

UNIVERSIDADE DE SANTO AMARO

Curso de Medicina Veterinária

Vanessa Regina Landau Chaulet

**AVALIAÇÃO NEUROCOMPORTAMENTAL DE *DANIO RERIO*
(*ZEBRAFISH*) INTOXICADOS POR ARSENIATO E O USO DE
MEDICAMENTOS ULTRADILUÍDOS NA REVERSÃO DOS QUADROS**

São Paulo

2018

Vanessa Regina Landau Chaulet

**AVALIAÇÃO NEUROCOMPORTAMENTAL DE *DANIO RERIO*
(*ZEBRAFISH*) INTOXICADOS POR ARSENIATO E O USO DE
MEDICAMENTOS ULTRADILUÍDOS NA REVERSÃO DOS QUADROS**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao
Curso de Medicina Veterinária da Universidade de
Santo Amaro – UNISA, como requisito parcial para
obtenção do título de Bacharel em Medicina
Veterinária

Orientadora: Prof. Dra. Cideli de Paula Coelho

São Paulo

2018

C438a Chaulet, Vanessa Regina Landau

Avaliação neurocomportamental de Danio rerio (Zebrafish) intoxicados por arseniato e o uso de medicamentos ultradiluídos na reversão dos quadros / Vanessa Regina Landau Chaulet. – São Paulo, 2018.

42 f.: il.

Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharelado em Medicina Veterinária) – Universidade Santo Amaro, 2018.

Orientador (a): Prof^a. Dra. Cideli de Paula Coelho

1. Medicamento ultradiluído (homeopatia). 2. Danio rerio. 3. Metais pesados. 4. Arseniato. 5. Ansiedade. I. Coelho, Cideli de Paula, orient. II. Universidade Santo Amaro. II. Título.

Vanessa Regina Landau Chaulet

**AVALIAÇÃO NEUROCOMPORTAMENTAL DE *DANIO RERIO*
(*ZEBRAFISH*) INTOXICADOS POR ARSENIATO E O USO DE
MEDICAMENTOS ULTRADILUÍDOS NA REVERSÃO DOS QUADROS**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Curso de Medicina Veterinária da Universidade de Santo Amaro – UNISA, como requisito parcial para obtenção do título de Bacharel em Medicina Veterinária

Orientadora: Prof. Dra. Cideli de Paula Coelho

Cidade de São Paulo, 27 de janeiro de 2019

Banca examinadora

Profa. Dra. Cideli de Paula Coelho

Profa. Dra. Amane Paldes Gonçalves

Conceito final: 9,5

Agradecimentos

Agradeço a minha família pelo apoio, que foi fundamental, para que pudesse me dedicar à Faculdade e a este trabalho.

Agradeço à Professora Cideli Coelho, minha orientadora, por ser uma pessoa incrível e contagiar todos à sua volta, com sua paixão pela Homeopatia e pelo Bem-Estar Animal, razão pela qual também me encantei por essa terapêutica, e por ser uma orientadora paciente, dedicada, atenciosa, e presente em todos os momentos, incentivando a mim todo o tempo, me motivando, e elogiando meus trabalhos em Congressos, sempre acreditando em mim como aluna, e incentivando meu futuro profissional.

Agradeço aos professores da Unisa, por tantos conhecimentos transmitidos, em especial ao professor Celso, por sua grande experiência com silvestres, e por seu carisma. E a todos os professores que responderam minhas dúvidas em aula (que não foram poucas) e por me fazer acreditar na profissão de Médico Veterinário. E ao Sr. Jucelino, Alessandro e Valter, do laboratório de *Zebrafish* da Unisa pelo apoio técnico.

Além é claro, da minha mãe, que tem minha admiração como profissional ética e responsável, por seu grande conhecimento, e por se empenhar em buscar uma solução mais saudável para seus pacientes, com seu estudo autodidata em homeopatia.

E por fim, agradeço aos animais, que me inspiram a cada dia em buscar uma solução mais saudável para seu bem-estar, e pelo amor que demonstram em gratidão.

Dedico este trabalho ao meu filho Yohann Landau Fabro Boemer, que mesmo nas horas de ausência ou quando não pude lhe dar atenção, soube ser um amigo e companheiro, procurando compreender a importância do que eu fazia, e de que tudo valeria a pena no final.

Resumo

A poluição ambiental causada por resíduos de metais pesados que são desreguladores endócrinos, assim como outros, é muito relevante pelo seu amplo uso em processos industriais e agrícolas, sendo que muitos efluentes chegam ao meio ambiente sem qualquer tratamento, o mesmo acontece com outras substâncias químicas que são altamente tóxicas ao meio ambiente e a organismos como peixes e invertebrados aquáticos, entretanto muito utilizadas na agricultura, medicina veterinária e controle de pragas urbanas. O objetivo deste trabalho foi avaliar alterações comportamentais no zebrafish (*Danio rerio*) induzidas por Arsênio, através da análise da atividade locomotora e parâmetros relacionados à ansiedade, verificar se as substâncias ultradiluídas são capazes de diminuir os efeitos neurocomportamentais, e os efeitos tóxicos causados no organismo dos peixes, assim como modular os efeitos do estresse e colaborar com o bem-estar dos animais em geral. Peixes *Danio rerio* foram mantidos em aquários de manutenção, com temperatura, pH controlado, até o momento dos experimentos toxicológicos. Foram realizados experimentos com a substância utilizada, o Arseniato. Os animais foram expostos 96h aos metais pesados e os grupos foram compostos por 8 animais cada: controle branco, medicação na 6cH, 30cH e Solução Aquosa inerte, o experimento foi em cego. Posteriormente os animais passaram por testes comportamentais (locomoção e ansiedade) para avaliação de neurotoxicidade. A identificação de possíveis alterações advindas da exposição aos metais pesados é de grande importância, sendo também avaliada a possível colaboração das substâncias ultradiluídas. Resultados: O metal Arseniato produziu um efeito ansiogênico nos animais que foram submetidos a ele sem medicação (solução hidroalcoólica), isso foi observado no teste claro/escuro através do aumento do tempo dos animais no lado escuro e diminuição no lado claro; houve também uma diminuição na locomoção no claro, em relação ao controle. No Campo Aberto, houve uma diminuição do número total de quadrantes percorridos além de um aumento de movimentos erráticos em relação ao controle, comprovando o efeito tóxico. O grupo que tomou

Arsenicum album 6 cH reverteu todos os parâmetros do controle positivo de forma estatisticamente significativa.

Palavras-chave: Medicamento Ultradiluído (homeopatia), *Danio rerio*, metais pesados, Arseniato, ansiedade.

Abstract

The environmental pollution caused by heavy metal residues that are endocrine disruptors, as well as others, is very relevant for its wide use in industrial and agricultural processes, and many effluents reach the environment without any treatment, as do other chemical substances which are highly toxic to the environment and to organisms such as fish and aquatic invertebrates, however widely used in agriculture, veterinary medicine and urban pest control. The objective of this study was to evaluate behavioral changes in zebrafish (*Danio rerio*) induced by Arsenic through the analysis of locomotor activity and parameters related to anxiety, to verify if ultradiluted substances are capable of reducing the neurobehavioral effects, and the toxic effects caused in the organism as well as modulate the effects of stress and collaborate with the welfare of animals in general. *Danio rerio* fish were kept in maintenance tanks, with temperature, pH controlled, until the time of toxicological experiments. Experiments were performed with the substance used, Arsenic. The animals were exposed 96h to heavy metals and the groups were composed of 8 animals each: white control, *Arsenicum album* 6cH, *Arsenicum album* 30cH and Inert Aqueous Solution, the experiment was blinded. Afterwards the animals underwent behavioral tests (locomotion and anxiety) to evaluate neurotoxicity. The identification of possible changes from exposure to heavy metals is of great importance and the possible collaboration of ultra-dilute substances is also evaluated. Results: The Arsenic metal produced an anxiogenic effect in animals that were submitted to it without medication (hydroalcoholic solution), this was observed in the light / dark test by increasing the time of the animals in the dark side and decrease in the light side; there was also a decrease in the locomotion in the clear, in relation to the control. In the Open Field, there was a decrease in the total number of quadrants traveled, besides an increase of erratic movements in relation to the control, proving the toxic effect. The group that took *Arsenicum album* 6 cH reverted all the parameters of the positive control statistically significant.

Key words: Ultradiluted medication (homeopathy), *Danio rerio*, heavy metals, Arsenate, anxiety.

