



UNIVERSITATEA „ALEXANDRU IOAN CUZA” DIN IAȘI

FACULTATEA DE BIOLOGIE

ȘCOALA DOCTORALĂ DE BIOLOGIE

**STUDII PRIVIND DEZVOLTAREA ȘI UTILIZAREA
PEȘTELUI ZEBRĂ CA MODEL ANIMAL ÎN STUDIAREA
TULBURĂRII DE SPECTRU AUTIST**

REZUMATUL TEZEI DE DOCTORAT

Conducător de doctorat:

CS I DR. HABIL CIOBÎCĂ ALIN STELIAN

Student-doctorand:

ROBEA MĂDĂLINA-ANDREEA

IAȘI

2021

MULȚUMIRI

De-a lungul timpului, pașii în demersul științific mi-au fost vegheați de îndrumările și cunoștințele oferite de fiecare om care m-a ajutat să fiu persoana din ziua de astăzi. Țin să mulțumesc tuturor persoanelor care au intrat în viața mea și au contribuit la îmbunătățirea calității mele de viitor cercetător.

Pe această cale, mulțumirile mele sunt îndreptate spre coordonatorul tezei de doctorat, CS I Dr. Habil Ciobică Alin, cu ajutorul căruia am putut trece prin marea agitată a cunoșterii și care m-a sprijinit pe parcursul acestor ani. Sunt extrem de recunoscătoare pentru discuțiile prietenoase purtate adeseori și pentru încurajările oferite. Aș dori, de asemenea, să le mulțumesc membrilor din comisia de îndrumare – Prof. Dr. Nicoară Mircea, Șef. Lucr. Dr. Plăvan Gabriel și Prof. Dr. Cojocaru Dumitru, ale căror sfaturi au susținut activitățile experimentale realizate în cadrul laboratorului de Ecotoxicologie.

Mai mult decât atât, mulțumiri deosebite le îndrept spre colegul și prietenul care a fost lângă mine zilnic cu entuziasm, pasiune și curaj, calități pe care a și reușit să mi le transmită, trecut în neființă mult prea devreme, ACS Dr. Strungaru Ștefan – Adrian.

O serie de mulțumiri generoase se îndreaptă spre membrii laboratoarelor din Islanda conduse de către Prof. Karl Karlsson și a celor din Portugalia – Prof. Lopez Isabel și Prof. Dominguez Ines, care mi-au oferit acces la noi cunoștințe și experiențe. Deopotrivă și colaboratorilor mei din cadrul Universității de Științe Agricole și Medicină Veterinară „Ion Ionescu de la Brad” din Iași. Multe mulțumiri le ofer tuturor colegilor și prietenilor care au fost prezenți în toată această perioadă și al căror sprijin a fost necondiționat.

Nu în ultimul rând, mulțumirile mele sunt îndreptate spre oamenii care m-au sprijinit, m-au ghidat și m-au format să fiu omul de astăzi, părinții mei.

Per aspera ad astra

CUPRINS

Listă abrevieri	11
CUVINTE CHEIE	12
INTRODUCERE	13
CAPITOLUL 1 – Tulburarea de spectru autist în contextul actual	16
1. 1. Evoluția autismului și conceptualizarea sintagmei „tulburare de spectru autist”... ..	16
1. 2. Prevalența și epidemiologia tulburării de spectru autist	21
1. 2. 1. Determinanții genetici	21
1. 2. 2. Factorii de mediu	23
1. 3. Criteriile de diagnosticare	24
1. 4. Intervenții terapeutice utilizate în tulburarea de spectru autist	32
CAPITOLUL 2 – Peștele zebură – model animal	34
2. 1. Caracterizarea și particularitățile peștelui zebură	35
2. 2. Elemente de comportament specifice peștelui zebură	36
2. 2. 1. Activitatea locomotorie	36
2. 2. 2. Anxietatea	37
2. 2. 3. Comportamentul agresiv	40
2. 2. 4. Peștele zebură – un organism prietenos	41
2. 2. 5. Ritmul circadian și somnul	42
CAPITOLUL 3 – Ipoteza de cercetare și obiectivele lucrării	48
3. 1. Obiective	49
3. 2. Limitările cercetărilor realizate	50
CAPITOLUL 4 – Metodologia cercetării	52
4. 1. Studiu experimental 1	52
4. 1. 1. Scopul studiului	52
4. 1. 2. Organismul model: peștele zebură adult	53
4. 1. 3. Substanța chimică în studiu: clorura de metil-mercur	54
4. 1. 4. Designul experimental	54
4. 1. 5. Testele comportamentale	55
4. 1. 5. 1. Testul performanței de înot	55
4. 1. 5. 2. Testul oglindei	56
4. 1. 5. 3. Testul memoriei	57
4. 1. 6. Evaluarea stresului oxidativ	58
4. 1. 7. Analiza statistică a datelor	58

4. 1. 8. Avizul etic	59
4. 2. Studiu experimental 2	59
4. 2. 1. Scopul studiului	59
4. 2. 2. Organismul model: peștele zebră adult	61
4. 2. 3. Substanța chimică în studiu: aurul	62
4. 2. 4. Designul experimental	63
4. 2. 5. Testele comportamentale	63
4. 2. 5. 1. Testul de performanță	63
4. 2. 5. 2. Testul de interacțiune socială	64
4. 2. 6. Analiza elementelor chimice	65
4. 2. 7. Evaluarea stresului oxidativ.....	67
4. 2. 8. Analiza statistică a datelor	67
4. 2. 9. Avizul etic.....	67
4. 3. Studiu experimental 3	68
4. 3. 1. Scopul studiului	68
4. 3. 2. Organismul model: peștele zebră	69
4. 3. 3. Substanța chimică în studiu: deltametrinul	70
4. 3. 4. Designul experimental.....	70
4. 3. 5. Testele comportamentale.....	71
4. 3. 6. Examenul histopatologic și testul de imunocitochimie	72
4. 3. 7. Analiza elementelor chimice.....	73
4. 3. 8. Analiza statistică a datelor.....	73
4. 3. 9. Avizul etic.....	74
4. 4. Studiu experimental 4	74
4. 4. 1. Scopul studiului	74
4. 4. 2. Organismul model: embrioni și larve de pește zebră	75
4. 4. 3. Substanța chimică în studiu: acidul valproic	76
4. 4. 4. Designul experimental	76
4. 4. 5. Testele comportamentale	77
4. 4. 6. Evaluarea arhitecturii somnului la peștele zebră	79
4. 4. 7. Analiza statistică a datelor	80
4. 4. 8. Avizul etic	80
4. 5. Studiu experimental 5	81
4. 5. 1. Scopul studiului	81

4. 5. 2. Organismul model: embrioni de pește zebra	82
4. 5. 3. Substanța chimică în studiu: fipronil	83
4. 5. 4. Designul experimental	84
4. 5. 5. Testele comportamentale	85
4. 5. 6. Evaluarea activității proteinelor și a acetilcolinesterazei	86
4. 5. 7. Analiza statistică a datelor	88
4. 5. 8. Avizul etic	88
4. 6. Studiu experimental 6	89
4. 6. 1. Scopul studiului	89
4. 6. 2. Organismul model: pește zebra adult	90
4. 6. 3. Mixtura de pesticide în studiu	90
4. 6. 4. Designul experimental	91
4. 6. 5. Testele comportamentale	92
4. 6. 6. Analiza statistică a datelor	92
4. 6. 7. Avizul etic	92
4. 7. Studiu experimental 7	93
4. 7. 1. Scopul studiului	93
4. 7. 2. Organismul model: embrioni de pește zebra	94
4. 7. 3. Substanțele chimice avute în studiu: fipronil + vitamina B ₁	94
4. 7. 4. Designul experimental	95
4. 7. 5. Analiza parametrilor comportamentali	96
4. 7. 6. Evaluarea activității acetilcolinesterazei	96
4. 7. 7. Analiza statistică a datelor	96
4. 7. 8. Avizul etic	96
4. 8. Studiu experimental 8	97
4. 8. 1. Scopul studiului	97
4. 8. 2. Organismul model: pește zebra juvenil	98
4. 8. 3. Mixtura de pesticide + vitamina B ₆	98
4. 8. 4. Designul experimental	98
4. 8. 5. Analiza statistică a datelor	99
4. 8. 6. Avizul etic	99
4. 9. Studiu experimental 9	100
4. 9. 1. Scopul studiului	100
4. 9. 2. Organismul model: pește zebra juvenil	101

4. 9. 3. Mixtura de pesticide + vitamina B ₁₂	101
4. 9. 4. Designul experimental	102
4. 9. 5. Analiza statistică a datelor.....	103
4. 9. 6. Avizul etic	103
4. 10. Studiu experimental 10	103
4. 10. 1. Scopul studiului	103
4. 10. 2. Organismul model: peștele zebra	104
4. 10. 3. Substanțele chimice utilizate în studiu	104
4. 10. 4. Designul experimental	105
4. 10. 5. Testele comportamentale	106
4. 10. 6. Evaluarea stresului oxidativ	106
4. 10. 7. Analiza statistică a datelor	106
4. 10. 8. Avizul etic	107
CAPITOLUL 5 – Rezultate și discuții	108
5. 1. STUDIU EXPERIMENTAL 1: Efectul administrării clorurii de metil-mercur asupra stresului oxidativ și a comportamentului peștelui zebra	108
5. 1. 1. Performanța de înot	108
5. 1. 2. Efectul clorurii de metil-mercur asupra comportamentului agresiv al peștelui zebra	111
5. 1. 3. Efectul clorurii de metil-mercur asupra capacității de memorare a peștelui zebra	113
5. 1. 4. Efectul clorurii de metil-mercur asupra stresului oxidativ	115
5. 1. 5. Discuțiile studiului	115
5. 2. STUDIU EXPERIMENTAL 2: Influența aurului asupra comportamentului peștelui zebra	117
5. 2. 1. Efectul aurului asupra activității locomotorii și asupra sociabilității	117
5. 2. 2. Rezultate analize elemente chimice și stres oxidativ	123
5. 2. 3. Discuțiile studiului	125
5. 3. STUDIU EXPERIMENTAL 3: Impactul deltametrinului asupra peștelui zebra	127
5. 3. 1. Efectul deltametrinului asupra performanței de înot	127
5. 3. 2. Influența deltametrinului asupra comportamentului de tip agresiv	127
5. 3. 3. Influența deltametrinului asupra comportamentului de tip anxios	131
5. 3. 4. Examenul histopatologic și evaluarea activității imunocitochimice cu ajutorul p53, PCNA și TUNEL	132

5. 3. 5. Influența deltametrinului asupra concentrației elementelor chimice	134
5. 3. 6. Discuțiile studiului	134
5. 4. STUDIU EXPERIMENTAL 4: Influența acidului valproic asupra larvelor și a juvenililor de pește zebra	137
5. 4. 1. Acțiunea acidului valproic asupra activității locomotorii a larvelor	137
5. 4. 2. Testul interacțiunii sociale	139
5. 4. 3. Agresivitatea	141
5. 4. 4. Acțiunea acidului valproic asupra somnului	143
5. 4. 5. Discuțiile studiului	143
5. 5. STUDIU EXPERIMENTAL 5A: Impactul fipronilului asupra activității locomotorii și a stresului oxidativ	145
5. 5. 1. Efectul fipronilului asupra activității locomotorii larvare	145
5. 5. 2. Efectul fipronilului asupra activității acetilcolinesterazei	148
5. 5. 3. Discuțiile studiului	150
5. 6. STUDIU EXPERIMENTAL 5B: Impactul fipronilului asupra peștelui zebra ...	151
5. 6. 1. Efectul fipronilului asupra activității locomotorii a larvelor	151
5. 6. 2. Influența fipronilului asupra dezvoltării embrionare	153
5. 6. 3. Discuțiile studiului	155
5. 7. STUDIU EXPERIMENTAL 6: Impactul asupra comportamentului și a sociabilității peștelui zebra în urma administrării unei mixturi de pesticide	156
5. 7. 1. Activitatea locomotorie	156
5. 7. 2. Comportamentul social	159
5. 7. 3. Discuțiile studiului	161
5. 8. STUDIU EXPERIMENTAL 7: Efectul vitaminei B ₁ în urma administrării de fipronil asupra peștelui zebra	162
5. 8. 1. Influența vit. B ₁ asupra activității locomotorii a larvelor de pește zebra	162
5. 8. 2. Discuțiile studiului	165
5. 9. STUDIU EXPERIMENTAL 8: Efectul vitaminei B ₆ în urma administrării unei mixturi de pesticide asupra peștelui zebra	166
5. 9. 1. Impactul vitaminei B ₆ asupra distanței și a vitezei de înot	166
5. 9. 2. Comportamentul social	169
5. 9. 3. Discuțiile studiului	172
5. 10. STUDIU EXPERIMENTAL 9: Efectul vitaminei B ₁₂ în urma administrării unei mixturi de pesticide asupra peștelui zebra	174

