



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM NEUROCIÊNCIAS E BIOLOGIA CELULAR

LÍLIAN DANIELLE PAIVA MAGNO

VALIDAÇÃO FARMACOLÓGICA DA PREFERÊNCIA CLARO-ESCURO EM
Danio rerio

BELÉM – PARÁ
2012

LÍLIAN DANIELLE PAIVA MAGNO

VALIDAÇÃO FARMACOLÓGICA DA PREFERÊNCIA CLARO-ESCURO EM
Danio rerio

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Neurociências e Biologia Celular da Universidade Federal do Pará, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Neurociências. Sob a orientação do Prof. Dr. Amauri Gouveia Jr.

BELÉM – PARÁ

2012

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)
Biblioteca Central / UFPA – Belém, Pará - Brasil

Magno, Lílian Danielle Paiva
Validação farmacológica da preferência claro-escuro em *Danio rerio* / Lílian
Danielle Paiva Magno - 2011

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do Pará, Instituto de Ciências
Biológicas Programa de Pós-Graduação em Neurociências e Biologia Celular,
Belém, 2012. Orientador: Prof. Dr. Amauri Gouveia Jr.

1 Farmacologia. 2. *Danio rerio*. 3. Ansiedade. 4. Gouveia Jr., Amauri, orient. I.
Título

CDD-615.1

LÍLIAN DANIELLE PAIVA MAGNO

VALIDAÇÃO FARMACOLÓGICA DA PREFERÊNCIA CLARO-ESCURO EM
Danio rerio

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Neurociências e Biologia Celular da Universidade Federal do Pará, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Neurociências. Sob a orientação do Prof. Dr. Amauri Gouveia Jr.

Belém, 23 de abril de 2012

COMISSÃO EXAMINADORA

Prof. Dr. Amauri Gouveia Jr. (Orientador)

Prof^a Dr^a Edna Cristina Santos Franco (IEC-PA)

Prof. Dr. Moisés Hamoy (UFPA)

AGRADECIMENTOS

A Deus, meu anjo da guarda e espíritos de luz que me guiaram por todo o caminho.

Ao Prof. Dr. Amauri Gouveia Jr., por ter me acolhido em seu laboratório, pela orientação, pelos conselhos e pela confiança depositada em mim.

A todo os colegas do Laboratório de Neurociências e Comportamento (LabNeC), em particular Beatriz Nocy, João Neto, Paula Carvalho, Bruno Rodrigues e Claudio Dias.

Aos queridos, Aldo Fontes e Edilane Costa, pelo apoio.

A Ketlin Castro, se não fosse por ela, não teria me inscrito para realizar a prova do mestrado.

Aos colegas do Programa de Pós-Graduação em Neurociências e Biologia Celular, em especial a Mellina Jacob, minha parceira de estudos nas disciplinas.

A banca da qualificação do projeto, Prof. Dr^a Maria Elena Crespo López e Prof^a Dr^a Edna Cristina Santos Franco, pelas recomendações que auxiliaram a aprimorar este trabalho.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela bolsa concedida.

Aos meus pais, Jorge e Leonor Magno, e irmãos, Fernando e Jorge Henrique Magno.

“A dúvida é o princípio da sabedoria”
(Aristóteles)

RESUMO

A ansiedade é uma desordem complexa e com grande relevância clínica, cujo estudo com modelos animais é importante para pesquisar sobre seus mecanismos e drogas para o seu tratamento. O *zebrafish* figura como um potencial modelo animal para pesquisas farmacológicas da ansiedade. Um modelo de ansiedade é a preferência claro-escuro, que já foi validado comportamentalmente em *zebrafish*, contudo necessita de uma validação farmacológica. Objetiva-se descrever a sensibilidade da preferência claro-escuro em *zebrafish* adultos para as drogas mais utilizadas na clínica da ansiedade, foram administradas pela imersão do animal na solução: Benzodiazepínicos (Clonazepam); Agonistas parciais 5-HT_{1A} (Buspirona); Antidepressivo tricíclico (Imipramina); Antidepressivo ISRS (Fluoxetina e Paroxetina); Antipsicóticos (Haloperidol e Risperidona); Psicostimulante (Dietilpropiona); Beta bloqueadores (Propranolol) e Depressores do SNC (Etanol). Os parâmetros analisados foram o tempo despendido pelo animal no ambiente escuro, o tempo da primeira latência e número de alternâncias. O clonazepam administrado por 300s aumentou o tempo no escuro na menor concentração e reduziu a atividade locomotora, a administração durante 600s da concentração intermediária diminuiu o tempo no escuro e da primeira latência, assim como aumentou a atividade locomotora, indicando efeito ansiolítico. A buspirona aumentou o tempo de permanência no escuro provavelmente devido a redução da atividade motora. A imipramina e a fluoxetina aumentaram o tempo no escuro e da primeira latência e diminuíram o número de alternâncias, indicando ação ansiogênica. A paroxetina não alterou o tempo no escuro, entretanto aumentou o tempo da primeira latência e diminuiu a atividade locomotora. O haloperidol diminuiu a ansiedade na menor concentração, curiosamente aumentou a atividade motora na maior concentração, ao contrário da risperidona que diminuiu a atividade na maior concentração. A dietilpropiona não modificou o tempo no escuro, mas aumentou o tempo da primeira latência e diminuiu a atividade motora apenas na menor concentração. O propranolol reduziu somente o tempo no escuro. O etanol foi efetivo na redução da ansiedade com a concentração intermediária e diminuiu a atividade locomotora em uma concentração menor. Os dados corroboram com relatos da literatura em *Danio rerio* tanto neste modelo em administração intraperitoneal como em outros modelos por administração hídrica e em roedores, quando foi possível a comparação.

Palavras-chave: Ansiedade, Drogas, Comportamento, *Danio rerio*, Modelo

ABSTRACT

Anxiety is a complex disorder with large clinical relevance, whose study with animal models is important for research about their mechanisms and drugs for their treatment. The zebrafish appears as a potential animal model for pharmacological research in anxiety. A model of anxiety is the light-dark preference, which has been validated behaviorally in zebrafish, however, requires a pharmacological validation. The objective is to describe the sensitivity of the light-dark preference in zebrafish adults for the most common drugs in clinical anxiety, were administered by immersing the animal in the solution: Benzodiazepines (Clonazepam), 5-HT_{1A} partial agonists (Buspirone), Tricyclic Antidepressant (Imipramine), Antidepressant SSRIs (Fluoxetine and Paroxetine), Antipsychotics (Haloperidol and Risperidone); Psychostimulant (Diethylpropion), Beta blockers (Propranolol) and CNS depressants (Ethanol). The parameters analyzed were the time spent by the animal in a dark environment, the time of the first latency and number of midline crossings. Clonazepam administered 300 s increased the time in the dark at lower concentrations and reduced locomotor activity, administration during 600 s of the intermediate concentration decreased over time in the dark and the first latency, and increased locomotor activity, indicating anxiolytic effect. Buspirone raised the time spent in the dark, probably due to reduction of motor activity. Imipramine and fluoxetine increased time in the dark and the first latency and decreased the number of alternations, indicating anxiogenic action. Paroxetine did not alter the time in the dark, however the first time increased latency and decreased locomotor activity. Haloperidol decreased anxiety in the lowest concentration, curiously raised motor activity at the highest concentration, instead of risperidone, which decreased the activity at the highest concentration. Diethylpropion did not change over time in the dark but increased the time of the first latency and decreased motor activity only at lower concentrations. Propranolol reduced only time in the dark. Ethanol was effective in reducing anxiety with the intermediate concentration and decreased locomotor activity in a lower concentration. Data corroborate with the literature in *Danio rerio* both intraperitoneal administration in this model as in other models for water delivery and in rodents, when it was possible to compare.

Keywords: Anxiety, Drugs, Behavior, *Danio rerio*, Model.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

FOTOGRAFIA 1 – <i>Zebrafish</i> (<i>Danio rerio</i>)	13
FIGURA 1 – Estrutura química do Clonazepam	18
FIGURA 2 – Estrutura química da Buspirona	19
FIGURA 3 – Estrutura química da Imipramina	20
FIGURA 4 – Estrutura química da Fluoxetina.....	21
FIGURA 5 – Estrutura química da Paroxetina	21
FIGURA 6 – Estrutura química do Haloperidol	22
FIGURA 7 – Estrutura química da Risperidona	23
FIGURA 8 – Estrutura química da Dietilpropiona	23
FIGURA 9 – Estrutura química do Propranolol	24
FIGURA 10 – Estrutura química do Etanol	25
FIGURA 11 – Aparato do teste da preferência claro-escuro	27

LISTA DE GRÁFICOS

GRÁFICO 1 – Efeitos do Clonazepam na preferência claro-escuro em <i>Danio rerio</i>	30
GRÁFICO 2 – Efeitos da Buspirona na preferência claro-escuro em <i>Danio rerio</i>	31
GRÁFICO 3 – Efeitos da Imipramina na preferência claro-escuro em <i>Danio rerio</i>	32
GRÁFICO 4 – Efeitos da Fluoxetina na preferência claro-escuro em <i>Danio rerio</i>	32
GRÁFICO 5 – Efeitos da Paroxetina na preferência claro-escuro em <i>Danio rerio</i>	33
GRÁFICO 6 – Efeitos do Haloperidol na preferência claro-escuro em <i>Danio rerio</i>	34
GRÁFICO 7 – Efeitos da Risperidona na preferência claro-escuro em <i>Danio rerio</i>	34
GRÁFICO 8 – Efeitos da Dietilpropiona na preferência claro-escuro em <i>Danio rerio</i>	35
GRÁFICO 9 – Efeitos do Propranolol na preferência claro-escuro em <i>Danio rerio</i>	36
GRÁFICO 10 – Efeitos do Etanol na preferência claro-escuro em <i>Danio rerio</i>	36

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 – Drogas utilizadas, concentração e tempo de administração.	29
TABELA 2 – Drogas, concentrações, efeitos sobre os parâmetros medidos e possível efeito na preferência claro-escuro.....	37

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

5-HT	5-hidroxitriptamina ou serotonina
BZD	Benzodiazepínicos
ISRS	Inibidores Seletivos da Recaptação de Serotonina
GABA	Ácido gama-aminobutírico
UFPA	Universidade Federal do Pará
SNC	Sistema Nervoso Central

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	12
1.1 ANSIEDADE	12
1.2 ZEBRAFISH (<i>Danio rerio</i>)	13
1.3 MODELOS DE ANSIEDADE EM PEIXES	15
1.3.1 Campo aberto	15
1.3.2 Teste do mergulho em tanque novo	15
1.3.3 Preferência claro-escuro	16
1.4 DROGAS	18
1.4.1 Benzodiazepínicos (BZD).....	18
1.4.2 Ansiolíticos não BZD (Agonistas parciais 5-HT _{1A})	19
1.4.3 Antidepressivos tricíclicos	20
1.4.4 Antidepressivos Inibidores Seletivos da Recaptação de Serotonina (ISRS)	20
1.4.5 Antipsicóticos	22
1.4.6 Psicostimulantes.....	23
1.4.7 Beta bloqueadores.....	24
1.4.8 Depressores do Sistema Nervoso Central (SNC)	24
1.5 FORMAS DE ADMINISTRAÇÃO	25
2. OBJETIVOS	26
2.1 GERAL.....	26
2.2 ESPECÍFICOS.....	26
3. MATERIAIS E MÉTODOS	27
4. RESULTADOS	30
5. DISCUSSÃO	38
6. CONCLUSÃO	43
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	45

1. INTRODUÇÃO

1.1 ANSIEDADE

A ansiedade é a emoção relacionada ao comportamento de avaliação de risco de uma ameaça potencial, seja por exposição a um novo ambiente ou a um potencial estímulo aversivo no ambiente (BLANCHARD; BLANCHARD, 1988; BLANCHARD *et al.*, 1990; GRAEFF; ZANGROSSI JR., 2010). O padrão de avaliação de risco envolve aproximação, inspeção, avaliação da área e diminuição da locomoção, eventualmente ocorre o contato com o estímulo potencialmente nocivo, este último é importante como a latência da avaliação de risco (BLANCHARD *et al.*, 1990).

Mesmo a ansiedade humana não podendo ser induzida ou analisada em animais em todos os seus aspectos, especialmente nos aspectos psicológicos e cognitivos, acredita-se que os modelos animais possam desempenhar um papel no estudo de seus mecanismos (AHMED *et al.*, 2011; CRYAN; SWEENEY, 2011). Visto que, além do elemento subjetivo da ansiedade em seres humanos, existem elementos comportamentais e fisiológicos que podem ser mensurados em animais (RANG *et al.*, 2007). Biologicamente, a ansiedade promove uma particular inibição comportamental devido a condições ambientais que apresentem ameaça ou provoquem dor (RANG *et al.*, 2007).

Os estados de ansiedade possuem como um dos pontos capitais o ácido γ -aminobutírico (GABA) (KALUEFF; NUTT, 2007; MOHLER, 2012). Uma disfunção do sistema gabaérgico tem sido associada com transtornos de ansiedade, em estudos com humanos e animais (KALUEFF; NUTT, 2007). Pesquisas farmacológicas e genéticas apontam que a disfunção no receptor GABA provoca predisposição para a ansiedade (MOHLER, 2012). A ativação do sistema gabaérgico tem efeito ansiolítico, oposto a diminuição da atividade gabaérgica que correlaciona-se com a ansiedade (KALUEFF; NUTT, 2007; MOHLER, 2012).

Os sistemas noradrenérgico e serotoninérgico desempenham um papel crucial na mediação do circuito afetivo subjacente aos distúrbios altamente relacionados a desordens da ansiedade. Há uma clara desregulação da atividade noradrenérgica e serotoninérgica contribuindo para ansiedade. A maioria dos dados sugere aumento da transmissão noradrenérgica ou supersensibilidade dos receptores, por outro lado, mostram com bastante coerência a diminuição da transmissão serotoninérgica, há também alterações nas populações de receptores de serotonina (5HT) (RESSLER; NEMEROFF, 2000).

1.2 ZEBRAFISH (*Danio rerio*)

O *zebrafish*, *Danio rerio* (Fotografia 1), também conhecido no Brasil como peixe-zebra ou paulistinha, é um pequeno peixe ciprinídeo, uma espécie popular em aquarismo e com alta relevância em pesquisas (SPENCE *et al.*, 2008). Além do *zebrafish* do tipo selvagem, há outras cepas como o leopardo, que é uma mutação espontânea do padrão de cor do *Danio rerio* do tipo selvagem, outra variante é o *Danio rerio longfin*, que possui as nadadeiras mais longas (SPENCE *et al.*, 2008). O uso do *zebrafish* está em expansão em diversos campos, como na neurociências comportamentais (BLASER *et al.*, 2010; WONG *et al.*, 2010; AHMED *et al.*, 2011), em biologia do desenvolvimento e da evolução, toxicologia e farmacologia (SUMANAS; LIN, 2004; SPENCE *et al.*, 2008; MAXIMINO *et al.*, 2010a; MAXIMINO *et al.*, 2010b; RICO *et al.*, 2011). Pesquisadores acadêmicos e companhias farmacêuticas consideram o *zebrafish* como um potente novo modelo em pesquisa e descoberta de drogas (SUMANAS; LIN, 2004; GERLAI, 2010a).

