

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM CONSERVAÇÃO DE FAUNA

GESTÃO E MANEJO IN SITU E EX SITU

STÉPHANIE FERGUSON MOTHEO

UTILIZAÇÃO DE *ZEBRAFISH* PARA VALIDAÇÃO DE PROGRAMA
COMPUTACIONAL APLICADO À ANÁLISE CARDÍACA APÓS ADMINISTRAÇÃO DE
MEDICAMENTOS CARDIOTÔNICOS

Orientador: Prof. Dr. Ricardo Carneiro Borra

São Carlos - SP
2020

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM CONSERVAÇÃO DE FAUNA

GESTÃO E MANEJO IN SITU E EX SITU

STÉPHANIE FERGUSON MOTHEO

UTILIZAÇÃO DE *ZEBRAFISH* PARA VALIDAÇÃO DE PROGRAMA
COMPUTACIONAL APLICADO À ANÁLISE CARDÍACA APÓS ADMINISTRAÇÃO DE
MEDICAMENTOS CARDIOTÔNICOS

Orientador: Prof. Dr. Ricardo Carneiro Borra

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação de Conservação de Fauna da Universidade Federal de São Carlos como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Conservação de Fauna.

São Carlos - SP
2020



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS

Centro de Ciências Biológicas e da Saúde
Programa de Pós-Graduação em Conservação da Fauna

Folha de Aprovação

Defesa de Dissertação de Mestrado da candidata Stéphanie Ferguson Motheo, realizada em 15/06/2020.

Comissão Julgadora:

Prof. Dr. Ricardo Carneiro Borra (UFSCar)

Prof. Dr. Ricardo Lacava Bailone (MAPA)

Profa. Dra. Meliza Goi Roscani (UFSCar)

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

O Relatório de Defesa assinado pelos membros da Comissão Julgadora encontra-se arquivado junto ao Programa de Pós-Graduação em Conservação da Fauna.

Agradecimentos

- Ao Prof. Dr. Ricardo Carneiro Borra, pela orientação, paciência e oportunidade;
- À minha irmã, Dra. Tathiana Ferguson Motheo (Bola), pelas discussões científicas, companheirismo, pela paciência, amor e dedicação que sempre teve comigo ao longo de minha vida e a minha sobrinha Sarah, que sempre me tira um sorriso quando menos espero;
- À minha mãe, Ângela, que apesar das dificuldades, sempre me apoiou e nunca mediou esforços para o meu crescimento;
- Ao meu pai, Artur, pelos “puxões de orelha”, incentivo, amor incondicional e por nunca me deixar desistir. Te amo pai!
- Aos demais membros da minha família pelo apoio, carinho, incentivo e por sempre acreditarem em mim;
- A Dra. Helena Janke pelo apoio com os experimentos no laboratório, amizade, sugestões e discussões;
- Um agradecimento especial aos meus amigos Sóstenes, Beto, Luci, Bruna, Thaís e Paula pelas discussões científicas, amizade e companheirismo ao longo desses anos;
- Aos meus colegas de laboratório pela ajuda e discussões científicas;
- À equipe da Secretaria da Pós-Graduação em Conservação de Fauna;
- À Universidade Federal de São Carlos, a Fundação Parque Zoológico de São Paulo e a todos aqueles que direta ou indiretamente contribuíram com esse trabalho.

Resumo: Utilização de *zebrafish* para validação de programa computacional aplicado à análise cardíaca após administração de medicamentos cardiotônicos.

O *zebrafish* (*Danio rerio*) é um vertebrado amplamente utilizado como modelo de testes laboratoriais, devido a sua alta fertilidade, praticidade de manejo e baixo custo. As características cardíacas dessa espécie, bem como, a fácil absorção de substâncias presentes na água no tecido de diferentes órgãos, faz dele uma excelente cobaia para estudos de cardiotoxicidade. Assim, o presente estudo tem como meta a validação do programa (CardioCount v2.0) capaz de detectar alterações cardíacas como, intervalos de contração cardíaca e padrões de contração em larvas de *zebrafish*. Para tal, foram selecionadas quatro substâncias (dopamina, atropina, adrenalina e haloperidol) de uso comum, às quais larvas de *zebrafish* foram expostas em diferentes concentrações. Por meio de filmagens, as 60 larvas com 96 hpf foram anestesiadas por imersão de metanossulfonato de tricáina 0,7 μM , filmadas e analisadas quanto as variações de frequência cardíaca, entropia e possível cardiotoxicidade, tendo como controle o DMSO 1%. Os testes realizados com a dopamina mostraram uma alteração significativa na concentração de 2,5 μM com relação a entropia; no uso da adrenalina, todas as doses acarretaram em um aumento da FC exceto a de 1,0 μM ; com relação a atropina, na dose de 2,50 μM houve aumento da entropia e, no teste com o haloperidol, ocorreu a maior dispersão de efeitos e a maior dependência com o valor da concentração, com a diminuição da frequência cardíaca nas doses de 2, 5 e 20 μM e na alteração da entropia com as concentrações de 5, 10 e 20 μM . A análise baseada em parâmetros de frequência cardíaca e entropia quantificados em larvas de *zebrafish*, com o uso do programa computacional CardioCount v.2.0 permitiu detectar de forma rápida e precisa efeitos cardiológicos dos seguintes fármacos: dopamina, adrenalina, atropina e haloperidol.

Palavras-chave: coração; peixe-zebra; *software*

Abstract: Use of *zebrafish* to validate a computer program applied to cardiac analysis after administration of cardiotoxic drugs.

The *zebrafish* (*Danio rerio*) is a vertebrate widely used as a model for laboratory tests, due to its high fertility, practical handling and low cost. The cardiac characteristics of this species, as well as the easy absorption of substances present in the water by the tissues of different organs, makes it an excellent model for cardiotoxicity studies. Thus, the present study aims to validate a program (CardioCount v2.0) capable of detecting cardiac changes like, intervals of cardiac contraction and contraction patterns in *zebrafish* larvae. For this, four substances (dopamine, atropine, adrenaline and haloperidol) were selected, to which *zebrafish* larvae were exposed in different concentrations. Through filming, the 60 larvae with 96 hpf were anesthetized by immersion of 0.7 μM tricaine methanesulfonate, filmed and analyzed for variations in heart rate, entropy and possible cardiotoxicity, with 1% DMSO as control. Tests performed with dopamine showed a significant change in the concentration of 2.5 μM with respect to entropy; in the case of adrenaline, all doses resulted in an increase in HR except for 1.0 μM ; with respect to atropine, at the dose of 2.50 μM there was an increase in entropy and, in the test with haloperidol, there was a greater dispersion of effects and a greater dependence on the concentration value, with a decrease in heart rate at doses of 2, 5 and 20 μM and in changing entropy with concentrations of 5, 10 and 20 μM . The analysis based on cardiac frequency and entropy parameters quantified in *zebrafish* larvae, using the computer program CardioCount v.2.0 allowed to quickly and accurately detect cardiotoxic effects of the following drugs: dopamine, adrenaline, atropine and haloperidol.

Keywords: heart; *zebrafish*; software

LISTA DE FIGURAS

Descrição	Página
Figura 1. <i>Zebrafish</i> (<i>Danio rerio</i>), também conhecido como paulistinha.	5
Figura 2. Coração do <i>zebrafish</i> (<i>Danio rerio</i>) (seta vermelha).	8
Figura 3. Estrutura química das moléculas das substâncias utilizadas no presente trabalho: adrenalina, dopamina, atropina e haloperidol.	14
Figura 4. Página principal do programa CardioCount V.2.0 desenvolvido no Núcleo de Pesquisa e Inovação <i>Zebrafish</i> – UFSCar, por Ricardo Borra (2020).	19
Figura 5. Aba do software, na qual se faz a contagem dos batimentos.	20
Figura 6. Aba do <i>software</i> , na qual se tem o resultado da contagem dos batimentos e a possível mudança de coloração da imagem.	20
Figura 7. Exemplificação da taxa de batimentos pelo método de Fourier (FFT).	21
Figura 8. Larvas de ZF com 96 horas pós fecundação.	22
Figura 9. Tubos com as diferentes concentrações utilizadas e placa de 96 poços com larvas de ZF devidamente distribuídas.	23
Figura 10. Fluxograma representativo do funcionamento do programa computacional CardioCount V. 2.0.	25
Figura 11. Imagem mostrando a área (ROI) cardíaca definida pelo usuário e o gráfico de variação de cor da região obtida durante o intervalo do filme.	26
Figura 12. Batimentos no domínio das frequências e gráfico dos batimentos cardíacos no domínio do tempo.	26

Figura 13. Larva de ZF com seus respectivos gráficos de pulso em função da área cardíaca definida pelo usuário (setas vermelhas).	27
Figura 14. Representação gráfica da (A) variação de frequência cardíaca durante o intervalo de amostragem (Heart rate) e (B) intervalo entre pulsos (Cardiac Rhythm).	29
Figura 15: Doze padrões de comprimento 3 utilizados para cálculo da entropia.	31
Figura 16. Série temporal representando os intervalos entre os pulsos do conjunto A.	32
Figura 17. Série temporal representando os intervalos entre os pulsos do conjunto A e C. Em azul observa-se o gráfico linearizado correspondente ao Conjunto C (ENTROPIA_L).	33
Figura 18. Série temporal representando os intervalos entre os pulsos do conjunto A e D.	34
Figura 19. Análise da Entropia: (A) Gráfico de Pulsos mostrando a variação dos tons de cinza gerados pelos batimentos cardíacos. (B) Gráfico da série temporal demonstrando as relações entre os pulsos e intervalos entre os pulsos. (C) Histograma de padrões.	35
Figura 20. Representação gráfica construída com os valores de FC padronizados e Entropia (A). As curvas de traçado sigmoide representadas nos gráficos à direita, representam a operação de transformação realizadas nos eixos X (B) e Y (D). O gráfico com a curva vermelha (B) apresenta a equação utilizada para transformação do eixo X e o gráfico com a curva azul (D) apresenta a equação utilizada para transformação do eixo Y. Após as transformações, os dados apresentados no gráfico de dispersão (A) ficam representados de acordo com o gráfico de dispersão (C).	38
Figura 21 – Relatórios de casos mostrando os gráficos de FC e o intervalo de batimento com os valores de FC, ENTROPIA_L e ENTROPIA_H e as respectivas representações no gráfico de dispersão.	40

Figura 22. Gráfico de dispersão mostrando a distribuição dos valores FC dos grupos tratados com Dopamina em relação ao Controle DMSO.	42
Figura 23. Gráfico de dispersão mostrando a distribuição dos valores de E dos grupos tratados com Dopamina em relação ao Controle DMSO.	42
Figura 24. Gráfico de dispersão mostrando a distribuição dos casos de larvas expostas à Dopamina em três concentrações diferentes, em relação ao grupo controle DMSO.	43
Figura 25. Gráfico de dispersão mostrando as médias dos grupos, representadas por vetores (FC x E). Fonte:	43
Figura 26. Gráfico de dispersão mostrando a distribuição dos valores FC dos grupos tratados com Adrenalina em relação ao Controle DMSO.	47
Figura 27. Gráfico de dispersão mostrando a distribuição dos valores de E dos grupos tratados com Adrenalina em relação ao Controle DMSO.	47
Figura 28. Gráfico de dispersão mostrando a distribuição dos casos de larvas expostas à Adrenalina em quatro concentrações diferentes, em relação ao grupo controle DMSO.	49
Figura 29. Gráfico de dispersão mostrando as médias dos grupos, representadas por vetores (FC x E).	49
Figura 30. Gráfico de dispersão mostrando a distribuição dos valores FC dos grupos tratados com Atropina em relação ao Controle DMSO.	51
Figura 31. Gráfico de dispersão mostrando a distribuição dos valores de E dos grupos tratados com Atropina em relação ao Controle DMSO.	51
Figura 32. Gráfico de dispersão mostrando a distribuição dos casos de larvas expostas à Atropina em quatro concentrações diferentes, em relação ao grupo controle DMSO.	52

Figura 33. Gráfico de dispersão mostrando as médias dos grupos, representadas por vetores (FC x E).	52
Figura 34. Gráfico de dispersão mostrando a distribuição dos valores FC dos grupos tratados com Haloperidol em relação ao Controle DMSO.	55
Figura 35. Gráfico de dispersão mostrando a distribuição dos valores de E dos grupos tratados com Haloperidol em relação ao Controle DMSO.	55
Figura 36. Gráfico de dispersão mostrando a distribuição dos casos de larvas expostas ao Haloperidol em quatro concentrações diferentes, em relação ao grupo controle DMSO.	57
Figura 37. Gráfico de dispersão mostrando as médias dos grupos, representadas por vetores (FC x E).	57

LISTA DE TABELAS

Descrição	Página
Tabela 1. Quantidades relativas dos padrões ordinários em cada assinatura:	35
Tabela 2. Resultados das Regressões Logísticas após a aplicação da correção por FDR.	44

SUMÁRIO

1.0. Introdução	1
1.1. Preâmbulo	1
1.2. Objetivos	5
1.2.1. Objetivo geral	5
1.2.2. Objetivos específicos	5
1.3. Revisão de literatura	5
1.3.1. <i>Zebrafish (Danio rerio)</i>	5
1.3.2. Drogas Cardioativas / Cardiotoxicidade	10
1.3.2.1. Adrenalina	13
1.3.2.2. Dopamina	14
1.3.2.3. Atropina	16
1.3.2.4. Haloperidol	16
1.3.3. Programas computacionais de análise comportamental de <i>zebrafish</i>	18
2.0. Materiais e Métodos	21
2.1. Larvas de zebrafish	22
2.1.1. Preparação das larvas	22
2.1.2. Filmagem das larvas	23
2.2. Parâmetros cardíacos	23
2.2.1. Frequência cardíaca	23
2.2.2. Entropia	29
2.2.3. Análise da cardiotoxicidade	36
2.3. Representação dos dados	37
3.0. Resultados e Discussão	39
3.1. Efetividade da Metodologia Proposta	39
3.2. Dopamina	41
3.3. Adrenalina	46
3.4. Atropina	50
3.5. Haloperidol	54
4.0. Conclusões	58
5.0. Referências Bibliográficas	60
ANEXO I – Tabela: Valores de frequência cardíaca (FC) e Entropias empregadas para representar os limites no gráfico de dispersão	69

1.0. Introdução

1.1. Preâmbulo

Considerando a essencialidade da água para a saúde humana e o ecossistema aquático, o aspecto de qualidade torna-se extremamente importante para a subsistência da vida e para o desenvolvimento social e econômico. Desta forma, a contaminação dos ecossistemas aquáticos é uma preocupação constante diante do crescimento populacional e da degradação contínua do meio ambiente. Produtos químicos residuais, provenientes da ação antrópica, podem chegar aos sistemas aquáticos por diferentes vias e, como consequência dos altos níveis de poluição, em 2013 as Nações Unidas classificaram a biodiversidade no ecossistema aquático como sendo a mais degradada dentre todos os ecossistemas.

Diariamente são descartados na natureza insumos ou resíduos de produtos industrializados que, de alguma forma, podem ser absorvidos pelos organismos vivos e, de forma cumulativa, causar diferentes efeitos como, toxicidade de natureza diversa, interferência endócrina e aparecimento de bactérias resistentes a antibióticos. Esses compostos químicos podem ser provenientes de medicamentos (e seus metabólitos) utilizados por humanos e animais, desinfetantes, detergentes, surfactantes, pesticidas, corantes, tintas, conservantes, aditivos alimentares e produtos para cuidados pessoais, contaminando recursos hídricos através de esgoto urbano.

Tanto esgotos quanto a água captada de mananciais e reservatórios hídricos, específicos para abastecimento de água, são submetidos a tratamentos convencionais, que não são capazes de remover efetivamente os poluentes, passando a promover o acúmulo dos mesmos no meio ambiente (SCHWARZENBACH *et al.*, 2006; LUO *et al.*, 2014; MARGOT *et al.*, 2015; DAS *et al.*, 2017). Com o aumento da urbanização, há por consequência o aumento da poluição do solo, através de lixões e esgotos a céu aberto,

que não só afeta a parte hídrica do meio ambiente, mas também inutiliza essas áreas gerando resíduos nocivos.

Além das fontes de contaminação mencionadas, outro agente causador de contaminação do solo é a agricultura, através do uso indiscriminado de agrotóxicos indiscriminado que permanecem na plantação, mesmo após a sua colheita (BRANCO, 2016). Entretanto, a contaminação por defensivos agrícolas não se limita ao solo pois, por irrigação ou chuvas, essas substâncias podem vir a percolar, contribuindo para aumentar o risco de contaminação de águas subterrâneas, e/ou, por escoamento superficial, comprometer cursos de água superficiais. Todos os processos que carregam poluentes às fontes de água levam à conseqüente contaminação de peixes e de fontes de abastecimento de água. Este tipo de contaminação resulta em sérios problemas de saúde, não só para aquelas pessoas que consomem o pescado, mas também para aquelas que ingerem a água proveniente destas fontes (UEDA *et al.*, 2009).

Entretanto, outros tipos menos evidentes de contaminação ocorrem, com graves efeitos no meio ambiente e, conseqüentemente, à saúde animal, dentre eles estão os fármacos. Essa classe de poluente é gerada pela excreção de substâncias não metabolizadas e de seus metabólitos e pelo descarte incorreto de fármacos, incluindo nessa denominação os antibióticos, anti-inflamatórios, hormônios e outros tipos de drogas, por exemplo, as drogas cardiotônicas (BILA & DEZOTTI, 2003).

As drogas cardiotônicas, ou simplesmente cardiotônicos, são medicamentos que produzem um efeito fortificante no coração, resultando em melhora do tratamento cardíaco com aumento do rendimento cardíaco, traduzido em menor consumo de oxigênio e gasto energético. Estes produzem um aumento da força de contração do miocárdio e da pressão arterial em pacientes com falência da bomba cardíaca ou em casos de choque cardiogênico (QUINTILIANO *et al.*, 2002).

Dependendo da dose, as drogas cardiotônicas promovem alterações na frequência cardíaca, e por esse fato, quando em excesso, elas apresentam possibilidades de uso como no controle nos testes de cardiotoxicidade (QUINTILIANO et al., 2002).

Para analisar o impacto desses contaminantes na saúde humana, animal e ambiental, existem inúmeras metodologias que se utilizam de diferentes modelos biológicos. Nestes modelos são realizados testes toxicológicos para avaliar o impacto do contaminante em sistemas específicos. Desta forma, existem inúmeros testes toxicológicos que avaliam os efeitos agudos e/ou crônicos no desenvolvimento (embriotoxicidade), na estabilidade genômica e na fisiologia dos sistemas nervoso, circulatório, endócrino e/ou imunológico (SEELIG, 2007; SIEBEL et al., 2015).

O uso de animais em laboratórios para desenvolvimento de testes, diagnósticos, tratamentos, vacinas, cosméticos e medicamentos, é comum no Brasil e no mundo, sendo que dados divulgados pela Humane Society Internacional (HSI) – organização global protetora dos animais – mostram que mais de 115 milhões deles são utilizados como cobaias em laboratórios em todo o mundo. Para mudar essa realidade e atender às discussões e determinações éticas de uso de animais em experimentos científicos, cada vez mais camundongos, cobaias e ratos estão sendo substituídos por outros tipos de modelos (SEELIG, 2007), sendo que, recentemente, foi publicado um compêndio intitulado Métodos Alternativos ao Uso de Animais de Pesquisa Reconhecidos no Brasil (MORETTO & STEPHANO, 2019).

Um dos animais mais utilizados atualmente é o zebrafish (*Danio rerio*) - ZF, devido ao seu baixo custo comparado a outros modelos vivos. O ZF é um excelente modelo de teste devido a sua facilidade de aquisição e reprodução em laboratório. Em decorrência de seu rápido desenvolvimento e sua transparência óptica, este modelo permite a

realização de pesquisas em curto espaço de tempo, assim como, a fácil visualização de estruturas anatômicas (CHAVEZ *et al.*, 2016).

Devido ao pequeno tamanho do ZF, permite a definição precisa dos seus estágios de desenvolvimento, assim como a mensuração da sua silhueta cardíaca, dos batimentos cardíacos, movimentos respiratórios, entre outros. No entanto, para a detecção de possíveis efeitos de drogas cardiogênicas e/ou cardiotoxícas sobre esses animais, é necessário o uso de recursos computacionais, o que inclui adotar o uso de um programa de baixo custo, fácil operação, com configuração analítica associada ao funcionamento de uma câmera de filmagem e, sobretudo, com possibilidade de atualizações. Essas características, na maioria dos casos, inviabilizam ou dificultam sobremaneira a aplicação desses recursos (SIEBEL *et al.*, 2015; FRANCO-RESTREPO *et al.*, 2019). Além disso, existem alguns programas comerciais disponíveis, que analisam tanto a forma adulta quanto nos estágios larvais (p.ex.: ZeCardio, Zebralab, EthoVision XT, ZebraBeat), e programas gratuitos (p.ex.: ToxTrack, EthoWatcher, Mouse Behavior Tracker, Mouse Move, JAABA, wrMTck, AnimalTracker, idTracker, Ctrax, Mousetracker, VideoHacking e Cowlog) que só analisam o ZF na fase adulta, uma vez que para a avaliação em estágios larvais se faz necessário o uso de um programa computacional para análise de vídeo e da cinemática (FRANCO-RESTREPO *et al.*, 2019).

Considerando a necessidade premente de desenvolver metodologias para avaliação dos riscos à saúde humana e animal, de fármacos encontrados no meio ambiente na forma de poluentes, e que o ZF é um animal sensível e amplamente usado em testes toxicológicos, a validação de um programa desenvolvido no Núcleo de Pesquisa e Inovação Zebrafish da UFSCar, denominado de CardioCount v.2, utilizando esse animal é extremamente importante.

1.2. Objetivos

1.2.1. Objetivo geral: Validar o programa CardioCount v.2 para a detecção de alterações indicativas de cardiotoxicidade, usando como modelo experimental larvas de ZF e drogas cardiotônicas, as quais podem causar efeitos de cardiotonicidade com inotropismo e cronotropismo positivo alterando, não só o intervalo de contração cardíaca, mas também, os padrões de contração.

1.2.2. Objetivos específicos

a) utilizar o ZF, um animal sensível e amplamente usado em testes toxicológicos, para avaliar a cardiotoxicidade de quatro tipos diferentes de substâncias, em quatro concentrações diferentes: adrenalina, dopamina, atropina e haloperidol;

b) avaliar a adequação do programa para a distinção dos parâmetros cardíacos em função da concentração, gerando comparações entre os diferentes efeitos gerados pelos medicamentos, com o consequente aumento da sensibilidade em detectar alterações cardíacas.