5. 10. 1. Impactul prezenței vitaminei B ₁₂ asupra activității locomotorii	174
5. 10. 2. Comportamentul social	177
5. 10. 3. Discuțiile studiului	180
5. 11. STUDIU EXPERIMENTAL 10: Efectul vitaminei C în urma administrării de fipronil și piriproxifen asupra peștelui zebra	181
5. 11. 1. Efectul vitaminei C asupra activității locomotorii	181
5. 11. 2. Efectul vitaminei C asupra comportamentului social	186
5. 11. 3. Stresul oxidativ	188
5. 11. 4. Discuțiile studiului	190
CONCLUZII GENERALE	193
BIBLIOGRAFIE	196
ANEXE	240

LISTĂ ABREVIERI

ACh = acetilcolina

AChE = acetilcolinesteraza

ADN = acid dezoxiribonucleic

APA = Asociația Americană de Psihologie

AVP = acid valproic

DTM = deltametrin

DSM = Manualul de Diagnostic și Clasificare Statistică a Tulburărilor Mintale

ES = eroarea standard

ESM = eroarea standard medie

Fl-AAS = spectrometrie de absorbție atomică cu flacără

FIP = fipronil

GABA = acid amino-butiric

GF-AAS = spectrometrie de absorbție atomică cu cuptor de grafit

MeHg = clorura de metil-mercur

PIR = piriproxifen

ROS = specii reactive de oxigen

T° = temperatura

TSA = tulburare de spectru autist

WT = wild type / de tip sălbatic

CUVINTE CHEIE

Tulburare de spectru autist, pește zebură, sociabilitate, pesticide, vitamine

INTRODUCERE

În prezent, tulburarea de spectru autist sau mai simplu spus autismul se află în prim-planul multor specialiști, cercetători și în cel al oamenilor care au în familie un membru diagnosticat cu această afecțiune. Identificat, în principal, pe baza criteriilor comportamentale, autismul a evoluat în mai multe etape de-a lungul celor aproape 80 de ani de când Leo Kanner și Hans Asperger îl introduseseră ca simptom al tulburărilor de natură socială la copii (Kanner, 1943; Rimland, 1964; Evans, 2013).

Pe lângă repetitivitatea unor obiceiuri sau comportamente și retragerea în sine descoperite de către Leo Kanner și Leon Eisenberg, Michael Rutter adăuga la acestea și dereglările de limbaj. Câțiva ani mai târziu, Lorna Wing și Judith Gould introduceau noțiunea de „*spectru autist*” ce făcea referire la mai multe afecțiuni unite sub același nume datorită deficiențelor de limbaj, de dezvoltare a imaginației și a celor din domeniul social.

Sindromul Asperger, tulburarea pervazivă nespecifică de dezvoltare, autismul sau sindromul Kanner, sindromul Rett și tulburarea dezintegrativă infantilă au fost grupate sub umbrela tulburărilor de spectru autist. Acestea s-au păstrat astfel până în 2013 când au fost reunite sub forma unei singure afecțiuni: *tulburare de spectru autist*. Caracterizată prin trei niveluri de severitate, identificarea acestora se realizează prin intermediul criteriilor din Manualul de Diagnostic și Clasificare Statistică a Tulburărilor Mintale – DSM-V apărut în 2013 (APA, 2013).

Cauza apariției autismului încă nu este clară. Dereglările semnificative care s-au observat la nivelul creierului conduc la apariția unor perturbări în domeniul social, afectiv, comportamental și cognitiv. Studiile realizate în cadrul familiilor indică deficiențe sociale, deficiențe în domeniul comunicării și comportament specific în rândul rudelor de gradul I (Liu și Takumi, 2014; Çöp *et al.*, 2015).

Neavând cunoștințe suficiente încât să se poată identifica cu precizie și să se poată elabora strategii adecvate de tratament, cercetătorii și medicii au apelat la utilizarea unor mijloace de analiză a tulburării prin utilizarea modelelor animale. În ultimul deceniu, în literatura de specialitate au apărut o multitudine de studii care întrebunțau organisme drept model folosite, cu precădere, în descoperirea dar și în prevenirea ori chiar tratarea unor afecțiuni specifice (Tierney, 2011; Dai *et al.*, 2014; Shams *et al.*, 2018).

Multe întrebări își caută răspunsul în dezvoltarea modelelor animale. „*De ce sunt folosite anumite organisme în testele experimentale? Prin ce metode poate fi indusă afecțiunea respectivă? Pot organismele să dobândească aceleași caracteristici ca cele prezente la om?*”. Organismele model sunt utilizate în cercetare din câteva motive lesne de înțeles. Aprofundarea cunoștințelor într-o anumită ramură, analizarea diferitelor afecțiuni, dezvoltarea unor tratamente în urma testării lor de către organismul respectiv dar și pentru a îmbunătăți calitatea mediului înconjurător și implicit a vieții. Astfel că, cercetătorii au reușit să pună bazele unor modele animale excelente folosind, în majoritatea cazurilor, rozătoare (șoareci/șobolani).

În ideea ca un organism să poată fi utilizat ca model animal se urmărește atingerea a trei cerințe importante precum: existența unui grad ridicat de similaritate a cauzelor de apariție a afecțiunii avute în studiu, manifestarea similarității și în ceea ce privește simptomatologia afecțiunii respective și, de asemenea, medicația existentă pentru tratarea acelei afecțiuni să poată oferi statutul de individ sănătos

organismului în urma tratamentului aferent (Held, 1983; Davidson, Lindsey și Davis, 1987). Cu toate că, rozătoarele sunt cele mai cunoscute în domeniul cercetării medicale și nu numai, în ultima perioadă, oamenii de știință au adus în lumina reflectoarelor un alt organism care prezintă mai multe plusuri față de rozătoare. Acest organism nu este altul decât peștele zebură.

Danio rerio după denumirea latinească sau, mai simplu, peștele zebură face parte din marea familie a peștilor exotici. Acesta este folosit ca model animal datorită unor avantaje care îl propulsează mai sus de rozătoare în topul preferințelor cercetătorilor. Dimensiunile reduse ale corpului, costul scăzut de întreținere și de achiziție, existența unui ciclu reproductiv scurt, embrionii transparenți, manipularea genetică ușoară și gama variată de comportamente sunt numai o parte dintre cele mai deosebite de care dispune. Avantajul suprem pe care îl deține îi asigură locul central în lumea științei și anume: omologia genomului său cu cel uman într-o proporție de aproximativ 70%.

În cadrul acestei teze de doctorat se vor prezenta mai multe rezultate obținute ca urmare a dezvoltării unui posibil model animal valid pentru tulburarea de spectru autist utilizând ca organism model, peștele zebură. Identificarea unor potențiali agenți inductori, validarea acestora în inducerea unor caracteristici similare tulburării la peștele zebură, cât și a unor intervenții terapeutice în ameliorarea lor vor fi descrise în continuare.

CAPITOLUL 1 – TULBURAREA DE SPECTRU AUTIST ÎN CONTEXTUL ACTUAL

Încă de la descoperirea sa, tulburarea de spectru autist (TSA) a intrigat și continuă să mențină această stare printre oameni datorită multivalenței pe care o posedă. Inițial, termenul de „*autism*” a fost folosit de către Eugene Bleuler în 1911 pentru caracterizarea tulburărilor mintale ale unor indivizi care, potrivit rapoartelor sale începuseră să piardă contactul cu lumea exterioară și să petreacă mai mult timp în propria lor lume (Evans, 2013). Psihiatrul elvețian a folosit acest termen pentru a defini demența dar și pentru diagnosticarea schizofreniei dar, în niciun caz, nu era adecvat pentru autism, considerat la acea vreme doar un simptom și nu o afecțiune propriu-zisă.

Până la începutul secolului al XIX-lea, rata de incidență a TSA era destul scăzută, existând câteva cazuri izolate. În 1966, Lotter realiza un sondaj statistic ajungând la concluzia că 4 din 10000 de oameni erau diagnosticați cu această tulburare pentru ca până în 1988 numărul să crească considerabil: 1 din 1000 de oameni (Singhania, 2005). La nivel global este estimat că 1 din 588 de copii este diagnosticat cu TSA potrivit studiului lui Onalapo (Onalapo și Onalapo 2017).

Cu toate că este de cele mai multe ori descris ca fiind determinat genetic există dovezi care susțin că este mai mult decât atât. Identificarea unui număr mare de gene și a unor factori de mediu, a căror interacțiune prezintă o susceptibilitate ridicată în declanșarea autismului a condus la oferirea caracterului multifactorial.

Deși multă vreme manifestările TSA nu au fost grupate sub denumirea unei singure afecțiuni, reperele în diagnosticarea autismului s-au tot schimbat de-a lungul anilor, în sensul că, dacă la început

autismul era văzut ca un debut în schizofrenia infantilă, în prezent, autismul este o afecțiune clar definită. Astfel, potrivit celei mai recente versiuni a *Manualului de Diagnostic și Clasificare Statistică a Tulburărilor Mintale* (DSM-V) identificarea TSA se realizează după prezența anumitor criterii, iar severitatea TSA este catalogată în funcție de trei niveluri de severitate (APA, 2013). Astfel, conform DSM-V în momentul evaluării, specialiștii au în vedere următoarele criterii de diagnostic:

A. Deficite persistente în comunicarea și interacțiunea socială ce se întâlnesc în cadrul mai multor contexte, manifestate în următoarele arii în momentul evaluării sau de-a lungul timpului (exemplele de mai jos sunt ilustrative și nu atotcuprinzătoare):

1. Deficite în reciprocitatea social – emoțională – care variază de la o inițiere anormală a interacțiunii sociale și imposibilitatea de a susține o conversație, la o capacitate de împărtășire redusă a intereselor, emoțiilor sau afecțiunii, la incapacitatea de a iniția sau de a răspunde la interacțiunile sociale.
2. Deficite ale comportamentelor în comunicarea nonverbală folosite în cadrul interacțiunilor sociale: variază de la comunicarea verbală și nonverbală foarte slab integrate, la anormalități ale contactului vizual și limbajul corpului sau deficite în înțelegerea și utilizarea gesturilor, la lipsă totală a expresiilor faciale și a comunicării nonverbale.
3. Deficite în dezvoltarea, menținerea și înțelegerea relațiilor - care variază, de exemplu, de la dificultăți în a ajusta comportamentele pentru a fi potrivite în diverse contexte sociale, la dificultăți de a se implica în jocuri imaginative sau de a-și face prieteni, la lipsa interesului vizavi de persoanele de aceeași vârstă.

B. Comportamente, interese sau activități restrictive cu modele repetitive, manifestate în cel puțin două din următoarele arii în momentul evaluării sau de-a lungul timpului (exemplele de mai jos sunt ilustrative și nu atotcuprinzătoare):

1. Mișcări motorii, folosirea de obiecte sau limbaj stereotip sau repetitiv (de exemplu: stereotipii motorii simple, aliniatul jucăriilor sau aruncatul obiectelor, ecolalia, utilizarea frazelor idiosincratice).
2. Insistență că lucrurile să se întâmple în același fel, o aderare inflexibilă la rutine sau modele ritualizate pentru comportamente verbale sau nonverbal (de exemplu reacții extreme la schimbări mici, dificultăți în situațiile de tranziție, modele rigide de gândire, formule de salut, nevoia de a urma aceeași rută sau de a mânca același lucru în fiecare zi).
3. Interese restrictive, fixiste de intensitate și concentrare anormale (de exemplu atașament puternic sau preocupare față de un obiect neobișnuit, interese înalt restrictive și manifestate cu perseverență).
4. Hiper sau hipo-reactivitate la stimuli senzoriali sau interes neobișnuit pentru caracteristicile senzoriale ale mediului (de exemplu aparent indiferenți la durere sau temperatură, reacții nepotrivite la anumite sunete, texturi, mirositul sau atingerea în mod excesiv a obiectelor, fascinație pentru lumini și mișcare).