FOTOGRAFIA 1 – *Zebrafish* (*Danio rerio*)



Fonte: <http://en.wikipedia.org/wiki/en:Image:Zebra.jpeg>

O sistema nervoso do *Danio rerio* apresenta similaridades ao dos humanos (BARROS *et al.*, 2008; GERLAI, 2010a; MARTHUR; GUO, 2010). A organização do cérebro do zebrafish é similar a outros vertebrados, tendo áreas como hipotálamo e bulbo olfatório, que engloba estrutura do pálido lateral, que parece ser homóloga ao hipocampo de mamíferos, os sistemas neurotransmissores como o gabaérgico, colinérgico, serotoninérgico, dopaminérgico e noradrenérgico também estão presentes (KIM *et al.*, 2004; BARROS *et al.*, 2008; RICO *et al.*, 2011).

Além disso, o sequenciamento do genoma do *zebrafish* e a identificação de diversos genes homólogos aos de mamíferos, demonstram sua eficácia como modelo para desordens humanas (GERLAI, 2010a; WONG *et al.*, 2010; RICO *et al.*, 2011; TIERNEY, 2011). Dessa forma, há uma possibilidade de que a identificação de genes envolvidos em funções/disfunções específicas do cérebro do *zebrafish* corresponda a homólogos humanos

que desempenhem funções similares, elevando a relevância da pesquisa translacional com o *zebrafish* (GERLAI, 2010b).

Esses achados, aliados as pesquisas farmacológicas, possibilitam a utilização da espécie como um modelo para a análise da resposta de medo em vertebrados e condições psicopatológicas, como a ansiedade (AHMED *et al.*, 2011). Entretanto nessa área há uma escassez de modelos comportamentais apropriados (AHMED *et al.*, 2011).

O uso do *zebrafish* apresenta diversas vantagens, os adultos são geralmente pequenos (3-4 cm), de baixo custo, de fácil acomodação e alimentação, e podem ser mantidos em grandes quantidades (SUMANAS; LIN, 2004; BARROS *et al.*, 2008; CHAMPAGNE *et al.*, 2010; GERLAI, 2010a; GERLAI, 2010b; GEBAUER *et al.*, 2011). Também podem se reproduzir em laboratório sob condições controladas (SUMANAS; LIN, 2004; CHAMPAGNE *et al.*, 2010). Experimentos com *zebrafish* são mais fáceis, econômicos e rápidos comparado ao uso de roedores (SUMANAS; LIN, 2004). Apesar de o *zebrafish* possuir inúmeras vantagens sobre outros animais utilizados em laboratório, um aspecto que o torna menos útil é o pouco conhecimento sobre o comportamento desta espécie e escassos protocolos para testes comportamentais disponíveis (GERLAI, 2010a).

Os testes comportamentais devem ser sensíveis para detecção de um amplo espectro de alterações funcionais no cérebro induzidas por manipulações diversas, incluindo genéticas e farmacológicas (GERLAI, 2010a; AHMED *et al.*, 2011) e o *zebrafish* é um modelo potencial de uso em larga escala, para detectar uma série de alterações, para tanto, o desenvolvimento de modelos de testes comportamentais é um ponto importante (AHMED *et al.*, 2011). Quando a questão diz respeito à identificação de novos compostos farmacêuticos, tem-se argumentado que a análise comportamental é uma das melhores abordagens (GERLAI, 2010a).

1.3 MODELOS DE ANSIEDADE EM PEIXES

Um modelo animal adequado para pesquisa deve ser constituído de uma validade preditiva (validade farmacológica), validade de face (isomorfismo) e validade de construto (homologia e similaridade dos mecanismos neurobiológicos subjacentes) (BELZUNG; GRIEBEL, 2001).

A validade preditiva indica que o modelo animal deve ser sensível aos efeitos das drogas que possuem eficácia clínica (BELZUNG; GRIEBEL, 2001). A validade de face, também chamada de validade comportamental, alude a resposta da ansiedade observada no modelo animal ser análoga às respostas fisiológicas e comportamentais em seres humanos, indicando que a expressão é similar através das espécies (BELZUNG; GRIEBEL, 2001).

E a validade de constructo está relacionada com a similaridade entre a consistência teórica implícita no modelo animal e no comportamento humano, isso requer que a etiologia do comportamento ansioso e os fatores biológicos sejam similares entre os animais e os humanos (BELZUNG; GRIEBEL, 2001).

1.3.1 Campo aberto

O teste do campo aberto mede a reatividade de um animal isolado em um amplo espaço novo, confrontando o animal entre explorar o novo ambiente em busca de alimento, caminho para fuga, parceiros para acasalar *versus* a insegurança de um lugar desconhecido (CHAMPAGNE *et al.*, 2010; GERLAI, 2010b). Sendo que ambientes novos são aversivos contribuindo para reduzir ou inibir o comportamento exploratório (CHAMPAGNE *et al.*, 2010). O animal é transferido para um tanque novo, usualmente redondo, e são observados os comportamentos exploratórios, incluindo tigmotaxia, nado exploratório, *freezing* e movimentos erráticos (MAXIMINO *et al.*, 2010b).

1.3.2 Teste do mergulho em tanque novo

O teste de mergulho em tanque novo (*novel tank diving test*) analisa as medidas de comportamentos com padrões ‘verticais’, compreendendo o tempo gasto no fundo do tanque como indicativo de ansiedade (CHAMPAGNE *et al.*, 2010). Há também estudos que analisam os comportamentos ‘horizontais’ incluindo a tigmotaxia *versus* a exploração (CHAMPAGNE *et al.*, 2010).

Em um estudo no qual foram testadas as seguintes drogas, buspirona (3,125; 6,25; 12,5; 25 e 50 mg/l), clordiazepóxido (0,625; 1,25; 2,5; 5, 10 e 20 mg/l) e diazepam (0,625; 1,5; 2,5; 5; 10 e 20 mg/l). A buspirona e o diazepam mostraram efeito ansiolítico, ao contrário do clordiazepóxido que não apresentou efeito ansiolítico, apenas sedativo (BENCAN *et al.*, 2009).

1.3.3 Preferência claro-escuro

O teste é baseado na preferência do animal por ambientes escuros (SERRA *et al.*, 1999). O comportamento apresentado reflete o conflito do animal entre áreas protegidas, nesse caso o lado escuro, pois a distribuição de melanóforos dorsais tende a diminuir a refração e a reflexão da luz incidente no peixe, reduzindo a visualização do animal pelos predadores *versus* a motivação inata em explorar novos ambientes (MAXIMINO *et al.*, 2010a). Apesar do conflito, o *zebrafish* adulto exibe uma preferência significativa pelo compartimento escuro e evita o iluminado (MAXIMINO *et al.*, 2010a; MARTHUR; GUO, 2010).

O teste de preferência claro-escuro já teve a sua validação comportamental (MAXIMINO *et al.*, 2010a), essa extensiva validação comportamental é uma das vantagens sobre outros testes (MAXIMINO *et al.*, 2011). No entanto, a principal desvantagem em relação ao campo aberto e ao teste do mergulho em tanque novo é a falta da validação farmacológica (MAXIMINO *et al.*, 2010b).

Maximino *et al.* (2011) pesquisaram sobre a ação de drogas na preferência claro-escuro em *zebrafish* adultos, com administração via intraperitoneal das seguintes drogas: Fluoxetina (5 e 10 mg kg⁻¹); Clonazepam (0,05; 0,5 e 1,0 mg kg⁻¹); Diazepam; Buspirona (25 ou 50 mg kg⁻¹); Ethanol (0,25%, 0,5% e 1,0% (v.v)), além de clordiazepóxido, moclobemide e cafeína. A fluoxetina foi administrada tanto de forma aguda quanto crônica, e as demais drogas apenas na forma aguda (MAXIMINO *et al.*, 2011). Mostrando resultados promissores para a validação farmacológica da preferência claro-escuro, visto serem consistentes com o modelo em roedores da caixa claro-escuro. Entretanto foi utilizada a injeção intraperitoneal, que tem a desvantagem de estressar o animal (MAXIMINO *et al.*, 2010a; STEWART *et al.*, 2011a).

Gebauer *et al.* (2011) estudaram a ação de Clonazepam (0,3 mg/l); Bromazepam; Diazepam; Buspirona (1 e 3 mg/l); Propranolol (3 mg/l) e Etanol (0,25 e 0,5%) administrados via hídrica em *zebrafish* adulto. As drogas benzodiazepínicas, a buspirona e o etanol

aumentaram o tempo gasto no compartimento claro. Esses dados sugerem que a preferência claro-escuro pode ser prática, de baixo-custo e sensível para triagem de drogas ansiolíticas. Ressaltamos que os parâmetros do teste utilizado é distinto do validado por Maximino e coautores (2010a), utilizado nessa pesquisa. O tamanho do aparato de teste possui as dimensões (18 x 9 x 7 cm, comprimento x largura x altura) dividido em duas partes iguais por uma porta corredeira, com o nível da água de 3 cm, sendo a divisão elevada 1 cm para permitir a passagem do *zebrafish* de um lado para o outro. A sessão inicia-se com o peixe na área clara e a duração do teste é de apenas 5 min (300 segundos (s)). Os parâmetros de análise são a latência da primeira entrada no compartimento escuro, tempo despendido no compartimento claro e número de alternâncias entre os compartimentos (GEBAUER *et al.*, 2011).

Steenbergen *et al.* (2011) analisaram a ação de drogas ansiolíticas (diazepam, buspirona e etanol) e ansiogênicas (caféina e FG-7142) na preferência claro-escuro, todavia utilizaram o *zebrafish* com apenas 6 dias pós-fertilização. Entretanto, os parâmetros utilizados são diferentes dos adotados nessa pesquisa, visto que o *zebrafish* na fase larval possui preferência pelo ambiente claro, o tempo do teste é de apenas 5 minutos (300 s), sem período de habituação, início do teste no centro do compartimento claro, além da diferença entre alguns parâmetros analisados, como a distância total percorrida no aparato, porcentagem do tempo gasto em cada compartimento, porcentagem da distância total em cada compartimento, latência para entrada no ambiente escuro e número total de entradas no compartimento escuro (STEENBERGEN *et al.*, 2011).

1.4 DROGAS

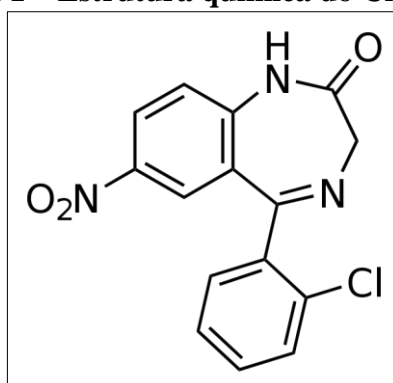
1.4.1 Benzodiazepínicos (BZD)

O grupo dos benzodiazepínicos (BZD) é o mais importante grupo de drogas utilizadas como ansiolíticos (RANG *et al.*, 2007). Os BZD realizam a ligação seletiva nos canais de cloreto dos receptores do subtipo GABA_A, compostos por várias subunidades e controlados por ligante, intensificando assim, as correntes iônicas induzidas pelo GABA (CHARNEY *et al.*, 2006; RANG *et al.*, 2007; LADER, 2011). Eles se ligam especificamente a um sítio alostérico regulatório do receptor, distinto do sítio de ligação ao GABA, aumentando a afinidade do GABA pelo receptor, consequentemente elevando a neurotransmissão gabaérgica (RANG *et al.*, 2007; FORMAN *et al.*, 2009).

A ação ansiolítica dos BZD é devido a inibição das sinapses no sistema límbico, região responsável pelo comportamento emocional e que possui uma ampla densidade de receptores GABA_A (FORMAN *et al.*, 2009). Os BZD possuem aspectos farmacológicos semelhantes, entretanto, distinguem-se em seletividade, modificando o uso clínico (CHARNEY *et al.*, 2006).

Na preferência claro-escuro, em *zebrafish* adulto, a administração intraperitoneal de Clonazepam (Figura 1) diminuiu a aversão ao compartimento claro na dose de 0,05 mg kg⁻¹; mas na dose de 1,0 mg kg⁻¹ parece ter provocado ataxia ou sedação, diminuindo assim a atividade de exploração (MAXIMINO *et al.*, 2011).

FIGURA 1 – Estrutura química do Clonazepam



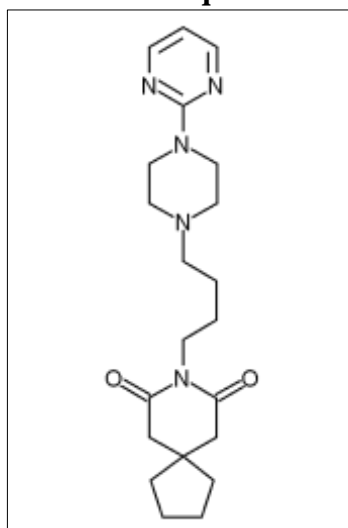
Fonte: <http://pt.wikipedia.org>

1.4.2 Ansiolíticos não BZD (Agonistas parciais 5-HT_{1A})

A Buspirona (Figura 2) é um ansiolítico não benzodiazepínico que não realiza ligação com os receptores de GABA, mas é um agonista parcial nos receptores 5-HT_{1A} (RANG *et al.*, 2007; LEE *et al.*, 2005; MOCH, 2009; NADAL-VICENS *et al.*, 2009). Os receptores 5-HT_{1A} são auto-receptores inibitórios que reduzem a liberação de 5-HT (RANG *et al.*, 2007).

Esse fármaco não é sedativo e oferece ação ansiolítica moderada no tratamento de vários transtornos da ansiedade (RANG *et al.*, 2007; LEE *et al.*, 2005; MOCH 2009; NADAL-VICENS *et al.*, 2009). Apesar de não apresentar a mesma eficácia clínica de um benzodiazepínico, trata-se de um fármaco conveniente, pois não produz adicção (NADAL-VICENS *et al.*, 2009).

FIGURA 2 – Estrutura química da Buspirona



Fonte: <http://pt.wikipedia.org>

Um estudo com administração aguda de buspirona na concentração 25 mg/l envolvendo *zebrafish* juvenis mostrou efeitos ansiolíticos na preferência claro-escuro (STEENBERGEN *et al.*, 2011). Da mesma forma buspirona (25 e 50 mg kg⁻¹) administrada via intraperitoneal em *zebrafish* adultos apresentou efeito ansiolítico em ambas as doses (MAXIMINO *et al.*, 2011).

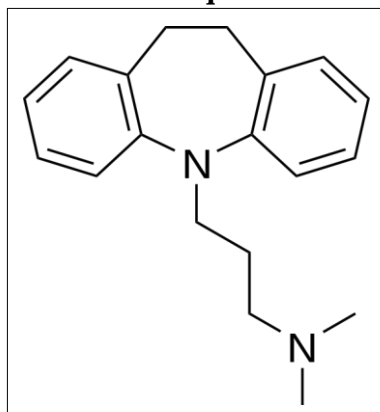
No teste do mergulho em tanque novo, o cloridrato de buspirona foi administrado através da imersão do animal na solução por 3 minutos (180 s), com as doses de 3,125; 6,25; 12,5; 25 e 50 mg/l. Os resultados foram condizentes com a redução da ansiedade de forma linear nas doses de 6,25; 25 e 50 mg/l (BENCAN *et al.*, 2009).

