



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

TAYANA SILVA DE CARVALHO

**A intensificação do comportamento tipo ansiedade induzido por
caféina em *Daniorerio*(zebrafish) é prevenida pelo tratamento com α -
Tocoferol e L-NAME**

Orientador: Prof. Dr. Anderson Manoel Herculano Oliveira da Silva
Co-orientadora: Prof(a) Dr (a) Karen Renata Herculano Matos Oliveira

Belém
2014

TAYANA SILVA DE CARVALHO

**A intensificação do comportamento tipo ansiedade induzido por
cafeína em *Daniorerio*(zebrafish) é prevenida pelo tratamento com α -
Tocoferol e L-NAME**

Dissertação de Mestrado
apresentado ao Programa de Pós-
Graduação em Neurociências e
Biologia Celular (Área de
Concentração Neurociências),
Instituto de Ciências Biológicas,
Universidade Federal do Pará.

Orientador: Prof. Dr.
Anderson Manoel Herculano
Oliveira da Silva

**Belém
2014**

Dados Internacionais de Catalogação-na-publicação (CIP)

Biblioteca do CESUPA, Belém - PA

C331i Carvalho, Tayana Silva de

A Intensificação do comportamento tipo ansiedade induzido por cafeína em *Danio rerio* (zebrafish) é prevenida pelo tratamento com α -Tocoferol e L-NAME / Tayana Silva de Carvalho, orientador; Anderson Manoel Herculano Oliveira da Silva, 2014.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Pará. Instituto de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Neurociências e Biologia Celular, , 2014.

1. Cafeína. 2. Ansiedade - comportamento. 3 Sistema nitrérgico.. I. Título

CDD. 20^o ed. 612.8

TAYANA SILVA DE CARVALHO

**A intensificação do comportamento tipo ansiedade induzido por
cafeína em *Daniorerio*(zebrafish) é prevenida pelo tratamento com α -
Tocoferol e L-NAME**

Dissertação de Mestrado
apresentado ao Programa de Pós-
Graduação em Neurociências e
Biologia Celular (Área de
Concentração Neurociências),
Instituto de Ciências Biológicas,
Universidade Federal do Pará.

Banca examinadora:

Orientador: Professor Dr Anderson Manoel Herculano Oliveira da Silva
Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Pará - UFPA.

Co-orientador(a): Professor Dra Karen Renata Herculano Matos Oliveira
Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Pará - UFPA.

Membro da Banca: Professor Dr. Fernando Allan de Farias Rocha
Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Pará - UFPA

Membro da Banca: Professor Dr Alan Barroso Araújo Grisólia
Hospital Universitário João de Barros Barreto, Universidade Federal do Pará - UFPA

**Belém
2014**

Dedico minha dissertação aos meus pais
Carmen Lúcia Silva de Carvalho
e Herminio Marques de Carvalho, como prova do meu
amor e carinho por uma vida toda que tiveram dedicada à mim.

AGRADECIMENTOS

Nessa caminhada como mestranda tenho muitos agradecimentos pra fazer. Muitas pessoas cruzaram meu caminho, muitas situações me fizeram crescer, muitas mãos se estenderam e tantas outras coisas aconteceram que poderiam ser descritas em longas dissertações. Posso dizer que vivi tudo na sua devida intensidade e faria o mesmo caminho de novo, pois sempre quis estar onde estou hoje.

E com enorme gratidão, eu inicio meus agradecimentos, expondo o quanto sou grata pelas maravilhas que Deus opera em minha vida, me conduzindo pelos caminhos que são tão necessários ao meu crescimento. Também, agradeço a Nossa Senhora de Nazaré e Santa Rita de Cássia, por intercederem por mim em todas as minhas orações e pelas muitas vezes que as coloquei como condutoras dos meus passos em minha vida.

E nessa caminhada árdua e tortuosa eu nada seria sem eles, meus pais Carmen Lúcia Silva de Carvalho e Herminio Marques de Carvalho. E ainda que eu tivesse incontáveis linhas para definir o que eles representam para mim, não bastaria! Esse sonho, esse dia, cada letra, cada frase, cada lágrima, cada nota no colégio, minha formatura, meu vestibular, cada passo que eu dei, cada queda que levei, cada sonho que construí, cada escolha que fiz, cada frustração, cada sorriso, cada abraço, enfim, cada etapa em minha vida, eles são parte de mim e meu todo como ser. Eles são minha força motriz, meu exemplo, minha motivação, meu sorriso, meu sonhar e a tradução mais simples e tão complexa do que é viver um sonho construído por três pessoas. Não há voz que me acalme mais, não há abraço que seja mais confortante, não há remédio mais eficaz que o beijo da mamãe e do papai e aquela frase: “já vai passar”. O amor, no qual, fui criada, não tem preço e nem tamanho. E meus pais são grandes mestres, pois além de me ensinarem conceitos básicos da vida, me fizeram ter sabedoria de aprender a esperar meu momento mais sem, contudo ficar parada.

Mas, esse sonho na vida científica não seria possível se, naquele, 04 de março de 2011, o professor Dr. Anderson Manoel Herculanio Oliveira da Silva, não tivesse me acolhido em seu laboratório para que eu pudesse vivenciar a Ciência na sua plenitude, na sua dificuldade, na sua pluralidade e na sua complexidade. Esse cientista, que atualmente é meu orientador me ensinou a buscar o pensamento científico com respostas consistentes e replicáveis. E na qualidade de um grupo, também, recebi a co-orientação da Dra Karen Renata Matos Oliveira, uma pessoa que conheci como doutoranda e hoje é uma grande cientista e que sempre se dispôs a me ajudar e ser parte do meu crescimento na ciência.

Gostaria de agradecer ao professor Doutor Evander Batista, também professor-pesquisador do laboratório de neuroendocrinologia, por todo apoio e carinho.

Gostaria de agradecer a minha banca avaliadora: Dr Fernando Allan e Dr. Alan Grisólia pelas valiosas contribuições ao meu trabalho.

Outro pesquisador que presto minha devida gratidão é professor Doutor Domingos Wanderley Luiz Picanço Diniz, que me orientou durante o período que fui aluna especial do mestrado. Agradeço as infinitas discussões metodológicas e a forma como me incitava a pensar na ciência.

Gostaria de agradecer, de forma muito especial, a aluna de doutorado Alódia Brasil, pois conseguimos trabalhar com bastante parceria e harmonia. Dividindo os momentos de angústias e felicidades, vibrando com os resultados, compartilhando

sonhos e ideias e lutando por avanços pessoais e profissionais mútuos. Tenho certeza que essa parceria será para vida inteira. Muito obrigada, amiga!

Também gostaria de agradecer aos amigos Glenda Figueiredo, Danielle Santana, Natielli Rabelo, Nadyme Assad, Ana Paula Araújo, Andrea Monteiro, Hellen Anastácia, Tatiana Nascimento, Martha Souza, Allan Malaquias pela amizade e por todos os momentos e sonhos que construímos nessa caminhada científica e que culminou em uma amizade além das salas de aula e laboratórios. Agradeço por compartilharem e viver comigo meus sonhos como se fosse de vocês e sempre me estenderem a mão nos momentos que precisei.

Agradeço, também, a Luana Leão e Bruna Puty por me ajudarem a caminhar, desde meus primeiros momentos no laboratório, no qual, muito do que sei devo a elas, assim como agradeço os momentos que partilhamos juntas, pois todos foram e sempre serão muito especiais para mim.

Agradeço, ao Doutor Caio Maximino pelas orientações e ensinamentos sobre a linha de pesquisa com a qual defendo minha dissertação e por todo apoio dado.

Agradeço aos colegas do laboratório de neuroendocrinologia pela convivência agradável e por todo suporte que me deram.

Nesse momento, também, quero agradecer a minha família: avós, afilhados, sobrinhas e sobrinhos, tios e tias, madrinhas, primos (em particular, primos-irmãos: Glaucio Carvalho, Glauco Carvalho, Fernando Albuquerque e Jean Albuquerque) e primas. Obrigada, pela família linda, lutadora e tão merecedora das coisas boas que tem acontecido conosco.

Enfim, agradeço a pós-graduação em Neurociências e Biologia Celular por todo o apoio e aos professores que compõe esse time de grandes neurocientistas e biólogos celulares, assim como, Capes e Cnpq pelo apoio financeiro e a Universidade Federal do Pará.

“O sonho é a satisfação de que o desejo se realize.”
Sigmund Freud

RESUMO

O crescente consumo de bebidas com elevado teor de cafeína pode resultar no aparecimento de sintomas provenientes do transtorno de ansiedade induzida por essa droga. Atualmente, tem-se utilizado a cafeína como um indutor farmacológico do comportamento tipo ansiedade e essa indução pode facilitar a melhor compreensão da relação entre alterações comportamentais e os mecanismos de ação envolvidos nesse efeito, portanto o presente trabalho propôs que a via nitrérgica poderia ser um mecanismo chave para explicar os efeitos comportamentais produzidos pela cafeína e que esses efeitos poderiam ser revertidos por um antioxidante, logo, no presente trabalho nós tivemos como objetivo avaliar o possível efeito do L-NAME e do α -tocoferol no comportamento tipo ansiedade ampliado pela cafeína nos testes de preferência claro/escuro (PCE) e distribuição vertical eliciada pela novidade (DVN) em *Danio rerio*. Foram utilizados peixes da espécie *Danio rerio* (n=178) subdivididos nos seguintes grupos experimentais: SAL – salina 0,9%; CAF – cafeína 100 mg/kg; DMSO – dimetilsulfóxido 0,1%; L-NAME - (N ω -Nitro-L-arginina-metil éster hidrocloreto) 10 mg/kg; TF – α -tocoferol 1 mg/kg (receberam apenas uma injeção por *i.p*); SAL + SAL; DMSO + SAL; SAL + CAF; L-NAME + SAL; L-NAME +CAF; TF + CAF (receberam duas injeções seguidas, uma injeção de cada substância na forma de cotratamento, por *i.p*). Os animais foram submetidos ao teste de preferência claro/escuro e de distribuição vertical eliciada pela novidade. Todos os testes foram filmados e os vídeos foram avaliados utilizando o X-PLO-RAT. Os dados foram expressos em média \pm erro padrão. Foi aplicado o teste de normalidade utilizando o teste Shapiro-Wilk e o teste paramétrico ANOVA de uma via com pós-teste *Tukey*, considerando significativos valores com $p < 0,05$. Nós demonstramos que o α -tocoferol na dose de 1 mg/kg reverteu todos os parâmetros do comportamento tipo ansiedade ampliado pela cafeína nos testes de PCE e do DVN e esse efeito foi semelhante ao observado quando administrado um inibidor da enzima óxido nítrico sintase (NOS), L-NAME. Portanto, o presente trabalho demonstrou pela primeira vez que o efeito comportamental ampliado pela cafeína no teste escotáxico e no DVN pode ser modulado pelo sistema nitrérgico e que o α -tocoferol reverte esse efeito comportamental induzido pela cafeína de forma total.

Palavras Chaves: comportamento tipo ansiedade, zebrafish, cafeína, sistema nitrérgico, α -tocoferol.

ABSTRACT

The growing consumption of beverages with high caffeine content can result in the appearance of symptoms from anxiety disorder induced by this drug. Currently, it has been used as a pharmacological caffeine inductor anxiety-like behavior and this induction may help facilitate better understanding of the relationship between behavioral changes and the mechanisms involved in this effect. Therefore, this study proposed that the nitrenergic pathway could be a key mechanism to explain the behavioral effects produced by caffeine and that these effects could be reversed by an antioxidant, hence, the present work we had to evaluate the possible effect of L-NAME and α -tocopherol expanded in anxiety-like behavior by caffeine in light/dark preference (LDP) test and novel tank dividing (NTD) test in *Danio rerio*. Zebrafish fish species (N=178) used were divided into the following experimental groups: SAL - 0.9% saline; CAF - Caffeine 100 mg/kg; DMSO - dimethylsulfoxide 0.1% ; L-NAME - (N ω -nitro-L-arginine methyl ester hydrochloride) 10 mg/kg; TF - α -tocopherol 1 mg/kg (received only one injection by *i.p.*); SAL + SAL; DMSO + SAL; SAL + CAF , L-NAME + SAL , L-NAME + CAF ; TF + CAF, received two followed injections, one injection of each substance in the form of co-treatment, by *i.p.* The animals were submitted to the light/dark preference test and novel tank dividing test. All tests were filmed and the videos were evaluated using X-PLO-RAT. Data were expressed as mean \pm SEM. The normality test was applied using the Shapiro-Wilk test and the ANOVA parametric test one-way with Tukey post-hoc, with the significance level set at $p < 0.05$. The α -tocopherol at a dose of 1 mg/kg, reversed all anxiety-like behavior parameters expanded by caffeine in LDP and NTD tests and this effect was similar to that observed when given one inhibitor of the enzyme nitric oxide synthase (NOS), L-NAME. Therefore, this study first demonstrated that the behavioral effect magnified by caffeine in scotaxis test and DVN test can be modulated by the nitrenergic pathway and that the α -tocopherol reverses completely this anxiety-like behavioral effect induced by caffeine.

Key Words: anxiety-like behavior, zebrafish, caffeine, nitrenergic pathway and α -tocopherol.

LISTA DE FÍGURAS

Figura 1: Representação esquemática dos efeitos da cafeína após administração de doses elevadas de cafeína bloqueando os receptores adenosinérgicos e gabaérgicos....	17
Figura 2: Subdivisão dos grupos de acordo com o tratamento administrado.....	33
Figura 3: Representação do aquário utilizado para o teste preferência claro/escuro....	36
Figura 4: Representação esquemática do experimento utilizando o teste de preferência claro/escuro.....	36
Figura 5: Representação do aquário utilizado para o teste de distribuição vertical eliciada pela novidade.....	38
Figura 6: Representação esquemática do experimento utilizando o teste de Distribuição Vertical Eliciada pela Novidade.....	38
Figura 7: Curva dose-resposta do tratamento com α -tocoferol no comportamento tipo ansiedade avaliado no teste escotáxico.....	41
Figura 8: Tratamento com cafeína no comportamento tipo ansiedade avaliado no parâmetro de tempo no compartimento claro e no cruzamento de quadrante no teste escotáxico.....	44
Figura 9: Tratamento com cafeína no comportamento tipo ansiedade avaliado no parâmetro de tigmotaxia, congelamento, nado errático e avaliação de risco no teste escotáxico.....	45
Figura 10: Tratamento com cafeína no comportamento tipo ansiedade avaliado no parâmetro de latência de saída para o compartimento branco no teste escotáxico.....	46
Figura 11: O efeito da cafeína no parâmetro de tempo na porção superior e quantidade de quadrantes cruzados utilizando o DVN.....	47
Figura 12: O efeito do tratamento com α - tocoferol nos parâmetros de: evento de congelamento, tempo em congelamento, nado errático e latência utilizando o DVN.....	48
Figura 13: Tratamento com α -tocoferol no comportamento tipo ansiedade avaliado no parâmetro de tempo no compartimento claro no teste escotáxico.....	52
Figura 14: Efeito do tratamento com α -tocoferol na atividade locomotora avaliada no teste escotáxico.....	53
Figura 15: O efeito do α -tocoferol no comportamento tipo ansiedade avaliado através do parâmetro de tigmotaxia no ambiente claro utilizando teste escotáxico.....	54
Figura 16: O efeito do α -tocoferol no comportamento tipo ansiedade avaliado através do parâmetro de congelamento no ambiente claro utilizando o teste escotáxico.....	55
Figura 17: O efeito do α -tocoferol no comportamento tipo ansiedade avaliado através do parâmetro de nado errático no ambiente claro utilizando o teste escotáxico.....	56
Figura 18: O efeito do α -tocoferol no comportamento tipo ansiedade avaliado através do parâmetro de avaliação de risco utilizando o teste escotáxico.....	57
Figura 19: O efeito do α -tocoferol no comportamento tipo ansiedade avaliado através do parâmetro de latência de saída para o compartimento branco utilizando o teste escotáxico.....	58
Figura 20: O efeito do α -tocoferol no parâmetro de tempo na porção superior utilizando o DVN.....	59
Figura 21: O efeito do α -tocoferol na atividade locomotora avaliada a partir de quadrantes cruzados na porção superior utilizando o teste DVN.....	60
Figura 22: O efeito do α -tocoferol no parâmetro de números de eventos do	

comportamento de congelamento no teste de DVN.....	61
Figura 23: O efeito α -tocoferol no comportamento tipo ansiedade avaliado no parâmetro de tempo de congelamento utilizando o teste DVN.....	62
Figura 24: O efeito α -tocoferol no comportamento tipo ansiedade avaliado no parâmetro de número de eventos de nados erráticos utilizando o teste DVN.....	63
Figura 25: O efeito α -tocoferol no comportamento tipo ansiedade avaliado no parâmetro de latência de saída para porção superior utilizando o teste DVN.....	64
Figura 26: O efeito do L-NAME no parâmetro de tempo no ambiente claro utilizando teste escotático.....	67
Figura 27: O efeito do L-NAME na atividade locomotora avaliada a partir de quadrantes cruzados no ambiente claro utilizando o teste escotático.....	68
Figura 28: O efeito do L-NAME no comportamento tipo ansiedade avaliado pelo parâmetro de Tigmotaxia no ambiente claro utilizando o teste escotático.....	69
Figura 29: O efeito do L-NAME no comportamento tipo ansiedade avaliado pelo parâmetro de tempo em congelamento no ambiente claro utilizando o teste escotático.....	70
Figura 30: O efeito do L-NAME no comportamento tipo ansiedade avaliado pelo parâmetro de nado errático no ambiente claro utilizando o teste escotático.....	71
Figura 31: O efeito do L-NAME no comportamento tipo ansiedade avaliado pelo parâmetro de avaliação de risco utilizando o teste escotático.....	72
Figura 32: O efeito LNAME no comportamento tipo ansiedade avaliado no parâmetro de latência de saída para o compartimento claro utilizando o teste escotático.....	73
Figura 33: Representação esquemática do efeito dos tratamentos com α -tocoferol e L-NAME associado a cafeína no comportamento tipo ansiedade.....	83

LISTA DE SIGLAS

AVE	Acidente Vascular Encefálico
CAF	Cafeína
CAT	Catalase
CRF1	Receptor do fator de liberação de corticotrofina
CoQH2	Complexo CitocromoRedutase C
CTRL	Controle
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
DMSO	Dimetilsulfóxido
DVN	Distribuição Vertical Elicida pela Novidade
ERNs	Espécies Reativas de Nitrogênio
EROs	Espécies Reativas de Oxigênio
GMPc	Monofosfato Cíclico de Guanosina
GPx	GlutationaPeroxidase
GSH	Glutationa
GSSG	Glutationa Oxidada
GSR	GlutationaRedutase
GTPase	Enzimas hidrolases que hidrolisam o GTP
HPA	Eixo Hipotalâmico Pituitária Adrenal
HPI	Eixo hipotalâmico-Pituitário-interrinal
i.c.v	Intracerebroventricular
i.p	Intraperitoneal
L-NAME	NG-nitro-L-arginina-metil éster
LCE	Labirinto em Cruz elevado
L-NOARG	L-NG-nitro arginina
NMDA	N-metil-D-Aspartato
NO	Óxido Nítrico
NOS	Óxido Nítrico Sintase
eNOS / NOS3	Óxido Nítrico Sintase Endotelial
iNOS / NOS2	Óxido Nítrico Sintase Induzível
nNOS / NOS1	Óxido Nítrico Sintase Neuronal
PCE	Preferência Claro/escuro
PDE	Fosfodiesterase
SERT	Transportador de Setoronina
TBARs	Substâncias Reativas ao Ácido Tiobarbitúrico
TF	Tocoferol
TNF-α	Fator de Necrose Tumoral Alfa
UI	Unidades Internacionais
5-HT	5-Hidroxitriptamina
α-TPP	Proteína de Transferência do α -tocoferol
α-TAP	Proteína associada ao α -tocoferol
7-NI	Inibidor da iNOS

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	14
1.1 MECANISMOS DE AÇÃO DA CAFEÍNA.....	15
1.1.1 Efeitos comportamentais da cafeína.....	20
1.2 ZEBRAFISH COMO UM MODELO DE ESTUDO DO COMPORTAMENTO TIPO ANSIEDADE.....	22
1.2.1 Teste de preferência claro/escuro e Distribuição vertical Elicida pela Novidade para avaliação do comportamento tipo ansiedade.....	24
1.3 EFEITO FARMACOLÓGICO DO α -TOCOFEROL (VITAMINA E).....	26
2 OBJETIVOS.....	29
2.1 OBJETIVO GERAL.....	29
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	29
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	30
3.1 ANIMAIS E ALOJAMENTO.....	30
3.2 DROGAS E REAGENTES.....	30
3.3 PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL.....	31
3.4 TESTE DE PREFERÊNCIA CLARO/ESCURO.....	34
3.5 DISTRIBUIÇÃO VERTICAL ELICIDA PELA NOVIDADE.....	37
3.6 ESTATÍSTICA.....	39
4 RESULTADOS.....	40
4.1 α -TOCOFEROL BLOQUEIA O COMPORTAMENTO TIPO ANSIEDADE AMPLIADO PELA CAFEÍNA NOS TESTES ESCOTÁXICO E DVN EM ZEBRAFISH.....	40
4.2 INIBIÇÃO NITRÉRGICA INDUZ BLOQUEIO NO COMPORTAMENTO TIPO ANSIEDADE AVALIADO NO TESTE ESCOTÁXICO EM ZEBRAFISH.....	65
5 DISCUSSÃO.....	74
6 CONCLUSÃO.....	82
REFERÊNCIAS.....	84

1 INTRODUÇÃO

A cafeína é amplamente consumida em todo o mundo, podendo ser encontrado em quantidades significativas em chás, café, bebidas energéticas (Boyle; Castillo, 2006), bebidas de cacau e barras de chocolate sendo consumida, predominantemente na forma de café (Fredholm; et al, 1999). Nos países em desenvolvimento a ingestão diária é menor que 50 mg/dia de cafeína (em média um copo de café) e em países desenvolvidos como Suécia, Reino Unido e outras nações européias, que apresentam um estilo de vida acelerado e altamente produtivo e que exige um elevado nível de alerta dos indivíduos, apresenta um consumo superior a 400 mg/dia (>6 copos de café) e muitas das vezes esse elevado consumo foi acompanhado de sintomas relacionados ao efeito da cafeína (LOKE; HINRICHS; GHONHEIM, 1985).

Além disso, a cafeína também tem sido amplamente consumida na forma de bebidas energéticas por praticantes de atividade física e atletas profissionais ou através do uso de misturas dessas bebidas com bebidas alcoólicas. Esse uso desmedido tem sido associado ao elevado número de acidentes de trânsito envolvendo pessoas que fizeram uso dessas misturas, maior frequência do uso de drogas psicoativas e alterações no ciclo de vigília/sono (LOPEZ; REZENDE, 2013).

A cafeína (1,3,7-trimetilxantina ou 1,3,7-trimetil-1H-purina-2,6-diona) é um alcaloide que apresenta fórmula molecular $C_8H_{10}N_4O_2$ e massa molar de 198,19 g/mol. Apresenta propriedade hidrofóbica que permite que ela atravesse todas as barreiras biológicas, inclusive a hematoencefálica e essa capacidade justifica a diversidade de efeitos neurobiológicos, produzidos por esse psicoestimulante (Fredholm; et al, 1999). A metabolização ocorre primariamente no fígado e posteriormente nos rins e no cérebro por desmetilação da P450 1A, gerando comometabólitos: teofilina (1,3-dimetilxantina), teobromina (3,7-dimetilxantina) (Rodrigues, 2012) e paraxantina (metabólito mais encontrado em humanos) (Fredholm; et al, 1999). Quando ingerida alcança sua concentração máxima na corrente sanguínea de 15 a 120 minutos e a dose letal para humanos com peso médio de 70 kg é cerca de 10g que equivalem a 100 xícaras de café, 200 latas do refrigerante do tipo Cola ou 50 kg de chocolate por dia (OTTEWILL, 1999; VILELA; et al, 2007).

Estudos indicam que a cafeína pode induzir uma relativa dependência, que está associada à frequência de auto-administração e doses diárias, portanto, inúmeros

trabalhos investigam o impacto da abstinência e/ou a retirada da cafeína (Fisone; Borgkvist; Usiello, 2004), e de acordo com Holtzman (1990), a cafeína é considerada um modelo de drogas de abuso.

Adicionalmente, outras formas de consumo da cafeína seria através de medicamentos anti-inflamatórios, antialérgicos e analgésicos (15 a 64 mg/U), moderadores de apetite (50 a 200 mg/U), estimulantes (100 a 200 mg/U) e suplementos alimentares (BRACKEN, 1982; SRISUPHAN; BRACKEN, 1986).

1.1 MECANISMOS DE AÇÃO DA CAFEÍNA

Diante dessa diversidade de fontes de consumo da cafeína é importante saber que essa metilxantina quando consumida e/ou administrada em doses elevadas pode induzir efeito diurético (Faust, 1993), taquicardia (Katan; Schouten, 2005), elevação da taxa de esvaziamento gástrico com conseqüente aumento da acidez gástrica (Boekema; et al, 1999) e provocar ação estimulante no Sistema Nervoso Celular (SNC) (VILELA; ET AL, 2007).

Em níveis centrais a cafeína pode atuar em diversos sistemas, dentre os quais, pode-se destacar sua principal ação que ocorre nos receptores adenosinérgicos, devido à similaridade estrutural que essa metilxantina apresenta com a adenosina. O efeito dessa interação ocorre no sentido de bloquear os receptores adenosinérgicos A1 e A2A de forma não seletiva e com baixa especificidade o A3, diversos estudos apontam que um dos efeitos resultantes desse bloqueio seria alterações no comportamento tipo ansiedade observadas após administração de cafeína em elevadas doses (FREDHOLM, 1999).

Esse bloqueio permite que a cafeína desencadeie uma ação contrária a adenosina promovendo a liberação de diversos neurotransmissores, como exemplo, neurotransmissores excitatórios tais como glutamato (Fredholm, 1995; Fredholm, 1998; Fredholm; et al, 1999; Daly; Ferré, 2008; 2010). Assim como, essa ação excitatória ativará receptores rianodina, elevando os níveis de cálcio intracelular e será acompanhado da inibição de nucleotídeos cíclicos como a fosfodiesterase (Fredholm; et al, 1999; Umemura; et al, 2006). Todos esses efeitos estimulatórios (aumento da liberação de glutamato e os elevados níveis de cálcio intracelular) podem favorecer a ativação do sistema nitrérgico e essa atividade ocorrerá em função da estimulação do

receptor NDMA pelo glutamato, com conseqüente aumento dos níveis de cálcio intracelular, formando o complexo cálcio/calmodulina que estimulará a enzima responsável pela síntese de óxido nítrico (NO) (ZHANG; SNYDER,1995).