C. Simptomele trebuie să fie prezente în perioada de dezvoltare timpurie (dar este posibil să nu fie identificate în mod potrivit decât atunci când cererile sociale depășesc capacitățile limitate ale individului, sau pot fi mascate de strategii învățate de-a lungul vieții).

D. Simptomele cauzează dificultăți semnificative din punct de vedere clinic în aria socială, ocupațională sau alte arii importante funcționării firești a individului.

E. Aceste deficite nu pot fi explicate de prezența unei dizabilități intelectuale (întârzierea mintală) sau de întârziere globală în dezvoltare. Întârzierea mintală și tulburarea de spectru autist apar în mod frecvent împreună, pentru a pune un diagnostic comorbid al tulburării de spectru autist și întârzierii mintale, comunicarea socială ar trebui să fie sub ceea ce se așteaptă de la un nivel general de dezvoltare (APA,2013).

CAPITOLUL 2 – PEȘTELE ZEBRĂ – MODEL ANIMAL

Peștele zebură a fost menționat pentru prima dată în 1822 de către fizicianul scoțian Francis Hamilton, care îl identificase în apele râului Kosi din Bengal, o regiune a Indiei Britanice, astăzi făcând parte din Bangladesh (Arunachalam *et al.*, 2013).

Conform literaturii din prezent, peștele zebură (*Danio rerio*) se încadrează taxonomic în genul *Danio* al familiei Cyprinidae. Genul *Danio* însumează aproximativ 44 de specii (Fang, 2003). Numele *Danio* i se datorează habitatului său natural, printre culturile inundate de orez, fiind tradus din bengaleză ca „*al câmpului de orez*” (Spence *et al.*, 2007).

Peștele zebură a devenit o alternativă viabilă în cadrul studiilor ce vizează aprofundarea toxicității unor substanțe chimice, în special, a efectelor asupra sistemului nervos. În cadrul cercetării de față, peștele zebură a fost folosit ca *model animal indus* adică modelul a fost dezvoltat și adaptat prin intermediul unor substanțe chimice administrate fie în stadiul embrionar, fie în cel de juvenil ori adulți în scopul inducerii unor simptome similare TSA observate la om sau a unor comorbidități asociate (agresivitate, anxietate, dereglări ale somnului).

CAPITOLUL 3 – IPOTEZA DE CERCETARE ȘI OBIECTIVELE LUCRĂRII

În ultimul perioadă s-a înregistrat o creștere exponențială a studiilor ce au corelat declanșarea autismului cu o serie de factori de mediu. Deși, principala cauză a numeroaselor cazuri de TSA este de natură genetică, incidența ridicată printre copiii a atras atenția și asupra factorilor de mediu cu care femeile însărcinate vin în contact în timpul sarcinii sau după naștere. Expunerea la factorii de mediu nocivi pot dereglă dezvoltarea normală a sistemului nervos în oricare dintre stadiile de dezvoltare printr-o gamă variată de efecte.

Obiective

Scopul acestei lucrări de doctorat a fost de a aduce noi informații în acest domeniu prin utilizarea peștelui zebură ca model animal în studierea TSA. În plus, luând în considerare accentul pus pe factorii de mediu în determinarea acestei tulburări, modelarea TSA s-a efectuat prin metode chimice. Pentru atingerea

scopului menționat s-au urmărit o serie de obiective principale și secundare de-a lungul cercetărilor întreprinse precum:

- **Obiectivul principal 1:** Identificarea unor posibili agenți inductori ai simptomelor tipice TSA, în mod special, a acelor capabili să perturbe comportamentul social al peștilor zebra.
 - » **Obiectiv secundar 1:** Testarea efectului clorurii de metil-mercur asupra activității locomotorii, memoriei și stresului oxidativ la peștele zebra;
 - » **Obiectiv secundar 2:** Determinarea efectului aurului asupra comportamentului social și stresului oxidativ în urma unui tratament acut la peștele zebra;
 - » **Obiectiv secundar 3:** Testarea impactului cronic asupra comportamentului agresiv și asupra creierului a administrării de deltametrin peștelui zebra;
 - » **Obiectiv secundar 4:** Evaluarea impactului acidului valproic asupra somnului și a sociabilității peștelui zebra;
 - » **Obiectiv secundar 5:** Testarea efectului fipronilului asupra activității locomotorii și asupra comportamentului social;
 - » **Obiectiv secundar 6:** Testarea efectului unei mixturi de insecticide (fipronil și piriproxifen) asupra peștelui zebra.

- **Obiectivul principal 2:** Evaluarea efectului pozitiv al suplimentării dietei cu vitamine prin ameliorarea simptomelor induse.
 - » **Obiectiv secundar 1:** Analizarea efectului vitaminei B₁ asupra peștelui zebra după administrarea concomitentă de fipronil în stadiu embrionar;
 - » **Obiectiv secundar 2:** Analizarea efectului vitaminei B₆ asupra sociabilității juvenililor de pește zebra după administrarea cronică de fipronil și piriproxifen;
 - » **Obiectiv secundar 3:** Analizarea efectului vitaminei B₁₂ asupra juvenililor de pește zebra după administrarea cronică a insecticidelor fipronil și piriproxifen;
 - » **Obiectiv secundar 4:** Analizarea efectului antioxidant al vitaminei C asupra peștelui zebra după administrarea mixturii compuse din fipronil și piriproxifen.

CAPITOLUL 4 – METODOLOGIA CERCETĂRII

Scopul studiilor

Cauzele declanșării autismului încă nu sunt complet descoperite. Impactul factorilor de mediu au fost adesea menționați pe lângă factorii genetici (Karimi *et al.*, 2017; Modabbernia, Velthorst și Reichenberg, 2017). În prezent, omul este expus la mii de compuși chimici în formă pură sau combinată a căror consecințe nu sunt studiate îndeajuns. Medicamentele, produsele cosmetice, produsele de curățenie, noxele din mediul înconjurător și alte tipuri de astfel de surse vin în contact cu omul aproape zilnic.

Organismul model: peștele zebură

Organismul model folosit în cadrul acestor studii a fost peștele zebură, fie în stadiu embrionar, larvar, juvenil sau în cel de adult.

Substanțele chimice luate în studiu

Clorura de metil-mercur (II, CH_3HgCl), soluția cu aur, deltametrinul, acidul valproic, fipronilul, piriproxifenul și o serie de vitamine (B_1 , B_6 , B_{12} , C) au fost testate în cadrul studiilor experimentale.

Testele comportamentale

Testul performanței de înot

Testul performanței de înot a fost efectuat în cadrul labirintului în formă de T care este adaptat de fiecare dată protocolului de lucru. Acesta este construit din plexiglas transparent și compus din 3 brațe: un braț central, un braț drept și un braț stâng. Deasupra labirintului este plasată o cameră cu infraroșu care preia datele fiecărui individ testat și care este conectată la un calculator. Apoi, fiecare sesiune este analizată prin intermediul software-ului EthoVision XT 11.5, calibrat anterior pentru testele necesare. Sistemul de măsurare a comportamentului este un produs al companiei NOLDUS din Olanda (Fig. 4. 2.).

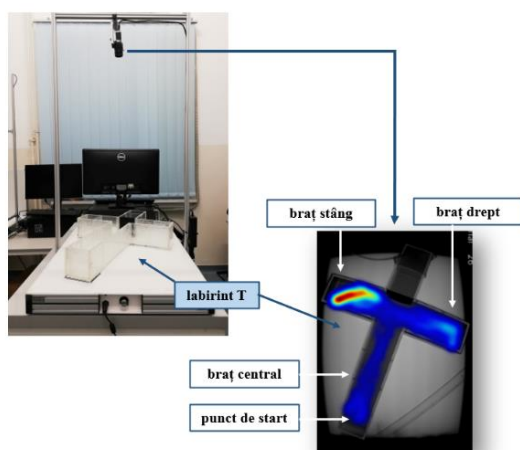


Fig. 4. 2. Sistemul de măsurare a comportamentului compus din labirintul T cu cele trei brațe și calculatorul cu software-ul EthoVision XT (imagine originală)

Prin acest test se urmărește observarea fiecărui individ din grup și reținerea unor date în ceea ce privește activitatea locomotorie precum: distanța totală parcursă, viteza de înot, accelerația, traiectoria și timpul petrecut în activitate și repaus. Parametrii preluați revin unui total de 4 minute per sesiune, iar înainte de începerea fiecărei sesiuni au fost oferite câte 30 de secunde fiecărui pește pentru a se acomoda temporar în noul spațiu și de a se liniști datorită transferului din acvariul experimental în labirintul T.

Testul oglindei

Prin acest test se urmărește cuantificarea nivelului de agresivitate pe care îl deține un individ. De cele mai multe ori, pentru testarea peștilor s-a folosit ca mijloc ajutător oglinda, astfel încât, comportamentul peștilor să poată fi analizat și, mai ales, felul în care indivizii se raportează la imaginea lor manifestând un răspuns social, prădătorism sau agresivitate (Kalueff and Stewart, 2012; Way *et al.*, 2015).

Astfel, la nivelul unuia dintre brațele labirintului se atașează o oglindă (pentru acest test oglinda a fost poziționată în brațul stâng) (Fig. 4. 3.). Activitatea fiecărui individ este monitorizată prin intermediul programului EthoVision XT 11.5 timp de 4 minute, după trecerea celor 30 de secunde de acomodare în punctul de start. Intensitatea agresivității a fost măsurată prin timpul petrecut în apropierea sau lângă oglindă; respectiv cu cât timpul petrecut în brațul stâng a fost mai mare, cu atât nivelul de agresivitate a fost mai semnificativ.

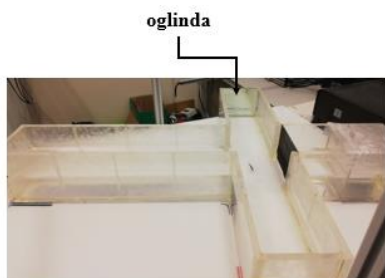


Fig. 4. 3. Adaptarea labirintului T pentru testul oglindei prin atașarea stimulului (oglindei) în brațul stâng (imagina originală)

Testul memoriei

Testul memoriei a cuantificat capacitatea unui individ de a învăța și de a face asocierea unui stimul negativ sau pozitiv cu o anumită culoare. Culoarele alese au fost roșu și verde. La început s-a analizat existența vreunui impact a culorii asupra comportamentului peștilor. Suporturile colorate au fost atașate celor două brațe (Fig. 4. 4.). După patru teste repetate prin schimbarea culorilor între brațe s-a ajuns la concluzia că în această etapă nu a existat nicio influență.



Fig. 4. 4. Labirintul T adaptat pentru testul memoriei prin atașarea celor două suporturi colorate la nivelul brațelor stâng și drept (imagina originală)

Pentru a putea observa abilitatea de memorare a peștilor, aceștia au fost, mai întâi, condiționați. Procesul a constat în plasarea fiecărui pește în două acvarii diferite: unul ce avea pereții de culoare roșie reprezentând stimulul negativ, iar celălalt prezenta pereții verzi în vederea asocierii stimulului pozitiv. În momentul în care individul ajungea în acvariul roșu apa începea să fie agitată. După 2 minute, peștele era transferat în acvariul verde, acolo unde era lăsat să se liniștească. După alte 2 minute, peștele era mutat înapoi în acvariul roșu. Acest proces a fost repetat de cinci ori înainte ca peștii să fie analizați în labirintul T.

Testul de interacțiune socială

Referitor la testul ce măsoară gradul de sociabilitatea, acesta s-a realizat tot cu ajutorul labirintului T care a fost pentru efectuarea acestui test și anume: la nivelul brațului stâng a fost plasat stimulul adică un pește din grupul de apartenență al individului analizat (Fig. 4. 8.). Acesta a fost despărțit printr-un perete transparent de restul zonelor, astfel încât, individul studiat să se poată apropia. Timpul petrecut în brațul

stâng și în apropierea celui alt individ a fost interpretat ca comportament social. Fiecare sesiune a fost înregistrată și a avut o durată de 4 minute.