1.4.3 Antidepressivos tricíclicos

Os antidepressivos tricíclicos são denominados dessa forma devido à sua estrutura química caracterizada por três anéis, sendo dois anéis aromáticos fixados a um anel de cicloheptano. Os antidepressivos tricíclicos inibem a recaptação de serotonina (5-HT) e noradrenalina da fenda sináptica através do bloqueio dos transportadores de recaptação da 5HT e da noradrenalina. A permanência prolongada do neurotransmissor na fenda sináptica gera uma ativação elevada dos receptores, os inibidores da recaptação intensificam as respostas pós-sinápticas. Embora as afinidades pelos transportadores de 5-HT e de noradrenalina sejam vastamente variáveis, os antidepressivos tricíclicos são bastante similares na eficácia clínica (NADAL-VICENS *et al.*, 2009).

Entre os antidepressivos tricíclicos, a imipramina (Figura 3) tem mostrado eficácia na melhora da ansiedade (ZOHAR; WESTENBERG, 2000).

FIGURA 3 – Estrutura química da Imipramina



Fonte: <http://pt.wikipedia.org>

A administração crônica da imipramina em ratos exerceu efeito ansiolítico em duas tarefas do teste do labirinto em cruz elevado, prejudicou a aquisição da esquiva inibitória e prolongou a latência de escape dos braços abertos, a administração aguda melhorou tanto a esquiva quanto a latência de fuga (TEIXEIRA *et al.*, 2000).

1.4.4 Antidepressivos Inibidores Seletivos da Recaptação de Serotonina (ISRS)

Os inibidores seletivos da recaptação de serotonina (ISRS) são amplamente utilizados na terapêutica da depressão e ansiedade (CARR *et al.*, 2011). A principal ação farmacológica aguda é o bloqueio direto dos transportadores de 5-HT o que eleva os níveis de 5-HT no meio

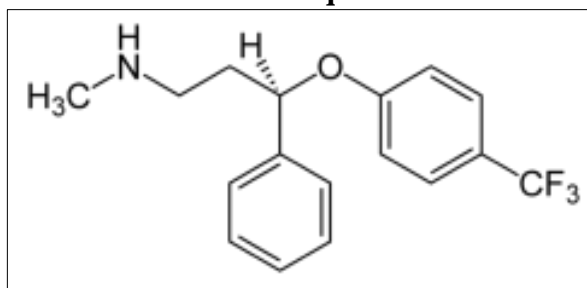
extracelular (CARR *et al.*, 2011) A inibição da recaptação de 5-HT eleva os níveis sinápticos da 5-HT, gerando aumento de ativação do receptor de 5-HT e intensificação das respostas pós-sinápticas (NADAL-VICENS *et al.*, 2009).

Apesar de a eficiência dos ISRS ser similar a dos antidepressivos tricíclicos no tratamento da depressão, tornaram-se agente de primeira linha para o tratamento da depressão, assim como da ansiedade e do transtorno obsessivo-compulsivo, pois são mais seletivos, reduzindo os efeitos adversos (NADAL-VICENS *et al.*, 2009).

A Fluoxetina (Figura 4) tem se tornado um dos antidepressivos mais prescritos, e é utilizado com eficácia no tratamento de ansiedade (WONG *et al.*, 2005).

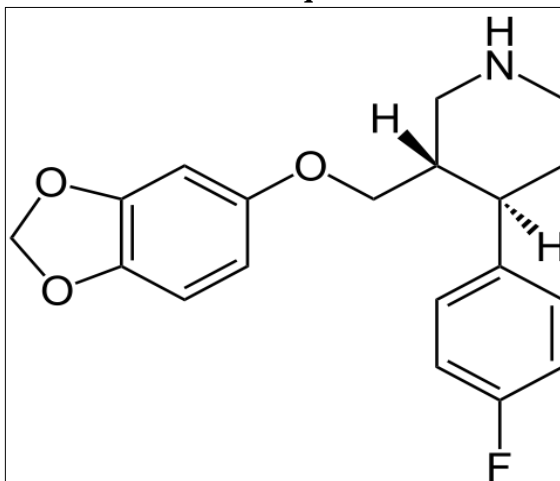
A Paroxetina (Figura 5) é o mais potente inibidor da recaptação de 5-HT entre os antidepressivos de uso comum. É um inibidor da captação de noradrenalina muito fraco, entretanto é mais potente nesse sítio que outros ISRS. A seletividade de paroxetina está entre as mais elevadas dos ISRS. A paroxetina é bem tolerada e eficaz no tratamento de desordens de ansiedade em todas as faixas etárias (BOURIN *et al.*, 2001).

FIGURA 4 – Estrutura química da Fluoxetina



Fonte: <http://pt.wikipedia.org>

FIGURA 5 – Estrutura química da Paroxetina



Fonte: <http://pt.wikipedia.org>

A administração aguda de fluoxetina na preferência claro escuro não modificou o comportamento de evitar o ambiente claro, ao contrário do tratamento crônico que aumentou o tempo despendido no compartimento claro na maior dose de 10 mg kg^{-1} , sugerindo efeito ansiolítico (MAXIMINO *et al.*, 2011).

A administração oral de 3 mg/kg de paroxetina em ratos Sprague-Dawley, durante 21 dias, mostrou efeitos ansiolíticos (LIGHTOWLER *et al.*, 1994).

1.4.5 Antipsicóticos

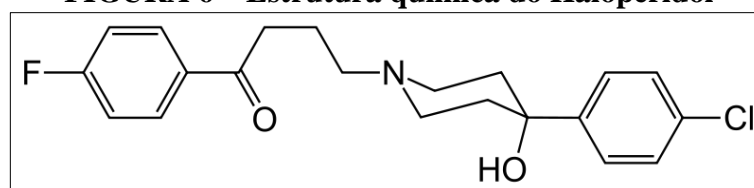
Os antipsicóticos podem ser divididos em antipsicóticos típicos, mais antigos e com atuação acentuada no receptor de dopamina D_2 , e antipsicóticos atípicos, mais recentes e com antagonismo D_2 menos acentuado e, conseqüentemente, com menos efeitos extrapiramidais (STANDAERT; GALANTER, 2009). Os antipsicóticos atípicos têm eficácia e efeitos adversos diferentes dos antipsicóticos típicos (STANDAERT; GALANTER, 2009).

Os antipsicóticos típicos agem principalmente como antagonistas dos receptores de dopamina D_2/D_3 , e possuem uma potência bem menor como antagonistas dos receptores de 5-HT_{2A} (MELTZER; MASSEY, 2011). Ao contrário dos antipsicóticos atípicos que em doses clinicamente efetivas produzem um intenso bloqueio dos receptores 5-HT_{2A} , estimulação direta ou indireta dos receptores 5-HT_{1A} , e menos intensamente reduzem os receptores mediados por dopamina D_2 (MELTZER; MASSEY, 2011).

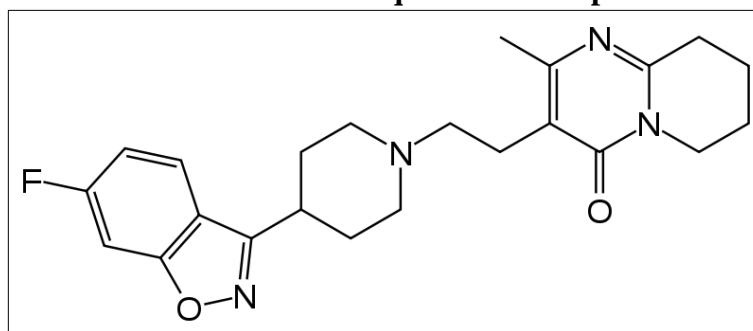
O Haloperidol (Figura 6) é um antipsicótico típico, sua ação primária está relacionada com o bloqueio dos receptores de dopamina D_2 (HOLLWAY; AMAN, 2011).

A Risperidona (Figura 7) é um antipsicótico atípico que possui propriedades antagonistas combinadas nos receptores D_2 e 5-HT_2 , embora seja mais robusta como antagonista serotoninérgico (STANDAERT; GALANTER, 2009). A risperidona também antagoniza os receptores α_1 -adrenérgicos, α_2 -adrenérgicos e histamínicos H_1 com afinidade relativamente alta (STANDAERT; GALANTER, 2009). Essa droga se diferencia dos antipsicóticos típicos por bloquear mais efetivamente 5-HT_2 que D_2 (HOLLWAY; AMAN, 2011).

FIGURA 6 – Estrutura química do Haloperidol



Fonte: <http://pt.wikipedia.org>

FIGURA 7 – Estrutura química da Risperidona

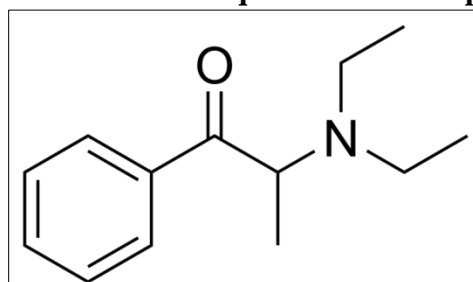
Fonte: <http://pt.wikipedia.org>

Evidências sugerem que os antipsicóticos atípicos são benéficos no tratamento da ansiedade (MCINTYRE; KATZMAN, 2003). Em um estudo com ratos, a risperidona em contraste com o haloperidol, apresentou melhora no efeito ansiolítico (NOWAKOWSKA *et al.*, 1999).

1.4.6 Psicostimulantes

Os psicostimulantes aumentam o estado de alerta e a motivação, possuem propriedades antidepressivas e melhoram o humor, uma precaução no uso de psicostimulantes é a exacerbação da ansiedade (HOWARD *et al.*, 2010).

A dietilpropiona (Figura 8), também conhecida como anfepramona, é uma droga estimulante semelhante a anfetamina, utilizada para o tratamento do controle de peso e obesidade. A dietilpropiona possui efeitos neurais similares a anfetamina, aumenta a noradrenalina e dopamina e inibe a recaptação desses neurotransmissores. Esta droga aumenta a 5-HT, mas de forma menos intensa que a noradrenalina e dopamina. Suas propriedades motoras e de reforço tem sido associadas aos efeitos da dopamina e serotonina (GARCIA-MIJARES *et al.*, 2009).

FIGURA 8 – Estrutura química da Dietilpropiona

Fonte: <http://pt.wikipedia.org>

Uma pesquisa com saguis verificou um aumento do comportamento ansioso após a administração da dietilpropiona (MELLO JR. *et al.*, 2005).

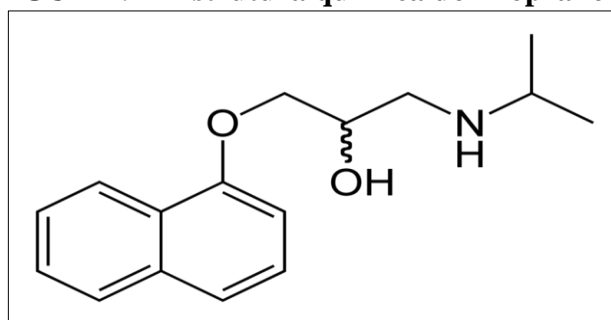
1.4.7 Beta bloqueadores

Os beta bloqueadores, por exemplo, o propranolol, são utilizados para tratar determinadas formas de ansiedade, em peculiar os sintomas físicos, como tremores, sudorese e taquicardia (RANG *et al.*, 2009).

O propranolol (Figura 9) é um bloqueador β -adrenérgico, que reduz a ansiedade e o medo. Em roedores, o propranolol dose-dependente diminui a ansiedade, no campo aberto e no *light-enhanced startle paradigm*. Esta droga reduz a expressão de respostas de sobressalto condicionadas em ratos, mas não o *freezing* condicionado em camundongos (RODRIGUEZ-ROMAGUERA *et al.*, 2009).

Em *zebrafish* adultos o propranolol (3mg/l) não afetou o comportamentos relacionados a ansiedade, na preferência claro-escuro (diferente da utilizada nessa pesquisa) e no *Group Behavior Task*, que avalia simultaneamente a coesão do cardume, altura no tanque e locomoção (GEBAUER *et al.*, 2011).

FIGURA 9 – Estrutura química do Propranolol



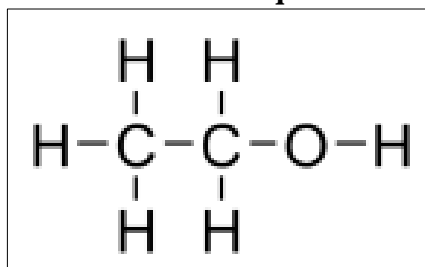
Fonte: <http://pt.wikipedia.org>

1.4.8 Depressores do Sistema Nervoso Central (SNC)

O etanol (Figura 10) age como ansiolítico e sedativo, visto que promove depressão do sistema nervoso central (SNC), entretanto com toxicidade potencialmente significativa. Os efeitos do etanol parecem ser devido à atuação sobre múltiplos alvos, incluindo os receptores GABA_A e glutamato. O etanol aumenta o influxo de cloreto mediado pelo receptor de

GABA_A e inibe os efeitos excitatórios do glutamato nos receptores NMDA (FORMAN *et al.*, 2009).

FIGURA 10 – Estrutura química do Etanol



Fonte: <http://pt.wikipedia.org>

Na preferência claro-escuro em *zebrafish* juvenis o etanol na concentração de 0,027% (v/v) apresentou efeito ansiolítico (STEENBERGEN *et al.*, 2011), assim como em *zebrafish* adultos, o etanol agudo nas doses de 0,25% e 0,5% reduziu a ansiedade, além de um efeito motor que aumentou na dose de 0,5% e diminuiu de forma não significativa em 1% (MAXIMINO *et al.*, 2011).

1.5 FORMAS DE ADMINISTRAÇÃO

Um ponto importante no estudo de drogas no comportamento animal é o método de exposição a droga (STEWART *et al.*, 2011a). Em *zebrafish* é comum a imersão do peixe na solução contendo a droga por um determinado tempo (STEWART *et al.*, 2011a). A administração de moléculas pequenas pode ser realizada adicionando-as diretamente à água, sendo as mesmas absorvidas através das brânquias ou da pele do peixe (RIHEL; SCHIER, 2011).

A administração via injeção intraperitoneal é uma boa alternativa caso seja realizada corretamente. É mais estressante que a imersão, porém tem maior precisão (STEWART *et al.*, 2011a).

2. OBJETIVOS

2.1 GERAL

Descrever a sensibilidade da preferência claro-escuro às principais drogas utilizadas na clínica da ansiedade, para a espécie de peixe *Danio rerio*, via administração hídrica.