A cafeína pode também exercer um proeminente efeito no sistema gabaérgico, diminuindo indiretamente a liberação desse neurotransmissor através do bloqueio do receptor A2A (De Carvalho; Marcelino; De Mendonça, 2010) ou atuando nos sítios benzodiazepínicos dos receptores GABA_A, agindo como um antagonista ou como um agonista inverso nesses sítios e nos receptores do GABA, e também pode atuar como inibidor nos sítios de picrotoxina, que de acordo com Shi; Padgett e Daily (2003), toda essa ação no sistema gabaérgico realizado pela cafeína pode explicar o efeito convulsivante induzido por essa droga e também, pode explicar em parte as alterações no comportamento tipo ansiedade produzidas pela cafeína em dose elevada (Fredholm, 1999). Resumidamente, os efeitos centrais no sistema adenosinérgico e gabaérgico da cafeína descritos acima são demonstrados na figura 1.

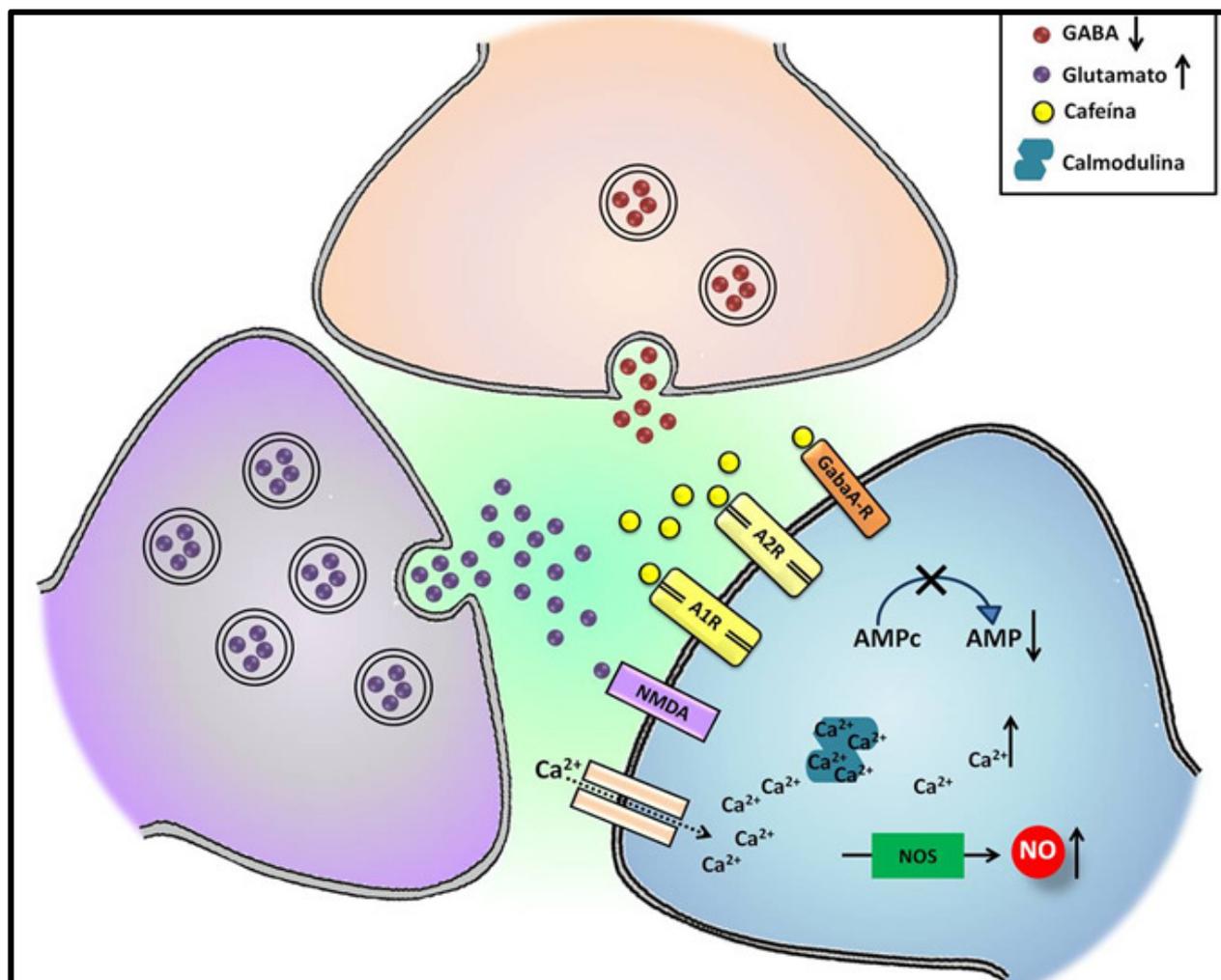


Figura 1: Representação esquemática dos efeitos da cafeína após administração de doses elevadas de cafeína bloqueando os receptores adenosinérgicos e gabaérgicos. O bloqueio dos receptores adenosinérgicos induzirá o aumento da liberação de glutamato (GLU) e esse neurotransmissor se ligará aos receptores NMDA. Essa ligação aumentará a mobilização de cálcio intracelular. O excesso de cálcio intracelular irá se ligar a calmodulina, formando o complexo cálcio/calmodulina que culminará na ativação da enzima óxido nítrico sintase (NOS) e essa por sua vez produzirá óxido nítrico. Assim como o bloqueio dos receptores adenosinérgicos incitará um bloqueio nas fosfodiesterases como o AMPc, diminuindo a produção de AMP. A ligação da cafeína nos receptores gabaérgicos exercerá uma ação antagônica com diminuição da liberação do GABA (FREEDHOLM; et al, 1999; SOLINAS; et al, 2001; SHI; et al, 2003; ARENDASH; et al, 2006; VILELA; et al, 2007).

Nesse contexto, deve-se ressaltar que o efeito mediado pelo bloqueio dos receptores adenosinérgicos está intimamente relacionado à dose, sendo considerada uma droga com efeito dual. Em doses consideradas baixas (10 mg/kg), a cafeína consegue exercer um efeito ideal para manutenção do processo de plasticidade cerebral, de potencial de longa duração, atuando de forma positiva sobre processos de aprendizagem, no sistema de locomoção e pode exercer um efeito ansiolítico, todas essas ações são observadas via bloqueio de receptores A2A que é mais atuante nessa condição, e exerce um efeito positivo sobre diversos sistemas (Rhoads; et al, 2011; Fredholm; et al, 1999). Porém em doses elevadas (acima de 75 mg/kg), a cafeína pode induzir um fenômeno de excitotoxicidade glutamatérgica e conseqüentemente um efeito ansiogênico (Fredholm, 1995; Kaplan; et al, 1997; Dunwiddie; Masino, 2001; Sudakov; et al, 2001; Rogers; et al, 2010). No qual, esse efeito em dose elevada pode ser em função do efetivo bloqueio do receptor A1 como demonstrado por Maximino e colaboradores (2011b) em zebrafish.

Outro efeito observado, em elevadas concentrações de cafeína, é o aumento da renovação de neurotransmissores monoamínicos, como a serotonina (5-hidroxitriptamina, 5-HT), dopamina e noradrenalina. Segundo Hadfield e Milio (1989) a alteração nos níveis de monoaminas (como norepinefrina e dopamina) e metabólitos ocorrem de forma distinta em diversas regiões centrais, como exemplo, no bulbo olfatório os níveis de serotonina aumentavam e no hipocampo diminuía. Além disso, os receptores muscarínicos e opióides, também podem ser ativados nessa condição.

Em relação ao efeito excitatório provocado por essa metilxantina observa-se o aumento da taxa de disparo de neurônios dopaminérgicos, colinérgicos e noradrenérgicos em diversas regiões, sendo algumas relacionadas à modulação do comportamento tipo ansiedade como o *locus ceruleus* (FREDHOLM; et al, 1999).

Todos esses efeitos estimulatórios, provocados pela cafeína conduzem ao aumento do metabolismo energético cerebral e conseqüentemente podem justificar os efeitos pró-oxidantes desencadeados por essa metilxantina (Hovatta; et al, 2005; Ng; et al, 2008; Masood; et al, 2009; Allam; et al, 2013; Arendash; et al, 2006). Nesse sentido, a literatura aponta uma possível participação da via nitrérgica modulando essa atividade pró-oxidante da cafeína, pois segundo Alasehirli e colaboradores, (2005), a cafeína em doses elevadas pode favorecer o aumento dos níveis de óxido nítrico (NO) por estimulação da enzima óxido nítrico sintase (NOS) e esse excesso pode desencadear a formação do peroxinitrito (ONOO[•]) um radical altamente reativo e responsável por

induzir a oxidação e nitração de lipídios, DNA (ácido desoxirribonucleico) e proteínas (BARBOSA; MEDEIROS; AUGUSTO, 2006).

Portanto, o óxido nítrico pode ser descrito como um radical formado na conversão de arginina a citrulina por diferentes isoformas da NOS. As isoformas podem ser classificadas em: nNOS ou NOS-1 (neuronal), eNOS ou NOS-3 (endotelial) e iNOS ou NOS-2 (induzível) e essas enzimas estão amplamente distribuídas em diversos tecidos e não necessariamente apenas nos locais de origem, como já foi demonstrado que a nNOS pode estar presente em células não neuronais e eNOS em células neuronais (Murad, 2004; Wegener; Volke; 2009). A atividade das isoformas NOS 1 e NOS 3 é dependente de CA^{2+} e calmodulina (constitutiva) e a atividade da isoforma NOS 2 é independente de CA^{2+} (induzível) (Wegener; Volke; 2009; Lima; et al, 2014). O óxido nítrico produzido tem a capacidade de difundir-se livremente ao longo de membranas celulares ou outras estruturas (Bredt; Snyder, 1994). Desenvolve importante papel no SNC, agindo como neurotransmissor ou neuromodulador e atuando como mensageiro intracelular em inúmeros processos fisiológicos (BREDT; SNYDER, 1989; GARTHWAITE; et al, 1989; KNOTT; BOSSY-WETZEL, 2009; STEINERT, et al, 2010).

Assim como, foi observado seu proeminente efeito na regulação do comportamento e estados emocionais, em função de sua atuação em diversas regiões como hipotálamo posterior, hipocampo, amígdala, núcleo do septo lateral e córtex entorrinal (Vincent; et al, 1992; Farias; et al, 1997; Ray; et al, 2007; Toda; et al, 2009 Wegener; Volker, 2009), sendo que na condição de elevados níveis pode promover ansiogênese, principalmente quando há o processo de neurotoxicidade gerado pelo glutamato (Faria; 1998), efeito esse reportado quando há um elevado consumo de cafeína. Portanto, estudos demonstraram que esse efeito central do NO poderá ser bloqueado com o uso de inibidores da NOS, como o L-NAME (NG-nitro-L-arginina-metil éster), um metil éster que inibe não seletivamente a enzima óxido nítrico sintase (FARIAS; et al, 1997; VOLKE; et al, 2003).

No qual, essa propriedade do óxido nítrico de atuar nas alterações comportamentais conduz ao questionamento do seu possível papel como mediador dos efeitos comportamentais induzidos pela cafeína, sendo que a descoberta dessa relação seria um ponto chave para descrever o mecanismo envolvido com esse efeito e para buscar novas terapias para os transtornos de ansiedade induzida por essa droga. Assim como, seria interessante se um antioxidante como α -tocoferol pudesse atuar nesse

possível sistema regulador da ansiogênese induzida por cafeína, visto que é uma vitamina amplamente consumida e que tem emergido como um possível neuroprotetor como observado por Vatassery, Bauer, Dysken; (1999) em diversas doenças neurodegenerativas e psiquiátricas.

Portanto, sabe-se que essa diversidade de alterações neuroquímicas produzidas pela cafeína pode disparar o processo de produção de radicais livres, apresentando efeito pró-oxidante (Lowry; Hale, 2010). No qual, essas alterações comportamentais induzidas por essa droga são semelhantes às respostas obtidas após modulações ambientais que geram aversividade, por isso a literatura tem utilizado a cafeína com um indutor farmacológico do comportamento tipo ansiedade e esses dados foram reproduzidos tanto em roedores quanto em peixes (Baldwin; File, 1989; Belzung; Le Pape, 1994; Cortopassi; Sapolsky, 1998; Silva; Frussa-Filho, 2000; Concas; et al, 2000; Jain; Hirani; Chopde, 2005; Noschang, 2009; Egan; et al, 2009; Mcintosh; Lowry; Hale, 2010; Lowry; Hale, 2010; Park ; et al 2010; Stewart; et al, 2010; Maximino; et al, 2011; Maximino; et al, 2011b). Ressalta-se que essa é uma das formas de estudar o comportamento tipo ansiedade e esse modelo de indução farmacológica, dependerá da dosagem utilizada, tempo de tratamento, forma de administração e modelo experimental testado (CHAE; et al, 2008).

1.1.1 Efeitos comportamentais da cafeína

As alterações comportamentais geradas pela cafeína podem ser classificadas como transtorno de ansiedade, e esse efeito é evidenciado a partir da manifestação de sintomas como elevado estado de alerta mental, taquicardia, elevação da pressão arterial, nervosismo, tensão e diminuição da coordenação motora (File; Bond; Lister, 1982; Loke; Hinrichs, Ghonheim, 1985; Smith; et al, 2011). Atualmente, esse transtorno de ansiedade induzido por cafeína tem se tornado um problema de saúde pública, justificado pelo aumento de internações de pacientes com intoxicação por bebidas contendo elevada quantidade de cafeína. Esses pacientes demonstraram sintomas comuns ao transtorno de ansiedade. Essa manifestação clínica irá variar entre os indivíduos, nos quais pacientes ansiosos são um dos mais afetados, por apresentarem maior sensibilidade ao composto (LEE; CAMERON; GREDEEN, 1984; SMITH, 2010).

Nesse contexto, faz-se importante compreender que a ansiedade pode ser definida como um comportamento de avaliação de risco em situações, onde o perigo não é eminente, porém, é potencial, podendo ocorrer a partir de uma exposição a ambientes novos, vivências subjetivas negativas ou através de um potencial estímulo aversivo no ambiente (Blanchard; Blanchard, 1990; Graeff, 2007; Graeff; Zangrossi Jr, 2010). Nos quais, a freqüente manifestação desse comportamento conduz ao desenvolvimento do transtorno de ansiedade e essa desordem está sendo cada vez mais prevalente em diversos países (Estados Unidos - 28,7%; Holanda -19,3%; Brasil – 18%) e pode ser justificada pelo o estilo de vida adotado que exige um estado de alerta freqüente e uma profunda mudança no sistema de vigília/sono, resultando em um alto consumo de bebidas energéticas (Almeida Filho; et al,1992; Michael; Zetsche e Margraf; 2007; Kalra; Kamath; Trivedi, 2008; Mello Cruz; Landeira-Fernandez, 2012). Porém, é importante diferenciar ansiedade de medo, pois apesar de serem comportamentos adaptativos que são relacionados com a situação de ameaça e que compartilham sintomas, o medo incita um repertório de estratégias defensivas na presença real do risco, além disso, a característica do comportamento do medo, freqüentemente, é de excitação com resposta de luta/fuga (GRAEFF, 2007).

A expressão desse comportamento de ansiedade segundo, Bernik (1999), pode ser composta por manifestações cognitivas, emocionais, comportamentais (inquietação, sobressalto verbais ou não verbais) e somáticas (hiperatividade autonômica, tensão muscular, sudorese, entre outros). Essas expressões, de acordo com Smith (2002) podem estar presentes de forma indistinguível na situação de alto consumo de cafeína, caracterizando a natureza ansiogênica desse psicoestimulante e estabelecendo uma possível relação entre consumo de cafeína e ansiedade.

Roedores que foram tratados com cafeína em dose elevadas apresentaram alterações comportamentais e sintomas característicos de comportamento tipo ansiedade, como: alterações no sono, aumento da freqüência cardíaca, diminuição da interação nos ambientes aversivos, centrofobia e inibição comportamental e todos esses efeitos foram avaliados em diversos modelos de estudo do comportamento tipo ansiedade (Noschang, 2009; Minatto, 2009). Peixes, também podem apresentar um comportamento tipo ansiedade desde a fase larval até a fase adulta em resposta a administração de elevadas doses de cafeína, no qual, nessas espécies foram observadas respostas comportamentais aos estímulos ansiogênicos semelhantes ao de roedores, além do aumento do índice de melanóforos (que é uma resposta de camuflagem como

uma reação de defesa substrato-dependente), e aumento da frequência cardíaca em embriões (Egan; et al, 2009; Rana; et al, 2011; Maximino; et al, 2011; Richendrfer; et al, 2012; Cachat; et a, 2013). A efetividade desse psicoestimulante em induzir o comportamento tipo ansiedade, se deve a ampla ação da cafeína em diversas regiões que estão ligadas a esse comportamento como o núcleo da rafe (LOWRY; HALE, 2010).

Diante do exposto, para o estudo do comportamento tipo ansiedade utilizando drogas como a cafeína que apresentam um elevado potencial ansiogênico, deve-se utilizar modelos experimentais que respondam a essas modulações farmacológicas e o zebrafish é uma espécie que apresenta grande confiabilidade na análise do seu comportamento por responder de forma efetiva a essas modulações (BARROS; et al, 2008; STEWART; et al, 2014; STEWART; KALUEFF, 2015).

1.2.ZEBRAFISH COMO UM MODELO DE ESTUDO DO COMPORTAMENTO TIPO ANSIEDADE

O zebrafish é um pequeno peixe ciprinídeo, tropical de água doce, proveniente da Índia e do sul da Ásia (Key; Devine, 2003; Subbiah; Kar, 2013). Popularmente conhecido como paulistinha ou peixe zebra, sendo essa espécie amplamente utilizada na prática do aquarismo (Spence; et al, 2008). O interesse crescente pelo uso desse modelo experimental em diversas pesquisas está no seu rápido desenvolvimento, fácil manutenção em laboratório e elevada produção de ovos (uma fêmea pode liberar 100 ovos por dia que serão fertilizados externamente) que são transparentes e permitem manipulações farmacológicas desde os estágios iniciais da vida. O ciclo reprodutivo desses animais é curto e atingem a maturidade sexual com três semanas de vida (Carvan; et al, 2000; Subbiah; Kar, 2013). Além do zebrafish selvagem existem outras cepas que são mutadas como o *leopard* (mutação espontânea no padrão de cor), o *longfinn* (apresentam nadadeiras longas) (Spence; et al, 2008) e o albino (Egan; et al, 2009). Essas espécies apresentam respostas comportamentais distintas por apresentar níveis basais de ansiedade diferentes, sendo que o *longfinn* apresenta níveis moderados de comportamento tipo ansiedade quando comparado com os elevados níveis dos animais selvagens (EGAN; et al, 2009; MAXIMINO; et al, 2014).

Portanto, o *Danio rerio* (zebrafish) tem sido utilizado em diversos estudos farmacológicos (Maximino; et al, 2010; Cachat; et al, 2010; Maximino; et al; 2011; Maximino; et al, 2013; Kalueff; Stewart; Gerlai, 2014), de reprodução (Landner; et al, 1985 apud Serra; Medalha; Matioli, 1999), genéticos (Key; Devine, 2003), toxicológicos (Nagel, 2002), teratológicos, alterações no desenvolvimento (Van Eeden, 1996 apud Serra; Medalha; Matioli, 1999) e comportamentais (Serra; Medalha; Matioli, 1999; Piato; et al, 2010; Cachat; et al, 2010; Maximino; et al, 2010; Maximino; et al; 2011; Stewart; et al; 2012; Maximino; et al, 2013). Em destaque, a neurociências começou a adotar o modelo a partir da década de 70 estudando as células de *Mauthner*, sendo elas responsáveis pelos comportamentos de fuga (VASCOTO; BECKHAM; KELLY, 1997 apud SERRA; MEDALHA; MATIOLLI, 1999).

Uma das vantagens dessa espécie consiste na conservação organizacional do SNC em relação aos vertebrados, permitindo observar diversas homologies, dentre as quais, áreas como: hipotálamo e bulbo olfatório, que engloba estrutura do pálido lateral sendo homóloga ao hipocampo de mamíferos (Barros; et al, 2008). Assim como, o telencéfalo de zebrafish pode corresponder ao sistema límbico de humanos e algumas evidências demonstraram uma equivalência funcional do telencéfalo Dorsomedial do zebrafish com amígdala de mamíferos (Portavella; Torres; Salas, 2004; Salas; et al, 2006). O eixo HPI (Eixo Hipotalâmico-Pituitário-Interrinal) do *Danio rerio* apresenta similaridade funcional ao eixo HPA (Hipotalâmico-Pituitário-Adrenal) de mamífero (STEENBERGEN; RICHARDSON; CHAMPAGNE, 2010).

Ainda em nível central, foram identificados neurotransmissores gabaérgicos, serotoninérgicos, colinérgicos, adenosinérgicos, dopaminérgicos, noradrenérgicos, histaminérgicos, glutamatérgicos, purinérgicos, glicinérgicos, e nitrérgicos (Barros; et al, 2008; Rico; et al, 2011), assim como, conservou receptores como os adenosinérgicos (Boehmler; et al, 2009; Maximino; et al 2011b). Contudo, segundo Rico e colaboradores (2011) poucos ensaios foram realizados para demonstrar o papel funcional do NO em zebrafish e esses autores apontam que são necessários mais estudos que identifiquem quais as mudanças observadas nesse sistema após induções farmacológicas.

Também foi observada similaridades, nas vias de transdução de sinal, homologia nos sítios catalíticos e nos domínios de ligação de receptores (100%). Além disso, foi descrito semelhanças no seqüenciamento do genoma (homologia de seqüenciamento de nucleotídeos em torno de 70-80% e de aminoácidos 60-90%) (Gerlai; et al, 2010;

Rinkwitz; Mourrain; Becker, 2011; Subbiah; Kar, 2013). Portanto, todas essas semelhanças permitem que o zebrafish seja utilizado para estudos translacionais de desordens humanas (EGAN; et al, 2009; CACHAT; et al, 2010).

Nesse contexto o zebrafish tem emergido como modelo para estudos do comportamento tipo ansiedade, pois reagem por vias endócrinas e comportamentais aos modelos de estresse e ansiedade. Esses peixes demonstram sensibilidade ao tratamento com drogas, resposta ao predador, exposição à substância alarme, inspeção de objetos novos, também, respondem aos modelos de esquiva inibitória e desamparo aprendido (Maximino; et al, 2011a, 2012; Subbiah; Kar, 2013). Nesse contexto, alguns modelos já foram validados para o estudo do comportamento tipo ansiedade como: campo aberto, escotático e distribuição vertical eliciada pela novidade (MAXIMINO; et al, 2010);

Portanto, diante das evidências científicas que atestam a confiabilidade na utilização do zebrafish como modelo experimental para o estudo do comportamento tipo ansiedade, o presente trabalho selecionou testes que são sensíveis a estes comportamentos e que respondam aos ensaios farmacológicos de forma a esclarecer a natureza ansiogênica ou ansiolítica das drogas utilizadas, como o teste de preferência claro/escuro e o teste distribuição vertical eliciada pela novidade (GOUVEA Jr; et al, 2005; MAXIMINO; et al, 2007; EGAN; et al., 2009; MAXIMINO; et al, 2010; MAXIMINO; et al, 2011).

1.2.1 Teste de preferência claro/escuro e Distribuição vertical Eliciada pela Novidade para avaliação do comportamento tipo ansiedade.

O teste de preferência claro/escuro é caracterizado por um comportamento de fototaxia negativa representada por uma preferência pelo escuro (Serra; Medalha; Mattioli, 1999). Outro aspecto importante, que foi observado por Gouvea Jr e colaboradores (2005) é que o perfil de respostas comportamentais produzidos por zebrafish são análogas às respostas produzidas por roedores, no que consiste número de entradas e o tempo de permanência no compartimento aversivo, qualificando esse teste como um modelo de estudo do comportamento tipo ansiedade em peixes.

Este aparato é um modelo de conflito que expõe o animal a tendência natural de explorar um ambiente novo versus as esquivas que o ambiente pode oferecer, ou seja,

uma possível situação aversiva que aqui se estabelece em um ambiente claro (CRAWLEY; GOODWIN, 1980).

Nesse contexto, a preferência pelo compartimento escuro foi observada por Serra; Medalha; Mattioli (1999), que realizaram diversos protocolos experimentais, os quais caracterizavam-se em expor os animais de formas diferentes aos ambientes (claro ou escuro), onde se observou que a latência de saída do compartimento escuro para o claro era muito maior que a avaliação inversa, logo, esse fenômeno indicaria a preferência natural do animal pelo compartimento escuro. Assim como, de acordo com Rosemberg e colaboradores (2011) apontaram que essa preferência pelo escuro visualizada no teste escotático representa uma típica estratégia defensiva da espécie como se fosse um comportamento de esquiva ao predador.

Além disso, ensaios posteriores avaliaram o comportamento tipo ansiedade em teleósteos pequenos e demonstraram evidências farmacológicas de que o teste escotático apresenta elevada sensibilidade a drogas ansiolíticas (MAXIMINO; et al, 2010; MAXIMINO; et al, 2011; MAXIMINO et al, 2011a; ARAUJO; et al., 2012).

As medidas de avaliação produzidas pelo teste de preferência claro/escuro são simples e demonstram que os agentes ansiolíticos aumentam o tempo que o animal explora o compartimento claro em relação ao grupo não tratado, enquanto que os agentes ansiogênicos apresentam efeito oposto. Etogramas adicionais também ajudam a atestar o efeito dos tratamentos, facilitando o delineamento do grau de motivação e/ou exploração no compartimento branco e estes podem ser descritos como: tigmotaxia (exploração nas extremidades do aquário), congelamento (imobilidade corporal), nado errático (nado em *zig-zag*) e avaliação de risco (entradas com menos de um segundo no compartimento branco e retorno seqüencial ao compartimento escuro) (MAXIMINO, 2012).

Outro teste utilizado como modelo de ansiedade em zebrafish é o teste de distribuição vertical eliciada pela novidade que baseia-se na observação de uma tendência do animal em se afastar da superfície (geotaxia), buscando um local “seguro” no ambiente novo (Egan; et al, 2009; Gerlai, 2010; Cachat; et al, 2010; Stewart; et al, 2010). Segundo, Levin e colaboradores (2007) a relação topo e fundo que reflete o nível de aversividade do animal em relação ao aparato é semelhante à relação braço aberto e braço fechado obtidas no teste de labirinto em cruz elevado (LCE) e também a relação centro e periferia do campo aberto, portanto essas analogias com modelos

clássicos do estudo de ansiedade em roedores qualificam esse teste para o estudo do comportamento tipo ansiedade em zebrafish.

No qual, nesse teste o comportamento tipo ansiedade pode ser observado a partir de uma significativa diminuição na exploração na porção superior, acompanhada de uma elevada latência para atingir essa porção, assim como, episódios de congelamento longo, ou elevada frequência de movimentos erráticos (Egan; et al, 2009). Portanto, manipulações farmacológicas que elevam o tempo do animal no fundo do aquário indicam ansiogênese (como exemplo a cafeína) e manipulações que aumentam a exploração na superfície representam ansiólise (Egan; et al, 2009). No entanto, quando o aquário de teste é semelhante ao aquário de alojamento não há alteração no comportamento do animal, sendo necessária a utilização de um aquário com tamanho diferente ao do alojamento para aplicação do teste (BENCAN; SLEDGE; LEVIN, 2009).

