

Universidade Federal De Minas Gerais
Instituto De Ciências Biológicas
Programa De Pós-Graduação Em Neurociências

Estudo sobre o papel da dopamina no desenvolvimento e no comportamento tipo-ansioso em larvas de Zebrafish (*Danio rerio*) utilizando teste de Labirinto em Cruz com Rampa adaptado para Larvas

Ana Cláudia Costa de Carvalho

Área de concentração: Neurociência Básica
Orientador: Prof. Dr. Bruno Rezende de Souza
Coorientador: Prof. Dr. André Walsh-Monteiro

Belo Horizonte – MG
Outubro 2020

Universidade Federal de Minas Gerais
Instituto de Ciências Biológicas
Programa de Pós-Graduação em Neurociências

Estudo sobre o papel da dopamina no desenvolvimento e no comportamento tipo-ansioso em larvas de Zebrafish (*Danio rerio*) utilizando teste de Labirinto em Cruz com Rampa adaptado para Larvas

Ana Cláudia Costa de Carvalho

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Neurociências do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Neurociências.

Área de concentração: Neurociência Básica
Orientador: Prof. Dr. Bruno Rezende de Souza
Coorientador: Prof. Dr. André Walsh-Monteiro

Belo Horizonte – MG
Outubro 2020

043 Carvalho, Ana Cláudia Costa de.

Estudo sobre o papel da dopamina no desenvolvimento e no comportamento tipo-ansioso em larvas de zebrafish (*Danio rerio*) utilizando teste de labirinto em cruz com rampa adaptado para larvas [manuscrito] / Ana Cláudia Costa de Carvalho. - 2020.

66 f. : il. ; 29,5 cm.

Orientador: Prof. Dr. Bruno Rezende de Souza. Coorientador: Prof. Dr. André Walsh-Monteiro.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Neurociências.

1. Neurociências. 2. Peixe-Zebra. 3. Modelos Animais. 4. Larva. 5. Transtornos de Ansiedade. 6. Dopamina. 7. Receptores Dopaminérgicos. I. Souza, Bruno Rezende de. II. Walsh-Monteiro, André. III. Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências Biológicas. IV. Título.

CDU: 612.8



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM NEUROCIÊNCIAS

ATA DA DEFESA DA DISSERTAÇÃO DA ALUNA

ANA CLÁUDIA COSTA DE CARVALHO

Realizou-se, no dia 22 de outubro de 2020, às 09:00 horas, Sala Virtual, da Universidade Federal de Minas Gerais, a defesa de dissertação, intitulada *Estudo sobre o papel da dopamina no desenvolvimento e no comportamento tipo-ansioso em larvas de Zebrafish (Danio rerio) utilizando o teste de Labirinto em Cruz com Rampa adaptado para Larvas*, apresentada por ANA CLÁUDIA COSTA DE CARVALHO, número de registro 2018713544, graduada no curso de LICENCIATURA EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS, como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre em NEUROCIÊNCIAS, à seguinte Comissão Examinadora: Prof(a). Bruno Rezende de Souza - Orientador (UFMG), Prof(a). Andre Luiz Viard Walsh Monteiro (IFPA), Prof(a). Amauri Gouveia Jr (UFPA), Prof(a). Ana Carolina Luchiarri (UFRN).

A Comissão considerou a dissertação: Aprovada

Finalizados os trabalhos, lavrei a presente ata que, lida e aprovada, vai assinada por mim e pelos membros da Comissão.

Belo Horizonte, 22 de outubro de 2020.

Assinatura dos membros da banca examinadora:

Carlos Magno Machado Dias - Secretário(a)

Prof(a). Bruno Rezende de Souza (Doutor)

Prof(a). Andre Luiz Viard Walsh Monteiro (Doutor)

Prof(a). Amauri Gouveia Jr (Doutor)

Prof(a). Ana Carolina Luchiarri (Doutora)



Documento assinado eletronicamente por **Ana Carolina Luchiarri, Usuário Externo**, em 23/10/2020, às 14:09, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Amauri Gouveia Junior, Usuário Externo**, em 27/10/2020, às 10:42, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).

05/11/2020

SEI/UFMG - 0325159 - Ata de defesa de Dissertação/Tese



Documento assinado eletronicamente por **Bruno Rezende de Souza, Membro de comissão**, em 28/10/2020, às 01:19, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **André Luiz Viard Walsh Monteiro, Usuário Externo**, em 03/11/2020, às 11:46, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.ufmg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **0325159** e o código CRC **F1513379**.

Referência: Processo nº 23072.235958/2020-23

SEI nº 0325159

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

This study was financed in part by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Finance Code 001.

Ana Cláudia Costa de Carvalho, Programa de Pós-Graduação em Neurociências,
Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte MG, Brasil.

Mail: anaclaudiac.carvalho@hotmail.com

Para meus pais.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente à minha mãe Cláudia Letícia, e irmãs Manuelle Carvalho e Flávia Carvalho por me apoiarem principalmente nos períodos que passei em Belo Horizonte.

À CAPES, que foi minha fonte de financiamento, e sem a bolsa eu não teria conseguido arcar com as despesas de deslocamento entre Belo Horizonte e Tucuruí, Pará.

Aos secretários, membros do colegiado e todas as pessoas do Programa de Pós Graduação em Neurociências, pelo acolhimento e disponibilidade sempre que precisei de orientação.

Aos membros do Núcleo de Neurociências, em especial ao grupo do professor Bruno: Beatriz Codo, Alcione Medeiros, Ana Luiza Lima, Laila Blac, Johnny Erick Costa, Muiara Moraes, Bruna Rezende, e Gisele Brunch, pela amizade, acolhimento no laboratório e pelas trocas de experiências, vocês contribuíram muito para meu crescimento profissional.

Aos alunos do Laboratório de Neuroquímica e Comportamento do IFPA Campus Tucuruí, em especial: Iara Macedo, Vanda Lourenço e Dariane Reis por todo apoio durante as reproduções, cuidados com as larvas e experimentos.

Aos funcionários de apoio do IFPA Campus Tucuruí pela colaboração, acolhimento e todo o café.

Ao meu orientador Bruno Rezende pela amizade, paciência, pelos ensinamentos e ter contribuído muito para que eu pudesse ter chegado até aqui.

Ao André Walsh, por ter me estimulado e prestado todo apoio emocional e profissional desde a seleção do mestrado até o final.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Desenho esquemático da reprodução, coleta de ovos e manejo das larvas.
- Figura 2.** Detalhes do Labirinto em Cruz com Rampa.
- Figura 3.** Desenho experimental testes de sensibilidade no LCR.
- Figura 4.** Desenho experimental ensaio farmacológico no LCR.
- Figura 5.** Testes de sensibilidade no teste de LCR em larvas de 5dpf expostas a diferentes alturas de coluna d'água e tempo de sessão teste. A) tempo gasto nos compartimentos; B) número de entradas nos braços.
- Figura 6.** Testes de sensibilidade no teste de LCR em larvas de 14dpf expostas a alturas de coluna d'água e tempo de sessão teste. A) tempo gasto nos compartimentos; B) número de entradas nos braços.
- Figura 7.** Testes de sensibilidade no teste de LCR em larvas de 21dpf expostas a diferentes alturas de coluna d'água e tempo de sessão teste. A) tempo gasto nos compartimentos; B) número de entradas nos braços.
- Figura 8.** Larvas de 5dpf expostas às doses agudas de álcool testadas no LCR. A) tempo gasto nos compartimentos; B) número de entradas nos braços.
- Figura 9.** Larvas de 10dpf expostas às doses agudas de álcool testadas no LCR. A) tempo gasto nos compartimentos; B) número de entradas nos braços.
- Figura 10.** Larvas de 14dpf expostas às doses agudas de álcool testadas no LCR. A) tempo gasto nos compartimentos; B) número de entradas nos braços.
- Figura 11.** Larvas de 5dpf expostas às doses agudas de clonazepam testadas no LCR. A) tempo gasto nos compartimentos; B) número de entradas nos braços.
- Figura 12.** Larvas de 10dpf expostas às doses agudas de clonazepam testadas no LCR. A) tempo gasto nos compartimentos; B) número de entradas nos braços.
- Figura 13.** Larvas de 14dpf expostas às doses agudas de clonazepam testadas no LCR. A) tempo gasto nos compartimentos; B) número de entradas nos braços.
- Figura 14.** Desenho experimental exposições farmacológicas agudas de agonistas e teste no LCR.
- Figura 15.** Desenho experimental exposição crônica de dopamina e teste no LCR.

Figura 16. Exposições agudas de dopamina e agonistas em larvas de 5dpf testadas no LCR. A) tempo de permanência nos compartimentos; B) número de entradas.

Figura 17. Exposições agudas de dopamina e agonistas em larvas de 10dpf testadas no LCR. A) tempo de permanência nos compartimentos; B) número de entradas.

Figura 18. Exposições agudas de dopamina e agonistas em larvas de 14dpf testadas no LCR. A) tempo de permanência nos compartimentos; B) número de entradas.

Figura 19. Larvas de 5dpf que passaram pela exposição crônica de dopamina durante a janela de desenvolvimento do 3 ao 5dpf expostas ao teste de LCR: A) tempo de permanência nos compartimentos; B) número de entradas nos braços.

Figura 20. Larvas de 10dpf que passaram pela exposição crônica de dopamina durante a janela de desenvolvimento do 3 ao 5dpf expostas ao teste de LCR: A) tempo de permanência nos compartimentos; B) número de entradas nos braços.

Figura 21. Larvas de 14dpf que passaram pela exposição crônica de dopamina durante a janela de desenvolvimento do 3 ao 5dpf expostas ao teste de LCR: A) tempo de permanência nos compartimentos; B) número de entradas nos braços.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Grupos experimentais para estudo da sensibilidade de larvas com 5, 14 e 21 dias pós fertilização, cada grupo composto por N=25.

Tabela 2. Fármacos e doses utilizados para as idades 5, 10 e 14dpf (cada dose representa um grupo N=25 para cada idade).

SUMÁRIO

Resumo.....	11
Abstract.....	12
Apresentação.....	13
Capítulo 1. Adaptação do protocolo do teste de Labirinto em Cruz com Rampa para análise da ontogenia do comportamento tipo ansioso em larvas de Zebrafish (<i>Danio rerio</i>).....	14
1. Introdução.....	15
2. Materiais e Métodos.....	18
2.1 Manejo dos animais e reprodução.....	18
2.2 Adaptação do Aparato.....	19
2.3 Condições experimentais.....	20
2.4 Sensibilidade do LCR.....	21
2.5 Investigação ontogenética do comportamento tipo-ansioso na larva de zebrafish.....	22
2.6 Ensaio farmacológico.....	23
2.7 Análise estatística.....	24
3. Resultados.....	25
3.1 Sensibilidade do teste LCR para larvas de zebrafish.....	25
3.2 Validação farmacológica do LCR.....	28
3.2.1 Álcool.....	28
3.2.2 Clonazepam.....	31
4. Discussão.....	35
5. Conclusões.....	38
Capítulo 2. Desequilíbrio dopaminérgico na janela de desenvolvimento de 3dpf à 5dpf alteram o comportamento tipo-ansioso em larvas de zebrafish (<i>Danio rerio</i>).....	39
1. Introdução.....	40
2. Materiais e Métodos.....	42
2.1 Cuidados gerais com os animais e reprodução.....	42
2.2 Cuidado com as larvas.....	42
2.3 Grupos experimentais.....	42

2.4	Exposições farmacológicas Agudas.....	42
2.5	Exposição farmacológica Crônica.....	43
2.6	Labirinto em Cruz com Rampa.....	43
2.7	Comportamento tipo-ansioso e atividade motora.....	43
2.8	Condições experimentais.....	43
2.9	Análise dos vídeos.....	44
2.10	Análise estatística.....	44
3.	Resultados.....	45
3.1	Exposições Agudas e Dopamina e Agonistas.....	45
3.2	Exposição Crônica de Dopamina.....	47
4.	Discussão.....	51
4.1	Exposições Agudas de Dopamina e Agonistas.....	51
4.2	Exposição Crônica de Dopamina.....	53
5.	Conclusões.....	56
	Referências.....	57

RESUMO

O uso de animais modelos na pesquisa comportamental vem crescendo cada vez mais. A utilização desses animais tornou-se com o passar dos anos mais diversificada, em comparação ao começo, quando apenas roedores ou primatas eram utilizados para pesquisa. Devido aos avanços em estudos genéticos, pôde ser possível o conhecimento de outras espécies compatíveis a nível molecular, genético e fisiológico com a espécie humana. Com base nisso, o Zebrafish (*Danio rerio*), um pequeno peixe teleosteo nativo dos campos de arroz da Índia, mostrou ser um animal não-mamífero com grande potencial para estudo dentro do campo das ciências biológicas. Nas neurociências, a utilização do Zebrafish contribui para estudos sobre o comportamento, devido seus padrões comportamentais que se assemelham a comportamentos humanos, o que faz dessa espécie uma das mais utilizadas para estudos que buscam entender transtornos psiquiátricos. Neste trabalho, estudamos o comportamento tipo-ansiedade em Zebrafish em fase larval, com intuito de entender possíveis fatores no desenvolvimento que contribuem para manifestações anormais desse comportamento em etapas mais tardias da vida. No estudo 1, adaptamos para larvas um aparato experimental que originalmente avalia comportamento tipo-ansiedade em Zebrafish adulto, o Labirinto em Cruz com Rampa, as etapas de validação desse protocolo para larvas foram divididas em testes de sensibilidade, onde avaliamos o perfil de resposta das larvas em diferentes colunas d'água e tempo de sessão teste, e efeito de drogas. Os resultados revelaram sensibilidade ao aparato para a altura de coluna d'água em 1,5cm e 5 minutos de sessão, e os resultados farmacológicos indicam que as larvas são sensíveis a substâncias ansiolíticas e ansiogênicas. No estudo 2, buscamos compreender se distúrbios no comportamento, como transtorno de ansiedade, possuem relação com a participação da sinalização dopaminérgica durante a gênese cerebral e sua relação com essas alterações comportamentais ao longo da vida. Sabemos que a dopamina desempenha diversas funções fisiológicas e comportamentais, como atividade motora, tomada de decisões, entre outros. Porém, os mecanismos que estão envolvido durante a modulação do neurodesenvolvimento desse neurotransmissor são pouco conhecidos, para isso utilizamos larvas de zebrafish como modelo para investigar o papel de receptores dopaminérgicos no desenvolvimento do comportamento tipo-ansiedade. Nossos resultados revelaram que o aumento de dopamina durante a janela de desenvolvimento do 3-5dpf apresentou alterações na atividade motora e aumento do comportamento tipo ansiedade em larvas expostas ao Labirinto em Cruz com Rampa, resultados também observados nas exposições agudas de agonistas D1 e D2.

Palavras-chaves: Zebrafish, modelo animal, larvas, ansiedade, labirinto em cruz, dopamina, receptores dopaminérgicos.

ABSTRACT

The use of model animals in behavioral research is increasing. The use of these animals has become more diverse over the years compared to the beginning when only rodents or primates were used for research. Due to the advances in genetic studies, it has been possible to get to know other species compatible at the molecular, genetic and physiological level with the human species. Based on this, the Zebrafish (*Danio rerio*), a small teleost fish native to the rice fields of India, proved to be a non-mammalian animal with great potential for study within the field of biological sciences. In neurosciences, the use of Zebrafish contributes to studies about behavior, due to its behavioral patterns that resemble human behaviors, which makes this species one of the most used for studies that aim to understand the psychiatric disorders. In this research, we studied the anxiety-like behavior in the larval stage in Zebrafish, in order to understand possible factors in development that contribute to abnormal manifestations of this behavior in later stages of life. In study 1, we adapted an experimental apparatus for larvae that originally assesses anxiety-like behavior in an adult Zebrafish which is called the plus maze with Ramp. The validation steps of this protocol for larvae were divided into sensitivity tests, where we evaluated the response profile of larvae in different water columns and test session time, and effect of drugs. The results showed sensitivity to the apparatus for the height of the water column in 1.5 cm and 5 minutes of session, and the pharmacological results indicate that the larvae are sensitive to anxiolytic and anxiogenic substances. In study 2, we aimed to understand if behavioral disorders, such as anxiety disorder, are related to the participation of dopaminergic signaling during brain genesis and its relationship to these behavioral changes throughout life. We know that dopamine performs several physiological and behavioral functions, such as motor activity, decision making, among others. However, the mechanisms that are involved during the modulation of this neurotransmitter's neurodevelopment are hardly known for this we use zebrafish larvae as a model to investigate the role of dopaminergic receptors in the development of anxiety-like behavior. Our results revealed that the increase in dopamine during the 3-5 dpf development window showed changes in motor activity and increased anxiety-like behavior in larvae exposed to the Maze in Cruz with Ramp, results also observed in the acute exposures of D1 and D2 agonists.

Keywords: Zebrafish, animal model, larvae, anxiety, plus maze, dopamine, dopaminergic receptors.

Apresentação

Em neurociências, modelos experimentais em animais para estudar transtornos psiquiátricos, têm aplicação com sucesso em animais mamíferos, como primatas e roedores (Agmo et al, 1997; Ribeiro & De Lima, 1998; Roth & Dicke, 2012). Por muito tempo, ratos e camundongos foram os mais utilizados na pesquisa por apresentarem, depois dos outros primatas, maior homologia com a espécie humana (Baumans, 2007), além de vantagens quanto a manipulação, baixo custo, rápida reprodução, etc. (Baumans, 2007; Kaliste & Mering, 2007).

Entretanto, com o passar dos anos, diversos outros modelos animais foram inseridos em laboratório, e entre os modelos animais mais utilizados nas últimas décadas, destaca-se o uso do Zebrafish (*Danio rerio*), um pequeno peixe teleosteo nativo dos campos de arroz da Índia (Howe et al., 2013).

O zebrafish possui elevada homologia molecular com humanos além de analogias embrionárias, morfológicas e fisiológicas (Howe et al., 2013; Kaslin & Panula, 2001) que fortalecem seu uso como modelo experimental translacional em diversas áreas de pesquisa, incluindo a Neurociência (Meshalkina et al., 2017). Além disso, a infraestrutura necessária e os custos de manutenção do biotério de zebrafish são bastante reduzidos se comparados aos modelos roedores tradicionais (Kalueff et al., 2014). Por isso, o Zebrafish vem se tornando um organismo modelo popular em pesquisas de farmacogenética e neurofarmacologia (de Abreu et al., 2019). Tanto a larva do Zebrafish (Souza et al., 2011) quanto o peixe adulto (Maximino et al., 2011) são usados atualmente para aumentar nossa compreensão da função cerebral, sua disfunção, sua modulação genética e comportamento.