Fig. 4. 8. Labirintul T adaptat pentru testul de interacțiune socială
(imagine originală)

Analiza elementelor chimice

Câte cinci indivizi din fiecare grup experimental au fost separați pentru analiza elementelor chimice după ce au fost stocați, în prealabil, în congelator la o temperatură de -25°C . Pentru această analiză s-au folosit metode diferite și anume: metoda FI-AAS aer-acetilenă (spectrometrie de absorbție atomică cu flacără) și metoda GF-AAS (spectrometrie de absorbție atomică cu cuptor de grafit).

Examenul histopatologic și testul de imunocitochimie

Pentru analizele histologice, peștii au fost fixați timp de o oră într-o soluție de 10% formol și alte 48 de ore în soluție Bouin (acid picric, acid acetic și formol). În continuare, țesuturile au fost deshidratate în diferite soluții de etanol, apoi încorporate în parafină și tăiate la o grosime de $5\ \mu\text{m}$. După acest pas, secțiunile au fost transferate colorării imunohistochemice clasice cu hematoxilină și eozină. Ultima etapă a obținerii secțiunilor a fost deparafinarea lor în xilen (dimetilbenzen) și rehidratare cu etanol.

Pentru pregătirea incubării secțiunilor cu anticorp anti-p53, anti-PCNA și cu kitul de testare a fragmentării ADN-ului proTUNEL-IHC, acestea au fost imersate în apă oxigenată și apoi 15 minute în soluție tampon pentru evitarea acțiunii peroxidazei. Anticorpul anti-p53 este un produs al firmei Abcam (ab77813, Regatul Unit al Marii Britanii), iar anticorpul anti-PCNA și kitul de testare proTUNEL-IHC sunt de la Gene Tex (Statele Unite ale Americii).

Complexele antigen-anticorp au fost vizualizate sub forma culorii maro folosind o soluție formată din avidină și biotină din kitul Vectastain ABC, Vector. Secțiunile au fost examinate cu ajutorul microscopului cu lumină Olympus CX4. Imaginile au fost surprinse prin intermediul camerei Olympus SP-350 și analizate cu software-ul LAS v 4.9. Intensitatea culorii maro a dovedit prezența marcatorelor enumerați mai sus. Secțiunile au fost realizate la nivelul creierului și s-au urmărit, în mod special, trei zone relevante pentru reglarea comportamentului ca: telencefalul, cerebelul și tectum optic (mezencefal). Din secțiunile pregătite pentru imunocitochimie s-au numărat și celulele afectate pe baza activității markerilor cu software-ul TIFFalyzer.

Evaluarea stresului oxidativ

Stresul oxidativ a fost măsurat din întregul corp al peștilor. După fiecare experiment peștii au fost păstrați în congelator, astfel încât, să se poată analiza activitatea enzimatică. Pentru observarea prezenței stresului oxidativ a fost cuantificată activitatea enzimelor specifice și anume: cea a superoxid dismutasei (SOD) și a malondialdehidei (MDA). Probele au fost obținute prin mojararea fiecărui pește și centrifugate. Din supernatant s-a preluat o anumită cantitate (în funcție de indicațiile kitului) care a fost transferată mai departe în alt recipient peste care s-au adăugat și celelalte componente din kiturile de testare ale SOD și MDA de la Merck (Darmstadt, Germania). Activitatea enzimelor a fost cuantificată prin intermediul spectrofotometrului Specord 210 Plus de la Analytik Jena, Germania.

Analiza statistică a datelor

Prima etapă în analiza datelor a fost aplicarea testului Shapiro-Wilk prin care s-a verificat distribuția datelor obținute. Rezultatele acestuia au dovedit că toate seturile de date au fost distribuite în mod uniform pentru toate grupurile experimentale. Testul unidirecțional ANOVA urmat de testul Tukey HSD a fost efectuat pentru a demonstra diferențele semnificative ale varianței comportamentului investigat comparat cu datele din pretratament. În cazul metalelor și a stresului oxidativ a fost calculată varianța dintre grupul control și grupurile experimentale. Analizele statistice au fost efectuate folosind software-ul OriginPro v.9.3 (2016) proiectat și creat de OriginLab Corporation, SUA.

CAPITOLUL 5 – REZULTATE ȘI DISCUȚII

5. 1. STUDIUL EXPERIMENTAL 1: Efectul administrării clorurii de metil-mercur asupra stresului oxidativ și a comportamentului peștelui zebură

În cadrul acestui studiu s-a analizat efectul clorurii de MeHg asupra comportamentului peștilor zebură după trecerea a 32 de ore de la administrarea compusului. Dat fiind faptul că peștii au reacționat diferit în etapa pretratamentului, compararea rezultatelor nu s-a făcut cu cele obținute de grupul control, ci cu cele specifice fiecărui grup. Comportamentul normal a fost considerat cel prezentat în etapa inițială.

Cele mai multe perturbări au fost prezente în cadrul grupului 3. Parametrii specifici activității locomotorii au înregistrat valori scăzute față de cele din etapa pretratamentului; semn clar că concentrația de 15 $\mu\text{g/L}$ MeHg a fost destul de puternică pentru a produce dezechilibre în metabolismul peștilor. Astfel de rezultate s-au obținut și pentru alte specii de pești; de exemplu, activitatea locomotorie a bibanului galben (*Perca flavescens*) a fost afectată după ce peștii au fost expuși în prealabil la doze de până la 1000 nM metil-mercur în stadiu embrionar (Mora-Zamorano *et al.*, 2017). Efecte similare s-au obținut și în cazul rozătoarelor când coordonarea motorie și întregul proces de locomoție a fost dereglat de prezența MeHg în organismul lor (Sakamoto *et al.*, 2002; Weiss *et al.*, 2005; Paletz, Craig-Schmidt și Newland, 2006; Christinal și Sumathi, 2013).

De asemenea, răspunsurile oferite de reprezentanții grupului 3 la procesul de condiționare ce viza testarea memoriei s-a remarcat imposibilitatea acestora de a diferenția cei doi stimuli. Mai mult, în studii ce

au folosit ca model animal rozătoarele s-au obținut date semnificative în ceea ce privește efectul MeHg asupra procesului de memorare și de învățare (Carratù *et al.*, 2006; Albores-Garcia *et al.*, 2016).

După cum s-a prezentat și mai sus, stresul oxidativ are o influență puternică asupra funcționării metabolismului în parametri normali. Prezența MeHg în organismul peștilor zebură componente ai grupului 3 a condus la observarea unor modificări în cazul enzimei SOD, al cărei nivel a fost semnificativ mai ridicat datorită acțiunii antioxidante pe care o posedă. În plus, markerul peroxidării lipidice, MDA, a prezentat valori ridicate. Stresul oxidativ este asociat cu inducerea neurotoxicității, iar MeHg nu a făcut decât să favorizeze prezența sa (Yee și Choi, 1996; Reardon și Bhat, 2007; Santos *et al.*, 2013). Suplimentarea hranei cu MeHg a somonului de Atlantic (*Salmon salar L.*) timp de patru luni a rezultat în creșterea nivelului de SOD pentru cei cărora li s-a dat 5 mg/Kg și o scădere a acesteia când doza a fost dublată (Berntssen, Aatland și Handy, 2003).

5. 2. STUDIUL EXPERIMENTAL 2: Influența aurului asupra comportamentului peștelui zebură

Administrarea aurului pentru 30 de ore a condus la perturbarea comportamentului peștilor zebură, însă efectul a fost temporar. Același rezultat a fost remarcat și în urma testului de interacțiune socială ce a urmărit impactul aurului asupra comportamentului social al peștilor zebură. Aurul a putut fi absorbit cu ușurință de către peștii zebură ținând cont de creșterea nivelului de aur din organism concomitent cu creșterea concentrației.

Prezența aurului în organismul peștilor a indus apariția stresului oxidativ. Acesta a fost menționat și în cazul midiei (*Mytilus edulis*) căreia i s-a administrat nanoparticule de aur de o concentrație de 0,75 mg/L timp de 24 de ore. Rezultatele lor au confirmat existența peroxidării lipidice prin nivelul crescut de MDA din glandele sistemului digestiv (Tedesco *et al.*, 2010). Câțiva ani mai târziu, studiul a fost refăcut urmând același protocol și organism schimbându-se doar învelișul nanoparticulelor de aur cu o soluție de citrat. De această dată, doar activitatea CAT din glandele digestive a fost semnificativă (Tedesco *et al.*, 2008).

Enzimele studiate (SOD, CAT și GPx) care au fost implicate în lupta contra ROS au prezentat valori ridicate, iar când activitatea uneia dintre enzime a scăzut, aceasta a fost imediat înlocuită de o alta; de exemplu, atunci când activitatea SOD a scăzut considerabil nivelul de CAT și GPx au crescut după cum s-a observat în cazul ultimului grup. Acțiunea enzimelor poate fi dereglată de prezența aurului în stadiul embrionar prin afectarea genelor responsabile de acestea conform unui studiu recent efectuat prin intermediul embrionilor de pește zebură (Patibandla *et al.*, 2018). Mai mult, se pare că toxicitatea acestor particule poate influența gravitatea efectelor de la dezvoltarea defectuoasă până la moarte în cazul peștilor zebură. Rezultatele studiului prezent indică o creștere progresivă a activității MDA pe măsură ce concentrația metalului a crescut înregistrând valori semnificative (* $p < 0,05$, ANOVA).

5. 3. STUDIUL EXPERIMENTAL 3: Impactul deltametrinului asupra peștelui zebură

În ceea ce privește activitatea locomotorie nu s-au observat modificări semnificative pentru nici unul dintre grupurile experimentale pentru toată perioada de testare. Agresivitatea grupul 2 care a primit cea mai mică doză (0,25 $\mu\text{g/L}$ DTM) a început să se evidențieze după 6 zile de la ingerarea DTM-ului și nu s-a menținut constantă până la finalul experimentului. Nu același lucru este valabil și pentru celelalte 3 grupuri experimentale. Când doza de sus a fost dublată (0,50 $\mu\text{g/L}$ DTM), comportamentul de tip agresiv a fost

declanșat mult mai repede, încă din ziua 2. Referitor la celelalte două grupuri (1 și 2 $\mu\text{g/L}$ DTM), intervalele de agresivitate și non-agresivitate au fluctuat cu predominarea celei dintâi. Acest fapt nu poate fi decât un semn al deteriorării domeniului cognitiv, iar analizele histologice au întărit această afirmație.

În urma analizelor histologice și a celor de imunocitochimie la nivelul cerebelului, tectumului optic și a telencefalului s-au identificat modificări semnificative ale țesuturilor din zonele respective pentru grupurile experimentale în comparație cu cele ale grupului control. După cum se poate observa și în Fig. 5. 21., intensitatea culorii relevă fragmentarea ADN-ului nuclear. În cele trei zone studiate se poate remarca variația densității celulare ce diferă în funcție de concentrația compusului. Culoarea datorită prezenței markerului (p53 sau TUNEL) a fost mai puternică spre deosebire de cea a PCNA care s-a diminuat pe măsură ce concentrația DTM-ului a crescut. Calcularea indexului apoptotic a arătat un număr semnificativ mai mare a celulelor apoptotice în toate cele trei zone analizate. Dintre toate elementele chimice analizate, seleniul a prezentat activitatea cea mai semnificativă; activitate ce a scăzut proporțional cu creșterea concentrației de DTM.