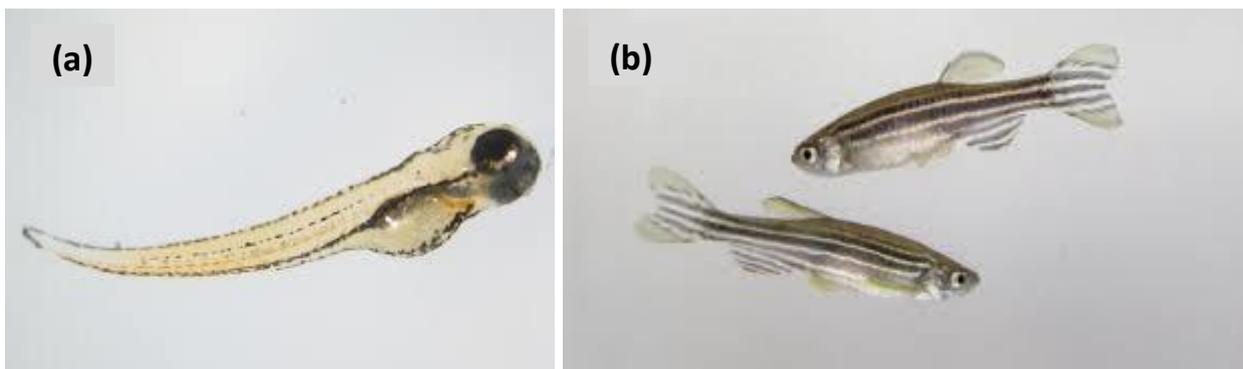


Figura 1. *Zebrafish* (*Danio rerio*), também conhecido como paulistinha: (a) embrião; (b) adulto. Fonte: *Behavioral Research Blog by Noldus Information Technology*.

1.3. Revisão de literatura

1.3.1. *Zebrafish* (*Danio rerio*)

O ZF (*Danio rerio*) é um peixe pertencente à família *Cyprinidae*, de clima tropical, ovíparo e com aproximadamente 5 cm de comprimento, também conhecido no Brasil como bandeirinha, paulistinha e bandeira-paulista (Figura 1). Possui uma expectativa média de vida de três a cinco anos, com embriões translúcidos e vem sendo amplamente empregado em laboratórios desde a última década por ser um animal com genética muito similar aos seres humanos (SANTOS, 2016).

Em comparação aos mamíferos, o ZF se diferencia por ser um vertebrado ectotérmico, com ausência de pulmões e de septo cardíaco e, com relação a frequência cardíaca, a taxa de batimentos por minuto (bpm) do ZF é entre 120 a 180, enquanto a do coração humano é de 60 a 100 bpm (YACOUB *et al.*, 2012).

O estudo na análise das fases de desenvolvimento e de suas patologias é possível; e uma vez que 70% do genoma do ZF se assemelha ao do ser humano. Entre os genes similares ao do homem se encontram os relacionados às doenças policísticas renais, doenças do metabolismo lipídico, doenças cardíacas, anemias, câncer, distrofia muscular, entre outras. Além disso, devido a transparência dos embriões do ZF é possível a avaliar a toxicidade de medicamentos e o potencial terapêutico por observação fenotípica após exposição por imersão ou por micro injeção dos mesmos (HOWE *et al.*, 2013).

Por possuir fecundidade elevada, reprodução fácil e de baixo custo, o ZF vem auxiliando pesquisas laboratoriais, por permitir manipulação e visualização *in vivo* e não somente *in vitro*. Essas mesmas características levaram ao uso do ZF pelas indústrias farmacêuticas para a fabricação de novas drogas, sobretudo pela rapidez nas pesquisas e a redução de custos (SANTOS, 2016; FARIA *et al.*, 2017).

Além dessas vantagens citadas acima, o ZF tem se mostrado extremamente importante como modelo embriológico, na tradução de dados moleculares com análise celular detalhada, na diferenciação de células-tronco em células do miocárdio ou

endocárdicas e até mesmo na capacidade de diagnosticar e corrigir precocemente uma má formação cardíaca que causa um risco de vida (STAINIER, 2001).

Os animais adultos quando comparados com as larvas apresentam morfologia corporal bastante distinta, na qual as larvas são menores, possuem menos pigmento e cada órgão é visualmente difícil de identificar (Figura 1). Como modelo comparativo, o comprimento padrão da larva do ZF é de 3,5 mm, com um ventrículo medindo 100 µm de comprimento, enquanto os adultos possuem um tamanho de 30 mm e 1 mm de comprimento do ventrículo (SINGLEMAN & HOLTZMAN, 2011).

O coração do ZF é localizado antero ventralmente à cavidade torácica, entre o opérculo e as cintas peitorais, e está contido em um saco membranoso prateado (Figura 1a), conhecido como pericárdio, e dentro dele existem quatro câmaras distintas que compõem o coração: o seio venoso, o átrio, o ventrículo e a via de saída chamada bulbo arterioso. No entanto, o coração desse peixe é frequentemente referido como sendo de duas câmaras, um átrio e um ventrículo (FARRELL & PIEPERHOFF, 2011). O desenvolvimento do coração começa muito cedo dentro do desenvolvimento do ZF; em apenas cinco horas após a fertilização, os progenitores cardíacos estão presentes nas zonas marginais laterais do embrião em estágio de clivagem (BAKKERS, 2011; TU & CHI, 2012).

Após a gastrulação, as células do mesoderma da placa lateral anterior migram para linha média e se diferenciam em cardiomiócitos ventriculares e atriais (TU & CHI, 2012). A formação do tubo cardíaco ocorre em torno de 24 horas após a fertilização, quando o embrião ainda é translúcido e a visualização do desenvolvimento é possível, sendo que o tubo começa a se alongar e dobrar, de modo que o ventrículo se torne anterior e o átrio posterior (TU & CHI, 2012; BROWN *et al.*, 2016). Nessa fase, um tubo linear cardíaco pulsante é formado para impulsionar a circulação por todo o corpo e esse movimento precede a formação do canal atrioventricular (TU & CHI, 2012).

Com 48 horas após a fertilização, o coração consiste em um seio venoso (trato de entrada que coleta sangue das veias cardinais e o entrega ao átrio), um átrio (uma cavidade muscular que recebe o sangue não oxigenado e o entrega ao ventrículo) e um ventrículo (que recebe sangue do átrio e entrega para o corpo através da aorta). Durante esse tempo, o bulbo arterioso (uma câmara compartilhada da qual o sangue sai do coração) se desenvolve. Enquanto o coração está se formando, as células estão se reorganizando e começando a se comunicar de uma maneira que lhes permita começar a bombear o sangue através do coração por meio da contração (GRIMES *et al.*, 2006; SINGLEMAN & HOLTZMAN, 2012). O desenvolvimento cardíaco é regulado por fatores moleculares, celulares e ambientais (MIURA & YELON, 2011; STAUDT *et al.*, 2012; CHEN, 2013). Anatomicamente, o coração do ZF é diferente do coração humano, pois, enquanto o do humano contém quatro câmaras separadas por um septo e válvulas, o do ZF contém um único átrio e ventrículo separados por válvulas atrioventriculares (Figura 2). Apesar dessas diferenças anatômicas, o ZF destacou-se como um sistema valioso de modelo vertebrado para o estudo cardiovascular (STAUDT *et al.*, 2012; ASNANI & PETERSON, 2014).

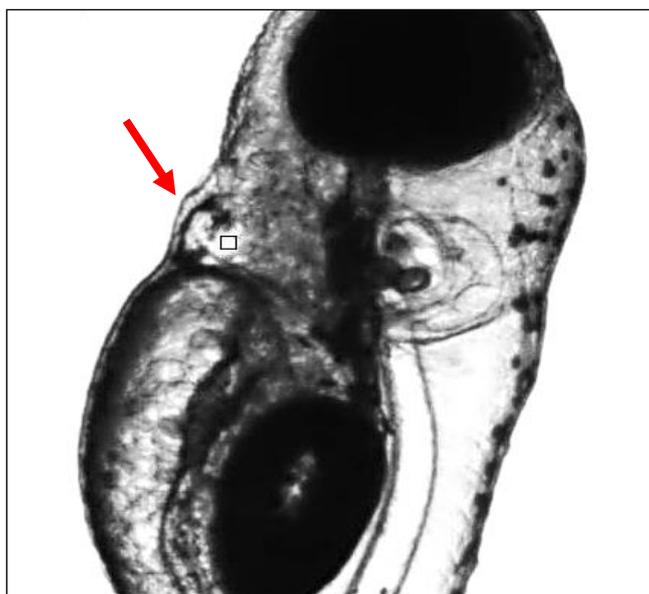


Figura 2. Coração do zebrafish (*Danio rerio*) (seta vermelha). Fonte: Arquivo pessoal

Os mecanismos celulares e moleculares do desenvolvimento do coração são altamente conservados entre o ZF e o ser humano, incluindo as semelhanças entre a formação de válvulas, formação do progenitor cardíaco e do tubo cardíaco, embora o tempo necessário de desenvolvimento para concluir esses eventos seja significativamente menor no ZF do que nos humanos (BUCKINGHAM *et al.*, 2005; TOMITA *et al.*, 2005). No ZF a formação do progenitor cardíaco começa por volta de 5 horas após a fertilização, seguida dos outros eventos que levam ao início da formação da válvula, que começa após cerca de 48 horas. Em humanos, por outro lado, progenitores cardíacos se formam com cerca de 15 a 16 dias, e a almofada cardíaca, precursora da válvula e septos, se forma com 28 dias (BUCKINGHAM *et al.*, 2005; TOMITA *et al.*, 2005).

O coração dos mamíferos é desenvolvido a partir da contribuição do primeiro campo cardíaco, do segundo campo e das células da crista neural cardíaca, equivalente ao coração do ZF. Muitos genes e redes reguladoras essenciais para a cardiogênese no ZF são igualmente essenciais em mamíferos (LAZIC *et al.*, 2011; ZHOU *et al.*, 2011; CAVANAUGH *et al.*, 2015).

Estudos genéticos avançados e reversos de ZF identificaram papéis de muitos genes anteriormente desconhecidos no desenvolvimento e na função cardíaca de vertebrados. Diferentemente do camundongo e da galinha, os embriões de ZF podem sobreviver aos primeiros sete dias de seu desenvolvimento sem um sistema cardiovascular funcional, recebendo oxigênio por difusão passiva através da pele (STAINIER, 2011). Além disso, a fisiologia cardiovascular do ser humano se parece mais com a do ZF do que com a do roedor (MACRAE & PETERSON, 2015), e muitas propriedades elétricas do coração do ZF são semelhantes às propriedades elétricas do coração humano (SEDMERA *et al.*, 2003; KOPP *et al.*, 2005; MILAN *et al.*, 2006; ZHANG *et al.*, 2011; STAUDIT *et al.*, 2012).

A frequência cardíaca embrionária do ZF (140-180 batimentos por minuto (bpm)) está bem próximo da frequência cardíaca fetal (130-170 bpm), que se difere muito da frequência cardíaca de ratos (300-600 bpm) (DELUCA *et al.*, 2014). Nos últimos anos, o ZF ganhou popularidade nas pesquisas cardiovasculares devido à sua capacidade de regenerar o coração, o que oferece grandes oportunidades para descobrir terapias para lesões cardíacas (FOGLIA *et al.*, 2016).

1.3.2. Drogas Cardioativas / Cardiotoxicidade

As drogas cardioativas são substâncias que atuam no miocárdio, por meio de glicosídeos cardiotônicos. Sua utilização visa sanar ou minimizar problemas cardíacos, promovendo maior força de contração do coração, o chamado efeito digitálico. São consideradas drogas vasoativas aquelas que possuem como principal objetivo otimizar a relação entre a oferta de oxigênio e o consumo de oxigênio. Sendo assim, há melhor distribuição da quantidade de oxigênio para órgãos e tecidos. Estes fármacos são muito indicados em casos de insuficiência cardíaca uma vez que exercem influência direta sobre o débito cardíaco, aumentando a força de contração do coração (OSTINI *et al.*, 1998).

As drogas vasoativas mais usadas são as chamadas catecolaminas (monoaminas com um grupo catecol derivadas do aminoácido tirosina) ou simpatomiméticas ou agonistas adrenérgicas, que têm como exemplo a noradrenalina, adrenalina, dopamina, dobutamina, dopexamina, e o isoproterenol. Algumas dessas substâncias ocorrem de forma natural e endógena no organismo, como é o caso da dopamina, da adrenalina e da noradrenalina (FONSECA, 2001). Elas têm um efeito inotrópico positivo, e melhoram o desempenho mecânico do coração, e possuem três principais receptores (alfa, beta e dopa) denominados de adrenérgicos e suas ações no organismo são dependentes a eles, atuando principalmente sobre o coração, vasos, rins

e adrenais, aumentando o cálcio intracelular. Seus efeitos são dose dependentes, onde o aumento da liberação endógena em casos de estresse inibe a interação com drogas exógenas (OSTINI *et al.*, 1998).

A cardiotoxicidade é definida como a toxicidade que danifica o músculo cardíaco e outros tecidos cardíacos, além de alterar sua eletrofisiologia, fazendo que o coração não seja capaz de bombear adequadamente o sangue para todo o corpo. Ela pode ocorrer como efeito colateral de drogas quimioterápicas ou se desenvolver devido à exposição a certos produtos químicos (CROSS *et al.*, 2015).

Muitas drogas anticancerígenas tem a cardiotoxicidade como efeito colateral devido ao seu acúmulo, podendo gerar alterações na pressão arterial, arritmias e cardiomiopatia. Essa cardiotoxicidade se dá por causa de danos celulares, com a formação de radicais livres de oxigênio, dano ao DNA e morte celular de cardiomiócitos e células progenitoras cardíacas (LAMBERTI *et al.*, 2014; MADONNA, 2017).

Por ser um animal aquático, a larva do ZF, realiza por muitas vezes a absorção de fármacos através da diluição direta na água. Isso implica na necessidade de maior controle do pH da solução, uma vez que a absorção de fármacos é dependente do pH, se fazendo necessário o tamponamento do fármaco a ser utilizado e o alerta na absorção branquial e/ou oral que podem reduzir a concentração do fármaco (SIEBEL *et al.*, 2015).

O embrião do ZF é um modelo animal também empregado para investigar os efeitos teratogênicos das drogas, para esse fim, a função cardiovascular dos animais precisa ser avaliada para revelar a influência da exposição no desenvolvimento do sistema cardiovascular e no crescimento de todo o animal. Ensaio simples que medem a frequência cardíaca em ZF não tem especificidade, como tal, uma avaliação cardíaca

mais direta é de difícil análise, sendo necessário uma ferramenta mais robusta para a investigação da cardiotoxicidade induzida por drogas (ZAKARIA *et al.*, 2018).

A exposição ao medicamento geralmente começa em torno de cinco horas após a fertilização (hpf), correspondendo aos estágios tardios da blástula/gástrula e termina em 96 hpf, onde a maioria dos órgãos está totalmente desenvolvida (BEEKHUIJZEN *et al.*, 2015). Além da análise da morfologia dos órgãos, a circulação sanguínea (hemodinâmica) nos animais expostos também pode ser investigada, sendo que a avaliação hemodinâmica permite estabelecer se o medicamento testado afeta todo o sistema cardiovascular, o que por sua vez, pode afetar o desenvolvimento de outros sistemas (HRUBIK *et al.*, 2016).

Para a avaliação hemodinâmica, os parâmetros mais empregados são: batimento cardíaco, débito cardíaco, alteração na área fracionária, encurtamento fracionário e velocidade do fluxo sanguíneo vascular (SHIN *et al.*, 2010). Essas avaliações podem ser feitas analisando os embriões sob um microscópio invertido ou em campo estereoscópico (YALCIN *et al.*, 2017).

Em aplicações mais avançadas, novas técnicas como dinâmica de fluido computacional ou a velocidade da imagem de partículas também podem ser usadas para análises hemodinâmicas detalhadas. A análise funcional envolve quantificação da eficiência do bombeamento do coração, enquanto a análise estrutural envolve a medição precisa dos tamanhos das câmaras cardíacas (JAMISON *et al.*, 2013; BOSELLI & VERMOT, 2016). Entretanto, essas análises exigem a utilização de técnicas avançadas de imagem rápida, como a microscopia de lapso de tempo, a microscopia fluorescente e a tomografia computadorizada. A determinação das velocidades da parede ventricular é importante para modelar as condições do músculo cardíaco, como a cardiomiopatia no ZF (YALCIN *et al.*, 2017).

1.3.2.1. Adrenalina

A adrenalina é muito conhecida em situações de estresse ou perigo, quando ocorre o seu aumento. Esse hormônio é produzido pela adrenal e possui receptores alfa e beta adrenérgicos, atuando no miocárdio, músculos vasculares e músculos lisos, com o aumento da contração do ventrículo, da resistência vascular periférica e da frequência cardíaca, vasoconstrição periférica e broncodilatação (OSTINI *et al.*, 1998; FONSECA, 2001) (Figura 3).

Em animais aquáticos, em situações de estresse, ocorre o aumento das catecolaminas, tendo como consequência o aumento do metabolismo, da frequência cardíaca e do fluxo sanguíneo para as brânquias, com o intuito de manter a oxigenação sanguínea, além de ter o aumento do cortisol (BARCELLOS, 2019).

Essa droga é indicada para casos de choque circulatório, choque anafilático, broncoespasmos e em casos de ressuscitação e as suas reações adversas podem causar tremor, ansiedade, tensão, cefaleia, dificuldade respiratória, hipertensão grave, hemorragia cerebral e arritmias (OSTINI *et al.*, 1998).

A precursora da adrenalina, também chamada de noradrenalina, é responsável pelo efeito vasopressor no tratamento de choque séptico e cardiogênico e por uma taquicardia menos evidente do que sua sucessora, a adrenalina (FONSECA, 2001).

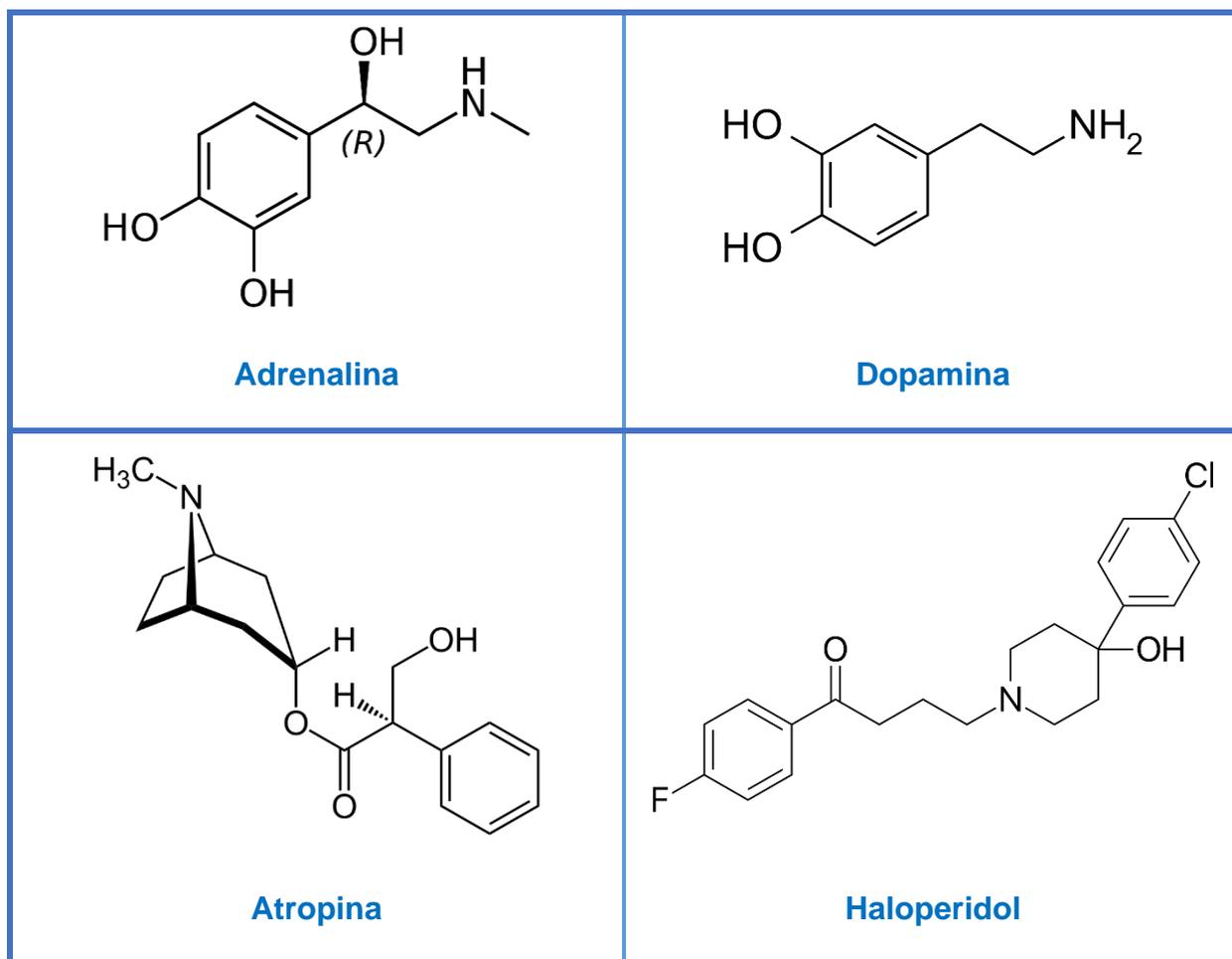


Figura 3. Estrutura química das moléculas das substâncias utilizadas no presente trabalho: adrenalina, dopamina, atropina e haloperidol. *Fonte: própria.*

O sistema nervoso simpático é responsável pela taquicardia quando exemplares de ZF são expostos ao CO₂ ambiental e em condições de hipóxia, a introdução da adrenalina ou de monóxido de carbono, aumenta a frequência cardíaca de larvas de ZF (TZANEVA & PERRY, 2016).

1.3.2.2. Dopamina

A dopamina é um neurotransmissor presente no sistema nervoso, da família das catecolaminas, e que possui funções na cognição, locomoção ativa, saciedade, motilidade gastrointestinal, modulação da função cardíaca e renal. Ainda, é um

precursor de outros neurotransmissores, com a noradrenalina e a adrenalina (GUELHO *et al.*, 2016).

Através dos receptores dopaminérgicos, o uso dessa droga resulta na vasodilatação de artérias renais, mesentéricas, coronárias e cerebrais. Em doses mais baixas, a dopamina age no aumento do fluxo sanguíneo renal e no aumento do volume urinário sendo indicada em quadros de “estresse” renal. Em doses mais altas, esta atua por meio do estímulo nos receptores beta 1, que por sua vez, resulta em taquicardia, aumento do retorno venoso e queda da resistência vascular sistêmica. É indicada para situações em que há o baixo débito cardíaco em que a volemia está controlada ou aumentada (FONSECA, 2001).

Ademais, a dopamina é um neuromodulador e transmissor que está diretamente envolvido no controle de sistemas motores de vertebrados e invertebrados. No entanto, pouco se sabe sobre os efeitos comportamentais das drogas dopaminérgicas em larvas de ZF (IRONS *et al.*, 2013). As vias dopaminérgicas nos mamíferos também são representadas por neurônios dopaminérgicos em ZF, encontrados principalmente no bulbo olfatório, região pré-óptica, retina e no diencéfalo ventral, e com a perda de neurônios dopaminérgicos do tronco encefálico, se ocasiona distúrbios de movimento em humanos e animais (SIEBEL *et al.*, 2015).

De 16 a 24 horas após a fertilização, as larvas de ZF começam a produzir neurônios dopaminérgicos, que possuem os receptores D1, D2, D3 e D4, que estão presentes no hipotálamo, telencéfalo ventral ou subpálio e pré-tecto e com 30 horas após a fertilização o receptor D1 tem seu aparecimento na parte posterior do cérebro e diencéfalo. O uso da dopamina está associado com a redução de sintomas da esquizofrenia, pelo fato que os antipsicóticos atuam na antagonização sobre os receptores dopaminérgicos do tipo D2, reduzindo o movimento das larvas de ZF, assim como observado em mamíferos (AMARAL, 2015).