O presente trabalho foi dividido em dois capítulos: no primeiro desenvolvemos um aparato para teste de comportamento tipo-ansioso e investigamos a ontogenia do comportamento tipo-ansioso em larvas de zebrafish; e no segundo pesquisamos as consequências da alteração na sinalização dopaminérgica do 3º ao 5º dia pós-fertilização (dpf) no comportamento tipo-ansioso de larvas de zebrafish.

Capítulo 1:

Adaptação do protocolo do teste de Labirinto em Cruz com Rampa para análise da ontogenia do comportamento tipo-ansioso em larvas de Zebrafish (*Danio rerio*)

1. Introdução

A ansiedade é um mecanismo fisiológico que possui um fator emocional como componente, e é essencial para o funcionamento do nosso corpo, por exemplo, prepara o organismo para se proteger, lutar ou fugir precedente a uma situação de risco (Giacobbe & Flint, 2018). Com base em estudos epidemiológicos, transtornos de ansiedade estão entre os transtornos mentais mais prevalentes em uma população (Orešković, 2016).

Associados a outras comorbidades, estes podem anteceder o início de outros transtornos psiquiátricos, como a depressão (Stein et al., 2017) e doenças pré-existentes como o câncer (Curran & Butow, 2017). Tendo em vista a alta prevalência desses transtornos, diversas áreas de pesquisa como neurociência (LeDoux & Pine, 2016; Stubbs et al., 2017), farmacologia (Zwanzger 2016), genética (Meier & Deckert, 2019), etc., visam o desenvolvimento de tratamentos farmacológicos e não-farmacológicos afim de melhorar a qualidade de vida dos pacientes.

Até o momento, modelos animais desempenharam um papel essencial na pesquisa (Anisman & Matheson, 2005), entre eles, o Zebrafish (*Danio rerio*), cada vez mais utilizado como modelo animal para o estudo de transtornos mentais. Sua homologia é semelhante a espécie humana em aproximadamente 70% do genoma (Howes, 2013), e seu sistema nervoso e suas conexões neurais são bem estabelecidas (Kalueff et al., 2014). O comportamento semelhante à ansiedade nesta espécie pode ser observado quando o animal é exposto a novidade, drogas ansiogênicas, ou lugares mais expostos (Blaser et al., 2010).

Outros parâmetros comportamentais caracterizam o comportamento tipo-ansioso em zebrafish, para isso, é essencial o uso de testes para mensurar este comportamento. Na literatura encontramos o teste de campo aberto, que avalia o comportamento exploratório do animal em um ambiente novo (Ahmand & Richardson, 2012; Stewart et al., 2012), outro teste verifica a preferência por ambientes mais claros ou escuros, como o teste de claro-escuro (Maximino et al., 2011), e a preferência inicial pelo fundo em um ambiente, como indicativo de comportamento tipo-ansiedade no teste de tanque novo (Haghani et al., 2019). Essas evidências representam a adequação desta espécie para modelar vários aspectos aos estudos relacionados à ansiedade, assim como também o efeito de drogas ansiolíticas e ansiogênicas.

Neste estudo utilizamos o Zebrafish em fase larval, considerando seu crescimento dentro da pesquisa neurocomportamental (Basnet et al., 2019). O ciclo de vida curto do zebrafish é uma das vantagens para estudo do desenvolvimento: período embrionário que dura 72 horas pós fertilização dos ovos (hpf), larvas juvenis já a partir dos 30 dias pós fertilização (dpf), e o início da fase adulta já observada aos 90 dpf (Kimmel et al., 1995).

Parâmetros no comportamento motor em larvas são observados desde o período embrionário (Souza et al., 2011), iniciam-se aproximadamente 17hpf via transmissão sináptica *gap junction* através de movimentos de cauda, e se tornam mais perceptíveis no decorrer do desenvolvimento das larvas (Saint-Amant & Drapeau, 2000). Sendo assim, estudos comportamentais envolvendo larvas levam em consideração as alterações motoras ainda nos estágios iniciais e a influência dessas alterações em outros comportamentos.

Em um estudo recente, Walsh-Monteiro e colaboradores (2016) desenvolveram um novo aparato para o estudo de comportamento tipo-ansioso em Zebrafish adulto, o labirinto em cruz com rampa (LCR). O LCR consiste em um aquário em forma de cruz que representa uma ferramenta de investigação análoga ao Labirinto em Cruz Elevado (LCE) para roedores. O LCR apresenta os mesmos paradigmas etológicos investigados em roedores, como a preferência por lugares fechados e seguros de predadores, assim evitando locais onde ficam mais expostos (Walsh-Monteiro et al., 2016; Bourin, 2019; Varga et al., 2018).

Neste estudo, adotamos os critérios sugeridos por Willner (1991) para validação do protocolo de LCR para as larvas, sendo eles: valor de face, valor preditivo e valor de construto. O valor de face está relacionado ao nível de semelhança entre o que se propôs e a realidade, ou seja, se as larvas expostas ao aparato irão manifestar um comportamento semelhante ao que manifestariam em um ambiente natural quando mais expostas.

O valor preditivo indica a capacidade de se prever aquilo que se espera simular, por exemplo, quando expostas a uma substância que altere o comportamento, essas larvas podem manifestar um estado mais desinibido ou ansiogênico, dependendo da droga. Já o valor de construto indica se o modelo proposto faz referência àquilo que se estuda, se o modelo apresentado representa então validade para estudos relacionados ao comportamento tipo-ansiedade e bases neurais, assim como o desenvolvimento de novos tratamentos com base nos resultados obtidos no aparato proposto.

Deste modo, levando em consideração à disponibilidade de técnicas de triagem e eficiência de recursos e imagens de alta resolução para larvas (Vargas et al., 2018), o objetivo deste estudo é adaptar o protocolo do LCR para larvas de zebrafish, podendo assim investigar possíveis fatores do desenvolvimento que acrescentem na formação de um transtorno tipo ansiedade, além de verificar o efeito da exposição de doses agudas de Álcool e Clonazepam sobre o comportamento tipo-ansiedade.

2. Materiais e Métodos

2.1 Manejo dos animais e reprodução

Zebrafish adultos foram usados apenas como matrizes reprodutoras adquiridos no biotério do Laboratório de Neuroquímica e Comportamento do Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Pará - Campus Tucuruí.

No biotério do laboratório, os animais foram acomodados em aquários viveiros de 50L. O sistema de aeração e de filtração foi constante com compressores de ar (S-2000A Boyu) acoplados a filtros biológicos. A sala foi mantida em temperatura de $26 \pm 3^\circ\text{C}$, o ciclo de luz nesta sala é controlado automaticamente por um interruptor horário (Altronic-Torn - modelo PDS02) e fornece 14 horas de luz e 10 horas de escuro, buscando simular uma iluminação similar ao ambiente natural desses animais. Os parâmetros da água foram: temperatura $27 \pm 1^\circ\text{C}$; pH $7 \pm 0,2$, livre de cloro (Kit Teste pH e cloro, HTH) e com níveis desprezíveis de amônia e nitrito (Kit Nitrito Labcon Test, Labcon), sendo estes dois últimos verificados a cada 48h. Todos esses parâmetros foram monitorados diariamente buscando diminuir ao máximo qualquer estresse aos peixes.

A alimentação aconteceu duas vezes ao dia (manhã e tarde) com ração floculada. Uma hora após a última alimentação do dia, que ocorre no final do período vespertino, são selecionados uma fêmea e dois machos para a reprodução. Esses foram transferidos por uma rede de coleta para os aquários de reprodução, que possui um fundo falso com pequenas aberturas por onde os ovos passam e permanecem ao fundo, o aquário de reprodução possui um volume final de um litro. Os peixes então foram deixados neste aquário em um lugar mais reservado do biotério, sem qualquer tipo de movimento, até a manhã seguinte, quando ovos fertilizados foram coletados (Figura 1).

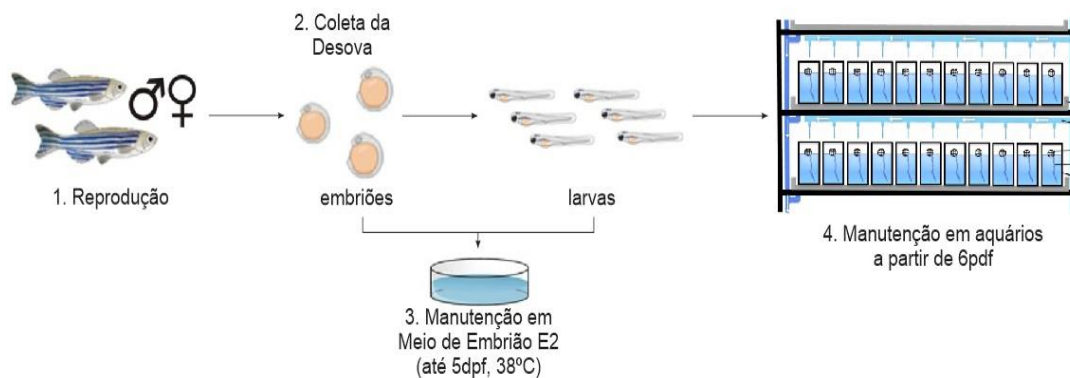


Figura 1. Desenho esquemático da reprodução, coleta de ovos e manejo das larvas de zebrafish.

Na coleta dos ovos, os peixes foram cuidadosamente retirados do aquário de reprodução e devolvidos a seus aquários de origem, e a água do aquário de reprodução foi vertida em um coador com poros finos, onde os ovos ficaram retidos. Logo após, esses ovos foram lavados com o auxílio de uma pisseta com água do sistema para remover qualquer sujeira aderida ao córion dos embriões. Logo em seguida, os ovos foram transferidos para uma Placa de Petri (100mm-24ml), em uma densidade de 60 ovos por placa, na qual possui meio de embrião E2 (15mM NaCl, 0.5mM KCL, 0.49mM MgSO₄.H₂O, 0.15mM KH₂PO₄, 0.042mM Na₂PO₄, 0.1mM CaCl₂ e 0.07mM NaHCO₃, pH 7± 0,5) (Figura 1). Esse meio é necessário, pois os sais que fazem parte da sua composição garantem um bom desenvolvimento dos embriões e mantém o meio tamponado.

As Placas de Petri foram mantidas em uma temperatura de 28°C, com o mesmo fotoperíodo que as matrizes (14 horas claro, 10 horas escuro) controlado por um interruptor horário. O meio E2 foi trocado diariamente sempre verificando se o mesmo precisa ter o pH corrigido para 7±0,5 caso seja necessário; embriões não viáveis, opacos, que não foram fertilizados, córions eclodidos, e qualquer outros detritos foram removidos.

As larvas foram mantidas nessas Placas até o 7dpf, mesmo após a eclosão das mesmas por volta do 3dpf. A partir do 7dpf, as larvas começaram a serem alimentadas com alimentos vivos (paramécio, rotífera) e ração rica em proteína. Antes disso, as larvas se mantiveram através da metabolização de seu próprio vitelo (Kimmel et al., 1995). A ração para larvas rica em proteína (Sera Micron) foi administrada duas vezes ao dia, uma vez no período da manhã e uma vez no período da tarde até o 14dpf juntamente com o alimento vivo, exceto para larvas um dia antes e no dia dos seus experimentos.

Os experimentos foram aprovados pelo comitê de ética da UFMG (16/2019).

2.2 Adaptação do Aparato

O LCR é um aparato experimental descrito por Walsh-Monteiro e colaboradores em 2016 para Zebrafish adultos, que representa uma adaptação do labirinto em cruz elevado de roedores (Pellow & File, 1986; Handley & Mithiani, 1984) e do mergulho

vertical em tanque novo para peixes (Gerlai, 2010). Neste trabalho, foi feita a adaptação para larvas de zebrafish utilizando as mesmas referências estruturais do labirinto e as medidas espaciais do aquário claro-escuro para larvas aplicadas em nosso laboratório.

Desta maneira, o LCR para larvas possui 7,5cm de comprimento e 2,5cm de largura e também 2,5cm de altura. Cada braço possui 2,5cm de comprimento, resultando em quatro braços de 2,5x2,5cm, o valor de angulação da rampa nos braços é de $18,66^\circ$, e uma área central com a mesma medida que os braços (Figura 1). Dois braços opostos entre si possuem rampas que ascenderam do início do braço (mais próximo à área central) até seu fundo, a uma altura final de 1 cm. Além disso, todo o aparato foi pintado com uma tinta branca atóxica.

Sendo assim, o aparato conta com dois braços com rampa, dois braços planos e uma área central. O teste inicia com a inserção do indivíduo na área central do labirinto.

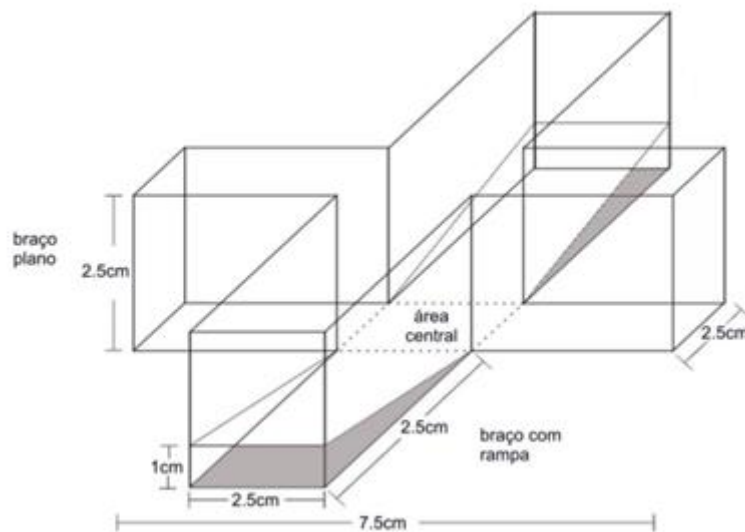


Figura 2. Detalhes do Labirinto em Cruz com Rampa

2.3 Condições Experimentais

Todos os experimentos foram realizados pela manhã em um ambiente com baixo ruído, levando em consideração a maior atividade da espécie no período matutino (MacPhail et al., 2009). Os aquários possuíam o fundo e paredes pintadas de branco fosco, evitando assim reflexos na água, e as larvas eram cuidadosamente colocadas no centro de

cada aparato. Após os testes, a água de cada aquário-teste foi trocada, a fim de evitar que a presença de possíveis substâncias sinalizadoras estressoras pudessem vir a influenciar o animal seguinte a ser testado (Brito, 2011).

No caso das transposições ou entradas dos animais em áreas distintas dos aquários teste, foi considerada a passagem para o outro compartimento quando 2/3 do corpo do animal estivesse neste outro ambiente, essa atividade locomotora foi avaliada pelo número de entradas dos indivíduos nos braços planos e braços com rampa. Já para o comportamento semelhante a ansiedade, mediu-se o tempo total nos compartimentos (braços planos, braços com rampa e área central).

Todos os testes foram registrados em alta definição por filmadoras digitais (DCRSR45, Sony e GZ-EX210, JVC) para em seguida serem analisados através do software livre X-Plo-Rat versão 0.3.3 (FFCLRP-USP). Todas as análises foram realizadas por pesquisador treinado. Após a análise das variáveis, os dados obtidos foram transcritos para planilhas do software Excel 2007 (Microsoft Office 2007, Microsoft, EUA), considerando os milésimos de segundos nas variáveis referentes à medida de tempo. Foram utilizadas 25 larvas de zebrafish por grupo experimental.

2.4 Sensibilidade do LCR

Considerando que o objetivo da adaptação do LCR é estabelecer um protocolo para larvas que seja equivalente ao protocolo feito com peixes adultos e com roedores, foram realizados testes de identificação de equivalências utilizando as variáveis: altura da coluna d'água (1,1cm – 1,2cm – 1,5cm), que vai influenciar diretamente na altura da água nas bordas da rampa (mais rasa ou mais profunda); e tempo de teste por sessão (5 min – 10 min – 15 min), para avaliar o tempo mínimo análise comportamental (Tabela 1) (Figura 3).

Tabela 1. Grupos experimentais para estudo da sensibilidade de larvas com 5, 14 e 21 dias pós fertilização, cada grupo composto por N=25.

Coluna d'água	Tempo de Sessão	Grupo Experimental
----------------------	------------------------	---------------------------

1,1 cm	15 minutos	1,1-5dpf
	<hr/>	
	15 minutos	1,1-14dpf
<hr/>		
1,1 cm	15 minutos	1,1-21dpf
	<hr/>	
	<hr/>	
1,2 cm	15 minutos	1,2-5dpf
	<hr/>	
	15 minutos	1,2-14dpf
<hr/>		
1,2 cm	15 minutos	1,2-21dpf
	<hr/>	
	<hr/>	
1,5 cm	15 minutos	1,5-5dpf
	<hr/>	
	15 minutos	1,5-14dpf
<hr/>		
1,5 cm	15 minutos	1,5-21dpf
	<hr/>	
	<hr/>	

2.5 Investigação ontogenética do comportamento tipo-ansioso na larva de zebrafish

Para investigar qual em qual idade emerge a manifestação do comportamento tipo-ansioso em zebrafish em fase larval, testamos larvas em três idades diferentes: 5dpf, 14dpf, 21dpf. Cada idade foi testada nos parâmetros acima citados em 2.4. (Figura 3).

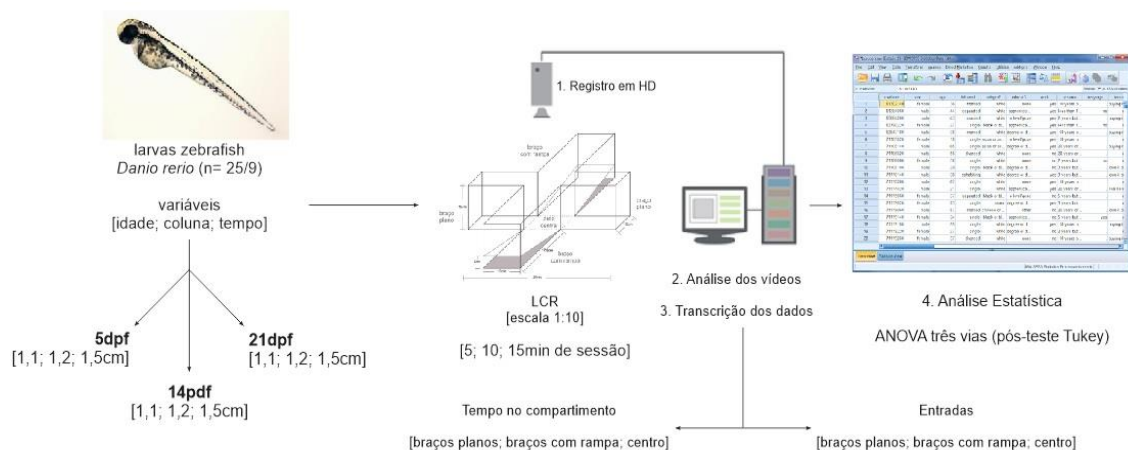


Figura 3. Desenho experimental testes de sensibilidade no LCR.