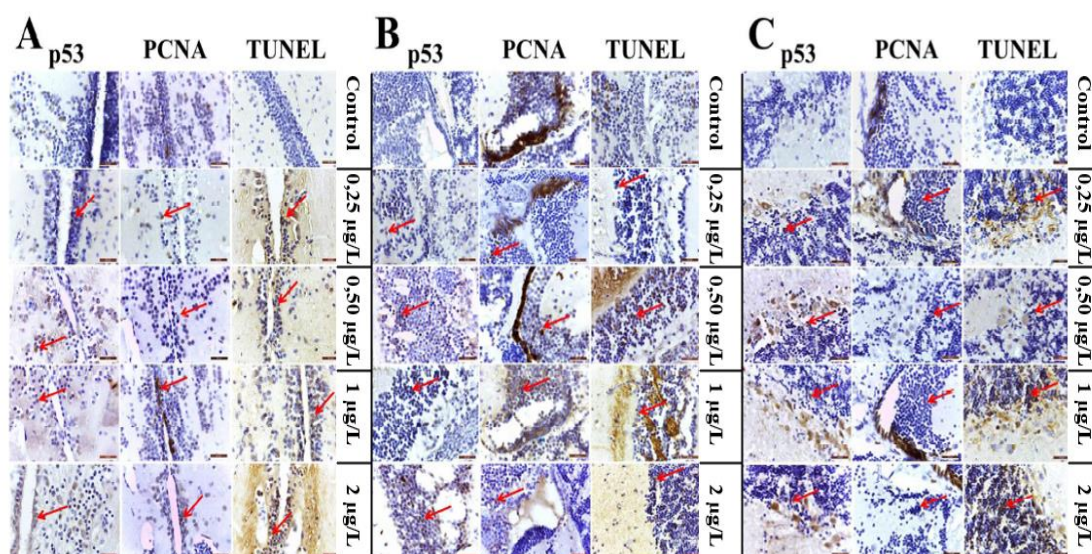


Fig. 5. 21. Examenul histopatologic și colorațiile specifice markerilor (p53, PCNA și TUNEL) de la nivelul telencefalului (A), tectumului optic (B) și al cerebelului (C) peștilor zebură (săgețile roșii indică activitatea pozitivă a markerilor asupra celulelor; scala 20 μm)

5. 4. *STUDIUL EXPERIMENTAL 4: Influența acidului valproic asupra larvelor și a juvenililor de pește zebură*

În cazul experimentului de față, AVP a indus o scădere a somnului și hiperactivitate la indivizii cu perioada cea mai lungă de administrare. Rezultatul acesta este validat de cel obținut de Baronio și echipa lui după un tratament de 5 zile cu 25 μM atunci când au constatat că nivelul histaminei și numărul de neuroni histaminergici au scăzut semnificativ în rândul larvelor de pești zebură tratate cu AVP (Baronio *et al.*, 2018).

Creșterea perioadei de veghe, a distanței și a vitezei de deplasare pe timpul nopții a grupului 4 în comparație cu cea a grupului 1 poate fi o consecință a AVP-ului asupra neuronilor histaminergici care nu au mai putut elibera o cantitate mai mare de GABA. O insuficientă cantitate de GABA a fost asociată cu hiperactivitate și alterare a calității somnului la șoareci (Yu *et al.*, 2015). Durata de expunere la AVP a influențat rezultatele obținându-se efecte contrare; grupul cu cea mai mare durată (72 ore) a înregistrat valori ridicate în cazul distanței parcurse, a vitezei de înot și a timpului petrecut în mișcare, în timp ce, grupul 3 (48 de ore) a prezentat cele mai mici valori în comparație cu grupul control. Hiperactivitatea a fost des raportată în cadrul studiilor în care s-a utilizat AVP-ul ca substanță chimică de studiu ceea ce este în acord și cu rezultatele de față. Administrarea a 3 mM, 50 sau 500 μ M AVP în primele ore de după fertilizare a expus creșterea deosebită a distanței dar și a vitezei larvelor de pești zebra (Ellis și Soanes, 2012; Bailey *et al.*, 2016; Li *et al.*, 2018).

Astfel, în urma analizării datelor s-a distins faptul că sociabilitatea grupurilor experimentale este influențată de durata expunerii embrionare; timpul petrecut lângă stimulului social scăzând pe măsură ce perioada respectivă s-a extins (Fig. 5. 26.).

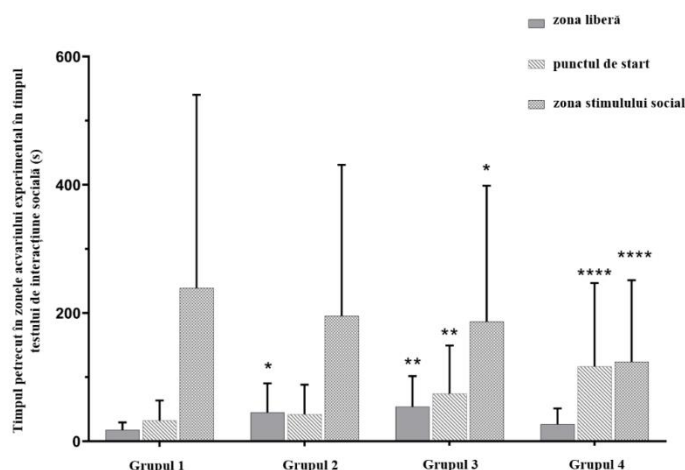


Fig. 5. 26. Timpul petrecut de către grupurile experimentale în timpul testului de interacțiune socială. Grupul 1: control (n = 30), grupul 2: 24 h (n = 24), grupul 3: 48 h (n = 24) și grupul 4: 72 h (n = 22). Datele sunt reprezentate ca medie \pm ESM; unde *p < 0,05; **p < 0,01 și ****p < 0,0001 Tukey comparat cu grupul control

5. 5. *STUDIUL EXPERIMENTAL 5A: Impactul fipronilului asupra activității locomotorii și a stresului oxidativ*

Administrarea timpurie a FIP embrionilor de pește zebra a relevat influența nefastă pe care acesta îl are asupra activității locomotorii și a dezvoltării peștilor. Rezultatele studiului au demonstrat existența unui efect dependent de doza ingerată, astfel ultimul grup (3 mg/L FIP) a fost cel mai afectat ($p < 0,05$, Tukey). Totodată, creșterea concentrației a determinat inhibarea locomoției, peștii fiind mai puțin activi. Viteza de înot a suferit modificări direct proporționale cu creșterea concentrației de FIP din mediu, astfel încât, distanța a scăzut semnificativ pentru ultimele trei grupuri experimentale. Schimbarea frecvență a direcției și mișcările

sacadate au fost identificate în urma observării unei curbe ascendente pentru clasele 1 și 8 și descendente pentru clasele 4 și 5 ($p < 0,05$, Tukey).

Evaluarea AChE a larvelor a indicat o scăderea a nivelului activității sale dependentă de concentrația de FIP; cu alte cuvinte relația dintre cele două fiind invers proporțională (Fig. 5. 34.) ($*p < 0,05$, ANOVA). Acesta poate fi o consecință a creșterii nivelului stresului oxidativ ceea ce este în acord cu studiul lui Gao et al. care descria reducerea activității receptorului nicotinic al ACh (Gao, Liu și Guan, 2008). Alte câteva studii susțin inhibarea ACh de către ROS în diferite țesuturi (Tsakiris *et al.*, 2000; Schallreuter *et al.*, 2004; Danylovyh, 2009; Liu *et al.*, 2017).

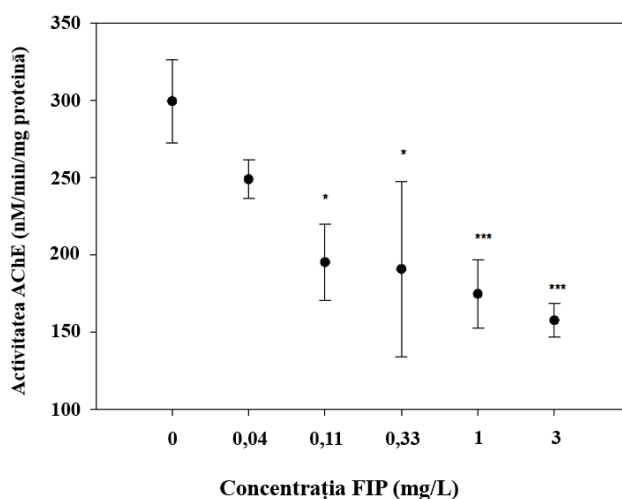


Fig. 5. 34. Activitatea AChE înregistrată în cadrul grupurilor experimentale. Datele sunt prezentate sub forma mediei \pm ESM; $*p < 0,05$ și $*** p < 0,001$ Tukey

5. 6. STUDIUL EXPERIMENTAL 5B: Impactul fipronilului asupra peștelui zebură

Impactul FIP s-a putut observa în cazul tuturor parametrilor analizați, cu efecte semnificative asupra grupurilor 4, 5 și 6 ($p < 0,05$, Tukey). În general, efectul compusului a fost invers proporțional cu concentrația sa. Parametrul ce a urmărit distanța totală parcursă de către larve în perioada de întuneric a scăzut pe măsură ce concentrația de FIP din mediu a crescut. În urma administrării timpurii a FIP-ului, toxicitatea acestuia a putut fi observată și în dezvoltarea embrionilor de pește zebură. Modificările de la nivelul corpului au fost dependente de concentrația insecticidului din mediu accentuându-se pe măsura creșterii acesteia. Astfel, deformări ale coloanei vertebrale și ale cozii au fost identificate la majoritatea grupurilor experimentale în comparație cu grupul control (Fig. 5. 39).

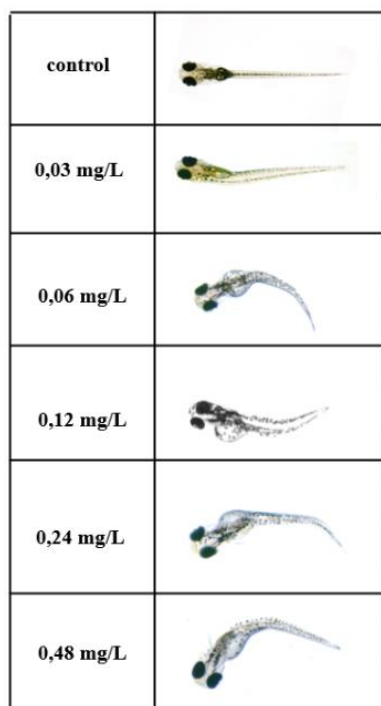


Fig. 5. 39. Anormalități de dezvoltare ale coloanei vertebrale observate la larvele de pește zebra în funcție de concentrație în comparație cu larva din grupul control (mărire x 2) (imagini originale)

5. 7. STUDIUL EXPERIMENTAL 6: Impactul asupra comportamentului și a sociabilității peștelui zebra în urma administrării unei mixturi de pesticide

Perturbarea activității locomotorii a fost prima observație realizată după analizarea datelor care a relevat efecte opuse în funcție de concentrația oferită. După 24 de ore de la adăugarea mixturii în mediu distanța parcursă de către grupurile experimentale a crescut considerabil față de cea din etapa inițială. Acest trend nu s-a menținut și după trecerea a încă 24 de ore pentru grupul 2 și 3, însă ultimul grup a continuat în pantă ascendentă față de perioada pretratamentului.

Privind caracterul social, combinația celor două insecticide nu a cauzat schimbări semnificative pentru nici unul dintre grupurile experimentale. Într-adevăr, timpul petrecut în brațul stâng a scăzut după cele 48 de ore, dar a existat o preferință pentru brațul central. Durata de expunere și concentrația pot manipula efectele exercitate asupra sociabilității, ceea ce sugerează studierea acestora pe o perioadă mai extinsă.

5. 8. STUDIUL EXPERIMENTAL 7: Efectul vitaminei B₁ în urma administrării de fipronil asupra peștelui zebra

Rezultatele au demonstrat influența nefavorabilă asupra locoțiiei raportată la distanța totală și la timpul petrecut în activitate a grupului 2 în comparație cu cea a controlului. În schimb, în grupurile care au primit concentrații diferite de vit. B₁ efectele constatate au fost contrare; semn că nu întotdeauna suplimentarea poate fi avantajoasă. Distanța înotată a scăzut atunci când embrionilor li s-a dat o doză mai mică de vit. B₁ (0,2 mg/L), însă timpul petrecut în activitate mult mai mare comparativ cu cel al grupului 1 (Fig. 5. 43.). Când doza s-a dublat, efectul obținut a fost opus. Mai mult decât atât, viteza a fost semnificativ mai mare în cazul grupului 4 (0,4 mg/L vit. B₁).