1.3.2.3. Atropina

A atropina é um antagonista parassimpático, competindo com receptores muscarínicos e absorvido pelo intestino, saco conjuntival e capaz de penetrar a barreira hematoencefálica. Essa droga é muito utilizada como reversor da bradicardia, antiarrítmico, midriático, na diminuição do fluxo salivar, antiespasmódica, na diminuição do tônus muscular associado à motricidade e como tratamento contra intoxicações por pesticidas organofosforados; e em altas doses pode causar aumento da temperatura corporal e dilatação dos vasos sanguíneos cutâneos (rubor) (SOARES, 2007).

A intoxicação leve causada pela atropina pode causar midríase, náuseas, taquicardia e aumento da pressão arterial e enquanto em uma intoxicação moderada sinais como agitação, alucinações e confusão mental podem ocorrer. Em casos mais graves, a intoxicação pode causar convulsões, delírios, psicose, alucinações, hipertermia, coma e insuficiência renal (HERNANDEZ *et al.*, 2017). Em um estudo realizado, a concentração de 0,4 μM auxiliou na proteção de larvas de ZF, em casos de envenenamento, com um pré-tratamento aumentando a frequência cardíaca (FARIA *et al.*, 2017).

Em um estudo realizado utilizando larvas de ZF, dentre as drogas agonistas (nicotina) e antagonistas do receptor colinérgico, a atropina não obteve nenhum efeito na resposta hiperventilatória, sendo aplicado em um quadro de hipóxia induzida, e somente em uma dose elevada (200 μM) obteve o resultado desejado da inibição da resposta hipóxica (RAHBAR *et al.*, 2016).

1.3.2.4. Haloperidol

O haloperidol é um fármaco antipsicótico comumente utilizado para tratamento de doenças como, esquizofrenia, distúrbios comportamentais, ansiedade e entre outros, possuindo uma importante ação neuroléptica. Sua metabolização é realizada no fígado

e excretado através da urina, leite materno e fezes e possui uma longa duração quando usado, podendo ser detectado no plasma, semanas após seu uso. Alguns efeitos durante sua ação podem ser observados, como sedação, hipotensão e efeitos extrapiramidais (acinesia, acatisia, opistotonia, distonia e entre outros) em humanos e catalepsia em roedores; e atua na inibição dos receptores de catecolaminas, possuindo assim o efeito contrário da dopamina e em larvas de ZF induzem defeitos de movimento (MARGONATO & NISHIYAMA, 2004; SIEBEL *et al.*, 2015).

O ZF é comumente estudado como modelo em estudos comportamentais, avaliando memória, aprendizado, ansiedade e medo, para avaliação de fármacos psiquiátricos e agentes tóxicos com ação no sistema nervoso, podendo auxiliar na neurobiologia, em doenças neurodegenerativas, como a Síndrome de Parkinson e a Doença de Alzheimer, no desenvolvimento de novos fármacos e na avaliação da neurotoxicidade. A exposição a inseticidas, herbicidas, raticidas e fungicidas podem aumentar o risco do desenvolvimento da Síndrome de Parkinson, sendo que essas substâncias induzem a perda de neurônios dopaminérgicos, causando sinais similares a doença, com bradicinesia, rigidez e tremor de repouso (SIEBEL *et al.*, 2015).

Segundo estudos, o haloperidol afeta o comportamento do ZF; que em altas concentrações (20 a 80 μM) causa a redução da atividade motora; e em concentrações mais baixas (2,5 a 10 μM) muda seu comportamento sem reduzir sua magnitude média. Já se tem conhecimento de que o haloperidol reduz a atividade motora de larvas de ZF, porém na concentração utilizada (5 μM) em um teste realizado houve aumentos na magnitude do movimento médio (BRUNI *et al.*, 2016).

Com o intuito de analisar o comportamento do ZF correlacionado com antipsicóticos, foram testados e comprovados que algumas butirofenonas e fenotiazinas possuem o mesmo efeito comparados com os efeitos causados pelo haloperidol, permitindo a identificação e análise de substâncias que possuam um efeito semelhante

aos antipsicóticos (BRUNI *et al.*, 2016). O uso do haloperidol no *zebrafish* na análise cardíaca, apresenta diversas alterações como, bradicardia, prolongamento do intervalo QT e bloqueio atrioventricular (DHILLON *et al.*, & CORNET *et al.*, 2017).

1.3.3. Programas computacionais de análise comportamental de *zebrafish*

Na análise automatizada do comportamento de ZF adultos, principalmente, se tem disponível uma infinidade de programas que exercem essa função, até mesmo de maneira gratuita. Dentre as dificuldades encontradas com esse tipo de programa está a análise de diferentes sistemas (como cardíaco, neurológico, hepático) que muitas vezes possuem um custo e só analisam peixes-zebra na forma adulta e não na fase larval (FRANCO-RESTREPO *et al.*, 2019). Além disso, para se ter uma melhor e mais fidedigna análise cardíaca, os filmes devem ser gravados em alta velocidade e a análise da imagem é realizada nesses vídeos para encontrar a velocidade da parede ventricular e a frequência cardíaca. Como alternativa, uma variedade de aplicativos de software pode ser usada para extrair automaticamente a frequência cardíaca das batidas do coração (EMRAN *et al.*, 2010) (Figura 4).

O CardioCount v.2 é um programa computacional desenvolvido no Núcleo de Pesquisa e Inovação Zebrafish – UFSCar, sendo de fácil administração, pelo total controle das suas funções, sendo possível implementar modificações, realizar novas metodologias, além de não gerar despesas aos pesquisadores no desenvolvimento de suas pesquisas.

Assim, as análises do presente trabalho serão feitas com o uso do programa CardioCount v.2, sendo que, se iniciarão com a aquisição de um filme com resolução em escala de cinza na resolução de 640x480 pixels, com taxa de aquisição de 50

quadros por segundo. Após a captura, o filme é carregado pelo programa, e o operador pode colorir as imagens, selecionado uma entre cinco das paletas de cores

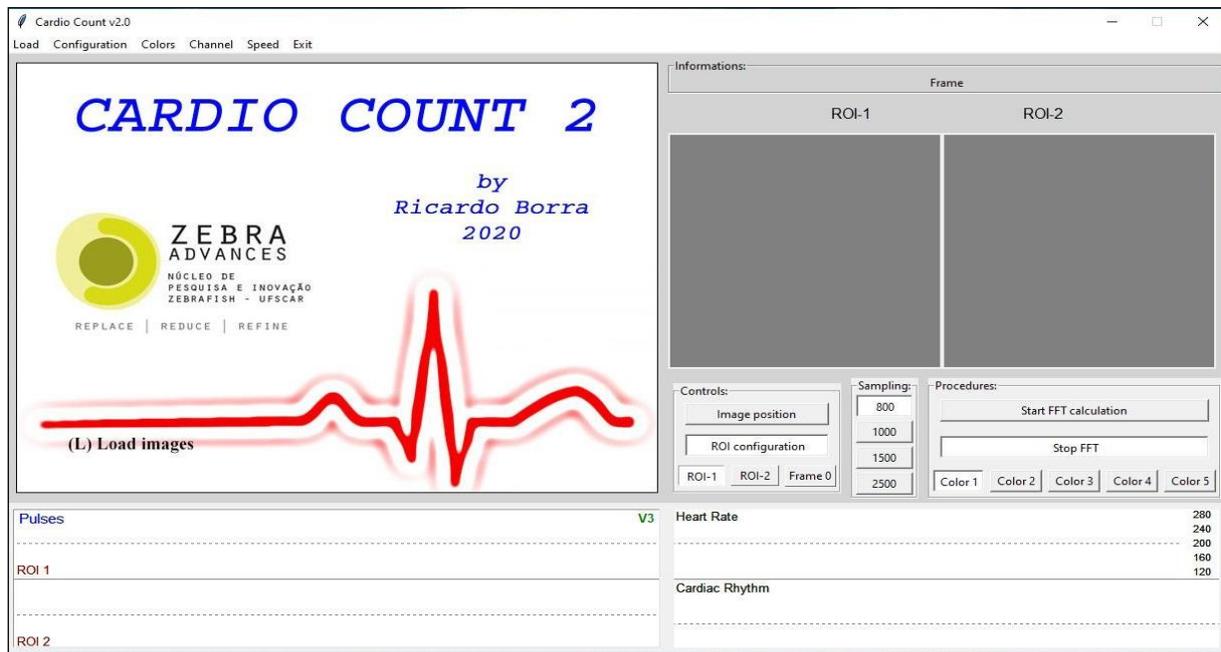


Figura 4. Página principal do programa CardioCount 2 desenvolvido no Núcleo de Pesquisa e Inovação Zebrafish – UFSCar, por Ricardo Borra (2020). *Fonte: Ricardo Borra.*

pré-definidas a fim de realçar as estruturas cardíacas. Em seguida, o operador indica qual a área cardíaca que melhor apresenta variação na intensidade de cor durante os movimentos de sístole e diástole.

Normalmente o operador desenha um retângulo sobre a área do átrio ou ventrículo, conhecida como região de interesse (ROI), e o posiciona na localização que melhor produz o gráfico de pulso. O operador pode observar em tempo real a construção do gráfico à medida que a ROI sofre mudanças de posição ou dimensão. Nesta fase, o operador também deve selecionar o número de amostras (800, 1.000, 1.500 ou 2.500 quadros) que serão utilizados para os cálculos dos parâmetros cardíacos. O programa permite que duas ROIs sejam analisadas simultaneamente (Figuras 5 e 6).

Após a ativação do processo de análise, o programa calcula, para cada quadro, a intensidade de cinza média que corresponde ao ROI ($mROI_n; n = \text{num. do quadro}$). Os

valores mROI são usados para construir a sequência de pontos em um gráfico. A sequência de pontos representa a variação de intensidade de cinza na área do coração

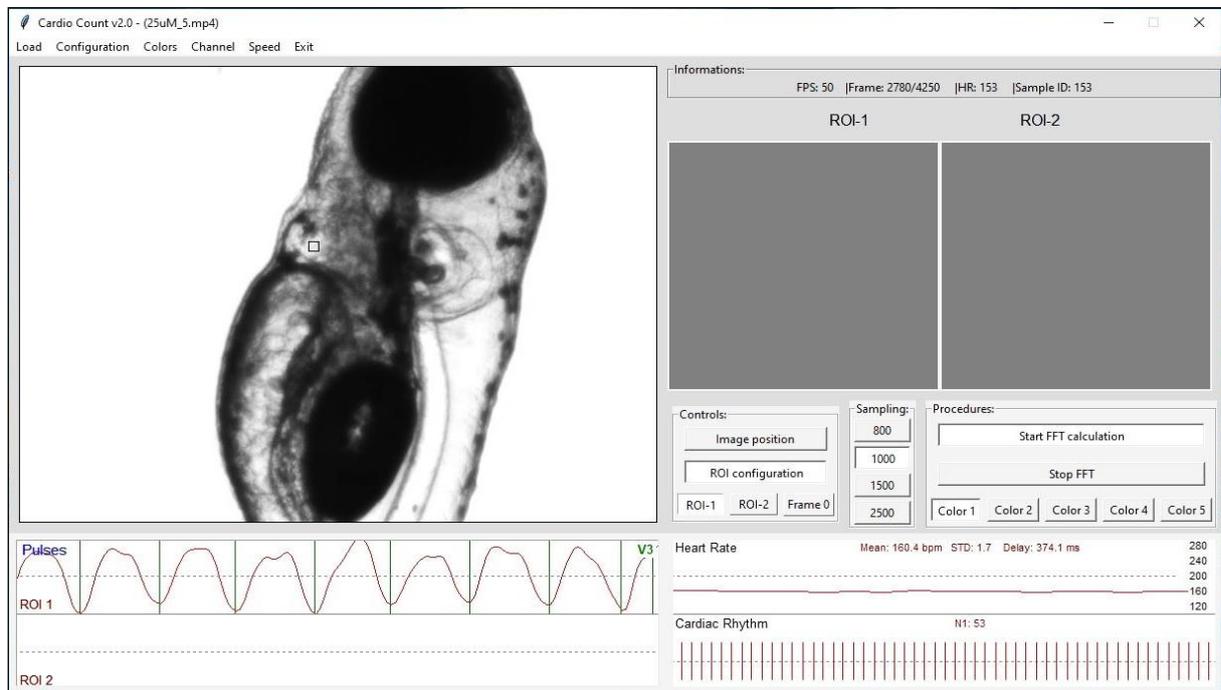


Figura 5. Aba do programa CardioCount v.2 na qual se faz a contagem dos batimentos.

Fonte: Ricardo Borra.

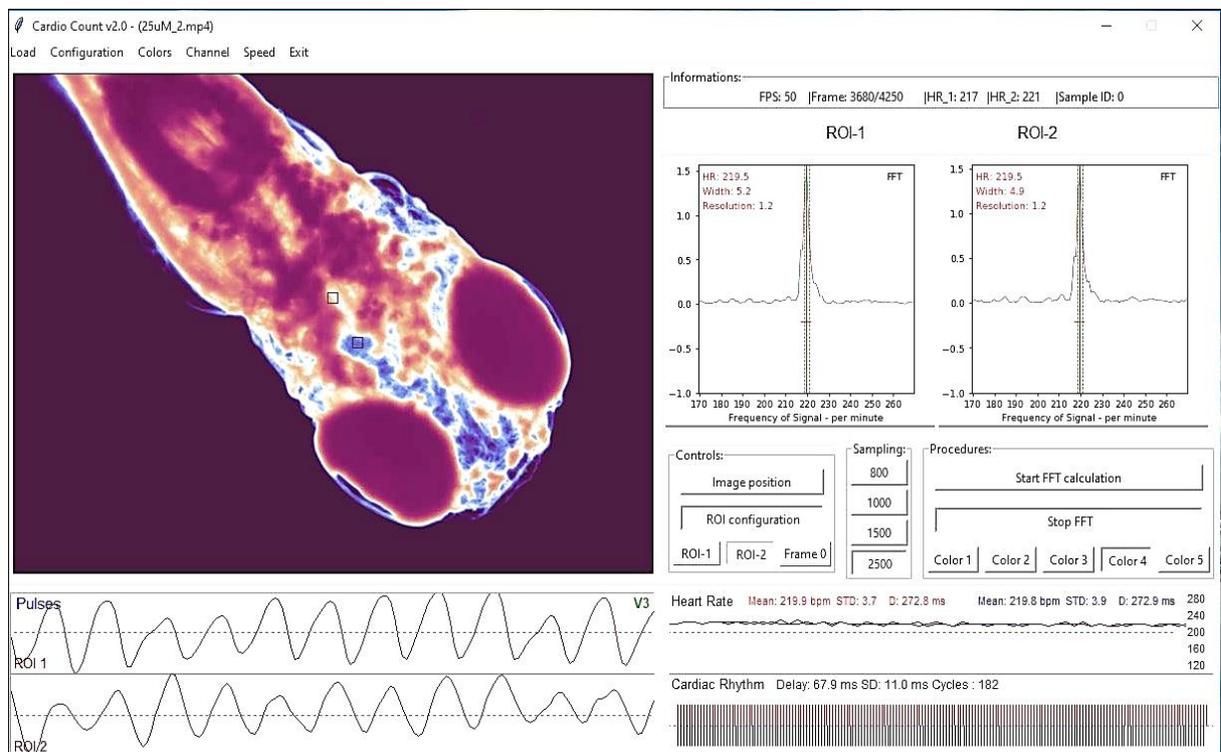


Figura 6. Aba do programa CardioCount v.2, na qual se tem o resultado da contagem dos batimentos e a possível mudança de coloração da imagem. Fonte: Ricardo Borra.

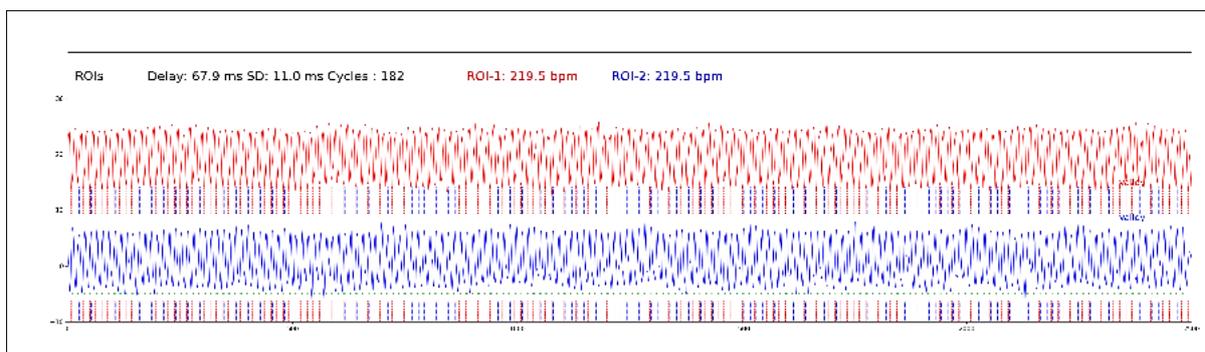


Figura 7. Exemplificação da taxa de batimentos pelo método de Fourier FFT. *Fonte: Ricardo Borra.*

durante os movimentos cardíacos. Essa sequência é submetida a um processo de normalização e convolução matemática, para eliminar ruídos e corrigir erros produzidos por pequenos movimentos do animal durante a filmagem (Figura 7). O objetivo é conseguir um padrão de curva com vales e picos homogêneos que representem os movimentos de contração cardíaca. Como última etapa, um ajuste de escala do gráfico é realizado. Todos esses procedimentos de processamento de sinal ocorrem sem que o operador tome conhecimento.

Uma vez construído a sequência ROI e processado o sinal, o programa calcula a taxa de batimento utilizando, em paralelo, duas metodologias distintas (método da transformada rápida de Fourier FFT: função *magnitude_spectrum* da biblioteca *matplotlib*) e o método para encontrar picos ou vale por comparação com vizinhos (função *scipy.signal.find_peaks* da biblioteca *SciPy* do *python*). Baseado nestas funções, o algoritmo calcula como parâmetros cardíacos: número de batimentos, frequência cardíaca por minuto, intervalo entre cada batimento e a diferença de tempo entre os batimentos de duas ROIs diferentes.

2.0. Materiais e Métodos

2.1. Larvas de zebrafish

As larvas de ZF utilizadas nesse projeto foram reproduzidas no biotério da Universidade Federal de São Carlos, campus de São Carlos. Foram selecionadas quatro drogas cardiônicas (atropina, adrenalina, haloperidol e dopamina – Figura 3) que produzem alterações distintas na frequência cardíaca.

2.1.1. Preparação das larvas

Os embriões do ZF foram obtidos através do acasalamento de peixes adultos reproduzidos no biotério da UFSCar, e mantidos de acordo com os procedimentos padrões estabelecidos (Figura 8). Foram utilizadas larvas de ZF com 96 horas após a fertilização, as quais foram mantidas em placa de Petri a temperatura média de 28°C. Nessas condições, as larvas estão aptas com relação ao desenvolvimento do coração para possibilitar as determinações pelo programa de computador (BERGHMANS *et al.*, 2008).

Foram utilizadas 12 larvas por concentração, totalizando 60 larvas por droga. Estas foram colocadas em placa de 96 poços e na qual foram realizadas cinco



Figura 8. Larvas de ZF com 96 horas pós fecundação. *Fonte: Arquivo pessoal*

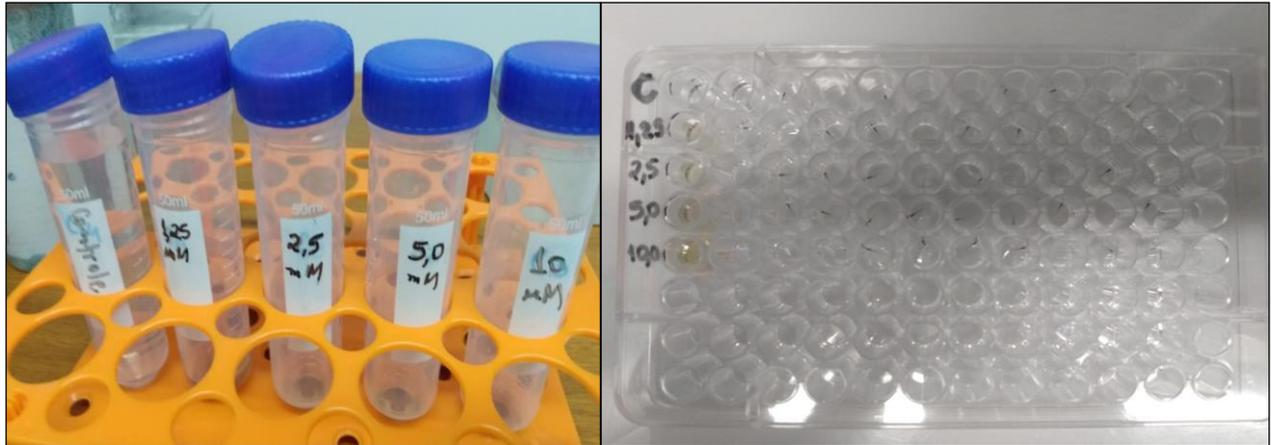


Figura 9. Tubos com as diferentes concentrações utilizadas e placa de 96 poços com larvas de ZF devidamente distribuídas. *Fonte: Arquivo pessoal*

concentrações logarítmicas por medicamento, que por sua vez, eram distintas entre as drogas. Cada larva foi analisada quanto à sua atividade cardíaca e as possíveis alterações com o uso das drogas. O DMSO 1% foi utilizado como controle negativo em todos os testes (CORNET, 2017) (Figura 9).

2.1.2. Filmagem das larvas

Após quatro horas de incubação com o fármaco, as larvas de ZF foram anestesiadas por imersão em solução de metanossulfonato de tricaína $0,7 \mu\text{M}$. As larvas foram filmadas com o uso de um microscópio, e foram registradas por 4.250 quadros (CORNET, 2017).

2.2. Parâmetros cardíacos

2.2.1. Frequência cardíaca

A análise cardíaca foi realizada com o programa computacional CardioCount V2.0, cujo fluxograma de funcionamento está apresentado na Figura 10. As frequências cardíacas dos embriões de ZF são quantificadas a partir do processamento das imagens de vídeos capturadas na forma de um filme em arquivo MP4. O programa CardioCount

lê os vídeos e calcula a variação de tons de cinza na área cardíaca delimitada pelo usuário, quadro a quadro. Os valores são utilizados para construir o gráfico de variação de tonalidades (gráfico de pulso), posteriormente empregado para o processamento dos parâmetros cardíacos. Os picos e os vales do gráfico correspondem aos movimentos de sístole e diástole do coração do embrião/larva (Figura 11). A velocidade de captura da câmera influi diretamente na resolução do intervalo entre os vales e os picos da imagem.

Para produzir gráficos que consigam registrar movimentos na ordem de 300 batimentos por minuto, o ideal é que as câmeras consigam atingir velocidade de captura de no mínimo 50 quadros por segundo. No presente caso, foi utilizada uma câmera monocromática acA1300-200um - Basler ace (Basler, Inc. Exton, PA, USA) acoplada a um microscópio invertido Motic AE31E (Motic Instruments, Inc, Richmond, BC, Canada), com velocidade de captura máxima de 203 quadros por segundos, na resolução de 1,3 megapixels.