2.6 Ensaio Farmacológico

Após a identificação do tempo de sessão e da altura da coluna d'água ideal para avaliar o comportamento tipo-ansioso no LCR, fizemos a validação farmacológica através da exposição de fármacos ansiolíticos. Antes dos testes, as larvas foram expostas de forma aguda a fármacos com diferentes variações de concentração por via hídrica (Magno et al., 2015). Os fármacos utilizados (Tabela 2) foram escolhidos com base nos mesmos utilizados por Walsh-Monteiro e colaboradores (2016) (álcool e clonazepam), (Álcool etílico absoluto, Sigma-Aldrich, Brasil; Rivotril, Roche, Brasil).

Os fármacos foram diluídos em água filtrada e pré-tratada no laboratório, com os mesmos parâmetros da água do sistema para uso nos aquários do biotério. Após a diluição, as larvas foram expostas à 100ml dessa solução em um béquer de vidro de 500ml por cinco minutos, considerando que durante as filmagens, 6 aparatos eram filmados de uma vez, foram colocadas 6 larvas expostas as soluções em cada béquer, logo depois, imediatamente cada uma foi colocada com o auxílio de uma Pipeta Pasteur no centro de cada labirinto, quando iniciou-se o teste (Figura 4).

Tabela 2. Fármacos e doses utilizados para as idades 5, 10 e 14dpf (cada dose representa um grupo N=25 para cada idade).

Fármaco	Efeito	Dose(s)
Álcool	Depressor SNC	0,5%; 1%; 2%
Clonazepam	Ansiolítico	0,003mg; 0,006mg

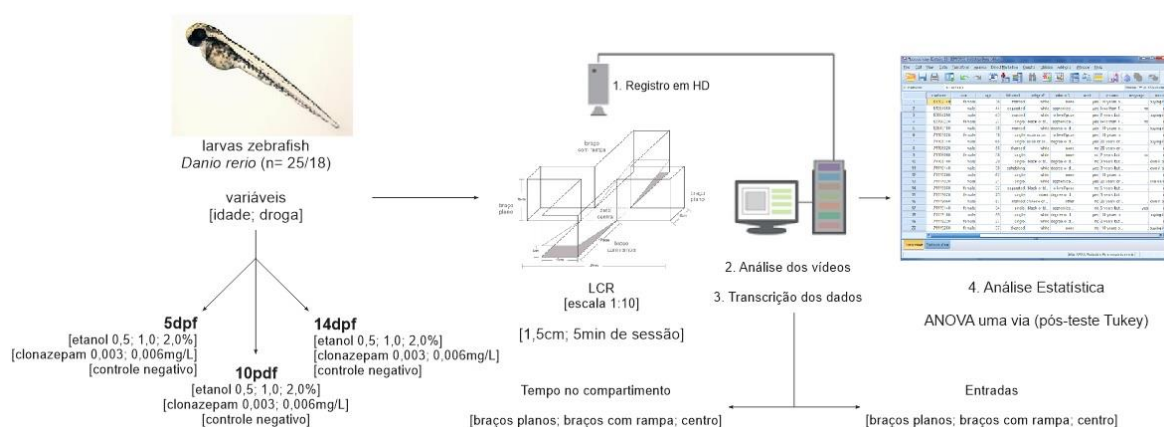


Figura 4. Desenho experimental ensaio farmacológico no LCR.

2.7 Análise estatística

Para a análise estatística foi utilizado o software Sigma Plot 12.5. Inicialmente foram obtidos dados de média aritmética e erro padrão, como valores de referência. O passo seguinte foi a determinação do perfil de normalidade das amostras através do teste de Shapiro-Wilk. De acordo com as variáveis analisadas e o resultado do teste de normalidade, foram utilizados os testes: Anova two way; Kruskal-Wallis; Anova de três vias; Kruskal-Wallis; t de Student ou Mann-Whitney. Foi aplicado como pós-teste o teste Tukey Para os testes estatísticos, foi admitido um nível de confiabilidade de 95% ou valor de $p \leq 0,05$.

3. Resultados

3.1 Sensibilidade do teste LCR para larvas de zebrafish

O estudo da sensibilidade ao aparato, considerando como variáveis a altura da coluna d'água e o tempo de sessão revelou diferenças, principalmente para a avaliação do tempo de permanência nos braços planos ou com rampa.

A análise da interação entre idade, coluna d'água e tempo de sessão revelou diferenças estatísticas para a medida de tempo nos braços planos [F(26,648)= 2.056; p=0,038]. A análise pós-teste mostrou diferenças para os animais expostos às três alturas de coluna d'água por 5min de sessão, entre os grupos: 5 dpfx 14dpf (p=0,017) (Figura 5A e 6A). Quando a altura foi de 1,2cm, também em 5min, as diferenças foram entre 5 x 21dpf (p=0,025) (Figura 5A e 7A). Na altura de 1,5cm, também houve diferenças entre: 5 x 21 (p=0,017), e 14 x 21dpf (p=0,05) (Figura 5A e 7A).

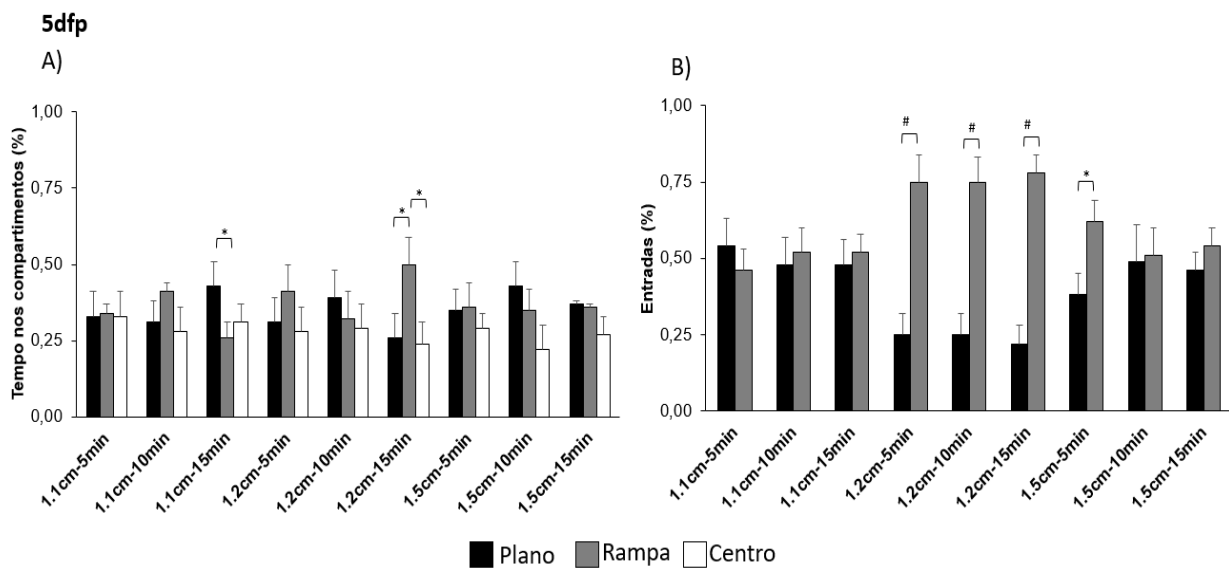


Figura 5. Testes de sensibilidade no teste de LCR em larvas de 5dpf expostas a diferentes alturas de coluna d'água e tempo de sessão teste. A) tempo gasto nos compartimentos; B) número de entradas nos braços. Valores representados por N= 25; média aritmética e erro padrão, *p≤ 0,05; #p ≤ 0,01.

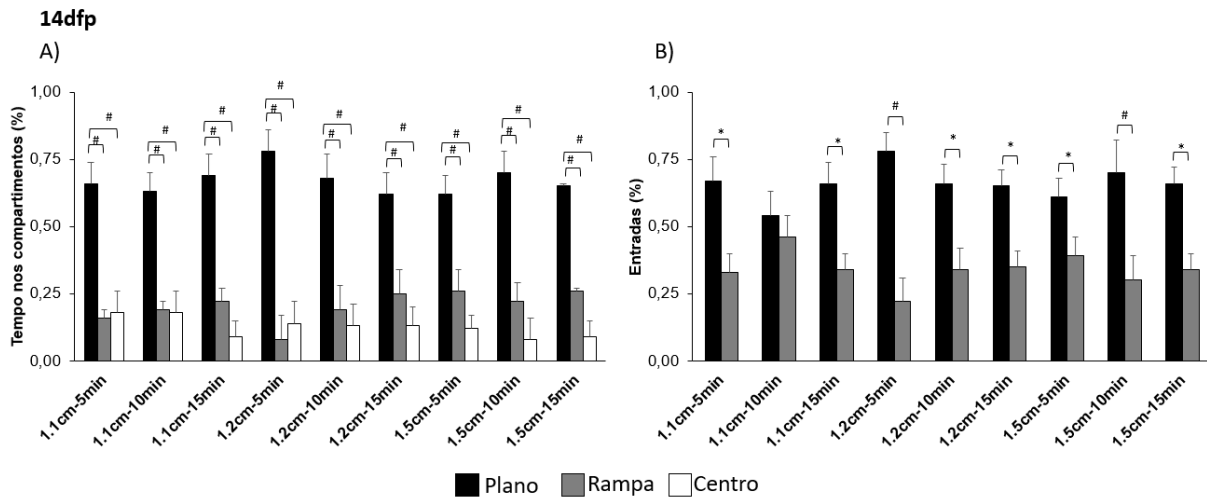


Figura 6. Testes de sensibilidade no teste de LCR em larvas de 14dpf expostas a diferentes alturas de coluna d'água e tempo de sessão teste. A) tempo gasto nos compartimentos; B) número de entradas nos braços. Valores representados por N= 25; média aritmética e erro padrão, * $p \leq 0,05$; # $p \leq 0,01$.

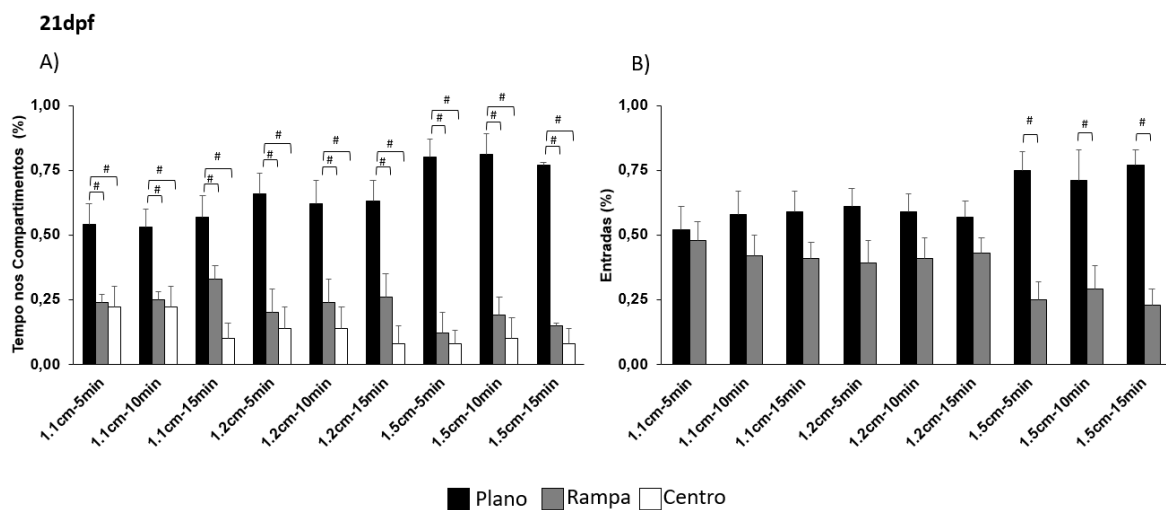


Figura 7. Testes de sensibilidade no teste de LCR em larvas de 21dpf expostas a diferentes alturas de coluna d'água e tempo de sessão teste. A) tempo gasto nos compartimentos; B) número de entradas nos braços. Valores representados por N= 25; média aritmética e erro padrão, * $p \leq 0,05$; # $p \leq 0,01$.

Para o tempo passado nos braços com rampa, a interação entre as três variáveis também revelou diferença estatística [$F(26,648) = 2.728$; $P = 0,006$], com uma quantidade

razoável de interações significativas, o que mostra que houve diferenças quanto ao tempo de sessão teste e coluna d'água sobre o tempo gasto no ambiente mais aversivo do aparato. Observamos diferenças entre os grupos de 5 x 14 ($p=0,17$) (Figura 5A e 6A), e 5 x 21dpf ($p=0,025$) (Figuras 5A e 7A) expostos à 1,2cm e qualquer um dos três tempos de sessão testados, para as idades de 14 e 21dpf mostrando preferência nos braços planos. Os grupos expostos à 1,5cm por 15min de sessão manifestaram diferenças entre: 5 x 14 ($p=0,017$) (Figuras 5A e 6A), e 5 x 21 ($p=0,025$) (Figuras 5A e 6A). Considerando-se indivíduos com 5dpf, foram encontradas diferenças entre as alturas de coluna d'água, indiferente do tempo de sessão, para os grupos expostos a: 1,1 x 1,2 ($p=0,017$), e 1,1 x 1,5cm ($p=0,025$) (Figura 5A).

A análise do tempo no centro no labirinto não encontrou diferenças entre as interações, apenas para idade [$F(26,648)= 25.808$; $p<0,001$] e altura de coluna d'água [$F(26,648)= 3.288$; $p=0,038$]. A análise pós-teste mostrou diferenças entre 5 x 14 ($p=0,017$) (Figuras 5A e 6A), e 5 x 21dpf ($p=0,025$) (Figuras 5A e 7A). Para a coluna d'água a diferença foi entre 1,1 x 1,5cm ($p=0,017$) (Figura 5A).

Para a avaliação da atividade motora, foi utilizado o número de entradas nos braços planos e com rampa, também convertidos para valores percentuais para, assim como para as medidas de tempo de permanência, equalizar os três diferentes tempos de sessão experimental adotados.

Para as entradas nos braços planos, a diferença estatística foi observada na interação entre idade e coluna d'água [$F(26,648)=7.925$; $p<0,001$]. Os grupos com 5dpf revelaram diferenças pós-teste entre todas as três alturas de coluna d'água ($p<0,05$) (Figura 5B). Para os animais com 21dpf as diferenças foram entre: 1,1 x 1,5 ($p=0,025$), e 1,2 x 1,5 ($p=0,017$) (Figura 7B). Considerando coluna de 1,1cm, as diferenças foram entre 5 x 14dpf ($p=0,017$) (Figuras 5B e 7B). Para a coluna de 1,2cm as diferenças foram entre todas as idades ($p<0,05$) (Figuras 5B, 6B e 7B). Já para a coluna de 1,5cm as diferenças foram entre 5 x 14 ($p=0,025$) (Figuras 5B e 6B), e 5 x 21dpf ($p=0,017$) (Figuras 5B e 7B). Quando considerado o tempo de sessão, indiferente da duração da sessão, foram encontradas diferenças entre 5 x 14 (Figura 5B e 6B), e 5 x 21pdf (Figuras 5B e 7B) ($p=0,05$). Especificamente para 5min, também houveram diferenças entre 5 x 14dpf ($p=0,017$) (Figuras 5B e 6B).

A análise das entradas nos braços com rampa revelaram diferenças nas interações entre idade e altura de coluna d'água [$F(26,648)= 18.930$; $p<0,001$] e, entre coluna e tempo de sessão [$F(26,648)= 3.024$; $p<0,017$]. No pós-teste, indiferente a idade, foram encontradas diferenças entre grupos expostos às colunas de 1,1 x 1,5cm ($p<0,05$) (Figuras 5B, 6B e 7B). Especificamente para 5dpf, também foram encontradas diferenças entre 1,1 x 1,2 ($p=0,017$), e 1,2 x 1,5cm ($p=0,025$) (Figura 5B). Da mesma forma, indiferente o tempo de sessão, também foram encontradas diferenças recorrentes entre 5 x 14dpf ($p=0,017$) (Figuras 5B e 6B). No caso das sessões de 5min, também houveram diferenças entre 14 x 21dpf ($p=0,025$) (Figuras 5B e 7B). Animais expostos a 1,2cm de altura de coluna d'água diferiram entre 5 x 10 ($p=0,025$) e 5 e 15min ($p=0,017$) (Figuras 5B, 6B e 7B). Por fim, nos grupos com sessões de 10 ou 15min, houveram diferenças entre os grupos expostos à 1,1 x 1,2 ($p=0,017$) (Figuras 5B, 6B e 7B). Para as sessões de 10min também houveram diferenças entre 1,2 x 1,5cm ($p=0,025$) e, para as de 15min, entre 1,1 x 1,5cm ($p=0,025$) (Figuras 5B, 6B e 7B).

Nossos resultados concluem que, para as idades de 14 e 21dpf houve preferência nos braços planos do aparato em relação aos braços com rampa e a área central do LCR, independentemente do tempo de sessão e altura de coluna d'água. Esse comportamento foi observado mais claramente para a coluna d'água de 1,5cm e, durante todos os 15 minutos de sessão o comportamento apresentou estabilidade. Portanto, percebeu-se que já com 5 minutos de sessão, larvas de zebrafish de 14 e 21pdf demonstram sensibilidade ao LCR (Figuras 5 e 7).

3.2 Validação Farmacológica do LCR

3.2.1 Álcool

A exposição farmacológica as doses de álcool, considerando como variáveis as concentrações da substância revelou diferenças, principalmente para a avaliação do tempo de permanência nos braços planos e com rampa.

Para análises estatísticas dos grupos que receberam doses de álcool em 5dpf, para o tempo gasto nos braços planos, houveram diferenças para essa medida [$F(3,96)= 21,677$; $p<0,001$]. O pós-teste mostrou diferenças quanto ao tempo de permanência nos braços planos entre a dose de 0,5% x 2% ($p<0,05$) e entre a dose de 2% x 1% ($p<0,05$)

(Figura 5A). Não foram encontradas diferenças em relação ao tempo nos braços com rampa. Para as análises do tempo no centro do aparato, foram encontradas diferenças [F(3,96)= 14,196; p=0,003], com diferenças pós-teste entre as doses 2% x 1% (p<0,05) (Figura 8A).