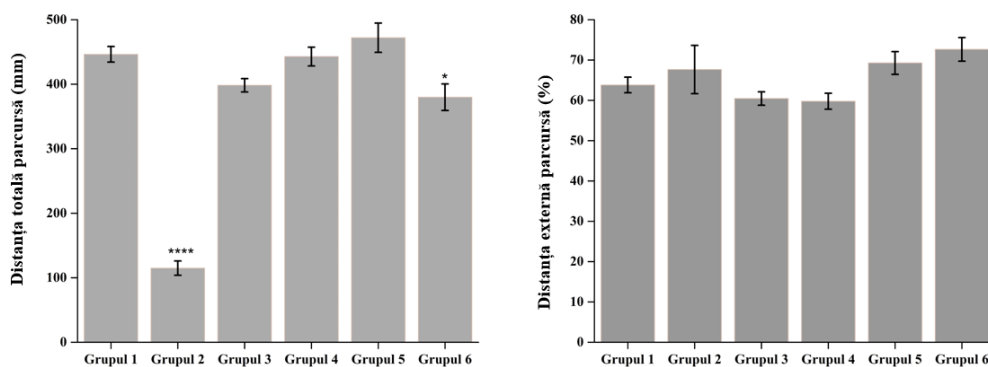


Fig. 5. 43. Distanța parcursă de către larve în timpul perioadei de întuneric. Grupul 1: control, grupul 2: 0,2 mg/L vit. B₁, grupul 3: 0,4 mg/L vit. B₁, grupul 4: 0,05 mg/L FIP, grupul 5: 0,2 mg/L vit. B₁ + 0,05 mg/L FIP și grupul 6: 0,4 mg/L vit. B₁ + 0,05 mg/L FIP. Rezultatele sunt prezentate sub forma mediei ± ESM; ****p< 0,0001 Tukey comparat cu grupul control

5. 9. STUDIUL EXPERIMENTAL 8: Efectul vitaminei B₆ în urma administrării unei mixturi de pesticide asupra peștelui zebură

O singură doză de pesticide a putut perturba sociabilitatea peștilor conducând la scăderea timpului petrecut lângă grup, însă este un efect pe termen scurt peștii fiind capabili să se recupereze și să manifeste un comportament similar celui de dinaintea expunerii (Fig. 5. 52.). Datorită celor constatate în urma tratamentului cu vit. B₆ la peștii zebură, aceasta poate fi considerată o posibilă alternativă terapeutică în TSA dar deținerea unei bogate surse despre eficiența ei este indiscutabilă, mai ales, că lipsa cunoașterii poate afecta ritmul de viață și integrarea oamenilor cu această tulburare în societate.

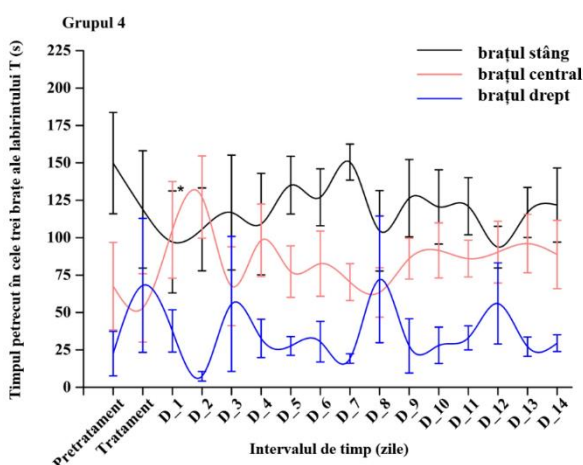


Fig. 5. 52. Timpul petrecut în cele trei brațe de către juvenalii din grupul 4. Rezultatele sunt prezentate sub forma mediei ± ESM; *p< 0,05 Tukey comparat cu rezultatul din etapa de pretratament

5. 10. STUDIUL EXPERIMENTAL 9: Efectul vitaminei B₁₂ în urma administrării unei mixturi de pesticide asupra peștelui zebură

Până în prezent, nu au fost analizate efectele vit. B₁₂ asupra activității locomotorii și nici în ceea ce privește domeniul social și nici corelate cu TSA la un model animal. Fiind primul studiu de așa natură,

rezultatele obținute relevă capacitatea vit. B₁₂ de a coopera cu enzimele sistemului antioxidant și de a participa la ajustarea unui comportament normal după asaltarea peștilor zebură cu mixtura de pesticide. Locomoția a fost clar îmbunătățită după suplimentarea cu vit. B₁₂ a dietei peștilor zebură după cum s-a prezentat și în subcapitolul de rezultate (Fig. 5. 53.).

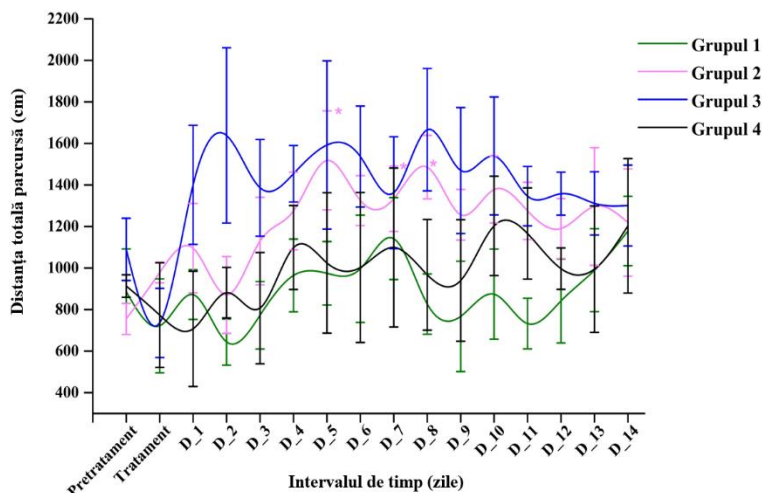


Fig. 5. 53. Distanța totală parcursă de către juvenalii din grupurile experimentale. Grupul 1: control, grupul 2: 0,24 µg/L vit. B₁₂, grupul 3: 600 µg/L FIP+ PIR și grupul 4: 0,24 µg/L vit. B₁₂ + 600 µg/L FIP+ PIR. Datele sunt exprimate prin media ± ESM; *p<0,05 Tukey comparat cu rezultatul din etapa de pretratament

Efectul insecticidelor a fost mult mai pronunțat asupra distanței parcurse și a vitezei în grupul 3 determinând apariția hiperactivității față de cel observat în cadrul celorlalte grupuri experimentale. Mișcarea excesivă este răspunsul la interacțiunea peștilor cu cele două insecticide, a căror prezență a stârnit apariția stresului inducând creșterea secreției de cortizol dar și a ROS (Stehr *et al.*, 2006; Wang *et al.*, 2016). Rezultatele similare grupului control au fost semnalate pentru grupul 4 expus atât la vitamină, cât și la mixtura de insecticide.

5. 11. STUDIUL EXPERIMENTAL 10: Efectul vitaminei C în urma administrării de fipronil și piriproxifen asupra peștelui zebură

Expunerea timp de 14 zile la mixtura de pesticide a determinat scăderea parametrilor activității locomotorii precum: distanța totală parcursă, viteza de înot și timpul petrecut în activitate. De cealaltă parte, grupul care a primit doar vit. C a prezentat un parcurs mult mai bun chiar și față de grupul control în ceea ce privește locomoția generând un posibil avantaj al prezenței vitaminei în dieta lor zilnică. De altfel, și atunci când vitamina a fost administrată concomitent cu mixtura de pesticide a participat la reglarea efectelor negative induse de prezența FIP-ului și a PIR-ului (Fig. 5. 60.).

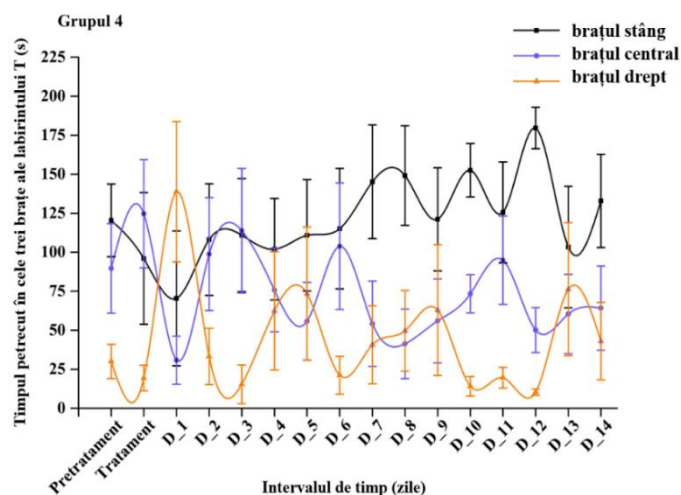


Fig. 5. 60. Timpul petrecut în brațele labirintului T de către grupul experimental 4 (s). Datele sunt exprimate prin media \pm ESM; $p > 0,05$ ANOVA comparat cu rezultatul din etapa de pretratament

Mixtura de pesticide a putut induce simptome caracteristice TSA prin afectarea, în principal, a comportamentului social. În plus, misiunea vit. C de a asigura protecția celulară contra ROS a fost încă o dată confirmată aducându-i susținere în utilizarea sa alături de celelalte enzime antioxidante. Deși în acest studiu vit. C nu a neutralizat în totalitate efectele mixturii, aceasta a luat parte la procesul de detoxifiere.

CONCLUZII GENERALE

În urma rezultatelor obținute de-a lungul tuturor studiilor experimentale realizate se pot formula următoarele concluzii:

- Administrarea de clorură de metil-mercur la peștii zebură a condus la dereglarea activității locomotorii, la inducerea unor deficite de memorie de scurtă durată, la scăderea agresivității dar și la favorizarea acțiunii negative a ROS prin creșterea stresului oxidativ.
- Aurul, un cunoscut element prețios, a determinat modificarea comportamentului social al peștilor zebură după numai 2 ore de la adăugarea lui în acvariile experimentale în cazul tuturor grupurilor, însă efectul acesta nu s-a menținut până la finalizarea studiului.
- De asemenea, prezența aurului în organismul peștilor zebură a cauzat scăderea nivelului enzimelor din sistemul antioxidant precum SOD, CAT și GPx și creșterea celui de MDA, binecunoscut marker al degradării oxidative.
- Utilizat ca tratament împotriva crizelor de epilepsie, AVP administrat embrionilor de pește zebură a indus modificări ale somnului și ale locoțiției după ingerarea unei doze de 48 μ M timp de 24, 48 și 72 de ore. Mai mult decât atât, sociabilitatea larvelor analizată după 6 săptămâni de la tratament a fost perturbată din cauza expunerii timpurii la AVP.
- Tratamentul cronic cu DTM nu a modificat activitatea locomotorie a peștilor zebură după adăugarea zilnică în mediu a unor concentrații de 0,25; 0,5; 1 și 2 μ g/L. În schimb, efecte ale acestuia au fost

constatate la nivelul țesuturilor din cerebel, tectumul optic și din telencefal care au prezentat alterări celulare dependente de concentrație.

