dispomos das lâminas, o porquê dos seus resultados não estarem presentes nesta dissertação.

No momento, a conclusão exequível é ausência de uma resposta confiável para a pergunta da pesquisa, pela ausência de resposta no controle positivo e irrelevância estatística. Entretanto, alguns pontos carecem de escrutínio adequado. Primeiramente, o comprimento normal de um peixe-zebra é aproximadamente entre 3-5 cm, com poucos indivíduos com dimensões menores ou maiores. Observamos durante a eutanásia que este padrão não foi verificado. Contrariamente, a grande maioria dos peixes média entre 1-2 cm, com alguns menores que 1cm e, poucos, maiores que 2 cm. Embora a alocação e à randomização tenham sido feitas aleatoriamente, com igual proporção entre machos e fêmeas, a distribuição inicial dos animais não era gaussiana. Isso significa que alguns dos peixes maiores ou menores alocados entre os grupos talvez tenha sido determinante para a presença de uma grande variância entre as amostras. A alocação e a randomização poderiam ser melhores, se levássemos em consideração outros parâmetros, além do gênero. O fator de condição de Fulton (K) é amplamente usado na biologia de peixes, como unidade métrica. Seu cálculo é $k = \frac{\text{peso (em gramas, sem água)}}{\text{comprimento (em centímetros)}^3}$. Este

fator informa sobre o volume do peixe (mais obeso ou mais fino) normalizado pelo seu comprimento [CLARK, PANDOLFO, L.M., MARSHALL, C.M., MITRA, 2018].

O segundo ponto a ser abordado é sobre a ausência de resposta da expressão gênica de *Fabp11* nos peixes expostos à rosiglitazona. Além da variabilidade inerente a distribuição dos peixes aleatoriamente alocados, uma quantificação da expressão gênica de PPAR γ faz-se mister. Como a rosiglitazona (rosi) é um agonista total desse receptor nuclear, com suas ações fisiológicas implicadas na adipogênese dependente da ligação ligante/receptor, uma baixa expressão de PPAR γ no grupo tratado com a rosi poderia justificar o resultado. Seria prudente, por conseguinte, a mensuração da expressão gênica daquele receptor nuclear nos grupos de estudos, bem como outros genes relacionados à adipogênese, tais como: *Ap-1*, *Klf4*, *Klf5*, *Srebp1*, *Stat5a*. Logicamente, primers específicos para os ortólogos em peixes-zebra deveriam ser confeccionados. Por fim, uma baixa expressão gênica de PPAR γ ou inativação do próprio fármaco, bem como uma concentração insuficiente para ativar o PPAR γ na concentração usada seriam hipóteses para explicar o resultado. Embora, esta última essas hipóteses não justificam a diferença entre os grupos controles (negativo e positivo).

Assim, a utilização de um experimento com peixes de dimensões e sexo bem distribuídos entre os aquários, com os fármacos a serem testados em padrão de curva dose-resposta, incluindo o controle positivo, poderiam mitigar essas prováveis fontes de vieses. Por fim, o mecanismo fisiológico da adipogênese induzida pela ametrina pode envolver outras vias, além da ativação do PPAR γ , incluindo talvez mecanismos epigenéticos, alteração da microbiota, stress oxidativo, disfunção mitocondrial e fenótipo pró-inflamatório. Portanto, seria singular, pelo menos, avaliar outros genes relacionados a algumas das vias supracitadas.

Em sumário, nossos resultados não podem ser levados em consideração devido ausência de resposta pelo controle positivo e significância estatística. Entretanto, é inquestionável que houve uma tendência de aumento de expressão de *Fabp11* nas amostras expostas à ametrina. Desta forma, a adoção de algumas medidas mencionadas poderia proporcionar diminuição de vieses, proporcionando resultados mais concretos e robustos. Novos experimentos serão necessários, incluindo não só a avaliação molecular por PCR, mas a histológica, de preferência com tecido adiposo e hepático e, em peixes-zebras maiores, com distribuição gaussiana de comprimento.