Quanto ao número de entradas nos braços, as larvas 5dpf, indicaram diferenças para o número de entradas nos braços planos [F(3,96)= 54,415; p<0,001], com diferenças pós-teste entre as doses de 0,5% x 1% (p<0,05), 0,5% x 2% (p<0,05), e também entre o grupo controle e as doses de 0,5% e 1%, sendo p<0,05 em ambos os casos (Figura 8B). Quanto as análises para o número de entradas nos braços com rampa, também foram encontradas diferenças estatísticas [F(3,96)= 45,355;p<0,001] e, a análise pós-teste revelou diferenças entre a dose de 0,5% com as doses de 1% e 2% (p<0,05), enquanto que o grupo controle diferiu apenas da dose de 0,5% (p<0,05) (Figura 8B).

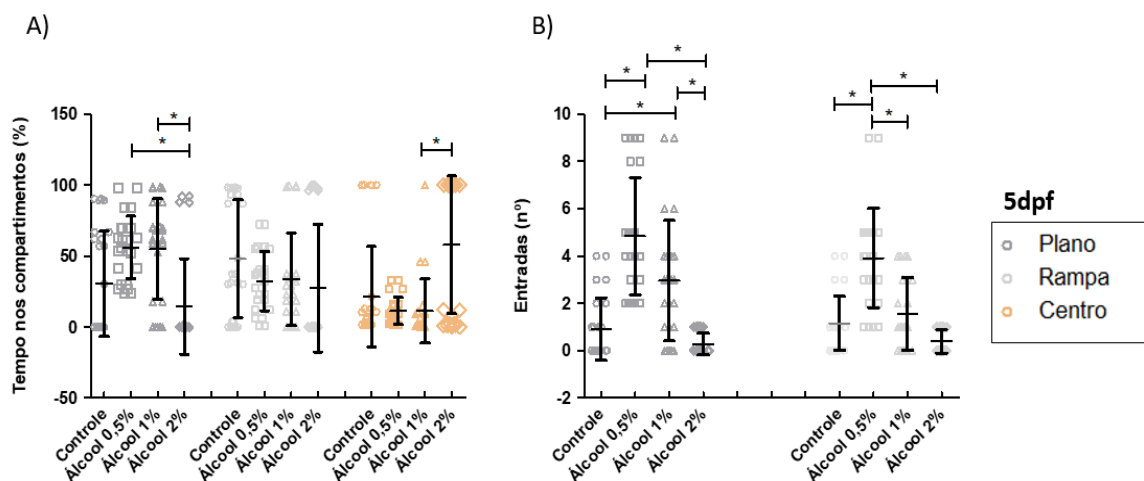


Figura 8. Larvas de 5dpf expostas às doses agudas de álcool testadas no LCR. A) tempo gasto nos compartimentos; B) número de entradas nos braços. Valores representados por N= 25; média aritmética e erro padrão, *p≤ 0,05.

Para larvas de 10dpf expostas as doses de álcool, a análise apresentou diferenças quanto ao tempo de permanência nos braços planos [F(3,96)= 43,930; p<0,001], com diferenças pós-teste entre o grupo controle e as doses de 0,5% e 2% (p<0,05); entre 0,5% x 1% (p<0,05) e, entre 1% x 2%, (p<0,05) (Figura 6A). Com relação ao tempo de permanência nos braços com rampa, a análise revelou diferenças entre os grupos [F(3,96)= 54,169; p<0,001], com diferenças pós-teste entre o grupo controle e as doses de 0,5% e 2% (p<0,05); entre a dose de 1% e as demais doses 0,5%, 2% (p<0,05) (Figura

9A). Para o tempo de permanência no compartimento central, foram observadas diferenças [F(3,96)= 13,757; p=0,003] entre os grupos, com diferenças pós-teste entre o controle e a dose de 0,5% (p<0,05) (Figura 9A).

Quanto a atividade locomotora, as larvas de 10dpf expostas ao álcool revelaram diferenças para o número de entradas nos braços planos [F(3,96)= 9,334; p= 0,025], com diferenças pós-teste entre 1% x 2% (p<0,05). Para as entradas nos braços com rampa também foram encontradas diferenças [F(3,96)=39,317 p<0,001], com diferenças pós-teste entre controle x 2% (p<0,05); e a dose de 1% diferiu das doses 0,5% e 2%, ambas com p<0,05 (Figura 9B).

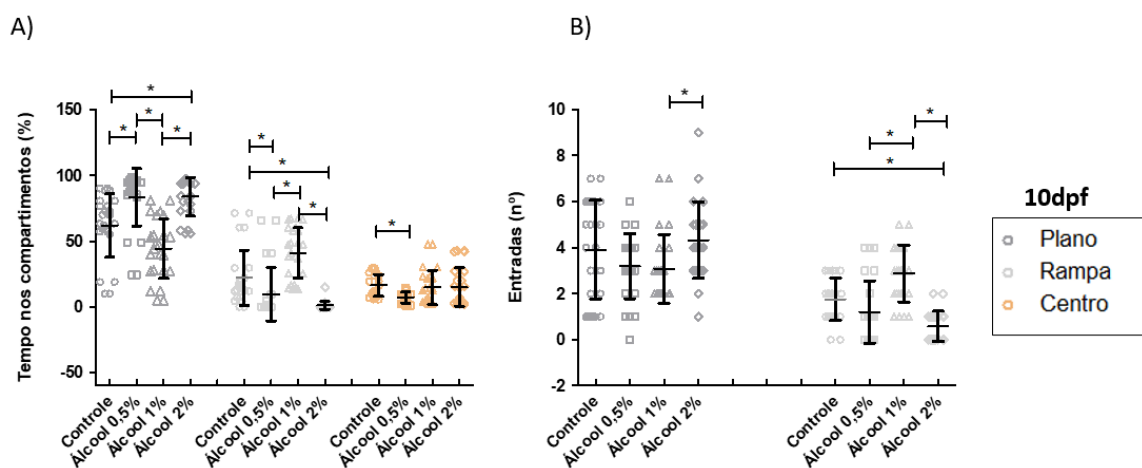


Figura 9. Larvas de 10dpf expostas às doses agudas de álcool testadas no LCR. A) tempo gasto nos compartimentos; B) número de entradas nos braços. Valores representados por N= 25; média aritmética e erro padrão, *p≤ 0,05.

Para a idade de 14dpf, as análises mostraram diferenças quanto ao tempo de permanência nos braços planos [F(3,96)=26,064; p<0,001], onde o pós-teste revelou diferenças entre o grupo controle e as doses de 0,5% e 1% (p<0,05), e entre 2% x 1% (p<0,05). Para os braços com rampa também foram encontradas diferenças [F(3,96)=14,102; p=0,003], onde o grupo controle diferiu das doses 1% e 2% (p<0,05), no pós-teste. Não foram encontradas diferenças em relação ao tempo de permanência no centro (Figura 10A).

Para a atividade locomotora, foram encontradas diferenças estatísticas quanto ao número de entradas nos braços planos [F(3,96)=39,165; p<0,001] e, o pós-teste indicou haver diferenças entre o grupo controle e todas as doses, sempre com p<0,05. Quanto ao

número de entradas nos braços com rampa, as análises também mostraram diferenças [F(3,96)= 23,102; $p < 0,001$], com diferença pós-teste entre o grupo controle com as doses de 1% e 2% ($p < 0,05$) (Figura 10B).

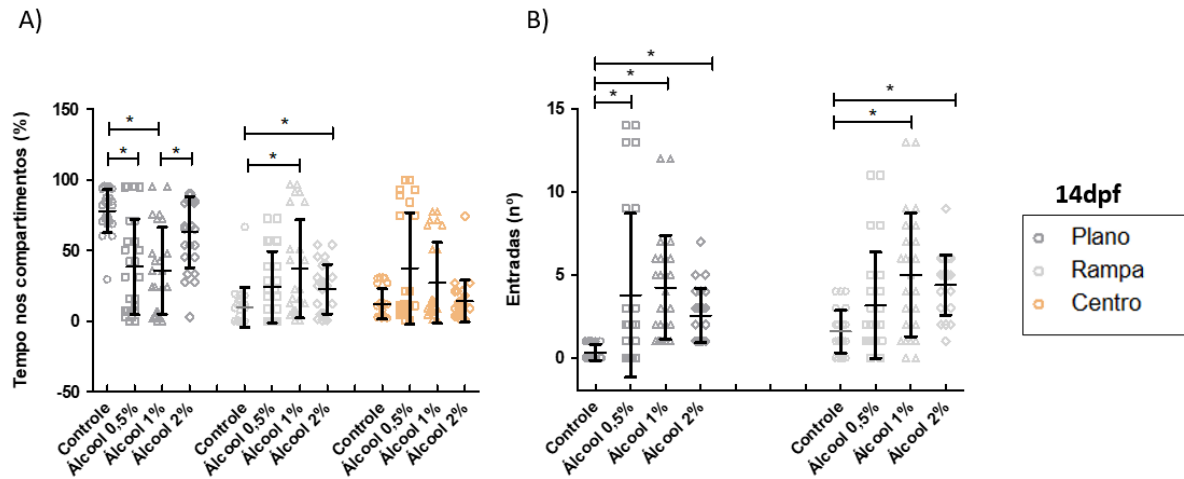


Figura 10. Larvas de 14dpf expostas às doses agudas de álcool testadas no LCR.

A) tempo gasto nos compartimentos; B) número de entradas nos braços. Valores representados por N= 25; média aritmética e erro padrão, * $p \leq 0,05$.

3.2.2 Clonazepam

A exposição farmacológica às doses de clonazepam (0,003 mg/kg e 0,006 mg/kg), revelaram diferenças, principalmente para a avaliação do tempo de permanência nos braços planos ou com rampa.

Para as larvas de 5dpf, foram encontradas diferenças no tempo de permanência nos braços planos [F(2,72)= 25,409; $p < 0,001$], com diferenças pós-teste entre o controle e as doses de clonazepam, sempre com $p < 0,05$. Com relação ao tempo de permanência nos braços com rampa, também foram observadas diferenças [F(2,72)= 9,375; $p = 0,009$], sendo a diferença pós-teste restrita entre o grupo controle x 0,006 ($p < 0,05$). Não foram encontradas diferenças para o tempo no centro (Figura 11A).

Quanto ao número de entradas nos braços, ainda para larvas de 5dpf, a análise para os braços planos revelaram diferenças entre os grupos [F(2,72)= 39,609; $p < 0,001$], com diferenças pós-testes entre o controle e as doses de clonazepam ($p < 0,05$). Para as entradas nos braços com rampa, também foram observadas diferenças [F(2,72)= 18,965;

$p < 0,001$], com diferença pós-teste, entre a dose de 0,003 x 0,006 e, entre 0,003 x controle, todos apresentando $p < 0,05$ (Figura 11B).

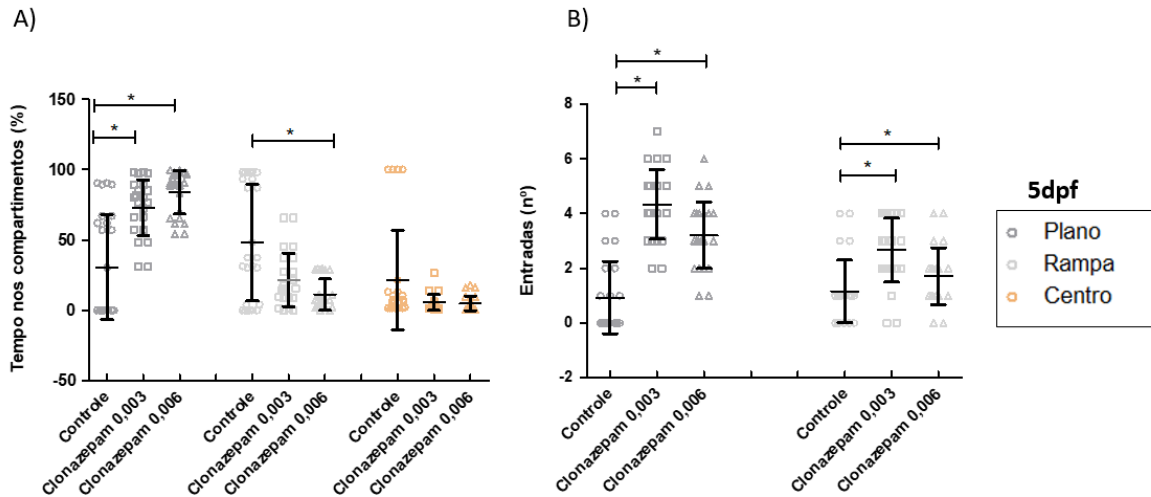


Figura 11. Larvas de 5dpf expostas às doses agudas de clonazepam testadas no LCR. A) tempo gasto nos compartimentos; B) número de entradas nos braços. Valores representados por N= 25; média aritmética e erro padrão, * $p \leq 0,05$.

Para a idade de 10dpf, também foram encontradas diferenças quanto ao tempo de permanência nos braços planos, para os animais expostos ao clonazepam [$F(2,72) = 7,350$; $p = 0,025$]. A análise pós-teste revelou diferenças entre o grupo controle x 0,006 ($p < 0,05$). Por outro lado, o tempo de permanência nos braços com rampa e centro do labirinto não indicou diferenças entre os grupos (Figura 12A).

A análise da atividade locomotora das larvas de 10dpf expostas ao clonazepam apresentaram diferenças quanto às entradas nos braços planos [$F(2,72) = 22,686$; $< 0,001$], de maneira que a análise pós-teste revelou diferença entre o grupo controle com as doses de 0,003 e 0,006 ($p < 0,05$). Já para as entradas nos braços com rampa [$F(2,72) = 8,955$; $p = 0,011$], e o pós-teste indicou diferenças entre o grupo controle e a dose de 0,006 ($p < 0,05$) (Figura 12B).

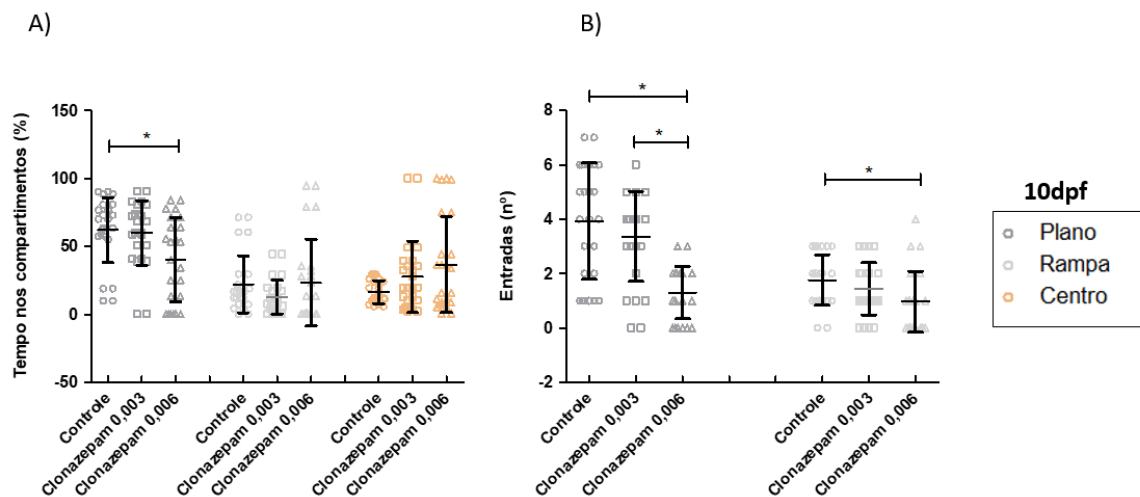


Figura 12. Larvas de 10dpf expostas às doses agudas de clonazepam testadas no LCR. A) tempo gasto nos compartimentos; B) número de entradas nos braços. Valores representados por N= 25; média aritmética e erro padrão, * $p \leq 0,05$.

Considerando as larvas com 14dpf expostas ao clonazepam, foram encontradas diferenças no tempo de permanência nos braços planos [$F(2,72)=8,475$; $p=0,014$], havendo diferenças pós-teste entre o controle e a dose de 0,006 ($p < 0,05$). Já o tempo de permanência nos braços com rampa indicou diferenças entre os grupos [$F(2,72)= 10,380$; $p=0,006$], com confirmação pós-teste 0,003 x 0,006 ($p < 0,05$) e, entre 0,006 e o grupo controle ($p < 0,05$) (Figura 13A).

A análise locomotora para os indivíduos com 14dpf expostos ao clonazepam revelaram diferenças quando ao número de entradas nos braços com rampa [$F(2,72)=37,268$; $p < 0,001$], com confirmação no pós-teste entre 0,003 x 0,006 ($p < 0,05$), e grupo controle x 0,006 ($p < 0,05$) (Figura 13B).

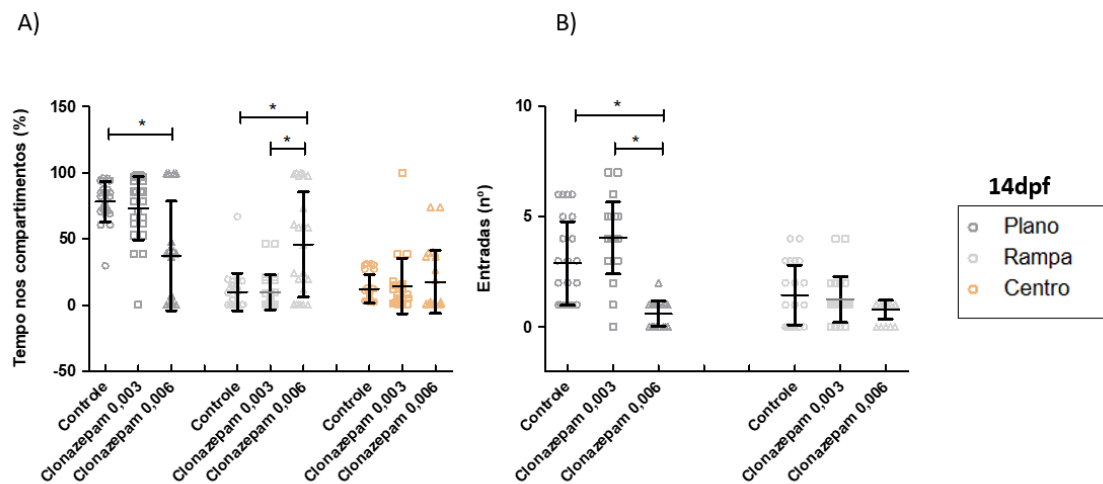


Figura 13. Larvas de 14dpf expostas às doses agudas de clonazepam testadas no LCR.

A) tempo gasto nos compartimentos; B) número de entradas nos braços. Valores representados por N= 25; média aritmética e erro padrão, * $p \leq 0,05$.