- Agresivitatea a variat în cadrul grupurilor experimentale, fiind mult mai pronunțată în prima parte a tratamentului cu DTM. În plus, nivelul seleniului a scăzut proporțional cu creșterea concentrației, ceea ce sugerează existența stresului oxidativ și implicarea seleniului în procesul de detoxifiere.
- Expunerea timpurie a embrionilor la diferite concentrații de FIP a determinat alterarea comportamentului locomotor și dezvoltare deficitară prin apariția modificărilor la nivelul coloanei vertebrale. În același timp, activitatea AChE a fost redusă în urma metabolizării FIP din mediu.
- Adăugarea în mediul de viață a unei mixturi de insecticide (FIP și PIR) a dovedit efectul sinergic al celor două substanțe asupra distanței de deplasare a juvenililor și a vitezei de înot. În ceea ce privește comportamentul social, acesta nu a fost schimbat semnificativ în cazul nici unei concentrații.
- Creșterea concentrației mixturii la 600 $\mu\text{g/L}$ a avut un efect negativ asupra sociabilității juvenililor prin scăderea timpului petrecut în/lângă zona stimulului, respectiv a grupului său.
- Administrarea vitaminelor B₁, B₆, B₁₂ și C au demonstrat o influență pozitivă asupra peștilor zebra.
- Impactul fiecarei vitamine a fost studiat după administrare sau concomitent cu mixtura de insecticide determinându-se în acest mod relația ce se stabilește între factorul perturbator și cel protector.
- Prezența vit. B₁ în mediul cu FIP a indicat efecte opuse în funcție de concentrația vitaminei; o concentrație mai mică (0,2 mg/L) a susținut metabolismul peștilor împiedicând într-o mare proporție toxicitatea insecticidului, în timp ce, o concentrație mai mare (0,4 mg/L) a avut un efect pozitiv. Situația a fost similară și atunci când peștilor li s-a oferit doar vitamină.
- Alăturarea vit. B₆ și a mixturii de pesticide în mediul juvenililor a arătat o bună acțiune a vitaminei asupra activității locomotorii, aceștia fiind mult mai activi. Deopotrivă, sociabilitatea indivizilor din grupul cărui li s-a adăugat și vit. B₆ a fost semnificativ mai bună decât cea a grupului tratat doar cu FIP și PIR.
- Referitor la influența vit. B₁₂ după administrarea mixturii de insecticide nu a fost la fel de semnificativă asupra sociabilității ca în cazul vit. B₆. Mai mult decât atât, expunerea juvenililor doar la vitamină a determinat un comportament oscilant, în timp ce, în mixtura cu insecticide a favorizat acest tip de comportament.
- În cazul ultimei vitamine studiate s-a constatat acțiunea antioxidantă a acesteia prin îmbunătățirea performanțelor locomotorii și a sociabilității. Vit. C a acționat în mod pozitiv asupra metabolismului prin contrabalansarea activității ROS validată printr-un nivel ridicat al MDA.

BIBLIOGRAFIE SELECTIVĂ

- Albores-Garcia, D, Acosta-Saavedra, LC, Hernandez, AJ, Loera, MJ, Calderón-Aranda, ES, 2016 - Early Developmental Low-Dose Methylmercury Exposure Alters Learning and Memory in Periadolescent but Not Young Adult Rats. *BioMed Research International*, 2016: 6532108. doi.org/10.1155/2016/6532108
- American Psychological Association, APA, 2013 - *Diagnostic and statistical manual of mental disorders* (fifth). <https://doi.org/10.1176/appi.books.9780890425596>
- Arunachalam, M, Raja, M, Vijayakumar, C, Malaiammal, P, Mayden, R, 2013 - Natural History of Zebrafish (*Danio rerio*) in India. *Zebrafish*, 10: 1–14. doi.org/10.1089/zeb.2012.0803
- Bailey, JM, Oliveri, AN, Karbhari, N, Brooks, RAJ, De La Rocha, AJ, Janardhan, S, Levin, ED, 2016 - Persistent behavioral effects following early life exposure to retinoic acid or valproic acid in zebrafish. *Neurotoxicology*, 52: 23–33. doi.org/10.1016/j.neuro.2015.10.001
- Baronio, D, Puttonen, HAJ, Sundvik, M, Semenova, S, Lehtonen, E, Panula, P, 2018 - Embryonic exposure to valproic acid affects the histaminergic system and the social behaviour of adult zebrafish (*Danio rerio*). *British Journal of Pharmacology*, 175(5): 797–809. doi.org/10.1111/bph.14124
- Berntssen, MHG, Aatland, A, Handy, RD, 2003 - Chronic dietary mercury exposure causes oxidative stress, brain lesions, and altered behaviour in Atlantic salmon (*Salmo salar*) parr. *Aquatic Toxicology (Amsterdam, Netherlands)*, 65(1): 55–72. doi.org/10.1016/s0166-445x(03)00104-8
- Carratù, MR, Borracci, P, Coluccia, A, Giustino, A, Renna, G, Tomasini, MC, Raisi, E, Antonelli, T, Cuomo, V, Mazzoni, E, Ferraro, L, 2006 - Acute exposure to methylmercury at two developmental windows: focus on neurobehavioral and neurochemical effects in rat offspring. *Neuroscience*, 141(3): 1619–1629. doi.org/10.1016/j.neuroscience.2006.05.017
- Christinal, J, Sumathi, T, 2013 - Effect of Bacopa monniera extract on methylmercury-induced behavioral and histopathological changes in rats. *Biological Trace Element Research*, 155(1): 56–64. doi.org/10.1007/s12011-013-9756-y

- Çöp, E, Yurtbaşı, P, Öner, Ö, Münir, KM, 2015 - Genetic testing in children with autism spectrum disorders. *Anadolu Psikiyatri Dergisi*, 16(6): 426–432.
doi.org/10.5455/apd.1414607917
- Dai, Y-J, Jia, Y-F, Chen, N, Bian, W-P, Li, Q-K, Ma, Y-B, Chen, Y-L, Pei, D-S, 2014 - Zebrafish as a model system to study toxicology. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 33(1): 11–17. doi.org/10.1002/etc.2406
- Danylovyh, I, 2009 - Hydrogen peroxide inhibits acetylcholinesterase of myometrium sarcolemma. *The Ukrainean Biochemical Journal*, 81: 32–38.
- Davidson, MK, Lindsey, JR, Davis, JK, 1987 - Requirements and selection of an animal model. *Israel Journal of Medical Sciences*, 23(6): 551–555.
- Ellis, LD, Soanes, KH, 2012 - A larval zebrafish model of bipolar disorder as a screening platform for neuro-therapeutics. *Behavioural Brain Research*, 233(2): 450–457.
doi.org/10.1016/j.bbr.2012.05.043
- Evans, B, 2013 - How autism became autism: The radical transformation of a central concept of child development in Britain. *History of the Human Sciences*, 26(3): 3–31.
doi.org/10.1177/0952695113484320
- Fang, F, 2003 - Phylogenetic Analysis of the Asian Cyprinid Genus *Danio* (Teleostei, Cyprinidae). *Copeia*, 2003(4): 714–728. <http://www.jstor.org/stable/1448427>
- Gao, Q, Liu, Y-J, Guan, Z-Z, 2008 - Oxidative stress might be a mechanism connected with the decreased alpha 7 nicotinic receptor influenced by high-concentration of fluoride in SH-SY5Y neuroblastoma cells. *Toxicology in Vitro: An International Journal Published in Association with BIBRA*, 22(4): 837–843.
doi.org/10.1016/j.tiv.2007.12.017
- Held, JR, 1983 - Appropriate animal models. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 406: 13–19. doi.org/10.1111/j.1749-6632.1983.tb53481.x
- Kanner, L, 1943 - Autistic disturbances of affective contact. *Nervous Child*, 2: 217–250.
- Liu, H, Wu, J, Yao, J, Wang, H, Li, S, 2017 - The Role of Oxidative Stress in Decreased Acetylcholinesterase Activity at the Neuromuscular Junction of the Diaphragm during Sepsis. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2017: 9718615.
doi.org/10.1155/2017/9718615

- Liu, Xiaoxi, Takumi, T, 2014 - Genomic and genetic aspects of autism spectrum disorder. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 452(2): 244–253.
doi.org/10.1016/j.bbrc.2014.08.108
- Mora-Zamorano, FX, Klingler, R, Basu, N, Head, J, Murphy, CA, Binkowski, FP, Larson, JK, Carvan, MJ, 2017 - Developmental Methylmercury Exposure Affects Swimming Behavior and Foraging Efficiency of Yellow Perch (*Perca flavescens*) Larvae. *ACS Omega*, 2(8): 4870–4877. doi.org/10.1021/acsomega.7b00227
- Onaolapo, A.Y.; Onaolapo, OJ., 2017 - Global data on autism spectrum disorders prevalence: a review of facts, fallacies and limitations. *Universal Journal of Clinical Medicine*, 5: 14–23. doi.org/10.13189/ucjm.2017.050202
- Paletz, EM, Craig-Schmidt, MC, Newland, MC, 2006 - Gestational exposure to methylmercury and n-3 fatty acids: effects on high- and low-rate operant behavior in adulthood. *Neurotoxicology and Teratology*, 28(1): 59–73.
doi.org/10.1016/j.ntt.2005.11.003
- Patibandla, S, Zhang, Y, Tohari, AM, Gu, P, Reilly, J, Chen, Y, Shu, X, 2018 - Comparative analysis of the toxicity of gold nanoparticles in zebrafish. *Journal of Applied Toxicology : JAT*, 38(8): 1153–1161. doi.org/10.1002/jat.3628
- Reardon, AM, Bhat, HK, 2007 - Methylmercury neurotoxicity: Role of oxidative stress. *Toxicological & Environmental Chemistry*, 89(3): 535–554.
doi.org/10.1080/02772240701201158
- Rimland, B, 1964 - Infantile autism: The syndrome and its implications for a neural theory of behavior. *Infantile autism: The syndrome and its implications for a neural theory of behavior*. Appleton-Century-Crofts.
- Robea, M. A., Luca, AC, Ciobica, A, 2020 - Relationship between Vitamin Deficiencies and Co-Occurring Symptoms in Autism Spectrum Disorder. *Medicina (Kaunas, Lithuania)*, 56(5): 245. doi.org/10.3390/medicina56050245
- Robea, MA., Nicoara, M, Plavan, G, Ciobica, A, Strungaru, SA, 2017 - An overview on toxicological effects of pyrethroid insecticide deltamethrin. *Analele Stiintifice ale Universitatii „Alexandru Ioan Cuza” Din Iasi, s. Biologie Animala*, 63: 97–104.
- Robea, MA, Nicoara, M, Plavan, G, Strungaru, SA, Ciobica, A, 2018 - Pain perception in zebrafish (*Danio rerio*): possible relevance for human neuropsychiatric studies.

- Robea, MA, Jijie, R, Nicoara, M, Plavan, G, Ciobica, AS, Solcan, C, Audira, G, Hsiao, C-D, Strungaru, SA, 2020 - Vitamin C Attenuates Oxidative Stress and Behavioral Abnormalities Triggered by Fipronil and Pyriproxyfen Insecticide Chronic Exposure on Zebrafish Juvenile. *Antioxidants (Basel, Switzerland)*, 9(10).
doi.org/10.3390/antiox9100944
- Robea, MA, Nicoara, M, Plavan, G, Strugaru, S-A, Ciobica, A, 2018 - Fipronil: mechanisms of action on various organisms and future relevance for animal models studies. *Survey in Fisheries Sciences*, 5(1). doi.org/10.18331/SFS2018.5.1.3
- Sakamoto, M, Kakita, A, Wakabayashi, K, Takahashi, H, Nakano, A, Akagi, H, 2002 - Evaluation of changes in methylmercury accumulation in the developing rat brain and its effects: a study with consecutive and moderate dose exposure throughout gestation and lactation periods. *Brain Research*, 949(1): 51–59. doi.org/10.1016/S0006-8993(02)02964-5
- Santos, R, Ruiz de Almodóvar, C, Bulteau, A-L, Gomes, CM, 2013 - Neurodegeneration, Neurogenesis, and Oxidative Stress. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2013: 730581. doi.org/10.1155/2013/730581
- Schallreuter, KU, Elwary, SMA, Gibbons, NCJ, Rokos, H, Wood, JM, 2004 - Activation/deactivation of acetylcholinesterase by H₂O₂: more evidence for oxidative stress in vitiligo. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 315(2): 502–508. doi.org/10.1016/j.bbrc.2004.01.082
- Shams, S, Rihel, J, Ortiz, JG, Gerlai, R, 2018 - The zebrafish as a promising tool for modeling human brain disorders: A review based upon an IBNS Symposium. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 85: 176–190.
doi.org/10.1016/j.neubiorev.2017.09.002
- Singhania, R, 2005 - Autistic spectrum disorders. *Indian Journal of Pediatrics*, 72(4): 343–351. doi.org/10.1007/BF02724019
- Spence, R, Fatema, MK, Ellis, S, Ahmed, ZF, Smith, C, 2007 - Diet, growth and recruitment of wild zebrafish in Bangladesh. *Journal of Fish Biology*, 71(1): 304–309. doi.org/10.1111/j.1095-8649.2007.01492.x
- Stehr, CM, Linbo, TL, Incardona, JP, Scholz, NL, 2006 - The developmental neurotoxicity