6 Conclusão

Nossos dados não sugerem um aumento da atividade obesogênica provocada pela ametrina em modelo *in vivo* de peixe-zebra. Não obstante, novos experimentos conduzidos com maior rigor, incluindo a exposição a concentrações crescentes dos fármacos estudados, análise molecular por PCR de outros genes ligados à adipogênese e outros mecanismos fisiológicos, além de melhor distribuição entre os peixes-zebras são fundamentais. Preferencialmente, animais maiores, com distribuição gaussiana de comprimento, em conjunto com as técnicas histológicas de hematoxilina & eosina e Oil-Red renderiam dados mais robustos para uma conclusão elucidativa.

7 Referências Bibliográficas

ADRIAN J. HILL, Hiroki Teraoka, Warren Heideman, Richard E. Peterson, **Zebrafish as a Model Vertebrate for Investigating Chemical Toxicity**, *Toxicological Sciences*, Volume 86, Issue 1, July 2005, Pages 6–19, <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfi110> [ADRIAN J HILL, TERAOKA, PETERSON et al, 2005]

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. **Monografia: A11 -Ametrina**, 2024.

ALZBETA Stara, Jana Machova, Josef Velisek, **Effect of chronic exposure to simazine on oxidative stress and antioxidant response in common carp (Cyprinus carpio L.)**, *Environmental Toxicology and Pharmacology*, Volume 33, Issue 2, 2012, Pages 334-343,

BIRKETT, J. W.; Lester, J. N.; **Endocrine Disrupters in Wastewater and Sludge Treatment Process**, 1st ed., Lewis Publishers, 2003.

BRITTO, F. B., Vasco, A. N. do., Pereira, A. P. S., Mélo Júnior, A. V., & Nogueira, L. C.. (2012). **Herbicidas no alto rio Poxim, Sergipe e os riscos de contaminação dos recursos hídricos**. *Revista Ciência Agronômica*, 43(2), 390–398. <https://doi.org/10.1590/S1806-66902012000200024>

CABRAL, m. f.; souza, d.; alves, c. r.; machado, s. a. s. **Estudo do comportamento eletroquímico herbicida ametrina utilizando a técnica de voltametria de onda quadrada**. *Eclética Química*, v.28,n.2, p.41-47, 2003

CARLSEN, E., Giwercman, A., Keiding, N., & Skakkebaek, N. E. (1992). **Evidence for decreasing quality of semen during past 50 years**. *BMJ (Clinical research ed.)*, 305(6854), 609–613. <https://doi.org/10.1136/bmj.305.6854.609>

CLARK, Tannia S.; PANDOLFO, Lauren M.; MARSHALL, Christopher M.; MITRA, Apratim K.; SCHECH, Joseph M. **Body condition scoring for adult zebrafish (Danio rerio)**. *Journal of the American Association for Laboratory Animal Science*, v. 57, n. 6, p. 698–702, 2018. DOI: 10.30802/AALAS-JAALAS-18-000045

COLLYMORE, CHEREEN et al. “Lidocaine Hydrochloride Compared with MS222 for the Euthanasia of Zebrafish (Danio rerio).” *Journal of the American Association for Laboratory Animal Science : JAALAS* vol. 55,6 (2016)

Consultation W. Obesity: preventing and managing the global epidemic. World Health Organization technical report series. 2000;894:1-253.