2.2 ESPECÍFICOS

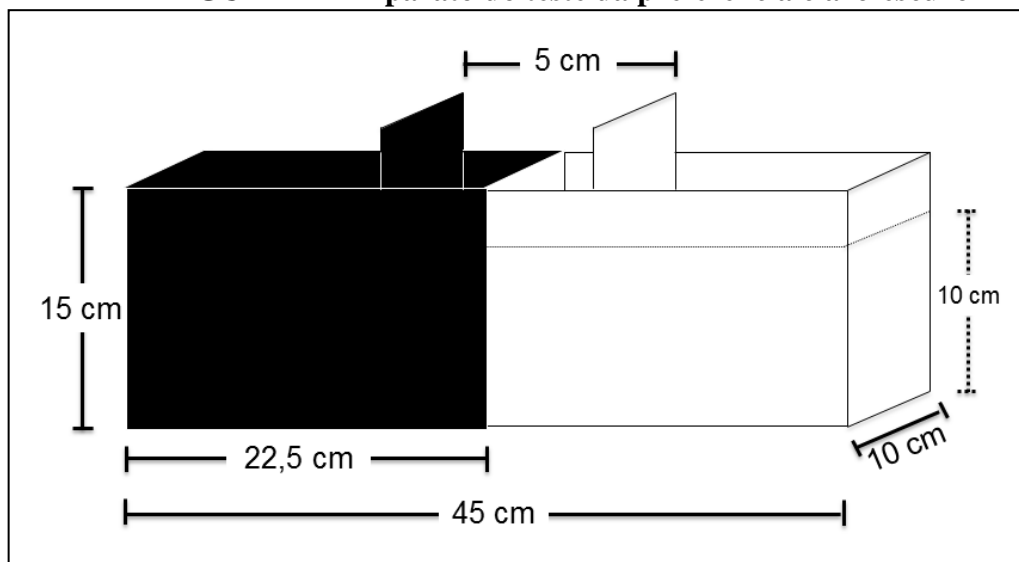
- Adaptar o modelo com administração hídrica aguda, menos estressante para o animal;
- Verificar a sensibilidade aos ansiolíticos Benzodiazepínicos; ansiolíticos Agonistas parciais 5-HT_{1A}; Antidepressivos tricíclicos; Antidepressivos inibidores seletivos da recaptação de serotonina; Antipsicóticos; Psicostimulantes; Beta bloqueadores; Depressores do Sistema Nervoso Central.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

Foram utilizados 328 peixes da espécie *Danio rerio*, adultos, de ambos os sexos, distribuídos em grupos, segundo droga e concentração, sendo 16 animais no grupo controle e 8 animais por concentração. Os animais foram mantidos, em grupos de no máximo 25 peixes por aquário (60 x 25 x 40 cm) no biotério de peixes do Laboratório de Neurociências e Comportamento da UFPA, sob condições estáveis, pH adequado (7 ± 1), temperatura média de $26 \pm 1^\circ\text{C}$, foto período 14:10 h, início do ciclo às 06h, com filtragem constante e alimentação com ração, uma vez ao dia.

O aparato de teste consiste em um aquário padrão (15 x 10 x 45 cm) dividido igualmente em dois compartimentos, um branco (claro) e outro preto (escuro), com uma área central (5 cm) delimitada por portas corredeiras, a qual é utilizada como compartimento inicial do teste e a coluna de água utilizada foi de 10 cm (Figura 11), como descrito por Maximino *et al.* (2010a). Para iluminação do lado branco foi utilizada duas luminárias de 9 Watts cada, colocadas nas laterais do aparato.

FIGURA 11 – Aparato do teste da preferência claro-escuro



Fonte: Adaptado de Maximino *et al.*, 2010a.

A administração da droga era realizada por via hídrica, submergindo o peixe em um Becker de 200 ml com a concentração da droga a ser testada. Posteriormente, o animal era colocado na área central por um período de habituação de 300 s. Em seguida, as portas corredeiras eram removidas e o animal podia explorar livremente o aparato por 900 s.

Os parâmetros analisados são: o tempo total que o animal permanece em cada compartimento, latência para explorar o lado oposto a primeira escolha e o número de alternâncias. Sendo que o tempo no ambiente escuro indica o comportamento ansioso propriamente dito, a primeira latência é uma medida de impulsividade para explorar novos ambientes e o número de cruzamentos é uma medida da atividade motora.

Cada animal participava de uma única sessão de exploração de 900 s, que era registrada com uma câmera filmadora da marca Sony®, para posterior análise. Todos os experimentos foram realizados entre 9:00 h e 14:00 h. A preferência pelo ambiente escuro é invertida quando os animais são testados à noite (18:00h às 24:00h), por isso é preferível que os animais sejam testados durante o dia (DIAS, 2010).

O grupo controle não recebeu droga, sendo denominado 0,0 mg/l, e é comum a todos os grupos de drogas. As drogas a serem administradas, segundo a concentração estão dispostas na Tabela 1.

Inicialmente foi utilizado o tempo de administração de 5 minutos (300 s) baseado nos estudos de Egan *et al.* (2009) para as drogas Buspirona, Fluoxetina, Haloperidol, Risperidona, Dietilpropiona, Propranolol e Etanol. Posteriormente, adotamos o tempo de 10 min. (600 s) utilizado por Gebauer *et al.* (2011) para Imipramina e Paroxetina. Para o Clonazepam foram utilizados os dois tempos de administração.

O cálculo das concentrações foi feito utilizando um “peixe farmacológico” pesando 0,3g e adaptando-se drogas utilizadas em modelos com roedores e alguns estudos pilotos do Laboratório de Neurociências e Comportamento. A solução mãe era preparada com a diluição da droga em água destilada, até a obtenção de uma solução homogênea, que era acondicionada em recipientes escuros para evitar fotodegradação.

Os dados, depois de transcritos, foram analisados em termos de tempo total no escuro, tempo da primeira latência e número de alternâncias utilizando-se teste *t* de *Student* comparando cada concentração ao controle em cada um dos parâmetros. Quando não era possível obedecer aos critérios para utilização do teste *t*, teste de normalidade (Kolmogorov-Smirnov) e teste de igualdade de variância, foi utilizado o teste não-paramétrico Mann-Whitney (U). O nível de significância adotado foi $p \leq 0,05$.

Os resultados das drogas administradas estão representados nos gráficos na forma de média e desvio padrão, dispostos conforme o tempo de permanência no ambiente escuro, tempo da primeira latência para exploração e número de alternâncias.

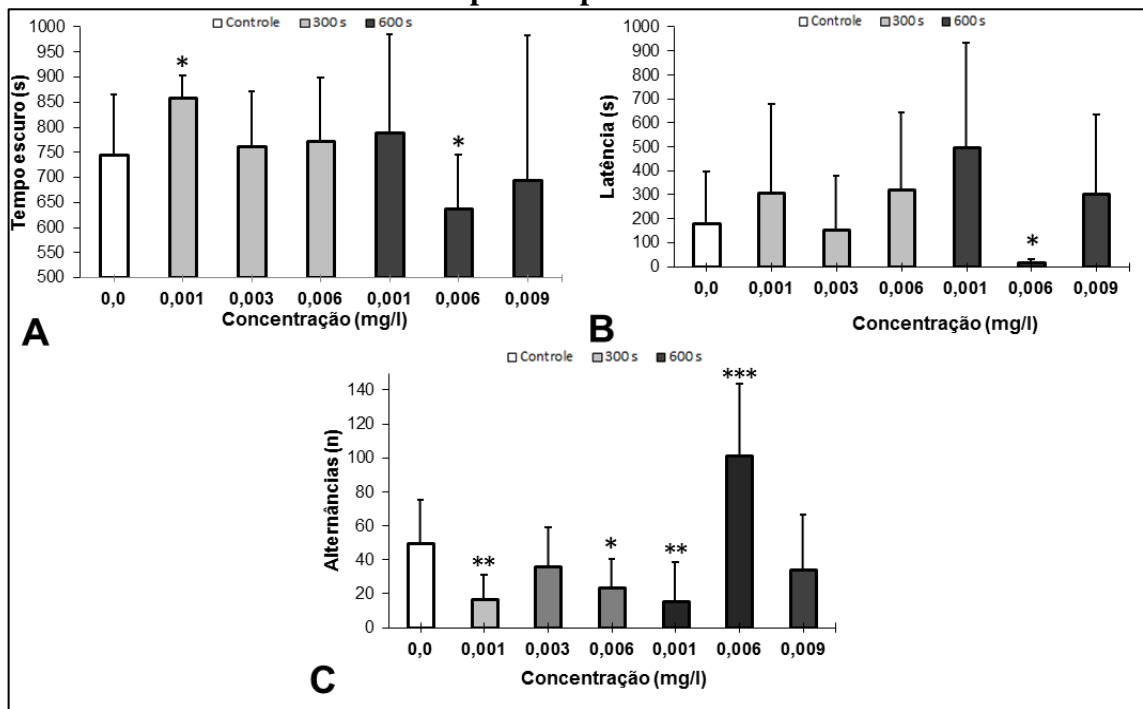
TABELA 1 – Drogas utilizadas, concentração e tempo de administração.

DROGA	CONCENTRAÇÃO (mg/l)	TEMPO (segundos)
Benzodiazepínicos (BZD)		
Clonazepam (Roche)	0,001; 0,003 e 0,006	300
	0,001; 0,006 e 0,009	600
Ansiolítico não BZD (Agonistas parciais 5-HT_{1A})		
Buspirona (LIBBS)	1; 10; 15 e 20	300
Antidepressivo tricíclico		
Imipramina (Farmácia Específica)	0,5; 1; 2 e 4	600
Antidepressivo ISRS		
Fluoxetina (Zydus)	1; 2; 4 e 6	300
Paroxetina (União Química)	0,3 e 3	600
Antipsicóticos		
Haloperidol (Cristália)	1; 2; 4 e 8	300
Risperidona (Cristália)	0,1; 0,25; 0,5	300
Psicostimulante		
Dietilpropiona (Farmácia Específica)	1; 2; 4 e 8	300
Beta bloqueadores		
Propranolol (Sigma Pharma)	0,5; 2,5 e 5	300
Depressores do SNC		
Etanol (Casa da Química)	0,5; 1 ; 2 e 4	300

4. RESULTADOS

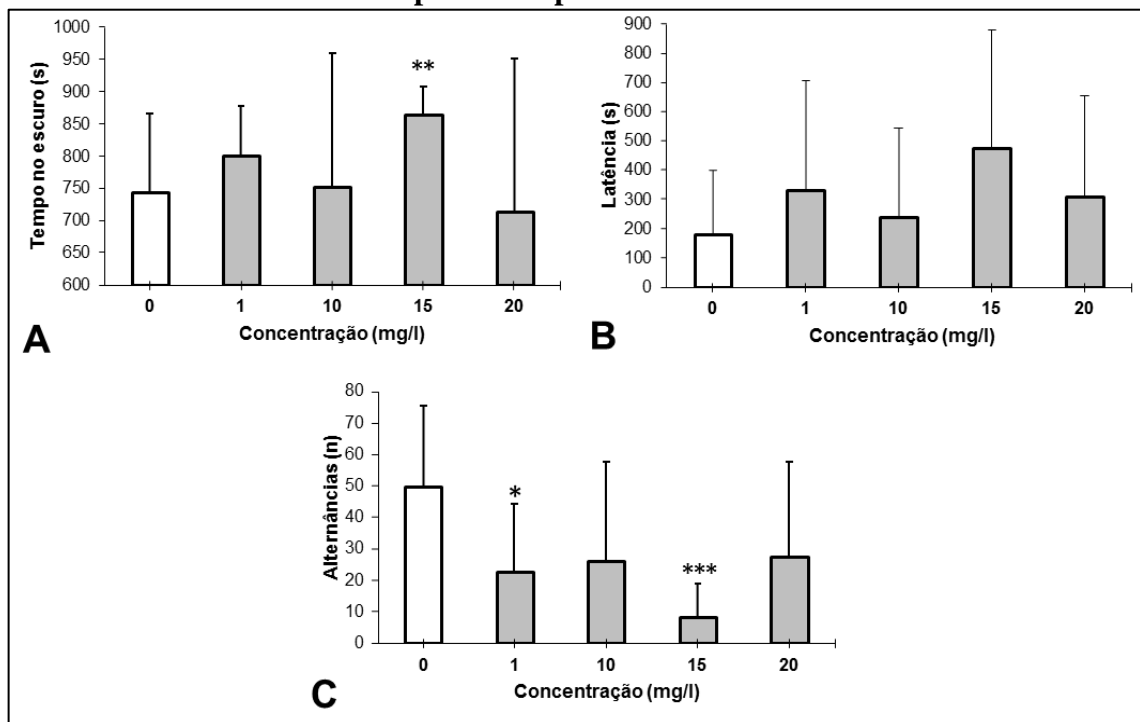
O Clonazepam (Gráfico 1) modificou o tempo no ambiente escuro de duas formas, aumentou o tempo de permanência com a administração de 0,001 mg/l durante 300 s [$U = 142$; $p = 0,011$] e diminuiu o tempo de permanência com a administração de 0,006 mg/l por 600 s [$t(22) = 2,112$; $p = 0,046$], com essa mesma concentração houve redução no tempo da latência [$U = 60$; $p = 0,016$]. O número de alternâncias diminuiu nas concentrações de 0,001 mg/l [$t(22) = 3,356$; $p = 0,003$] e 0,006 mg/l [$t(22) = 2,571$; $p = 0,017$] administradas durante 300s e 0,001 mg/l administrada por 600 s [$t(22) = 3,165$; $p = 0,001$], já a concentração de 0,006 mg/l administrada durante 600 s aumentou o número de alternâncias [$t(22) = - 3,735$; $p = 0,001$].

GRÁFICO 1 – Efeitos do Clonazepam na preferência claro-escuro em *Danio rerio*



Legenda: A) Tempo no escuro B) Tempo da Primeira Latência. C) Número de alternâncias. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p \leq 0,001$ x 0,0mg/l.

A Bupiriona (Gráfico 2) na concentração de 15 mg/l aumentou o tempo de permanência no escuro [$U = 146$; $p = 0,005$], mas não alterou o tempo da primeira latência em nenhuma concentração ($p > 0,05$), quanto as alternâncias, foram diminuídas nas concentrações de 1 mg/l [$t(22) = 2,559$; $p = 0,018$] e 15 mg/l [$t(22) = 4,344$; $p \leq 0,001$].

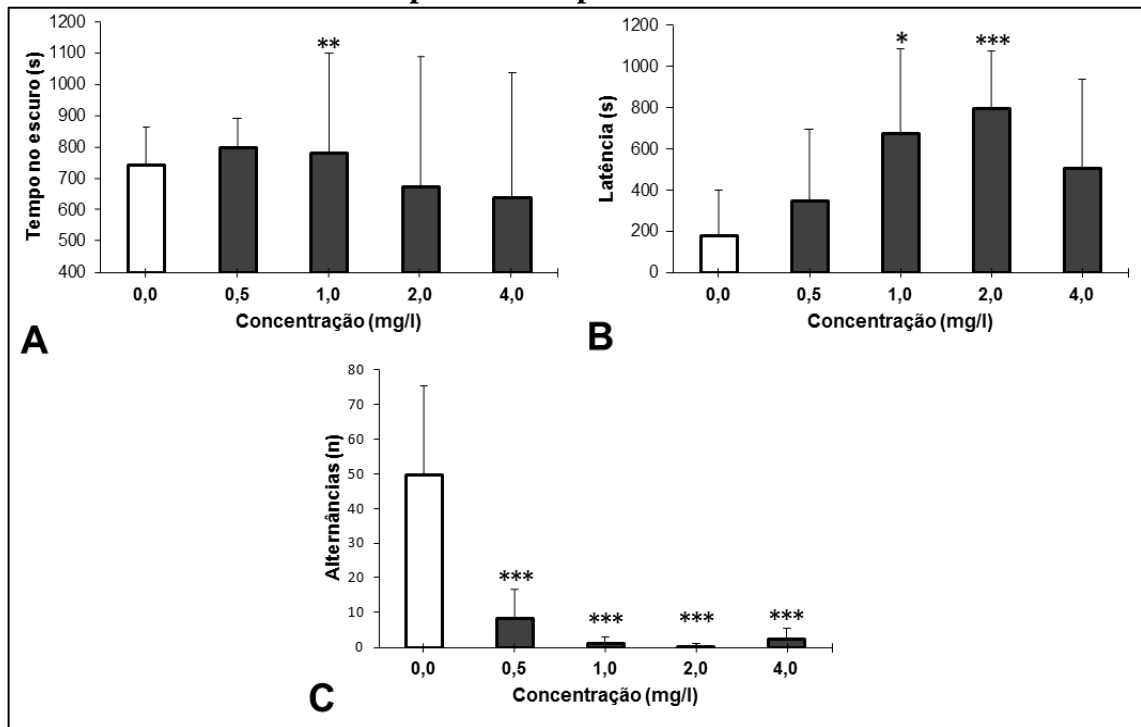
GRÁFICO 2 – Efeitos da Buspirona na preferência claro-escuro em *Danio rerio*

Legenda: A) Tempo no escuro; B) Tempo da Primeira Latência; C) Número de alternâncias. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p \leq 0,001$ x 0,0mg/l.