Portanto, os testes descritos a cima permitem avaliar o comportamento tipo ansiedade em zebrafish, e também poderão ser um modelo experimental adequado para verificar o efeito de antioxidantes como o α -tocoferol no comportamento tipo ansiedade em Zebrafish.

1.3 EFEITO FARMACOLOGICO DO α -TOCOFEROL (VITAMINA E)

Vitamina E é um termo genérico que abrange 8 famílias de tocoferóis e tocotrienos (Traber; Atkinson, 2007), no qual, o α -tocoferol, é a forma biologicamente mais ativa e a mais utilizada para estudos (Catania; Barros; Ferreira, 2009). Esses compostos caracterizam-se por serem facilmente oxidados na presença da luz e ar, mas quando presentes na sua forma natural (óleos e gorduras) apresentam atividade antioxidante elevada, por isso é largamente utilizado na indústria farmacêutica e alimentícia (Franco, 2008). Nos alimentos, podem ser encontrados em vegetais folhosos, óleos vegetais e frutas oleaginosas (BRIGELIUS-FLOHÉ, 1999).

Outra característica importante é sua natureza lipossolúvel, portanto, o α -tocoferol é solubilizado pelos ácidos biliares e absorvido pelos Enterócitos, nos quais serão estocados em quilomícrons (Eggermont, 2006; Schneider, 2005). A distribuição desses quilomícrons para os mais diversos tecidos ocorre através da proteína de transferência

do α -tocoferol (α -TPP) (Brigelius-Flohe; Traber, 1999). Uma vez dentro da célula, proteínas associadas ao α -tocoferol (α -TAP), podem estar envolvidas no transporte intracelular desse composto entre compartimentos e a membrana plasmática. Essas proteínas associadas possuem atividade GTPase e podem ser responsáveis por regular processos como a sinalização intracelular promovida pelo α -tocoferol (STOCKER; AZZI, 2000).

O α -tocoferol é considerado um antioxidante exógeno, e deve ser ofertado pela dieta ou outras fontes, pois os animais não são capazes de sintetizá-lo e a sua atividade antioxidante ocorre de forma não-enzimática, interceptando os radicais livres gerados pelo metabolismo celular ou por fontes exógenas e impedindo o ataque sobre lipídios, aminoácidos das proteínas, dupla ligação de ácidos graxos poli-insaturados, e bases de DNA (MILEI; et al, 1986; HALLIWELL, 1995; HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1999, BIANCHI; ANTUNES, 1999; QUILES; et al, 2002; CATANIA; BARROS; FERREIRA, 2009).

A ação neuroprotetora do α -tocoferol pode ser vista em diversos sistemas, no entanto, alguns estudos têm reportado seu efeito no sistema nitrérgico, atuando na enzima produtora do óxido nítrico, sendo que esse efeito consiste em bloquear a ação da NOS, diminuindo por conseguinte a produção de NO (Gurela; et al, 2004; Osakada; et al, 2003), resultando em diversos efeitos benéficos na vasodilatação (Green; et al, 1998); condições inflamatórias (Shibata; et al, 2006) e prevenindo apoptose gerada pela disfunção mitocondrial e o estresse oxidativo em condições de elevados níveis de NO (Wei; et al, 1999). Portanto, esse potencial efeito do α -tocoferol pode justificar o uso desse antioxidante.

Além disso, em decorrência das propriedades antioxidantes da vitamina E, ela tem sido implementada como terapia que reforça as vias de defesa endógena, podendo combater inúmeras doenças como doenças cardiovasculares, acidente vascular encefálico (AVE), diabetes melito, câncer, hipertensão e impede a formação tumoral inibindo a conversão de nitritos em nitrosaminas (WASHIO; et al, 1994; QUILES; et al, 2002; HOVATTA; et al, 2005; CATANIA; BARROS; FERREIRA, 2009).

Particularmente, no SNC o α -tocoferol além de proteger a membrana de células do sistema nervoso, também, tem atuado no sentido de aumentar o nível de glutatona e a atividade de várias enzimas antioxidantes endógenas, incluindo: SOD (Superóxidos Dismutases), CAT (Catalase) e GPx (Glutationa Peroxidase) (Zaidi; Banu, 2004). Essa ação central apresentou efeitos reportados em alguns estudos como melhoras no humor

e nas funções intelectuais, diminuição da progressão da doença de Alzheimer e melhoras na performance cognitiva (SANO; et al, 1997; SMITH; et al, 1999; CASINI; et al, 2006).

Poucos estudos foram realizados para demonstrar o efeito do α -tocoferol em alterações comportamentais, porém já foi demonstrado que ele pode atuar em doenças psiquiátricas como depressão e alguns estudos demonstram um possível efeito ansiolítico através do tratamento prolongado e com altas doses desse antioxidante (CHAKRABORTI; GULATI; RAY, 2008; COMIN; et al, 2010; LOBATO; et al, 2010; AMBROGINI; et al, 2011; ALZOUBI; et al, 2012; MANOSSO, 2013).

Nesse contexto, inúmeros estudos têm buscado avaliar o efeito do α -tocoferol para reverter ou amenizar alterações comportamentais provenientes de desordens psiquiátricas como: depressão, transtorno de ansiedade, ou até quem sabe esse composto pode ter efeito em desordens de ansiedade induzida por drogas de abuso como a cafeína. Esse crescente interesse pelo α -tocoferol se deve em grande parte pelo seu potencial antioxidante, propriedade essa que fornece um mecanismo de defesa, que muitas vezes encontra-se insuficiente em transtornos de ansiedade, e outro ponto positivo é a facilidade com a qual ele pode ser adquirido pela população por estar presente em diversos alimentos, podendo ser um potencial agente terapêutico.

2 OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO GERAL

Avaliar o possível efeito preventivo do α -tocoferol e do L-NAME contra a potencialização do comportamento tipo ansiedade induzido por cafeína em *Danio rerio*.

2.2 OBJETIVOS ESPECIFICOS

- Caracterizar o efeito ansiogênico ampliado pela cafeína nos testes de preferência claro/escuro e de distribuição vertical eliciada pela novidade em *Danio rerio*;
- Avaliar o efeito gerado pelo tratamento com diferentes doses de α -tocoferol nos testes de preferência claro/escuro;
- Avaliar a atividade locomotora dos animais (*Danio rerio*) tratados com α -tocoferol em diferentes doses nos testes de preferência claro/escuro;
- Avaliar o efeito associado do α -tocoferol com cafeína nos testes de preferência claro/escuro e de distribuição vertical eliciada pela novidade em *Danio rerio*;
- Avaliar o efeito associado do inibidor da enzima óxido nítrico sintase (L-NAME) com cafeína nos testes de preferência claro/escuro e de distribuição vertical eliciada pela novidade em *Danio rerio*.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 ANIMAIS E ALOJAMENTO

Os animais utilizados foram peixes da espécie *Danio rerio*, popularmente conhecidos como paulistinhas ou zebrafish. Adultos, de sexo indeterminado, da linhagem *longfin*, adquiridos em distribuidoras locais. Os animais foram coletivamente alojados em um aquário com densidade de 1 animal /L por um período mínimo de 15 dias (período de aclimação) que antecederam os experimentos comportamentais, ressaltando que os cuidados de alojamento estavam de acordo com *Canadian Council on Animal Care* (2005) e este estudo foi previamente aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Animais de Experimentação da Universidade Federal do Pará (CEPAE) através do processo CEPAE – UFPA: 213-14. A manutenção dos aquários estava de acordo com o protocolo de criação em biotério (Dammski; et al, 2011) respeitando condições de temperatura (28°C), ciclo circadiano (fotoperíodo 12C:12E), filtragem, oxigenação e diariamente os animais foram alimentados com ração balanceada e na consistência de flocos, além disso, todas as áreas do aquário estavam iluminadas com a mesma intensidade de luz.

3.2 DROGAS E REAGENTES

Os agentes farmacológicos foram diluídos como descrito a seguir: A cafeína anidra – CAF - (1,3,7-trimetilxantina; Quimis, Diadema, SP, Brasil) na dose de 100 mg/kg e o L-NAME (N ω -Nitro-L-arginina-metil éster hidrocloreto; Sigma Aldrich) na dose de 10 mg/kg foi diluída em solução salina a 0,9%. O α -tocoferol - TF - (Fluka, Sigma - Aldrich) foi diluído em Dimetilsulfóxido - DMSO - (Sigma - Aldrich) 0,1% e salina 0,9% e os animais controle dos grupos cafeína e L-NAME receberam solução salina 0,9% e os animais controle do grupo α -tocoferol, receberam solução DMSO 0,1%. A via de administração de todas as drogas foi via intra-peritoneal (*i.p*) utilizando

uma seringa de 10 µl com agulha de 35G e todos animais foram anestesiados por crioanestesia (temperatura entre 12 °C e 14 °C).

3.3 TRATAMENTOS

Foram utilizados um total de 178 animais (em média 6 animais por grupo), distribuídos de acordo com os tratamentos descritos na figura 2, no qual, os animais que receberam apenas uma injeção foram utilizados para testar o efeito isolado de cada composto e os animais que receberam duas injeções foram utilizados para avaliar o efeito do cotratamento. É importante destacar que o tempo de intervalo entre as duas injeções foi de 1 segundo. Todos os peixes foram testados no teste de preferência claro/escuro e no teste de distribuição vertical eliciada pela novidade para avaliar o comportamento tipo ansiedade. O tempo de ação farmacológica foi estimado com base em outros estudos com mamíferos e roedores, no qual, a cafeína era injetada 30 minutos antes dos testes comportamentais (Baldwin; File, 1989; Silva; Frussa-Filho, 2000; Jain; Hirani; Chopde, 2005; Park ; et al 2010). A escolha da dose de 100 mg/kg de cafeína baseou-se em um estudo realizado anteriormente por Maximino e colaboradores (2011b) que demonstraram um efeito de amplificação do comportamento tipo ansiedade utilizando o teste escotático em zebrafish. A dose de 10mg/kg de L-NAME utilizada no presente estudo foi estimada a partir de estudos prévios que identificaram um efeito de redução no comportamento tipo ansiedade com essa dose (FARIAS; et al, 1997).

Ressalta-se que a dose do α -tocoferol foi previamente escolhida para o presente estudo através de uma curva dose – resposta que correspondeu ao efeito desse antioxidante no teste escotático. No qual, os animais tratados com α -tocoferol na dose de 2 mg/kg apresentaram um tempo superior no compartimento aversivo se comparado ao grupo controle. Os animais tratados com α -tocoferol na dose de 5 mg/kg apresentaram um efeito hiperlocomotor no ambiente claro. Portanto, diante dos efeitos observados nas outras doses elegemos a dose de 1 mg/kg de α -tocoferol, por esta não alterar o comportamento tipo ansiedade gerado pelo teste escotático e nem alterar a atividade locomotora. Além disso, a estatística demonstrou que entre os controles (SAL; SAL + SAL) não houve diferença significativa ($F=0.8545$; $p>0,05$), portanto, a

manipulação não influenciou no comportamento tipo ansiedade dos grupos controles e os animais toleraram os 10 μ l (5 μ l de cada composto) que corresponderam ao volume final das duas injeções.

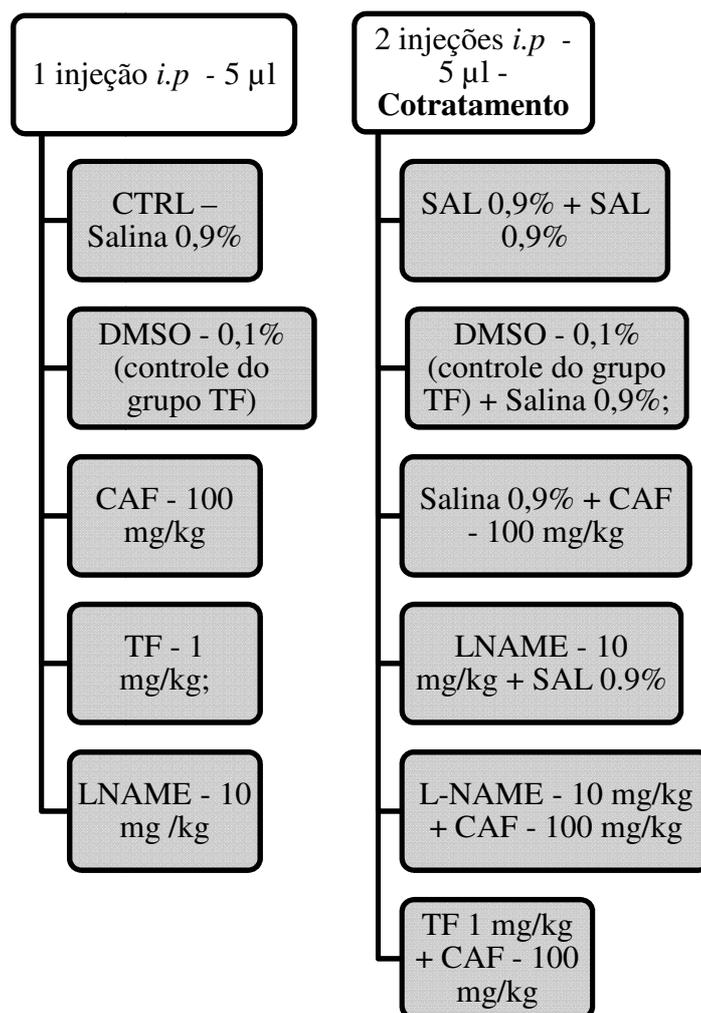


Figura 2: Subdivisão dos grupos de acordo com o tratamento administrado. No qual as siglas são referentes, aos seguintes compostos: TF – Tocoferol; CAF – Cafeína; DMSO – Dimetilsulfóxido; L-NAME (NG-nitro-L-arginina-metil éster); SAL – Salina.

3.4 TESTE DE PREFERÊNCIA CLARO/ESCURO

No teste de preferência claro/escuro os animais foram colocados, individualmente, em aquários de acrílico que apresentavam uma dimensão 15 cm x 10 cm x 45 cm (altura x largura x comprimento), divididos em dois compartimentos (22,5 cm cada) sendo um branco e outro preto, como demonstrado na figura 3. Os animais eram testados em aquários contendo água proveniente do aquário em temperatura ambiente e o nível da água no aquário preenchia uma altura de 10 cm. Além disso, os aparatos apresentavam um compartimento móvel que consistia em uma porta corrediça que delimitava uma área de 5 cm (centro do aquário), contendo tanto uma parte clara quanto uma escura.

Esse compartimento foi utilizado no início do teste, para que o animal se habitasse ao aparato por 3 minutos antes da avaliação, em seguida, as portas foram removidas e o animal transitou livremente por todos os compartimentos durante 15 minutos como demonstrado na figura 4 (MAXIMINO; et al, 2012).

O teste comportamental foi filmado utilizando uma câmera digital (Cyber-shot DSC-W710 BR4) e os vídeos foram avaliados utilizando o software X-Plo-Rat 2005 (versão 1.1.0), no qual se avaliou os seguintes parâmetros: tempo no compartimento branco (comportamento escotático quantificado pelo tempo em porcentagem que o animal permaneceu no compartimento claro); tigmotaxia (recordado pelo percentual de tempo que o animal permaneceu explorando a periferia do aparato a uma distância de no máximo 2 cm das paredes do compartimento claro); nado errático (número de eventos que o animal apresentou um comportamento natatório em *zig-zag* com alta velocidade e mudança de direção no compartimento branco); congelamento (percentual de tempo que o animal permaneceu apresentando imobilidade no fundo do aquário no compartimento branco); avaliação de risco (número de entradas no compartimento branco, seguidas de um retorno imediato ao compartimento escuro em menos de 1 segundo ou como um cruzamento apenas parcial do corpo do animal em direção ao compartimento branco); latência de saída para o compartimento branco (tempo que o animal leva para entrar na porção clara do aparato pela primeira vez contados a partir do início do teste ou se esse animal iniciou o teste no compartimento branco esse comportamento foi recordado depois da primeira incursão no lado escuro, e na seqüência foi contabilizado sua latência de saída para o compartimento branco) e número de quadrantes cruzados (número total

de quadrantes cruzados no compartimento branco, como uma forma de avaliar a atividade locomotora).

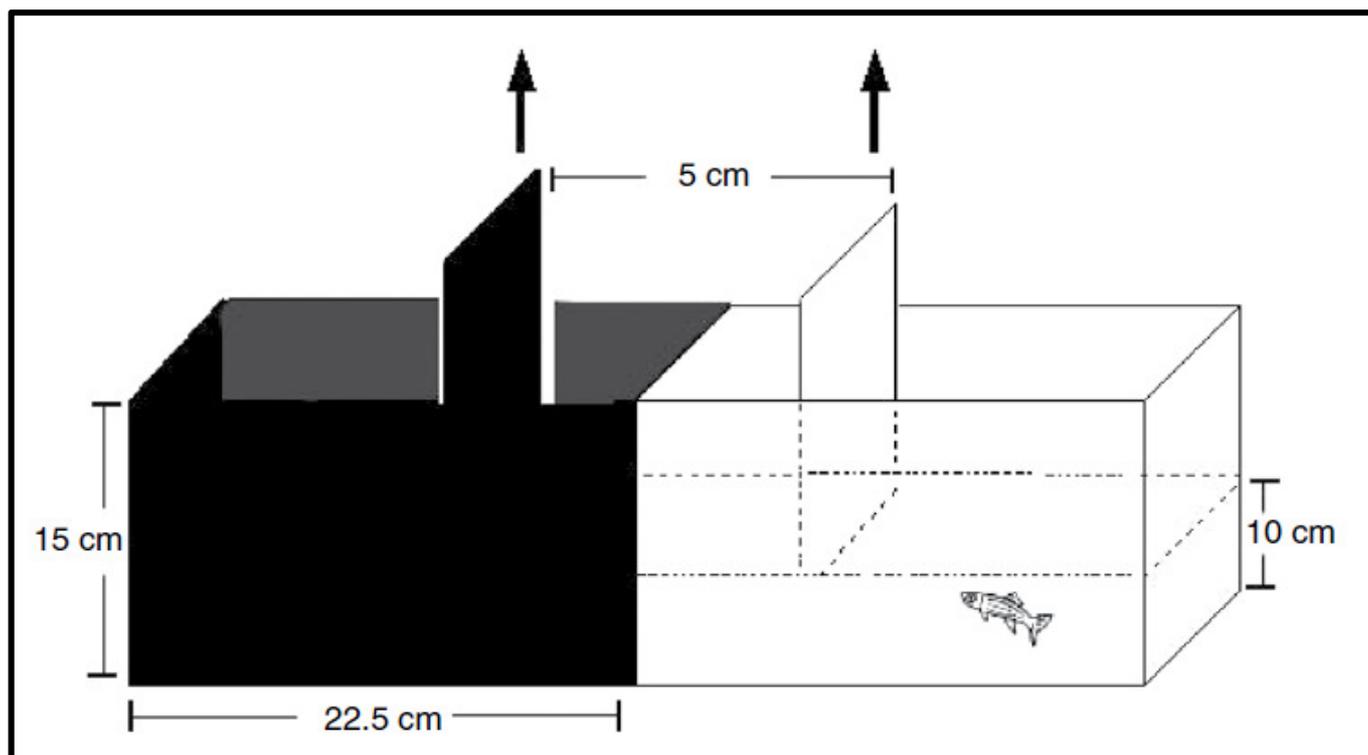


Figura 3: Representação do aquário utilizado para o teste preferência claro/escuro (MAXIMINO; et al, 2010).

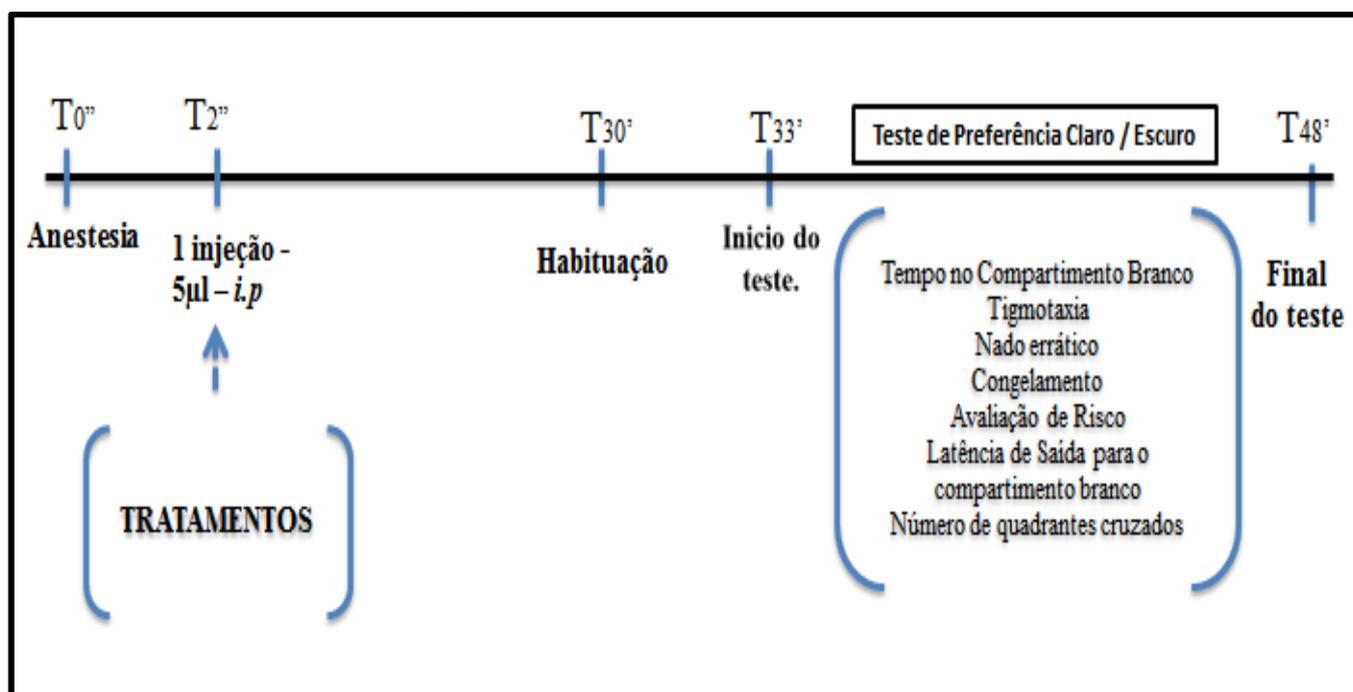


Figura 4: Representação esquemática do experimento utilizando o teste de preferência claro/escuro.

3.5 DISTRIBUIÇÃO VERTICAL ELICIADA PELA NOVIDADE

O protocolo para o teste de distribuição vertical eliciada pela novidade (DVN) foi modificado de Cachat; et al (2010). Os animais foram transferidos individualmente para o aparato de teste, que consistiu em um aquário de 15 x 25 x 20 cm (largura x comprimento x altura), preenchido de água do aquário até a extremidade (Egan; et al, 2009). O aquário era dividido igualmente em duas secções de 10 cm de altura cada (topo e fundo) e subdivididos em quadrantes (para avaliação da atividade locomotora), no qual, as linhas de separação foram marcadas externamente como demonstrado na figura 5. Assim que o animal era transferido para o aparato, o seu comportamento era captado por uma câmera digital (Cyber-shot DSC-W710 BR4). A filmadora era posicionada à frente do aquário para captar a exploração em todo o ambiente, logo, registrou-se a distribuição vertical e lateral dos peixes.

Além disso, ao longo do teste os animais puderam explorar livremente o aquário por 6 min, após os quais foram removidos e sacrificados como demonstrado na figura 6. Os vídeos foram analisados utilizando o software X-Plo-Rat 2005 (v.1.1), e as imagens foram divididas em quadrantes (6 x 6).

As seguintes variáveis foram analisadas: tempo na porção superior (tempo dispendido na metade superior do aquário); número de transições no compartimento superior (quantidade de quadrantes cruzados nessa porção do aparato); nado errático (quantidade de vezes que o animal apresentou o comportamento natatório em *zig-zag* com alta velocidade e mudança de direção em todo aparato); congelamento (tempo que o animal demonstrou o comportamento de completa imobilização, apenas apresentando comportamentos operculomotores); quantidade de eventos de comportamento de congelamento (quantidade de vezes que o animal demonstrou o comportamento de congelamento) e latência de entrada na porção superior (tempo em segundos que o animal demorou a adentrar a porção superior).

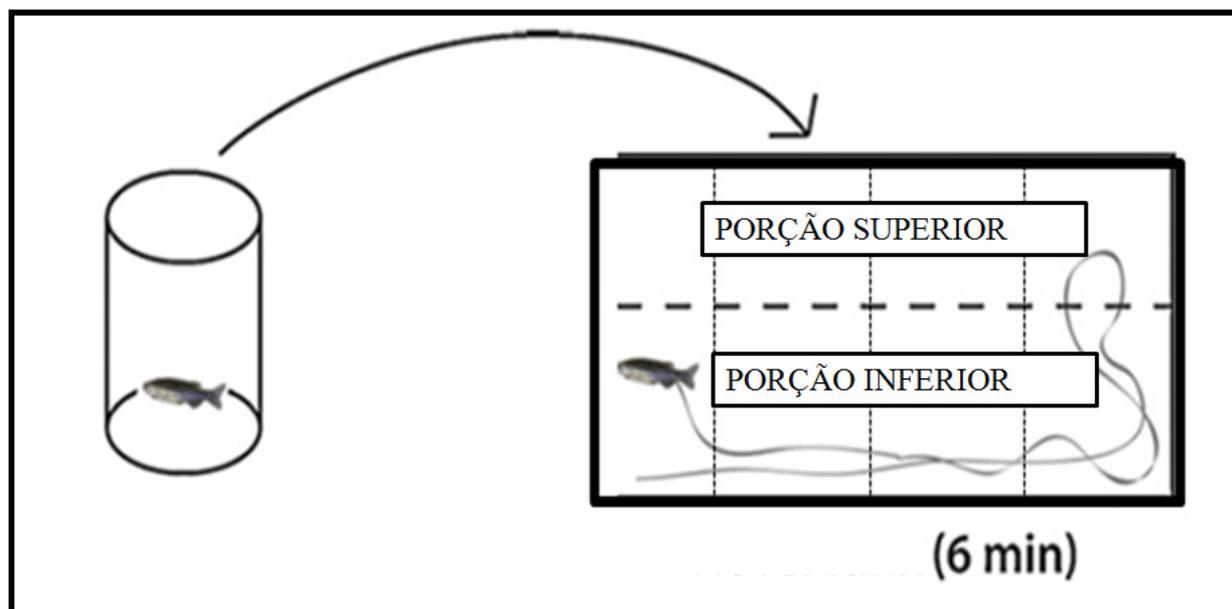


Figura 5: Representação do aquário utilizado para o teste de distribuição vertical eliciada pela novidade. Adaptado de EGAN; et al (2009).