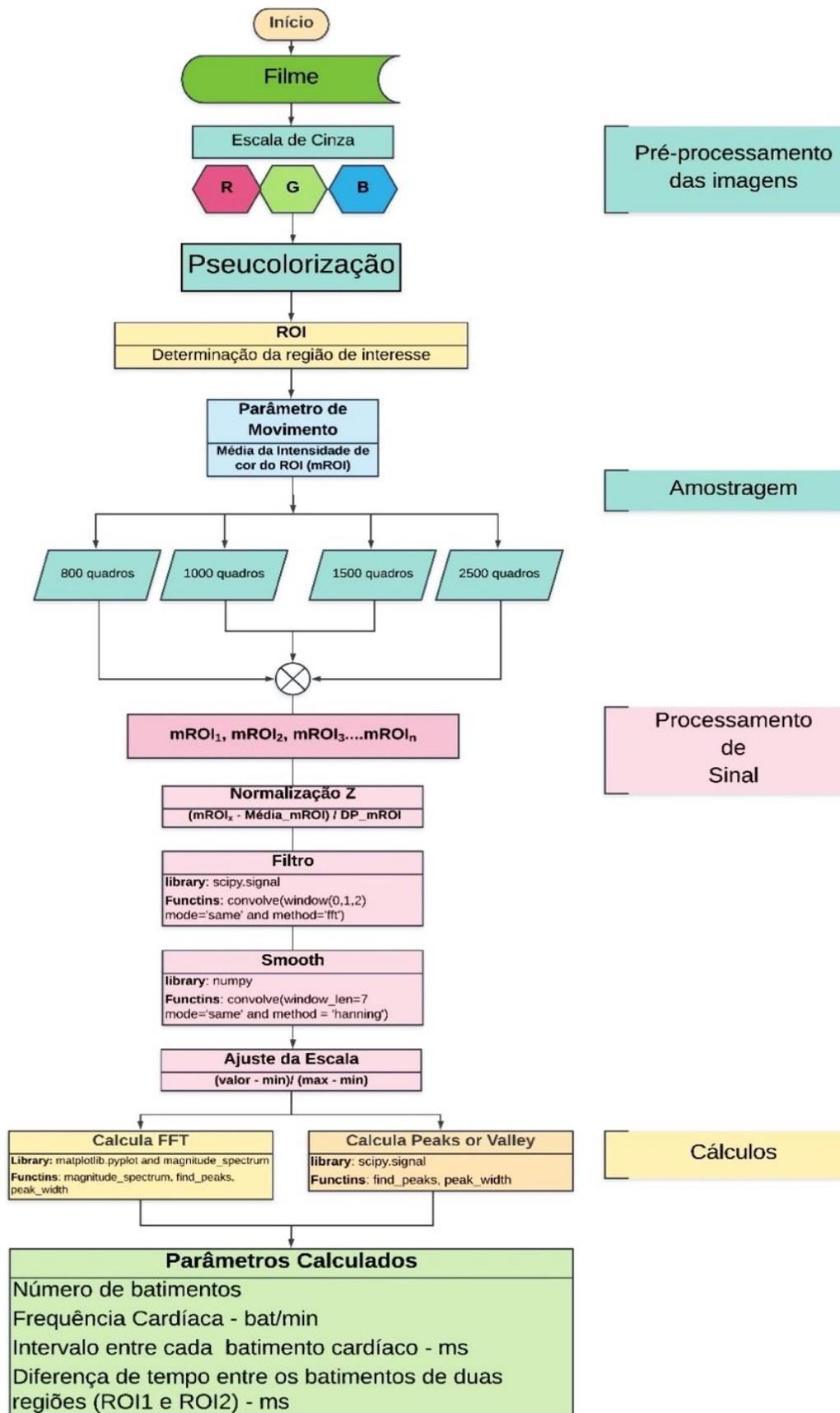


Figura 10. Fluxograma representativo do funcionamento do programa computacional CardioCount V. 2.0. *Fonte: Ricardo Borra*

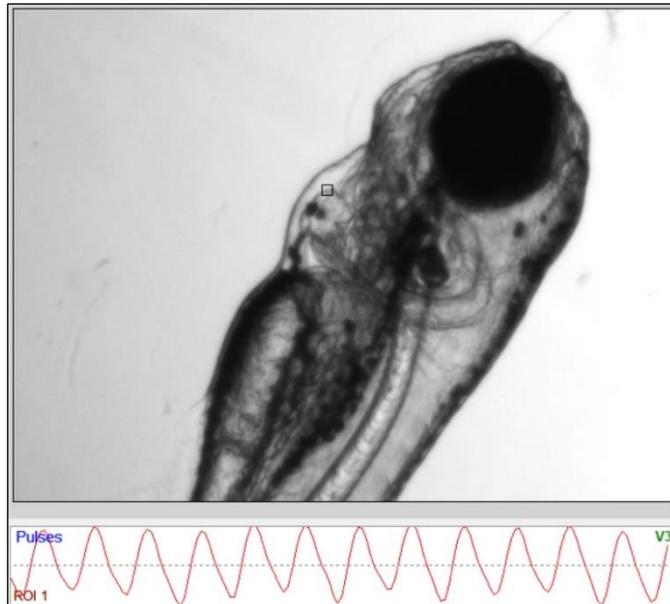


Figura 11. Imagem mostrando a área (ROI) cardíaca definida pelo usuário e o gráfico de variação de cor da região obtida durante o intervalo do filme. *Fonte: Arquivo pessoal.*

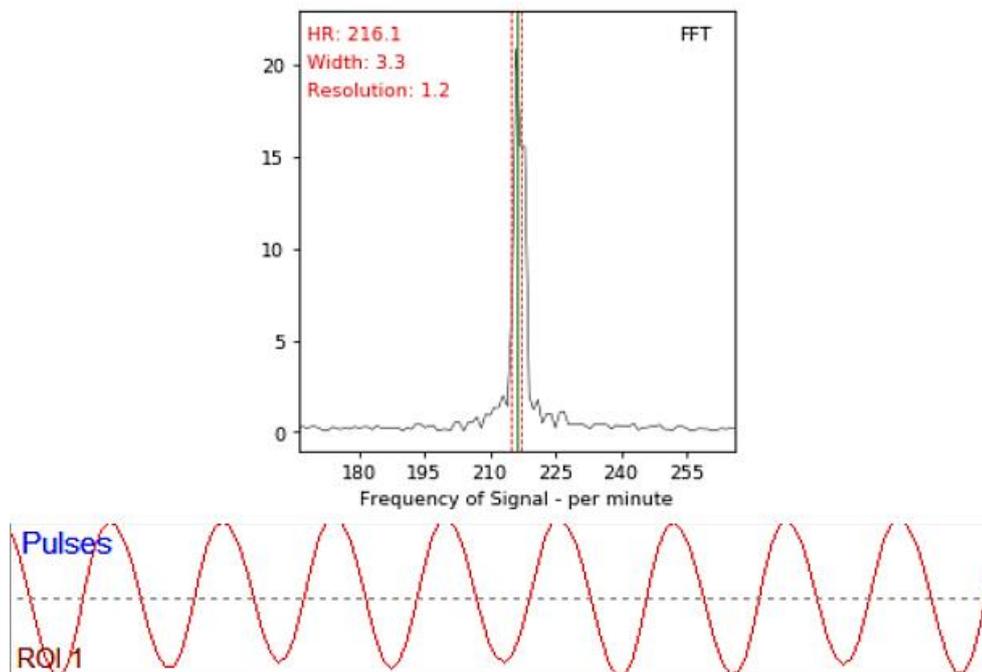


Figura 12. Batimentos no domínio das frequências e gráfico dos batimentos cardíacos no domínio do tempo. *Fonte: Arquivo pessoal.*

A partir do gráfico de pulso (Figura 11), o programa CardioCount calcula a frequência cardíaca por duas metodologias de forma independente. A primeira metodologia utiliza a “transformada rápida de Fourier” (FFT) para calcular a frequência de onda do desenho (Figura 12).

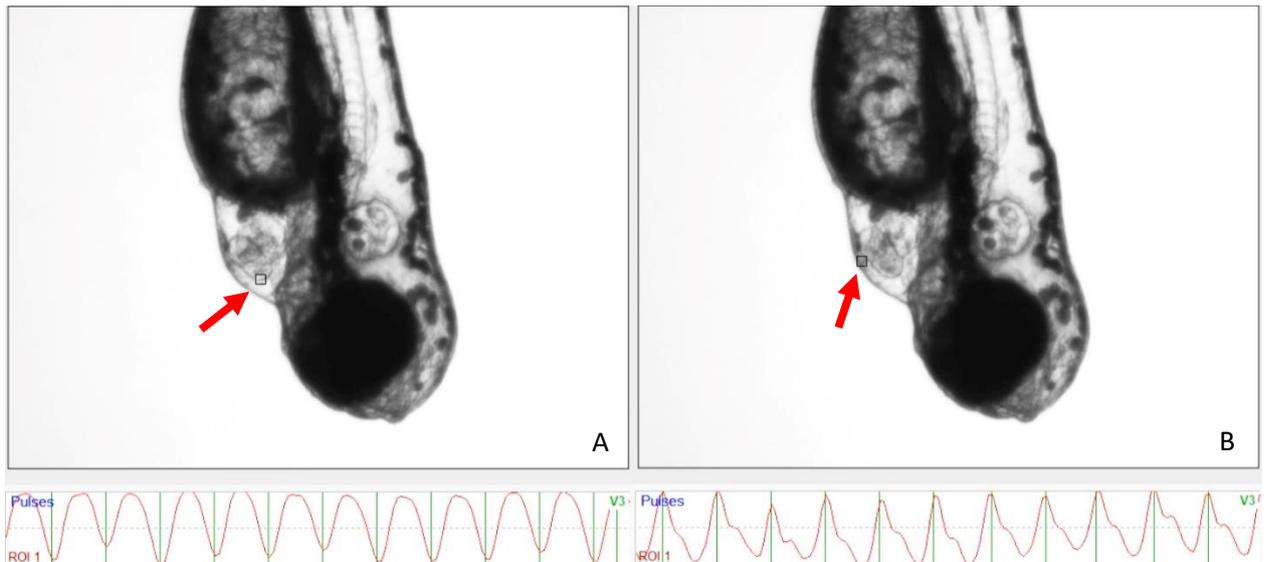


Figura 13. Larva de ZF com seus respectivos gráficos de pulso em função da área cardíaca definida pelo usuário (setas vermelhas). *Fonte: Arquivo pessoal.*

Na Figura 12 é possível observar no gráfico superior a existência de um pico correspondente a frequência de 216,1 bpm. O gráfico mostra que a resolução é de 1,2 bpm e a largura da banda é de 3,3. A resolução de frequência corresponde a capacidade de detectar mudanças na variação de batimentos. Para aumentar a resolução podem ser utilizadas amostragens maiores para o cálculo da frequência a partir do algoritmo de FFT. Neste caso, a amostragem utilizada foi de 2.500 quadros. Por outro lado, a largura de banda está associada com a variação de frequência do gráfico.

A segunda metodologia baseia-se na utilização de algoritmos que identificam a posição de vales e picos no gráfico de pulso (Figura 13). A distância entre os vales ou os picos são utilizados para calcular os intervalos de tempo entre os batimentos cardíacos, a partir da velocidade de captura de vídeo da câmera. A distância entre dois vales ou dois picos consecutivos representa um determinado número de quadros no filme. Se a velocidade de captura da câmera é de 50 quadros por segundo, o intervalo entre picos ou vales corresponde a ao número de quadros multiplicado pelo tempo de captura de cada quadro (1/50 s). Exemplo, nos casos com 20 quadros de registros entre dois picos consecutivos, o intervalo seria de 0,4 s (400 ms). A partir dos valores de

intervalos, a frequência cardíaca (batimento por minuto) pode ser inferida pela fórmula $\text{frequência cardíaca} = 60 / \text{intervalo (s)}$. Desta forma, um intervalo de 400 ms corresponderia a uma frequência cardíaca de $60/0,4 = 150$ bpm.

Na figura 13A pode ser observado que a variação de tonalidade em relação ao tempo produz um gráfico com pulso delimitados por curvas mais suaves, enquanto a região do gráfico da figura 13B produziu pulso com delimitações mais agudas. No caso da figura 13A, a identificação de vales é mais precisa para determinação de intervalos entre dois pulsos. Na imagem à direita, ao contrário, os picos permitem uma melhor identificação entre pulsos. O *software* CardioCount permite ao usuário definir o melhor parâmetro a ser utilizado (identificação de pico ou vale) para cálculo dos intervalos. Embora o critério de referência possa variar de acordo com o local e posição da larva, a distância entre picos ou vale é sempre a mesma pois, depende somente do intervalo entre os batimentos cardíacos.

Além da frequência cardíaca média, o programa calcula pela segunda metodologia a frequência cardíaca associada a cada pulso e mostra essa informação por meio de dois tipos de gráficos: o que representa a variação da frequência no intervalo de tempo analisado (*Heart Rate*) e o que representa os intervalos entre os pulsos (*Cardiac Rhythm*) (Figura 14).

Neste gráfico são mostrados a frequência cardíaca média (188,1 bpm) e o desvio padrão (8,0 bmp) e o intervalo médio entre cada batimento cardíaco (319 ms). O gráfico inferior (*Cardiac Rhythm*) representa o intervalo entre os pulsos, neste gráfico são mostrados além do número de total de batimento no intervalo de amostragem, bem como os valores de entropia alta e baixa que representam o distanciamento de ritmo de batimento. Os valores de entropia variam de 0,00 (rítmico) a 1,00 (arrítmico).

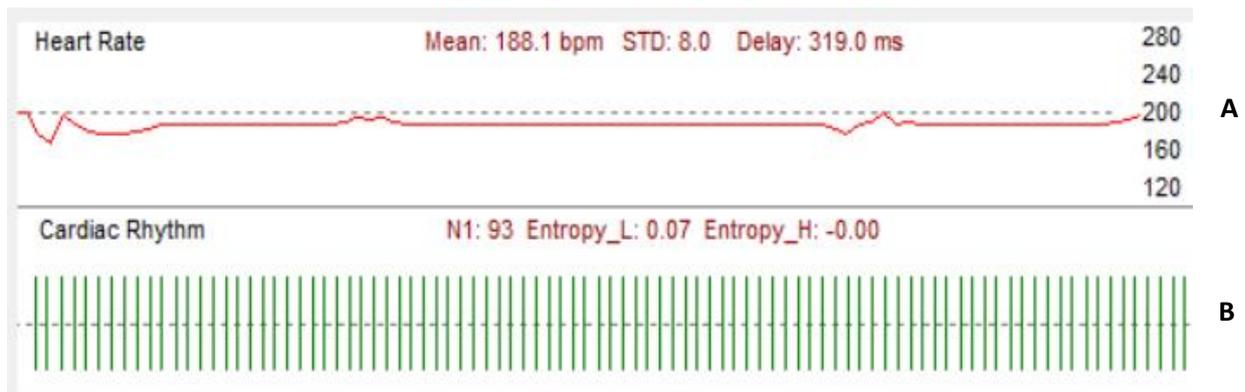


Figura 14. Representação gráfica da (A) variação de frequência cardíaca durante o intervalo de amostragem (*Heart rate*) e (B) intervalo entre pulsos (*Cardiac Rhythm*).
Fonte: Arquivo pessoal.

2.2.2. Entropia

A entropia foi classicamente definida como uma propriedade termodinâmica capaz de quantificar a aleatoriedade de um sistema termodinâmico. Esse conceito foi mais recentemente expandido para descrever a previsibilidade ou aleatoriedade dos sistemas físicos à medida que mudam com o tempo, ou seja, quanto maior o valor da entropia, mais aleatório (ou caótico) o processo. Assim, em séries temporais, como a variação de frequência em determinado intervalo de tempo, a ordem dos dados é de grande importância e a entropia pode ser quantificada por meio de uma metodologia conhecida como entropia de permutação, onde uma distribuição de probabilidades de padrões ordinários pode ser usada para calcular o grau de desordem do sistema (RIEDLA *et al.*, 2013). No caso da frequência cardíaca, a desordem representa o conjunto de padrões de frequência variados, dependente de fatores, tais como, a respiração, o estado do sono, o ritmo circadiano e o sistema renina-angiotensina, os quais caracterizam uma arritmia fisiológica ou não fisiológica.

O cálculo da entropia de permutação envolve a utilização de dados dicotômicos (0 ou 1), ou seja, utilizar os dados de intervalos de batimento cardíaco representa classificar em 0 ou 1 um intervalo entre batimentos consecutivos em função de um limiar

escolhido. Se o limiar for pequeno, o valor 1 representa as variações de intervalos a partir de valores baixos. Aumentando o limiar, o valor 1 é atribuído às variações de intervalos maiores. Neste caso, a escolha do limiar é de fundamental importância para definir em que faixa de alteração se deseja investigar.

No presente caso, a proposta é avaliar dois tipos de padrões de arritmia: aquelas que acontecem por pequenas variações na frequência cardíaca e aquelas que se manifestam por intermédio de grandes variações na frequência cardíaca. Para isso, em vez de optar por um ou outro limiar, são calculados dois valores de entropia com amplitude de limiares diferentes. A entropia calculada a partir de um limiar baixo é chamada de ENTROPIA_L e a calculada utilizando um limiar alto, denominada de ENTROPIA_H, as quais são responsáveis por registrar arritmias a partir de variações pequenas nos intervalos de batimento (arritmia regulares) e arritmias com grande variação de tempo entre os batimentos (arritmia irregulares).

Para realizar os cálculos da ENTROPIA_L, as sequências temporais de pulsos são filtradas de tal forma que pequenas variações, usualmente associadas com o ruído do sistema, sejam removidas. No cálculo da ENTROPIA_H, as sequências temporais são filtradas de forma mais pronunciada, de tal forma, que somente as grandes variações das frequências permaneçam.

Para calcular as entropias, é utilizado um conjunto de padrões ordinários representado por sequências de 0 ou 1. Os padrões podem ser formados por permutações de 2, 3, 4 ou n elementos de comprimento. Quanto maior o comprimento, maior o número de padrões a serem pesquisados e classificados na sequência de valores temporais. Normalmente a maioria dos trabalhos indica a utilização de padrões formados por comprimento 3, principalmente quando a quantidade de dados (número de pulsos) é limitada. Normalmente, os padrões de comprimento 3 são restritos a 6 tipos

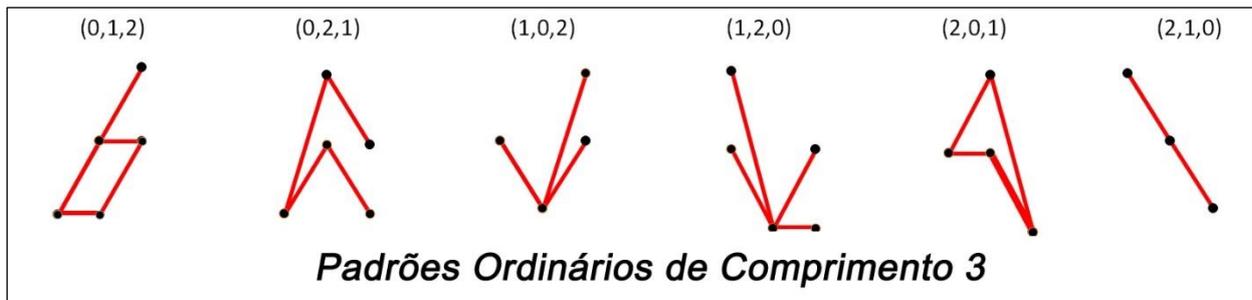


Figura 15: Doze padrões de comprimento 3 utilizados para cálculo da entropia. *Fonte: Ricardo Borra.*

de variações (RIEDLA *et al.*, 2013). No presente caso, os padrões de comprimento foram ampliados para 12 tipos (Figura 15).

Os valores de entropia são calculados pelo programa por meio de uma metodologia conhecida como entropia de permutação, a qual é capaz de fornecer uma medida de quantificação da complexidade de um sistema, capturando as relações de ordem entre os valores de uma série temporal e extraíndo uma distribuição de probabilidade dos padrões ordinais.

Para calcular a entropia de permutação o programa CardioCount utiliza os dados de intervalos (quadros) entre os pulsos para calcular o grau de complexidade da assinatura de pulsos. Nos casos onde o batimento segue um padrão rítmico, os valores de entropia de permutação são baixos (probabilidade de 0%) e, nos casos onde existe uma arritmia regular ou irregular, os valores de entropia ficam próximos de 1 (probabilidade de 100%).

O cálculo para a entropia baixa (Entropia_L) se dá pelos seguintes passos:

1) Sequência numérica que representa os intervalos entre os batimentos (em quadros).

Por exemplo:

Conj A = {15, 25, 13, 14, 23, 28, 16, 14, 13, 22, 14, 18, 15, 21, 14, 13, 17, 27, 14, 20, 14, 13, 21, 21, 14, 14, 21, 16, 16, 14, 18, 17, 19, 25, 14, 19, 18, 13, 25, 15, 16, 18, 19, 14}

SÉRIE TEMPORAL DOS INTERVALOS ENTRE OS PULSOS



Figura 16. Série temporal representando os intervalos entre os pulsos do conjunto A.

Fonte: Ricardo Borra.

2) Obtenção da a média dos valores (média = 17,5) e cálculo do índice de ajuste denominado de **valor inteiro de 40% da média** (VIM40) que será utilizado para padronização dos valores do conjunto:

$$\text{VIM40} = \text{int}(\text{média} * 0,4)$$

sendo que para o conjunto A, esse valor assume o valor de 7.

3) Padronização da escala, dividindo todos os valores pelo valor inteiro de 40% da média (VIM40).

Essa padronização serve para que a altura relativa dos vales e picos seja usada para cálculo das entropias e não os valores absolutos. Isso permite que as frequências cardíacas altas ou baixas possam ser tratadas da mesma forma. Após a operação de padronização, foi obtido o seguinte conjunto de dados:

Conj B = {2,1 3,6 1,9 2,0 3,3 4,0 2,3 2,0 1,9 3,1 2,0 2,6 2,1 3,0 2,0 1,9 2,4 3,9 2,0 2,9 2,0 1,9 3,0 3,0 2,0 2,0 3,0 2,3 2,3 2,0 2,6 2,4 2,7 3,6 2,0 2,7 2,6 1,9 3,6 2,1 2,3 2,6 2,7 2,0}

A aplicação da operação VIM40 produz uma regra de corte que pode ser traduzida da seguinte maneira:

- Valores de intervalo entre 7 a 13 serão arredondados para 7;
- Valores de intervalo entre 14 a 20 serão arredondados para 14;

SÉRIE TEMPORAL DOS INTERVALOS ENTRE OS PULSOS

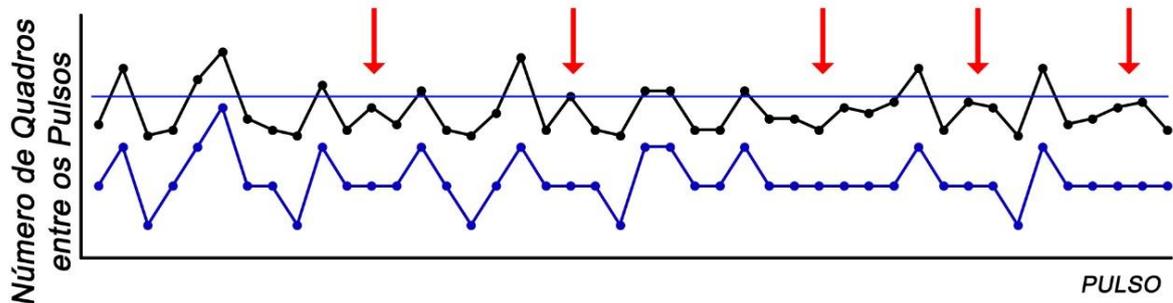


Figura 17. Série temporal representando os intervalos entre os pulsos do conjunto A e C, com destaque (setas vermelhas) aos picos ou vales que foram removidos por apresentar uma diferença em relação à média da série (linha azul) menor do que o limiar aplicado pelas operações matemáticas da ENTROPIA_L. Em azul observa-se o gráfico linearizado correspondente ao Conjunto C (ENTROPIA_L). *Fonte: Ricardo Borra.*

- Valores de intervalo entre 21 a 27 serão arredondados para 21;
- Valores de intervalo entre 28 a 34 serão arredondados para 28.