Lista de Tabelas

- Tabela 1 – Média \pm desvio padrão dos grupos Controle Branco, Controle Positivo, *Arsenicum album* 6 cH, *Arsenicum album* 30 cH com relação ao tempo em segundos de locomoção e imobilização, e quadrantes totais percorridos por *Danio rerio* no aparato experimental Campo Aberto Redondo.....29
- Tabela 2 - Média \pm desvio padrão dos grupos Controle Branco, Controle Positivo, *Arsenicum album* 6 cH, *Arsenicum album* 30 cH com relação ao tempo em segundos de permanência no fundo do aquário, na superfície do aquário, e de apresentação de movimentos erráticos de *Danio rerio* no aparato experimental Campo Aberto Retangular (Neurotoxicidade).....29
- Tabela 3 - Média \pm desvio padrão dos grupos Controle Branco, Controle Positivo, *Arsenicum album* 6 cH, *Arsenicum album* 30 cH com relação ao tempo em segundos no lado claro, no lado escuro, tempo de imobilização, frequência de entradas no lado claro, no lado escuro, e número de quadrantes percorridos por *Danio rerio* no lado claro no aparato experimental para teste de claro/escuro..... .30

Lista de Gráficos

Gráfico 1– Média \pm desvio padrão de tempo em minutos de permanência no lado claro do aparato experimental para teste de claro/escuro dos diferentes grupos de <i>Danio rerio</i>	31
Gráfico 2 – Média \pm desvio padrão de tempo de permanência no lado escuro do aparato experimental para teste de claro/escuro dos diferentes grupos de <i>Danio rerio</i>	31
Gráfico 3 - Média \pm desvio padrão da frequência de movimentos erráticos dos diferentes grupos de <i>Danio rerio</i>	32

Lista de Figuras

Figura 1 <i>Danio rerio</i> (Zebrafish).....	12
Figura 2 Aparato experimental para teste de campo aberto redondo em <i>Danio rerio</i> .	20
Figura 3 Aparato experimental para teste de campo aberto retangular em <i>Danio rerio</i>	20
Figura 4 Aparato experimental para teste de claro/escuro em <i>Danio rerio</i>	22
Figura 5 Fluxograma do tratamento homeopático e da exposição de <i>Danio rerio</i> ao Arseniato, de acordo com os dias do experimento.....	25

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	11
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	11
2.1	<i>Danio rerio</i>	11
2.2	Desreguladores endócrinos.....	13
2.3	Homeopatia.....	15
2.3.1	Pesquisa em Homeopatia.....	16
2.4	Modelos em Pesquisa Animal.....	18
2.5	Testes Comportamentais.....	19
2.5.1	Campo Aberto.....	19
2.5.2	Teste de neurotoxicidade (Campo Aberto retangular).....	20
2.5.3	Teste Claro/Escuro.....	21
3	OBJETIVOS.....	23
4	MATERIAL E MÉTODOS.....	23
4.1	Animais.....	23
4.2	Delineamento experimental	24
4.2.1	Tratamentos.....	24
4.2.2	Testes comportamentais.....	25
4.2.2.1	Avaliação dos sinais de neurotoxicidade do <i>Danio rerio</i> , após exposição às diferentes substâncias.....	25
4.2.2.2	Resposta de peixes <i>Danio reiro</i> no teste de atividade geral em campo aberto.....	26
4.2.2.3	Resposta do peixe <i>Danio rerio</i> no teste de ansiedade.....	26
4.3	Descarte de carcaças e de resíduos.....	26
5	RESULTADOS.....	28
6	DISCUSSÃO.....	33
7	CONCLUSÃO.....	36
	Referências.....	37

1 INTRODUÇÃO

Desreguladores endócrinos e poluentes orgânicos persistentes (POP) como o Arseniato são substâncias muito estudadas principalmente devido aos efeitos nocivos ao meio ambiente. É muito preocupante a possibilidade que essas substâncias possuem de produzir efeitos adversos já em uma concentração muito baixa.

Os desreguladores endócrinos podem interferir no sistema endócrino humano e de animais são de grande interesse científico, já que podem afetar a saúde, o crescimento, e a reprodução.

Baldissarelli et al (2012) analisaram o comportamento de *Danio rerio* submetidos ao Arseniato, demonstrando que o mesmo provocou alterações significativas na locomoção, aumento da ansiedade e hidrólise de nucleotídeos extracelulares. Observaram diminuição da atividade locomotora na dose de 5 mg de As/L.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 *Danio rerio*

O *Danio rerio* é natural do sul da Ásia e está amplamente distribuído em partes da Índia, Bangladesh, Nepal, Mianmar e Paquistão (RAHMAN, 1989;(ARUNACHALAM et al., 2013). Essa região geográfica tem clima de estações chuvosas e secas pronunciadas que têm efeito apreciável nos parâmetros do habitat, influenciando na química da água e na abundância dos recursos. O *Danio rerio* apresenta-se em diversos tipos de ambientes aquáticos nessa região, incluindo fossas de irrigação e campos de arroz, lagoas artificiais de peixes, a parte superior dos rios e até mesmo em riachos de fluxo rápido (BHAT, 2003). As preferências de habitat dessa espécie são, no

entanto, os locais de águas imóveis ou em movimento lento, incluindo as lagoas rasas, algumas das quais foram ligadas ao cultivo do arroz, mostrando preferência pela desova em locais com vegetação aquática (LAWRENCE, 2007).

Figura 1: *Danio rerio* (zebrafish)



Fonte: www.zebrafishfilm.org acesso em 19/11/18

As evidências coletadas até o momento indicam que o *Danio rerio* (Figura 1) apresenta-se em pequenos cardumes (5-20 indivíduos) em águas de movimento lento ou em corpos d'água paradas de planície (PRITCHARD et al., 2001). O *Danio rerio* é assincrônico, ou seja, os peixes dessa espécie não reproduzem todos ao mesmo tempo, desovando em pequenos grupos, e suas fêmeas depositam seus ovos sobre o substrato sem cuidados parentais (BREDER; ROSEN, 1966). A sua reprodução ocorre na chegada das chuvas, mas Spence e Smith (2006) propõem que sua reprodução depende mais da disponibilidade de alimentos, cujo nível está positivamente correlacionado com o aumento das chuvas, e não propriamente pela presença de chuva. Os ovos são demersais, ou seja, são mais densos que a água e, dependendo das condições (temperatura, química da água, etc.), eclodem dentro de 4-7 dias como larvas de natação livre (LAWRENCE, 2007). O *Danio rerio* macho é territorial em torno de locais potenciais de oviposição (SPENCE; SMITH, 2005) e também adota uma tática de acasalamento alternativa para perseguir fêmeas (GOOLISH EDWARD et al., 1998). As fêmeas exercem a escolha do companheiro (SPENCE; JORDAN; SMITH, 2006), que pode estar ligada a pistas olfatórias (GERLACH, 2006).

O *Danio rerio* tornou-se um modelo favorito de escolha na investigação biomédica uma vez que cobre uma ampla gama de temas, que vão desde a biologia do desenvolvimento e morfogênese para neurociência, a regeneração até o envelhecimento nas últimas décadas. Além disso, devido à sua facilidade de

manutenção e grande número de descendentes, a opção de conduzir avaliações genéticas e a clareza de observação de seus embriões em desenvolvimento constituem apenas alguns fatores que fazem do *Danio rerio* um organismo-modelo atraente em muitas das áreas das Ciências Biológicas (BOVINO, 2016).

O Sistema Nervoso Central do *Danio rerio* adulto apresenta organização geral e circuitos neuronais muito semelhantes ao dos mamíferos, e seu sistema motor, sensitivo e endócrino são bem desenvolvidos (SIEBEL, 2015).

O *Danio rerio* possui todos os neurotransmissores "clássicos" encontrados em vertebrados (RINKWITZ; MOURRAIN; BECKER, 2011), e seu sistema neuroendócrino permite diferentes respostas de estresse fisiológico (STEENBERGEN; RICHARDSON; CHAMPAGNE, 2011). Nesse sentido, uma gama muito ampla de modelos comportamentais bem estabelecidos em roedores já foram também validados para o *Danio rerio* (PETERSON et al., 2008).

2.2 Desreguladores endócrinos

Estudos (Bilotta et al 2005; Bretaud, et al., 2007), são indicativos que o *Danio rerio* representa um modelo útil e de fácil execução, sendo útil na análise de desreguladores endócrinos (DEs). Segundo o Programa Internacional de Segurança Química (IPCS), que envolve a Organização Mundial de Saúde (OMS) e o Programa das Nações Unidas para o Ambiente (PNUA) *“Um desregulador endócrino é uma substância ou um composto exógeno que altera uma ou várias funções do sistema endócrino e tem conseqüentemente, efeitos adversos sobre a saúde num organismo intacto, na sua descendência, ou (sub) populações, sendo definido não pela sua natureza química, mas de acordo com os seus efeitos biológicos”*, é possível então observar que os efeitos destes desreguladores pode ser devastador, e o uso de medicamentos ultradiluídos pode ser um caminho de reversão.

Os desreguladores endócrinos podem: danificar diretamente um órgão endócrino; alterar diretamente a função de um órgão endócrino; interagir com um receptor de hormônios ou alterar o metabolismo de um hormônio em um órgão endócrino (BONTOUX, 2001).

Bernardi et al. (2013), estudaram em *Danio rerio* a toxicidade do praguicida neem por meio de alterações na sua atividade geral, ansiedade e aprendizado em esQUIVA. Os autores demonstraram que o modelo animal *Danio rerio* expressa tanto os efeitos motores como de ansiedade promovidos pelo neem. Além disto, Blaser et al. (2010), desenvolveram o método comportamental para avaliação da ansiedade em peixes *Danio rerio*.

Bovino (2016) investigou os efeitos tóxicos da concentração subletal de Fipronil no comportamento do *Danio rerio* adulto como uma expressão da função SNC uma vez que comportamento é um indicador precoce da ocorrência de danos sutis do SNC.

Presentemente, apenas na base de dados Pub Med (www.pubmed.com.br), reconhecida base de dados, são computados 28.408 trabalhos empregando esse peixe como modelo para estudos nas mais diferentes áreas do conhecimento.