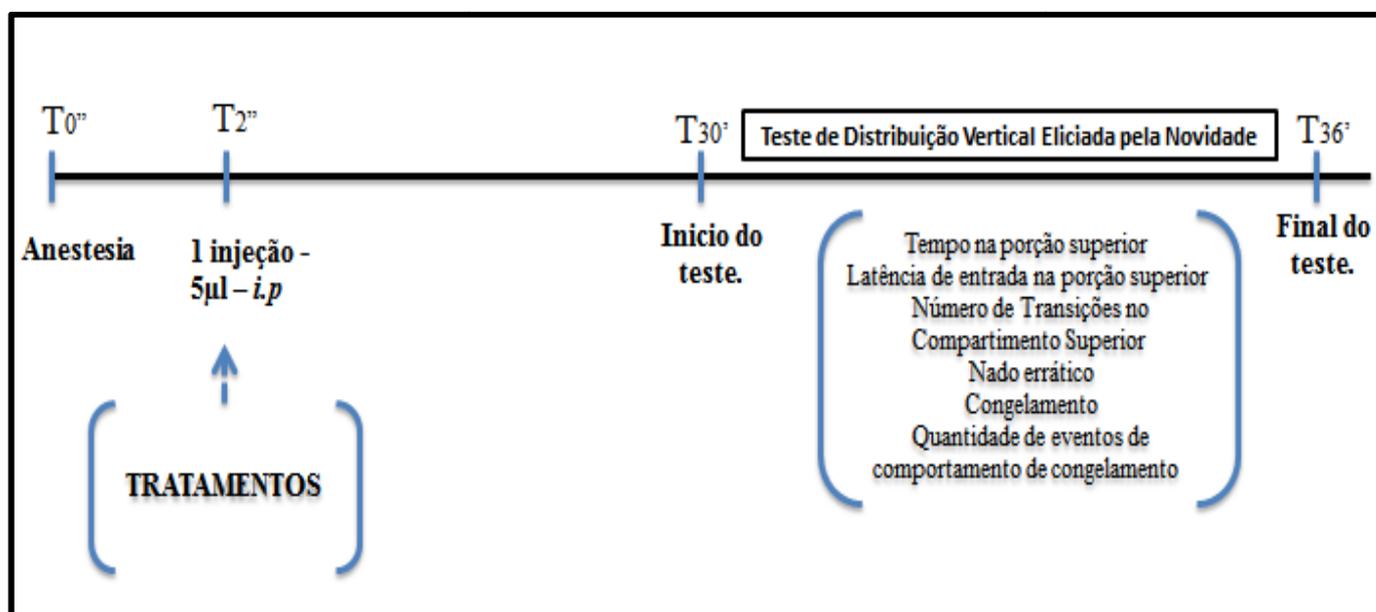


Figura 6: Representação esquemática do experimento utilizando o teste de Distribuição Vertical Eliciada pela Novidade.

3.6 ESTATÍSTICAS

A análise estatística dos resultados foi realizada a partir da aplicação do teste de normalidade utilizando o teste Shapiro-Wilk, considerando uma distribuição normal $p < 0,05$ e foi posteriormente aplicado o teste paramétrico ANOVA de uma via com pós-teste *Tukey* para comparação entre os diferentes grupos dos parâmetros avaliados. Foi utilizado o programa *Graph Pad Prism 5.0* e considerados significativos valores com $p < 0,05$. Os resultados de todos os parâmetros dos dois testes comportamentais foram expressos em média \pm erro padrão.

4 RESULTADOS

4.1 α -TOCOFEROL BLOQUEIA O COMPORTAMENTO TIPO ANSIEDADE AMPLIADO PELA CAFEÍNA NOS TESTES ESCOTÁXICO E DVN EM ZEBRAFISH.

No intuito de selecionar a dose efetiva de α -tocoferol construímos uma curva dose-resposta (Figura 7A). Os animais tratados com α -tocoferol nas doses de 1 mg/kg e 5 mg/kg não apresentaram diferença estatística no tempo despendido no compartimento branco quando comparado ao o grupo controle Salina (TF 1 mg/kg= 59,1±9,27% vs SAL= 62,23±10,77%; F=0,8356; p>0,05; TF 5 mg/kg= 31,05±9,06% vs SAL= 62,23±10,77%; F=0,3020; p>0,05), porém os animais tratados com α -tocoferol na dose de 2 mg/kg apresentaram um tempo significativamente maior explorando o ambiente claro em relação ao grupo controle salina (TF 2 mg/kg= 78,66±2,72% vs SAL= 62,23±10,77%; p<0,05) (Figura 7A).

No entanto, os animais tratados com 5 mg/kg de α -tocoferol apresentaram um maior número de cruzamentos de quadrantes em relação ao grupo controle salina (TF 5 mg/kg= 261,5±51,7 vs SAL= 116±31,84; F=3,2386; p<0,05), indicando que essa dose pode alterar a atividade locomotora dos animais, efeito esse que não foi observado nos demais tratamentos (Figura 7B).

Diante do exposto elegemos a dose de 1 mg/kg de α -tocoferol para prosseguir nas análises dos demais parâmetros e para realizar o cotratamento com a cafeína, em função de que nessa dose não observamos diferenças de respostas comportamentais e na atividade locomotora quando comparado ao grupo controle (Figura 7).

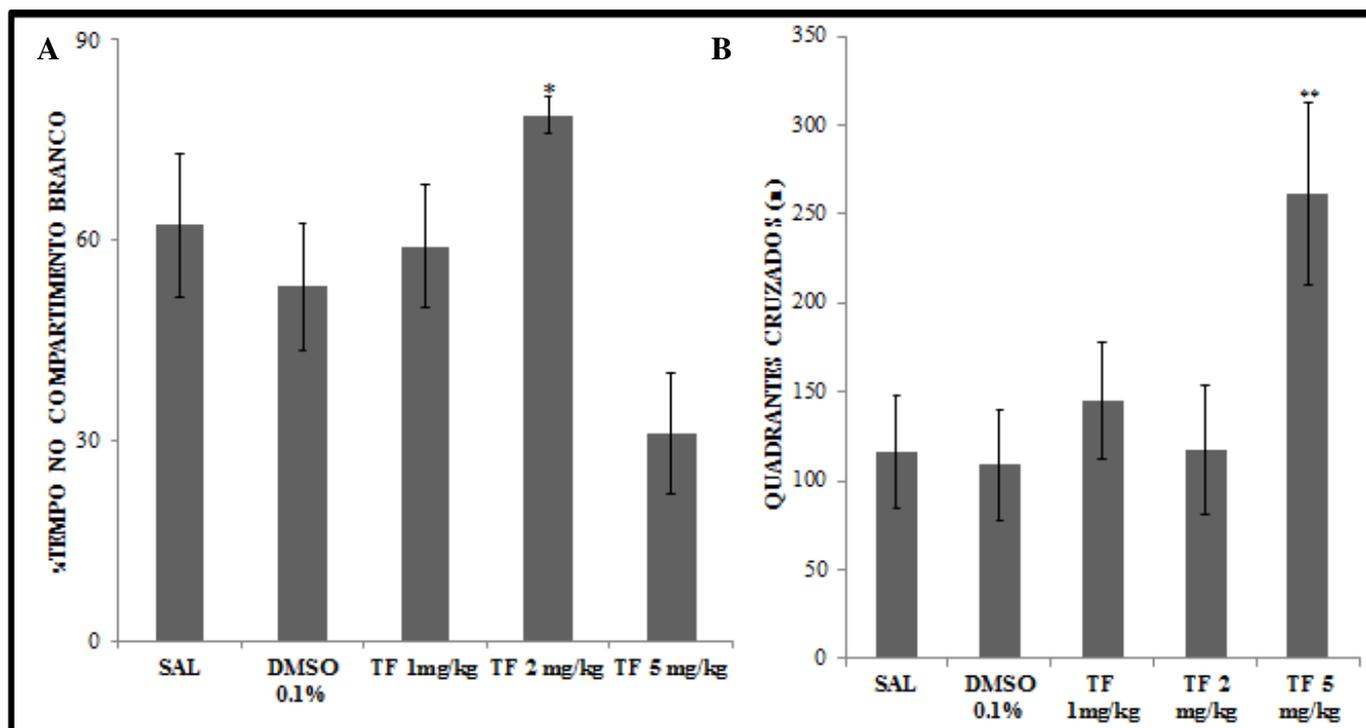


Figura 7: Curva dose-resposta do tratamento com α -tocoferol no comportamento tipo ansiedade avaliado no teste escotáxico. Em A tem-se o percentual de tempo dispendido no compartimento branco e em B o número de quadrantes cruzados no teste escotáxico. Foi aplicado como teste estatístico ANOVA uma via com pós-teste *Tukey*. Em A não houve diferença estatística dos diferentes tratamentos em relação ao grupo controle SAL e em B houve diferença estatística do grupo que recebeu a dose de 5 mg/kg de α -tocoferol em relação ao controle SAL com $**p < 0,05$. Os dados foram expressos em média \pm erro padrão.

Em relação ao tratamento com cafeína nossos resultados referentes ao teste escotático demonstraram que os animais tratados (Figura 8A) com cafeína apresentaram uma diminuição significativa do tempo despendido no compartimento branco em relação aos animais controle (CAF=9,42±2,50% vs SAL= 62,23±10,77%; F= 19,5875; p<0,01; CAF + SAL= 6,38±1,26% vs SAL+SAL= 62,47±18.68%; F=4,8829; p>0,05).

O tratamento com essa droga não exerceu efeito na quantidade de quadrantes cruzados (F= 0,9795; p>0,05), logo, não foi observado alteração locomotora entre os animais tratados com cafeína e os grupos controles (Figura 8B).

No parâmetro tigmotático demonstramos que os animais tratados com cafeína (CAF=4,8±0,17%; CAF + SAL=3,59±0,08%) demandaram um percentual de tempo elevado apresentando esse comportamento enquanto que os controles (SAL; SAL + SAL) não apresentaram tigmotaxia (Figura 9A).

Quanto ao parâmetro de congelamento, demonstramos que os grupos tratados com cafeína (CAF= 6,98±1,78%; SAL + CAF= 3,77±2,24) apresentaram um elevado percentual de tempo em inibição comportamental enquanto que os grupos controle (SAL e SAL + SAL) não apresentaram esse comportamento (Figura 9B).

Em relação ao parâmetro de nado errático demonstramos que o grupo cafeína apresentou uma elevada quantidade de eventos desse comportamento quando comparado ao grupo controle (CAF=9±2,6 vs SAL= 3±0,28; F=4,74; p<0,05; CAF=4±0,5 vs SAL+SAL= 2±0,472; F=0,2935; p>0,05) (Figura 9C).

No parâmetro de avaliação de risco demonstramos que o tratamento com cafeína (CAF= 2,42±0,41; CAF + SAL= 1,5±0,35) não exerceu efeito nessa variável quando comparado ao grupo controle (SAL=2,2±0,44; SAL + SAL= 1) (Figura 9D).

A latência de saída para o compartimento branco foi estatisticamente superior para o grupo tratado com cafeína quando comparado ao grupo controle (CAF= 127,42±27,31s vs SAL= 48,2 ± 7,8s; p>0,05; SAL+CAF= 105,25±12,56s vs SAL+SAL=40,83±9,84s; p>0,05) (Figura 10).

Nossos resultados referentes ao teste de distribuição vertical eliciada pela novidade demonstraram que o tratamento com cafeína diminuiu estatisticamente o tempo despendido na porção superior do aquário (Figura 11A) quando comparado ao grupo controle (CAF= 151.49±9.945s vs SAL= 301.22±18.24s; F= 6.7824; p<0,05;

CAF+SAL= 145,92±6,19s vs SAL + SAL= 265,43±25,45s; F= 4,8419; p<0,05). Não houve diferença estatística em relação ao número de quadrantes cruzados entre os animais tratados com cafeína e os animais dos grupos controle (F= 0,2944; p>0,05) (Figura 11 B).

Em relação, ao parâmetro de congelamento no teste DVN, demonstramos que os animais tratados com cafeína (11,6±0,72) apresentaram uma elevada frequência de episódios desse comportamento, enquanto que o controle não apresentou esse evento (Figura 12A).

Quanto ao tempo que os animais permaneceram em congelamento demonstramos que o grupo cafeína (CAF= 52,69±12,40s) apresentou um tempo elevado, enquanto que os grupos controle não apresentaram esse comportamento (Figura 12B).

Em relação ao parâmetro de nado errático demonstramos que no teste DVN o grupo cafeína apresentou uma elevada frequência de episódios de nado errático quando comparado aos grupos controle (CAF= 4,3±0,27 vs SAL= 1; F= 14,1421; p<0,01; SAL + CAF= 5,66±0,54 vs SAL + SAL= 1; F= 7,6681; p<0,05) (Figura 12C).

Quanto à latência de saída para o compartimento superior observamos que os animais tratados com a cafeína apresentaram uma latência significativamente superior aos grupos controle (CAF= 114±26,73s vs SAL= 13,5±3,75s; F=6,084; p<0,05; SAL + CAF= 102±23,73s vs SAL + SAL= 11±1,6s; F=5,030; p<0,05) (Figura 12D).

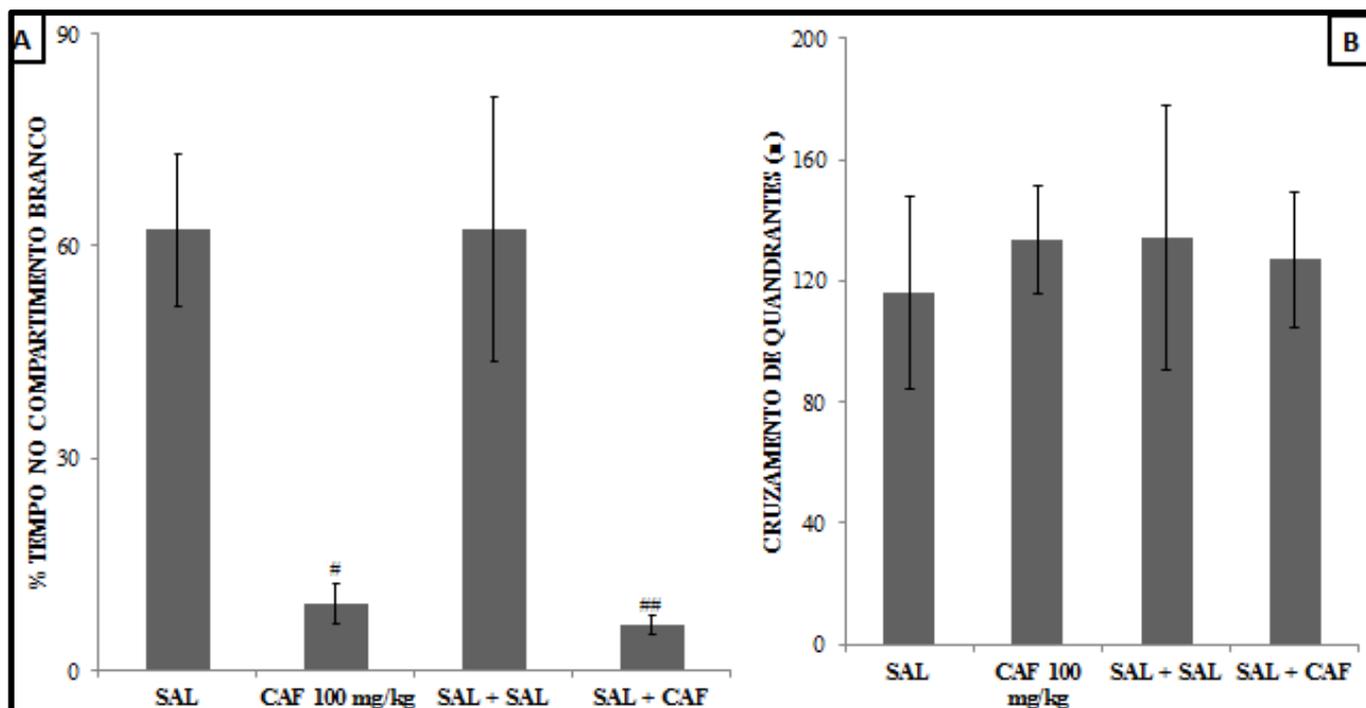


Figura 8: Tratamento com cafeína no comportamento tipo ansiedade avaliado no parâmetro de tempo no compartimento claro e no cruzamento de quadrante no teste escotático. Foi aplicado como teste estatístico ANOVA uma via com pós-teste *Tukey*. Em A houve diferença estatística do grupo CAF em relação ao controle SAL com $\#p < 0,05$; do grupo SAL + CAF em relação ao grupo SAL + SAL com $\#\# p < 0,05$ e em B não houve diferença estatística entre os grupos avaliados. Os dados foram expressos em média \pm erro padrão.

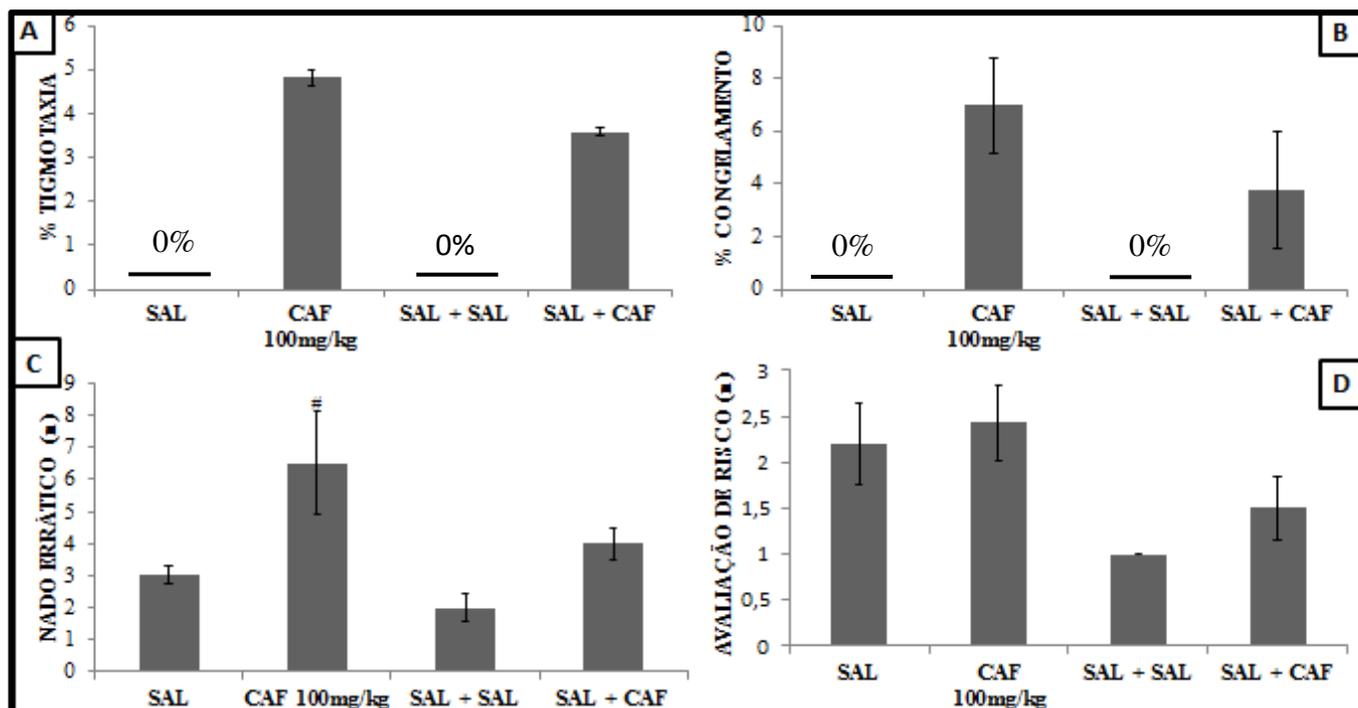


Figura 9: Tratamento com cafeína no comportamento tipo ansiedade avaliado no parâmetro de tigmotaxia, congelamento, nado errático e avaliação de risco no teste escotático. Foi aplicado como teste estatístico ANOVA uma via com pós-teste *Tukey*. Em A não houve diferença estatística no parâmetro tigmotaxia entre os grupos. Em B não houve diferença estatística no parâmetro congelamento entre os grupos. Em C houve diferença estatística no parâmetro nado errático entre o grupo CAF e o grupo SAL com $## p < 0,05$. Em D não houve diferença estatística no parâmetro avaliação de risco entre os grupos avaliados. Os dados foram expressos em média \pm erro padrão.

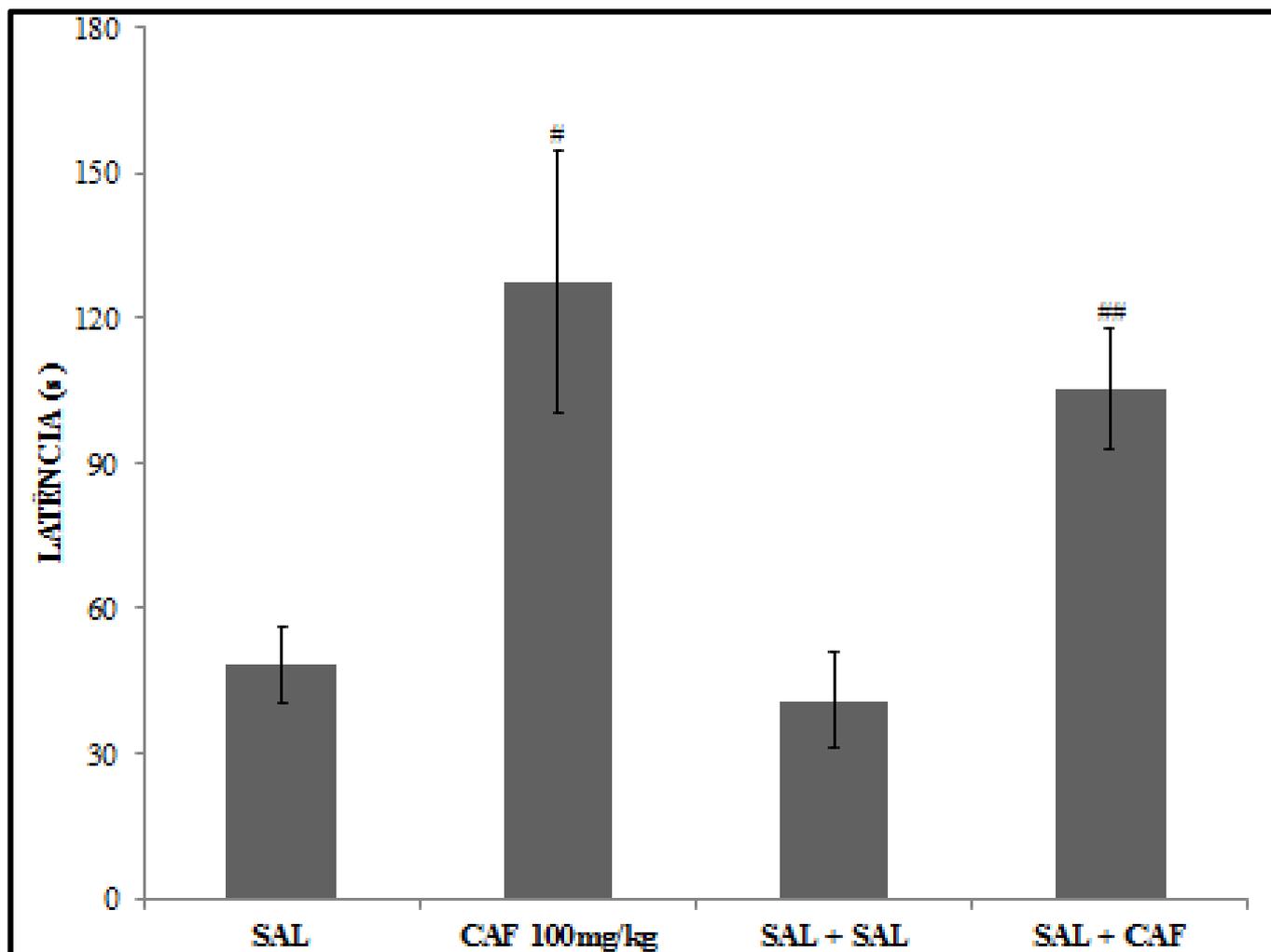


Figura 10: Tratamento com cafeína no comportamento tipo ansiedade avaliado no parâmetro de latência de saída para o compartimento branco no teste escotático. Foi aplicado como teste estatístico ANOVA uma via com pós-teste *Tukey*, houve diferença estatística entre o grupo CAF e o grupo SAL com # $p < 0,05$ e entre o grupo SAL + CAF e SAL + SAL com ## $p < 0,05$. Os dados foram expressos em média \pm erro padrão.

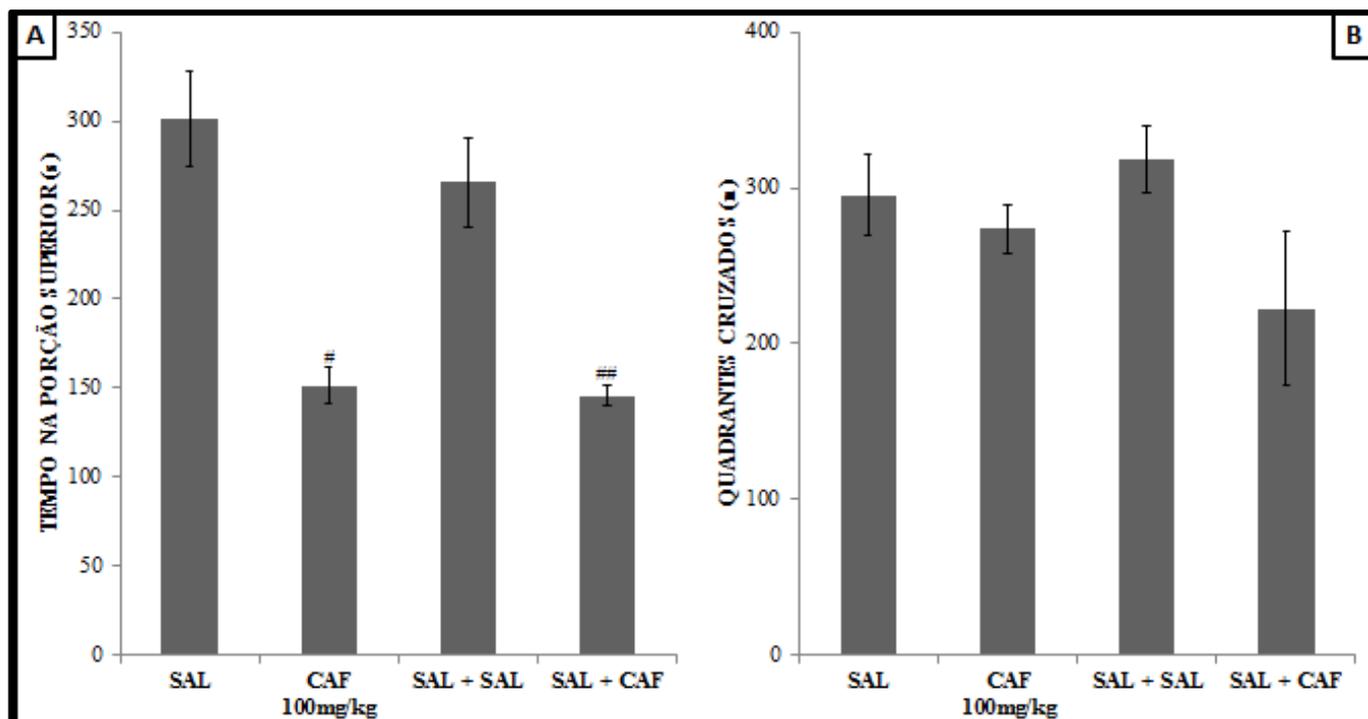


Figura 11: O efeito da cafeína no parâmetro de tempo na porção superior e quantidade de quadrantes cruzados utilizando o DVN. Foi aplicado como teste estatístico ANOVA uma via com pós-teste *Tukey*. Em A houve diferença estatística no parâmetro de tempo na porção superior do grupo CAF em relação ao controle SAL com # $p < 0,05$ e do SAL + CAF em relação ao grupo SAL + SAL com ## $p < 0,05$. Em B não houve diferença estatística entre os grupos avaliados no parâmetro de quadrantes cruzados. Os dados foram expressos em média \pm erro padrão.