4) Neste ponto, é realizada a operação inversa e os valores são multiplicados pelo valor inteiro da média ($VIM40 = 7$), sendo obtido o conjunto C.

Conj.C. = {14 21 7 14 21 28 14 14 7 21 14 14 14 21 14 7 14 21 14 14 14 7 21 21 14 14 21 14 14 14 14 14 21 14 14 14 7 21 14 14 14 14 14}

Desta forma, é obtida uma sequência numérica, onde os valores de picos de pequena magnitude são filtrados (Figura 17).

5) Para o cálculo da entropia alta (Entropia_H) foi usado a mesma sequência de operações com o valor VIM representando pelo inteiro de 80% da média (VM80): $\text{int}(\text{média} \cdot 0,8) = 14$.

A aplicação da operação VIM80 produz uma regra de corte que pode ser traduzida da seguinte maneira:

- Valores de intervalo entre 0 a 13 serão arredondados para 7;
- Valores de intervalo entre 14 a 27 serão arredondados para 14;

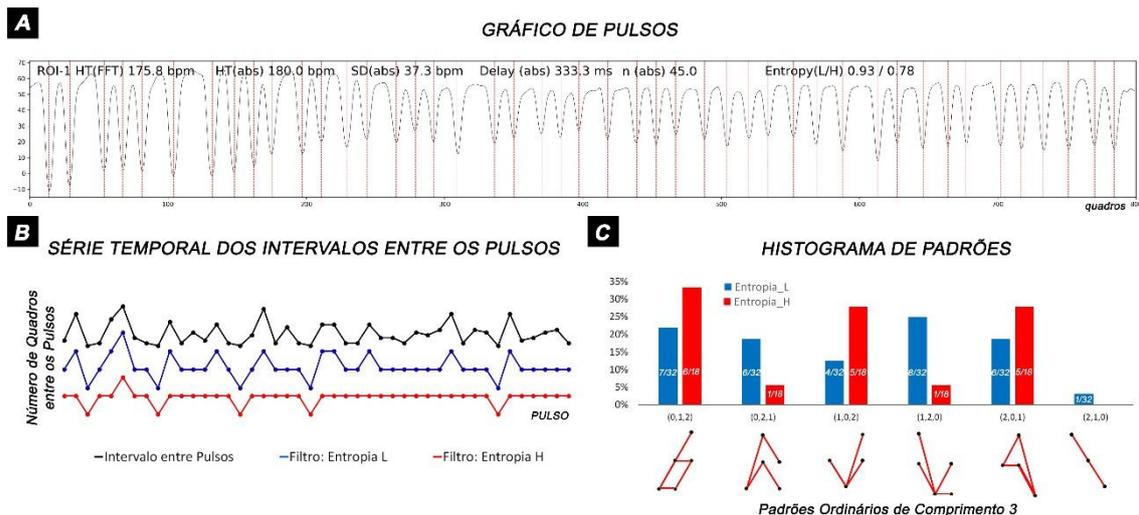


Figura 19. Análise da Entropia: (A) Gráfico de Pulsos mostrando a variação dos tons de cinza gerados pelos batimentos cardíacos. (B) Gráfico da série temporal demonstrando as relações entre os pulsos e intervalos entre os pulsos. (C) Histograma de padrões.
 Fonte: Arquivo pessoal.

Tabela 1: Quantidades relativas dos padrões ordinários em cada assinatura:

Padrões	(0,1,2)	(0,2,1)	(1,0,2)	(1,2,0)	(2,0,1)	(2,1,0)	TOTAL
Entropia_L	7(22%)	6(19%)	4(13%)	8(25%)	6(19%)	(13%)	32(10%)
Entropia_H	6(33%)	1(6%)	5(28%)	1(6%)	5(28%)	0(0%)	18(100%)

Para calcular a entropia utiliza-se a fórmula:

$$\text{Entropia} = - \frac{\sum_{i=1}^n (p_i \cdot \log_2(p_i))}{\log_2(n)}, \text{ onde } n=6 \text{ e } i = \{1,2,3,4,5,6\}$$

Cálculo da Entropia_H:

$$= -(0.33 \cdot \log_2(0.33) + 0.06 \cdot \log_2(0.06) + 0.28 \cdot \log_2(0.28) + 0.06 \cdot \log_2(0.06) + 0.28 \cdot \log_2(0.28) + 0.0 \cdot \log_2(0.0)) / \log_2(6) = 0.78$$

No gráfico de pulsos (Figura 19(A)) é possível observar variação na largura dos pulsos, indicando uma alteração no ritmo cardíaco. O gráfico da série temporal (Figura 19(B)) mostra as relações entre os pulsos e os intervalos entre os pulsos, representado

pelo número de quadros entre dois vales ou picos consecutivos. No gráfico observa-se o desenho formado pelos intervalos de pulsos (preto). É possível observar os resultados dos sinais de pulso filtrados seguindo a metodologia Entropia L (azul) e Entropia H (vermelho). No gráfico 19B, o padrão de algumas saliências e reentrâncias do gráfico azul desapareceram quando comparados com o gráfico em preto. Os valores mais baixos foram linearizados. No gráfico vermelho a intensidade da linearização foi maior, de tal forma que somente os maiores intervalos permaneceram representados. A Figura 19(C) consiste no histograma, mostrando a distribuição de cada um dos padrões de comprimento 3 presentes nas linhas azul e vermelhas da Figura 19(B). Pode ser observado, por exemplo, que o padrão (0,1,2) aparece 7 vezes no gráfico azul enquanto aparece 6 vezes no gráfico vermelho. Esses padrões são transformados em frequência relativa e usados para calcular os valores de Entropia de Permutação.

2.2.3. Análise da cardiotoxicidade

Essa análise objetiva utilizar os parâmetros de frequência cardíaca, Entropia_L e Entropia_H para obter uma classificação de toxicidade cardíaca. O princípio que norteia esta proposta está baseado no fato de que as drogas podem causar efeitos tóxicos alterando, não só o intervalo de contração cardíaca, mas também, os padrões de contração. Com essa abordagem é esperado aumentar a sensibilidade em detectar alterações cardíacas de drogas. Para isso os três parâmetros: frequência cardíaca, Entropia_L e Entropia_H serão quantificados utilizando 4 tipos diferentes de substâncias, em 4 concentrações diferentes, as quais supostamente alteram a fisiologia cardíaca. Os dados serão comparados com grupo controle, não exposto a qualquer tipo de tratamento.

Os valores de Entropia_L e Entropia_H serão combinados de forma a compor um único índice de Entropia (E). Para calcular o valor de entropia único, será utilizada a

média ponderada com peso para ENTROPIA_L de 1,0 e para ENTROPIA_H de 1,25, sendo o cálculo expresso como: $ENTROPIA (E) = (ENTROPIA_L + 1,25 * ENTROPIA_H) / 2,25$. A opção da média ponderada foi para aumentar a importância de grandes intervalos entre os batimentos cardíacos no cálculo da Entropia.

Os valores serão tabulados e submetidos à análise estatística multivariável por meio da Análise de Regressão logística. Para isso, todos os casos não expostos aos compostos serão agrupados em um único grupo Controle (GRUPO 0) e comparado com cada uma das concentrações das drogas (GRUPO 1) por meio da regressão logística, onde os parâmetros de Frequência Cardíaca, Entropia_L e Entropia_H entram como variáveis dependentes. Após a obtenção dos valores p das comparações, será aplicada a correção pelo False Discovery Rate para controlar a taxa de erro familiar.

2.3. Representação dos dados

No sentido de visualizar a distribuição dos casos, foi construído um gráfico de dispersão XY para representar a distribuição dos parâmetros de frequência cardíaca (FC) e entropia combinada (E) simultaneamente. Para isso, o valor FC foi inicialmente normalizado (FC_Z) utilizando a média e o desvio padrão do grupo controle e o valor E não foi alterado. Desta forma as escalas FC e E ficaram representado a quantidade de DP da média (~ -3 a $\sim +3$) e E (0-1) respectivamente.

$$FC_Z = (FC - \text{média_FC_controle}) / DP_FC_Controle$$

Depois da transformação, os valores de FC e E foram novamente transformados utilizando uma curva sigmoide (Figura 20). Essa transformação possibilitou que valores próximos e distantes dos eixos fossem agrupados, permitindo que os dados com valores normais e alterados se distribuíssem de forma mais próxima a uma curva normal.

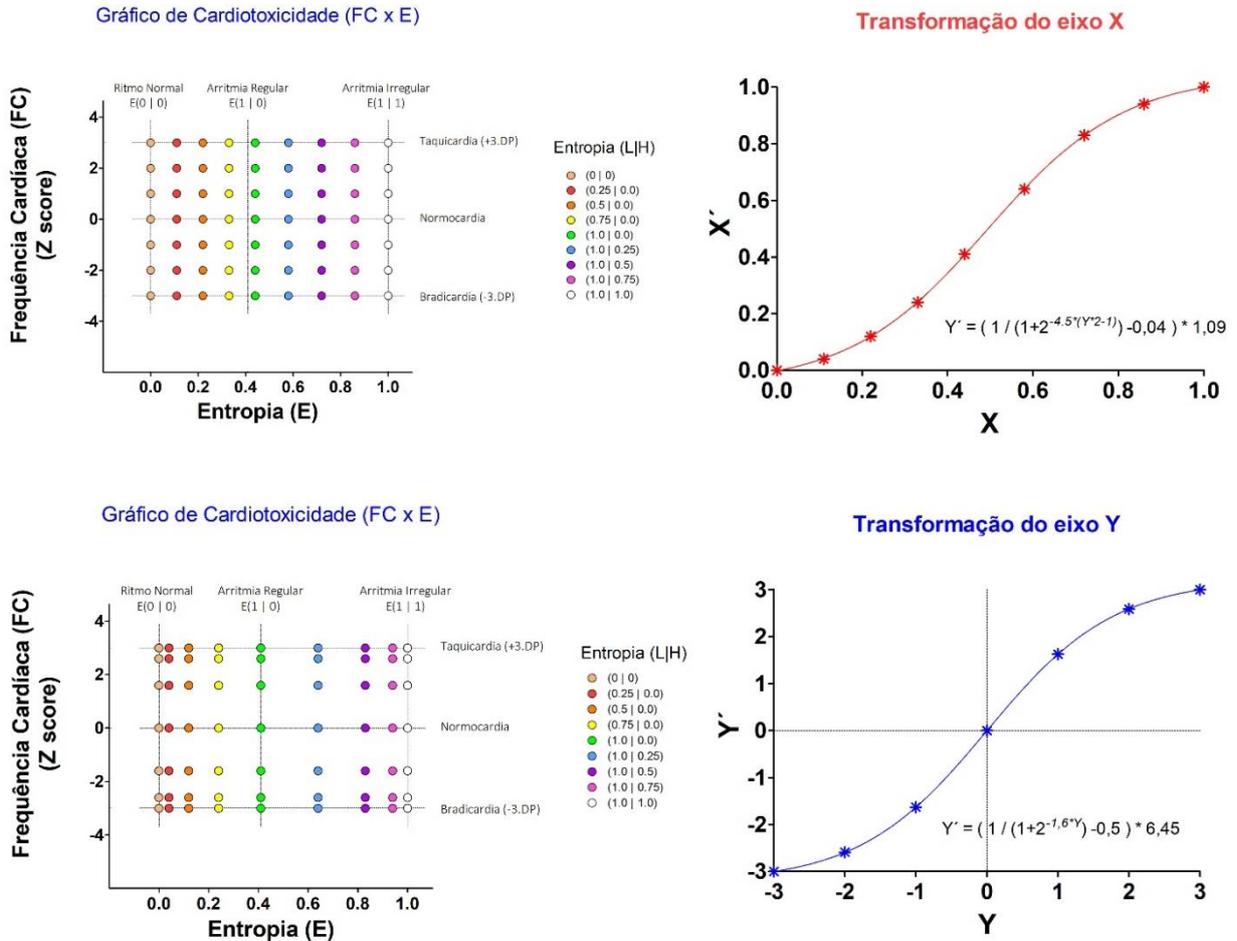


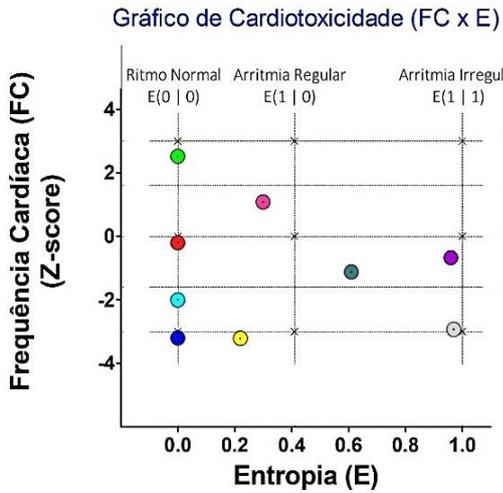
Figura 20. Representação gráfica construída com os valores de FC padronizados e Entropia (A). Os pontos representam valores que combinam uma escala de 7 níveis de FC com 9 níveis de E (Tabela – ANEXO 1). As curvas de traçado sigmoide representadas nos gráficos à direita, representam a operação de transformação realizadas nos eixos X (B) e Y (D). O gráfico com a curva vermelha (B) apresenta a equação utilizada para transformação do eixo X e o gráfico com a curva azul (D) apresenta a equação utilizada para transformação do eixo Y. Após as transformações, os dados apresentados no gráfico de dispersão (A) ficam representados de acordo com o gráfico de dispersão (C). *Fonte: Arquivo pessoal.*

3.0. Resultados e Discussão

3.1. Efetividade da Metodologia Proposta

As avaliações dos batimentos e da ritimicidade cardíaca são parâmetros-chave para a avaliação da função cardíaca. Atualmente, a aquisição e avaliação de tais parâmetros podem ser realizadas tanto de forma manual como automatizada. A contagem manual é um método demorado, subjetivo e que pode levar a resultados inconsistentes. Já o método automatizado permite ganhos de tempo, reprodutibilidade e objetividade dos resultados. Sendo assim, foi desenvolvido pelo presente grupo de pesquisa o programa computacional *CardioCount* que permite analisar a função cardíaca de ZF de forma simples e precisa, conforme ilustrado na Figura 21, onde é mostrada a correspondência entre os diversos padrões de alterações cardíacas e a sua representação gráfica.

Assim, para comprovar a sua eficácia, larvas de ZF foram expostas a quatro diferentes drogas com cardiotoxicidade comprovada, a saber, dopamina, adrenalina, atropina e haloperidol.



- #1 #2 #3 #4 #5 #6 #7 #8 #9
- ● ● ● ● ● ● ● ●

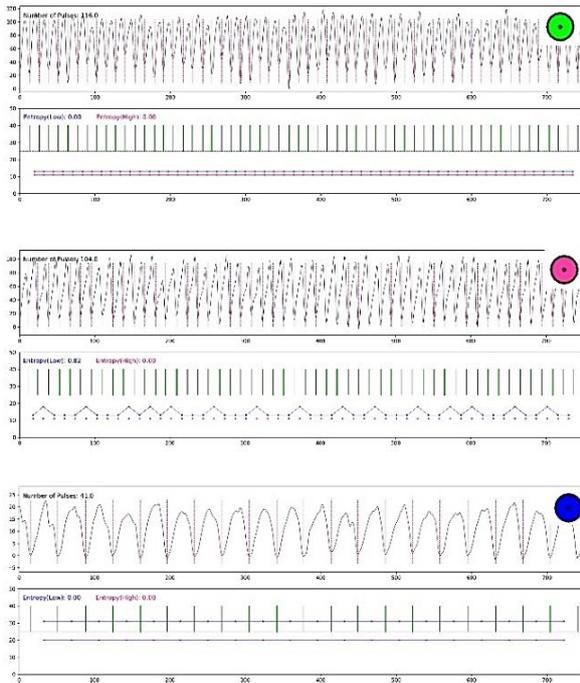


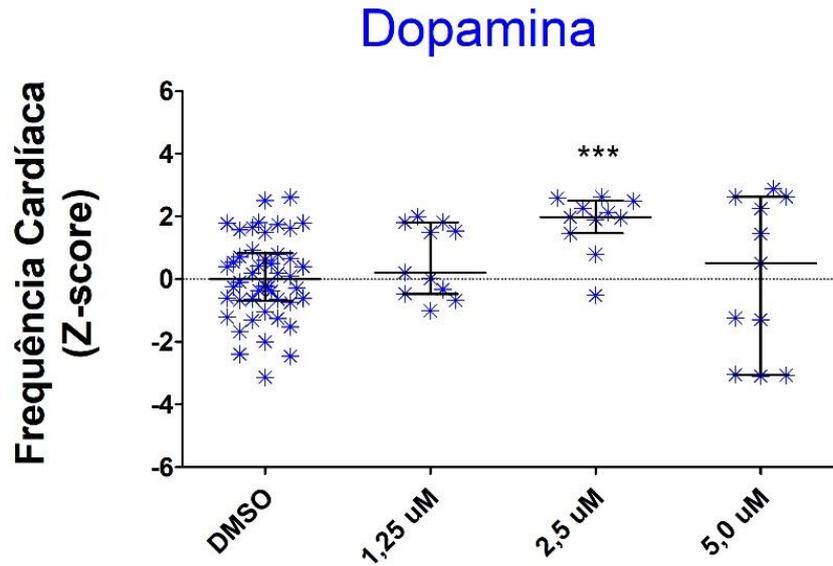
Figura 21 – Relatórios de casos mostrando os gráficos de FC e o intervalo de batimento com os valores de FC, ENTROPIA_L e ENTROPIA_H e as respectivas representações no gráfico de dispersão. *Fonte: Arquivo pessoal.*

3.2 Dopamina

Analisando separadamente as variáveis FC e E, o uso de 1,25 μM de dopamina não alterou a FC das larvas de ZF. No entanto, ao aumentar a concentração para 2,5 μM pôde ser constatado um aumento significativo deste parâmetro, contrastando com a concentração de 5 μM , que apesar induzir um pequeno aumento na FC, este não foi consistente em relação ao controle e as demais concentrações testadas ($p > 0.05$) (Figura 22). Em relação ao ritmo de batimento cardíaco representado pelos valores de entropia (E), a dopamina não induz alterações significativas, como pode ser observado pela Figura 23.

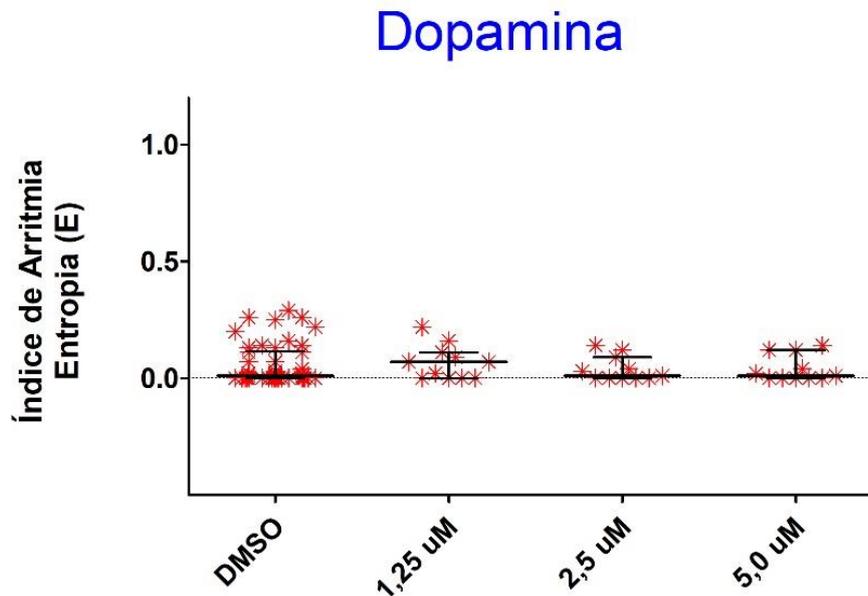
Essa dependência de FC e E com a concentração pode ser relacionada com o fato de que a dopamina é um agonista adrenérgico não seletivo, da classe das catecolaminas, cujos efeitos variam de acordo com a dose ministrada. Sendo assim, o uso da concentração de 1,25 μM foi insuficiente para promover alterações na FC, uma vez que em baixas doses, esta é capaz de atuar somente em receptores dopaminérgicos (D1 e D2) produzindo efeitos como vasodilatação renal e esplênica (GOLDBERG *et al.*, 1972; FRANCIS *et al.*, 2014). Ainda, com a utilização de uma concentração intermediária (2,5 μM) de dopamina, foi constatado aumento significativo da FC, que pode ser explicado pela ativação receptores β_1 adrenérgicos presentes no coração, com aumento da força de contração do miocárdio e da frequência cardíaca (FRANCIS *et al.*, 2014; GINWALLA & TOFOVIC, 2018).

Por fim, inúmeros autores descrevem a ocorrência de vasoconstrição periférica, pela ativação de receptores α_1 após o uso de altas doses de dopamina. Dessa forma, pode ser presumido que, apesar da ativação dos receptores β_1 , ao utilizar a concentração de 5 μM , houve uma predominância dos efeitos α_1 adrenérgicos (FRANCIS *et al.*, 2014; GINWALLA & TOFOVIC, 2018), que resultou em vasoconstrição



Kruskal-Wallis test e Dunn's Multiple Comparison Test
 (***) $p < 0,001$

Figura 22. Gráfico de dispersão mostrando a distribuição dos valores FC dos grupos tratados com Dopamina em relação ao Controle DMSO. *Fonte: Arquivo pessoal.*



Kruskal-Wallis test e Dunn's Multiple Comparison Test

Figura 23. Gráfico de dispersão mostrando a distribuição dos valores de E dos grupos tratados com Dopamina em relação ao Controle DMSO. *Fonte: Arquivo pessoal.*

periférica com conseqüente aumento da pressão sistólica e diastólica e diminuição reflexa da frequência cardíaca (IRIGOYEN et al., 2001).