O Arseniato é um metalóide encontrado no meio ambiente, proveniente de rochas e solo, e encontrado em efluentes industriais, pesticidas e herbicidas, produto da queima de combustíveis fósseis, da mineração, utilizado como conservante de madeiras, na fabricação de papel e produção de metais como ferro e aço (GONTIJO; BITTENCOURT, 2005; NG *et al.*, 2003, apud Cagnin, 2013).

Os efeitos tóxicos causados pelos metais, como o Arseniato, variam de acordo com o tempo de exposição e a quantidade convertida a forma biodisponível, capaz de causar alterações nos organismos vivos (SOUZA, 2013).

A concentração de As em água potável, segundo a Organização Mundial da Saúde, não deve exceder 10 mg/L, valor adotado também pelo Ministério do Meio Ambiente do Brasil para água superficial propícia a tratamento para consumo humano, conforme estabelece a Resolução 357 do CONAMA de 17 de março de 2005 (<http://www.mma.gov.br/port/conama/res/res05/res35705.pdf>).

A forma inorgânica do Arseniato, que é carcinogênico, é a mais nociva ao homem. A exposição humana ao Arseniato ocorre mais comumente através da água contaminada, podendo, menos frequentemente, se dar também pelas formas de gás ou pó. A exposição crônica no ser humano está relacionada a casos de doenças metabólicas, hiperqueratose, câncer de pele e pulmonar, distúrbios do sistema nervoso e abortos. Os casos mais graves de intoxicação ocorreram em Bengala Ocidental

Bangladesh, México, Chile e Argentina, por consumo de água subterrânea (SILVA et al., 2006).

2.3 Homeopatia

A homeopatia foi fundamentada por Christian Frederich Samuel Hahnemann, médico alemão, em 1796, tendo como princípios a cura por medicamento que se enquadre nos princípios da semelhança, ultradiluição e dinamização. A homeopatia é uma prática médica reconhecida como especialidade pelo Conselho Federal de Medicina com mais de 200 anos de existência, em torno da qual vem ocorrendo avanços através da pesquisa científica. A homeopatia considera o indivíduo como um todo, e o processo de homeostase relacionado ao estado de saúde e de doença. A homeopatia mostra-se uma terapêutica segura e de baixo custo. Pelo princípio de Hahnemann, médico homeopata unicista, o medicamento homeopático para a mesma doença deve ser único, de acordo com cada paciente, pois age de forma individual. Já o médico homeopata pluralista e o alternista, prescrevem duas ou mais medicações, na forma de complexos, ou em administrações alternadas, de forma complementar.

Em relação aos princípios da ultradiluição e da dinamização, tiveram origem na preocupação de Hahnemann com quadros de intoxicações causadas pelas substâncias contidas nos medicamentos, caso fossem empregados em altas doses, sendo que diluídos não provocavam esses sintomas, além de aumentarem sua potência. Já o termo dinamização refere-se as diluições e sucussões sucessivas pelas quais passa o medicamento.

Os medicamentos homeopáticos contém baixa concentração da substância, estimulando, através do sistema imunológico, o organismo a restabelecer o equilíbrio ou homeostase, acelerando a cura. São derivados de substâncias do reino animal, vegetal e mineral, sendo que essas substâncias devem seguir as normas estabelecidas pela Farmacopéia Homeopática Brasileira, e outras estrangeiras. O

medicamento homeopático pode ser administrado sob diversas formas farmacêuticas, como esferas, preparações liofilizadas, micropartículas e soluções. A escala homeopática estabelece a quantidade de matéria-prima inerte e ativa presente no medicamento, sendo que a escala Decimal (X, D, CH) é a mais utilizada no Brasil; utiliza para cada parte de matéria-prima ativa, noventa e nove partes de matéria-prima inerte, totalizando cem partes. A farmacotécnica utiliza-se também das escalas Decimal (X, D, DH) e Cinquenta Millesimal (Q, LH). Os veículos mais utilizados são a água purificada e o etanol para as substâncias solúveis, e a lactose para as insolúveis.

2.3.1 Pesquisa em Homeopatia

Nos últimos 20 anos, diversos estudos experimentais têm sido realizados no universo das altas diluições, por exemplo os que utilizam moléculas endógenas ultradiluídas, isoterápicos (diluições homeopáticas da mesma substância causadora das alterações a serem tratadas) (Bonamin, et al., 2001; Bonamin, et al., 2013; Santana, et al, 2014 a), experimentos *in vitro*, modelos animais que desafiam o princípio de similitude propriamente dito (Coelho, et al., 2006; Santana, et al., 2014b), além do desenvolvimento de vários modelos experimentais que demonstram as propriedades físicas das altas diluições (Chaplin, 2007; Rey, 1998, 2000, 2003, 2007; Zacharias, 2008). No que diz respeito à pesquisa veterinária com ultradiluições, é importante considerar que o uso de medicamentos homeopáticos ou isopáticos adicionados à água de bebida ou à comida representa um potencial recurso zootécnico-sanitário com grande vantagem prática para o tratamento de grandes plantéis, dada a fácil administração e a ausência de resíduos químicos nos produtos derivados (carne, leite, ovos), que é base da pecuária orgânica. Vários são os trabalhos publicados que propõem tais métodos (Soto *et al.*, 2008; Soto *et al.*, 2008; Soto *et al.*, 2009; Soto *et al.*, 2010; Sato *et al.*, 2012; Coelho, et al 2014).

Os efeitos comportamentais e hematológicos de tratamento com *Chamomilla* 6cH em camundongos submetidos a estresse experimental são descritos por Pinto, et al. (2008) e sugerem que o tratamento com o medicamento homeopático está relacionado com a recuperação de condições basais comportamentais em camundongos submetidos a condições de estresse.

Bonamin et al. (2001), mostraram que a injeção simultânea de potências altas de dexametasona (15CH) inibiam a ação do tratamento farmacológico de doses de dexametasona in vivo, tanto no processo inflamatório (edema de pata) quanto na migração de células polimorfonucleares e nenhum efeito foi observado nas células tumorais inoculadas, já que o experimento utilizou como modelo experimental: inflamação aguda induzida pela carragenina, tumor de Ehrlich ascítico. Bonamin, et al. (2013) analisou os mecanismos de modulação do sistema imunológico com o medicamento ultradiluído Timulina 5CH em um modelo experimental de granuloma e concluiu que o tratamento com Timulina 5CH é capaz de melhorar o processo inflamatório e granuloma com a remissão da infecção, por modulação da diferenciação de fagócitos local e sistêmico.

Um trabalho realizado por Filippesen, et al. (2011) com *Aconitum napellus* 30 cH (indicado para tratamento de indivíduos que apresentam pavor e angústia, com medo da morte), visando reduzir o estresse, conseguiu influenciar positivamente a coloração da carne (vermelho vivo) ($p < 0,01$), chegando a conclusão de que a utilização do medicamento homeopático pode auxiliar no controle do estresse pré-abate, contribuindo para o bem-estar animal e na qualidade da carne.

Camargo, et al. (2013) ao analisar o efeito de *Arnica montana* dinamizada sobre o estresse oxidativo mitocondrial induzido por Ca² plus fosfato inorgânico e / ou Fe² lipídico +-citrato, mediada por oxidação por meio de mudanças nas taxas de consumo de oxigênio, perceberam que a *Arnica* inibiu a peroxidação lipídica das membranas mitocondriais. Em condições de estresse oxidativo, na presença de Ca² e fosfato inorgânico, os animais que receberam *Arnica montana* na 30cH tiveram uma diminuição significativa do consumo de O₂ mitocondrial em comparação com os animais do controle.

Baseado nos exemplos de trabalhos citados anteriormente, a proposta é trabalhar com as altas diluições neste Modelo experimental.

2.4 Modelos em Pesquisa Animal

Na escolha da espécie a ser utilizada na pesquisa, são pontos importantes o custo e facilidade de manutenção, a fertilidade, o tempo de desenvolvimento, a disponibilidade de dados genéticos, sua disponibilidade em comunidades de pesquisa, e a disponibilidade de dados como comportamento, habitat, características (MAXIMINO et al., 2015). Na neurociência, a escolha leva em conta a simplicidade do sistema nervoso. Historicamente, existem diversos organismos-modelos, dentre eles, primatas, ratos, camundongos, *Danio rerio*, *Xenopus*, *Drosophila*, e *C. elegans*.

Em relação ao *Danio rerio*, o adulto possui comportamento complexo, incluindo o que denota ansiedade, agressividade, interação com outros da mesma espécie, aprendizado e memória. Devido a essas características e por ser possível a utilização de ferramentas complexas de pesquisa, além da possibilidade de expor diversos indivíduos ao mesmo tempo à ação de drogas solúveis na água onde os animais se encontram, esse modelo animal vem se tornando muito utilizado na pesquisa científica. Avanços na área de neurociência indicam que o *Danio rerio* é um modelo funcional para a triagem de fármacos em larga escala, antes de sua validação em modelos roedores, além de serem possíveis testes como ensaios toxicológicos nas fases iniciais de desenvolvimento dessa espécie, que possui o embrião transparente (SIEBEL, 2015).