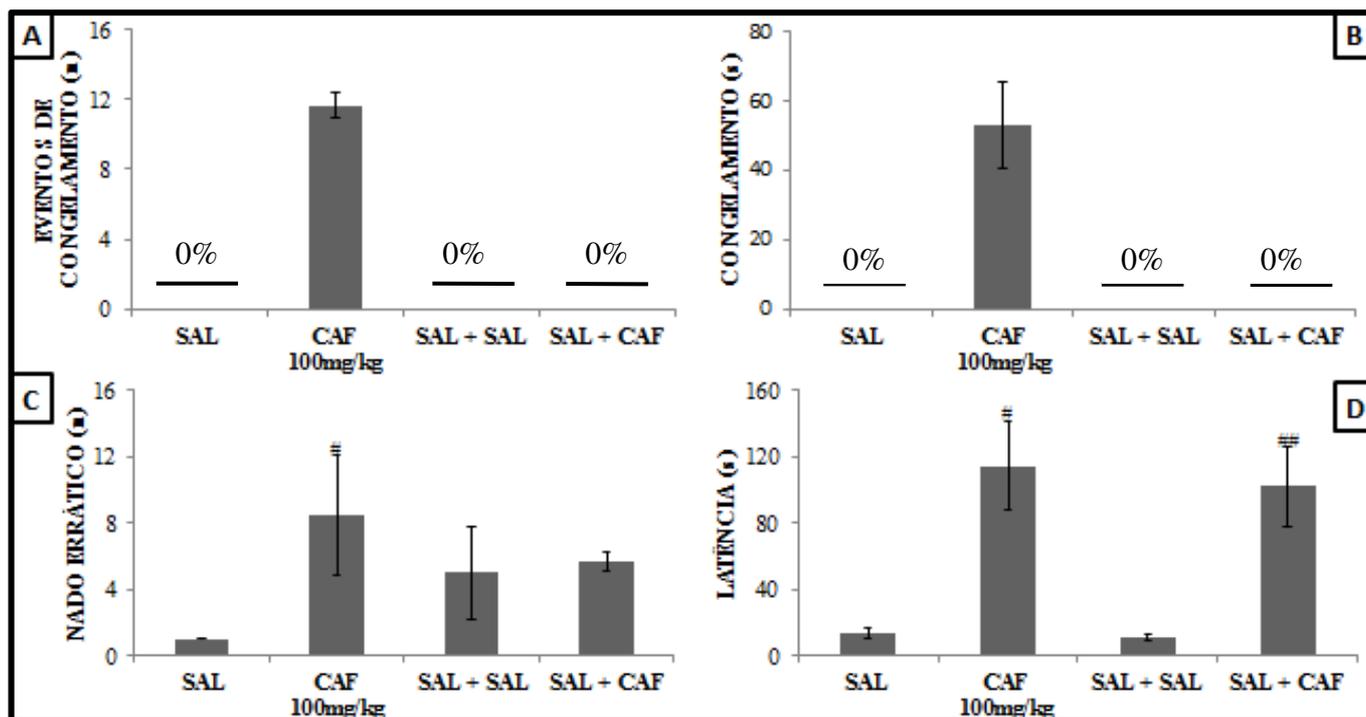


Figura 12: O efeito do tratamento com α - tocoferol nos parâmetros de: evento de congelamento, tempo em congelamento, nado errático e latência utilizando o DVN. Foi aplicado como teste estatístico ANOVA uma via com pós-teste *Tukey*. Em A não houve diferença estatística no parâmetro de número de eventos de congelamento entre os grupos avaliados. em B não houve diferença estatística no parâmetro de tempo em congelamento entre os grupos avaliados. Em C houve diferença estatística no parâmetro de nado errático do grupo CAF em relação ao controle com # $p < 0,05$. Em D houve diferença estatística no parâmetro de nado errático do grupo CAF em relação ao SAL com # $p < 0,05$ e do grupo SAL + CAF em relação ao grupo SAL + SAL com ## $p < 0,05$. Os dados foram expressos em média \pm erro padrão.

Os dados referentes ao tratamento com α -tocoferol e ao cotratamento avaliados no teste escotácico revelaram que os animais que receberam o cotratamento de α -tocoferol na dose de 1 mg/kg com cafeína (TF 1 mg/kg + CAF= 60,08±15,59%), não apresentaram diferença estatística ($p>0,05$) quanto ao tempo dispendido no compartimento branco quando comparado aos grupos controle (SAL=62,23±10,77%; SAL+SAL= 62,47±18,68%), sugerindo que a dose de α -tocoferol utilizada no presente estudo, bloqueia o efeito ansiogênico, refletido na diminuição do tempo no compartimento claro, induzido por cafeína nesse parâmetro (Figura 13). Quanto à atividade locomotora, não foi observado diferença estatística no número de quadrantes cruzados entre os grupos avaliados ($F=0,9973$; $p>0,05$, Figura 14)

Em relação ao parâmetro tigmotácico, demonstramos que os animais tratados com α -tocoferol na dose de 1 mg/kg (figura) não apresentaram esse comportamento assim como o grupo controle. Por outro lado, o cotratamento com α -tocoferol e cafeína (TF 1 mg/kg + CAF) bloqueou parcialmente o aumento na tigmotaxia induzido por cafeína (TF 1 mg/kg + CAF= 0,84±0,10% vs CAF= 4,8±0,17%; $F=12,889$; $p<0,05$; TF 1 mg/kg + CAF= 0,84±0,10% vs SAL + CAF= 3,59±0,08%; $F=7,724$; $p<0,05$).

No parâmetro de congelamento, demonstramos que os animais tratados com α -tocoferol na dose de 1 mg/kg não apresentaram esse comportamento, assim como os grupos controle salina. Nesse parâmetro observamos que os animais cotratados com α -tocoferol e cafeína (TF 1 mg/kg + CAF) não apresentaram o comportamento de congelamento, esse resultado sugere que nessa variável a bloqueio do efeito gerado pela cafeína (aumento no percentual de tempo em congelamento) foi total (Figura 16).

Em relação ao parâmetro de nado errático demonstramos que não houve diferença entre o grupo tratado com α -tocoferol (TF 1 mg/kg = 4,6±0,5) e o grupo controle (SAL= 3±0,28). Porém, os animais que receberam o cotratamento de α -tocoferol com cafeína (TF 1 mg/kg + CAF= 5,25±0,6) não retornaram aos níveis do controle (SAL= 3±0,28) e permaneceram sem diferença estatística ($F=1,4115$; $p>0,05$) com o grupo cafeína (CAF=9±2,6), ou seja, nesse parâmetro o cotratamento não bloqueou o aumento no número de eventos de nado errático induzido pela cafeína (Figura 17).

Quanto ao parâmetro de avaliação de risco demonstramos que o grupo tratado com α -tocoferol na dose de 1 mg/kg e o grupo cotratado (TF 1 mg/kg + CAF) não apresentaram esse comportamento (Figura 18). No entanto, o tratamento com cafeína

(CAF= 2,42±0,41; CAF + SAL= 1,5±0,35) não exerceu efeito nessa variável quando comparado ao grupo controle (SAL=2,2±0,44; SAL + SAL= 1) (Figura 9D, Figura 18).

A latência de saída para o compartimento branco não foi estatisticamente diferente (F=0,3704; p>0,05) entre o grupo tratado com α -tocoferol (TF 1 mg/kg= 56 ± 28,09s) e o grupo controle (SAL= 48,2 ± 7,8s). O cotratamento (TF 1 mg/kg + CAF= 10,57±3,33s) manteve os níveis dos controles (SAL= 48,2 ± 7,8s; SAL+SAL= 40,83±9,84s) sem diferença estatística entre esses grupos (p>0,05), sugerindo uma bloqueio total no aumento da latência gerado pela cafeína (Figura 19).

Nossos resultados referentes ao teste de distribuição vertical eliciada pela novidade demonstraram que os animais tratados com α -tocoferol na dose de 1 mg/kg (342,46±12,83s) não apresentaram diferença estatística (F=1,1860; p>0,05) quanto ao tempo dispendido na porção superior do aquário em relação ao grupo controle salina (SAL= 301,22±18,24s). Esse mesmo padrão de comportamento foi observado no grupo cotratado (TF 1 mg/kg + CAF= 331,4±19,62s), que também não apresentou diferença (p>0,05) em relação ao grupo controle Salina (SAL=311,53±18,24s, F=0,9669; SAL + SAL= 265,43±25,45s, F=1,7880), enquanto que a cafeína diminuiu esse tempo, portanto sugerimos que houve um bloqueio total promovido pelo α -tocoferol no efeito ansiogênico gerado pela cafeína nesse parâmetro (Figura 20).

Quanto ao número de quadrantes cruzados demonstramos que não houve diferença estatística (F= 0,8698; p>0,05) entre os diferentes tratamentos, logo não houve alteração na atividade locomotora (Figura 21).

Em relação, ao parâmetro de congelamento no teste DVN, demonstramos que o grupo α -tocoferol não apresentou esse comportamento ao longo do teste, assim como o grupo controle. Porém, o aumento na frequência de episódios de congelamento gerado pela cafeína é bloqueado parcialmente pelo cotratamento (TF 1 mg/kg + CAF= 3,5±0,8) onde observamos que houve uma redução estatística (F= 17,09; p<0,05) dos episódios de congelamento quando comparado com os animais tratados com cafeína (11,6±0,72), porém essa redução não foi suficiente para retornar aos níveis do controle (Figura 22).

Quanto ao tempo que os animais permaneceram em congelamento demonstramos que o grupo tratado com α -tocoferol não apresentou o comportamento de congelamento, assim como os grupos controle. O cotratamento (TF 1 mg/kg + CAF= 41,84±9,35s) não exerceu efeito (F=0,6119; p>0,05) sobre o elevado tempo em congelamento gerado pela cafeína (52,69±12,40s) e não retornou aos níveis do controle (F=0,3102; p>0,05, Figura 23).

Em relação ao parâmetro de nado errático demonstramos que no teste DVN o grupo tratado com α -tocoferol na dose de 1 mg/kg ($3,33\pm 0,33$) não apresentou diferença estatística ($F=0,2750$; $p=>0,05$) em relação ao grupo controle (SAL= 1). No entanto, também, demonstramos que o grupo cotratado (TF 1 mg/kg + CAF= $1,6\pm 0,25$) não apresentou diferença ($F=0,2021$; $p<0,05$) em relação ao grupo controle (SAL=1), sugerindo que nesse parâmetro o cotratamento bloqueou totalmente o efeito de aumento na frequência de nado errático induzido por cafeína (Figura 24).

Quanto à latência de saída para o compartimento superior observamos que o tratamento com α -tocoferol ($23,05\pm 4,069s$) apresentou uma latência semelhante ($F=0,6054$; $p<0,05$) ao grupo controle ($13,5\pm 3,750$). Assim como, não observamos diferença estatística em relação a esse parâmetro entre o grupo cotratado (TF 1 mg/kg + CAF= $10,6\pm 2,32$) e os grupos controle (SAL= $13,5\pm 3,75$, $F=0,1588$; $p>0,05$; SAL + SAL= $11\pm 1,6s$, $F=0,0175$, $p>0,05$) indicando que houve uma bloqueio total realizada pelo cotratamento na elevada latência induzida por cafeína (Figura 25).

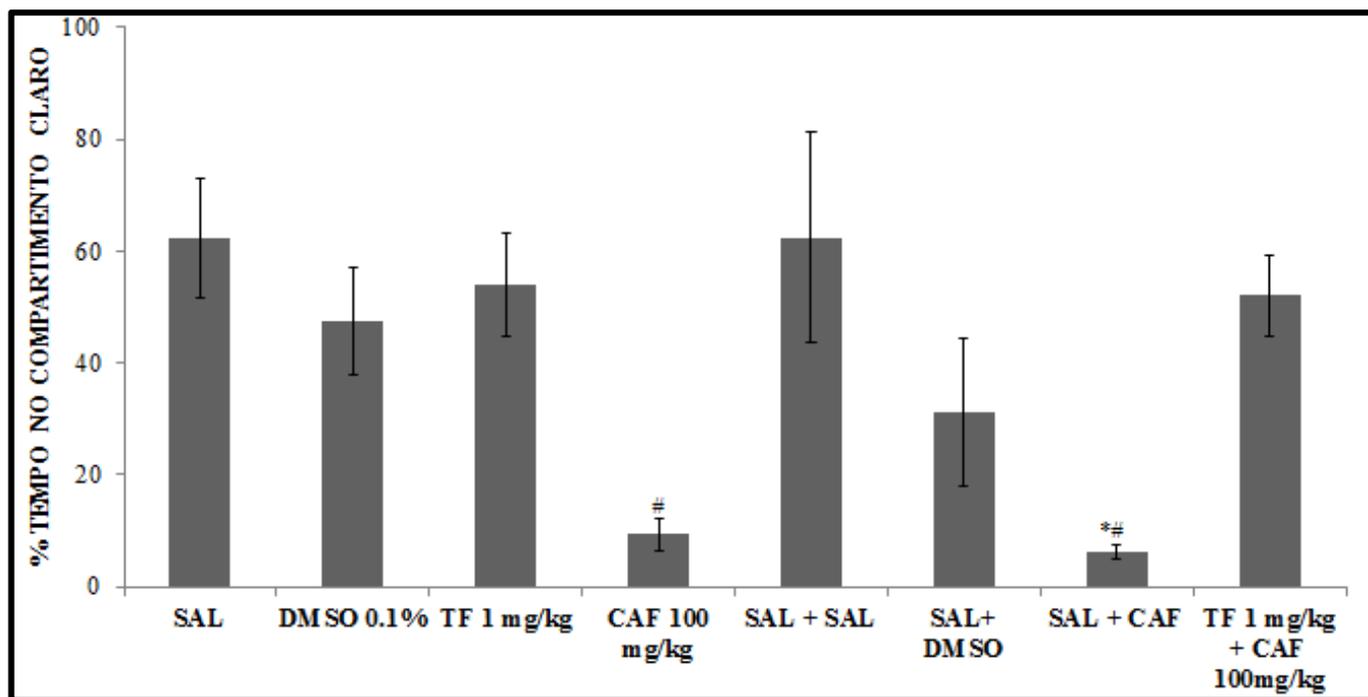


Figura 13: Tratamento com α -tocoferol no comportamento tipo ansiedade avaliado no parâmetro de tempo no compartimento claro no teste escotático. Foi aplicado como teste estatístico ANOVA uma via com pós-teste *Tukey*. Houve diferença estatística entre o grupo CAF e o grupo controle SAL com # $p < 0,05$; entre o grupo SAL + CAF e o grupo SAL + SAL com *# $p < 0,05$; e não houve diferença estatística entre o grupo cotratado (TF 1 mg/kg + CAF) e o grupo controle (SAL e SAL + SAL). Os dados foram expressos em média \pm erro padrão.

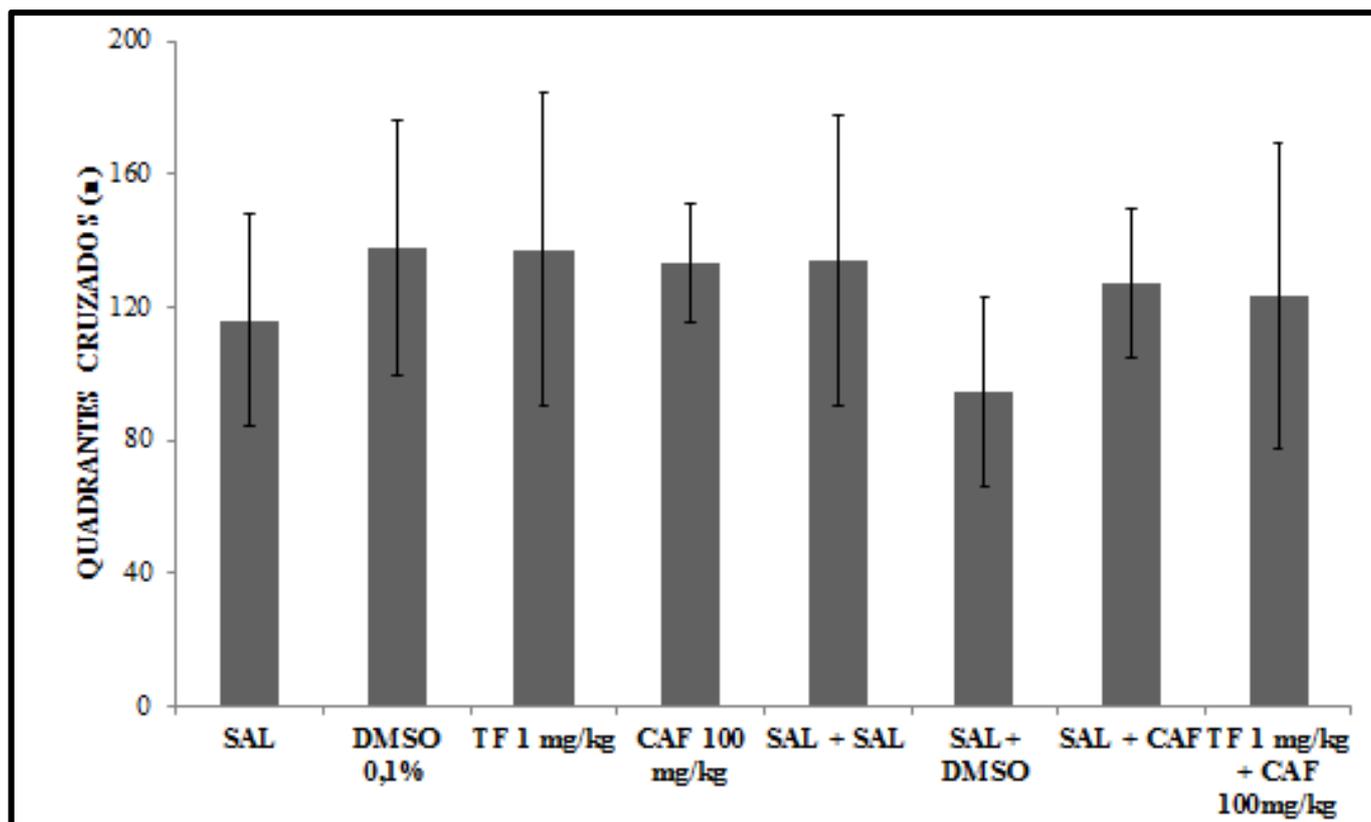


Figura 14: Efeito do tratamento com α -tocoferol na atividade locomotora avaliada no teste escotáxico. Foi aplicado como teste estatístico ANOVA uma via com pós-teste *Tukey*. Não houve diferença estatística entre os grupos avaliados em relação ao grupo controle. Os dados foram expressos em média \pm erro padrão.

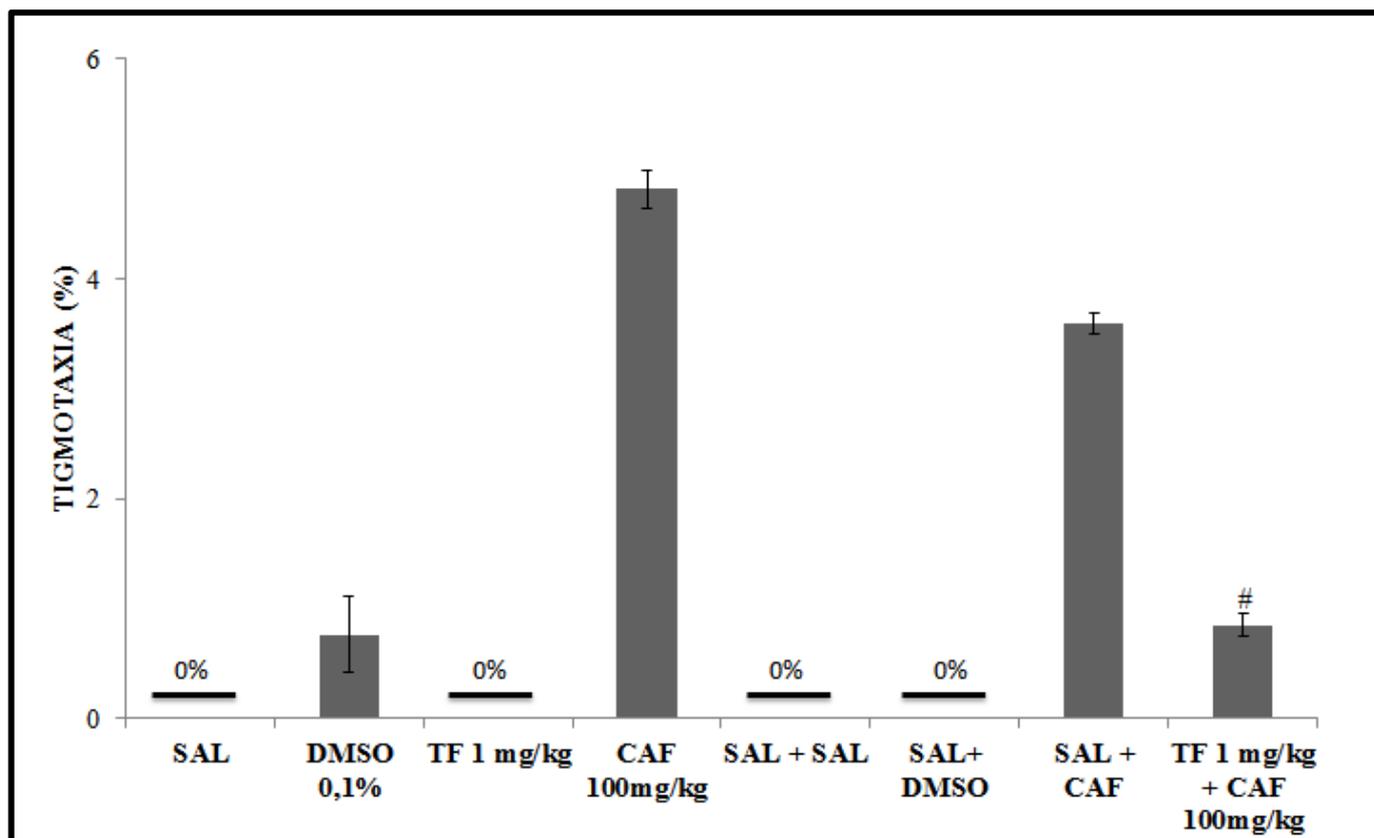


Figura 15: O efeito do α -tocoferol no comportamento tipo ansiedade avaliado através do parâmetro de tigmotaxia no ambiente claro utilizando teste escotático. Foi aplicado como teste estatístico ANOVA uma via com pós-teste *Tukey*. Houve diferença estatística do grupo TF 1 mg/kg + CAF em relação ao controle CAF com # $p < 0,05$. Os dados foram expressos em média \pm erro padrão.

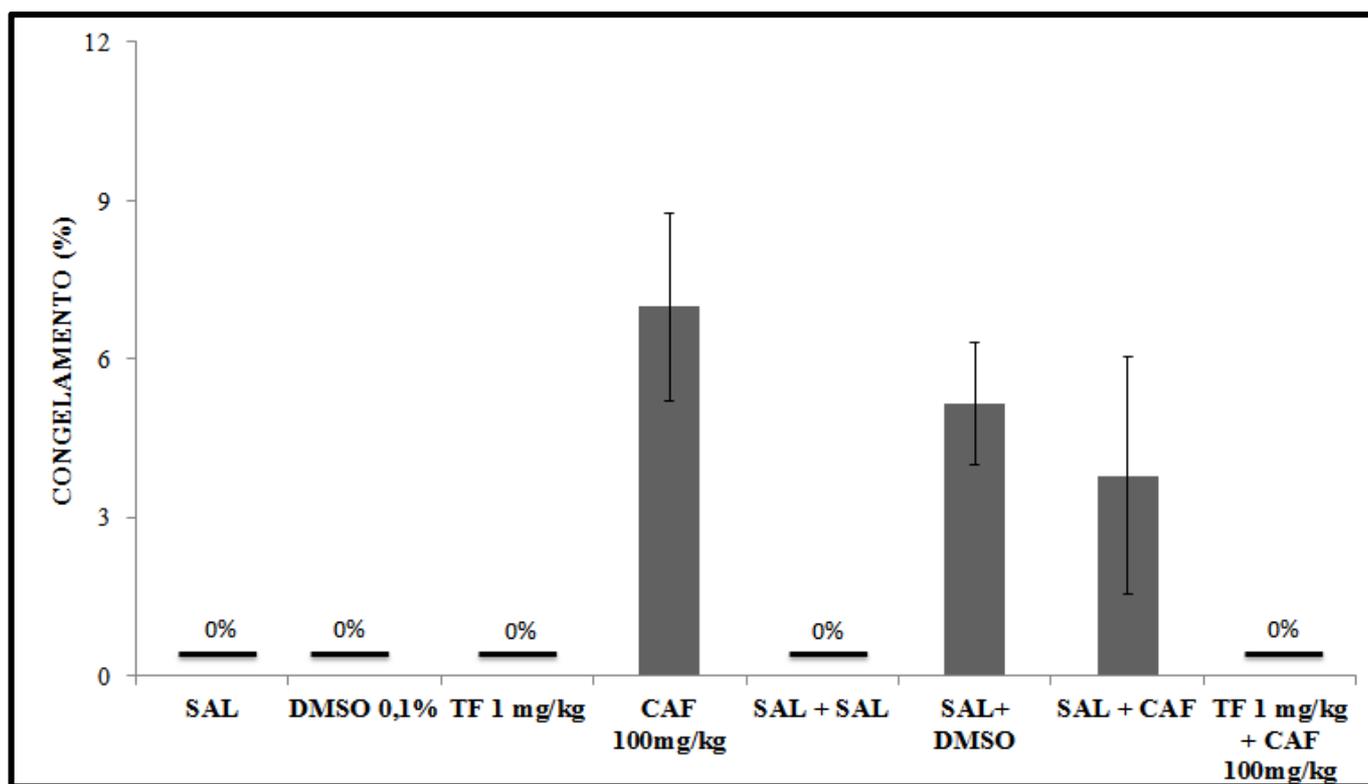


Figura 16: O efeito do α -tocoferol no comportamento tipo ansiedade avaliado através do parâmetro de congelamento no ambiente claro utilizando o teste escotácico. Foi aplicado como teste estatístico ANOVA uma via com pós-teste *Tukey*. Não houve diferença estatística entre os grupos que apresentaram o comportamento. Os dados foram expressos em média \pm erro padrão.