Gráfico de Cardiotoxicidade (FC x E) - Dopamina

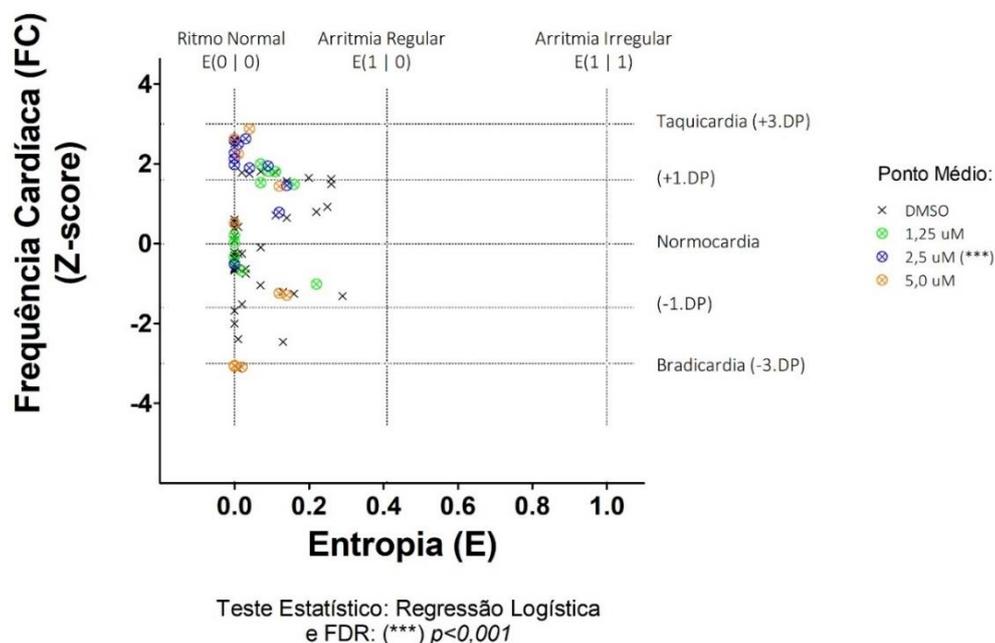


Figura 24. Gráfico de dispersão mostrando a distribuição dos casos de larvas expostas à Dopamina em três concentrações diferentes, em relação ao grupo controle DMSO. *Fonte: Arquivo pessoal.*

Gráfico de Cardiotoxicidade (FC x E): Dopamina

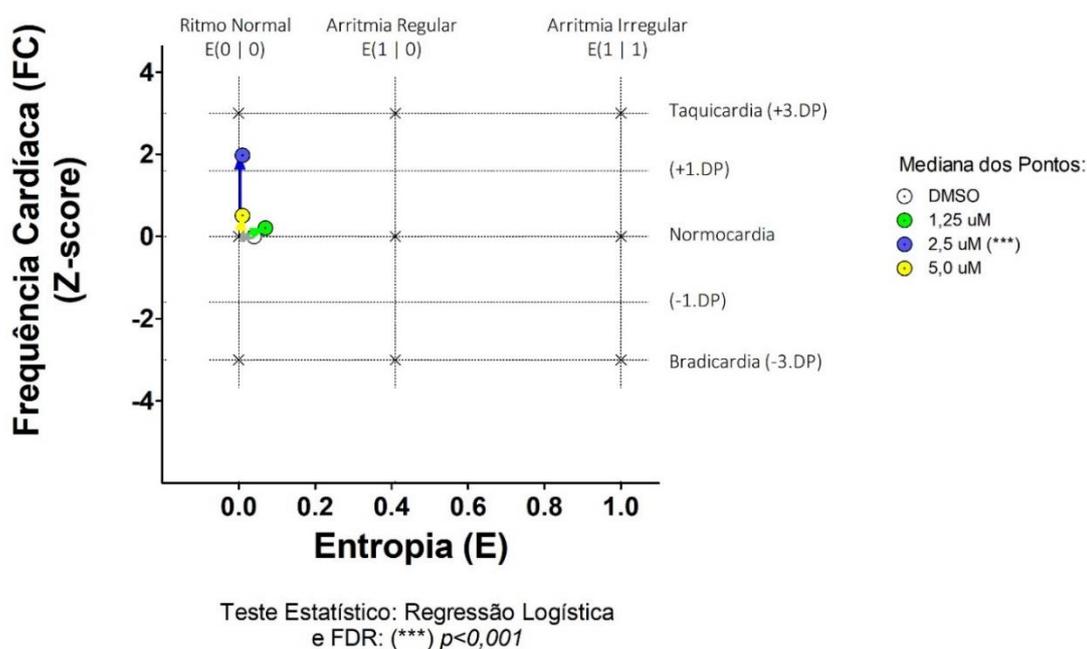


Figura 25. Gráfico de dispersão mostrando as médias dos grupos, representadas por vetores (FC x E). *Fonte: Arquivo pessoal.*

Tabela 2. Resultados das regressões logísticas após a aplicação da correção por FDR.

Regressão Logística		Entropia (E)	Frequência Cardíaca (FC)	Ajuste ao Modelo
Droga	Dose / μM	<i>P</i>	<i>p</i>	<i>P</i>
Dopamina	1,25	0,9464	0,2154	0,4307
	2,5	0,3163	0,0013^(*)	0,0001^(*)
	5,0	0,4532	0,8847	0,7288
Adrenalina	0,125	0,7709	0,0015^(*)	0,0001^(*)
	0,250	0,5124	0,0039^(*)	0,0001^(*)
	0,500	0,3039	0,0010^(*)	0,0001^(*)
	1	0,2391	0,1068	0,0769
Atropina	2,5	0,0130^(*)	0,3381	0,0172^(*)
	5	0,2815	0,2284	0,1992
	10	0,2364	0,0912	0,0557
	20	0,2203	0,5773	0,3252
Haloperidol	2.5	0,3003	0,0018^(*)	0,0001^(*)
	5	0,0087^(*)	0,6197	0,0001^(*)
	10	0,0065^(*)	0,0633	0,0001^(*)
	20	0,0178^(*)	0,0632	0,0001^(*)

(*) considerado significativo após a correção do FDR

Pelos testes de regressão logísticas, pode ser observado que a dose de dopamina de 2,5 μM produz alteração significativa na fisiologia cardíaca, em função de aumento expressivo da FC (Tabela 2). Em concentração de 1,25 e 5,0 μM , a dopamina não altera a fisiologia cardíaca das larvas. Esta interpretação baseia-se na observação

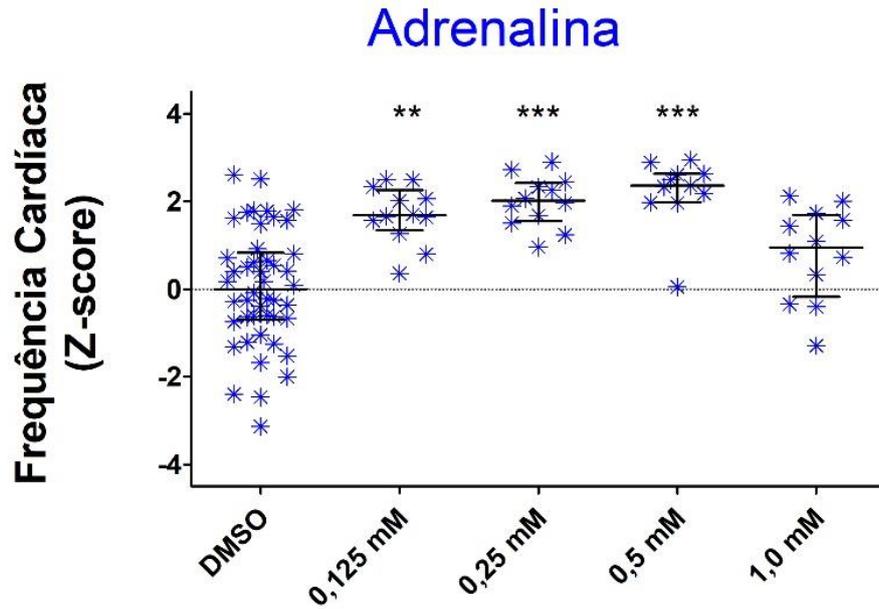
da amplitude e do posicionamento do vetor no gráfico de FC vs. E (Figura 25), o qual, no caso da concentração de 2,5 μM , é paralelo ao eixo Y (ritmo normal) com tendência de aumento da FC (taquicardia). Nos demais casos, os vetores apresentam amplitude pequena em direção diversa, indicando uma aproximação à fisiologia do grupo controle.

Os resultados discutidos corroboram a ação da dopamina no coração, uma vez que, ao utilizar concentrações crescentes desta droga foram constatadas alterações dose – dependentes, conforme descrito para humanos e demais mamíferos, validando o programa CardioCount v.2.0 para o efeito desse fármaco como cardiotoxíco.

3.3. Adrenalina

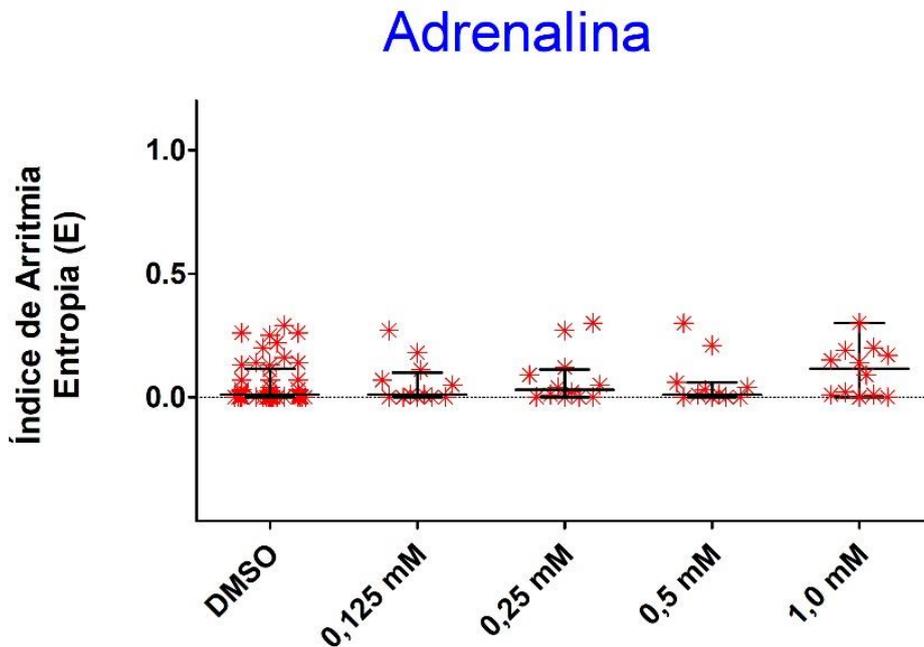
Analisando separadamente as variáveis FC e E, pode ser observado que a adrenalina nas concentrações de 0,125, 0,25 e 0,5 μM , aumenta de forma significativa a FC, diferentemente da concentração de 1,0 μM que não produz efeito significativo nesta mesma variável (Figura 26). Em relação ao ritmo cardíaco, representado pelos valores de E, a adrenalina não alterou de forma significativa parâmetro em nenhuma das concentrações utilizadas (Figura 27).

A adrenalina é uma catecolamina de ação direta, que ativa todos os subtipos de receptores adrenérgicos. No coração, esta age através do receptor β_1 , causando tanto efeitos inotrópicos como cronotrópicos positivos. No presente estudo, foi constatado aumento na frequência cardíaca após a utilização de concentrações crescentes de adrenalina (0,125, 0,25 e 0,5 μM), comportamento este que pode ser explicado pela ativação de receptores β_1 (FRANCIS *et al.*, 2014; GINWALLA & TOFOVIC, 2018). No entanto, quando submetidas as concentrações de 1 μM , as larvas de ZF não apresentaram aumento significativo de FC como o observado nas demais concentrações. Uma vez que a adrenalina é um agonista adrenérgico não seletivo, todos os receptores são ativados, sendo assim, o aumento em sua concentração pode ter desencadeado um efeito pressor máximo. Com o aumento da PA, há a ativação de barorreceptores, capazes de gerar potenciais de ação que são conduzidos ao sistema nervoso central (SNC). Neurônios secundários excitam os neurônios pré-ganglionares do sistema parassimpático que se projetam para neurônios pós-ganglionares intramurais do coração, aumentando a atividade vagal e conseqüente queda na da frequência cardíaca (IRIGOYEN *et al.*, 2001; FRANCIS *et al.*, 2014).



Kruskal-Wallis test e Dunn's Multiple Comparison Test
 (**) $p < 0,01$ (***) $p < 0,001$

Figura 26. Gráfico de dispersão mostrando a distribuição dos valores FC dos grupos tratados com Adrenalina em relação ao Controle DMSO. *Fonte: Arquivo pessoal.*



Kruskal-Wallis test e Dunn's Multiple Comparison Test

Figura 27. Gráfico de dispersão mostrando a distribuição dos valores de E dos grupos tratados com Adrenalina em relação ao Controle DMSO. *Fonte: Arquivo pessoal.*

Pelos testes de regressão logísticas e o gráfico de vetores (Figuras 28 e 29), pode ser observado que as concentrações de 0,125, 0,25 e 0,50 μM de adrenalina produzem alterações significativas na fisiologia cardíaca em função das variações da FC (Tabela 2). Tais alterações podem ser observadas por meio da direção e amplitude dos vetores na Figura 29. Sendo assim, pode-se notar que os vetores representativos dessas concentrações se encontram orientados paralelos em relação ao eixo Y, indicando alterações associadas exclusivamente ao aumento da FC. Em concentração de 1,0 μM , a adrenalina não alterou a fisiologia cardíaca de forma significativa, no entanto, na representação de vetores a direção e amplitude (vetor vermelho) se desloca para a direita em relação aos demais tratamentos, indicando tendência de aumento do processo de arritmia, sem alcançar a significância estatística.

A adrenalina causa uma irritabilidade do miocárdio, provocando taquiarritmias sérias, especialmente com altas doses ou em animais pré-sensibilizados, ou até mesmo em quadros hipoxêmicos decorrentes de desequilíbrios das vias parassimpáticas e simpáticas (KRAL *et al.*, 1969; ADDAMS, 1992; KAHN & LINE, 2008). Sendo assim, a queda da FC, associada ao aumento da entropia, podem ter sido causadas não só pelo aumento do tônus vagal, mas também em decorrência de um quadro de hipoxêmico.

Os testes realizados com a adrenalina no presente estudo validam essa substância, pelo aumento da frequência cardíaca, além da alteração na entropia, relatos que são descritos no mecanismo de ação da droga.

Gráfico de Cardiotoxicidade (FC x E): Adrenalina

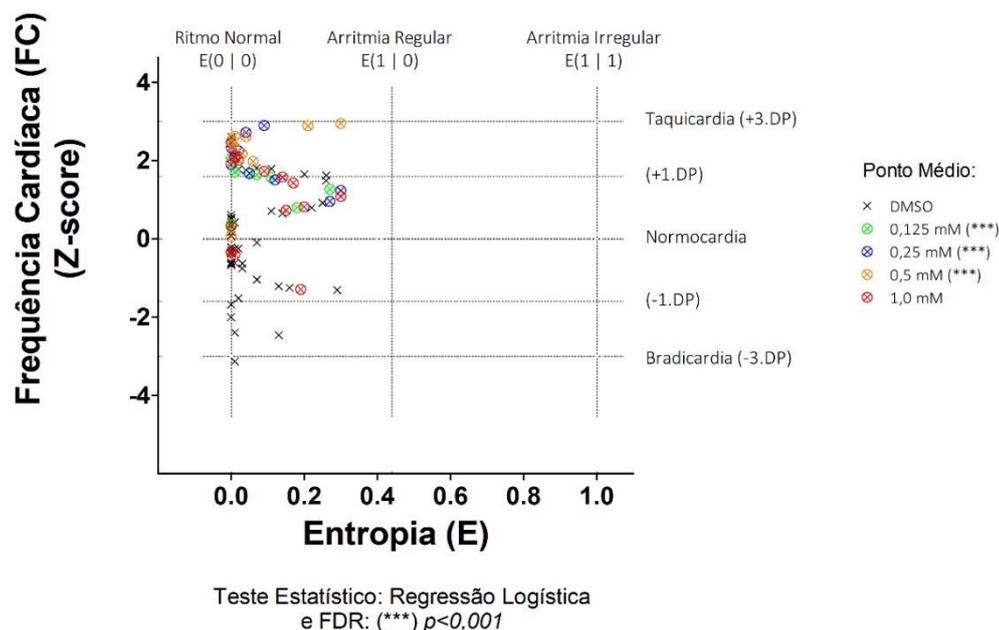


Figura 28. Gráfico de dispersão mostrando a distribuição dos casos de larvas expostas à Adrenalina em quatro concentrações diferentes, em relação ao grupo controle DMSO.

Fonte: Arquivo pessoal.

Gráfico de Cardiotoxicidade (FC x E): Adrenalina

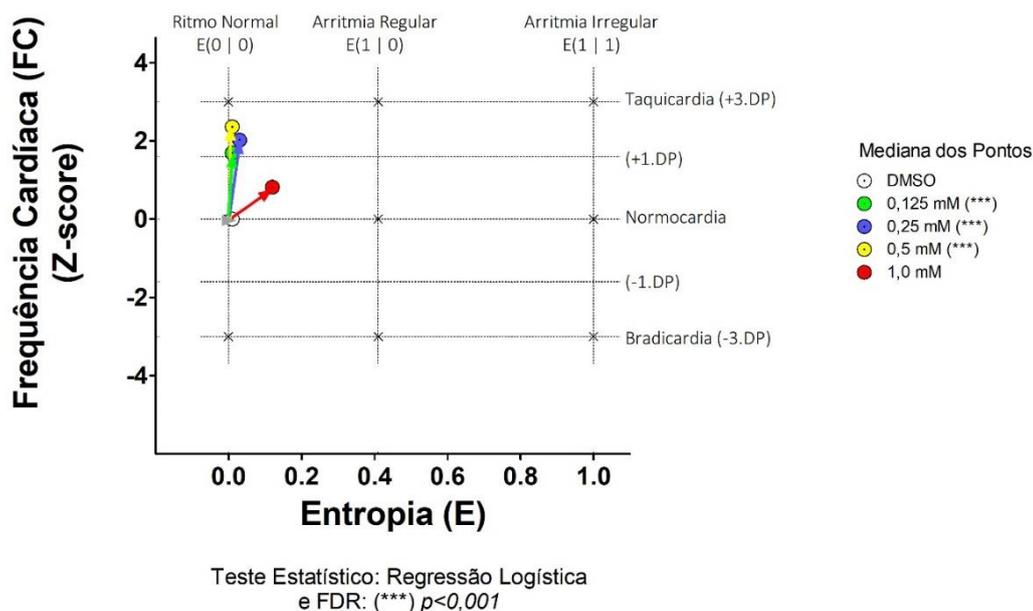


Figura 29. Gráfico de dispersão mostrando as médias dos grupos, representadas por vetores (FC x E). Fonte: Arquivo pessoal.

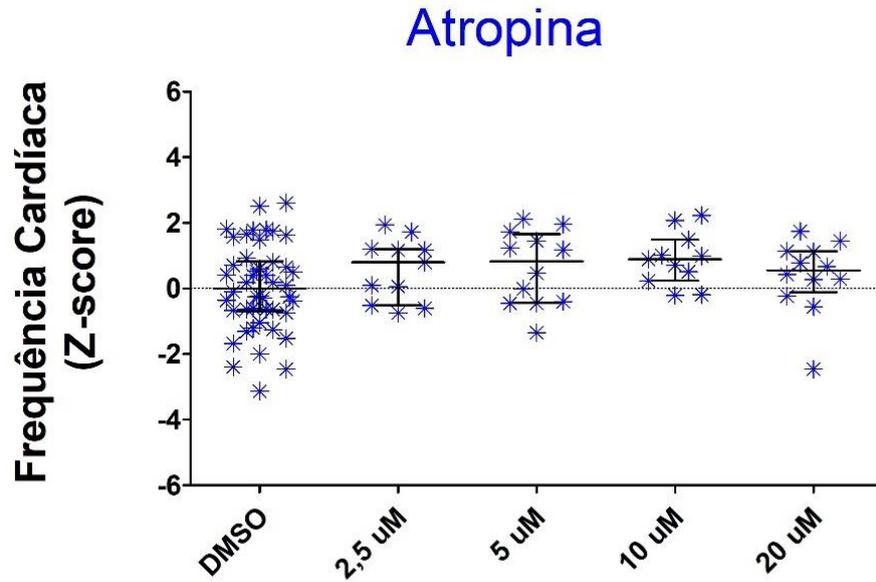
3.4. Atropina

Analisando separadamente as variáveis FC e E, pode ser observado que a atropina nas concentrações de 2,5, 5,0, 10,0 e 20,0 μM não alteraram de forma significativa a FC ou a E em relação ao controle DMSO (Figuras 30 e 31).

A atropina é um antagonista muscarínico, que bloqueia os efeitos da atividade parassimpática, através da inibição dos receptores muscarínicos (M_2) presentes no coração (MCLENDON & PREUSS, 2020). Como a atropina atua bloqueando o nervo vago cardíaco, ela reduz acentuadamente ou extingue os efeitos inibitórios cardíacos de drogas que atuam por mecanismo vagal, e atenuam as respostas reflexas mediadas pelo vago, gerando aumento na frequência cardíaca (KAHN, 2008). Ademais, para aumentar a frequência cardíaca, a atropina depende, em parte, do grau de tônus vagal individual do paciente, uma vez que foi constatada maior aumento na FC em animais com alto tônus vagal pré-existente comparativamente aqueles com tônus vagal baixo (ADAMS, 1992).

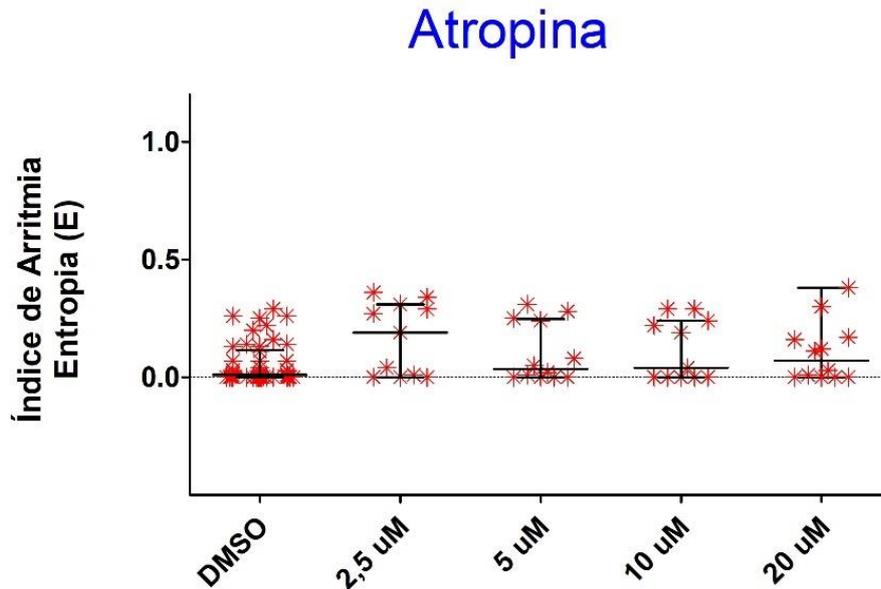
Nas concentrações utilizadas no presente estudo, a atropina não causou alterações significativas de aumento da frequência cardíaca, em comparação ao grupo controle. O desconhecimento da presença de receptores muscarínicos no ZF, pode justificar a inalteração da FC nas concentrações avaliadas, pois não há receptor para a atropina se ligar e por consequência, a ausência de aumento na frequência cardíaca.