Além disso, os modelos comportamentais amplamente empregados em roedores já foram adaptados ao *Danio rerio*, produzindo resultados consistentes e comparáveis àqueles observados em animais de laboratório (MAXIMINO et al., 2015). As avaliações comportamentais em Ecotoxicologia empregando o *Danio rerio* como modelo podem, portanto, representar instrumento valioso como indicador precoce da ocorrência de danos sutis do SNC produzidos por poluentes ambientais (HILL et al., 2005) (SPITSBERGEN; KENT, 2007).

2.5 Testes Comportamentais

As análises ou testes comportamentais são métodos utilizados para avaliar alterações do Sistema Nervoso Central (SNC) causadas por neurotoxinas, daí a importância em realizar-se tais análises, que podem identificar danos leves ao SNC quando expomos os animais a substâncias químicas (HILL et al., 2005).

2.5.1 Campo Aberto

O comportamento natural do *Danio rerio* no campo aberto é caracterizado pela atividade natatória constante, com exploração do aquário como um todo.

O teste de campo aberto é muito utilizado em análises comportamentais na pesquisa básica, principalmente para identificar ansiedade e estresse, além do efeito de fármacos (Fig 2). Em estudos com *Danio rerio* o animal é colocado em um aquário simples, de uma só cor, sem divisórias ou estímulos, e seu comportamento em um intervalo de tempo é analisado, posteriormente através de um vídeo. O tempo do teste é variável, conforme o estudo. Nesse teste, são analisados diversos parâmetros, entre eles distância percorrida, velocidade média, permanência no fundo ou superfície do aquário, movimentos erráticos e *freezing* (corpo completamente imóvel). Os comportamentos de *freezing*, saltos e movimentos erráticos são pouco observados em condições naturais no *Danio rerio*. Durante o primeiro minuto, os animais costumam permanecer a maior parte do tempo no fundo do aquário, preferência que é reduzida com o passar do tempo. (SIEBEL et al, 2015).

São indicadores de ansiedade ou estresse a diminuição da atividade exploratória, aumento da permanência no fundo do aquário e ocorrência de movimentos erráticos, sendo sensíveis a diferentes fármacos. A utilização de fármacos ansiolíticos, como benzodiazepínicos produziu aumento na atividade exploratória. Animais tratados com as drogas fluoxetina e tranilcipromina passaram mais tempo na superfície do

aquário e apresentaram diminuição na atividade locomotora, indicando diminuição da ansiedade (SIEBEL *et al*, 2015).

Figura 2: Aparato experimental para teste de campo aberto redondo em *Danio rerio*



Fonte: Arquivo pessoal

2.5.2 Teste de neurotoxicidade (Campo Aberto retangular)

Os testes de toxicidade foram criados para determinar o potencial de novas substâncias e produtos capazes de causar danos à saúde humana e animal (BOVINO, 2016).

Figura 3: Aparato experimental para teste de campo aberto retangular em *Danio rerio*.



Fonte: Arquivo pessoal

2.5.3 Teste Claro/Escuro

Esse teste foi desenvolvido por Crawley e colaboradores e consiste em um modelo de conflito entre a tendência em explorar ambientes desconhecidos e a aversão inata do animal a áreas abertas e iluminadas. Seu objetivo é avaliar o comportamento de animais colocados individualmente em uma caixa experimental contendo dois compartimentos, um claro e outro escuro, através da quantificação de transições realizadas entre os compartimentos, bem como o tempo de permanência em cada compartimento (CAMPOS, 2016).

A partir de estudos que empregaram o Teste de Claro/Escuro em *Danio rerio*, foi verificado que o peixe possui uma preferência inata pela área mais escura do aquário e, dessa forma, sendo o comportamento do *Danio rerio* sensível a manipulações ansiolíticas e ansiogênicas, normalmente drogas com efeitos ansiolíticos, como *Arsenicum album*, induzem ao aumento no número de entradas na área clara e aumentam o tempo de permanência nessa área, enquanto drogas ansiogênicas, como o Arseniato, produzem o efeito contrário, ou seja, maior número de entradas e tempo de permanência no lado escuro (CAMPOS, 2016).

Figura 4: Aparato experimental para teste de claro/escuro em *Danio rerio*



Fonte: Arquivo pessoal

3 OBJETIVO

- Avaliar alterações comportamentais no *Danio rerio* induzidas pelo metal pesado Arseniato, através da análise da atividade locomotora e parâmetros relacionados à ansiedade.
- Verificar se os medicamentos utilizados podem diminuir o nível de estresse/ansiedade destes animais.
- Validar o Modelo de *Danio rerio* para experimentos com ultradiluições (homeopatia).

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Animais

Os experimentos foram conduzidos no Laboratório da Universidade de Santo Amaro (UNISA) – Campus I, São Paulo/SP. Empregados peixes da espécie *Danio rerio* (machos) com 4 a 5 cm de comprimento, adquiridos como doação do Instituto Butantan, e acondicionados em aquários na Universidade de Santo Amaro (Unisa – Campus I), foram mantidos em condições de laboratório que serão descritas a seguir.

Para caracterização física e química da água de manutenção e cultivo, foram efetuadas análises físicas e químicas nas amostras – temperatura, pH, condutividade, oxigênio dissolvido, alcalinidade.

Condições de manutenção dos organismos

Os organismos obtidos foram dispostos inicialmente em aquários com capacidade total de 100 litros, onde foram colocados 80 litros de água de manutenção obtida de rede de abastecimento, descloradas com aeração intensa durante 24 horas. No recipiente foi colocada uma quantidade de organismos que mantenham a relação entre massas dos organismos e volume de água de manutenção igual 1,0 g de peixe por litro de água, conforme recomendada a norma CETESB L5.019-II, (1990). Após um período de aclimação de 24 horas, os peixes foram mantidos nesta condição durante uma semana para aclimação total.

Água de manutenção foi mantida à temperatura de 25°C (\pm 2°C), e pH 7,0(\pm 0,2°C), intensidade luminosa de 600 lux e fotoperíodo de 12 horas/luz. A água foi aerada por meio de compressores de ar com saídas conectadas a sistemas de filtragem com lã acrílica e carvão ativo, auxiliando, assim, a manutenção de qualidade de água, embora 25% do volume total foi trocado a cada 7 dias.

A alimentação dos peixes constituiu de rações destinadas a essa finalidade que contenham pelo menos 40% de proteína bruta e fornecendo-se diariamente a média de 4% de ração por massa fresca dos peixes. Na alimentação dos organismos, foi utilizada a ração Tetramin® ministrada conforme recomendado pelo fabricante.

Os medicamentos foram feitos segundo a farmacotécnica e Farmacopéia Homeopática.

4.2 Delineamento experimental

4.2.1 Tratamentos

Foram utilizados 32 animais distribuídos em 4 grupos de 8 animais cada, 3 grupos ficaram 4 dias (96 horas) expostos ao Arseniato (Na_2HAsO_4 – Arseniato de sódio) na concentração de 5 mg/L de água, segundo Baldissarelli et al. (2012) esta dosagem na água onde os animais se encontram, é capaz de promover a redução significativa na atividade locomotora e um aumento no tempo gasto na zona inferior do tanque de teste, sugerindo um efeito ansiogênico.

Um grupo não recebeu nenhum tratamento (Controle Branco). Os dados coletados no Grupo Controle, foram utilizados para todos os experimentos diminuindo assim o número de animais. O desenho experimental foi planejado para atender aos requisitos de bem estar animal e ao conceito dos 3 Rs (*reduction, replacement, refinement*).

Grupo CB – Controle Branco;

Grupo 1 – com Arseniato, recebeu 0,5ml/L de *Arsenicum álbum* 6 cH;

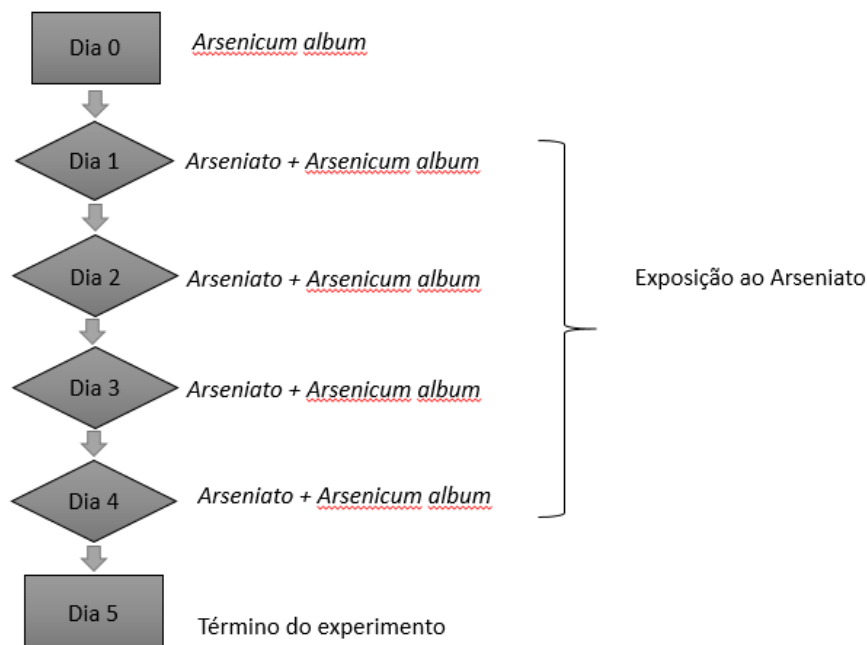
Grupo 2 - com Arseniato, recebeu 0,5ml/L de *Arsenicum álbum* 30 cH;

Grupo 3 - com Arseniato, recebeu 0,5ml/L de solução inerte.