A Imipramina (Gráfico 3) na concentração de 1mg/l aumentou o tempo no escuro [$U = 146$; $p = 0,005$] e as concentrações de 1 mg/l [$U = 139,5$; $p = 0,017$] e 2 mg/l [$U = 158$; $p \leq 0,001$] aumentaram o tempo de latência. O número de alternâncias diminuiu de forma significativa em todas as concentrações testadas ($p \leq 0,001$).

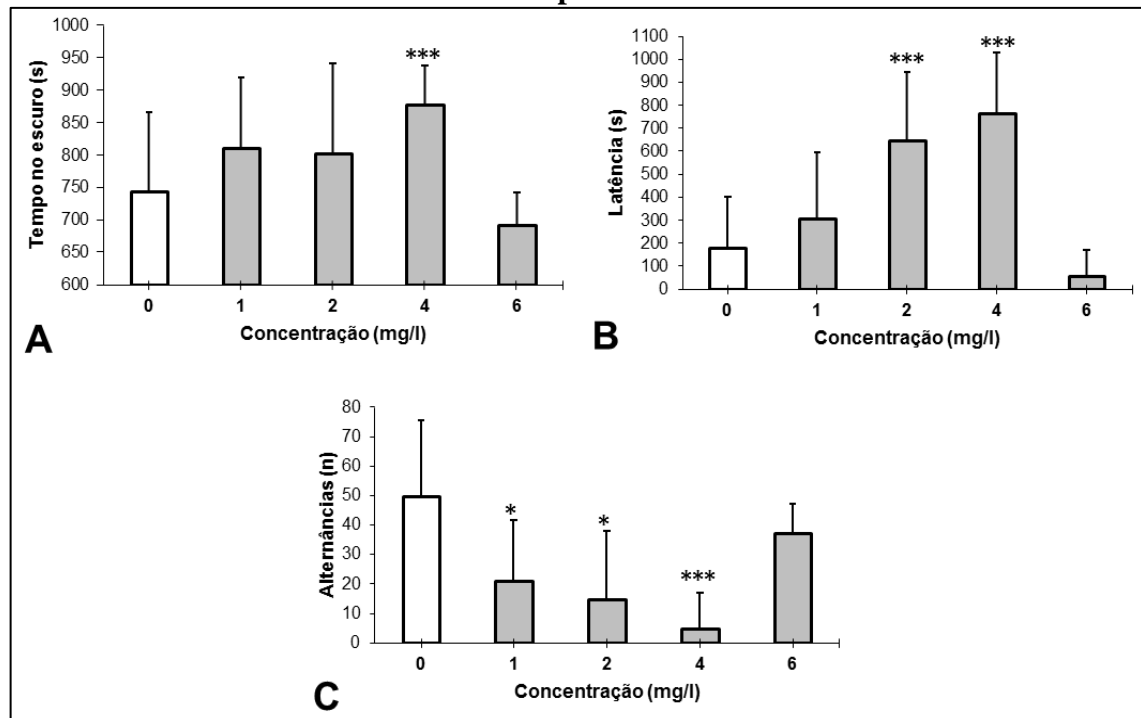
A Fluoxetina (Gráfico 4) na concentração de 4 mg/l aumentou significativamente o tempo no escuro em relação ao controle [$U = 154$; $p \leq 0,001$] e a concentração de 6 mg/l diminuiu o tempo em relação a de 4 mg/l [$U = 98$; $p = 0,002$]. A primeira latência nas concentrações de 2 e 4 mg/l aumentaram ao compará-las com 0 mg/l [$t(22) = - 4,339$; $p \leq 0,001$] [$t(22) = - 5,802$; $p \leq 0,001$] e a concentração de 6 mg/l diminuiu em comparação a de 4 mg/l [$U = 99$; $p \leq 0,001$]. O número de alternâncias foi reduzido gradativamente nas concentrações de 1 mg/l [$t(22) = 2,759$; $p = 0,011$], 2 mg/l [$t(22) = 3,255$; $p = 0,004$] e 4 mg/l [$U = 41$; $p \leq 0,001$] em comparação a concentração de 0 mg/l, no entanto a concentração de 6 mg/l aumentou em relação a de 4 mg/l [$U = 40$; $p = 0,004$].

GRÁFICO 3 – Efeitos da Imipramina na preferência claro-escuro em *Danio rerio*



Legenda: A) Tempo no escuro; B) Tempo da Primeira Latência; C) Número de alternâncias. *p < 0,05; **p < 0,01; ***p ≤ 0,001 x 0,0mg/l.

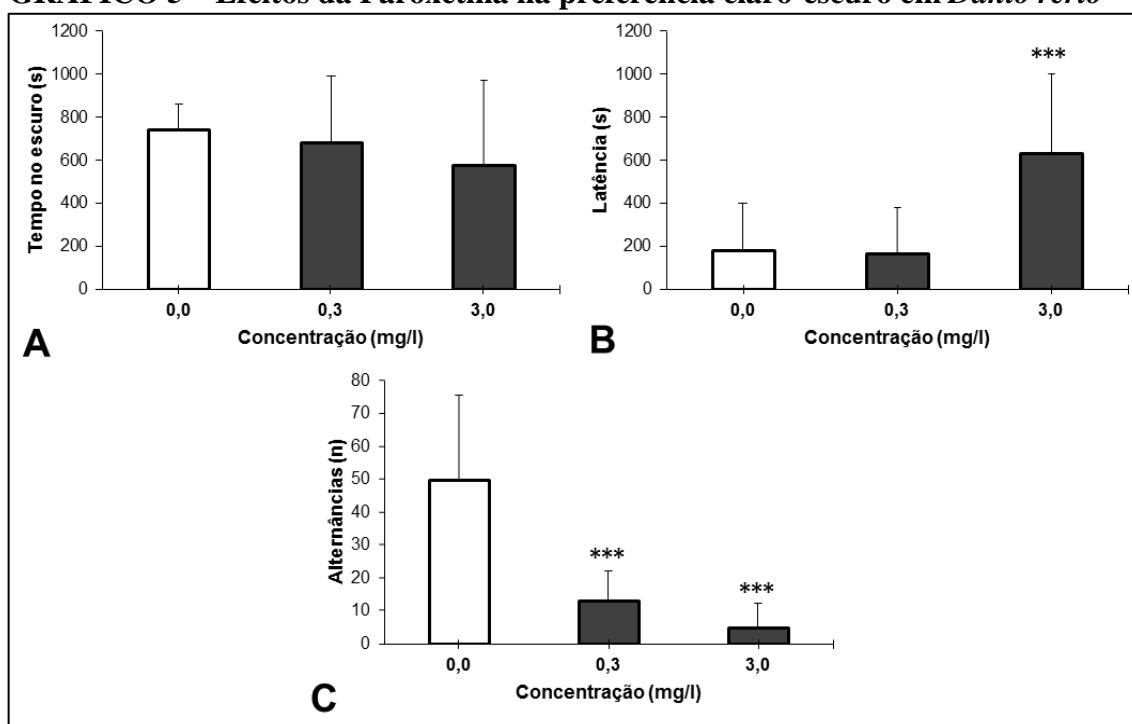
GRÁFICO 4 – Efeitos da Fluoxetina na preferência claro-escuro em *Danio rerio*



Legenda: A) Tempo no escuro; B) Tempo da Primeira Latência; C) Número de alternâncias. *p < 0,05; ***p ≤ 0,001 x 0,0mg/l.

O tempo no ambiente escuro não foi modificado com a administração de Paroxetina (Gráfico 5) ($p > 0,05$), entretanto o tempo de primeira latência aumentou com a concentração de 3,0 mg/l [$t(22) = -3,839$; $p \leq 0,001$] e o número de alternâncias diminuiu com as concentrações de 0,3 mg/l [$t(22) = 3,873$; $p \leq 0,001$] e 3,0 mg/l [$U = 38$; $p \leq 0,001$].

GRÁFICO 5 – Efeitos da Paroxetina na preferência claro-escuro em *Danio rerio*



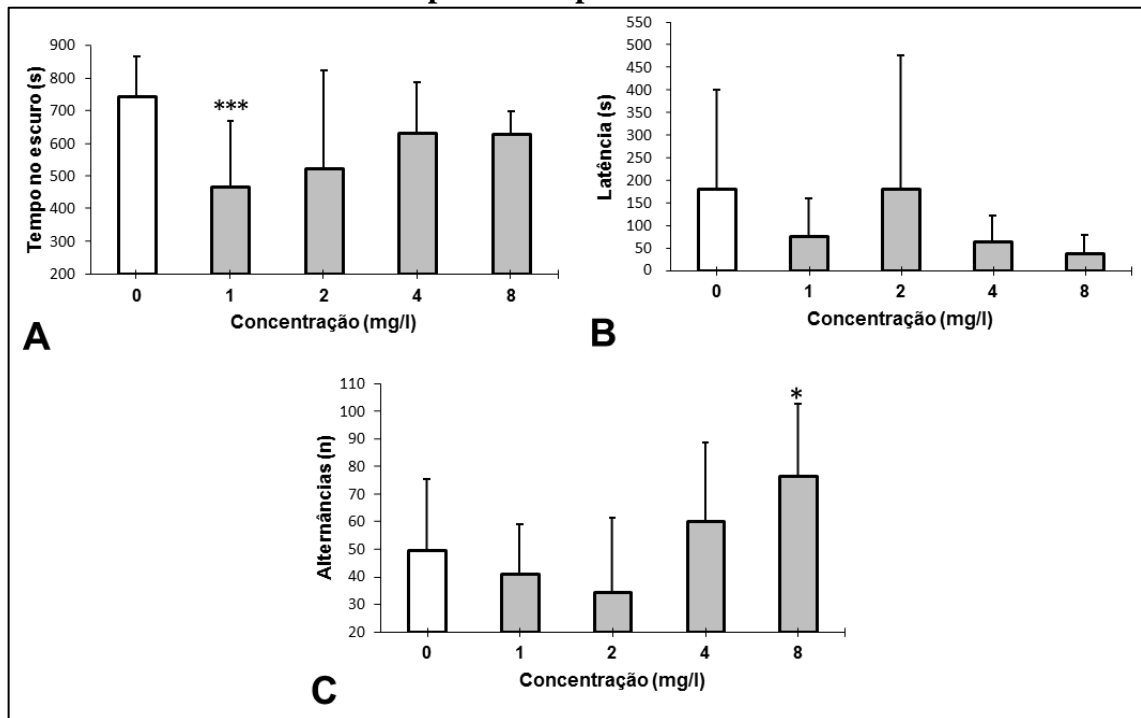
Legenda: A) Tempo no escuro; B) Tempo da Primeira Latência; C) Número de alternâncias; *** $p \leq 0,001$ x 0,0mg/l.

O antipsicótico típico Haloperidol (Gráfico 6) mostrou eficácia na redução do tempo despendido no escuro na concentração de 1mg/l [$t(22) = 3,402$; $p = 0,003$], o mesmo não pode ser dito do tempo de primeira latência que não foi modificado ($p > 0,05$). Verificando-se as alternâncias, a concentração de 8 mg/l aumentou o número das mesmas [$t(22) = - 3,460$; $p = 0,002$].

O antipsicótico atípico, Risperidona (Gráfico 7) não modificou o tempo no escuro ($p > 0,05$). Assim como o antipsicótico típico o tempo de primeira latência não foi modificado entre as concentrações utilizadas ($p > 0,05$) e o número de alternâncias foi reduzido na concentração de 0,5 mg/l ($U = 66,5$; $p = 0,043$).

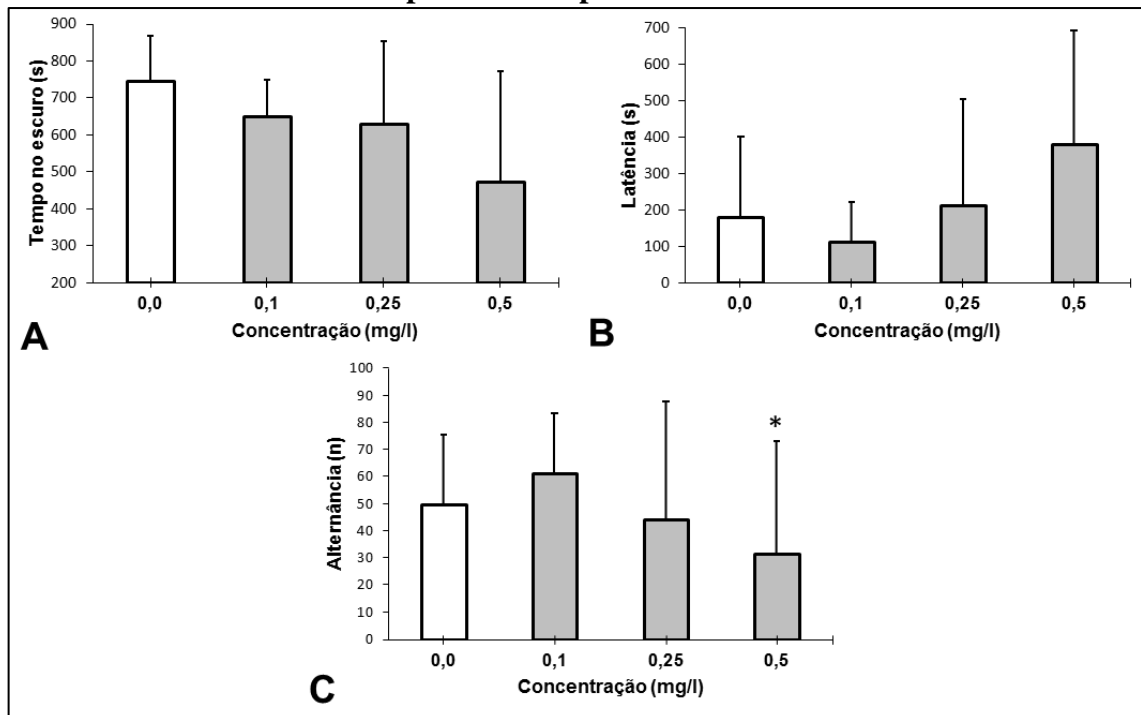
A Dietilpropiona (Gráfico 8) não apresentou efeito sob o tempo no escuro ($p > 0,05$), mas aumentou o tempo da primeira latência na concentração de 1mg/l [$U = 133$; $p = 0,047$] e diminuiu o número de alternâncias na mesma concentração [$t(22) = 2,979$, $P = 0,007$].