Pelos testes de regressão logística e gráfico de vetores, pode ser observado que somente na mais baixa concentração utilizada, 2,50 μM , a atropina causa alteração expressiva na fisiologia cardíaca do ZF, provavelmente relacionada ao aumento da Entropia, como pode ser observado pelos valores correspondentes da Tabela 2 e pela magnitude e direção do vetor verde na Figura 33. Neste caso, o vetor se encontra



Kruskal-Wallis test e Dunn's Multiple Comparison Test

Figura 30. Gráfico de dispersão mostrando a distribuição dos valores FC dos grupos tratados com Atropina em relação ao Controle DMSO. *Fonte: Arquivo pessoal.*



Kruskal-Wallis test e Dunn's Multiple Comparison Test

Figura 31. Gráfico de dispersão mostrando a distribuição dos valores de E dos grupos tratados com Atropina em relação ao Controle DMSO. *Fonte: Arquivo pessoal.*

Gráfico de Cardiotoxicidade (FC x E) - Atropina

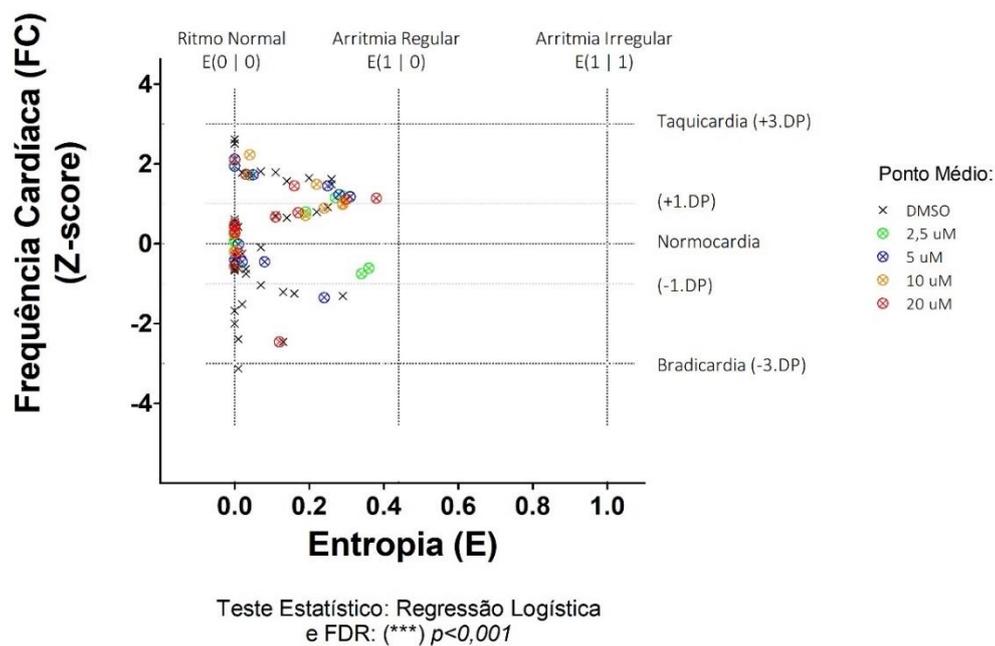


Figura 32. Gráfico de dispersão mostrando a distribuição dos casos de larvas expostas à Atropina em quatro concentrações diferentes, em relação ao grupo controle DMSO.

Fonte: Arquivo pessoal.

Gráfico de Cardiotoxicidade (FC x E): Atropina

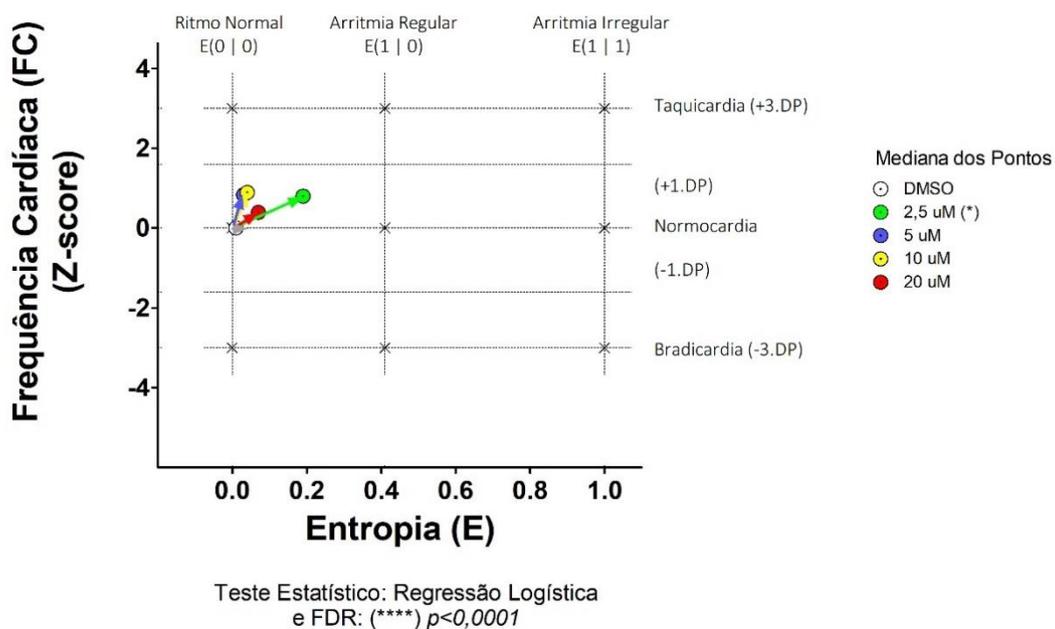


Figura 33. Gráfico de dispersão mostrando as médias dos grupos, representadas por vetores (FC x E). Fonte: Arquivo pessoal.

orientado em ângulo de aproximadamente 45° em relação ao eixo X, com maior amplitude no sentido horizontal, indicando alterações associadas ao aumento da entropia. O fato dessa significância se manifestar na regressão logística e não na análise individual da variável, está relacionada com a capacidade da regressão logística, na análise multivariável, de utilizar as informações de FC e Entropia simultaneamente.

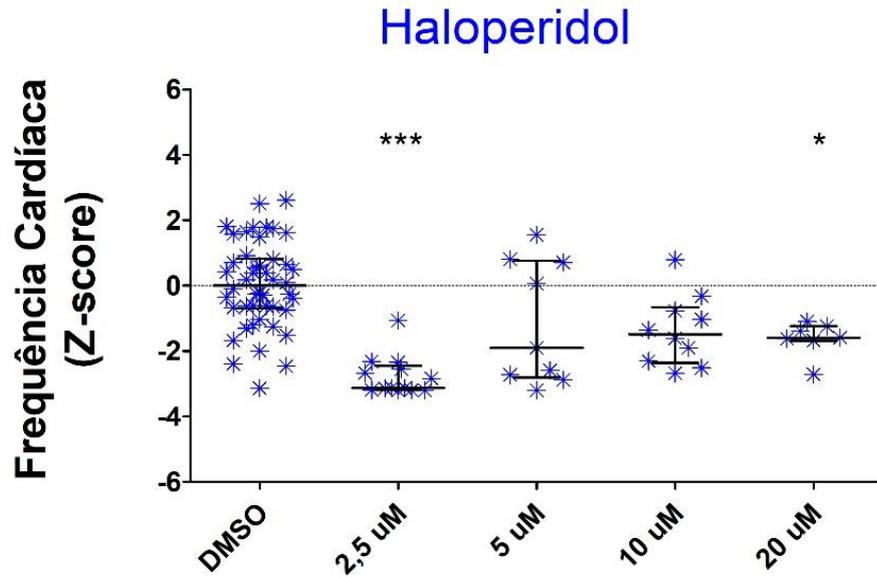
Para concentrações acima de $2,5 \mu\text{M}$ de atropina, pela Figura 33 não são observados efeitos apreciáveis na fisiologia cardíaca. Segundo MANN *et al.* (2010), larvas de ZF expostas a atropina, apresentaram resposta significativa na diminuição da bradicardia para $50 \mu\text{M}$, de forma amena para $15 \mu\text{M}$ e sem resposta significativa com a dose de $5 \mu\text{M}$, comprovando a ação do sistema nervoso parassimpático em larvas de ZF. Essas observações aparentemente são opostas as do presente estudo, provavelmente devido a utilização de concentrações menores, não sendo observada assim uma alteração significativa da frequência cardíaca. Ou seja, a atropina não respondeu de forma significativa com as doses utilizadas, o que pode ser explicado pela conjugação entre a baixa dose utilizada com a ausência de pré-estimulação do tônus vagal.

3.5. Haloperidol

Pela Figura 34 pode ser constatado que nas concentrações de 2,5 e 20 μM de haloperidol ocorre uma diminuição significativa da FC, enquanto as concentrações de 5 e 10 μM , não produzem efeitos significativos neste parâmetro. Entretanto, a entropia (figura 35) é alterada de forma significativa pelas concentrações de 5, 10 e 20 μM de haloperidol.

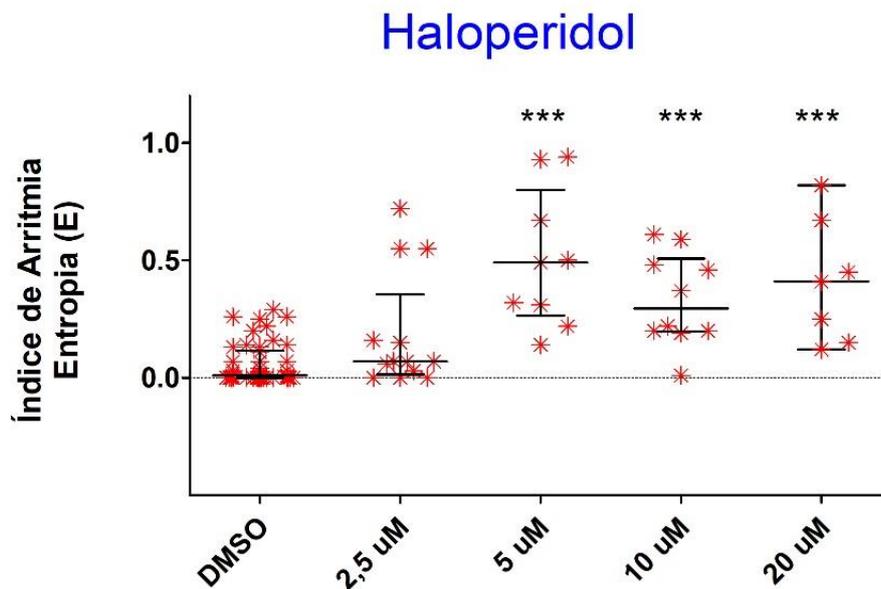
Segundo HOWLAND (2014), fármacos que causam aumento no intervalo QT levam à bradicardia e bloqueio átrio ventricular (AV), interferindo na repolarização e na condução cardíaca. Comprovadamente o haloperidol, um medicamento antipsicótico antidopaminérgico, é capaz de prorrogar a repolarização cardíaca, causando um prolongamento no intervalo QT, que gera uma taquiarritmia ventricular cardíaca, seguida de morte súbita (HOWLAND, 2014). Além do prolongamento do intervalo QT, CORNET *et al.* (2017) afirmam que o haloperidol pode ser usado no controle de cardiotoxicidade, por ser responsável pela produção de um efeito antiarrítmico, causado pelo bloqueio do gene responsável de canais de potássio (hERG), dificultando a repolarização dos potenciais de ação cardíaca e na produção de arritmias em humanos e ZF.

No presente estudo houve a diminuição da frequência cardíaca para todas as concentrações utilizadas, corroborando com o estudo realizado por CORNET *et al.* (2017). Essas constatações podem ser justificadas pelo aumento do intervalo QT, e possível ocorrência de bloqueio AV, principalmente na concentração de 2,5 μM , onde o decréscimo na frequência cardíaca foi mais expressivo (Figuras 36 e 37, Tabela 2). Ainda, segundo DHILLON *et al.* (2013), essas alterações no bloqueio atrioventricular (AV) são dependentes da concentração do fármaco e do tempo de exposição dos indivíduos. Nas demais concentrações, essa bradicardia ocorreu de uma maneira mais amena, porém, com maior amplitude dos vetores para direita (Figura 37), indicando



Kruskal-Wallis test e Dunn's Multiple Comparison Test
 (*) $p < 0,05$ (***) $p < 0,001$

Figura 34. Gráfico de dispersão mostrando a distribuição dos valores FC dos grupos tratados com Haloperidol em relação ao Controle DMSO. *Fonte: Arquivo pessoal.*



Kruskal-Wallis test e Dunn's Multiple Comparison Test

Figura 35. Gráfico de dispersão mostrando a distribuição dos valores de E dos grupos tratados com Haloperidol em relação ao Controle DMSO. *Fonte: Arquivo pessoal.*

alterações significativas na entropia (Tabela 2), justificadas pela possível ocorrência de taquiarritmias.

Pode ser notado que as orientações dos vetores representativos dessas concentrações (Figura 37) se encontram inclinada para baixo e para direita, indicando alterações na FC e na E. O vetor que representa a concentração de 2,5 μM de haloperidol se destaca dos demais por apresentar-se mais verticalizado em direção inferior, indicando que nesta dosagem, somente existe uma diminuição significativa da FC, sem alteração significativa na entropia (Tabela 2). Por outro lado, os vetores associados com as concentrações de 5, 10 e 20 μM encontram-se inclinados no sentido inferior, porém com maior amplitude para direita, indicando alterações significativa na E e tendência à arritmia (Tabela 2). Essas informações podem ser observadas na tabela de regressão logística, onde podemos ver os valores p associados com a significância de ajuste do modelo e os valores p relacionados com os coeficientes que representam as variáveis dependentes.

Assim, foi possível observar pelos dados relativos ao haloperidol que todas as concentrações utilizadas, no intervalo de 2,5 a 20 μM , foram produzidas alterações significativas na fisiologia cardíaca do ZF. Além disso, os resultados obtidos pelo programa CardioCount v.2.0 estão em total acordo com os processos associados a presença da droga no sistema cardíaco do ZF.

Gráfico de Cardiotoxicidade (FC x E) - Haloperidol

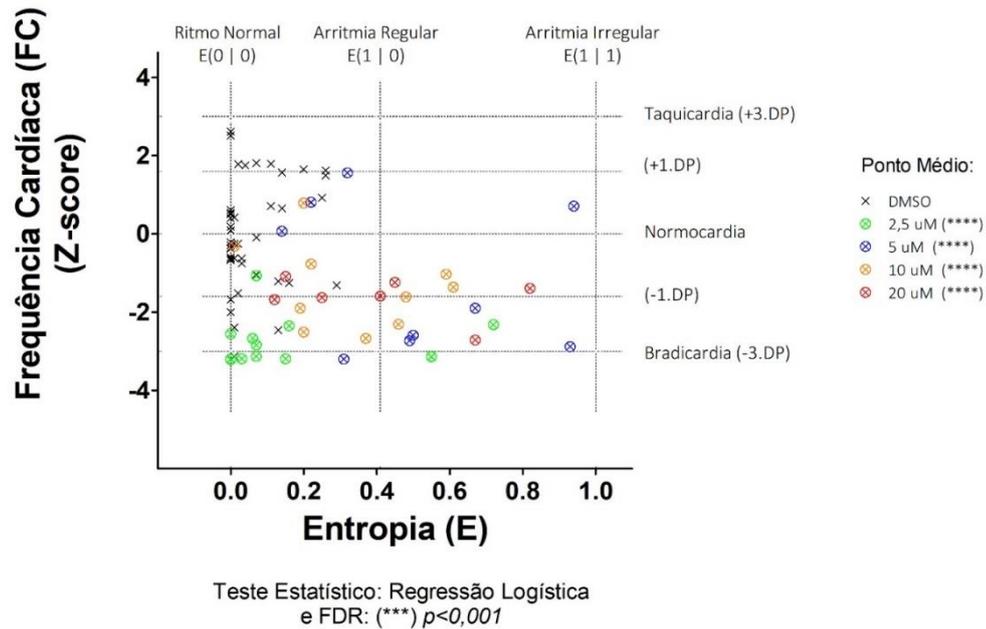


Figura 36. Gráfico de dispersão mostrando a distribuição dos casos de larvas expostas ao Haloperidol em quatro concentrações diferentes, em relação ao grupo controle DMSO. *Fonte: Arquivo pessoal.*

Gráfico de Cardiotoxicidade (FC x E): Haloperidol

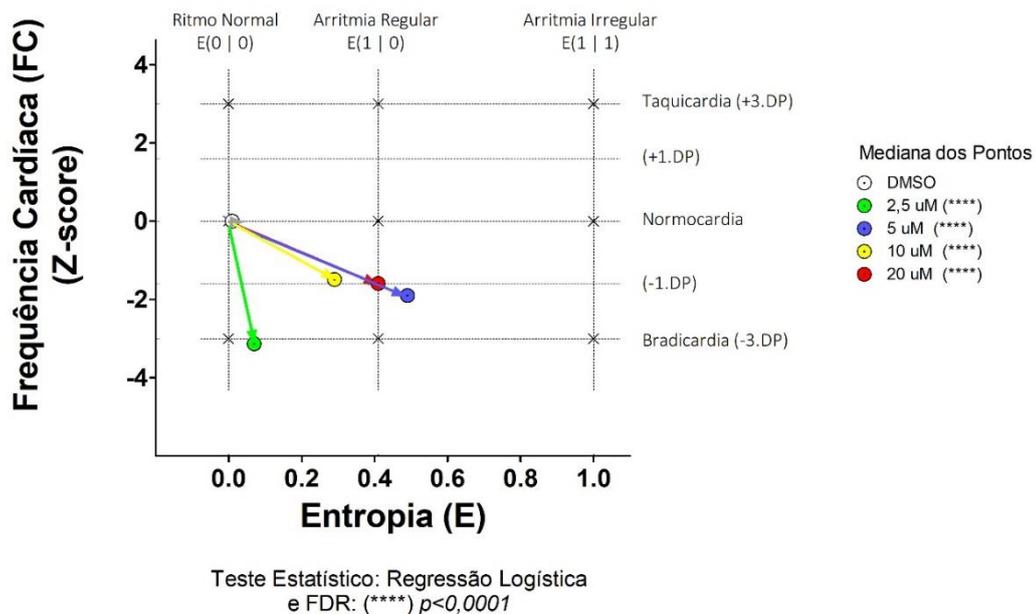


Figura 37. Gráfico de dispersão mostrando as médias dos grupos, representadas por vetores (FC x E). *Fonte: Arquivo pessoal.*

4.0. Conclusões

A análise baseada em parâmetros de frequência cardíaca e entropia quantificados em larvas de *zebrafish*, com o uso do programa computacional *CardioCount v.2.0* permitiu detectar de forma rápida e precisa efeitos cardiotoxicos dos seguintes fármacos: dopamina, adrenalina, atropina e haloperidol.

Aos gráficos resultantes dos experimentos ilustraram a dependência tanto da frequência cardíaca quanto do índice de arritmia (entropia) com a concentração dos fármacos e da dependência da frequência cardíaca com a entropia, os gráficos de cardiotoxicidade. Com essas figuras em mãos, os efeitos das substâncias foram interpretados pelos possíveis mecanismos de atuação, sendo que de forma geral foi observado que a exposição das larvas a:

- i) *dopamina* causou alterações pequenas na entropia quando na concentração mais baixa utilizada. Ao aumentar a concentração do fármaco foram observadas alterações na frequência cardíaca, sem apreciáveis alterações na entropia;
- ii) *adrenalina* acarretou aumento na frequência cardíaca, em todas as concentrações utilizadas. Entretanto, na concentração mais elevada de 1 μM , houve a associação de aumento de entropia, induzindo uma tendência a arritmia;
- iii) *atropina*, em todas as concentrações utilizadas, ocorreu uma tendência a arritmia com significativo aumento da frequência cardíaca e entropia;
- iv) *haloperidol* causou efeito totalmente distinto dos demais fármacos, com decréscimo da frequência cardíaca e aumento da entropia, mostrando a tendência de causar bradicardia.

Todos esses resultados puderam ser justificados com base nas funções cardíacas de humanos, já que o *zebrafish* tem um sistema cardiovascular com comportamento muito similar. O programa computacional *Cardio Count v.2.0*, permitiu a

análise cardíaca, fornecendo a possibilidade de análise da frequência cardíaca, entropia e possível cardiotoxicidade. Tendo em vista que os resultados foram devidamente interpretados com base na literatura, inclusive corroborando resultados de outros trabalhos científicos, a validação do programa para análises de efeitos cardiológicos foi possível.