Todos os medicamentos homeopáticos que trataram os metais pesados, iniciaram 5 dias antes do término do experimento (portanto os animais já estavam tomando a medicação 24 horas antes da exposição).

O estudo foi realizado em cego e os códigos foram revelados somente após os resultados da análise estatística.

Figura 5 : Fluxograma do tratamento homeopático e da exposição de *Danio rerio* ao Arseniato, de acordo com os dias do experimento.



4.2.2 Testes Comportamentais

Todos os experimentos a seu tempo, passaram pelas mesmas etapas a seguir:

4.2.2.1 Avaliação dos sinais de neurotoxicidade do *Danio rerio*, após exposição às diferentes substâncias:

Parâmetros observados: tempo e frequência na superfície e movimentos erráticos. Para a presença de tremores e movimentos erráticos foram atribuídos escores: ausente-0, leve-1, média-2, moderada-3, forte-4 e muito forte-5.

Os parâmetros observados foram gravados através de câmeras Go Pro e posteriormente analisados em vídeos no programa Windows Media Player. Alguns dos vídeos foram analisados em câmera lenta para melhor visualização dos movimentos dos animais.

4.2.2.2 Resposta de peixes *Danio rerio* no teste de atividade geral em campo aberto.

Os peixes foram transferidos para o campo aberto sendo observados por 5 minutos. Os seguintes parâmetros foram gravados em câmeras Go Pro e observados posteriormente através de vídeos gravados: tempo em segundos de locomoção e imobilidade.

4.2.2.3 Resposta do peixe *Danio rerio* no teste de ansiedade.

O *Danio rerio* foi colocado em outro aquário de 40 centímetros (cm) de comprimento com água, o qual é dividido em 3 compartimentos: o primeiro claro (20 cm), o diametralmente oposto escuro (20 cm) e o intermediário (10 cm) que serviu como local de habituação para o peixe. O animal foi colocado no compartimento intermediário aguardando-se a habituação por 2 minutos. A seguir as paredes deste compartimento foram retiradas e medimos o número de vezes que o animal cruzou o compartimento claro para o escuro, o tempo que o peixe permaneceu em cada lado, o número de tentativas de entrar em cada compartimento e o tempo de imobilidade em cada compartimento. Os testes foram feitos em duas condições de luz: luz normal do laboratório e luz colocada diretamente no lado claro do aquário.

4.3 Descarte das carcaças e de resíduos (água comprometida com o Metal pesado).

O metal foi precipitado no local de sua geração. O resíduo líquido aquoso foi descartado na pia, somente após análise para verificação da eficiência do procedimento de precipitação e acerto de pH. O precipitado foi empacotado e armazenado em depósitos até sua retirada por empresa credenciada (em anexo “Cadri”: “Certificado de movimentação de resíduos de interesse ambiental”. Validade Unisa: 10/01/2018).

Procedimento: Metais pesados (e seus sais): identificar, precipitar (como sais insolúveis), filtrar e recolher o sólido em recipientes separados. A precipitação foi realizada com soda cáustica ($\text{NaOH} + \text{Na}_2\text{CO}_3$) em excesso. Neutralizou-se o sobrenadante, verificou-se a eficiência da precipitação e o descarte foi realizado na pia sob água corrente.

As carcaças dos peixes foram colocadas em saco apropriado para descarte, mantidas em câmara fria e posteriormente levadas para incineração, pelos órgãos competentes (Informações cedidas pelo responsável pelos laboratórios da Universidade – Campus I).

I- Forma de análise dos Resultados (estatística)

Para análise dos dados da atividade geral foi empregada a ANOVA de dados repetidos. Para a análise dos testes de ansiedade foi empregada a ANOVA para os dados independentes. E na análise do aprendizado foi empregado o teste T de Student. O valor de $P < 0,05$ foi considerado capaz de indicar diferenças significativas (Zar, 2010).

5 RESULTADOS

Por meio da análise estatística pode-se observar (Tabela 1), que no Campo Aberto, nos animais que foram submetidos ao Arseniato sem receber a medicação, houve uma diminuição do número total de quadrantes percorridos ($346,2 \pm 41,33$) em relação ao controle ($520,5 \pm 131,6$). *Arsenicum* 6 cH aumentou o número de quadrantes totais percorridos pelo peixe no campo aberto ($525,0 \pm 142,3$).

Por meio da análise dos dados da Tabela 2, podemos observar, no grupo controle positivo, um aumento no escore de movimentos erráticos ($3,5 \pm 0,7$) em relação ao controle ($1,7 \pm 0,9$).

Analisando-se os dados da Tabela 3, podemos observar que houve uma diminuição na locomoção (quadrantes) no claro ($96,2 \pm 63,7$) por parte do grupo controle positivo em relação ao grupo controle ($201,8 \pm 89,2$). O grupo que tomou *Arsenicum album* 6 cH reverteu todos os parâmetros do controle positivo (solução hidroalcoólica) de forma estatisticamente significativa, mantendo os valores de tempo do lado escuro, tempo de lado claro, locomoção do lado claro (respectivamente $161,6 \pm 63,7$; $138,4 \pm 96,3$; $121,0 \pm 49,8$) próximos dos animais controle. O tempo no lado claro para os animais tratados com *Arsenicum album* 6 cH, em relação ao grupo controle, mostrou-se mais semelhante, e o mesmo ocorreu em relação ao tempo no lado escuro.

Em relação aos gráficos 1 e 2, foi observado no teste claro/escuro aumento do tempo (segundos) dos animais do lado escuro ($245,3 \pm 61,82$) em relação ao controle ($101,1 \pm 62,3$) e consequente diminuição no lado claro ($54,3 \pm 36,3$) em relação ao controle ($198,9 \pm 62,3$).

Em relação aos movimentos erráticos (gráfico 3), observou-se que esse comportamento diminuiu tanto para os animais tratados com a concentração 6 cH quanto para os tratados com a concentração 30 cH de *Arsenicum album* quando comparado ao controle positivo.

Tabela 1 – Média \pm desvio padrão dos grupos Controle Branco, Controle Positivo, *Arsenicum album* 6 cH, *Arsenicum album* 30 cH com relação ao tempo em segundos de locomoção e imobilização, e quadrantes totais percorridos por *Danio rerio* no aparato experimental Campo Aberto Redondo

	Controle branco (media \pm dp)	Sol. Hidroalcoólica Controle positivo (media \pm dp)	<i>Arsenicum album</i> 6 cH (media \pm dp)	<i>Arsenicum album</i> 30 cH (media \pm dp)
LOCOMOÇÃO (seg)	278,4 \pm 30,50	299,9 \pm 0,37	247,3 \pm 61,81	286,4 \pm 19,23
IMOBILIZAÇÃO (seg)	11,29 \pm 14,12	0,14 \pm 0,37	34,29 \pm 35,71 ^a	13,63 \pm 19,23
QUADRANTES TOTAIS	520,5 \pm 131,6 ^a	346,2 \pm 41,33	525,0 \pm 142,3 ^a	409,0 \pm 72,62

ANOVA, Teste de Tukey, a $p < 0.05$ em relação ao grupo Solução Hidroalcoólica.

Tabela 2 – Média \pm desvio padrão dos grupos Controle Branco, Controle Positivo, *Arsenicum album* 6 cH, *Arsenicum album* 30 cH com relação ao tempo em segundos de permanência no fundo do aquário, na superfície do aquário, e de apresentação de movimentos erráticos de *Danio rerio* no aparato experimental Campo Aberto Retangular (Neurotoxicidade)

	Controle branco	Sol. Hidroalcoólica Controle positivo (media \pm dp)	<i>Arsenicum album</i> 6 cH (media \pm dp)	<i>Arsenicum album</i> 30 cH (media \pm dp)
--	--------------------	--	---	--

TEMPO NO FUNDO DO AQUÁRIO (seg)	278,4±30,50	299,9±0,37	247,3±61,81	286,4±19,23
TEMPO NA SUPERFÍCIE (seg)	11,29±14,12	0,14±0,37	34,29±35,71 ^a	13,63±19,23
MOVIMENTOS ERRÁTICOS (ESCORE)	1,7±0,9 ^a	3,5±0,7	2,5±1,1 ^b	0,66±1,0 ^a

ANOVA, Teste de Tukey, a $p < 0.05$ em relação ao grupo Solução Hidroalcoólica.

b $p < 0.05$ em relação ao grupo *Arsenicum album* 30 cH.