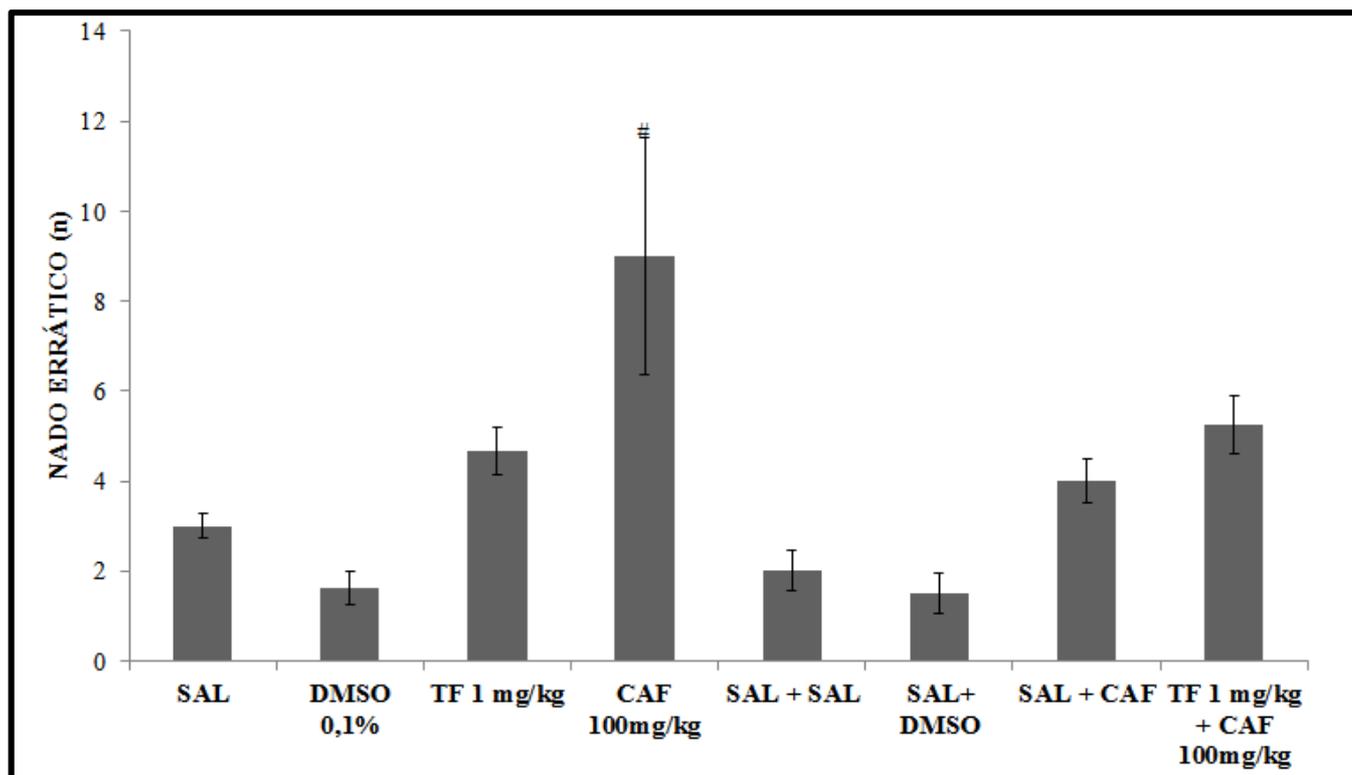


Figura 17: O efeito do α -tocoferol no comportamento tipo ansiedade avaliado através do parâmetro de nado errático no ambiente claro utilizando o teste escotáxico. Foi aplicado como teste estatístico ANOVA uma via com pós-teste *Tukey*. Houve diferença estatística do grupo CAF em relação ao SAL com $\#p < 0,05$ e não houve diferença estatística entre o grupo TF 1 mg/kg e SAL e entre o grupo TF 1 mg/kg + CAF 100 mg/kg e os grupos controle (SAL e SAL + SAL). Os dados foram expressos em média \pm erro padrão.

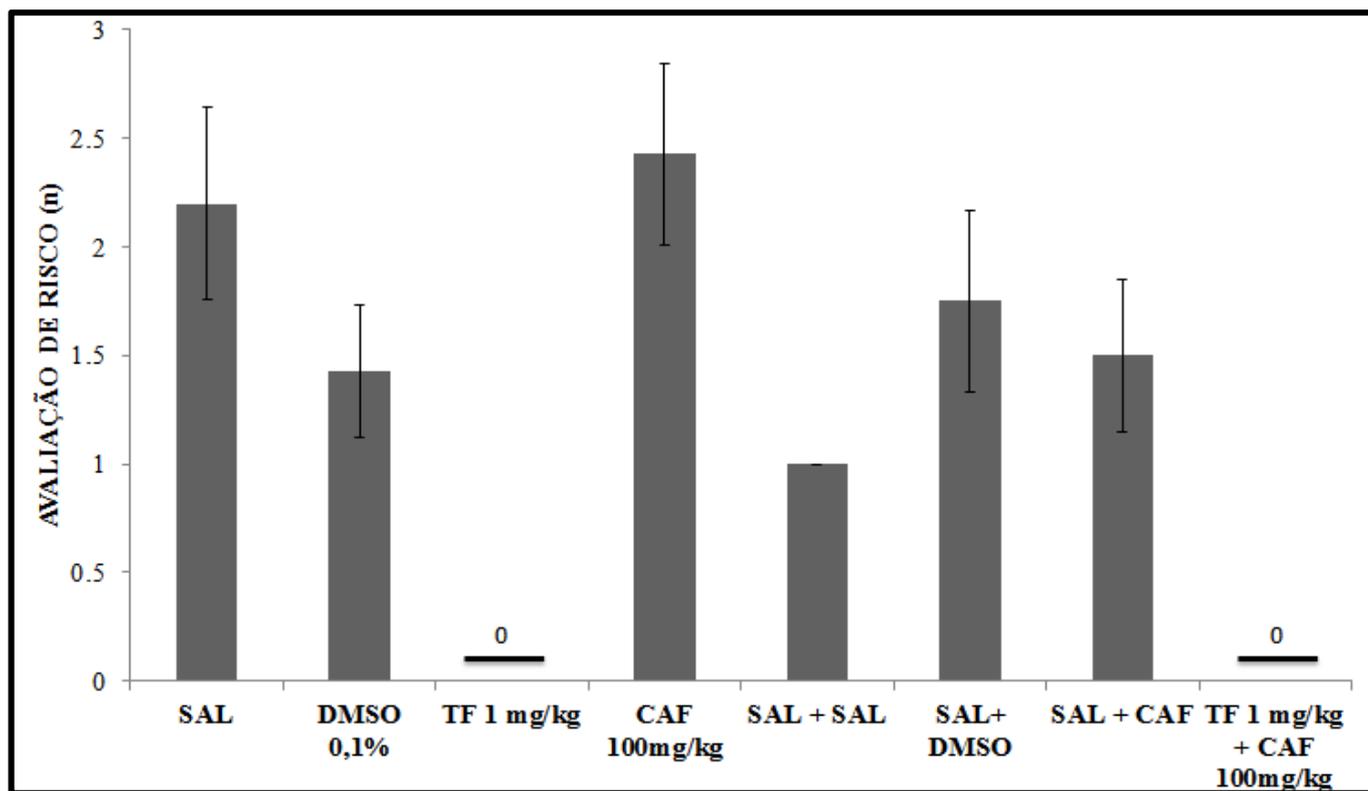


Figura 18: O efeito do α -tocoferol no comportamento tipo ansiedade avaliado através do parâmetro de avaliação de risco utilizando o teste escotático. Foi aplicado como teste estatístico ANOVA uma via com pós-teste *Tukey*, não houve diferença estatística entre os grupos avaliados. Os dados foram expressos em média \pm erro padrão.

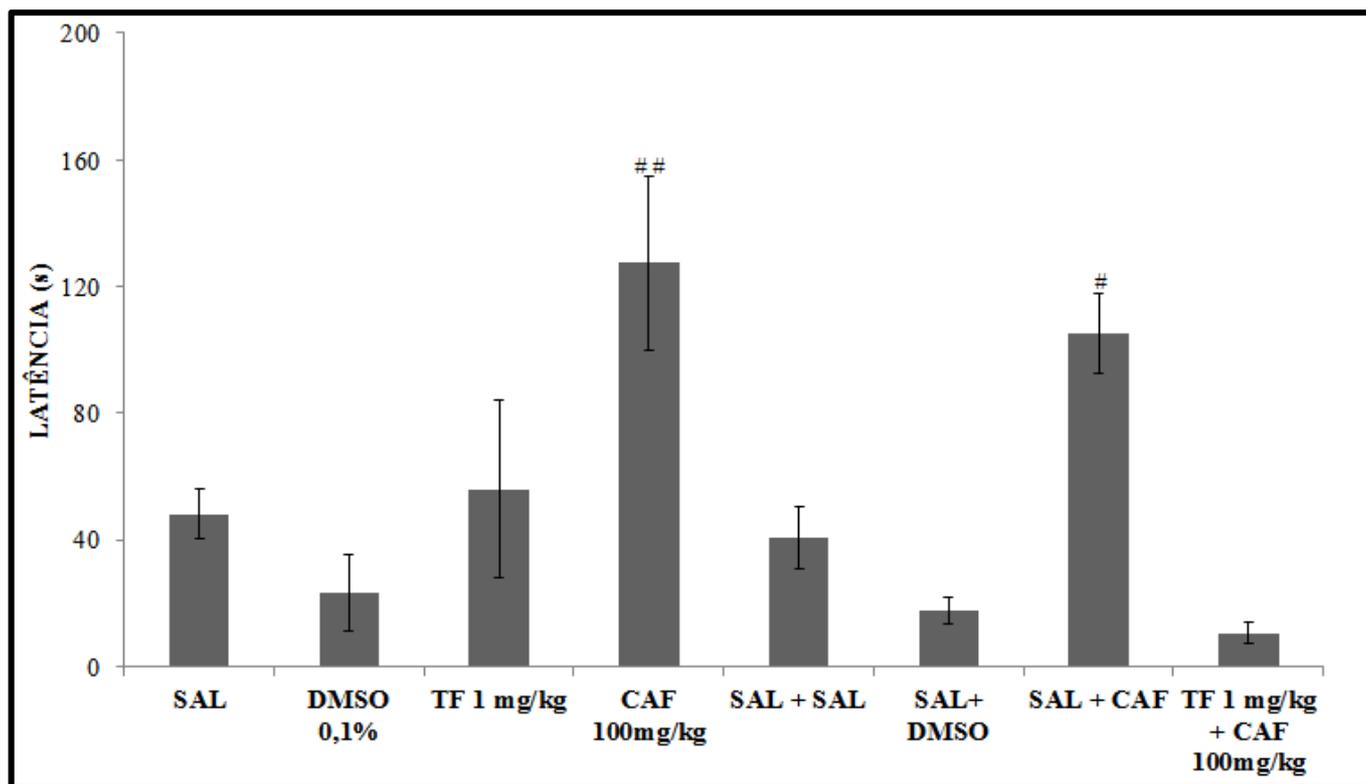


Figura 19: O efeito do α -tocoferol no comportamento tipo ansiedade avaliado através do parâmetro de latência de saída para o compartimento branco utilizando o teste escotático. Foi aplicado como teste estatístico ANOVA uma via com pós-teste *Tukey*. Houve diferença estatística do grupo CAF em relação ao grupo SAL com $##p < 0,05$, do grupo SAL+CAF em relação ao grupo SAL + SAL com $\#p < 0,05$ e não houve diferença estatística entre o grupo TF 1 mg/kg + CAF 100 mg/kg e os grupos controle (SAL e SAL + SAL). Os dados foram expressos em média \pm erro padrão.

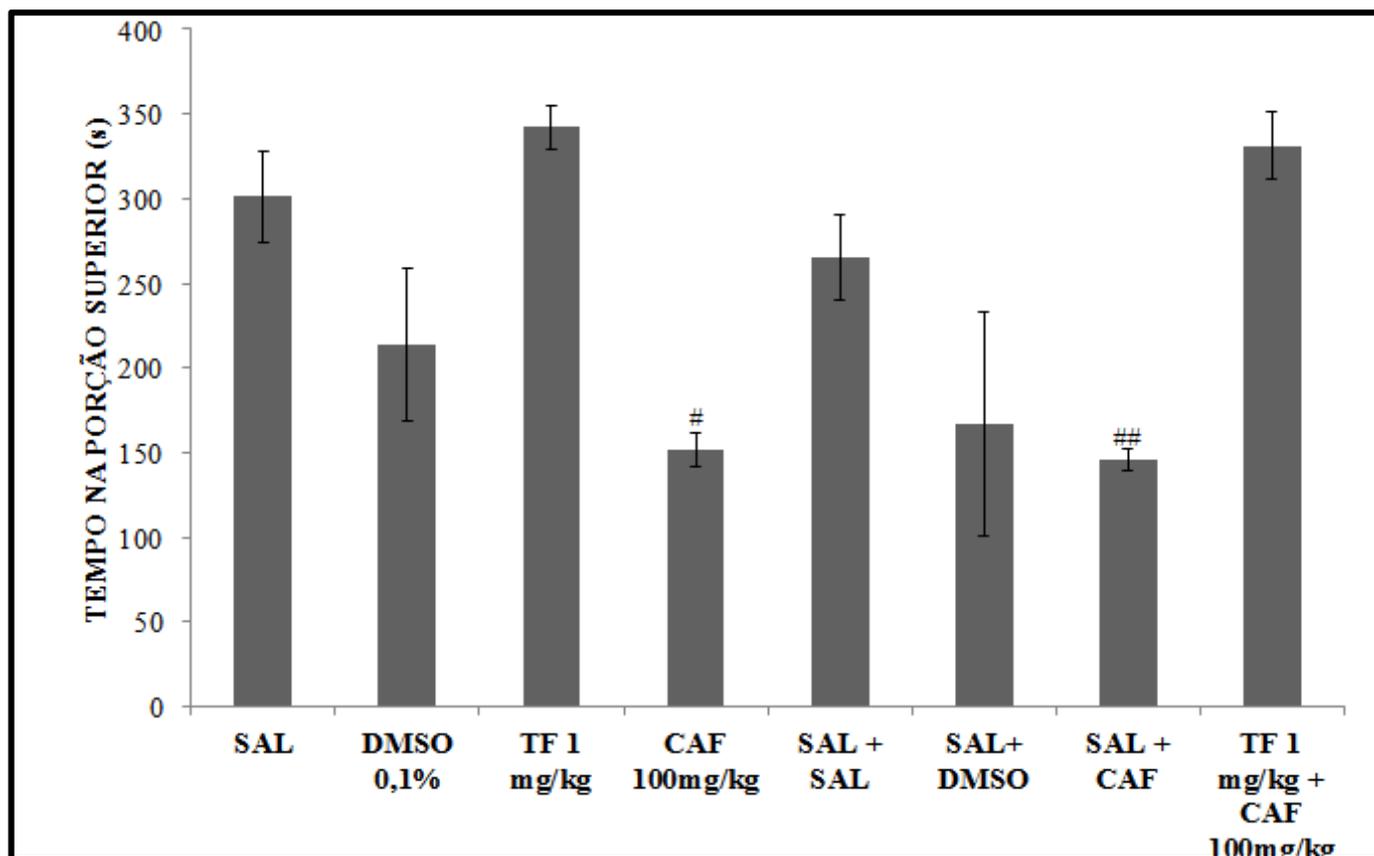


Figura 20: O efeito do α -tocoferol no parâmetro de tempo na porção superior utilizando o DVN. Foi aplicado como teste estatístico ANOVA uma via com pós-teste *Tukey*. Houve diferença estatística do grupo CAF em relação ao controle SAL com # $p < 0,05$; do SAL + CAF em relação ao grupo SAL + SAL com ## $p < 0,05$ e não houve diferença entre o grupo TF 1 mg/kg + CAF e os grupos controle (SAL e SAL + SAL). Os dados foram expressos em média \pm erro padrão.

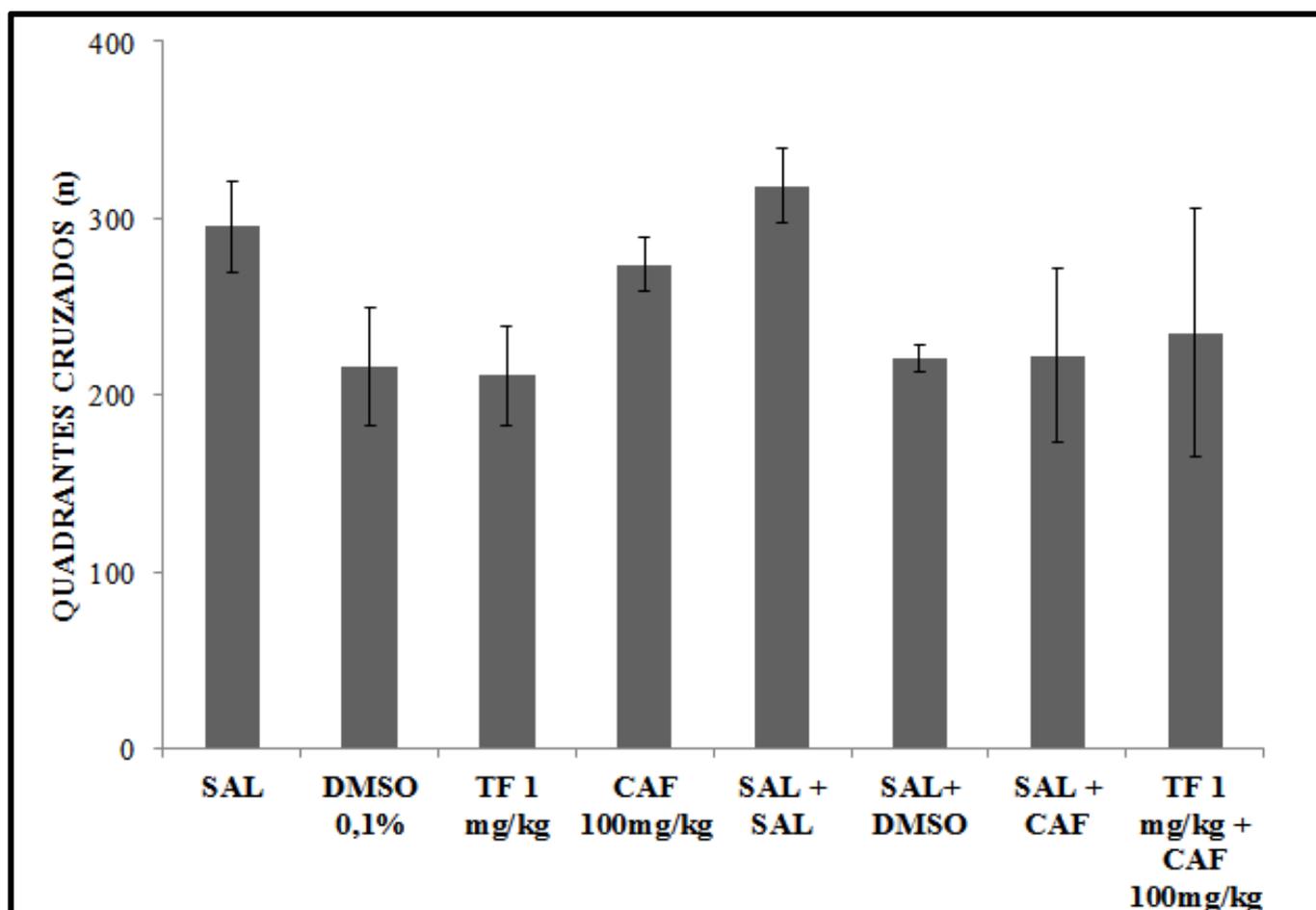


Figura 21: O efeito do α -tocoferol na atividade locomotora avaliada a partir de quadrantes cruzados na porção superior utilizando o teste DVN. Foi aplicado como teste estatístico ANOVA uma via com pós-teste *Tukey*. Não houve diferença estatística entre os grupos avaliados. Os dados foram expressos em média \pm erro padrão.

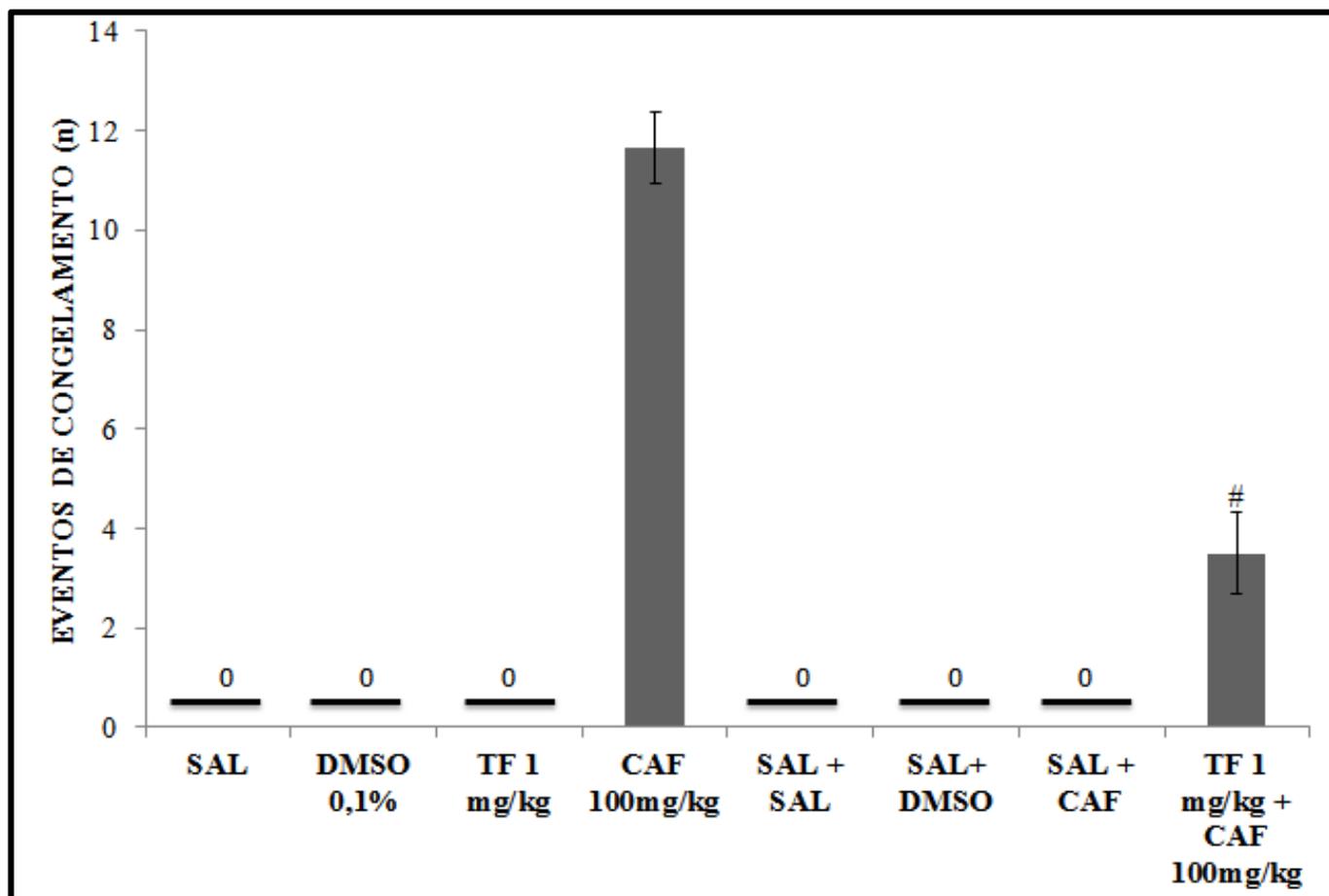


Figura 22: O efeito do α -tocoferol no parâmetro de números de eventos do comportamento de congelamento no teste de DVN. Foi aplicado como teste estatístico ANOVA uma via com pós-teste *Tukey*. Houve diferença estatística do grupo TF 1 mg/kg + CAF em relação ao controle CAF com # $p < 0,05$. Os dados foram expressos em média \pm erro padrão.

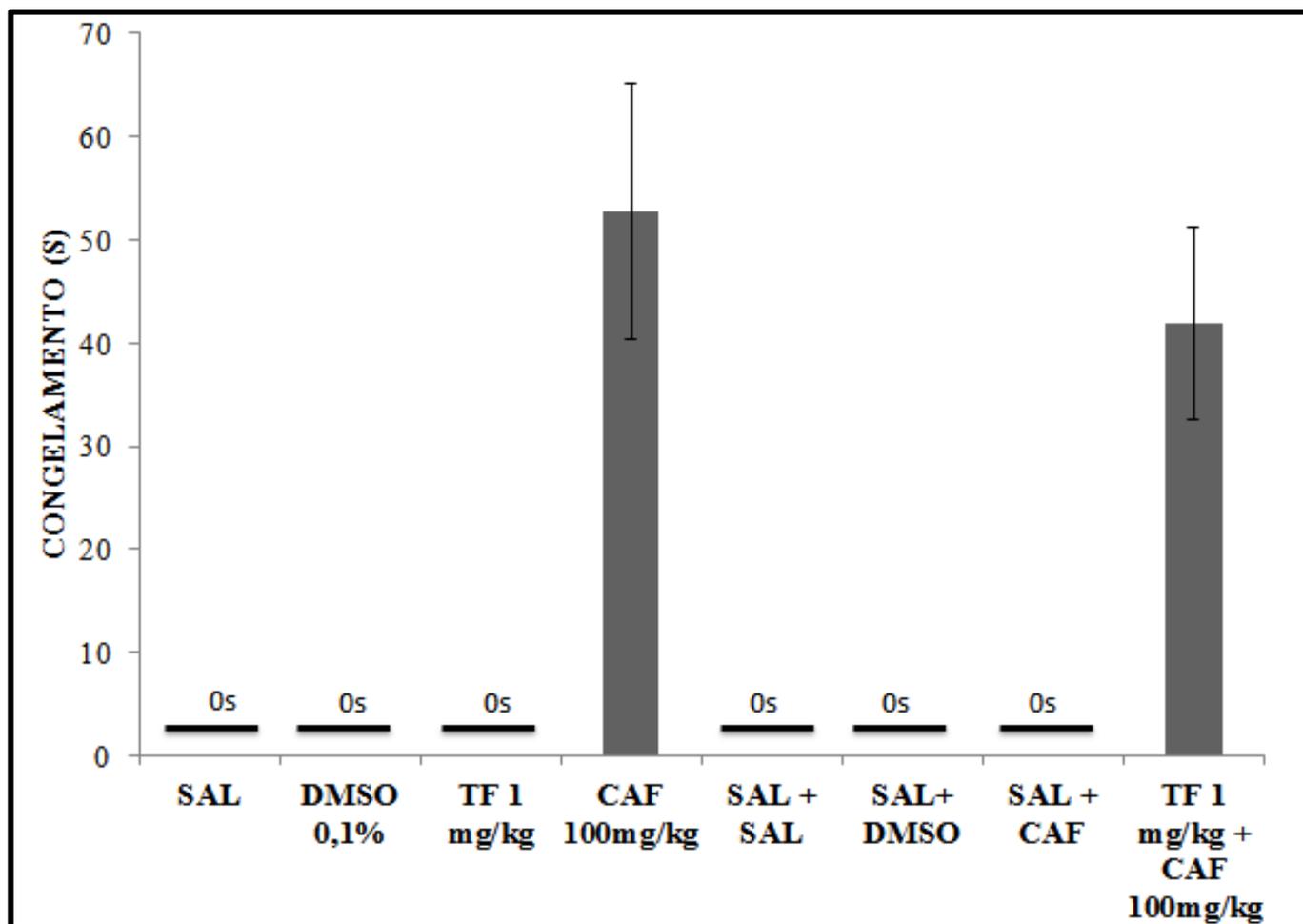


Figura 23: O efeito α -tocoferol no comportamento tipo ansiedade avaliado no parâmetro de tempo de congelamento utilizando o teste DVN. Foi aplicado como teste estatístico ANOVA uma via com pós-teste *Tukey*. Não houve diferença estatística entre os grupos avaliados. Os dados foram expressos em média \pm erro padrão.