- of fipronil: notochord degeneration and locomotor defects in zebrafish embryos and larvae. *Toxicological Sciences: An Official Journal of the Society of Toxicology*, 92(1): 270–278. doi.org/10.1093/toxsci/kfj185
- Strungaru, S-A, Plavan, G, Ciobica, A, Nicoara, M, Robea, MA, Solcan, C, Todirascu-Ciornea, E, Petrovici, A, 2018 - Acute exposure to gold induces fast changes in social behavior and oxidative stress of zebrafish (*Danio rerio*). *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*, 50: 249–256. doi.org/10.1016/j.jtemb.2018.07.013
- Strungaru, SA, Robea, MA, Plavan, G, Todirascu-Ciornea, E, Ciobica, A, Nicoara, M, 2018 - Acute exposure to methylmercury chloride induces fast changes in swimming performance, cognitive processes and oxidative stress of zebrafish (*Danio rerio*) as reference model for fish community. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*, 47: 115–123. doi.org/10.1016/j.jtemb.2018.01.019
- Strungaru, Stefan-Adrian, Plavan, G, Ciobica, A, Nicoara, M, Robea, MA, Solcan, C, Petrovici, A, 2019 - Toxicity and chronic effects of deltamethrin exposure on zebrafish (*Danio rerio*) as a reference model for freshwater fish community. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 171: 854–862. doi.org/https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2019.01.057
- Tedesco, S, Doyle, H, Redmond, G, Sheehan, D, 2008 - Gold nanoparticles and oxidative stress in *Mytilus edulis*. *Marine Environmental Research*, 66(1): 131–133. doi.org/10.1016/j.marenvres.2008.02.044
- Tedesco, Sara, Doyle, H, Blasco, J, Redmond, G, Sheehan, D, 2010 - Oxidative stress and toxicity of gold nanoparticles in *Mytilus edulis*. *Aquatic Toxicology*, 100(2): 178–186. doi.org/10.1016/j.aquatox.2010.03.001
- Tierney, KB, 2011 - Behavioural assessments of neurotoxic effects and neurodegeneration in zebrafish. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1812(3): 381–389. doi.org/10.1016/j.bbadis.2010.10.011
- Tsakiris, S, Angelogianni, P, Schulpis, KH, Stavridis, JC, 2000 - Protective effect of L-phenylalanine on rat brain acetylcholinesterase inhibition induced by free radicals. *Clinical Biochemistry*, 33(2): 103–106. doi.org/10.1016/s0009-9120(99)00090-9
- Wang, X, Martínez, MA, Wu, Q, Ares, I, Martínez-Larrañaga, MR, Anadón, A, Yuan, Z, 2016 - Fipronil insecticide toxicology: oxidative stress and metabolism. *Critical Reviews in Toxicology*, 46(10): 876–899. doi.org/10.1080/10408444.2016.1223014

- Weiss, B, Stern, S, Cox, C, Balys, M, 2005 - Perinatal and Lifetime Exposure to Methylmercury in the Mouse: Behavioral Effects. *NeuroToxicology*, 26(4): 675–690. doi.org/10.1016/j.neuro.2005.05.003
- Yee, S, Choi, BH, 1996 - Oxidative stress in neurotoxic effects of methylmercury poisoning. *Neurotoxicology*, 17(1): 17–26.
- Yu, X, Ye, Z, Houston, CM, Zecharia, AY, Ma, Y, Zhang, Z, Uygun, DS, Parker, S, Vyssotski, AL, Yustos, R, Franks, NP, Brickley, SG, Wisden, W, 2015 - Wakefulness Is Governed by GABA and Histamine Cotransmission. *Neuron*, 87(1): 164–178. doi.org/10.1016/j.neuron.2015.06.003.

ANEXE

Anexa 1 – Diseminarea rezultatelor

Articole publicate în reviste cotate ISI Web of Science cu factor de impact:

1. Strungaru, S.-A., **Robea, M. A.**, Plavan, G., Todirascu-Ciornea, E., Ciobica, A., Nicoara, M., 2018 – Acute exposure to methylmercury chloride induces fast changes in swimming performance, cognitive processes and oxidative stress of zebrafish (*Danio rerio*) as reference model for fish community, *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*, 47: 115-123, DOI 10.1016/j.jtemb.2018.01.019. (F.I.= 3, 245)
2. Strungaru, S.-A., Plavan, G., Ciobica, A., Nicoara, M., **Robea, M. A.**, Solcan, C., Todirascu-Ciornea, E., Petrovici, A., 2018 – Acute exposure to gold induces fast changes in social behavior and oxidative stress of zebrafish (*Danio rerio*), *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*, 50: 249 – 256. (F.I.= 3, 245)
3. Strungaru, S.-A., Plavan, G., Ciobica, A., Nicoara, M., **Robea, M. A.**, Solcan, C., Petrovici, A., 2019 – Toxicity and chronic effects of deltamethrin exposure on zebrafish (*Danio rerio*) as a reference model for freshwater fish community, *Ecotoxicologic Environmental Safety*, 171: 854-862. (F.I.= 4,872)
4. **Robea, M. A.**, Luca, A.-C., Ciobica, A., 2020 – Relationship between vitamin deficiencies and co-occurring symptoms in autism spectrum disorder, *Medicina*, 56(5): 245. (F.I.= 1,205)
5. **Robea, M. A.**, Jijie, R.; Nicoara, M.; Plavan, G.; Ciobica, A.S.; Solcan, C.; Audira, G.; Hsiao, C.-D.; Strungaru, S.-A.; 2020 – Vitamin C attenuates oxidative stress

and behavioral abnormalities triggered by fipronil and pyriproxyfen insecticide chronic exposure on zebrafish juveniles, *Antioxidants*, 9: 944. (F.I.= 5, 014)

Articole publicate în reviste indexate în Baza de Date Internațională (BDI):

1. **Robea, M. A.**, Nicoară, M., Plăvan, G., Ciobică, A., Strungaru, Ș.-A., 2017 – An overview on toxicological effects of pyrethroid insecticide deltamethrin, *Analele Științifice ale Universității „Alexandru Ioan Cuza” din Iași*, s. Biologie animală, 63: 97-104.

2. **Robea, M. A.**, Nicoara, M., Plavan, G., Strungaru, S.-A., Ciobica, A., 2018 – Fipronil: mechanisms of action on various organisms and future relevance for animal models studies, *Journal of Survey in Fisheries Sciences*, 5(1): 20-31.

Articole publicate în afara subiectului tezei de doctorat

1. Strungaru, Ș.-A., Angheluș, D. M., Nicoară, M., Plăvan, G., **Robea, M. A.**, Groban, C., Vlad, C.-E., 2017 – An overview on toxicological effects of the neonicotinoid insecticide imidacloprid, *Analele Științifice ale Universității „Alexandru Ioan Cuza” din Iași*, s. Biologie animală, 63: 91-96.

2. **Robea, M. A.**, Nicoara, M., Plavan, G., Strungaru, S.-A., Ciobica, A., 2018 – Pain perception in zebrafish (*Danio rerio*): possible relevance for human neuropsychiatric studies, *Bulletin of Integrative Psychiatry*, 3(78), ISSN 1453 – 7257.

3. **Robea, M. A.**, Strungaru, S.-A., Lenzi, C., Nicoara, M., Ciobica, A., 2018 – The importance of rotenone in generating neurological and psychiatric features in zebrafish - relevance for a Parkinson's disease model, *Annals Series on Biological Sciences*, 7(1): 59 - 67.

4. Petrovici, A., Strungaru, S.-A., Nicoara, M., **Robea, M.A.**, Solcan, C., Faggio, C., 2020 – Toxicity of deltamethrin to zebrafish gonads revealed by cellular biomarkers, *Journal of Marine Science and Engineering*, 8: 73. (F.I.= 2,033)

5. **Robea, M.A.**, Balmus, I-M., Ciobica, A., Strungaru, S.-A., Plavan, G., Gorgan, LD., Savuca, A., Nicoara, M., 2020 – Parkinson's Disease-Induced Zebrafish Models: Focussing on Oxidative Stress Implications and Sleep Processes, *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, DOI 10.1155/2020/1370837. (F.I.= 5,076)

Participări la simpozioane și conferințe naționale și internaționale

1. Madalina-Andreea Robea, Mircea Nicoara, Gabriel Plavan, Alin Ciobica, Stefan-Adrian Strungaru, TOXICOLOGICAL EFFECTS ON MODEL ORGANISMS CAUSED BY ADMINISTRATION OF INSECTICIDES DELTAMETHRIN AND IMIDACLOPRID, International Symposium, 12th Edition - Ecology and Protection of Ecosystems, 2-4 November 2017, "Vasile Alecsandri" University, Bacau, Romania. Poster

2. Madalina-Andreea Robea, Mircea Nicoara, Gabriel Plavan, Alin Ciobica, Stefan-Adrian Strungaru, TOXICOLOGICAL EFFECTS ON ORGANISMS AND ENVIRONMENT CAUSED BY ADMINISTRATIONS OF INSECTICIDES DELTAMETHRIN AND IMIDACLOPRID, "Mihai David" National Student Symposium, 8th Edition, 30 November-2 December 2017, "Ion Gugiuman" Research Station, Faculty of Geography and Geology, "Alexandru Ioan Cuza" University, Iasi-Rarau, Romania. Oral presentation

3. Madalina-Andreea Robea, Stefan-Adrian Strungaru, Carmen Solcan, Mircea Nicoara, Gabriel Plavan, Adriana Petrovici, CHRONIC EXPOSURE TO INSECTICIDE DELTAMETHRIN AFFECTS THE AGGRESSIVE BEHAVIOR OF ZEBRAFISH (*DANIO RERIO*), Scientific Symposium, 26th Edition, Deltas and Wetlands, 16-20 May 2018, Tulcea, Romania. Poster

4. Madalina-Andreea Robea, Gabriel Plavan, Stefan-Adrian Strungaru, Mircea Nicoara, Alin Ciobica, EVALUATION OF FIPRONIL POTENTIAL ON THE BEHAVIOR OF ZEBRAFISH (*DANIO RERIO*) AND HIS RELEVANCE TO AUTISM SPECTRUM DISORDER, International Congress on Biological and Medical Sciences, Nigde, Turkey, 31 October- 3 November 2018. Oral presentation

5. Madalina-Andreea Robea, Stefan-Adrian Strungaru, Mircea Nicoara, Gabriel Plavan, Alin Ciobica, FIPRONIL DISTURBS THE SOCIABILITY OF ZEBRAFISH (*DANIO RERIO*): FURTHER RELEVANCE FOR AUTISM SPECTRUM DISORDER IN DEVELOPMENT OF ANIMAL MODELS, 48th Meeting of the European Brain and Behaviour Society, Prague, Czech Republic, 21-24 September 2019. Poster

6. Madalina-Andreea Robea, Mircea Nicoară, Gabriel Plăvan, Ștefan-Adrian Strungaru, Alin Ciobica, IMPACTUL TOXICOLOGIC AL INSECTICIDULUI PIRIPROXIFEN ASUPRA ORGANISMELOR ȘI A MEDIULUI ÎNCONJURĂTOR,

Conferința Școlilor Doctorale din cadrul Universității „Alexandru Ioan Cuza” din Iași, online, 22-23 octombrie 2020. Prezentare orală.

7. Madalina-Andreea Robea, Alin Ciobica, Stefan-Adrian Strungaru, Gabriel Plavan, Mircea Nicoara, Carmen Solcan, THE EFFECT OF VITAMIN C ON SOCIABILITY IN A JUVENILE ZEBRAFISH PESTICIDE-INDUCED MODEL OF AUTISM SPECTRUM DISORDER, 29th European Congress of Psychiatry, online, 10-13 April 2021. Poster

Participări la simpozioane și conferințe naționale și internaționale în afara subiectului tezei de doctorat

1. Madalina-Andreea Robea, Alin Ciobica, THE POSSIBLE USAGE OF ZEBRAFISH MODELS IN IRRITABLE BOWEL SYNDROME AND ITS ASSOCIATED BEHAVIOURAL DISTURBANCES, 48th Meeting of the European Brain and Behaviour Society, Prague, Czech Republic, 21-24 September 2019. Poster