Tabela 3 - Média ± desvio padrão dos grupos Controle Branco, Controle Positivo, *Arsenicum album* 6 cH, *Arsenicum album* 30 cH com relação ao tempo em segundos no lado claro, no lado escuro, tempo de imobilização, frequência de entradas no lado claro, no lado escuro, e número de quadrantes percorridos por *Danio rerio* no lado claro no aparato experimental para teste de claro/escuro

	Controle (média±dp)	Sol. Hidroalcoólica Controle positivo (média±dp)	<i>Arsenicum album</i> 6 cH (média±dp)	<i>Arsenicum album</i> 30 cH (média±dp)
TEMPO LADO CLARO (seg)	198,9±62,3	54,3±36,3 ^a	138,4±96,3 ^b	36,5±29,2 ^a
TEMPO LADO ESCURO (seg)	101,1±62,3	245,3±61,82 ^a	161,6±63,7 ^{bc}	263,5±28,6 ^a
IMOBILIZAÇÃO	0	0	0	0
ENTRADA LADO CLARO (frequência)	11,88±8,1	13,63±6,9	8,50±5,4	10,00±5,8
ENTRADA LADO ESCURO (frequência)	12,38±8,2	15,29±6,5	8,75±5,4	10,63±5,7
LOCOMOÇÃO NO CLARO (quadrantes)	201,8±89,2	96,2±63,7 ^a	121,0±49,8	71,8±43,9 ^a

ANOVA, Teste de Tukey, ^a $p < 0.05$ em relação ao grupo Controle. ^b $p < 0.05$ em relação ao grupo *Arsenicum album* 30 cH. , ^c $p < 0.05$ em relação ao grupo Controle

Gráfico 1 – Média \pm desvio padrão de tempo em minutos de permanência no lado claro do aparato experimental para teste de claro/escuro dos diferentes grupos de *Danio rerio*.

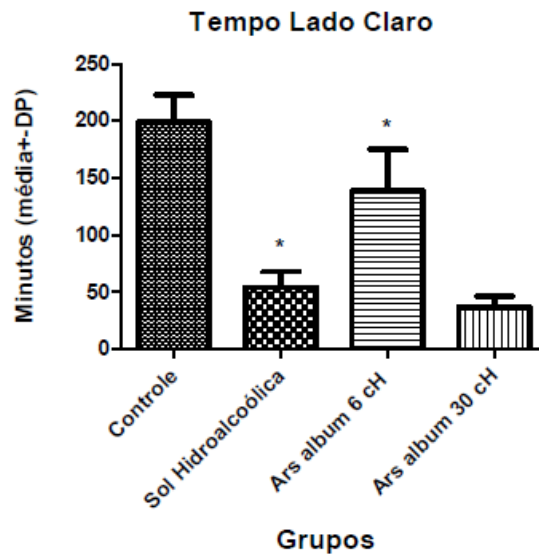


Gráfico 2 – Média \pm desvio padrão de tempo de permanência no lado escuro do aparato experimental para teste de claro/escuro dos diferentes grupos de *Danio rerio*.

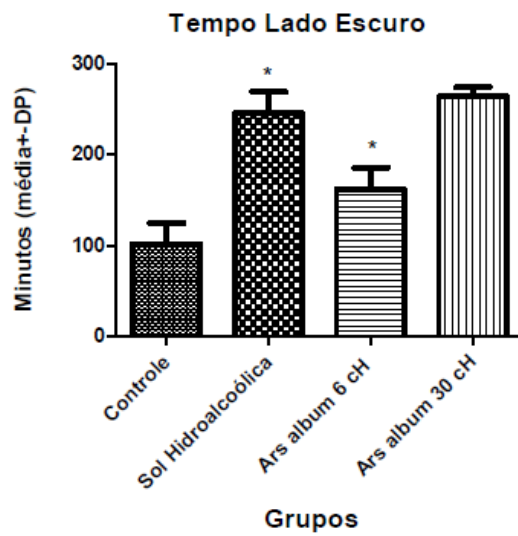
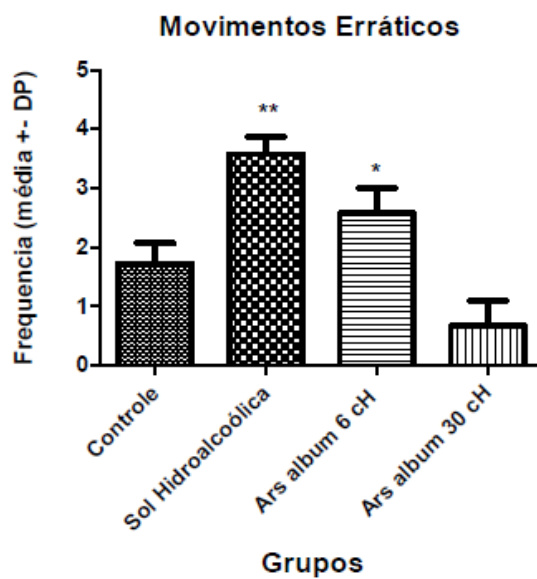


Gráfico 3 – Média \pm desvio padrão da frequência de movimentos erráticos dos diferentes grupos de *Danio rerio*.



6 DISCUSSÃO

O *Danio rerio* como modelo experimental com ultradiluições mostrou-se adequado, devido ao fato de apresentar vantagens em relação aos roedores, como custo de manutenção, facilidade de manejo em pequenos espaços e facilidade de administração desses fármacos, na água em que se encontram os animais (BOVINO, 2016). Este mesmo autor analisou a atividade geral de *Danio rerio* sob a exposição à concentração subletal do fipronil analisando os seguintes parâmetros: tremores, número de vezes que o peixe subiu à superfície da água, colocando sua boca próxima à superfície, tempo em segundos que o peixe permaneceu na superfície da água, frequência de natação errática, atividade motora em campo aberto, teste de preferência claro/escuro, entre outros, chegando à conclusão de que a exposição aguda à concentração subletal do fipronil promoveu aumento da ansiedade do *Danio rerio* uma vez que houve redução do número de tentativas de entradas no lado claro e aumento da imobilidade.

CAMPOS (2016) Investigou os efeitos da cetamina sobre a ansiedade e a agressividade em *Danio rerio* adultos empregando Testes de Claro-Escuro e Testes do Espelho, indicando que a cetamina produziu um efeito significativo dose-dependente em *Danio rerio* adulto na latência à área clara, no número de cruzamentos entre as áreas e no tempo de exploração da área clara. Analisando-se os dados da Tabela 3, podemos observar que houve uma diminuição na locomoção (quadrantes) no claro ($96,2 \pm 63,7$) por parte do grupo controle positivo em relação ao grupo controle ($201,8 \pm 89,2$), o que condiz com o resultado de CAMPOS (2016) em relação ao efeito ansiogênico da cetamina.

MAXIMINO (2014) estudou o papel da serotonina no comportamento defensivo de *Danio rerio* com base em modelos comportamentais, observando um aumento nos níveis extracelulares de serotonina associados a um aumento no *freezing* e movimentos erráticos. Segundo o autor, os transtornos de ansiedade apresentam a maior incidência na população mundial dentre os transtornos psiquiátricos, e a eficácia clínica das drogas ansiolíticas é baixa, motivo pelo qual a descoberta de novas drogas ansiolíticas é de grande importância. Comparando-se com os resultados obtidos no presente experimento, por meio da análise dos dados da Tabela 2, podemos observar, no grupo controle positivo, um aumento no escore de movimentos erráticos ($3,5 \pm 0,7$) em relação

ao controle ($1,7 \pm 0,9$), comprovando o efeito tóxico do metal pesado sobre os animais. O grupo que foi medicado com o *Arsenicum album* 30 cH, demonstrou uma diminuição dos movimentos erráticos ($0,66 \pm 1,0$) em relação aos animais intoxicados, aproximando-se dos valores do grupo controle. *Arsenicum album* 6 cH diminuiu o número de movimentos erráticos ($2,5 \pm 1,1$), demonstrando capacidade ansiolítica.

MOREIRA et al (2008), em um trabalho com praguicidas organofosforados, verificou que o tratamento com os sete medicamentos homeopáticos (*Antimonium crudum*; *Kali carbonicum*; *Mercurius solubilis*; *Sulphur*; *Natrum muriaticum*; *Aurum metallicum*; *Ammonium muriaticum*) utilizados segundo o método FAO, protegeu os animais previamente intoxicados (DL50 do Chlorpiriphos e DL50 do Methamidophos) da ocorrência de óbito tanto quanto o tratamento com o sulfato de atropina, o que pode indicar uma reversão do quadro de intoxicação, com uso de medicamentos ultradiluídos. Podemos comparar esses resultados com os do presente trabalho, onde foi observado que o grupo que tomou *Arsenicum album* 6 cH reverteu todos os parâmetros do controle positivo (solução hidroalcoólica) de forma estatisticamente significativa em relação aos movimentos erráticos (gráfico 3), observando-se que esse comportamento diminuiu tanto para os animais tratados com a concentração 6 cH quanto para os tratados com a concentração 30 cH de *Arsenicum album* quando comparado ao controle positivo, podendo indicar uma reversão do quadro de intoxicação.

Conforme a tabela 1, no Campo Aberto, para os animais que foram submetidos ao Arseniato sem receber a medicação, houve uma diminuição do número total de quadrantes percorridos ($346,2 \pm 41,33$) em relação ao controle ($520,5 \pm 131,6$). *Arsenicum* 6 cH aumentou o número de quadrantes totais percorridos pelo peixe no campo aberto ($525,0 \pm 142,3$), o que condiz com dados de literatura que relatam aumento na atividade locomotora, conforme há diminuição da ansiedade. A análise da locomoção ou atividade natatória é utilizada como índice de ansiedade e a supressão desta atividade é indicativa de ansiedade (Blaser et al. 2009).