4. Discussão

Existem hoje diversos testes encontrados na literatura para avaliar o comportamento tipo-ansioso em larvas de zebrafish (Varga et al., 2018; Bai et al., 2016;), neste estudo, utilizamos o protocolo do LCR, previamente desenvolvido para identificar comportamento tipo-ansioso em zebrafish adultos (Walsh-Monteiro et al., 2016), para a análise do comportamento tipo-ansiedade em larvas. Os resultados obtidos nos testes de sensibilidade, nos permitiram inferir que sessões de 5 minutos de duração em colunas d'água com 1,5cm de altura são suficientes para determinar o comportamento tipo-ansioso em larvas de zebrafish no LCR.

Sendo uma busca por uma adaptação ao protocolo desenvolvido em 2016 para adultos, utilizamos as mesmas substâncias (álcool e clonazepam), como forma de apresentar essa validade do aparato para análise do efeito de drogas também com larvas. Como medida de avaliação do comportamento semelhante à ansiedade foi utilizado o tempo de permanência nos compartimentos (braços planos, braços com rampa e área central), e como medida de avaliação motora utilizamos o número total de entradas nos braços (planos ou com rampa). Reforça-se que os braços com rampa são considerados os ambientes mais aversivos, principalmente nas porções mais distantes da área central, onde a coluna d'água é mais rasa (Blaser & Goldsteinholm, 2012). Estudos com outros modelos piscinos mostraram que a espécie possui maior preferência por ambientes menos aversivos (Maximino et al., 2010; Haghani, S. et al., 2019), evitando assim ambientes mais rasos (Blaser & Goldsteinholm, 2012).

A área central do aquário pode ser classificada como um ambiente de escolha, onde o animal escolhe entre os braços mais rasos ou profundos estando em um ambiente aberto (Walsh-Monteiro et al., 2016) em que o nível de exposição é mais alto e, desta forma, a avaliação de risco pelo animal é por entrar em ambientes mais protegidos (braços planos) ou explorar (braços com rampa).

Os fármacos utilizados neste estudo complementam a validação do LCR analisando o efeito que essas substâncias causam sobre o comportamento tipo-ansiedade em larvas. e são consistentes quando comparados com resultados encontrados na literatura para peixes adultos e LCE para roedores (Walf & Frye, 2007). Nosso trabalho utilizou três

concentrações de álcool etílico (0,5%, 1% e 2%) encontradas em diferentes trabalhos (Ramlan, 2017; Baiamonte et al., 2016; Sylvain et al., 2010). As larvas com 10 e 14dpf apresentaram reduções no tempo de permanência nos braços planos e aumento nos braços com rampa quando expostas as doses 0,5% e 1% de álcool. Para estas larvas, mais desenvolvidas, assim como já descrito para os adultos, estas doses indicam efeito ansiolítico do álcool sobre o comportamento dos animais (Tsang et al., 2019). Assim, os animais, mais desinibidos, explorariam mais o labirinto, com aumento da atividade locomotora e acesso a ambientes mais aversivos. Já a dose de 2% indica efeito de intoxicação, com redução da atividade locomotora e na permanência nos braços com rampa. Tais resultados são equivalentes ao descrito por Walsh-Monteiro e colaboradores (2016) para zebrafish adultos.

O clonazepam é um benzodiazepínico com efeito seletivo sobre receptores GABA_A, potencializando a hiperpolarização neural (Rudolph & Knoflach, 2011). Em nosso estudo, larvas com idade de 10 e 14dpf tiveram menor tempo de permanência nos braços planos em relação ao controle, para a concentração de 0,006mg. Especificamente para larvas com 14dpf, 0,006mg de clonazepam, além de reduzir a presença nos braços planos, aumentou a presença nos braços com rampa em relação ao controle e à concentração de 0,003mg. Isto fortalece a ideia de efeito ansiolítico da droga sobre o comportamento dos indivíduos. Maximino e colaboradores (2011) também encontraram efeito ansiolítico do clonazepam em zebrafish adultos testados em aquários claro-escuro, onde os animais reduziram a aversividade passando mais tempo no aquário branco, porém tiveram redução da atividade locomotora. Quanto ao número de entradas, a dose de 0,006mg indicou redução na atividade locomotora, o que também é característico do efeito do clonazepam (Cao et al., 2019).

Já as larvas de 5dpf se comportaram de maneira diferente das demais idades. Em um primeiro momento, não parece haver distinção entre ambientes rasos e profundos na sua exploração. Isso pode ser explicado pelo seu desenvolvimento natatório em busca de alimento, enchimento da bexiga natatória (Palmér et al., 2017), e também a possibilidade de ainda haver imaturidade dos circuitos neurais nas regiões do pallium e subpallium, que provavelmente estejam envolvidas com a manifestação do comportamento tipo-ansioso.

A análise das variações de tempos de sessão e altura de coluna d'água para estas larvas com 5dpf, sugere uma preferência pelos braços com rampa e uma aversão ao fundo,

comportamento potencializado quando expostas aos fármacos. Tal situação nos permite levantar a hipótese de haver um efeito ansiogênico contrário para larvas de 5dpf no LCR.

As larvas de 5dpf expostas às diferentes concentrações de álcool apresentaram diferenças nos tempos de permanência nos braços planos e área central do LCR. Nos braços planos, percebe-se que a concentração de 1% é aquela que indica maior tempo de permanência nestes braços, em comparação às demais concentrações. O efeito observado é característico da exposição alcoólica em animais expostos a protocolos de estudo da ansiedade: o comportamento exploratório aumenta até uma dose intermediária e depois reduz, indicando intoxicação (Rico et al., 2007). Em nosso estudo, como mencionado anteriormente, sugerimos que para larvas de 5dpf têm os braços planos como o local aversivo em comparação aos braços com rampa. Desta forma, com a dose de 1% de álcool, as larvas sofrem efeito ansiolítico, aumentando a permanência no aversivo, enquanto com 2% o efeito é de intoxicação, com redução no tempo de permanência no aversivo e correspondente redução da atividade locomotora geral.

Já na área central do LCR, concentrações de 2% indicaram preferência por permanência em relação às outras doses o que, considerando a redução motora em relação às outras doses, indica efeito de intoxicação semelhante à embriaguez (Guo et al., 2015). Especificamente para as larvas de 5dpf, foi observada preferência pelos braços planos em relação ao grupo controle para a dose de 0,006mg. Mais uma vez esta observação sugere uma resposta ansiolítica para esta idade que, diverge de indivíduos com idade a partir de 10dpf até adultos (Walsh-Monteiro et al., 2016). Além disso, estas larvas de 5dpf também manifestaram maior atividade locomotora nos braços planos em relação ao controle, em ambas as doses de clonazepam adotadas. Esses resultados também reforçam a nossa hipótese de que larvas de 5dpf possuem preferência pelo raso.

5. Conclusões

O protocolo do teste de LCR adaptado para larvas apresentou resultados equivalentes aos encontrados na literatura para peixes adultos (Walsh-Monteiro et al., 2016). Os testes de sensibilidade permitiram o uso de uma coluna d'água de 1,5cm de altura em 5 minutos de sessão teste. O efeito de drogas mostrou que o aparato é sensível ao efeito de substâncias ansiolíticas e, e a utilização neste trabalho de três diferentes idades larvais do Zebrafish mostraram que, podemos analisar o desenvolvimento do comportamento, visto que larvas de 5dpf apresentaram resposta diferente das demais idades quando expostas no teste de LCR por conta do desenvolvimento ainda de seus circuitos neurais que podem estar envolvidos na manifestação de comportamentos (Vanwalleghem et al., 2018), e a detecção do comportamento tipo-ansiedade em larvas de zebrafish em um novo aparato experimental também pode representar uma vantagem no auxílio de desenvolvimento de novos fármacos, visto que as larvas também mostraram sensibilidade aos fármacos no teste de LCR.

Capítulo 2:

Desequilíbrio dopaminérgico na janela desenvolvimental de 3 dpf à 5 dpf alteram o comportamento tipo-ansioso em larvas de zebrafish (*Danio rerio*)

1. Introdução

Transtornos de ansiedade são umas das morbidades e comorbidades psiquiátricas mais prevalentes na população mundial (de Souza & Machado-De-Sousa, 2017). Diversos mecanismos fisiológicos desses transtornos já são bem estudados em modelos animais de laboratório, como efeito de drogas e testes comportamentais. Essas pesquisas visam o descobrimento tanto da etiologia quanto o desenvolvimento de novos tratamentos farmacológicos e não-farmacológicos, que possam melhorar a qualidade de vida dos pacientes (Campos et al., 2013).

Neste trabalho, estudamos se o comportamento tipo-ansioso pode estar associado a alterações durante o neurodesenvolvimento, com foco no sistema dopaminérgico, como acontece no surgimento de outros distúrbios psiquiátricos como a esquizofrenia (Howes et al., 2017), autismo (Pavál, 2017; Hazlett et al., 2017), e TDAH (Coelho et al., 2010).

Compreendemos que receptores dopaminérgicos são um dos principais alvos de drogas psicoativas (Beaulieu & Gainetdinov, 2011), e que pacientes que fazem uso dessas substâncias podem apresentar alterações na ansiedade (Garay et al., 2015). Existem evidências de que diferentes regiões do cérebro estão envolvidas na modulação e expressão da ansiedade, como amígdala, o hipocampo e o córtex pré-frontal (Zarrindast & Khakpai, 2015), essas regiões estão relacionadas ao neurocircuito da ansiedade em humanos (Adhikari et al., 2010), assim como também vários outros mecanismos de neurotransmissão podem estar relacionados ao estado ansioso (Viveros et al., 2005).

A dopamina é a principal catecolamina no cérebro de mamíferos (Chakravarthy et al., 2018), tendo influencias na regulação da atividade motora (Felger & Treadway, 2017), reforço positivo (Berke, 2018), cognição, emoção (Tank & Lee Wong, 2015) e, etc. É esperado que alterações na sua sinalização provoque alterações nessas funções, como na resposta de ansiedade (de la Mora et al., 2010).

Conexões dopaminérgicas também já podem ser observadas no início do neurodesenvolvimento (Robinson & Gradinaru, 2018), e procuramos compreender as alterações nesse sistema durante uma janela de oportunidade, ou desenvolvimento, podem influenciar no comportamento tipo ansiedade usando como modelo o Zebrafish (*Danio rerio*) em fase larval.

O Zebrafish vem ganhando cada vez mais espaço como modelo animal nas neurociências, graças sua grande homologia com a espécie humana (Panula et al., 2010). Diversos mecanismos neurais já são bem estabelecidos nesta espécie (Kalueff et al., 2014), e vários comportamentos semelhante aos dos mamíferos também são bem determinados, como estresse (Steenbergen et al., 2011), depressão (Fonseka et al., 2016), e ansiedade (Walsh-Monteiro et al., 2016).

No presente trabalho, estudamos quais os mecanismos dopaminérgicos podem estar envolvidos na formação do comportamento tipo-ansiedade em Zebrafish, para isso, usamos o peixe em sua fase larval. As larvas apresentam vantagens quanto a manipulação e o rápido desenvolvimento embrionário: crescimento em ovos e eclosão no terceiro dia após a fecundação (Kimmel et al., 1995).

Os primeiros neurônios dopaminérgicos do Zebrafish são formados cerca de 18h pós fertilização (hpf), e os primeiros grupos completos desses neurônios já podem ser observados no 4 dia pós fertilização (Schweitzer & Driever, 2009). Muitas das classes de genes de receptores dopaminérgicos são semelhantes aos encontrados em mamíferos (Schweitzer & Driever, 2009). A expressão dos receptores do tipo D1 foram detectados pela primeira vez em larvas de 30dpf, e durante o período de somitogênese para os receptores D2 e D3 (Yamamoto et al., 2015), esses achados apresentam outra vantagem para a utilização deste modelo.

Estudos anteriores do nosso grupo mostram que durante o 3 ao 5dpf a sinalização dopaminérgica é importante para a diferenciação neuronal GABAérgica, e que alterações neste período, como o aumento da dopamina, afeta o comportamento motor das lavas e essas alterações comportamentais são sustentadas até idades mais posteriores (Souza, et al., 2011; Lima et al., 2020). Assim como também estudos mostram que a exposição aguda a agonistas D1 e D2 como SKF-38393 e Quinpirole alteram a atividade motora em larvas de 6dpf (Irons et al., 2013).

Com base nesses achados, neste trabalho, investigaremos se essas alterações dopaminérgicas durante a janela de desenvolvimento e exposições agudas de agonistas dos receptores D1 e D2 podem influenciar também no comportamento tipo-ansioso em larvas de 5, 10 e 14dpf no teste de LCR.

2. Materiais e Métodos

2.1 Cuidados gerais com os animais e reprodução

Descrição no capítulo 1.

2.2 Cuidado com as larvas

Descrição no capítulo 1.

2.3 Grupos experimentais

Neste estudo foram utilizadas larvas de 5, 10 e 14dpf, para cada idade foram utilizadas 150 larvas divididas em 6 grupos com N=25, sendo os respectivos grupos: Controle Agudo, Dopamina Agudo, SKF Agudo, Quinpirole Agudo; Controle crônico, Dopamina crônico.

2.4 Exposições Farmacológicas Agudas

Os fármacos utilizados neste estudo foram adquiridos pela Sigma Aldrich com concentrações de: A administração aguda da Dopamina 100uM (código H8502) e agonistas D1 (SKF-38393) 10uM (código D047) e D2 (Quinpirole) 10uM (código Q102). As concentrações foram estabelecidas de acordo com Souza e colaboradores (2011) e foram expostas 30 minutos antes do teste para ambas as idades em placas de 24 poços, sendo uma larva por poço com volume total de 2ml (Figura 14).

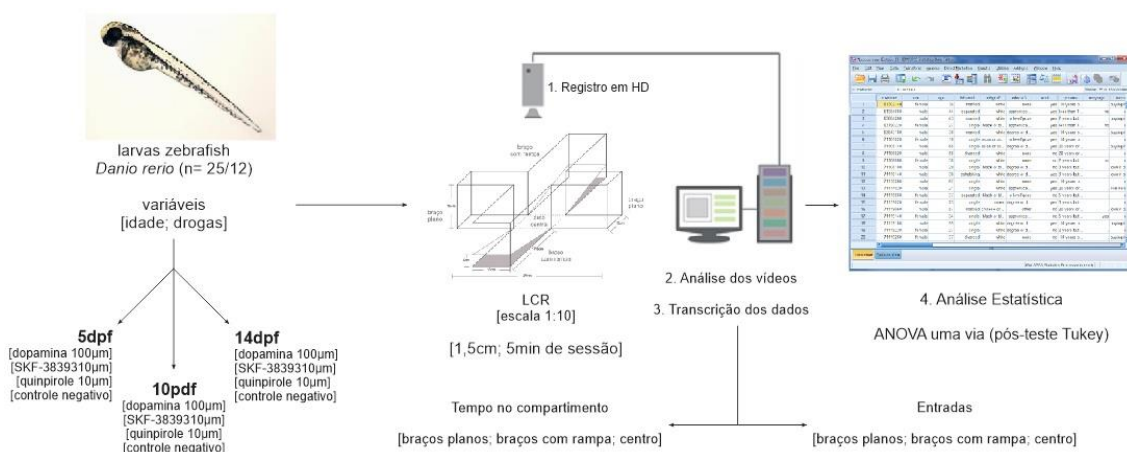


Figura 14. Desenho experimental exposições farmacológicas agudas de agonistas e teste no LCR.

2.5 Exposição Farmacológica Crônica

Para a administração crônica de dopamina na janela de desenvolvimento do 3-5dpf, larvas recém eclodidas foram colocadas em placas de 24 poços, sendo uma larva por poço, e foram expostas desde o dia da eclosão até o 5dpf com uma dose de dopamina (informações sobre o fármaco descritas no item 2.4) de 100uM diluída em 2ml de E2 em cada poço (Souza et al., 2011), essa solução foi trocada uma vez por dia até o 5dpf, após cada troca as placas de 24 poços foram envolvidas com papel alumínio e devolvidas a estufa incubadora numa temperatura de 28°C, o intuito é impedir que a presença da luz degradasse a dopamina fotossensível, o mesmo processo foi feito para as larvas do grupo controle, com exceção de receberem a dose de dopamina.

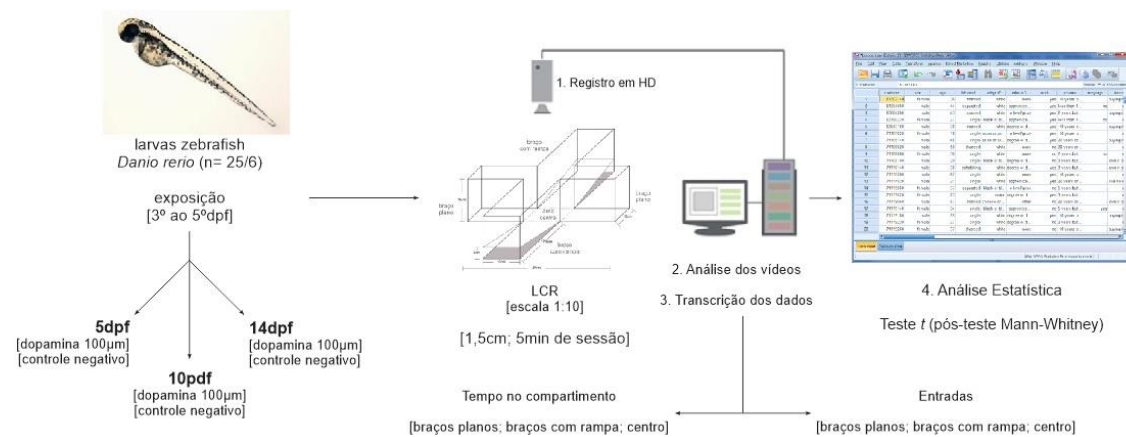


Figura 15. Desenho experimental exposição crônica de dopamina e teste no LCR.

2.6 Labirinto em Cruz com Rampa

Descrição no capítulo 1.

2.7 Comportamento tipo ansiedade e atividade motora

Descrição no capítulo 1.

2.8 Condições experimentais

Descrição no capítulo 1.

2.9 Análise dos vídeos

Descrição no capítulo 1.

2.10 Análise estatística

Descrição no capítulo 1.

3. Resultados

3.1 Exposições Agudas de Dopamina e Agonistas

Os resultados da exposição farmacológica a doses agudas de Dopamina (100uM), SKF-38393 (10uM) e Quinpirole (10uM) nas idades de 5, 10 e 14dpf revelou diferenças, principalmente para a avaliação do tempo de permanência nos braços planos ou com rampa.