GRÁFICO 6 – Efeitos do Haloperidol na preferência claro-escuro em *Danio rerio*



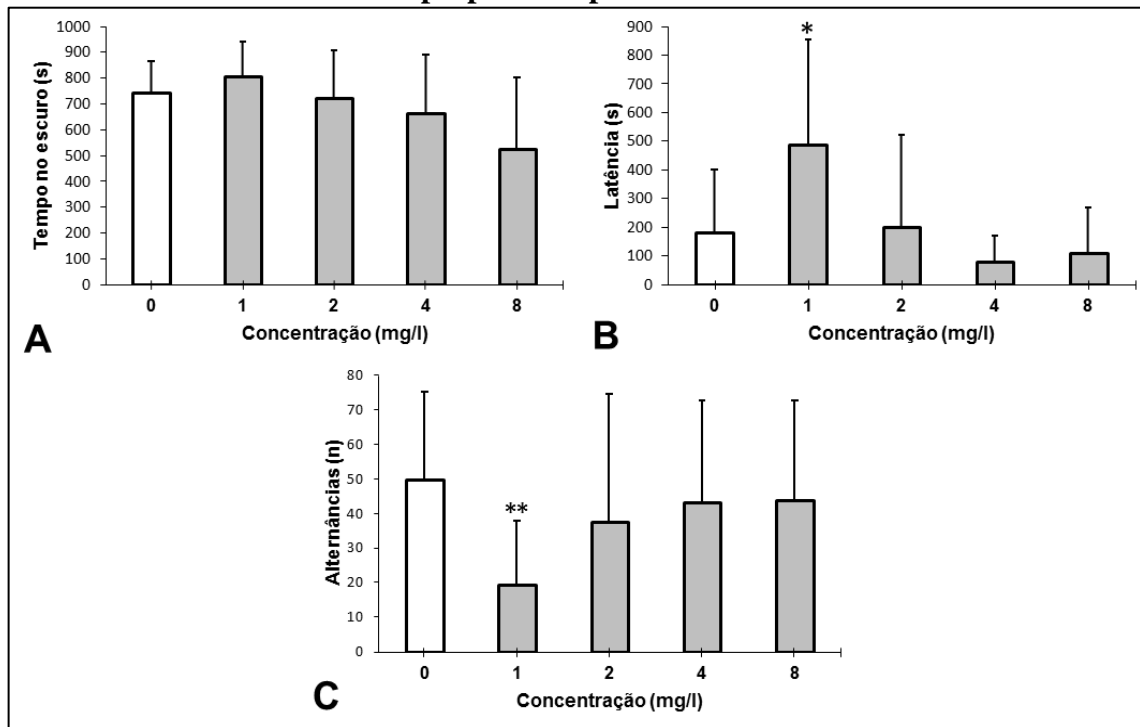
Legenda: A) Tempo no escuro; B) Tempo da Primeira Latência; C) Número de alternâncias. * $p < 0,05$; *** $p \leq 0,001$ x 0,0mg/l.

GRÁFICO 7 – Efeitos da Risperidona na preferência claro-escuro em *Danio rerio*



Legenda: A) Tempo no escuro; B) Tempo da Primeira latência; C) Número de alternâncias. * $p < 0,05$ x 0,0mg/l.

GRÁFICO 8 – Efeitos da Dietilpropiona na preferência claro-escuro em *Danio rerio*

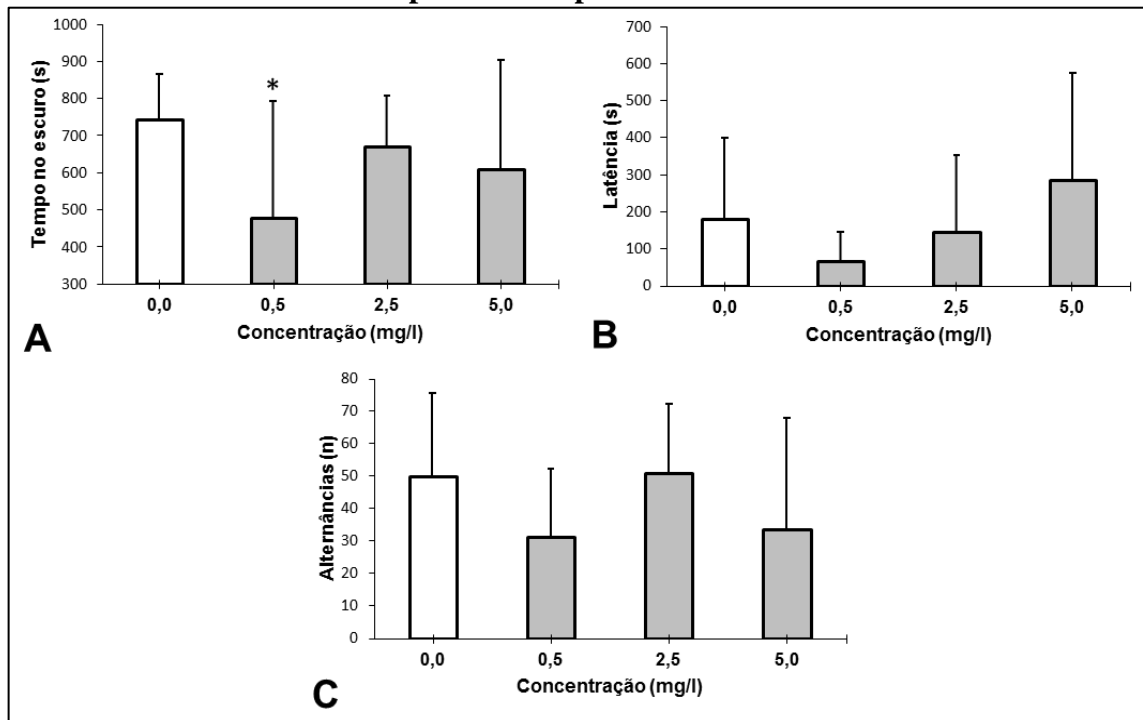


Legenda: A) Tempo no escuro; B) Tempo da Primeira Latência; C) Número de alternâncias. *p < 0,05, **p < 0,01 x 0,0mg/l.

O propranolol (Gráfico 9) diminuiu o tempo no escuro na concentração de 0,5mg/l [U = 61; p = 0,018] e não apresentou alteração na primeira latência (p > 0,05) e nem no número de alternâncias (p > 0,05).

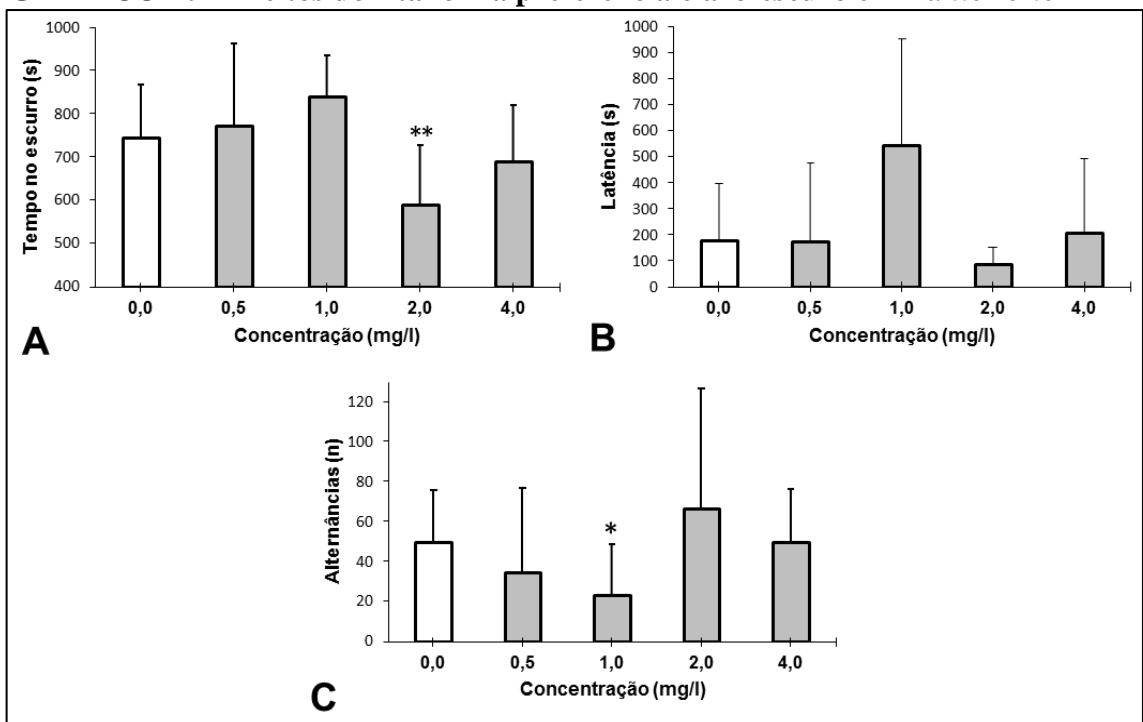
O etanol (Gráfico 10), na concentração de 2 mg/l reduziu o tempo que o *zebrafish* depende no compartimento escuro [t(22) = 2,825; p = 0,01]. O tempo da primeira latência não foi alterado (p > 0,05). O número de alternâncias diminuiu na concentração de 1 mg/l [t(22) = 2,396; p = 0,026].

GRÁFICO 9 – Efeitos do Propranolol na preferência claro-escuro em *Danio rerio*



Legenda: A) Tempo no escuro; B) Tempo da Primeira Latência; C) Número de alternâncias. * $p < 0,05$ x 0,0mg/l.

GRÁFICO 10 – Efeitos do Etanol na preferência claro-escuro em *Danio rerio*



Legenda: A) Tempo no escuro; B) Tempo da Primeira Latência; C) Número de alternâncias. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ x 0,0mg/l.

A Tabela 2 sintetiza as drogas, concentrações pesquisadas e suas ações sobre os parâmetros, tempo no ambiente escuro, tempo de primeira latência e número de alternâncias, além da indicação do possível efeito da droga na preferência claro-escuro.

TABELA 2 – Drogas, concentrações, ação sobre tempo no escuro, tempo da primeira latência e número de alternâncias e possível efeito na preferência claro-escuro.

DROGA	CONCENTRAÇÃO (mg/l)	TEMPO NO ESCURO (s)	LATÊNCIA (s)	ALTERNÂNCIA (n)	POSSÍVEL EFEITO
Benzodiazepínicos (BZD)					
Clonazepam	0,001; 0,003 e 0,006	↑	=	↓	Ansiogênico e Inibição motora
	0,001; 0,006 e 0,009	↓	↓	U	Ansiolítico e aumento da impulsividade e Motor dose-dependente
Ansiolítico não BZD					
Bupiriona	1; 10; 15 e 20	↑	=	↓	Ansiogênico Inibição motora
Antidepressivo tricíclico					
Imipramina	0,5; 1,0; 2,0 e 4,0	↑	↑	↓	Ansiogênico, Inibição da Impulsividade e motora
Antidepressivo ISRS					
Fluoxetina	1; 2; 4 e 6	↑	↑	↓	Ansiogênico, Inibição da Impulsividade e motora
Paroxetina	0,3 e 3,0	=	↑	↓	Inibição da impulsividade e motora
Antipsicóticos					
Haloperidol	1; 2; 4 e 8	↓	=	↑	Ansiolítico e Excitação motora
Risperidona	0,1; 0,25 e 0,5	=	=	↓	Inibição motora
Psicostimulante					
Dietilpropiona	1; 2; 4 e 8	=	↑	↓	Inibição da impulsividade e motora
Beta bloqueadores					
Propranolol	0,5; 2,5 e 5	↓	=	=	Ansiolítico
Depressores					
Etanol	0,5; 1,0; 2,0 e 4,0	↓	=	↓	Ansiolítico e Inibição motora

Legenda: ↑ aumentou; ↓ diminuiu; U curva em “U” dose-dependente; = Sem diferença estatística entre as concentrações

5. DISCUSSÃO

A preferência claro-escuro é um teste relativamente simples, indolor e não necessita de condicionamento, pois avalia a tendência natural do *zebrafish* (ALI *et al.*, 2011). A validação farmacológica da preferência claro-escuro é uma etapa fundamental para ampliar a utilidade do modelo.

O teste de compostos conhecidos e sua padronização permitem, por analogia, a seleção de novos compostos e o estudo não invasivo de atividade de compostos químicos, desta forma, o resultado de uma dada droga X, sendo similar a droga conhecida Y, pode ser tomado por mecanismos neurais similares entre si (WILLNER, 1991). Desta maneira, a padronização farmacológica do modelo gera uma alternativa de baixo custo para a seleção inicial de drogas com potencial psiquiátrico.

Uma atenção especial deve ser dirigida à seleção das concentrações das drogas a serem estudadas em *zebrafish*. Como o *zebrafish* é um modelo animal relativamente novo em farmacologia comportamental, as concentrações eficazes de diversos compostos psicotrópicos são desconhecidas (STEWART *et al.*, 2011b; 2011c). Apesar de possuir os principais “neurotransmissores de mamíferos”, peptídeos e hormônios, há diferenças entre a fisiologia das espécies (STEWART *et al.*, 2011b). Também podem ocorrer discrepâncias entre diferentes estudos com *zebrafish*, porque é difícil a adaptação das concentrações de drogas a partir de larvas para adultos (STEWART *et al.*, 2010; 2011b). Além disso, o método de administração da droga na maioria dos estudos com *zebrafish* é a imersão, diferente de outras espécies que comumente é a injeção, assim as concentrações eficazes das drogas podem ser baseadas em farmacocinéticas distintas das de roedores e humanos (STEWART *et al.*, 2011b; 2011c). Entretanto, isto não significa necessariamente uma falha no modelo, pois a imersão pode ser vantajosa para alguns fármacos, que são rapidamente metabolizados ou requerem um tratamento prolongado, e não envolve o estresse da injeção, que poderia confundir os dados comportamentais (STEWART *et al.*, 2011b).

Corroborando com esse último, há algumas limitações do uso de injeção intraperitoneal, muitas vezes é necessária a utilização de anestésicos para realização do procedimento, que pode gerar efeitos indesejáveis na fisiologia e no comportamento a ser avaliado. Outra limitação da injeção é que requer bastante habilidade, como o cuidado e precisão para evitar a perfuração de órgãos do peixe, bem como para minimizar as anormalidades comportamentais induzidos por dor. Além disso, as injeções utilizam pequenos volumes das drogas, logo, este método pode não ser apropriado para a aplicação de doses

elevadas de certas drogas, que exigiriam maiores volumes de injeção. Enquanto o método de imersão pode ser usado para a administração crônica da droga, injeções repetidas não são aconselháveis em pequenos animais como o *zebrafish* (STEWART *et al.*, 2011a).

Todas as drogas pesquisadas foram administradas de forma aguda, com a imersão do peixe no recipiente contendo a droga diluída na água. Foram utilizados Benzodiazepínico, Ansiolítico não benzodiazepínico (agonista parcial 5-HT_{1A}), Antidepressivo tricíclico e ISRS, Antipsicóticos típico e atípico, Psicoestimulante, Beta-bloqueador e Depressor do SNC.