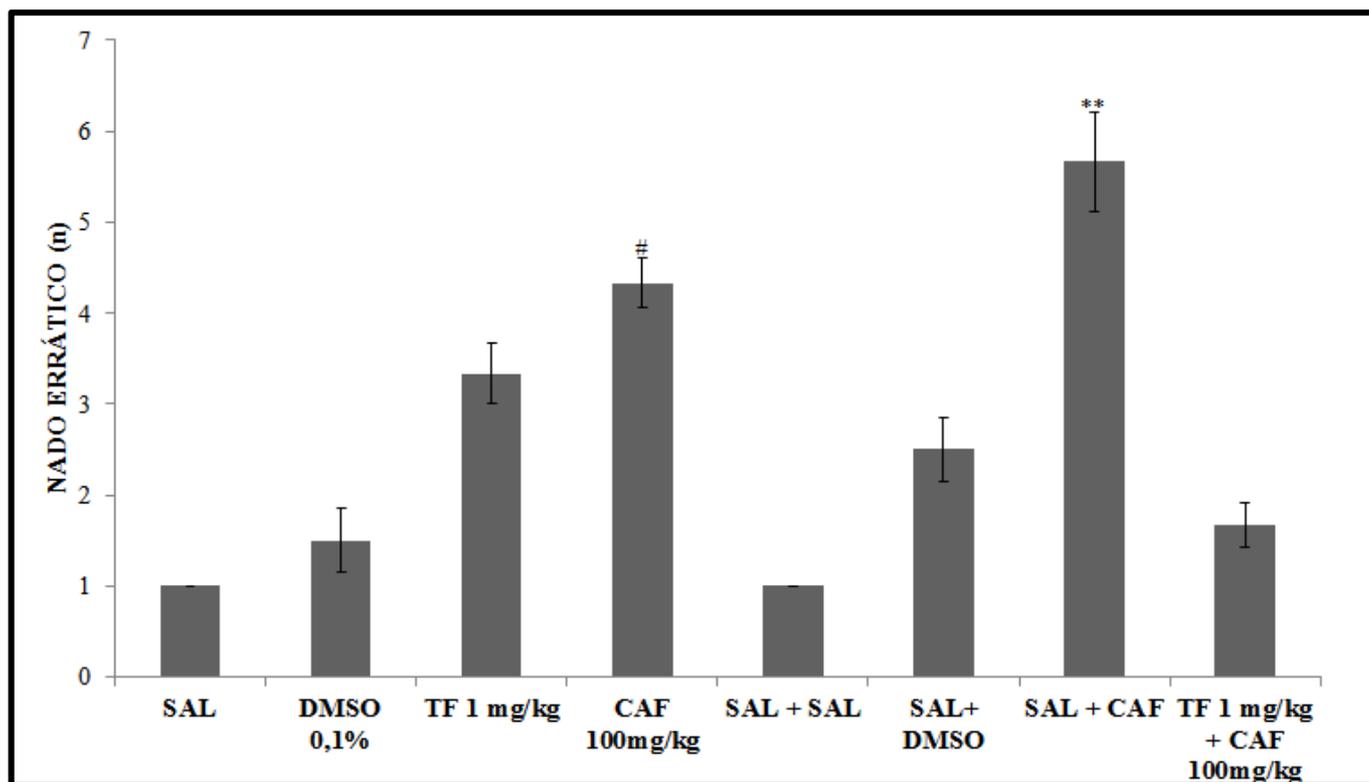


Figura 24: O efeito α -tocoferol no comportamento tipo ansiedade avaliado no parâmetro de número de eventos de nados erráticos utilizando o teste DVN. Foi aplicado como teste estatístico ANOVA uma via com pós-teste *Tukey*. Houve diferença estatística do grupo CAF em relação ao controle SAL com # $p < 0,01$, do grupo SAL + CAF 100 mg/kg em relação o grupo SAL + SAL com ** $p < 0,05$ e não houve diferença estatística entre o grupo TF 1mg/kg e o grupo controle salina e TF 1 mg/kg + CAF e os grupo controles (SAL e SAL + SAL) . Os dados foram expressos em média \pm erro padrão.

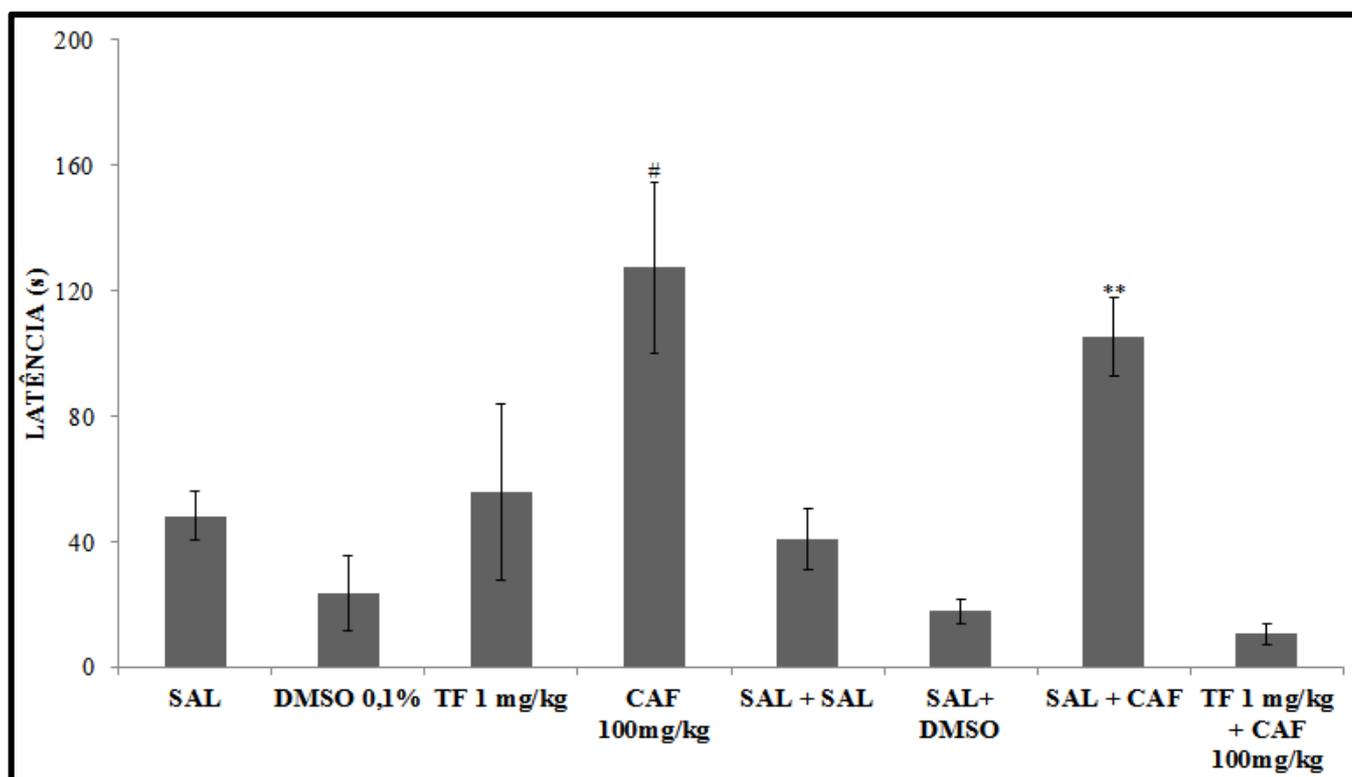


Figura 25: O efeito α -tocoferol no comportamento tipo ansiedade avaliado no parâmetro de latência de saída para porção superior utilizando o teste DVN. Foi aplicado como teste estatístico ANOVA uma via com pós-teste *Tukey*. Houve diferença estatística do grupo CAF em relação ao controle SAL com # $p < 0,05$, do grupo SAL + CAF 100 mg/kg em relação o grupo SAL + SAL com ** $p < 0,05$ e não houve diferença estatística entre o grupo TF 1mg/kg e o grupo salina e TF 1 mg/kg + CAF e os grupo controles (SAL e SAL + SAL). Os dados foram expressos em média \pm erro padrão.

4.2 INIBIÇÃO NITRÉRGICA INDUZ BLOQUEIO NO COMPORTAMENTO TIPO ANSIEDADE AVALIADO NO TESTE ESCOTÁXICO EM ZEBRAFISH.

Nossos resultados referentes ao teste escotático demonstraram que os animais tratados com L-NAME na dose de 10 mg/kg ($62,59 \pm 9,72\%$) não apresentaram diferença estatística ($F= 0,0371$; $p>0,05$) em relação ao grupo controle (SAL= $62,23 \pm 10,77\%$). O cotratamento do inibidor da enzima NOS (L-NAME) com cafeína (L-NAME + CAF= $41,274 \pm 3,98\%$) gerou uma bloqueio total na diminuição do tempo dispendido no compartimento branco induzido pela cafeína, uma vez que os animais cotratados não apresentaram diferença ($F= 1,7172$; $p>0,05$) no tempo dispendido no compartimento branco quando comparado ao grupo controle (SAL= $62,24 \pm 11,71\%$) (Figura 26)

Os resultados demonstraram que não houve diferença ($F= 0,4844$; $p>0,05$) no número de quadrantes cruzados entre os grupos avaliados, comprovando que os tratamentos não alteraram a atividade locomotora dos animais (Figura 27).

Em relação ao parâmetro tigmotático observamos ausência desse comportamento no grupo tratado com L-NAME na dose de 10 mg/kg, assim como nos grupos controle. Por outro lado, os animais que receberam o cotratamento com L-NAME e cafeína (L-NAME 10 mg/kg + CAF= $5,77 \pm 0,53\%$) apresentaram um elevado percentual de tempo em comportamento tigmotático, semelhante ao grupo cafeína, sugerindo que o cotratamento não bloqueou esse efeito (Figura 28).

Quanto ao parâmetro de congelamento, demonstramos que os animais tratados com L-NAME não apresentaram esse comportamento, semelhantemente aos grupos controle. Os animais cotratados com L-NAME e cafeína (L-NAME 10 mg/kg + CAF) também apresentaram ausência de congelamento, portanto, esse resultado sugere que o L-NAME gerou uma bloqueio total do efeito gerado pela cafeína no tempo de congelamento (Figura 29).

Em relação ao parâmetro de nado errático demonstramos que não houve diferença estatística entre o grupo tratado com L-NAME (L-NAME= $3,5 \pm 0,2$) e o grupo controle (SAL= $3 \pm 0,28$). Porém, os animais que receberam o cotratamento de L-NAME com cafeína (L-NAME 10 mg/kg + CAF= 0) não apresentaram eventos de nado errático, sugerindo que o cotratamento bloqueou totalmente o aumento no número de eventos de nado errático induzido pela cafeína (Figura 30).

Quanto ao parâmetro de avaliação de risco demonstramos que nenhum dos tratamentos alterou esse parâmetro (Figura 31).

A latência de saída para o compartimento branco não diferiu ($F=0,4154$; $p>0,05$) entre o grupo tratado com L-NAME ($39,82\pm 11,16s$) e o grupo controle ($SAL= 48,2 \pm 7,8s$). O grupo cotratado (L-NAME 10 mg/kg + CAF= $36,66\pm 7,09s$) não apresentou diferença ($F=0,5255$; $p>0,05$) na latência de saída para o compartimento branco em relação ao grupo controle ($SAL= 48,2 \pm 7,8s$), sugerindo que o cotratamento bloqueou totalmente o aumento na latência induzido pela cafeína (Figura 32).

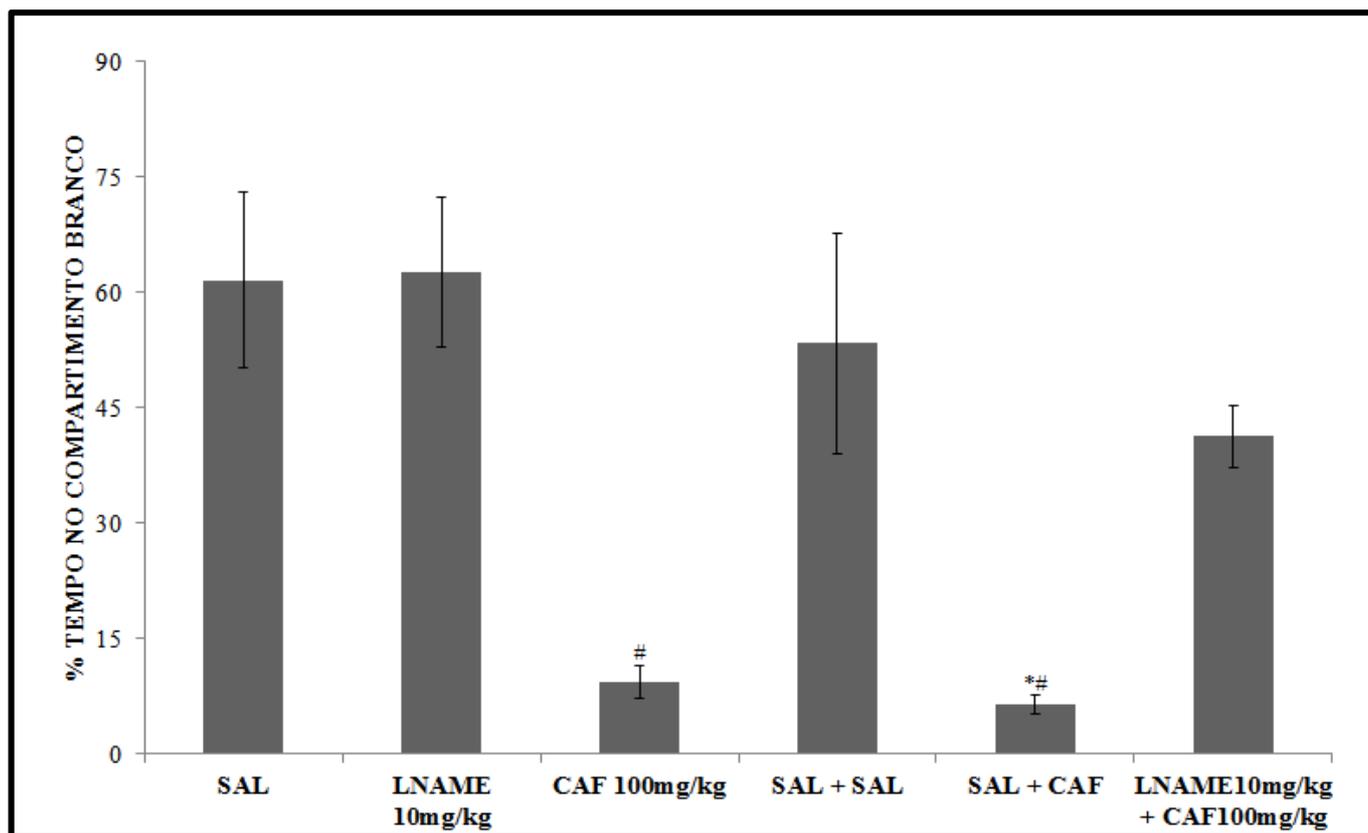


Figura 26: O efeito do L-NAME no parâmetro de tempo no ambiente claro utilizando teste escotático. Foi aplicado como teste estatístico ANOVA uma via com pós-teste *Tukey*. Houve diferença estatística do grupo CAF em relação ao controle SAL com $\#p < 0,05$; do grupo SAL + CAF em relação ao grupo SAL + SAL com $*\#p < 0,05$ e não houve diferença estatística entre o grupo L-NAME e o grupo controle SAL e entre o grupo L-NAME 10 mg/kg + CAF 100 mg/kg e os grupos controles SAL e SAL + SAL. Os dados foram expressos em média \pm erro padrão.

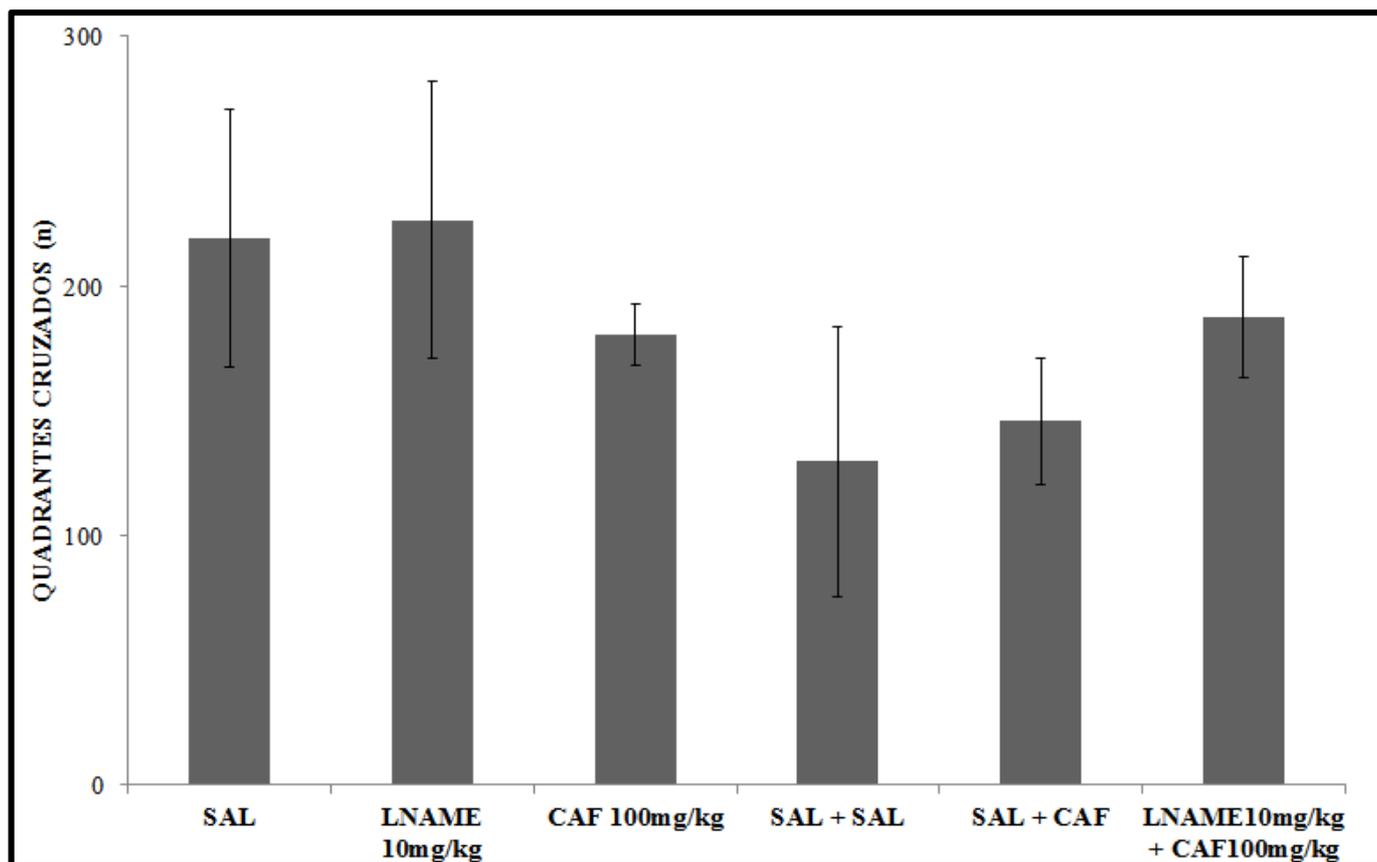


Figura 27: O efeito do L-NAME na atividade locomotora avaliada a partir de quadrantes cruzados no ambiente claro utilizando o teste escotático. Foi aplicado como teste estatístico ANOVA uma via com pós-teste *Tukey*. Não houve diferença estatística entre os grupos. Os dados foram expressos em média \pm erro padrão.

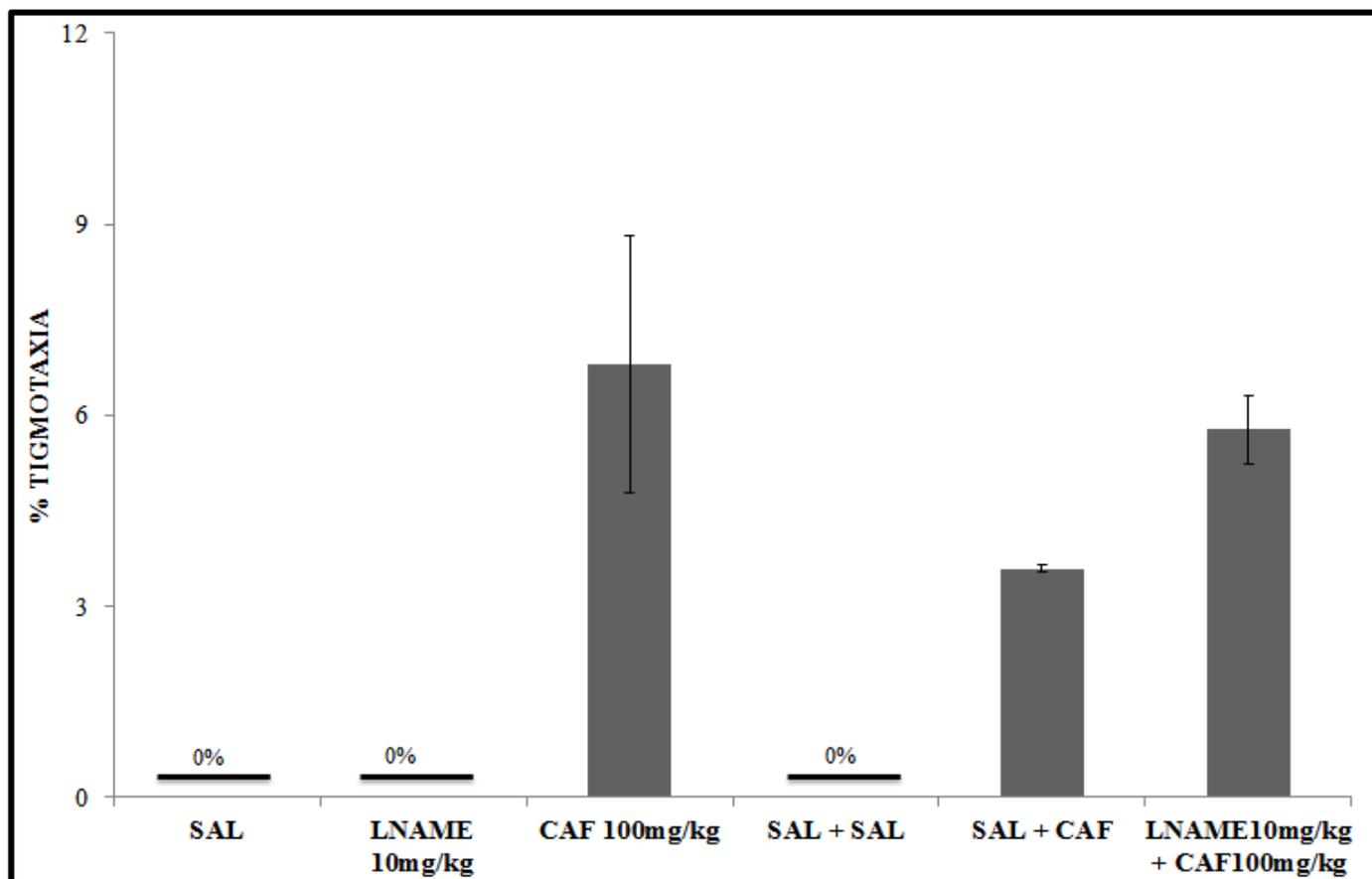


Figura 28: O efeito do L-NAME no comportamento tipo ansiedade avaliado pelo parâmetro de Tigmotaxia no ambiente claro utilizando o teste escotático. Foi aplicado como teste estatístico ANOVA uma via com pós-teste *Tukey*. Não houve diferença estatística entre os grupos. Os dados foram expressos em média \pm erro padrão.

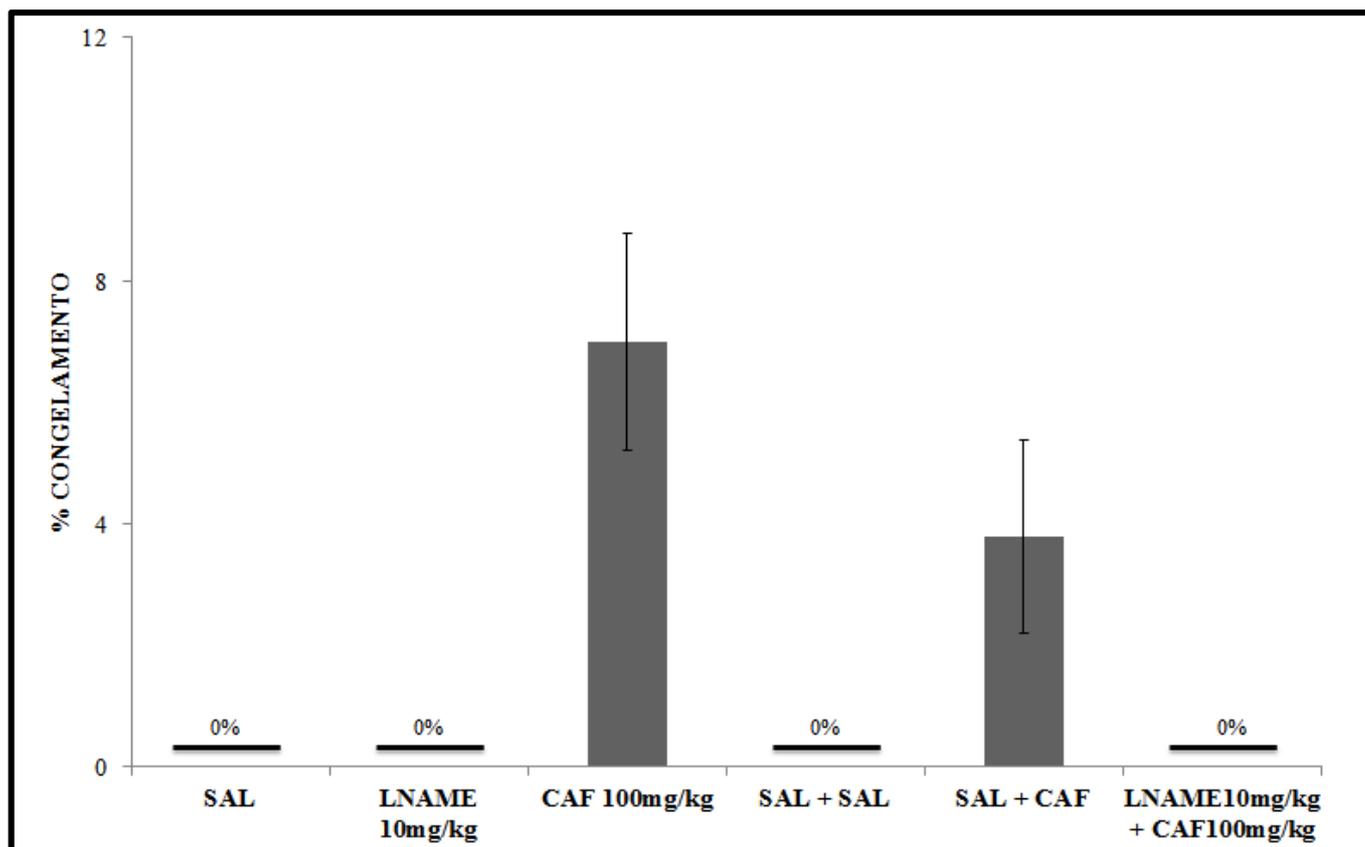


Figura 29: O efeito do L-NAME no comportamento tipo ansiedade avaliado pelo parâmetro de tempo em congelamento no ambiente claro utilizando o teste escotáxico. Foi aplicado como teste estatístico ANOVA uma via com pós-teste *Tukey*. Não houve diferença estatística entre os grupos, visto que somente os grupos tratados com cafeína apresentaram esse comportamento. Os dados foram expressos em média \pm erro padrão.