- DARBRE P. D. (2017). **Endocrine Disruptors and Obesity.** *Current obesity reports*, 6(1), 18–27. <https://doi.org/10.1007/s13679-017-0240-4>
- DU J, ZHAO L, Kang Q, He Y, Bi Y. **An optimized method for Oil Red O staining with the salicylic acid ethanol solution.** *Adipocyte*. 2023 Dec;12(1):2179334. doi: 10.1080/21623945.2023.2179334.
- GIULIVO, M., De Alda, L., Capri, E., & Barceló, D. Human exposure to endocrine disrupting compounds: Their role in reproductive systems, metabolic syndrome and breast cancer. A review. *Environmental research*, 151, pp. 251-264 (2016)
- GUILLETTE, L. J., Jr, Pickford, D. B., Crain, D. A., Rooney, A. A., & Percival, H. F. (1996). **Reduction in penis size and plasma testosterone concentrations in juvenile alligators living in a contaminated environment. General and comparative endocrinology**, 101(1), 32–42. <https://doi.org/10.1006/gcen.1996.0005>
- GUPTA R. et al. **"Endocrine disruption and obesity: A current review on environmental obesogens."** *Current Research in Green and Sustainable Chemistry*, 3 (2020)
- HASAN, M., Norhan, N., Wahab, W., Melad, A., Kismiyati, K., Aziz, M., Husin, N., & Zakariah, M.,. **The Toxic Effect of Ametryn on Behaviour and Histopathological Changes of Freshwater Eel (Monopterus Albus).** *Jurnal Ilmiah Perikanan dan Kelautan*. (2019)
- J. HEINDEL et al. **"Obesity II: Establishing Causal Links Between Chemical Exposures and Obesity."** *Biochemical pharmacology* (2022)
- K. HOWE et al. **"The zebrafish reference genome sequence and its relationship to the human genome."** *Nature*, 496 (2013): 498-503
- KOLIAKI, C., Dalamaga, M. & Liatis, S. Correction to: **Update on the Obesity Epidemic: After the Sudden Rise, Is the Upward Trajectory Beginning to Flatten?.** *Curr Obes Rep* 12, 528 (2023)
- KUMAR, M., Sarma, D., Shubham, S., Kumawat, M., Verma, V., Prakash, A., & Tiwari, R. Environmental Endocrine-Disrupting Chemical Exposure: Role in Non-Communicable Diseases. *Frontiers in Public Health*, 8 (2020)
- LEWIS, K.A., Tzilivakis, J., Warner, D. and Green, A. **An international database for pesticide risk assessments and management.** *Human and Ecological Risk Assessment: An International Journal*, 22(4), 1050-1064. (2016)

LIVAK, K. J., & Schmittgen, T. D. (2001). **Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method.** *Methods* (San Diego, Calif.), 25(4), 402–408. <https://doi.org/10.1006/meth.2001.1262>

MAXIM P Carlier, Peter H Cenijn, Timur Baygildiev, Jenny Irwan, Sylvia E Escher, Majorie B M van Duursen, Timo Hamers, **Profiling the endocrine-disrupting properties of triazines, triazoles, and short-chain PFAS,** *Toxicological Sciences*, Volume 202, Issue 2, Pages 250–264 (2024)

MIN, N., Park, H., Hong, T., An, G., Song, G., & Lim, W. Developmental toxicity of prometryn induces mitochondrial dysfunction, oxidative stress, and failure of organogenesis in zebrafish (*Danio rerio*).. *Journal of hazardous materials*, 443 Pt A, (2022)

MOURA, M.A.M., Oliveira, R., Jonsson, C.M. *et al.* **The sugarcane herbicide ametryn induces oxidative stress and developmental abnormalities in zebrafish embryos.** *Environ Sci Pollut Res* **25**, 13416–13425 (2018)

MOUTINHO, M.F., de Almeida, E.A., Espíndola, E.L.G. *et al.* **Herbicides employed in sugarcane plantations have lethal and sublethal effects to larval *Boana pardalis* (Amphibia, Hylidae).** *Ecotoxicology* **29**, 1043–1051 (2020)

NATIONAL CENTER FOR BIOTECHNOLOGY INFORMATION (NCBI). NCBI. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>.

RAMOS, B., Vaz, W., Diniz, L., Neto, F., Ribeiro, J., Carvalho-Silva, V., Teixeira, A., Ribeiro, C., Napolitano, H., & Carvalho, P., **Kinetic, mechanism, and tautomerism in ametryn acid hydrolysis: From molecular structure to environmental impacts.** *Chemosphere*, pp. 138278 (2023)

REBOUÇAS, E. de L., Costa, J. J. do N., Passos, M. J., Passos, J. R. de S., Hurk, R. van . den ., & Silva, J. R. V.. (2013). **Real time PCR and importance of housekeeping genes for normalization and quantification of mRNA expression in different tissues.** *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 56(1), 143–154. <https://doi.org/10.1590/S1516-89132013000100019> [REBOUÇAS, COSTA, PASSOS & SILVA, 2013]

RIANN J. E, Bruce Blumberg, **Environmental Obesogens and Their Impact on Susceptibility to Obesity: New Mechanisms and Chemicals,** *Endocrinology*, Volume 161, Issue (2020)

RIK BOOM, Lucia Vergauwen, Dries Knapen, **Effects of Metabolic Disruption on Lipid Metabolism and Yolk Retention in Zebrafish Embryos**, *Environmental Toxicology and Chemistry*, Volume 43, 1 August 2024, Pages 1880–1893