Os benzodiazepínicos são ansiolíticos comumente utilizados no tratamento da ansiedade. O clonazepam reduziu o tempo no ambiente escuro na concentração de 0,006 mg/l administrado durante 600 s, sugerindo o efeito ansiolítico. Essa mesma concentração reduziu o tempo da primeira latência e aumentou o número de alternâncias, indicando aumento da atividade motora, ao contrário das concentrações de 0,001 mg/l e 0,006 mg/l administradas por 300 s e 0,001 mg/l administrada por 600 s que diminuíram em relação ao grupo controle, sugerindo sedação. Esses resultados são condizentes com o estudo de Maximino *et al.* (2011) sobre os efeitos de algumas drogas na preferência claro-escuro administradas via injeção intraperitoneal, no qual o tratamento agudo com clonazepam (0,05; 0,5 e 1,0 mg kg⁻¹) diminuiu o tempo no escuro na dose de 0,05 mg kg⁻¹, já a dose de 1,0 mg kg⁻¹ parece ter provocado ataxia ou sedação ao diminuir o número de alternâncias (MAXIMINO *et al.*, 2011). No estudo de Gebauer *et al.* (2011) que utiliza a caixa de preferência claro-escuro e tempo de teste diferente dos adotados por nossa pesquisa, a concentração de 0,3 mg/l de clonazepam diminuiu o tempo no escuro sem alterar a latência e o número de alternâncias. A diminuição do número de alternâncias na concentração de 0,001 mg/l durante 300 s pode ter sido responsável pelo aumento do tempo de permanência no ambiente escuro com esta concentração.

A buspirona na concentração de 15 mg/l majorou o tempo de permanência no escuro e reduziu o número de alternâncias nas concentrações de 1 e 15 mg/l. O tempo da primeira latência não foi alterado. O decréscimo das alternâncias na concentração de 15mg/l pode ter causado o aumento do tempo no compartimento escuro. A buspirona reduziu a atividade locomotora e a exploração nas doses de 10 e 30 mg/kg em gerbilos testados no labirinto em cruz elevado, as doses menores diminuíram a ansiedade sem provocar sedação (VARTY *et al.*, 2002). Os achados em roedores são complexos, alguns descrevem o tratamento com buspirona como ansiolítico, ansiogênico e/ou sedativo (VARTY *et al.*, 2002). A administração intraperitoneal da buspirona em *zebrafish* adulto produziu efeito ansiolítico, diminuindo o tempo gasto no escuro nas doses de 25 e 50 mg kg⁻¹, sem prejuízo da função

locomotora (MAXIMINO *et al.*, 2011). A bupirona administrada pela imersão do *zebrafish* nas concentrações (3,125; 6,25; 12,5; 25 e 50 mg/l) por 180 s avaliada com o teste do mergulho em tanque novo, diminuiu de forma linear (6,25; 25 e 50 mg/l) o tempo no fundo, sem promover sedação (BENCAN *et al.*, 2009). Talvez a duração do tempo de administração (300 s x 180 s) tenha ocasionado a diferença entre a diminuição da atividade locomotora encontrada no nosso estudo e o efeito ansiolítico encontrado no estudo de Bencan *et al.* (2009). Apoiando a hipótese de que o tempo de administração da bupirona é importante na resposta apresentada, 3mg/l foram suficientes para aumentar a exploração do ambiente claro, mas a duração da administração foi de 600 s (GEBAUER *et al.*, 2011) o dobro do tempo utilizado na presente pesquisa.

A imipramina na concentração de 1mg/l acresceu o tempo despendido no escuro e aumentou o tempo da primeira latência nas concentrações 1 e 2mg/l, o número de alternâncias foi reduzido bruscamente em todas as concentrações empregadas. Ratificando esses achados, a administração aguda de imipramina em ratos testados no labirinto em T elevado aumentou a latência para deixar os braços fechados e também prejudicou a atividade locomotora na arena quadrada, os resultados são correlatos com evidências clínicas que no início da administração a ansiedade é agravada e diminui com a administração prolongada (TEIXEIRA *et al.*, 2000).

O tempo de permanência no escuro em *zebrafish* submetidos a fluoxetina apresentou aumento na concentração de 4mg/l e a primeira latência aumentou nas concentrações de 2 e 4 mg/l. Interessantemente a concentração de 6 mg/l diminuiu os dois parâmetros em relação a concentração de 4mg/l. O número de alternâncias diminuiu nas concentrações de 1, 2 e 4 mg/l, a concentração de 6mg/l aumentou o valor mensurado por este parâmetro em comparação a 4 mg/l. O tratamento agudo com fluoxetina intraperitoneal (5 e 10 mg kg⁻¹) não alterou o tempo gasto no escuro, mas aumentou o número de cruzamentos na maior dose, enquanto o tratamento crônico diminuiu o tempo gasto no escuro na maior dose sem alterar o parâmetro motor (MAXIMINO *et al.*, 2011). Da mesma forma, a fluoxetina administrada por imersão, de forma aguda não teve efeito no teste do mergulho em tanque novo (STEWART *et al.*, 2011c), mas o tratamento crônico com 0,1 mg/l reduziu a latência para entrada na parte superior do tanque novo, maior tempo na parte superior e mais transições para o topo e a redução do número de movimentos erráticos (EGAN *et al.*, 2009). Apesar de os resultados da fluoxetina aguda não estar de acordo com os estudos prévios com *zebrafish*, está fortemente correlacionado com os resultados em roedores no teste de interação social (BAGDY *et al.*, 2001); labirinto em cruz elevado (DRAPIER *et al.*, 2007; KURT *et al.*, 2000; SILVA; BRANDÃO, 2000; SILVA *et al.*, 1999), medo condicionado (BURGHARDT *et al.*, 2007);

análise de grooming (ENGINAR *et al.*, 2008), nos quais no início do tratamento os sintomas de ansiedade são exacerbados.

A Paroxetina não alterou o tempo no ambiente escuro. Porém, aumentou o tempo de primeira latência na concentração de 3,0 mg/l e diminuiu o número de alternâncias nas concentrações de 0,3 e 3,0 mg/l. Em gerbilos, a paroxetina diminuiu a atividade horizontal no teste da atividade locomotora nas doses de 0,3 e 1,0 mg/kg (VARTY *et al.*, 2002). Em ratos a administração aguda de paroxetina foi ansiogênica nas doses de 3 e 12mg/kg demonstrado pela diminuição do tempo total nos braços abertos e da porcentagem do tempo de inatividade despendido nos braços abertos do labirinto em cruz elevado, a dose de 0,1 mg/kg não teve efeito algum (DRAPIER *et al.*, 2007).

O antipsicótico típico haloperidol mostrou ação ansiolítica ao reduzir o tempo despendido no escuro na menor concentração (1 mg/l), sem modificar o tempo da primeira latência. O aumento do número de alternâncias na concentração de 8mg/l é curioso, pois o haloperidol em *zebrafish*-larval produziu hipoatividade associada com surtos de nados erráticos (GIACOMINI *et al.*, 2006). O haloperidol não reverteu os efeitos de hiperlocomoção desencadeados pela exposição do *zebrafish* a prolina (SAVIO *et al.*, 2012).

O uso de antipsicótico atípico no tratamento da ansiedade tem aumentado, mas a sua eficácia ainda não é bem conhecida (VULINK *et al.*, 2011). A risperidona modificou apenas o parâmetro motor com a diminuição do número de alternâncias, a hipótese é que o uso agudo de antipsicóticos atípicos não seja suficiente para modificar o comportamento ansioso. Na revisão de Vulink *et al.* (2011) observamos que a diminuição da ansiedade ocorre após semanas de tratamento. Um dado interessante é que além da diminuição do número de alternâncias, a maior concentração provocou *freezing* no claro em 50% dos animais com média de duração de $505,75 \pm 44,56$ s, o que mostra os efeitos extrapiramidais.

A Dietilpropiona não apresentou efeito sobre o tempo no escuro, mas aumentou o tempo da primeira latência na concentração de 1mg/l e diminuiu o número de alternâncias na mesma concentração. A anfetamina não apresentou efeito em nenhum parâmetro mensurado no teste do labirinto em cruz elevado em gerbilos (VARTY *et al.*, 2002).

O propranolol diminuiu o tempo no escuro somente na menor concentração, sem modificar o tempo da primeira latência e número de alternâncias. Sugerindo que sua ação ansiolítica ocorre em pequenas concentrações, pois no estudo de Gebauer *et al.* (2011) falhou em diminuir a ansiedade com a concentração de 3 mg/l.

O etanol, na concentração de 2 mg/l, reduziu o tempo que o *zebrafish* despende no compartimento escuro, não alterou o tempo da primeira latência e o número de alternância foi

reduzido na concentração de 1mg/l. O etanol aplicado via intraperitoneal também diminuiu o tempo no escuro nas doses 0,25% e 0,5% mas não em 1,0% (v.v.) e teve um efeito bifásico na locomoção com aumento em 0,5% e diminuição não significativa em 1,0% (MAXIMINO *et al.*, 2011). Na administração por imersão, 0,5% de etanol diminuiu o tempo no escuro (GEBAUER *et al.*, 2011). O etanol exerceu efeito ansiolítico com as concentrações de 0,5% e 1,0% aumentando o tempo no compartimento superior, sem alterar a velocidade do nado, mas não alterou o tempo com 1,5% de etanol (MATHUR; GUO, 2011). O tratamento agudo por imersão com 0,3% de etanol durante 300 s diminuiu a latência para entrada na porção superior no teste do mergulho em tanque novo, aumentou o número de transições para a porção superior e aumentou o tempo total despendido nessa área (EGAN *et al.*, 2009).

O tempo de administração maior pode ser determinante para desencadear o efeito de drogas como a buspirona. Ao comparar-se o tempo de 10, 30 e 50 minutos de exposição a concentração da droga a ser testada, verificou-se que o tempo de 10 minutos é suficiente para induzir efeitos comportamentais (GEBAUER *et al.*, 2011). Assim, provavelmente a administração durante 10 minutos (600 s) seja mais adequada do que 5 minutos (300 s).

Além disso, a dificuldade em homogeneizar os fenótipos pode ter influenciado os resultados não significativos devido ao grande desvio padrão. O *zebrafish* pode exibir fenótipos comportamentais atípicos e/ou variados, diferentes cepas de *zebrafish* podem ter diferentes níveis basais de ansiedade e variações na resposta também podem ser vistas entre a cepa do tipo selvagem padrão, com peixes que evitam mais ou menos o ambiente claro (STEWART *et al.*, 2011d).

Ao compara-se o *zebrafish* do tipo selvagem (*short fin*) com três cepas mutantes, *long fin*, leopardo e albino, as cepas mutantes tendiam a apresentar maior latência para entrar na porção superior no teste do mergulho em tanque novo, apesar da diferença ser significativa apenas nos leopardos. O grupo selvagem tendia a entrar mais na parte superior, as cepas mutantes, albinos e leopardos, passavam menos tempo na porção superior, comparados aos *zebrafish* selvagens. É importante salientar que a distância percorrida e a velocidade do nado foram similares nos quatro grupos, indicando não haver diferenças motoras/neurológicas na habilidade do nado entre as cepas (EGAN *et al.*, 2009). Essas observações são importantes sugerindo diferenças genéticas na ansiedade entre várias cepas comercializadas (EGAN *et al.*, 2009).

6. CONCLUSÃO

Essa pesquisa mostra os efeitos das drogas utilizadas na clínica da ansiedade administradas de forma aguda via imersão, em *zebrafish* adultos, para verificar a sensibilidade da preferência claro-escuro.

O benzodiazepínico clonazepam, o antipsicótico haloperidol, o beta bloqueador propranolol e o etanol, demonstraram reduzir o tempo de permanência no ambiente escuro, indicando efeito ansiolítico com a administração aguda.

O clonazepam administrado por 300 s aumentou o tempo no escuro na menor concentração, presumivelmente causado pela redução da atividade locomotora. Por outro lado, a administração durante 600 s da concentração intermediária diminuiu o tempo no escuro e da primeira latência, assim como aumentou a atividade locomotora, embora a menor dose tenha causado diminuição dessa atividade, é visível o efeito ansiolítico.

A buspirona aumentou o tempo de permanência no escuro, mas provavelmente esse resultado seja devido a redução da atividade motora e não ao aumento da ansiedade.

A imipramina e a fluoxetina aumentaram o tempo de permanência no escuro, o tempo de primeira latência e diminuíram o número de cruzamentos, indicando um efeito ansiogênico com a administração aguda dessas drogas, consistente com os dados em roedores.

A paroxetina não alterou o tempo no escuro, entretanto aumentou o tempo da primeira latência e diminuiu a atividade locomotora.

O haloperidol foi eficiente na redução da ansiedade na menor concentração, curiosamente aumentou a atividade motora na maior concentração, ao contrário da risperidona que diminuiu a atividade motora.

A dietilpropiona não modificou o tempo despendido no escuro, mas aumentou o tempo da primeira latência e diminuiu a atividade motora apenas na menor concentração.

O propranolol reduziu tempo no escuro sem alterar os outros parâmetros. O etanol foi efetivo na redução da ansiedade com a concentração intermediária e diminuiu a atividade locomotora em uma concentração menor.

As medidas obtidas no modelo são complexas do ponto de vista farmacológico, sendo que a ansiedade mensurada segue o referido na literatura com efeitos de drogas gabaérgicas e serotoninérgicas. O componente motor é modulado por diversos neurotransmissores no cérebro, entre eles a noradrenalina em sua inibição, além de dopamina e serotonina, e é excitado pelas drogas que agem sobre estes sistemas e mais as drogas gabaérgicas, o que pode indicar que há um efeito cruzado entre os sistemas motor e emocional do peixe.

Recomenda-se para novas pesquisas o uso da administração crônica da imipramina, paroxetina, haloperidol, risperidona, dietilpropiona e propranolol para verificar se há alteração dos efeitos ao longo do tratamento. Além disso, é necessária a utilização de outras concentrações, pois ainda são desconhecidas as doses efetivas de várias drogas em *zebrafish*.

A preferência claro-escuro é um modelo promissor para a pesquisa de compostos que alteram o comportamento ansioso, verificada sua alta validade de face e atualmente preditiva.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AHMED, O.; SEGUIN, D.; GERLAI, R. An automated predator avoidance task in zebrafish. *Behavioural Brain Research*, v. 216, 166 - 171, 2011.

ALI, S.; CHAMPAGNE, D.L.; SPAINK, H.P.; RICHARDSON, M.K. Zebrafish Embryos and Larvae: A New Generation of Disease Models and Drug Screens. *Birth Defects Research*, v 93, (Part C), p. 115 - 133, 2011.

BAGDY, G.; GRAF, M.; ANHEUER, Z.E.; MODOS, E.A.; KANTOR, S. Anxiety-like effects induced by acute fluoxetine, sertraline or m-CPP treatment are reversed by pretreatment with the 5-HT_{2C} receptor antagonist SB-242084 but not the 5-HT_{1A} receptor antagonist WAY-100635. *International Journal of Neuropsychopharmacol*, v. 4, p. 399 – 408, 2001.

BARROS, T.P.; ALDERTON, W.K.; REYNOLDS, H.M.; ROACH, A.G.; BERGHMANS, S. Zebrafish: an emerging for in vivo pharmacological assessment to identify potential safety liabilities in early drug discovery. *British Journal of Pharmacology*, v. 154, p. 1400 - 1413, 2008.

BELZUNG, C.; GRIEBEL, G. Measuring normal and pathological anxiety-like behaviour in mice: a review. *Behavioural Brain Research*, v. 125, p. 141 - 149, 2011.