Analisando-se os dados da Tabela 3, podemos observar que houve uma diminuição na locomoção (quadrantes) no claro ($96,2 \pm 63,7$) por parte do grupo controle positivo em relação ao grupo controle ($201,8 \pm 89,2$). O grupo que tomou *Arsenicum album* 6 cH reverteu todos os parâmetros do controle positivo (solução hidroalcoólica)

de forma estatisticamente significativa, mantendo os valores de tempo do lado escuro, tempo de lado claro, locomoção do lado claro (respectivamente $161,6 \pm 63,7$; $138,4 \pm 96,3$; $121,0 \pm 49,8$) próximos dos animais controle. O tempo no lado claro para os animais tratados com *Arsenicum album* 6 cH, em relação ao grupo controle, mostrou-se mais semelhante, e o mesmo ocorreu em relação ao tempo no lado escuro. Peixes quando tratados com ansiolíticos tendem a permanecer mais tempo do lado claro, o que revela uma diminuição da ansiedade (Serra et al. 1999). Em relação à locomoção no claro, houve maior semelhança entre o grupo controle e os tratados com *Arsenicum album* 6 cH.

Em relação aos gráficos 1 e 2, o metal Arseniato produziu um efeito ansiogênico nos animais que foram submetidos a ele sem medicação (grupo solução hidroalcoólica, controle positivo), isso foi observado no teste claro/escuro através do aumento do tempo (segundos) dos animais do lado escuro ($245,3 \pm 61,82$) em relação ao controle ($101,1 \pm 62,3$) e consequente diminuição no lado claro ($54,3 \pm 36,3$) em relação ao controle ($198,9 \pm 62,3$).

Em relação aos movimentos erráticos (gráfico 3), observou-se que esse comportamento diminuiu tanto para os animais tratados com a concentração 6 cH quanto para os tratados com a concentração 30 cH de *Arsenicum album* quando comparado ao controle positivo. Reações de alarme (resposta endócrina) ocorrem a partir do primeiro contato com o estímulo aversivo ou a um ambiente novo e evocam características comportamentais que podem ser observadas e quantificadas em laboratório, como: fuga do predador/locomoção aumentada; apresentam movimentos erráticos; ficam no fundo do aquário (Gebauer, 2010). Em relação aos movimentos erráticos, observou-se que esse comportamento diminuiu tanto para os animais tratados com a concentração 6 cH quanto para os tratados com a concentração 30 cH quando comparado ao controle positivo (solução hidroalcoólica).

7 CONCLUSÃO

- Os animais foram intoxicados pelo metal pesado Arseniato que provocou aumento da ansiedade;

- O quadro de ansiedade foi revertido pelo medicamento *Arsenicum album*, que na concentração 6cH mostrou-se mais efetivo como um possível ansiolítico.

- O *Danio rerio* mostrou-se um modelo adequado, pois apresenta vantagens em relação aos roedores, como custo de manutenção, facilidade de manejo em pequenos espaços e facilidade de administração desses fármacos. Outros estudos necessitam ser realizados.

REFERÊNCIAS

- ARUNACHALAM, M, RAJA, M, VIJAYAKUMAR, C, MALAIAMMAL, P, Mayden, RI. **Natural history of zebrafish (Danio rerio) in India.** Zebrafish, 2013;10(1):1–14.
- BALDISSARELLI, LA; CAPIOTTI, KM; BOGO, MR; GHISLENI, G; BONAN, CD. Arsenic alters behavioral parameters and brain ectonucleotidases activities in zebrafish (Danio rerio). **Comparative Biochemistry and Physiology, Part C** 155 (2012) 566–572.
- BARBOSA, A.D.A.; OLIVEIRA, R.H.F.; PEREIRA-DA-SILVA, E.M. Método alternativo para a determinação de glicemia em campo: aplicabilidade em lambaris (*Astyanax altiparanae*). On line: <https://uspdigital.usp.br/siicusp/cdOnlineTrabalhoVisualizarResumo?numeroInscricaoTrabalho=1437&numeroEdicao=20> . Acesso em junho/2016.
- BEECHAM, R.V.; SMALL, B.C.; MINCHEW, C.D. Using Portable Lactate and Glucose Meters for Catfish Research: Acceptable Alternatives to Established Laboratory Methods ? **North American Journal of Aquaculture.** Volume 68, Issue 4, 2006.
- BERNARDI MM, DIAS SG, BARBOSA Ve. Neurotoxicity of neem commercial formulation (*Azadirachta indica* A. Juss) in adult zebrafish (*Danio rerio*). **Environmental toxicology and pharmacology**, 2013 Nov;36(3):1276–82.
- BILOTTA J, RISNER ML, DAVIS EC, HAGGBLOOM SJ. **Assessing appetitive choice discrimination learning in zebrafish.** Zebrafish. 2005;2(4):259–68.
- BLASER RE, CHADWICK L, MCGINNIS GC. Behavioral measures of anxiety in zebrafish (*Danio rerio*). **Behavioural Brain Research.** 2010;208(1):56–62.
- BONAMIN, L.V.; MARTINHO, K.S.; NINA, A.L.; CAVIGLIA, F.; DO RIO, R.G. **Very high dilutions of dexamethasone inhibit its pharmacological effects in vivo.** British Homeopathic Journal. v. 90: p. 198–203, 2001.
- BONAMIN, L. V. et al. Immunomodulation of homeopathic thymulin 5ch in a bcg-induced granuloma model. **E-cam**, 2013.

BOVINO, E. E. **Toxicidade aguda do fipronil em peixes *Danio rerio* (zebrafish)**. 2016. 57 p. Tese (Doutorado) - Departamento de Patologia Ambiental e Experimental, Universidade Paulista, São Paulo, 2016.

BRETAUD S, PAGNON-MINOT A, GUILLON E, RUGGIERO F, LE GUELLEC D. **Characterization of spatial and temporal expression pattern of Col15a1b during zebrafish development**. Gene expression patterns : GEP. 2010;11(1-2):129–34.

CAGNIN, R.C. **Efeitos da exposição ao arsênio sobre juvenis de robalo-peva (*Centropomus parallelus* (Teleostei: Centropomidae) em diferentes salinidades**. 91 p. Dissertação (mestrado) - Centro de Ciências Humanas e Naturais, Pós Graduação em Oceanografia Ambiental, Universidade Federal do Espírito Santo, Espírito Santo, 2013.

CAMARGO, R.A.; COSTA, E.D.; CATISTI, R. **Effect of the oral administration homeopathic *Arnica montana* on mitochondrial oxidative stress**. Homeopathy, 102, p.49-53. 2013.

CAMPOS, E. G. **Zebrafish como organismo-modelo para análises de efeitos comportamentais e toxicológicas da cetamina empregando cromatografia em fase gasosa e estatística multivariada**. 72 p. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, USP, Ribeirão Preto, 2016.

CASSU, R.N.; ANDREAZI, C.D.; PEREIRA, L. **Efeito da *Matricaria chamomilla* ch12 na resposta de estresse em cães**. Colloquium Agrariae, v. 7, n.2 Jul-Dez., p. 01-07, 2011.

CATTANI, O.; SERRA, R.; ISANI, G. et al. Correlation between metallothionein and energy metabolism in sea bass, *Dicentrarchus labrax*, exposed to cadmium. **Comp. Bioch. Physiol.**, v.113, p.193-199, 1996.

CAVAS, T.; GARANKO, N.N.; ARKHIPCHUK, V.V. Induction of micronuclei and binuclei in blood, gill and liver cells of fishes subchronically exposed to cadmium chloride and copper sulphate. **Food Chem Toxicol**, 43:569–574. 2005.

CETESB- Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental. L 5.019-I-água-teste de toxicidade aguda com peixes. São Paulo, 1990 Norma Técnica.

CHAPLIN, M. F. The Memory of Water: an overview. **Homeopathy**. V. 96,p. 143-150, 2007.

COELHO, C. P., D' ALMEIDA, V., PEDRAZOLLI NETO, M., DURAN-FILHO, C., FLORIO, J. C., ZINCAGLIA, L. M. C., BONAMIN, L. V. Therapeutic and Pathogenic animal models for *Dolichos pruriens*. **Homeopathy**, v. 95, p. 136-143, 2006.

COELHO, C. P., VUADEN ER, BONAMIN, L. V. et al. Pilot study: evaluation of homeopathic treatment of Escherichia coli infected swine with identification of virulence factors involved. *Int J High Dilution Res* 2014; 13(49):197-206.

FILIPPSEN, L. F.; MOLETTA, J.L.; MINHO, A. P.; SILVA, N. L.; STRACK, M. G.; KUSS, F.; RODRIGUES, M. R. L. ***Aconitum napellus* No Pré-Abate E Seu Efeito Na Qualidade Da Carne Bovina**. In: 38º COMBRAVET Florianópolis- Santa Catarina, 2011.

GARCIA-SANTOS, S.; MONTEIRO, S.M.; CARROLA, J.; FONTAINHAS-FERNANDES, A. Alterações histológicas em brânquias de tilápia nilótica *Oreochromis niloticus* causadas pelo cádmio. [Histological alterations in gills of Nile tilapia *Oreochromis niloticus* caused by cadmium]. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, v.59, n.2, p.376-381, 2007.

HILL, A.J. Zebrafish as a Model Vertebrate for Investigating Chemical Toxicity. **Toxicological sciences : an official journal of the Society of Toxicology**. 86(1): 6-19. 2005. Disponível em : <<https://zfin.org/ZDB-PUB-050211-1>>Acesso em 25 nov. 2018

IWANA, G.K.; MORGAN, J.D. Simple field methods for monitoring stress and general condition of fish. **Aquaculture research**, 26, 273-282, 1995.