A análise estatística quanto as exposições agudas com Dopamina e agonistas D1 e D2: SKF-38393 e Quinpirole respectivamente, para larvas de 5dpf foram encontradas diferenças quanto ao tempo de permanência nos braços planos [F(3,96)= 20,606; p<0,001]. O pós teste revelou diferença entre o grupo Quinpirole e os demais grupos (p<0,05); para a análise do tempo gasto nas rampas, foram observadas diferenças [F(3,96)= 20,606; p<0,001], e na análise pós teste o Quinpirole diferiu do grupo controle (p<0,05). Não foram encontradas diferenças estatísticas para o tempo gasto no centro e número de entradas nos braços (Figura 16A).

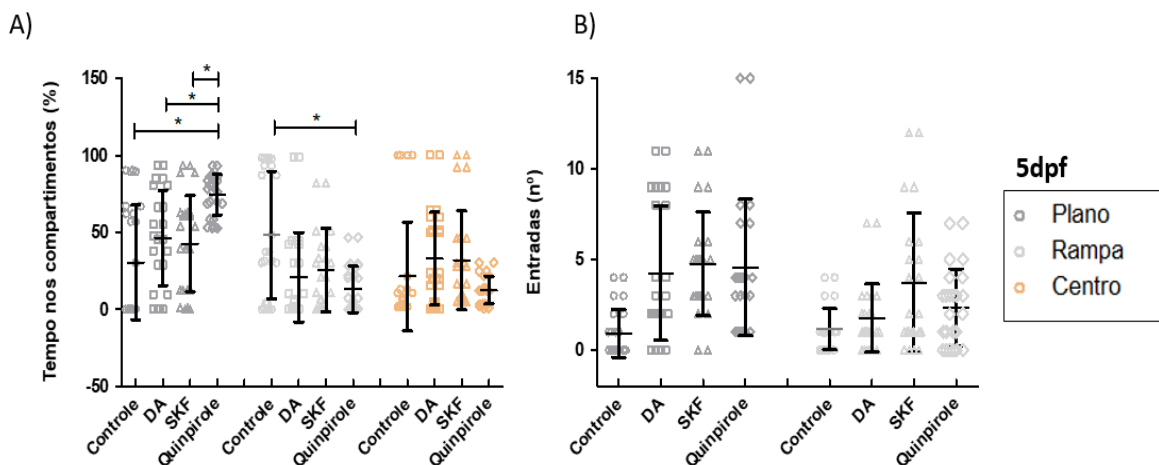


Figura 16. Exposições agudas de dopamina e agonistas em larvas de 5dpf testadas no LCR. A) tempo de permanência nos compartimentos; B) número de entradas nos braços. Valores representados por N= 25; média aritmética e erro padrão, *p≤ 0,05.

A análise estatística para as larvas de 10dpf expostas as doses agudas dos agonistas e dopamina, foram encontradas diferenças na medida de tempo gasto nos braços

planos [$F(3,96)=44,497$; $p<0,001$]. A análise pós teste mostrou diferenças entre grupo controle x SKF-38393 ($p<0,05$); grupo controle x Quinpirole ($p<0,05$); dopamina x SKF-38393 ($p<0,05$); dopamina x Quinpirole ($p<0,05$). Para a análise estatística do tempo gasto nas rampas foram encontradas diferenças [$F(3,96)=42,639$; $p<0,001$], e o pós teste revelou diferenças entre controle x dopamina ($p<0,05$); controle x SKF-38393 ($p<0,05$); dopamina x Quinpirole ($p<0,05$). Diferenças estatísticas significativas também foram encontradas com relação ao tempo gasto no compartimento central [$F(3,96)=41,985$; $p<0,001$], e o pós teste revelou diferenças entre os grupos SKF-38393 e Quinpirole com relação ao grupo controle ($p<0,05$), diferença também encontrada quando comparados com o grupo dopamina ($p<0,05$) (Figura 17A).

Quanto a análise estatística do número de entradas nos braços, foram observadas diferenças para as entradas nos braços planos [$F(3,96)=31,477$; $p<0,001$]. O pós teste mostrou diferenças entre o grupo controle para todas as doses agudas ($p<0,05$). Com relação ao número de entradas na rampa, as análises estatísticas apresentaram diferenças [$F(3,96)=30,606$; $p<0,001$], e o pós teste revelou diferença entre o grupo controle x dopamina ($p<0,05$); controle x SKF-38393 ($p<0,05$). (Figura 17B).

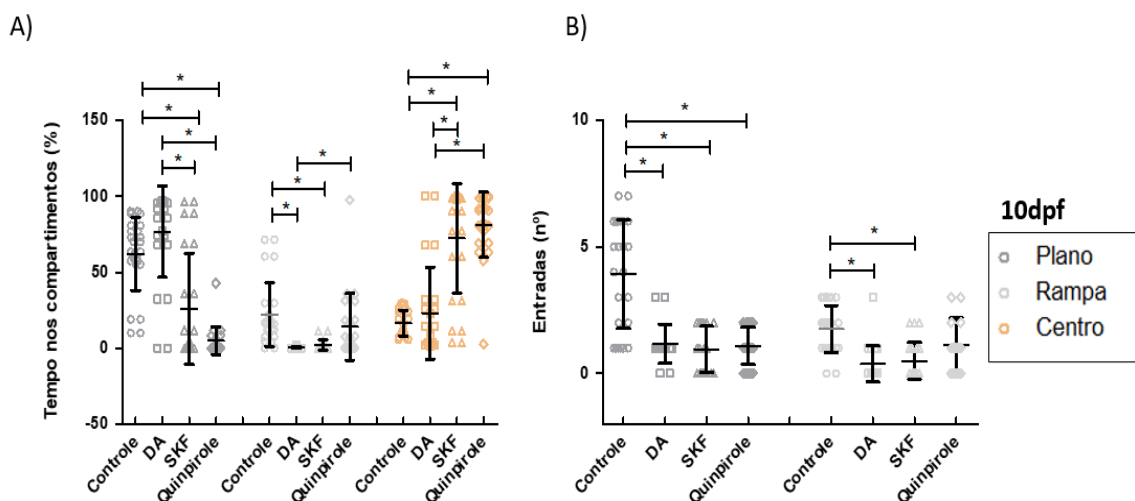


Figura 17. Exposições agudas de dopamina e agonistas em larvas de 10dpf testadas no LCR. A) tempo de permanência nos compartimentos; B) número de entradas nos braços. Valores representados por N=25; média aritmética e erro padrão, * $p\leq 0,05$.

Larvas de 14dpf revelaram diferenças quanto a análise estatística para o tempo gasto nos compartimentos planos [F(3,96)=31.317;P<0,001], e a análise pós teste mostrou diferença entre os grupos: controle x SKF-38393 (p<0,05); SKF-38393 apresentou diferenças também em relação ao grupo Quinpirole e dopamina para ambos p<0,05. Com relação ao tempo gasto nas rampas, a análise estatística apontou diferenças [F(3,96)=28,339;P<0,001]. O pós teste revelou diferenças entre o grupo controle quando comparado com dopamina e SKF-38393 (p<0,05); Quinpirole x dopamina (p<0,05) e SKF-38393 (p<0,05). Para o tempo gasto no compartimento central [F(3,96)=22,097;p<0,001], a análise pós teste mostrou dopamina diferindo do grupo SKF-38393 (p<0,05); SKF-38393 x Quinpirole (p<0,05) (Figura 18A).

Para o número de entradas nos braços foram encontradas diferenças estatísticas com relação a entradas no plano [F(3,96)=23,156;p<0,001], e o pós teste revelou diferença entre os grupos: controle x dopamina (p<0,05); controle x SKF-38393 (p<0,05); dopamina x Quinpirole (p<0,05); SKF-38393 x Quinpirole (p<0,05). Para o número de entradas na rampa, foram observadas diferenças estatísticas [F(3,96)=27,475; p<0,001] e o pós teste revelou diferença entre Quinpirole e os demais agonistas, ambos com p<0,05. (Figura 18B).

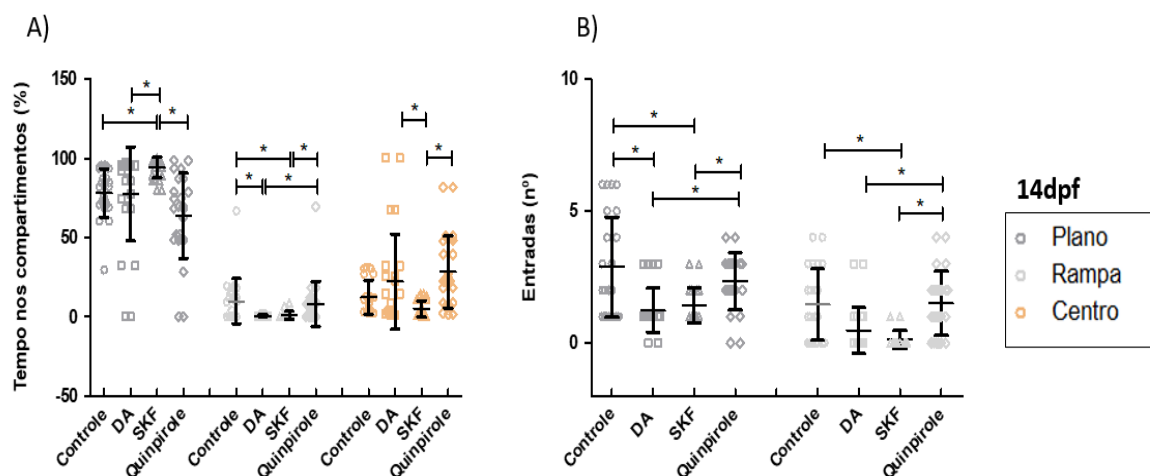


Figura 18. Exposições agudas de dopamina e agonistas em larvas de 14dpf testadas no LCR. A) tempo de permanência nos compartimentos; B) número de entradas nos braços. Valores representados por N= 25; média aritmética e erro padrão, *p≤ 0,05.

3.2 Exposição Crônica de Dopamina

Os resultados da exposição farmacológica a dose crônica de Dopamina (100uM) durante a janela de desenvolvimento do 3-5dpf, considerou como variáveis as concentrações da substância, revelou diferenças, principalmente para a avaliação do tempo de permanência nos braços planos ou com rampa.

Os resultados das larvas de 5dpf expostas ao LCR duas horas após a última exposição crônica de dopamina, mostraram que houveram diferenças com relação ao tempo gasto nos braços com rampa com relação ao grupo controle [T(1,48)= 328,000; $p < 0,001$]; para o braço plano e centro não foram encontradas diferenças (Figura 19A). Quanto a atividade motora, o número de entradas para ambos os braços mostraram diferenças após o tratamento com dopamina com relação ao grupo controle [T(1,48)= 286,500; $p < 0,001$]; [T(1,48)= 282,000; $p < 0,001$] (Figura 19B).

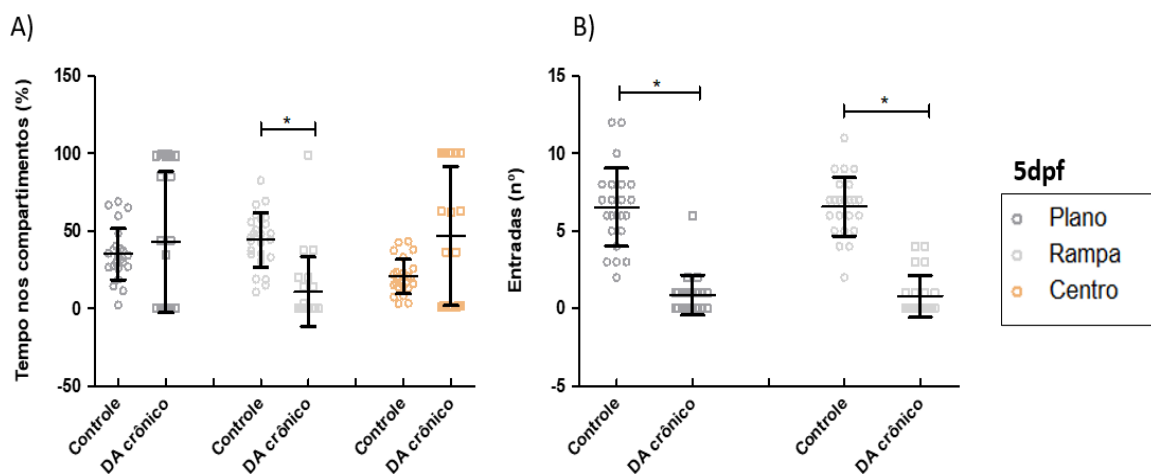


Figura 19. Larvas de 5dpf que passaram pela exposição crônica de dopamina durante a janela de desenvolvimento do 3 ao 5dpf expostas ao teste de LCR: A) tempo de permanência nos compartimentos; B) número de entradas nos braços. Valores representados por N= 25; média aritmética e erro padrão, * $p \leq 0,05$.

Para larvas de 10dpf testadas no LCR que foram expostas do 3-5dpf com dopamina, a análise estatística revelou diferença apenas entre o tempo gasto nas rampas [T(1,48)= 292,000; $P < 0,001$] entre o grupo controle e o grupo tratado (Figura 20A). Não foram encontradas diferenças quanto ao tempo nos braços planos e centro. Quanto a análise estatística do número de entradas, foi observada diferenças entre os grupos para os braços planos [T(1,48)= 278,000; $P < 0,001$] e diferenças entre os grupos para os braços com rampa [T(1,48)= 297,500; $p < 0,001$] (Figura 20B).

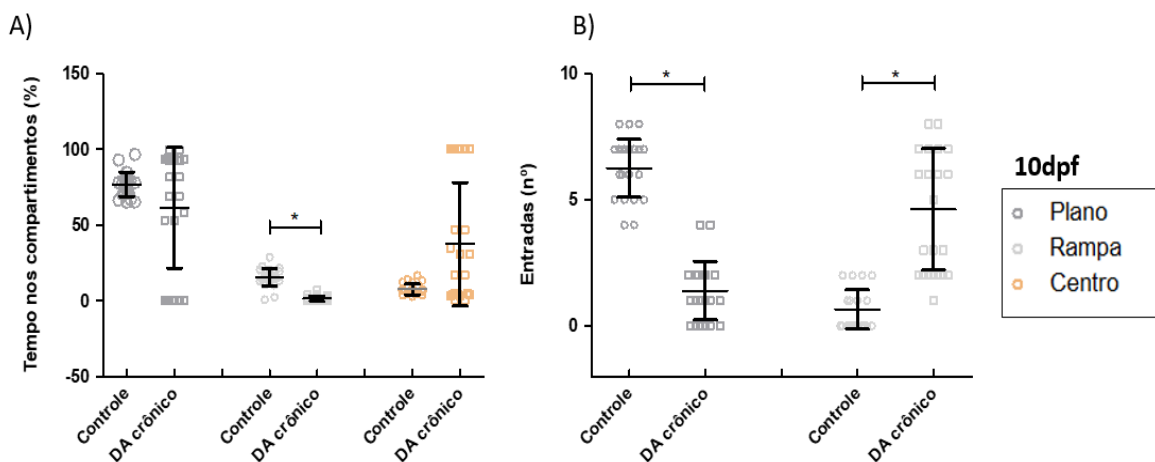


Figura 20. Larvas de 10dpf que passaram pela exposição crônica de dopamina durante a janela de desenvolvimento do 3 ao 5dpf expostas ao teste de LCR: A) tempo de permanência nos compartimentos; B) número de entradas nos braços. Valores representados por N= 25; média aritmética e erro padrão, * $p \leq 0,05$.

As larvas de 14dpf apresentaram diferenças estatísticas para o tempo gasto nos braços planos [T(1,48)=399,000; $p < 0,001$] para o grupo controle e dopamina. A análise estatística também revelou diferença entre o tempo gasto na rampa [T(1,48)=765,000; $p < 0,001$] com relação ao grupo controle, houve também diferenças com relação ao tempo gasto no centro entre os grupos [T(1,48)=729,500; $p = 0,004$] (Figura 21A). A análise estatística para o número de entradas nos braços não apresentou diferenças significativas entre os grupos (Figura 21B).

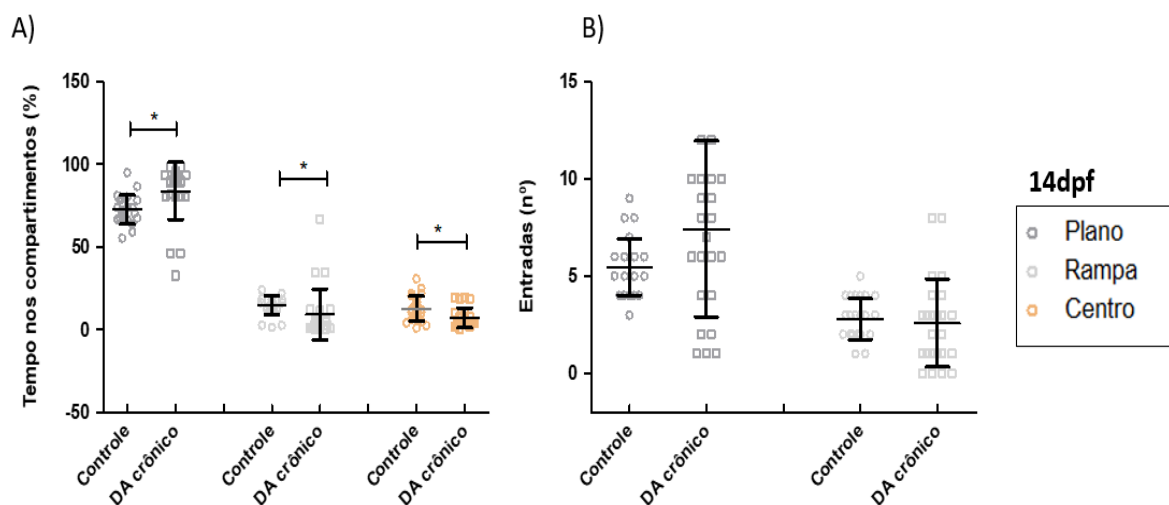


Figura 21. Larvas de 14dpf que passaram pela exposição crônica de dopamina durante a janela de desenvolvimento do 3 ao 5dpf expostas ao teste de LCR: A) tempo de

permanência nos compartimentos; B) número de entradas nos braços. Valores representados por N= 25; média aritmética e erro padrão, * $p \leq 0,05$.