BENCAN, Z.; SLEDGE, D.; LEVIN, E.D. Buspirone, chlordiazepoxide and diazepam effects in zebrafish model of anxiety. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*, v. 94, p. 75-80, 2009.

BLANCHARD, D.C.; BLANCHARD, R.J. Ethoexperimental approaches to the biology of emotion. *Annual Review Psychology*, v. 39, p. 43 - 68, 1988.

BLANCHARD, R.J.; HORI, K.M.; MAYER, S.I.; RODGERS, R.J.; BLANCHARD, D.C. An ethopharmacological approach to the biology of anxiety. In MORATO S, CAROBREZ, A.P.; LIMA, T.C.M. *Neurosciences & Behavior* - 2. Ribeirão Preto: Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, p. 125 - 141, 1990.

BLASER, R.E.; CHADWICK, L.; MCGINNIS, G.C. Behavioral measures of anxiety in zebrafish. *Behavioural Brain Research*, v. 208, p. 56 - 62, 2010.

BOURIN, M.; CHUE, P.; GUILLON, Y. Paroxetine: A Review. *CNS Drug Reviews*, v. 7, p. 25 – 47, 2001.

BURGHARDT, N.S.; BUSH, D.E.A.; McEWEN, B.S.; LeDOUX, J.E. Acute selective serotonin reuptake inhibitors increase conditioned fear expression: Blockade with a 5-HT_{2C} receptor antagonist. *Biological Psychiatry*, v. 62, p. 1111 - 1118, 2007.

CARR, G.V.; SCHECHTER, L.E.; LUCKI, I. Antidepressant and anxiolytic effects of selective 5-HT₆ receptor agonists in rats. *Psychopharmacology*, v. 213, p. 499 - 507, 2011.

CHAMPAGNE, D.L.; HOEFNAGELS, C.C.M.; KLOET, R.E.; RICHARDSON, M.K. Translating rodent behavioral repertoire to zebrafish (*Danio rerio*): Relevance for stress research. *Behavioural Brain Research*, v. 214, p. 332 - 342, 2010.

CHARNEY, D.S.; MIHIC, S.J.; HARRIS, R.A. Hipnóticos e sedativos. In: BRUNTON, L.L.; LAZO, J.S.; PARKER, K.L. *Goodman & Gilman: As bases farmacológicas da terapêutica*. 11. ed. Rio de Janeiro: McGraw-Hill Interamericana do Brasil, 2006.

CRYAN, J.F.; SWEENEY, F.F. The age of anxiety: role of animal models of anxiolytic action in drug discovery. *British Journal of Pharmacology*, v. 164, p. 1129 - 1161, 2011.

DIAS, Cláudio Alberto Gellis de Mattos. *Preferência Claro-escuro em Danio rerio: Efeitos do horário da coleta e de regime de luz*. 2010. 34 f. Dissertação (Mestrado em Neurociências) – Programa de Pós-Graduação em Neurociências e Biologia Celular, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Pará, Belém: UFFPA, 2010.

DRAPIER, D. *et al.* Effects of acute fluoxetine, paroxetine and desipramine on rats tested on the elevated plus-maze. *Behavioural Brain Research*, v. 176, p. 202 – 209, 2007.

EGAN, R.J. *et al.* Understanding behavioral and physiological phenotypes of stress and anxiety in zebrafish. *Behavioural Brain Research*, v. 205, p. 38 – 44, 2009.

ENGINAR, N.; HATIPOGLU, I.; FIRTINA, M. Evaluation of the acute effects of amitriptyline and fluoxetine on anxiety using grooming analysis algorithm in rats. *Pharmacology Biochemistry Behavior*, v. 89, p. 450–455, 2008.

FORMAN, S.A.; CHOU, J.; STRICHARTZ, G.R.; LO, E.H. Farmacologia da neurotransmissão GABAérgica e glutamatérgica. In: GOLAN *et al.* *Princípios de farmacologia: A base fisiopatológica da farmacoterapia*. 2. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2009.

GARCIA-MIJARES, M.; BERNARDES, A.M.T.; SILVA, M.T.A. Diethylpropion produces psychostimulant and reward effects. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*, v. 91, p. 621 – 628, 2009.

GEBAUER, D.L.; PAGNUSSAT, N.; PIATO, A.L.; SCHAEFER, I.C.; BONAN, C.D.; LARA, D.R. Effects of anxiolytics in zebrafish: Similarities and differences between benzodiazepines, buspirone and ethanol. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*, v. 99, p. 480 - 486, 2011.

GERLAI, R. High-throughput behavioral screens: the first step towards finding genes involved in vertebrate brain function using zebrafish. *Molecules*, v. 15, p. 2609 - 2622, 2010a.

GERLAI, R. Zebrafish Antipredatory responses: a future for translational research? *Behavioural Brain Research*, v. 207, p. 223 - 231, 2010b.

GIACOMINI, N.J.; ROSE, B.; KOBAYASHI, K.; GUO, S. Antipsychotics produce locomotor impairment in larval zebrafish. *Neurotoxicology and Teratology*, v. 28, p. 245 – 250, 2006.

GRAEFF, F.G.; ZANGROSSI JR, H. The hypothalamic-pituitary-adrenal axis in anxiety and panic. *Psychology & Neuroscience*, v. 3, 1, p.3 - 8, 2010.

HOLLWAY, J.A.; AMAN, M.G. Pharmacological treatment of sleep disturbance in developmental disabilities: A review of the literature. *Research in Developmental Disabilities*, v. 32, p. 939 - 962, 2011.

HOWARD, P.; SHUSTER, J.; TWYLCROSS, R.; MIHALYO, M.; WILCOCK, A. Therapeutic Reviews: Psychostimulantes. *Journal of pain and symptom management*, v. 40, p.789 - 795, 2010.

KALUEFF, A.V.;NUTT,D.J. Role of GABA in anxiety and depression. *Depression and Anxiety*, v. 24, p. 495 - 517, 2007.

KIM, Y.J.; NAM, R.H.; YOO, Y.M.; LEE, C.J. Identification and functional evidence of GABAergic neurons in parts of the brain of adult zebrafish (*Danio rerio*). *Neuroscience Letters*, v. 355, p. 29 – 32, 2004.

KURT, M.; ARIK, A.C.; CELIK, S. The effects of sertraline and fluoxetine on anxiety in the elevated plus-maze test in mice. *Journal of Basic Clinical Physiology and Pharmacology*, v. 11, p. 173 – 180, 2000.

LADER, M. Benzodiazepines revisited—will we ever learn? *Addiction*, v. 106, p. 2086 – 2109, 2011.

LEE, S.T; Park, J.H; Kim, M. Efficacy of the 5-HT_{1A} agonist, buspirone hydrochloride, in migraineurs with anxiety: A randomized, prospective, parallel group, double-blind, placebo-controlled study. *Headache*, v. 45, p. 1004 – 1011, 2005.

LIGHTOWLER, S.; KENNETT, G.A.; WILLIAMSON, I.J.; BLACKBURN, T.P.; TULLOCH, I.F. Anxiolytic-like effect of paroxetine in a rat social interaction test. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, v. 49, p. 281 - 285, 1994.

MATHUR, P.; GUO, S. Use of zebrafish as a model to understand mechanisms of addiction and complex neurobehavioral phenotypes. *Neurobiology of Disease*, v. 40, p. 66 - 72, 2010.

MATHUR, P.; GUO, S. Differences of acute versus chronic ethanol exposure on anxiety-like behavioral responses in zebrafish. *Behavioural Brain Research*, v. 219, p. 234 – 239, 2011.

MAXIMINO, C.; BRITO, T.M.; DIAS, C.A.G.M.; GOUVEIA JR, A.; MORATO, S. Scototaxis as anxiety-like behavior in fish. *Nature Protocols*, v. 5, p. 209 - 216, 2010a.

MAXIMINO, C.; BRITO, T.M.; BATISTA, A.W.S.; HERCULANO, A.M.; MORATO, S.; GOUVEIA JR, A. Measuring anxiety in zebrafish: A critical review. *Behavioural Brain Research*, v. 214, p. 157 - 171, 2010b.

MAXIMINO, C.; SILVA, A.W.B.; GOUVEIA JR, A.; HERCULANO, A.M. Pharmacological analysis of zebrafish (*Danio rerio*) scototaxis. *Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry*, v. 35, p. 624 – 631, 2011.

MCINTYRE, R.; KATZMAN, M.; The role of atypical antipsychotics in bipolar depression and anxiety disorders. *Bipolar Disorders*, v. 5, (Suppl. 2), p. 20 – 35, 2003.

MELLO JR, E.L.; MAIOR, R.D.; CAREY, R.J.; HUSTON, J.P.; TOMAZ, C.; MÜLLER, C.P. Serotonin 1A-receptor antagonism blocks psychostimulant properties of diethylpropion in marmosets (*Callithrix penicillata*). *European Journal of Pharmacology*. v. 511, p. 43 - 52, 2005.

MELTZER, H.Y.; MASSEY, B.W. The role of serotonin receptors in the action of atypical antipsychotic drugs. *Current Opinion in Pharmacology*, v. 11, p. 59 - 67, 2011.

MOCH, S. A perspective on anxiolytics. *SA Pharmaceutical Journal*, p. 20 - 24 2009.

MOHLER, H. The GABA system in anxiety and depression and its therapeutic potential. *Neuropharmacology*, v. 62, p. 42 – 53, 2012.

NADAL-VICENS, M.; CHYUNG, J.H.; TURNER, T.J. Farmacologia da neurotransmissão serotoninérgica e adrenérgica central. In GOLAN *et al.* *Princípios de farmacologia: A base fisiopatológica da farmacoterapia*. 2. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2009.

NOWAKOWSKA, E. CHODERA, A. KUSK, K. RYBAKOWSKI J. Some behavioral of risperidone in rats: comparison with haloperidol. *European Neuropsychopharmacology*. v.9, p. 421 - 426, 1999.

RANG, H.P.; DALE, M.M.; RITTER, J.M.; FLOWER, R.J. *Rang & Dale Farmacologia*. 6. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2007.

RESSLER, K.J.; NEMEROFF, C.B. Role of serotonergic and noradrenergic systems in the pathophysiology of depression and anxiety disorders. *Depression and Anxiety*, v. 12, supplement 1, p. 2 - 19, 2000.

RICO, E.P.; ROSEMBERG, D.B.; SEIBT, K.J.; CAPIOTTI, K.M.; DA SILVA, R.S.; BONAN, C.D. Zebrafish neurotransmitter systems as potential pharmacological and toxicological targets. *Neurotoxicology and Teratology*, v. 33, p. 608 - 617, 2011.

RIHEL, J.; SCHIER, A.F. Behavioral Screening for Neuroactive Drugs in Zebrafish. *Developmental Neurobiology*, p. 373 – 385, 2011.

RODRIGUEZ-ROMAGUERA, J.; SOTRES-BAYON, F.; MUELLER, D.; QUIRK, G.J. Systemic propranolol acts centrally to reduce conditioned fear in rats without impairing extinction. *Biological Psychiatry*, v. 65, p. 887 - 892, 2009.

SAVIO, L.E.B.; VUADEN, F.C. PIATO, A.L. BONAN, C.D.; WYSE, A.T.S. Behavioral changes induced by long-term proline exposure are reversed by antipsychotics in zebrafish *Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry*, v. 36, p. 258 – 263, 2012.

SERRA, E.L.; MEDALHA, C.C.; MATTIOLI, R. Natural preference of zebrafish (*Danio rerio*) for a dark environment. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, v. 32, p. 1551 – 1553, 1999.

SILVA, M.T.; ALVES, C.R.; SANTAREM, E.M.; Anxiogenic-like effect of acute and chronic fluoxetine on rats tested on the elevated plus-maze. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, v. 32, p. 333–339, 1999.

SILVA, R.C.B.; BRANDÃO, M.L. Acute and chronic effects of gepirone and fluoxetine in rats tested in the elevated plus-maze: An ethological analysis. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, v. 65, p. 209 - 216, 2000.

SPENCE, R.; GERLACH, G.; LAWRENCE C.; SMITH, C. The behavior and ecology of zebrafish, *Danio rerio*. *Biology Review*, v. 83, 13-34, 2008.

STANDAERT, D.G.; GALANTER, J.M. Farmacologia da neurotransmissão dopaminérgica. In GOLAN *et al.* *Princípios de farmacologia: A base fisiopatológica da farmacoterapia*. 2. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2009.

STEENBERGEN, P.J.; RICHARDSON, M.K.; CHAMPAGNE, D.L. Patterns of avoidance behaviours in the light/dark preference test in young juvenile zebrafish: A pharmacological study. *Behavioral Brain Research*, v. 222, p. 15 – 15, 2011.

STEWART, A. *et al.* The developing utility of zebrafish in modeling neurobehavioral disorders. *International Journal of Comparative Psychology*, v. 23, p. 104 – 120, 2010.

STEWART, A. *et al.* Intraperitoneal injection as a method of psychotropic drug delivery in adult zebrafish. *Neuromethods*, v. 51, p. 169 - 179, 2011a.

STEWART, A. *et al.* Zebrafish models to study drug abuse-related phenotypes. *Reviews in the Neurosciences*, v. 22, p. 95 – 105, 2011b.

STEWART, A. *et al.* Pharmacological modulation of anxiety-like phenotypes in adult zebrafish behavioral models. *Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry*, v. 35, p. 1421 – 1431, 2011c.

STEWART, A. *et al.* Neurophenotyping of adult zebrafish using the Light/Dark Box Paradigm. *Neuromethods*, v. 51, p. 157-167, 2011d.

SUMANAS, S.; LIN, S. Zebrafish as a model system for drug target screening and validation. *Drug Discovery Today: Targets*, v. 3, p. 89 - 96, 2004.

TEIXEIRA, R.C.; ZANGROSSI JR, H.; GRAEFF, F.G. Behavioral effects of acute and chronic imipramine in the elevated T-Maze modelo of anxiety. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, v. 65, p. 571 – 576, 2000.

TIERNEY, K.B. Behavioural assessments of neurotoxic effects and neurodegeneration in zebrafish. *Biochimica et Biophysica Acta*, v. 1812, p. 381 - 389, 2011.

VARTY, G.B.; MORGAN, C.A.; COHEN-WILLIAMS, M.E.; COFFIN, V.L.; CAREY, G.J. The Gerbil Elevated Plus-Maze I: Behavioral Characterization and Pharmacological Validation, *Neuropsychopharmacology*, v. 27, p. 357 – 370, 2002.

VULINK, N.C.C.; FIGEE, M.; DENYS, D. Review of atypical antipsychotics in anxiety. *European Neuropsychopharmacology*, v. 21, p. 429 – 449, 2011.

WILLNER, P. *Behavioural Models in Psychopathology: Theoretical, Industrial and Clinical Perspectives*. Cambridge: Cambridge University Press, 1991.

WONG, D.T.; PERRY.; K.W.; BYMASTER, F.P. Case history: The discovery of fluoxetine hydrochloride (Prozac). *Nature Review Drug Discovery*, v. 4, p. 764 – 774, 2005.

WONG, K. *et al.* Analyzing habituation responses to novelty in zebrafish (*Danio rerio*). *Behavioral Brain Research*, v. 208, p. 450 - 457, 2010.

ZOHAR, J.; WESTENBERG, H.G.M. Anxiety disorders: a review of tricyclic antidepressants and selective serotonin reuptake inhibitors. *Acta Psychiatrica Scandinavica*, v. 101, p. 39 – 49, 2000.