5.0. Referências Bibliográficas

- ADAMS, H. R. Agentes antiarrítmicos. cap. 27. p. 412-426. In BOOTH, H. N.; MCDONALD, E. L. **Farmacologia e Terapêutica em Veterinária**. ed.6. 997p. 1992
- AMARAL, A.R. **O zebrafish (*Danio rerio*) como modelo de estudo das bases desenvolvimentais da esquizofrenia: regulação da via intracelular dopaminérgica DARPP-32/Akt durante o neurodesenvolvimento**. Trabalho de conclusão de curso para obtenção do título de Especialista em Neurociências pela Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 24p., 2015.
- ASNANI, A.; PETERSON, R.T. **The zebrafish as a tool to identify novel therapies for human cardiovascular disease**. Disease models & mechanisms, v. 7, n. 7. p. 763-767, 2014.
- BAKKERS, J. **Zebrafish as a model to study cardiac development and human cardiac disease**. Cardiovascular research, v. 91, n. 2, p. 279-288, 2011.
- BARCELLOS, A.H.H. **Efeitos Neuroendócrinos e Comportamentais do Aripiprazol em Zebrafish**. Dissertação para obtenção do título de Doutora pela Universidade Federal de Santa Maria. Santa Maria, 116p, 2019.
- BEEKHUIJZEN, M.; DE KONING, C.; FLORES-GUILLÉN, M.E.; DE VRIES-BUITENWEG, S. **A first step in harmonization of the zebrafish embryotoxicity test (ZET) by describing the most optimal test conditions and morphology scoring system**. Reproductive toxicology, v. 56, p. 64-76, 2015.
- BILA, M.D.; DEZOTTI, M. **Fármacos no Meio Ambiente**. Química Nova, v. 26, n. 4, p. 523-530, 2003.
- BOSELLI, F.; VERMOT, J. **Live imaging and modeling for shear stress quantification in the embryonic zebrafish heart**. Methods, v. 94, p. 129-134, 2016.
- BROWN, D.; SAMSA, L.; QIAN, L.; LIU, J. **Advances in the study of heart development and disease using zebrafish**. Journal of Cardiovascular Development and Disease, v. 3, n. 2, 13p., 2016.
- BRANCO, C.J. **Convenção de Estocolmo sobre poluentes orgânicos persistentes: impactos ambientais, sociais e econômicos associados**. Dissertação para

- obtenção do título de Mestre pela Universidade Federal de São Paulo, Diadema, 394p., 2016.
- BRUNI, G.; RENNEKAMP, J.A.; VELENICH, A.; MCCARROLL, M.; GENDELEV, L.; FERTSCH, E. **Zebrafish behavioral profiling identifies multitarget antipsychotic-like compounds.** Nature Chemical Biology, v. 12, n. 7, p. 559-566, 2016.
- BUCKINGHAM, M.; MEILHAC, S.; ZAFFRAN, S. **Building the mammalian heart from two sources of myocardial cells.** Nature Reviews Genetics, v. 6, n. 11, 826p., 2005.
- CARVALHO, I.; PUPO, T.M., BORGES, L.D.A.; BERNARDES, C.S.L. **Introdução a modelagem molecular de fármacos no curso experimental de química farmacêutica.** Química Nova, v. 26, n. 3, p. 428-438, 2003.
- CAVANAUGH, A.M.; HUANG, J.; CHEN, J.N. **Two developmentally distinct populations of neural crest cells contribute to the zebrafish heart.** Developmental biology, v. 404, n. 2, p. 103-112, 2015.
- CHAN, K.P.; LIN, C.C.; CHENG, H.S. **Noninvasive technique for measurement of heartbeat regularity in zebrafish (*Danio rerio*) embryos.** BMC Biotechnology, v. 9, 11p., 2009.
- CHAVEZ, M.N.; AEDO, G.; FIERRO, F.A.; ALLENDE, M.L.; EGAÑA, J.T. **Zebrafish as an emerging model organism to study angiogenesis in development and regeneration.** Frontiers in Physiology, v. 7, 56p., 2016.
- CHEN, J. **Impaired cardiovascular function caused by different stressors elicits a common pathological and transcriptional response in zebrafish embryos.** Zebrafish, v. 10, n. 3, p. 389-400, 2013.
- CORNET, C.; CALZOLARI, S.; MIÑANA-PRIETO, R.; DYBALLA, S.; DOORNMALEN, E.; RUTJES, H.; SAVY, S.; D'AMICO, D.; TERRIENTE, J. **ZeGlobalTox: An Innovative Approach to Address Organ Drug Toxicity Using Zebrafish.** International Journal of Molecular Sciences, v. 18, n. 4, p.864, (2015) J Mol Sci. 2017 Apr; 18(4): 864.
- CROSS, M.J.; BERRIDGE, B.R.; CLEMENTS, P.J.M.; COVE-SMITH, L.; FORCE, T.L.; HOFFMANN, P.; PIRMOHAMED, M. Physiological, pharmacological and

- toxicological considerations of drug-induced structural cardiac injury. **British Journal of Pharmacology**, v. 172, n. 4, p. 957-974, 2015.
- DAS, S.; RAY, N.M.; WAN, J.; KHAN, A.; CHAKRABORTY, T.; RAY, M.B. **Micropollutants in Wastewater: Fate and Removal Processes** (Chapter 5) in *Physico-Chemical Wastewater Treatment and Resource Recovery*, Eds. R. Farooq and Z. Ahmad, IntechOpen, p. 75-107, 2017.
- DE LUCA, E.; ZACCARIA, G.M.; HADHOUD, M.; RIZZO, G.; PONZINI, R.; MORBIDUCCI, U.; SANTORO, M.M. **ZebraBeat: a flexible platform for the analysis of the cardiac rate in zebrafish embryos**. *Scientific Reports*, v. 4, 4898p., 2014.
- DHILLON, S.S., DORO, E., MAGYARY, I., EGGINTON, S., SIK, A., AND MULLER, F. **Optimisation of Embryonic and Larval ECG Measurement in Zebrafish for Quantifying the Effect of QT Prolonging Drugs**. *PLoS One*, v. 8, n. 4, e60552, 2013.
- FARIA, M.; PRATS, E.; PADRÓS, F.; SOARES, A.M.V.M.; RALDÚA, D. **Zebrafish is a predictive model for identifying compounds that protect against brain toxicity in severe acute organophosphorus intoxication**. *Archives of Toxicology*, v. 91, p. 1891-1901, 2017.
- FARRELL, A.P; PIEPERHOFF, S. **Design and physiology of the heart / Cardiac Anatomy in Fishes**. *Encyclopedia of Fish Physiology*, p. 998-1005, 2011.
- FEO, M.L.; GINEBREDA, A.; ELJARRAT, E.; BARCELÓ, D. **Presence of pyrethroid pesticides in water and sediments of Ebro River Delta**. *Journal of Hydrology*, v. 393, n. 3–4, p. 156-162, 2010.
- FRANCIS, G.S.; BARTOS, J.A.; ADATYA, S. **Inotropes**. *Journal of the American College of Cardiology*, v. 63, n. 20, p. 2069-2078, 2014.
- FOGLIA, M.J; POSS, K. D. **Building and re-building the heart by cardiomyocyte proliferation**. *Development*, v. 143, n. 5, p. 729-740, 2016.
- FRANCO-RESTREPO, E.J.; FORERO, A.D.; VARGAS, A.R. **A review of freely available, open-source software for the automated analysis of the behavior of adult zebrafish**. *Zebrafish*, v. 16, n. 3, 10p., 2019.

- GAUR, H.; PULLAGURI, N.; NEMA, S.; PURUSHOTHAMAN, S.; BHARGAVA, Y.; BHARGAVA, A. **ZebraPace: An Open-Source Method for Cardiac- Rhythm Estimation in Untethered Zebrafish Larvae.** *Zebrafish*, 9p., 2018.
- GINWALLA, M.; TOFOVIC, D.S. **Current Status of Inotropes in Heart Failure.** *Heart Failure Clinics*, v. 14, n. 4, p. 601-616, 2018.
- GOLDBERG, L.I. **Cardiovascular and renal actions of dopamine: potential clinical applications.** *Pharmacological Reviews*, v. 24, n. 1, p. 1-29, 1972.
- GRIMES, A.C.; STADT, H.A.; SHEPHERD, I.T.; KIRBY, M.L. **Solving an enigma: arterial pole development in the zebrafish heart.** *Developmental Biology*, v. 290, n. 2, p. 265-276, 2006.
- GUELHO, D.; GOMES, L.; PAIVA, I.; CARRILHO, F. **Prolactina e metabolismo- uma perspectiva diferente de uma hormona multifuncional.** *Revista Portuguesa de Endocrinologia, Diabetes e Metabolismo*, v. 11, p. 268-276, 2016.
- HERNANDEZ, M.M.E.; RODRIGUES, R.M.R.; TORRES, M.T. **Manual de toxicologia clínica: orientações para assistência e vigilância das intoxicações agudas.** Secretaria Municipal da Saúde, São Paulo, ed. 1, 475p, 2017.
- HOWLAND, R.H. **The Comparative Cardiac Effects of Haloperidol and Quetiapine: Parsing a Review.** *Journal of Psychosocial Nursing and Mental Health Services*, v. 52, n. 6, p. 23-26, 2014.
- HOWE, K.; CLARK, M.D.; TORROJA, C.F.; TORRANCE, J.; BERTHELOT, C.; MUFFATO, M.; MCLAREN, S. **The zebrafish reference genome sequence and its relationship to the human genome.** *Nature*, v. 496, p. 498-503, 2013.
- HRUBIK, J.; GLISIC, B.; SAMARDZIJA, D.; STANIC, B.; POGRMIC-MAJKIC, K.; FA, S.; ANDRIC, N. **Effect of PMA- induced protein kinase C activation on development and apoptosis in early zebrafish embryos.** *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, v. 190, p. 24-31, 2016.
- IRIGOYEN, M.C.; CONSOLIM-COLOMBO, F.M.; KRIEGER, E.M. **Controle cardiovascular: regulação reflexa e papel do sistema nervoso simpático.** *Revista Brasileira de Hipertensão*, v. 8, n. 1, p. 55-62, 2001.

- IRONS, D.T.; KELLY, E.P.; HUNTER, I.D.; MACPHAIL, C.R.; PADILLA, S. **Acute administration of dopaminergic drugs has differential effects on locomotion in larval zebrafish.** *Pharmacology Biochemistry and Behavior Journal*, v.103, p. 792-813, 2013.
- JAMISON, R.A.; SAMARAGE, C.R.; BRYSON-RICHARDSON, R.J.; FOURAS, A. **In vivo wall shear measurements within the developing zebrafish heart.** *Plos One*, v. 8, n. 10, p. e75722, 2013.
- KAHN, C.M.; LINE, S. **Manual Merck de veterinária**, 9. Ed., São Paulo : Roca, 2008.
- KOPP, R.; SCHWERTE, T.; PELSTER, B. Cardiac performance in the zebrafish breakdance mutant. **Journal of experimental biology**, v. 208, n. 11, p. 2123-2134, 2005.
- KRAL, J.G.; ÅBLAD, B.; BJÖRNTORP, P.; EK, L.; JOHNSON, G. **Metabolic and cardiovascular effects of adrenaline and alprenolol (Aptin®) in human subjects.** *Pharmacologia Clinica*, v. 2, p. 40–45 (1969).
- LAMBERTI, M.; GIOVANE, G.; GARZILLO, M.E.; FEOLA, A.A.F.; PORTO, S.; TOMBOLINI, V.; DOMENICO, M. **Animal models in studies of cardiotoxicity side effects from antiproliferative drugs in patients and occupational exposed workers.** *BioMed Research International*, v. 2014, ID 240642, 8p., 2014.
- LAZIC, S.; SCOTT, I.C. Mef2cb regulates late myocardial cell addition from a second heart field-like population of progenitors in zebrafish. **Developmental biology**, v. 354, n. 1, p. 123-133, 2011.
- LUO Y.; GUO W.; NGO H.H.; NGHIEM L.D.; HAI F.I.; ZHANG J.; LIANG S.; WANG X.C. **A review on the occurrence of micropollutants in the aquatic environment and their fate and removal during wastewater treatment.** *Science of The Total Environment*, v. 473–474, p. 619–641, 2014.
- MCLENDON, K.; PREUSS, C.V. **Atropine.** [Updated 2020 Mar 2]. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2020 Jan-. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK470551/>
- MACRAE, C.A.; PETERSON, R.T. **Zebrafish as tools for drug Discovery.** *Nature Reviews Drug Discovery*, v. 14, p. 721-731, 2015.

- MADONNA, R. **Early Diagnosis and Prediction of Anticancer Drug-induced Cardiotoxicity: From Cardiac Imaging to “Omics” Technologies.** Revista Espanhola de Cardiologia, v. 70, n. 7, p. 576-582, 2017.
- MANN, D.K.; HOYT, C.; FELDMAN, S.; BLUNT, L.; RAYMOND, A.; PAGE-MCCAW, P.S. **Cardiac response to startle stimuli in larval zebrafish: sympathetic and parasympathetic components.** American Journal of Physiology, v. 318, n. 5, p. 886-893, 2010.
- MARGONATO, B.F.; BONETTI, S.F.M.; NISHIYAMA, P. **Reações adversas ao haloperidol.** Infarma, v. 16, n. 9-10, p. 81-84, 2004.
- MARGOT, J.; ROSSI, L.; BARRY, D.A.; HOLLIGER, C. **A review of the fate of micropollutants in wastewater treatment plants.** Wires Water, v. 2, p. 457-487, 2015.
- MARTIN, K.W.; TENNANT, H.A.; CONOLLY, B.R.; PRINCE, K.; STEVENS, S.J.; DEMARINI, M.D.; MARTIN, L.B.; THOMPSON, C.L.; GILMOUR, I.; CASCIO, E.W.; HAYS, D.M.; HAZARI, S.M.; PADILLA, S.; FARRAJ, K.A. **High-Throughput Video Processing of Heart Rate Responses in Multiple Wild-type Embryonic Zebrafish per Imaging Field.** Scientific reports, v. 9, ID. 145, 14p., 2019.
- MESQUITA, Q.H.; BAPTISTA, C.A.S. **Cardiotônico: insuperável na preservação da estabilidade miocárdica como preventivo das síndromes coronárias agudas e responsável pela prolongada sobrevivência.** Ars Cvrandi, v. 35, 3p., 2002.
- MESQUITA, Q.H.; BAPTISTA, C.A.S.; KERBRIE, S.V.; MARI, S.M.; GROSSI, M.C.B.M.; MONTEIRO, J. **Efeitos do cardiotônico + dilatador coronário na coronário-miocardioptia crônica estável, com e sem enfarte prévio, a longo prazo.** Ars Cvrandi, v. 35, 7p., 2002.
- MILAN, D.J.; GIOKAS, A.C.; SERLUCA, F.C.; PETERSON, R.T.; MACRAE, C.A. **Notch1b and neuregulin are required for specification of central cardiac conduction tissue.** Development, v.133, n. 6, p. 1125-1132, 2006.
- MIURA, G.I.; YELON, D. **A guide to analysis of cardiac phenotypes in the zebrafish embryo.** In: **Methods in cell biology.** Academic Press, v. 101, p. 161-180, 2011.

- MONTANHA, F.P.; GALEB, L.A.G.; MIKOS, J.D.; GANECO, L.N.; PEREIRA, T.P.; TANAKA, A.; KIRSCHNIK, P.G.; PIMPÃO, C.T. **Pyrethroid toxicity in silver catfish, *Rhamdia quelen***. Pesquisa Veterinária Brasileira, v. 32, n. 12, p. 1297-1303, 2012.
- MORETTO, L.D.; STEPHANO, M.A. **Métodos alternativos ao uso de animais em pesquisa reconhecidos no Brasil**. São Paulo : Limay, 2019. 732 p.
- OSTINI, M.F.; ANTONIAZZI, P.; FILHO, P.A.; BESTETTI, R.; CARDOSO, M.C.M.; FILHO, B.A. **O uso de drogas vasoativas em terapia intensiva**. Medicina, Ribeirão Preto, v. 31, p. 400-411, 1998.
- RAHBAR, S.; PAN, W.; JONZ, G.M. **Purinergic and Cholinergic Drugs Mediate Hyperventilation in Zebrafish: Evidence from a Novel Chemical Screen**. Plos One, v. 11, n. 4, p. e0154261, 2016.
- RIEDLA, M.; MULLERB, A.; WESSEL, N. **Practical considerations of permutation entropy**. Eur. Phys. J. Special Topics, n. 222, p. 249–262, 2013.
- SALA, L.; MEER, B.; TERTOOLEN, J.G.L.; BAKKERS, J.; BELLIN, M.; DAVIS, P.R.; DENNING, C.; DIEBEN, E.A.M.; ESCHENHAGEN, T.; GIACOMELLI, E.; GRANDELA, C.; HANSEN, A.; HOLMAN, R.E.; JONGBLOED, M.R.M.; KAMEL, M.S.; KOOPMAN, D.C.; LACHAUD, Q.; MANNHARDT, I.; MOL, M.P.H.; MOSQUEIRA, D.; ORLOVA, V.V.; PASSIER, R.; RIBEIRO, C.M.; SALEEM, U.; SMITH, L.G.; BURTON, L.F.; MUMMERY, L.C. **Musclemotion- A Versatile Open Software Tool to Quantify Cardiomyocyte and Cardiac Muscle Contraction In Vitro and In Vivo**. Circulation Research, v. 122, p. e5-e16, 2018.
- SCHWARZENBACH, R.P.; ESCHER, B.I.; FENNER, K.; HOFSTETTER, T.B.; JOHNSON, C.A.; VON GUNTEN, U.; WEHRLI, B.. **The Challenge of Micropollutants in Aquatic System**. Science, v. 313, p. 1072–1077, 2006.
- SEDMERA, D.; RECKOVA, M.; SEDMEROVA, M.; BIERMANN, M.; VOLEJNIK, J.; SARRE, A.; THOMPSON, R.P. **Functional and morphological evidence for a ventricular conduction system in the zebrafish and xeponus heart**. American Journal of Physiology- Heart and Circulatory Physiology, v. 285, n. 2, p. H919, 2003.
- SEELIG, C.V. **Questões atuais relacionadas ao uso de modelos animais em pesquisa científica**. Monografia para obtenção do título de Especialista em

- Análises Clínicas Veterinárias pela Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 41p., 2007.
- SIEBEL, M.A.; BONAN, C.; SILVA, S.R. **Zebrafish como Modelo para Estudos Comportamentais**. cap. 1, p. 15-56 In: RESENDE, R. R; SOCCOL, R. C. Biotecnologia Aplicada à Saúde- Fundamentos e Aplicações, v. 1, 611p., 2015.
- SINGLEMAN, C.; HOLTZMAN, N.G. **Heart Dissection in Larval, Juvenile and Adult Zebrafish, *Danio rerio***. Journal of Visualized Experiments, v. 55, e3165, 6p., 2011.
- SINGLEMAN, C.; HOLTZMAN, N.G. **Analysis of postembryonic heart development and maturation in the zebrafish, *Danio rerio***. Developmental Dynamics, v. 241, n. 12, p. 1993-2004, 2012.
- SHIN, J.T.; POMERANTSEV, E.V; MABLY, J.D; MACRAE, C.A. **High-resolution cardiovascular function confirms functional orthology of myocardial contractility pathways in zebrafish**. Physiological Genomics, v. 42, n. 2, p. 300-309, 2009.
- SOARES, R. **Determinação dos enantiômeros da atropine em soluções oftálmicas empregando a cromatografia líquida de alta eficiência com fase estacionária quiral**. Dissertação para obtenção do título de Mestre pela Universidade de São Paulo, São Paulo, 195p., 2007.
- STAINIER, D. Y. **Zebrafish genetics and vertebrate heart formation**. Nature Reviews Genetic, v. 2, p. 39-48, 2001.
- STAUDT, D.; STAINIER, D. **Uncovering the molecular and cellular mechanisms of heart development using the zebrafish**. Annual Review of Genetic, v. 46, p. 397-418, 2012.
- THIRUMALAI, V.; CLINE, T.H. **Endogenous Dopamine Suppresses Initiation of Swimming in Prefeeding Zebrafish Larvae**. Journal of Neurophysiology, v. 100, p. 1635-1648, 2008.
- TOMITA, Y.; MATSUMURA, K.; WAKAMATSU, Y.; MATSUZAKI, Y.; SHIBUYA, I.; KAWAGUCHI, H.; OSUMI, N. **Cardic neural crest cells contribute to the dormant multipotent stem cell in the mammalian heart**. Journal Cell Biology, v. 170, n. 7, p. 1135-1146, 2005.

- TU, S.; CHI, N.C. **Zebrafish models in cardiac development and congenital heart birth defects.** Differentiation, v. 84, n. 1, p. 4-16, 2012.
- TZANEVA, V.; PERRY, F.S. **Evidence for a role of heme oxygenase-1 in the control of cardiac function in zebrafish (*Danio rerio*) larvae exposed to hypoxia.** Journal of Experimental Biology, v. 219, p. 1563-1571, 2016.
- UEDA, J.; TAVERNARO, R.; MAROSTEGA, V.; PAVAN, W. **Impacto Ambiental do descarte de fármacos e estudo da conscientização da população a respeito do problema.** Revista Ciências do Ambiente Online, v. 5, n. 1, 6p., 2009.
- YACOB, M.; BRAND, T.; SCHLUETER, J. **Think small: The zebrafish as a novel disease model in QCRC.** Journal of Biomedicine and Biotechnology, ID: 817341, 12p., 2012.
- YALCIN, H.C.; AMINDARI, A.; BUTCHER, J.T.; ALTHANI, A.; YACOB, M. **Heart function and hemodynamic analysis for zebrafish embryos.** Developmental dynamics, v. 246, n. 11, p. 868-880, 2017.
- ZAKARIA, Z.Z.; BENSLIMANE, F.M.; NASRALLAH, G.K.; SHURBAJI, S.; YOUNES, N.N.; MRAICHE, F.; YALCIN, H.C. **Using zebrafish for investigating the molecular mechanisms of drug induced cardiotoxicity.** BioMed Research International, ID: 1642684, 10p., 2018.
- ZHANG, P.C.; LLACH, A.; SHENG, X.Y.; HOVE-MADSEN, L.; TIBBITS, G.F. **Calcium handling in zebrafish ventricular myocytes.** American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology, v. 300, p. R56-R66, 2011.
- ZHOU, Y.; CASHMAN, T.J.; NEVIS, K.R.; OBREGON, P.; CARNEY, S.A.; LIU, Y.; HEIDEMAN, W. **Latent TGF- β binding protein 3 identifies a second heart field in zebrafish.** Nature, v. 474, n. 7353, p. 645-648, 2011.

ANEXO I

Tabela: Valores de frequência cardíaca (FC) e Entropias empregadas para representar os limites no gráfico de dispersão.

REFERÊNCIAS	FREQUÊNCIA CARDÍACA (BMP)	ENTROPIA L	ENTROPIA H	ENTROPIA TOTAL (E)
MÉDIA + 3XDP	260	0	0	0,0
	260	0,25	0	0,1
	260	0,5	0	0,2
	260	0,75	0	0,3
	260	1	0	0,4
	260	1	0,25	0,6
	260	1	0,5	0,7
	260	1	0,75	0,9
	260	1	1	1,0
MÉDIA + 2XDP	237	0	0	0,0
	237	0,25	0	0,1
	237	0,5	0	0,2
	237	0,75	0	0,3
	237	1	0	0,4
	237	1	0,25	0,6
	237	1	0,5	0,7
	237	1	0,75	0,9
	237	1	1	1,0

REFERÊNCIAS	Frequência Cardíaca	Entropia	Entropia	Entropia
	(bmp)	L	H	Total (E)
MÉDIA + 1XDP	215	0	0	0,0
	215	0,25	0	0,1
	215	0,5	0	0,2
	215	0,75	0	0,3
	215	1	0	0,4
	215	1	0,25	0,6
	215	1	0,5	0,7
	215	1	0,75	0,9
	215	1	1	1,0
MÉDIA	193	0	0	0,0
	193	0,25	0	0,1
	193	0,5	0	0,2
	193	0,75	0	0,3
	193	1	0	0,4
	193	1	0,25	0,6
	193	1	0,5	0,7
	193	1	0,75	0,9
	193	1	1	1,0

REFERÊNCIAS	FREQUÊNCIA CARDÍACA (BMP)	ENTROPIA L	ENTROPIA H	ENTROPIA TOTAL (E)
MÉDIA – 3XDP	170	0	0	0,0
	170	0,25	0	0,1
	170	0,5	0	0,2
	170	0,75	0	0,3
	170	1	0	0,4
	170	1	0,25	0,6
	170	1	0,5	0,7
	170	1	0,75	0,9
	170	1	1	1,0
MÉDIA – 2XDP	148	0	0	0,0
	148	0,25	0	0,1
	148	0,5	0	0,2
	148	0,75	0	0,3
	148	1	0	0,4
	148	1	0,25	0,6
	148	1	0,5	0,7
	148	1	0,75	0,9
	148	1	1	1,0

REFERÊNCIAS	FREQUÊNCIA CARDÍACA (BMP)	ENTROPIA L	ENTROPIA H	ENTROPIA TOTAL (E)
MÉDIA – 1XDP	125	0	0	0,0
	125	0,25	0	0,1
	125	0,5	0	0,2
	125	0,75	0	0,3
	125	1	0	0,4
	125	1	0,25	0,6
	125	1	0,5	0,7
	125	1	0,75	0,9
	125	1	1	1,0

MÉDIA: MÉDIA DA FC DO GRUPO CONTROLE;

DP: DESVIO PADRÃO DE FC DO GRUPO CONTROLE