4. Discussão

Muitos distúrbios neuropsiquiátricos estão associados a hipóteses de alterações no neurodesenvolvimento (Bale et al., 2010; Hazlett et al., 2017) e na sinalização dopaminérgica (Howes et al., 2009; Lau et al., 2013; Zarrindast et al., 2015). Neste estudo replicamos tratamentos farmacológicos, com concentrações e métodos baseados em trabalhos anteriores do nosso grupo (Souza et al., 2011; Lima et al., 2020), como a exposição de dopamina durante a janela de desenvolvimento do 3 ao 5dpf, e exposição aguda de dopamina e agonistas D1 e D2 (SKF-38393 e Quinpirole).

Pra investigar como alterações no comportamento tipo-ansiedade podem estar relacionadas a desequilíbrios durante o desenvolvimento, o primeiro objetivo é verificar se a exposição aguda a Dopamina e agonistas D1 e D2 podem causar alterações no comportamento tipo-ansiedade em larvas no LCR. O segundo, é verificar como a exposição crônica de dopamina durante uma janela de desenvolvimento do 3 ao 5dpf altera a resposta tipo-ansiosa em etapas mais posteriores da vida (Souza & Tropepe, 2011).

4.1 Exposições agudas de dopamina e agonistas

Nesta fase do estudo, investigamos os efeitos sob o comportamento tipo ansiedade no LCR das larvas expostas a doses agudas de agonistas dopaminérgicos, respectivamente agonista D1 (SKF-38393) e D2 (Quinpirole), e dose aguda de Dopamina.

É entendido que a ativação de receptores D1 aumentam a atividade motora enquanto que receptores D2 reduzem essa atividade em mamíferos (Jaber et al., 1996), porém, Irons e colaboradores (2013) mostraram que agonistas D1 e D2 (SKF-38393 e Quinpirole) aumentam de forma significativa o comportamento motor em larvas de Zebrafish com 6dpf. Porém ainda é pouco compreendido qual o efeito desses agonistas sob o comportamento tipo-ansiedade.

Os resultados das larvas de 5dpf que foram expostas aos agonistas e dopamina, mostram que em relação ao tempo nos braços planos do labirinto, o Quinpirole, agonista D2, revelou maior tempo de permanência nesse compartimento com relação aos outros grupos (Figura 14). Para o tempo gasto nos braços com rampa, o agonista D2 mostrou diferença em relação ao grupo controle, dessa vez apresentando um menor tempo no

compartimento. Com relação a atividade locomotora, não foram encontradas diferenças em relação ao número de entradas nos braços do Labirinto em Cruz com Rampa.

Com base nas diferenças encontradas, para os resultados das larvas de 5dpf, observamos que houve uma preferência pelos braços planos do aparato para o agonista D2, isso sugere comportamento ansiogênico (preferência pelo compartimento mais seguro) no protocolo do teste do LCR, porém quando comparado esse resultado com o que foi observado no capítulo anterior para larvas de 5dpf, esse dado ainda parece ser inseguro para determinar se o efeito do agonista foi ansiogênico ou ansiolítico. Para isso, análises neuroquímicas podem ser feitas em conjunto ao teste comportamental, para determinar qual efeito o agonista D2 apresentou na larva de 5dpf.

Para as larvas de 10dpf, os agonistas novamente mostraram diferenças com relação ao grupo controle e para o grupo que recebeu dopamina. Para os agonistas D1 e D2, houve menor tempo gasto nos braços planos, e nos braços com rampa. Quanto ao tempo no centro, os agonistas mostraram maior preferência, sugerindo efeito de um comportamento ansioso mais exacerbado, apontando o conflito de escolha para qual compartimento do LCR ir, como freezing, o que pode ser potencializado por uma substância ansiogênica, como mostram trabalhos feitos com roedores no Labirinto em Cruz Elevado (Korte & De Boer, 2003), e em peixes adultos expostos a nicotina (Ziani et al., 2018) e cafeína (Egan et al., 2009).

Com relação ao efeito das substâncias sob o número de entradas nos braços, todos os grupos apresentaram redução da atividade locomotora para os braços planos (Figura 15), e para o número de entradas nas rampas, apenas dopamina e SKF-38393 diferiram do grupo controle, mostrando também uma redução dessa atividade.

Estudos encontrados na literatura sugerem que as larvas de zebrafish exibem alterações comportamentais quando expostas a drogas que são conhecidas por agirem em receptores de dopamina em mamíferos (Irons et al., 2013). Nossos resultados sobre a diminuição da locomoção das larvas de 10dpf no LCR corroboram com um estudo feito por Boehmler e colaboradores (2007) onde foi relatado que a administração aguda de Quinpirole aumenta a atividade locomotora dependendo da dose. Para as larvas de 10dpf então, as doses utilizadas causaram redução da atividade motora e um aumento no comportamento tipo-ansiedade.

Quando analisamos os resultados para as larvas de 14dpf, claramente observamos preferência pelos braços planos dos grupos que receberam os agonistas. Podemos sugerir uma hipótese de que esse comportamento mais ansioso e com menor efeito de congelamento nesta idade, pode estar relacionado ao fato de que larvas de 14dpf estão em um estágio de desenvolvimento e amadurecimento da resposta comportamental para as doses utilizadas com relação às larvas de 10dpf.

Para o número de entradas nos braços do labirinto, novamente observamos em larvas de 14dpf uma redução dessa atividade locomotora, ambos os agonistas D1 e D2 apresentaram redução nesse comportamento quanto comparados com os respectivos grupos controle.

As exposições agudas de dopamina para ambas as idades apresentaram novamente diferenças quanto ao tempo de permanência nos braços, assim como na exposição crônica (discutido logo no próximo tópico), a dose aguda de dopamina revelou efeito ansiogênico e as larvas apresentaram preferência pelos braços planos e redução do número de entradas. Esses resultados sugerem que o aumento da sinalização dopaminérgica não somente na janela de desenvolvimento do 3 ao 5dpf apresenta alterações do comportamento tipo-ansiedade das larvas no LCR.

4.2 Exposição Crônica de Dopamina

Os resultados da exposição crônica de dopamina durante a janela de desenvolvimento do 3 ao 5dpf nas três idades revelaram diferenças quanto ao tempo gasto nos compartimentos do LCR como também o número de entradas nos braços planos e com rampa.

Para as medidas de ansiedade, foi levada em consideração o tempo gasto nos braços planos, com rampa e centro, e para as larvas de 5dpf foi observada uma redução no tempo de permanência nos braços com rampa em comparação ao grupo controle (Figura 11). No capítulo anterior, uma hipótese de que larvas de 5dpf apresentam resposta contrária no LCR foi levantada, onde foi discutido que elas podem preferir nesta idade um ambiente mais exposto, porém nossos resultados quanto ao comportamento tipo-ansiedade no LCR para essas larvas ainda são pouco conclusivos. Com relação ao número

de entradas nos braços, foi revelada uma diminuição da atividade locomotora para larvas que passaram pelo tratamento crônico de dopamina.

Assim como nas larvas de 5dpf, larvas de 10 dias que passaram pela exposição crônica revelaram diferenças quanto ao tempo de permanência nos braços com rampa, quando comparado com o grupo controle, houve uma diminuição do tempo gasto nesses braços, o que sugere efeito ansiogênico da exposição crônica em larvas que foram testadas aos 10dpf; houve um aumento no número de entradas nos braços com rampa com relação ao grupo controle, novamente apontando as alterações da atividade locomotora em larvas que passaram pela exposição crônica de dopamina durante a janela de desenvolvimento.

Larvas de 14dpf apresentaram diferenças quanto ao tempo de permanência para todos os braços, mostrando haver uma diminuição no tempo gasto nos braços com rampa e aumento de permanência nos braços planos. Quanto a atividade locomotora não foi encontrada diferenças para essa idade.

Os resultados mostram que houve alteração no comportamento tipo ansiedade no teste de Labirinto em Cruz com Rampa em larvas de ambas as idades que passaram pela exposição durante a janela de desenvolvimento, os resultados mostram que a exposição crônica apresentou alterações em larvas de 10 e 14dpf, revelando efeito ansiogênico, quando há maior preferência pelos compartimentos planos (mais seguros) do aparato.

Essa resposta tipo-ansiosa em larvas de 10 e 14dpf sugerem que larvas dessas idades já apresentam um desenvolvimento mais maduro que larvas de 5dpf, o que mostra que, mesmo após todo o desenvolvimento que essas larvas apresentam, as alterações durante o tratamento crônico foram mantidas e podem ser observadas de maneira mais nítida.

No estudo anterior deste trabalho, que as larvas de 5dpf demonstram ainda uma resposta imatura no teste de Labirinto em Cruz com Rampa, por conta disso, há uma hipótese que elas possuem uma preferência pelos braços mais expostos do aparato, visto que nessa idade elas ainda não tenham a percepção do que é raso ou fundo (Mork & Crump, 2015), por isso, os resultados para avaliar a ansiedade nessas larvas no LCR ainda são pouco conclusivos. Porém, quanto a atividade locomotora das larvas de 5dpf, observamos que houve uma menor atividade para larvas que passaram pelo tratamento crônico de dopamina (Figura 11), o que mostra, e corrobora, com estudos anteriores, que

a exposição crônica de dopamina durante a janela de desenvolvimento do 3 ao 5dpf reduz o número de receptores GABAérgicos quanto o número de movimentos iniciados em larvas com 5dpf (Souza et al., 2011).

5 Conclusões

Dado o exposto no presente estudo, nossos resultados sugerem que pouco ainda sabemos sobre a maquinaria do sistema dopaminérgico em zebrafish. As larvas apresentaram maior comportamento ansiogênico e redução da atividade motora para todas as exposições, com agonistas e dopamina, o que levanta a hipótese de haver diversos fatores envolvidos, como as diferenças individuais dos animais, as diferentes fases larvais e janelas de desenvolvimento. Diferindo novamente de outros resultados encontrados na literatura. Porém levamos em consideração que essas respostas comportamentais podem estar influenciadas pelo protocolo do teste de Labirinto em Cruz com Rampa, recém adaptado para larvas de zebrafish.

Dessa forma, para confirmar os efeitos dessas substâncias em larvas, seria necessária uma medição mais específica das drogas e células receptoras, além do auxílio de análises neurobioquímicas mais aprofundadas junto ao teste comportamental, para que assim possamos compreender com mais segurança quais os circuitos estariam envolvidos nas alterações observadas no nosso trabalho.

Referências

- Adhikari, A., Topiwala, M. A., & Gordon, J. A. (2010). Synchronized activity between the ventral hippocampus and the medial prefrontal cortex during anxiety. *Neuron*, *65*(2), 257–269. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2009.12.002>
- Agmo, A., Belzung, C., & Rodríguez, C. (1997). A rat model of distractibility: effects of drugs modifying dopaminergic, noradrenergic and GABAergic neurotransmission. *Journal of neural transmission (Vienna, Austria : 1996)*, *104*(1), 11–29. <https://doi.org/10.1007/BF01271291>
- Ahmad, F., & Richardson, M. K. (2013). Exploratory behaviour in the open field test adapted for larval zebrafish: impact of environmental complexity. *Behavioural processes*, *92*, 88–98. <https://doi.org/10.1016/j.beproc.2012.10.014>
- Alia, A. O., & Petrunich-Rutherford, M. L. (2019). Anxiety-like behavior and whole-body cortisol responses to components of energy drinks in zebrafish (*Danio rerio*). *PeerJ*, *7*, e7546. <https://doi.org/10.7717/peerj.7546>
- Anisman, H., & Matheson, K. (2005). Stress, depression, and anhedonia: caveats concerning animal models. *Neuroscience and biobehavioral reviews*, *29*(4-5), 525–546. <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2005.03.007>
- Bai, Y., Liu, H., Huang, B., Wagle, M., & Guo, S. (2016). Identification of environmental stressors and validation of light preference as a measure of anxiety in larval zebrafish. *BMC neuroscience*, *17*(1), 63. <https://doi.org/10.1186/s12868-016-0298-z>
- Baiamonte, M., Parker, M. O., Vinson, G. P., & Brennan, C. H. (2016). Sustained Effects of Developmental Exposure to Ethanol on Zebrafish Anxiety-Like Behaviour. *PloS one*, *11*(2), e0148425. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0148425>
- Bale, T. L., Baram, T. Z., Brown, A. S., Goldstein, J. M., Insel, T. R., McCarthy, M. M., Nemeroff, C. B., Reyes, T. M., Simerly, R. B., Susser, E. S., & Nestler, E. J. (2010). Early life programming and neurodevelopmental disorders. *Biological psychiatry*, *68*(4), 314–319. <https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2010.05.028>
- Basnet, R. M., Zizioli, D., Taweedet, S., Finazzi, D., & Memo, M. (2019). Zebrafish Larvae as a Behavioral Model in Neuropharmacology. *Biomedicines*, *7*(1), 23. <https://doi.org/10.3390/biomedicines7010023>
- Baumans, V. (2007). The welfare of laboratory mice. In E. Kaliste. *The Welfare of Laboratory Animals* (v.2, pp.119-152). Dordrecht: Springer. [DOI: 10.1007/978-1-4020-2271-5_7].
- Beaulieu, J., & Gainetdinov, R. R. (2011). The Physiology, Signaling, and Pharmacology of Dopamine Receptors. *63*(1), 182–217. <https://doi.org/10.1124/pr.110.002642>
- Berke, J. D. (2018). What does dopamine mean?. *Nature neuroscience*, *21*(6), 787–793. <https://doi.org/10.1038/s41593-018-0152->
- Blaser, R. E., Chadwick, L., & McGinnis, G. C. (2010). Behavioral measures of anxiety in zebrafish (*Danio rerio*). *Behavioural brain research*, *208*(1), 56–62. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2009.11.009>
- Blaser, R. E., Goldsteinholm, K. (2012). Depth preference in zebrafish, *Danio rerio*: control by surface and substrate cues. *Animal Behaviour*, [S.L.], v. 83, n. 4, p. 953-959, <http://dx.doi.org/10.1016/j.anbehav.2012.01.014>.
- Boehmler, W., Carr, T., Thisse, C., Thisse, B., Canfield, V. A., & Levenson, R. (2007). D4 Dopamine receptor genes of zebrafish and effects of the antipsychotic clozapine on larval swimming behaviour. *Genes, brain, and behavior*, *6*(2), 155–166. <https://doi.org/10.1111/j.1601-183X.2006.00243.x>

- Bourin M. (2019). The test retest model of anxiety: An appraisal of findings to explain benzodiazepine tolerance. *Pharmacology, biochemistry, and behavior*, 178, 39–41. <https://doi.org/10.1016/j.pbb.2017.12.009>
- Brito, T. M. (2011) *Validação da preferência claro/escuro como modelo comportamental de ansiedade no Carassius auratus (peixe dourado)*. Dissertação de Mestrado, Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, SP, Brasil.
- Campos, A. C., Fogaça, M. V., Aguiar, D. C., & Guimarães, F. S. (2013). Animal models of anxiety disorders and stress. *Revista Brasileira de Psiquiatria*, 35(SUPPL.2), 101–111. <https://doi.org/10.1590/1516-4446-2013-1139>
- Cao, Y., Yan, H., Yu, G., & Su, R. (2019). Flumazenil-insensitive benzodiazepine binding sites in GABA_A receptors contribute to benzodiazepine-induced immobility in zebrafish larvae. *Life sciences*, 239, 117033. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2019.117033>
- Chakravarthy, S., Balasubramani, P. P., Mandali, A., Jahanshahi, M., & Moustafa, A. A. (2018). The many facets of dopamine: Toward an integrative theory of the role of dopamine in managing the body's energy resources. *Physiology & behavior*, 195, 128–141. <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2018.06.032>
- Coelho, L., Chaves, E., Vasconcelos, S., Fonteles, M., De Sousa, F., & Viana, G. (2010). Transtorno do déficit de atenção e hiperatividade (TDAH) na criança: aspectos neurobiológicos, diagnóstico e conduta terapêutica [Attention deficit hyperactivity disorder (ADHD) in children: neurobiological aspects, diagnosis and therapeutic approach]. *Acta medica portuguesa*, 23(4), 689–696.
- Cruz, F. F., Leite, C. E., Kist, L. W., de Oliveira, G. M., Bogo, M. R., Bonan, C. D., Campos, M. M., & Morrone, F. B. (2017). Effects of caffeine on behavioral and inflammatory changes elicited by copper in zebrafish larvae: Role of adenosine receptors. *Comparative biochemistry and physiology. Toxicology & pharmacology : CBP*, 194, 28–36. <https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2017.01.007>
- Curran, L., Sharpe, L., & Butow, P. (2017). Anxiety in the context of cancer: A systematic review and development of an integrated model. *Clinical psychology review*, 56, 40–54. <https://doi.org/10.1016/j.cpr.2017.06.003>
- Dark, C., Homman-Ludiye, J., & Bryson-Richardson, R. J. (2018). The role of ADHD associated genes in neurodevelopment. *Developmental biology*, 438(2), 69–83. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2018.03.023>
- de Abreu, M. S., Giacomini, A., Echevarria, D. J., & Kalueff, A. V. (2019). Legal aspects of zebrafish neuropharmacology and neurotoxicology research. *Regulatory toxicology and pharmacology : RTP*, 101, 65–70. <https://doi.org/10.1016/j.yrtph.2018.11.007>
- de la Mora, M. P., Gallegos-Cari, A., Arizmendi-García, Y., Marcellino, D., & Fuxe, K. (2010). Role of dopamine receptor mechanisms in the amygdaloid modulation of fear and anxiety: Structural and functional analysis. *Progress in neurobiology*, 90(2), 198–216. <https://doi.org/10.1016/j.pneurobio.2009.10.010>
- de Souza Lima, A., de Alvarenga, K., Codo, B. C., Sacramento, E. K., Rosa, D., Souza, R. P., Romano-Silva, M. A., & Souza, B. R. (2020). Impairment of motor but not anxiety-like behavior caused by the increase of dopamine during development is sustained in zebrafish larvae at later stages. *International journal of developmental neuroscience : the official journal of the International Society for Developmental Neuroscience*, 80(2), 106–122. <https://doi.org/10.1002/jdn.10009>