IWAMA, G.K.; PICKERING, A.D.; SUMPTER, J.P.; SCHRECK, C.B. Fish stress and health in aquaculture. Society for Experimental Biology Seminar Series 62. Online: [https://books.google.com.br/books?hl=pt-](https://books.google.com.br/books?hl=pt-BR&lr=&id=xKKBmYE7WXwC&oi=fnd&pg=PA247&dq=glucometer+fish+research&ots=4FNVzjaeJY&sig=y-Vs2s_WkjDJqtBTSJapy4DFBxg#v=onepage&q&f=false)

[BR&lr=&id=xKKBmYE7WXwC&oi=fnd&pg=PA247&dq=glucometer+fish+research&ots=4FNVzjaeJY&sig=y-Vs2s_WkjDJqtBTSJapy4DFBxg#v=onepage&q&f=false](https://books.google.com.br/books?hl=pt-BR&lr=&id=xKKBmYE7WXwC&oi=fnd&pg=PA247&dq=glucometer+fish+research&ots=4FNVzjaeJY&sig=y-Vs2s_WkjDJqtBTSJapy4DFBxg#v=onepage&q&f=false) . Acesso em fevereiro.2016.

KONDERA, E.; ŁUGOWSKA, K.; SARNOWSKI, P. High affinity of cadmium and copper to head kidney of common carp (*Cyprinus carpio* L.). **Fish Physiol Biochem.** 2014; 40(1): 9–22.

MARCONDES, A. L. Estresse e habilidade de aprendizado na Tilápia-do-Nilo. Botucatu, 2002. **Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas)** – Centro de Zoologia, UNESP.

MOREIRA, H.M. et al. Reversão de intoxicação experimental por praguicidas organofosforados em ratos com medicamentos homeopáticos. **Brazilian Homeopathic Journal.** v. 10 n.1 1-7, 2008. Disponível em <<http://www.ihb.org.br/ojs/index.php/artigos>>. Acesso em: 23 nov.2018

NETTER, K.J. Fundamentals of aquatic toxicology — Methods and applications. **Toxicology.** 1985. p. 181–2.

OKAMURA, D.; ARAÚJO, F.G.; LOGATO, P.V.R.; MURGAS, L.D.S.; FREITAS, R.T.F.; ARAÚJO, R.V. Efeito da vitamina C sobre o hematócrito e glicemia de alevinos de tilápia-do-nilo (*Oreochromis niloticus*) em transporte simulado. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, v.59, n.4, p.883-888, 2007.

PALIOURA, E. E E. DIAMANTI-KANDARAKIS. Industrial endocrine disruptors and polycystic ovary syndrome. **J Endocrinol Invest**, v.36, n.11, Dec, p.1105-1111. 2013.

PINTO, S. A. G.; BOHLAND, E.; COELHO, C. P.; MORGULIS, S. M. F. A.; BONAMIN, L. V. **Um modelo animal para o estudo da *Chamomilla* em stress e depressão: estudo piloto.** Homeopathy. v. 97, n. 3, p. 141-144, 2008.

REY, L. Low-temperature thermoluminescence. **Nature**;391:418, 1998 .

REY, L. Thermoluminescence de la glace. C. R. **Acad Sci Paris**;1(IV):107-10, 2000.

REY, L. Thermoluminescence of ultra-high dilutions of lithium chloride and sodium chloride. **Physica A**.323:67, 2003.

REY, L. Can low temperature thermoluminescence cast light on the nature of ultra-high dilutions? **Homeopathy.** v. 96, p. 170-174, 2007.

SANTANA, F.R. et al. Modulation of inflammation response tom urine cutaneous

Leishmaniosis by homeopathy medicines: Thymulin 5cH. **Homeopathy**, v.103, p. 275-284. 2014a.

SANTANA, FR, DE PAULA COELHO C, CARDOSO TN, PEREZ HURTADO EC, ROBERTI BENITES N, DALASTRA LAURENTI M, *et al.* Modulation of inflammation response to murine cutaneous Leishmaniasis by homeopathic medicines: Antimonium crudum 30cH. **Homeopathy**, v. 103, p.264-74. **doi: 10.1016/j.homp.2014.08.006**. Epub 2014 Oct 3. 2014b.

SATO, C; LISTAR, V.G.; BONAMIN, L.V. Development of Broiler Chickens after treatment with Thymulin 5cH: a zoo technical approach. **Homeopathy**, v. 101, p.68-73, 2012.

SANTOS, C.R.; SILVA, E.S.; PAIVA, R.O.; OLIVEIRA, V.P.S.; BURLA, R.S.; BASTOS, J.C.; OLIVEIRA, M.M. Efeito do Triclorfon (Masoten®) sobre as esterases de *Oreochromis niloticus*. In: II Seminário sobre Ecotoxicologia Aquática. 19- 20 de Outubro 2011, Campos de Goytacazes/RJ.

SANTOS, R.; PEREIRA de SÁ, M.P. Homeopatia: histórico e fundamentos. Homeopathy: History and Fundamentals. **Revista Científica da Faculdade de Educação e Meio Ambiente** 5(1): p. 60-78, jan-jun, 2014.

SENGER, M.R.; RICO, E.P.; ARIZI, M.B.; FRAZZON, A.P.G.; DIAS, R.D.; BOGO, M.R.; BONAN, C.D. Exposure to Hg²⁺ and Pb²⁺ changes NTPDase and ecto-5'-nucleotidase activities in central nervous system of zebrafish (*Danio rerio*). **Toxicology**, Volume 226, Issues 2–3, 21 September 2006, P 229–237.

SIEBEL, A. M.; BONAN, C. D.; Silva, R.S. *Zebrafish* como modelo para estudos comportamentais. In: RESENDE, R.R.; SOCCOL, C.R. **Biotecnologia aplicada à saúde: fundamentos e aplicações**. Volume 1. São Paulo. Blucher. 2015. Disponível em

<https://www.researchgate.net/publication/313837614_Zebrafish_como_Modelo_para_Estudos_Comportamentais> Acesso em 06 nov. 2018

SILVA, C. R. et al. **Geologia médica no Brasil: efeitos dos materiais e fatores geológicos na saúde humana, animal e meio ambiente**. In: Textos do 2005

Workshop Internacional de Geologia Médica. Rio de Janeiro: CPRM - Serviço Geológico do Brasil, 2006. 220 p.

SOTO FRM, VUADEM ER, BENITES NR, AZEVEDO SS, PINHEIRO SR, BERNARDI F, COELHO CP, VASCONCELLOS SA. [Implementation and evaluation of homeopathy productivity indices of a commercial swine farm compared to allopathy during the growing and finishing]. *Vet Zootec*. 2007 jun; 14(1): 07-114.

SOTO FRM, VUADEM ER, BENITES NR, AZEVEDO SS, PINHEIRO SR, COELHO CP, VASCONCELLOS SA. [Evaluation of zootecnic indexes of a commercial swine herd using homeopathic treatment]. **Vet Zootec**. 2008 dec; 15(3): 577- 586.

SOUZA, A. C. F. **Comparação dos efeitos da ingestão crônica de arsenito e arsenato de sódio sobre parâmetros testiculares e epididimários em ratos Wistar**. Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa. Viçosa, Minas Gerais, 2013.

STEVENS, A., C. DE LEONIBUS, et al. Network analysis: a new approach to study endocrine disorders. *Journal of Molecular Endocrinology*, v.52, n.1, Feb, p.R79-93. 2013.

TEIXEIRA, M. Z. **O vitalismo homeopático ao longo da história da medicina**. Homeopathic vitalism along the history of medicine. In: VII Congresso Brasileiro de História da Medicina, Ribeirão Preto, SP, 2002. 15 p.

VAN SCOY, AR, TJEERDEMA, RS. **Environmental fate and toxicology of fipronil**. *Journal of Pesticide Science*. 2007;32(3):1–26.

VIJAYAN, M.M.; PEREIRA, C. GRAU, E.G. & IWAMA, G.K. Metabolic responses associated with confinement stress in Tilapia: the role of cortisol. **Comp Biochem Physiol**, 116C:89-95, 1997.

WITTMANN, V. **Avaliação de medicamento homeopático em ratos submetidos à dieta hipercalórica e estresse**. 57 p. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação) - Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade de Santo Amaro, São Paulo, 2014.

ZACHARIAS, C. R. Theoretical and Physical-Chemical Models for Dynamized Systems: Validation Criteria. In: Bonamin LV (Ed). **Signals and Images: Contributions and contradictions of high dilution research**. Dordrecht, Springer. 2008. p.29-36.

ZHAO, X, SALGADO, VL, YEH, JZ, NARAHASHI, T. **Differential actions of fipronil and dieldrin insecticides on GABA-gated chloride channels in cockroach neurons**. The Journal of pharmacology and experimental therapeutics. 2003;306(3):914–24.

ZAR, J. H. **Biostatistical analysis**. 5^a ed. Upper Saddle River: Prentice Hall, 2010. 944 p.

WONG, C.K.; WONG, M.H. Morphological and biochemical changes in the gills of Tilapia (*Oreochromis mossambicus*) to ambient cadmium exposure. **Aquatic Toxicol.**, v.48, p.517-527, 2000.