ROLAND, Rachel Marcella et al. **“Synthesis of molecularly imprinted polymer by precipitation polymerization for the removal of ametryn.”** *BMC chemistry* vol. 17,1 165. 24 Nov. 2023

ROSEN, E. D., Sarraf, P., Troy, A. E., Bradwin, G., Moore, K., Milstone, D. S., Spiegelman, B. M., & Mortensen, R. M. (1999). **PPAR gamma is required for the differentiation of adipose tissue in vivo and in vitro.** *Molecular cell*, 4(4), 611–617. [https://doi.org/10.1016/s1097-2765\(00\)80211-7](https://doi.org/10.1016/s1097-2765(00)80211-7) [ROSEN, SARRAF, TROY et al, 1999]

SANTOS, Tamires. et al. **Toxicological evaluation of ametryn effects in Wistar rats. Experimental and Toxicologic Pathology.** São Paulo, 2015, p.1-8

SEVERI-AGUIAR et al. **Action Mode of Triazines and Toxic Effects on Vertebrates.** Nova Science, São Paulo, 2013. p.133-143.

SMOLIŃSKA, K., SOBCZYŃSKI, J., SZOPA, A. *et al.* **Innovative high fat diet establishes a novel zebrafish model for the study of visceral obesity.** *Sci Rep* 14, 3012 (2024).

SUMEKAR, Yayan, Dedi Widayat, Uum Umiyati, Ajeng Cahya Aprilia, and Abdul Gafur. **"Effect of Ametryn Herbicide and Soil Organic Matter Content on Weed Growth, Herbicide Persistence, and Yield of Sweet Corn (*Zea mays*)"** *Sustainability* 15, no. 23: 16238. (2023)

SZEWCZYK et al. **"Ametryn removal by *Metarhizium brunneum*: Biodegradation pathway proposal and metabolic background revealed.."** *Chemosphere*, 190 (2018): 174-183

UNIVERSITY OF CALIFORNIA, SANTA CRUZ. **UCSC Genome Browser.** Disponível em: <https://genome.ucsc.edu/>

US EPA — United States Environmental Protection Agency. Ametryn: **Preliminary Human Health Risk Assessment for Registration Review**; Office of Chemical Safety and Pollution Prevention, Health Effects Division: Washington, DC, USA, 2017.

VIGILÂNCIA em Saúde das Populações Expostas a Agrotóxicos. Disponível em: <https://www.gov.br/saude/pt-br/composicao/svsa/saude-do-trabalhador/renast/vspea>. Acesso em: 5 dez. 2025.

VIGITEL. **Vigitel Brasil 2006-2023**. 2024; WOF. **Atlas mundial da Obesidade**. 2025

WARNE Et al. "**Ecotoxicity thresholds for ametryn, diuron, hexazinone and simazine in fresh and marine waters.**" *Environmental Science and Pollution Research*, 25 (2018): 3151-3169.

WEIWEI YANG et al. "**Comportamentos químicos e efeitos tóxicos da ametryn durante o processo UV/cloro...**" *Quimiosfera*, 240 (2020).

YILMAZ, B., Terekeci, H., Sandal, S. *et al.* Endocrine disrupting chemicals: exposure, effects on human health, mechanism of action, models for testing and strategies for prevention. *Rev Endocr Metab Disord* **21**, 127–147 (2020)

Y. LIU, L. Ma, Y. Lu, Shuang Jiang, H. Wu and Hong Yang. "**Comprehensive analysis of degradation and accumulation of ametryn in soils and in wheat, maize, ryegrass and alfalfa plants..**" *Ecotoxicology and environmental safety*, 140: 264-270. (2017)

YVONNE M. BRADFORD et al. "**Zebrafish Models of Human Disease: Gaining Insight into Human Disease at ZFIN.**" *ILAR Journal*, 58 (2017): 4 - 16.

ZANG, L., SHIMADA, Y. & NISHIMURA, N. **Development of a Novel Zebrafish Model for Type 2 Diabetes Mellitus.** *Sci Rep* 7, 1461 (2017). <https://doi.org/10.1038/s41598-017-01432-w>

ZOELLER RT, Brown TR, Doan LL, Gore AC, Skakkebaek NE, Soto AM, et al. **Endocrine-disrupting chemicals and public health protection: a statement of principles from the Endocrine Society.** *Endocrinology*. 2012

ZFIN website www.zfin.org