- de Souza, I. M., & Machado-De-Sousa, J. P. (2017). Brazil: World leader in anxiety and depression rates. In *Revista Brasileira de Psiquiatria* (Vol. 39, Issue 4, p. 384). Associacao Brasileira de Psiquiatria. <https://doi.org/10.1590/1516-4446-2017-2300>
- Egan, R. J., Bergner, C. L., Hart, P. C., Cachat, J. M., Canavella, P. R., Elegante, M. F., Elkhayat, S. I., Bartels, B. K., Tien, A. K., Tien, D. H., Mohnot, S., Beeson, E., Glasgow, E., Amri, H., Zukowska, Z., & Kalueff, A. V. (2009). Understanding behavioral and physiological phenotypes of stress and anxiety in zebrafish. *Behavioural Brain Research*, 205(1), 38–44. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2009.06.022>
- Felger, J. C., & Treadway, M. T. (2017). Inflammation Effects on Motivation and Motor Activity: Role of Dopamine. *Neuropsychopharmacology : official publication of the American College of Neuropsychopharmacology*, 42(1), 216–241. <https://doi.org/10.1038/npp.2016.143>
- Fitzgerald, J. A., Kirla, K. T., Zinner, C. P., & Vom Berg, C. M. (2019). Emergence of consistent intra-individual locomotor patterns during zebrafish development. *Scientific reports*, 9(1), 13647. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-49614-y>
- Fonseka, T. M., Wen, X., Foster, J. A., & Kennedy, S. H. (2016). Review Zebrafish Models of Major Depressive Disorders. 14(October 2015), 3–14. <https://doi.org/10.1002/jnr.23639>
- Garay, R. P., Samalin, L., Hameg, A., & Llorca, P. M. (2015). Investigational drugs for anxiety in patients with schizophrenia. *Expert Opinion on Investigational Drugs*, 24(4), 507–517. <https://doi.org/10.1517/13543784.2014.987339>
- Gerlai R. (2010). Zebrafish antipredatory responses: a future for translational research?. *Behavioural brain research*, 207(2), 223–231. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2009.10.008>
- Giacobbe, P., & Flint, A. (2018). Diagnosis and Management of Anxiety Disorders. *Continuum (Minneapolis, Minn.)*, 24(3, BEHAVIORAL NEUROLOGY AND PSYCHIATRY), 893–919. <https://doi.org/10.1212/CON.0000000000000607>
- Girault, J. B., & Piven, J. (2020). The Neurodevelopment of Autism from Infancy Through Toddlerhood. *Neuroimaging clinics of North America*, 30(1), 97–114. <https://doi.org/10.1016/j.nic.2019.09.009>
- Guo, N., Lin, J., Peng, X., Chen, H., Zhang, Y., Liu, X., & Li, Q. (2015). Influences of acute ethanol exposure on locomotor activities of zebrafish larvae under different illumination. *Alcohol (Fayetteville, N.Y.)*, 49(7), 727–737. <https://doi.org/10.1016/j.alcohol.2015.08.003>
- Haghani, S., Karia, M., Cheng, R. K., & Mathuru, A. S. (2019). An Automated Assay System to Study Novel Tank Induced Anxiety. *Frontiers in behavioral neuroscience*, 13, 180. <https://doi.org/10.3389/fnbeh.2019.00180>
- Handley, S. L., & Mithani, S. (1984). Effects of alpha-adrenoceptor agonists and antagonists in a maze-exploration model of 'fear'-motivated behaviour. *Naunyn-Schmiedeberg's archives of pharmacology*, 327(1), 1–5. <https://doi.org/10.1007/BF00504983>
- Hazlett, H. C., Gu, H., Munsell, B. C., Kim, S. H., Styner, M., Wolff, J. J., Elison, J. T., Swanson, M. R., Zhu, H., Botteron, K. N., Collins, D. L., Constantino, J. N., Dager, S. R., Estes, A. M., Evans, A. C., Fonov, V. S., Gerig, G., Kostopoulos, P., McKinstry, R. C., Pandey, J., ... Statistical Analysis (2017). Early brain development in infants at high risk for autism spectrum disorder. *Nature*, 542(7641), 348–351. <https://doi.org/10.1038/nature21369>
- Howe, K., Clark, M. D., Torroja, C. F., Torrance, J., Berthelot, C., Muffato, M. et al. (2013). The Zebrafish reference genome sequence and its relationship to the human genome. *Nature*. 496(7446),498–503. [DOI: 10.1038/nature12111].

- Howes, O. D., & Kapur, S. (2009). The dopamine hypothesis of schizophrenia: version III--the final common pathway. *Schizophrenia bulletin*, 35(3), 549–562. <https://doi.org/10.1093/schbul/sbp006>
- Howes, O. D., McCutcheon, R., Owen, M. J., & Murray, R. M. (2017). The Role of Genes, Stress, and Dopamine in the Development of Schizophrenia. *Biological Psychiatry*, 81(1), 9–20. <https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2016.07.014>
- Jaber, M., Robinson, S. W., Missale, C., & Caron, M. G. (1996). Dopamine receptors and brain function. *Neuropharmacology*, 35(11), 1503–1519. [https://doi.org/10.1016/s0028-3908\(96\)00100-1](https://doi.org/10.1016/s0028-3908(96)00100-1)
- Kaliste, E. & Mering, S. (2007). The welfare of laboratory rats. In E. Kaliste. *The Welfare of Laboratory Animals*. 2,153-180. Dordrecht: Springer. [DOI: 10.1007/978-1-4020-2271-5_7].
- Kalueff, A. V., Stewart, A. M., & Gerlai, R. (2014). Zebrafish as an emerging model for studying complex brain disorders. *Trends in pharmacological sciences*, 35(2), 63–75. <https://doi.org/10.1016/j.tips.2013.12.002>
- Kaslin, J. & Panula, P. (2001). Comparative anatomy of the histaminergic and other aminergic systems in *Zebrafish (Danio rerio)*. *J Com Neurol*, 440(4),342-377. [PMID: 11745628].
- Kimmel, C. B., Ballard, W. W., Kimmel, S. R., Ullmann, B., & Schilling, T. F. (1995). Stages of Embryonic Development of the Zebrafish.
- Korte, S. M., & De Boer, S. F. (2003). A robust animal model of state anxiety: Fear-potentiated behaviour in the elevated plus-maze. *European Journal of Pharmacology*, 463(1–3), 163–175. [https://doi.org/10.1016/S0014-2999\(03\)01279-2](https://doi.org/10.1016/S0014-2999(03)01279-2)
- Lau, C. I., Wang, H. C., Hsu, J. L., & Liu, M. E. (2013). Does the dopamine hypothesis explain schizophrenia?. *Reviews in the neurosciences*, 24(4), 389–400. <https://doi.org/10.1515/revneuro-2013-0011>
- LeDoux, J. E., & Pine, D. S. (2016). Using Neuroscience to Help Understand Fear and Anxiety: A Two-System Framework. *The American journal of psychiatry*, 173(11), 1083–1093. <https://doi.org/10.1176/appi.ajp.2016.16030353>
- MacPhail, R. C., Brooks, J., Hunter, D. L., Padnos, B., Irons, T. D., & Padilla, S. (2009). Locomotion in larval zebrafish: Influence of time of day, lighting and ethanol. *Neurotoxicology*, 30(1), 52–58. <https://doi.org/10.1016/j.neuro.2008.09.011>
- Magno, L. D., Fontes, A., Gonçalves, B. M. & Gouveia Jr, A. (2015). Pharmacological study of the light/dark preference test in *Zebrafish (Danio rerio)*: Waterborne administration. *Pharmacol Biochem Behav*, 135,169-176. [DOI: 10.1016/j.pbb.2015.05.014].
- Maximino, C. (2011) *Parâmetros da escototaxia como modelo comportamental de ansiedade no paulistinha (Danio rerio, Cyprinidae, pisces)*. Dissertação (Mestrado em Neurociências e Biologia Celular)- Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Pará, Pará, Brasil.
- Maximino, C., de Brito, T. M., Colmanetti, R., Pontes, A. A., de Castro, H. M., de Lacerda, R. I., Morato, S., & Gouveia, A., Jr (2010). Parametric analyses of anxiety in zebrafish scototaxis. *Behavioural brain research*, 210(1), 1–7. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2010.01.031>
- Meier, S. M., & Deckert, J. (2019). Genetics of Anxiety Disorders. *Current psychiatry reports*, 21(3), 16. <https://doi.org/10.1007/s11920-019-1002-7>
- Meshalkina, D. A., Kizlyk, M. N., Kysil, E. V., Collier, A. D., Echevarria, D. J., Abreu, M. S., Barcellos, L., Song, C., & Kalueff, A. V. (2017). Understanding zebrafish cognition. *Behavioural processes*, 141(Pt 2), 229–241. <https://doi.org/10.1016/j.beproc.2016.11.020>

- Mork, L., & Crump, G. (2015). Zebrafish Craniofacial Development: A Window into Early Patterning. *Current topics in developmental biology*, *115*, 235–269. <https://doi.org/10.1016/bs.ctdb.2015.07.001>
- Orešković S. (2016). Breaking down the Silo Mentality in Global Mental Health: The New Role for the Schools of Public Health. *Psychiatria Danubina*, *28*(4), 318–320.
- Palmér, T., Ek, F., Enqvist, O., Olsson, R., Åström, K., & Petersson, P. (2017). Action sequencing in the spontaneous swimming behavior of zebrafish larvae - implications for drug development. *Scientific reports*, *7*(1), 3191. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-03144-7>
- Panula, P., Chen, Y. C., Priyadarshini, M., Kudo, H., Semenova, S., Sundvik, M., & Sallinen, V. (2010). The comparative neuroanatomy and neurochemistry of zebrafish CNS systems of relevance to human neuropsychiatric diseases. In *Neurobiology of Disease* (Vol. 40, Issue 1, pp. 46–57). <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2010.05.010>
- Pavál, D. (2017). A Dopamine Hypothesis of Autism Spectrum Disorder. *Developmental Neuroscience*, *39*(5), 355–360. <https://doi.org/10.1159/000478725>
- Pellow, S., & File, S. E. (1986). Anxiolytic and anxiogenic drug effects on exploratory activity in an elevated plus-maze: a novel test of anxiety in the rat. *Pharmacology, biochemistry, and behavior*, *24*(3), 525–529. [https://doi.org/10.1016/0091-3057\(86\)90552-6](https://doi.org/10.1016/0091-3057(86)90552-6)
- Ramlan, N. F., Sata, N., Hassan, S. N., Bakar, N. A., Ahmad, S., Zulkifli, S. Z., Abdullah, C., & Ibrahim, W. (2017). Time dependent effect of chronic embryonic exposure to ethanol on zebrafish: Morphology, biochemical and anxiety alterations. *Behavioural brain research*, *332*, 40–49. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2017.05.048>
- Ribeiro, S. J., & De Lima, T. C. (1998). Naloxone-induced changes in tachykinin NK3 receptor modulation of experimental anxiety in mice. *Neuroscience letters*, *258*(3), 155–158. [https://doi.org/10.1016/s0304-3940\(98\)00880-5](https://doi.org/10.1016/s0304-3940(98)00880-5)
- Rico, E. P., Rosemberg, D. B., Dias, R. D., Bogo, M. R., & Bonan, C. D. (2007). Ethanol alters acetylcholinesterase activity and gene expression in zebrafish brain. *Toxicology letters*, *174*(1-3), 25–30. <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2007.08.005>
- Robinson, J. E., & Gradinaru, V. (2018). Dopaminergic dysfunction in neurodevelopmental disorders: recent advances and synergistic technologies to aid basic research. *Current Opinion in Neurobiology*, *48*, 17–29. <https://doi.org/10.1016/j.conb.2017.08.003>
- Rodgers, R. J., & Dalvi, A. (1997). Anxiety, defence and the elevated plus-maze. *Neuroscience and biobehavioral reviews*, *21*(6), 801–810. [https://doi.org/10.1016/s0149-7634\(96\)00058-9](https://doi.org/10.1016/s0149-7634(96)00058-9)
- Roth, G., & Dicke, U. (2012). Evolution of the brain and intelligence in primates. *Progress in brain research*, *195*, 413–430. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-53860-4.00020-9>
- Rudolph, U., & Knoflach, F. (2011). Beyond classical benzodiazepines: Novel therapeutic potential of GABA_A receptor subtypes. *Nat Rev Drug Discov*, *10*(9), 685–697. [DOI: 10.1038/nrd3502].
- Schneiderman, N., Ironson, G., & Siegel, S. D. (2005). Stress and health: psychological, behavioral, and biological determinants. *Annual review of clinical psychology*, *1*, 607–628. <https://doi.org/10.1146/annurev.clinpsy.1.102803.144141>
- Schweitzer, J., & Driever, W. (2009). Development of the dopamine systems in Zebrafish. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, *651*, 1–14. https://doi.org/10.1007/978-1-4419-0322-8_1
- Souza, B. R., & Tropepe, V. (2011). The role of dopaminergic signalling during larval zebrafish brain development: a tool for investigating the developmental basis of neuropsychiatric disorders. *Reviews in the neurosciences*, *22*(1), 107–119. <https://doi.org/10.1515/RNS.2011.012>

- Souza, B. R., Romano-Silva, M. A., & Tropepe, V. (2011). Dopamine D2 receptor activity modulates Akt signaling and alters GABAergic neuron development and motor behavior in zebrafish larvae. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, *31*(14), 5512–5525. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.5548-10.2011>
- Steenbergen, P. J., Richardson, M. K., & Champagne, D. L. (2011). The use of the zebrafish model in stress research. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*, *35*(6), 1432–1451. <https://doi.org/10.1016/j.pnpbp.2010.10.010>
- Stein, D. J., Scott, K. M., de Jonge, P., & Kessler, R. C. (2017). Epidemiology of anxiety disorders: from surveys to nosology and back. *Dialogues in clinical neuroscience*, *19*(2), 127–136.
- Stewart, A. M., Gaikwad, S., Kyzar, E., & Kalueff, A. V. (2012). Understanding spatio-temporal strategies of adult zebrafish exploration in the open field test. *Brain research*, *1451*, 44–52. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2012.02.064>
- Stubbs, B., Vancampfort, D., Rosenbaum, S., Firth, J., Cosco, T., Veronese, N., Salum, G. A., & Schuch, F. B. (2017). An examination of the anxiolytic effects of exercise for people with anxiety and stress-related disorders: A meta-analysis. *Psychiatry research*, *249*, 102–108. <https://doi.org/10.1016/j.psychres.2016.12.020>
- Sylvain, N. J., Brewster, D. L., & Ali, D. W. (2010). Zebrafish embryos exposed to alcohol undergo abnormal development of motor neurons and muscle fibers. *Neurotoxicology and teratology*, *32*(4), 472–480. <https://doi.org/10.1016/j.ntt.2010.03.001>
- Tank, A. W., & Lee Wong, D. (2015). Peripheral and central effects of circulating catecholamines. *Comprehensive Physiology*, *5*(1), 1–15. <https://doi.org/10.1002/cphy.c140007>
- Tsang, B., Ansari, R., & Gerlai, R. (2019). Dose dependent behavioral effects of acute alcohol administration in zebrafish fry. *Pharmacology, biochemistry, and behavior*, *179*, 124–133. <https://doi.org/10.1016/j.pbb.2019.02.011>
- Vanwalleghe, G. C., Ahrens, M. B., & Scott, E. K. (2018). Integrative whole-brain neuroscience in larval zebrafish. *Current opinion in neurobiology*, *50*, 136–145. <https://doi.org/10.1016/j.conb.2018.02.004>
- Varga, M., Demeter, K., Mikics, É., Haller, J., & Aliczki, M. (2018). The swimming plus-maze test: a novel high-throughput model for assessment of anxiety-related behaviour in larval and juvenile zebrafish (*Danio rerio*). *Scientific reports*, *8*(1), 16590. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-34989-1>
- Varga, Z. K., Zsigmond, Á., Pejtsik, D., Varga, M., Demeter, K., Mikics, É., Haller, J., & Aliczki, M. (2018). The swimming plus-maze test: a novel high-throughput model for assessment of anxiety-related behaviour in larval and juvenile zebrafish (*Danio rerio*). *Scientific reports*, *8*(1), 16590. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-34989-1>
- Viveros, M. P., Marco, E. M., & File, S. E. (2005). Endocannabinoid system and stress and anxiety responses. *Pharmacology, biochemistry, and behavior*, *81*(2), 331–342. <https://doi.org/10.1016/j.pbb.2005.01.029>
- Walf, A. A., & Frye, C. A. (2007). The use of the elevated plus maze as an assay of anxiety-related behavior in rodents. *Nature protocols*, *2*(2), 322–328. <https://doi.org/10.1038/nprot.2007.44>
- Walsh-Monteiro, A., dos Santos, R., Sanches, É. M., de Carvalho, A. C. C., de Brito e Silva, Y. C., Chirinéa, G., & Gouveia, A. (2016). A new anxiety test for zebrafish: Plus maze with ramp. *Psychology and Neuroscience*, *9*(4), 457–464. <https://doi.org/10.1037/pne0000067>
- Willner, P. & Mitchell, P. J. (2002). The validity of animal models of predisposition to depression. *Behav Pharmacol*, *13*(3), 169–188. [PMID: 12122308].

- Wu, Z., Yang, Z., Zhang, M., Bao, X., Han, F., & Li, L. (2018). The role of N-methyl-D-aspartate receptors and metabotropic glutamate receptor 5 in the prepulse inhibition paradigms for studying schizophrenia: pharmacology, neurodevelopment, and genetics. *Behavioural pharmacology*, 29(1), 13–27. <https://doi.org/10.1097/FBP.0000000000000352>
- Varga, Z. K., Zsigmond, Á., Pejtsik, D.
- Yamamoto, K., Fontaine, R., Pasqualini, C., & Vernier, P. (2015). Classification of dopamine receptor genes in vertebrates: Nine sub- types in osteichthyes. *Brain, Behavior and Evolution*, 2015, 167–178. <https://doi.org/10.1159/000441550>
- Zahid, H., Tsang, B., Ahmed, H., Lee, R., Tran, S., & Gerlai, R. (2018). Diazepam fails to alter anxiety-like responses but affects motor function in a white-black test paradigm in larval zebrafish (*Danio rerio*). *Progress in neuro-psychopharmacology & biological psychiatry*, 83, 127–136. <https://doi.org/10.1016/j.pnpbp.2018.01.012>
- Zarrindast, M. R., & Khakpai, F. (2015). The Modulatory Role of Dopamine in Anxiety-like Behavior. *Archives of Iranian medicine*, 18(9), 591–603.
- Zarrindast, M. R., & Khakpai, F. (2015). The Modulatory Role of Dopamine in Anxiety-like Behavior. *Archives of Iranian medicine*, 18(9), 591–603.
- Ziani, P. R., Müller, T. E., Stefanello, F. V., Fontana, B. D., Duarte, T., Canzian, J., & Rosemberg, D. B. (2018). Nicotine increases fear responses and brain acetylcholinesterase activity in a context-dependent manner in zebrafish. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 170(2017), 36–43. <https://doi.org/10.1016/j.pbb.2018.05.004>
- Zwanzger P. (2016). Pharmakotherapie bei Angsterkrankungen [Pharmacotherapy of Anxiety Disorders]. *Fortschritte der Neurologie-Psychiatrie*, 84(5), 306–314. <https://doi.org/10.1055/s-0042-106764>