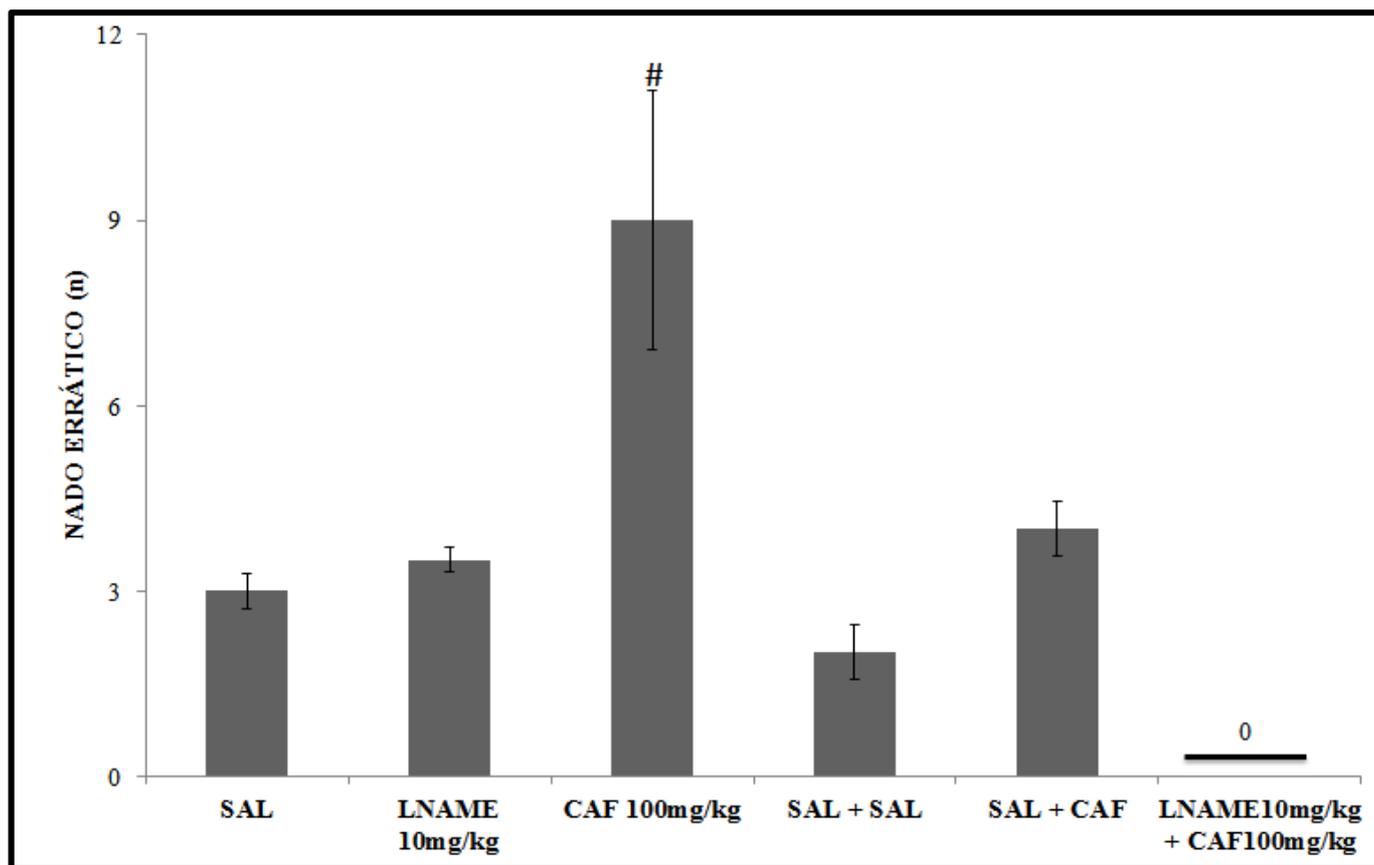


Figura 30: O efeito do L-NAME no comportamento tipo ansiedade avaliado pelo parâmetro de nado errático no ambiente claro utilizando o teste escotático. Foi aplicado como teste estatístico ANOVA uma via com pós-teste *Tukey*. Houve diferença estatística apenas entre o grupo CAF 100 mg/kg e o grupo SAL com $\#p < 0,05$, não houve diferença entre o grupo L-NAME e o grupo salina. Os dados foram expressos em média \pm erro padrão.

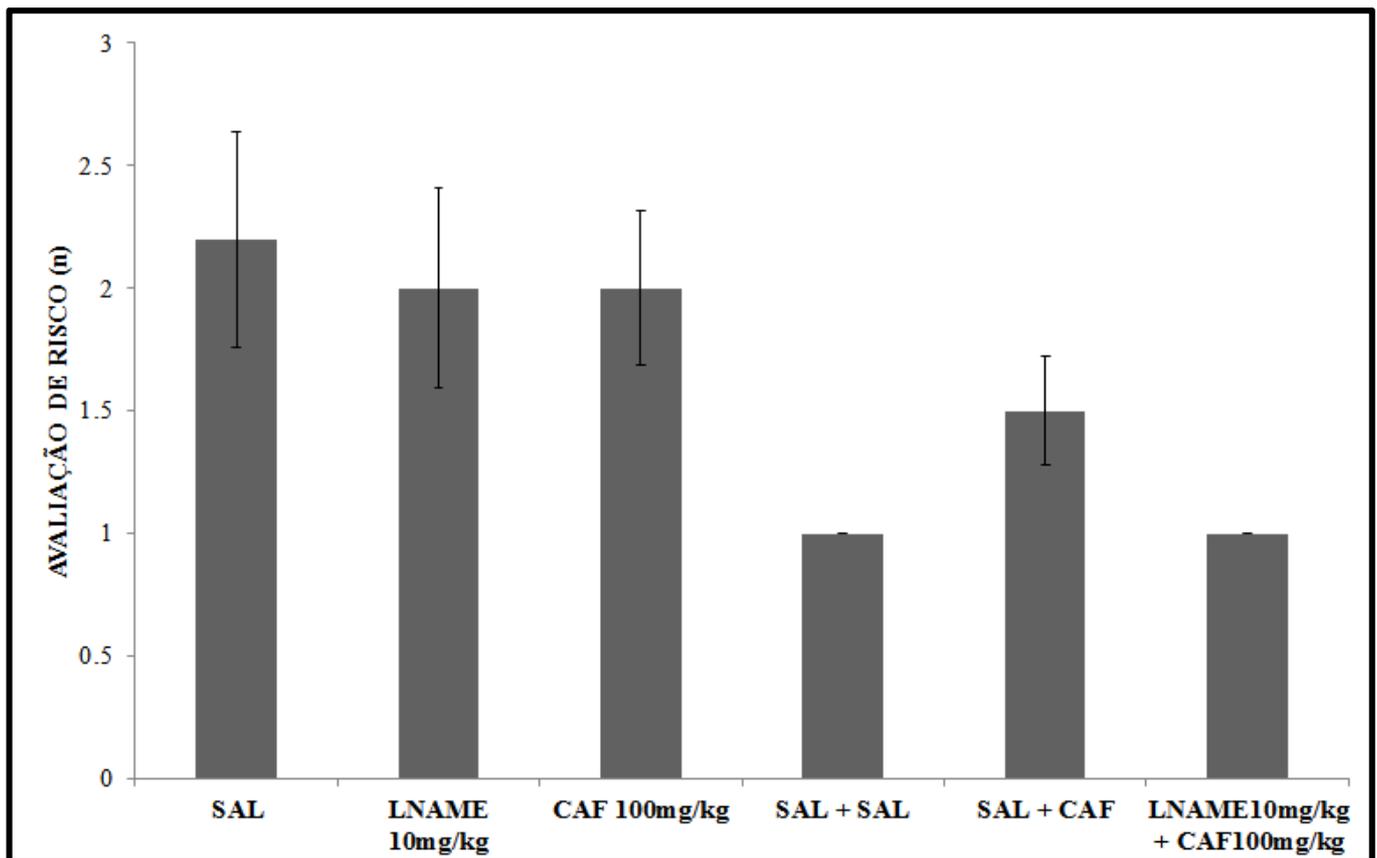


Figura 31: O efeito do L-NAME no comportamento tipo ansiedade avaliado pelo parâmetro de avaliação de risco utilizando o teste escotáxico. Foi aplicado como teste estatístico ANOVA uma via com pós-teste *Tukey*. Não houve diferença estatística entre os grupos. Os dados foram expressos em média \pm erro padrão.

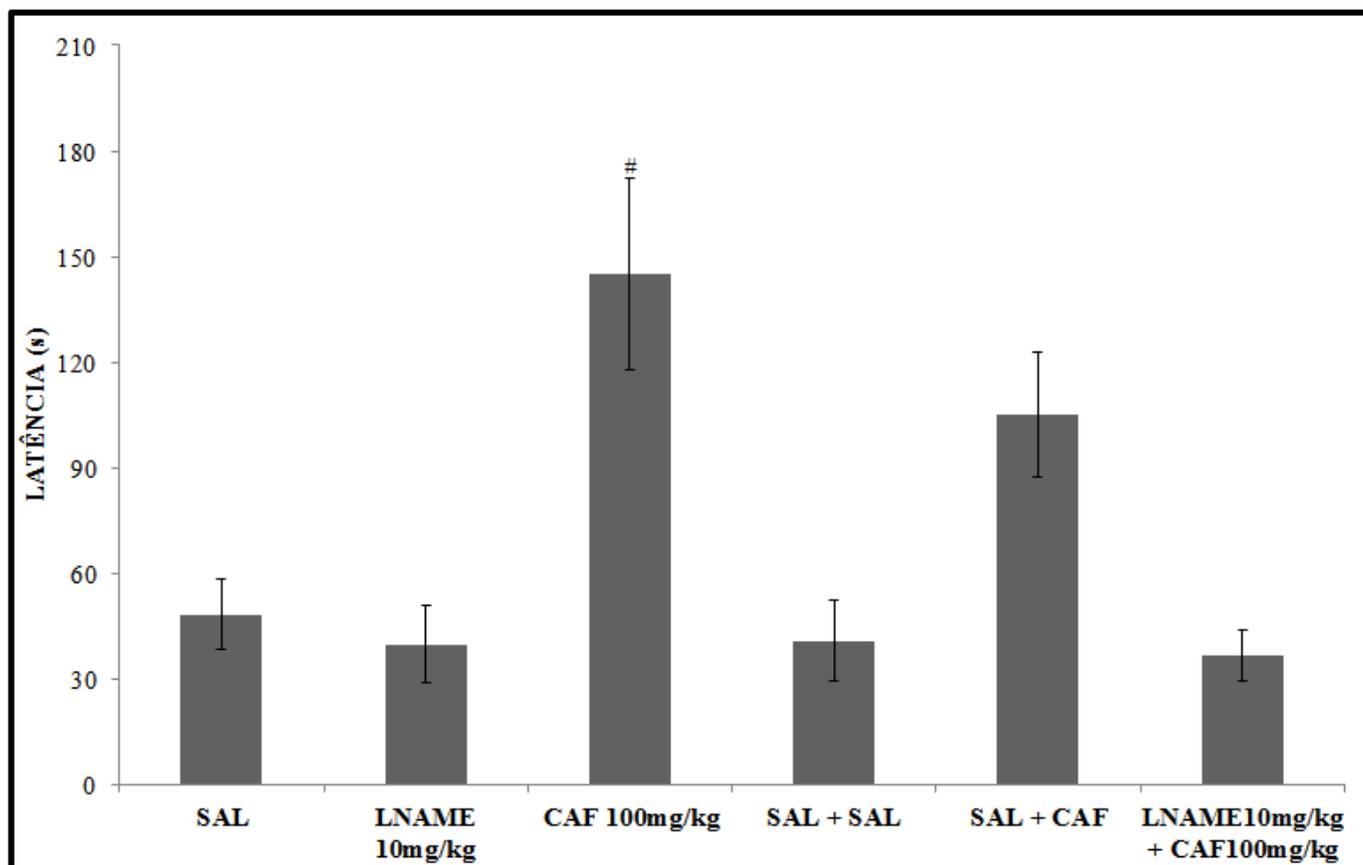


Figura 32: O efeito LNAME no comportamento tipo ansiedade avaliado no parâmetro de latência de saída para o compartimento claro utilizando o teste escotático. Foi aplicado como teste estatístico ANOVA uma via com pós-teste *Tukey*. Houve diferença estatística do grupo CAF em relação ao controle SAL com # $p < 0,05$ e não houve diferença estatística entre o grupo L-NAME 10 mg/kg e o controle e também não houve diferença entre o grupo LNAME 10 mg/kg + CAF 100 mg/kg com os grupos controle (SAL e SAL + SAL). Os dados foram expressos em média \pm erro padrão.

5 DISCUSSÃO

Os dados do presente estudo indicaram que a cafeína potencializou o comportamento tipo ansiedade gerado pelo teste de preferência claro/escuro (PCE) e o teste de distribuição vertical eliciada pela novidade (DVN). Esse efeito é característico de tratamentos com drogas ansiogênicas como substância de alarme (substâncias subtraídas de células da epiderme da própria espécie e que induz respostas defensivas em coespecíficos), doses sub-convulsivantes de pentilenotetrazol ou cafeína e que resultam em uma ineficiente exploração da porção aversiva (WONG; et al, 2010).

Portanto, em consonância com os dados da literatura nós demonstramos que o efeito dessa indução farmacológica foi diminuir o tempo de exploração no ambiente claro do teste PCE (Figura 8A) e na porção superior do DVN (Figura 11A) e essa baixa interação com o ambiente aversivo indica que a dose de 100 mg/kg de cafeína utilizada potencializa a ansiogênese. Esse efeito foi confirmando com os dados obtidos nos demais etogramas, nos quais a exploração dos animais tratados com cafeína no compartimento aversivo em ambos os testes foi marcada por comportamentos centrofóbicos (preferência pela periferia do aquário, Figura 9A), por elevados episódios de congelamento (Figura 9B), movimentos natatórios desordenados (Figura 9C e 12C) e elevada latência de saída para exploração do compartimento aversivo (Figura 10 e Figura 12D).

Essa preferência pelo ambiente escuro ampliada pela cafeína foi semelhante ao resultado obtido por Maximino e colaboradores (2011), que identificaram que a cafeína na dose de 100 mg/kg elevava o comportamento tipo ansiedade gerado pelo teste escotático, uma vez que os animais pouco exploraram o ambiente aversivo. Esse efeito foi acompanhado pelo aumento do índice de melanóforos (resposta de camuflagem como uma reação de defesa substrato-dependente) e mediado especificamente pelo bloqueio do receptor A1. Portanto, a partir desse resultado obtido por Maximino e colaboradores (2011) nós pudemos inferir que os efeitos comportamentais gerados pela cafeína em zebrafish, ocorrem via bloqueio do receptor A1 como assim já foi descrito em humanos e roedores, sendo esse o receptor especificamente responsável pela modulação das respostas comportamentais e autonômicas diferentemente do A2 que parece está envolvido com as respostas locomotoras (Oshima; Yamaji; Fuji, 1986; Fredholm; et al, 1999; Prediger; et al, 2006). No entanto, Maximino e colaboradores

(2011) analisaram apenas o parâmetro de permanência no ambiente aversivo do teste escotático, logo, o presente estudo além de ter reproduzido esse resultado, também demonstrou nos demais etogramas gerados pelo teste PCE que a cafeína alterou as respostas dos animais, ampliando o comportamento tipo ansiedade.

Além disso, Bradley e colaboradores (2011) demonstraram que roedores também apresentam essa tendência de busca pelo compartimento escuro no teste caixa claro/escuro após administração de cafeína. Assim como, Yacoubi e colaboradores (2000) evidenciaram que esse mesmo efeito foi observado tanto em tratamento agudo quanto crônico utilizando altas doses de cafeína (100 mg/kg), ratificando que os efeitos comportamentais da cafeína estão diretamente relacionados à dose. Também foi possível identificar, ainda em roedores, que todos antagonistas adenosinérgicos derivados de xantinas (cafeína, teofilina, 8-fenilteofilina e 8-ciclopentil-1,3-dipropil-xantina) induziam o mesmo perfil de resposta quanto elevar a preferência pelo ambiente escuro (IMAIZUMI; MIYAZAKI; ONODERA; 1994).

O elevado comportamento tigmotático dos animais tratados com cafeína foi um dado importante observado em nosso estudo. Esse comportamento de centrofobia é uma resposta preditiva do comportamento tipo ansiedade, caracterizada pela busca de uma porção protegida no aparato e que é potencializado por tratamento com drogas ansiogênicas, portanto, nós reproduzimos esse efeito no presente trabalho, e conseguimos corroborar com outros estudos utilizando roedores (Frussa-filho; 2000), peixes (Maximino; et al, 2011) e também ensaios realizados com larva de zebrafish, sendo que especialmente para esse último modelo experimental, o comportamento de tigmotaxia é a principal medida de avaliação do comportamento tipo ansiedade (RICHENDRFER; et al, 2012; SCHNÖRR; et al, 2012).

Além disso, a inibição comportamental (congelamento) e os episódios de nado erráticos aumentados pela cafeína em ambos os testes realizado no presente estudo, refletem segundo Kalueff e colaboradores (2013) um elevado grau de ansiedade em zebrafish. Nesse sentido, a elevada frequência desses comportamentos indica que a aversividade do ambiente impede que o animal explore-o normalmente. Nossos dados do comportamento de congelamento estão em consonância com outros trabalhos, que identificaram esse comportamento a partir da exposição a um contexto ansiogênico (PCE, DVN, LCE, campo aberto, teste do nado forçado) ou após manipulações farmacológicas que induzam o comportamento tipo ansiedade em diferentes espécies (Egan; et al, 2009; Stewart; et al, 2011; Cachat; et al 2013; Kyzar; et al, 2013; Assis;

2014). Assim como, o aumento no número de eventos de nado erráticos em zebrafish é característico de manipulações farmacológicas que induzem o comportamento tipo ansiedade como reserpina, anfetamina, substância de alarme e pentilenotetrazol(EGAN; et al, 2009; STEWART; et al, 2011; KYZAR; et al, 2013).

Quanto ao parâmetro de latência de saída para explorar o compartimento aversivo, demonstramos através de nossos dados que os grupos tratados com cafeína apresentavam uma maior hesitação em explorar o ambiente aversivo em ambos os testes avaliados e essa tendência revela a preferência desses animais por se manter no ambiente considerado seguro por mais tempo. Portanto, os animais tratados com cafeína não exploraram como os demais grupos o ambiente aversivo, e esse comportamento é muito comum em animais que são tratados com drogas potencialmente ansiogênicas. Nesse contexto, nossos dados corroboram com os dados obtidos por Egan e colaboradores (2009) e Cachat e colaboradores (2013) que demonstraram elevada latência quando expuseram os peixes (*Danio rerio*) com substância de alarme e cafeína, respectivamente.

Adicionalmente, a amplificação do comportamento tipo ansiedade gerada pela cafeína no teste DVN em nosso estudo, foi semelhante aos resultados obtidos por Egan e colaboradores (2009), cuja forma de administração da cafeína foi diluição na água utilizando a concentração de 100 mg/l e os animais foram expostos por 5 minutos e essa exposição aguda já foi considerada uma manipulação experimental potencialmente ansiogênica. Em outro estudo, Cachat e colaboradores (2013), também administraram na água uma concentração de 250 mg/l de cafeína e observaram que os níveis de cortisol estavam elevados e os animais diminuía consideravelmente a locomoção e a velocidade de nado no aparato, ou seja, já foi possível verificar não somente alterações comportamentais quanto locomotoras em zebrafish expostos a essa concentração de cafeína.

Outro dado interessante, é que em termos de comportamento geotáxico positivo ampliado por cafeína, à literatura já identificou que esse efeito não ocorre somente em zebrafish adulto, mas também pode ser demonstrado em larvas, por variações de luminosidade ambiental que induzem a uma tendência dessas larvas a buscar o fundo do poço (Richendrfer; et al, 2012). Assim como foi demonstrado por Rana e colaboradores (2010) que zebrafish desde as fases iniciais da vida apresentam não somente alterações comportamentais em decorrência do tratamento com elevadas concentrações de cafeína,

mas também pode aumentar a frequência cardíaca, sendo esta uma alteração preditiva do comportamento tipo ansiedade.

Portanto, os nossos resultados reforçam os dados na literatura que já indicavam uma ansiogênese ampliada por cafeína em zebrafish, efeito semelhante ao que já foi reportado em humanos após elevado consumo (Childs; et al, 2008) e em roedores após administração de elevadas doses (El Yacoubi; et al, 2000; Sudakov; et al, 2001). Por isso essa droga tem sido largamente utilizada como um modelo de amplificação do comportamento tipo ansiedade em diferentes espécies (BALDWIN; FILE, 1989; SILVA; FRUSSA-FILHO, 2000; JAIN; HIRANI; CHOPDE, 2005; PARK ; et al 2010).

O uso da cafeína nesse modelo supracitado possibilita a melhor compreensão dos mecanismos de ação relacionados ao efeito comportamental dessa droga e esse entendimento será fundamental para aplicação clínica, futuramente, pois o elevado consumo de bebidas contendo cafeína conduziu ao aparecimento de um transtorno de ansiedade.

Em termos de mecanismo de ação, inúmeros estudos têm demonstrado que as mudanças comportamentais induzidas por cafeína em altas doses são geralmente associadas ao bloqueio dos receptores adenosinérgicos e ao antagonismo dos receptores gabaérgicos (Fredholm; 1999; Shi; Padgett; Daily, 2003; Umemura; et al, 2006). Assim como, já foi reportado pela literatura que o bloqueio dos receptores adenosinérgicos estimula a via nitrérgica, sendo esta via intimamente relacionada com alterações comportamentais.

Nesse sentido, nosso estudo foi pioneiro em demonstrar a relação entre a via nitrérgica e o efeito comportamental ampliado pela cafeína através do bloqueio da enzima NOS, utilizando o L-NAME na dose 10 mg/kg em cotratamento com a cafeína. Nós demonstramos que esse cotratamento bloqueou o efeito ansiogênico ampliado pela cafeína no teste escotáxico. Esse bloqueio foi observada no percentual de tempo dispendido no compartimento aversivo (figura 26), no comportamento de congelamento (figura 29), nos movimentos erráticos (figura 30) e na latência de saída para o compartimento branco (figura 32).

Esses resultados indicam que o óxido nítrico pode estar envolvido no comportamento tipo ansiedade potencializado pela cafeína, assim como elevados níveis de óxido nítrico estão presentes em desordens de ansiedade, sugerindo que a inibição da produção de NO pode exercer um papel positivo contra essas desordens (WEGENER; VOLKER, 2009).

Nesse sentido, o efeito demonstrado no teste escotácico pelo presente estudo ratifica o papel do óxido nítrico modulando o comportamento tipo ansiedade, pois já foi reportado por Maximino e colaboradores (2012) que após administração de um inibidor da NOS (L-NOARG - L-NG-nitro arginina) por via intracerebroventricular (i.c.v), os animais elevavam o tempo de exploração no compartimento aversivo. Assim como, ensaios utilizando camundongos *knockdown* do gene NOS 1 demonstraram diminuição no comportamento tipo ansiedade (Nelson; et al, 1993), e há fortes evidências que a efetividade no comportamento tipo ansiedade da inibição da NOS seja em função de sua ampla distribuição em regiões responsáveis pelo repertório emocional da ansiedade como o sistema límbico (MIGUEL; NUNES de SOUZA, 2008).

O efeito ansiolítico da inibição da NOS também foi demonstrado por estudos utilizando o L-NAME e também o 7-NI (inibidor da iNOS) nos quais roedores testados no LCE dispenderam mais tempo no braço aberto (compartimento aversivo) e demandaram mais tempo na porção clara da caixa claro/escuro (GUIMARAES; et al, 1994; VOLKE; et al, 1995; FARIAS; et al, 1997; GUILHOTRA; JAIN; DHINGRA, 2009).

Nesse sentido, drogas modulando a via do óxido nítrico como o L-NAME (inibidor não específico da NOS), aminoguanidina (inibidor específico da iNOS) e o sildenafil (inibidor de uma fosfodiesterase 5 – PDE 5) vem sendo cada vez mais utilizadas para estudos do comportamento tipo ansiedade e comportamento tipo depressivo (Bettio; et al, 2012; Montezuma et al, 2012; Zhang et al, 2013) e elas estão sendo utilizadas também para melhor elucidar o papel do óxido nítrico nessas alterações comportamentais, principalmente quando essas alterações são promovidas por alguma indução farmacológica como é o caso do presente estudo que utilizou a cafeína. Assim como já foi observado semelhança de efeitos desses inibidores com antidepressivos e ansiolíticos clássicos como diazepam e fluoxetina (KHAN; GOSH, 2010).

Outra característica importante é que o sistema nitrérgico pode modular os níveis de serotonina (neurotransmissor envolvido na patogênese de transtornos de ansiedade). Segundo, Maximino 2012b, a interação entre o transportador de serotonina e a NOS1, diminui a atividade da SERT (Transportador de serotonina pré-sináptico) e conseqüentemente diminui a liberação da serotonina na fenda sináptica. Essa atuação explica o baixo conteúdo de serotonina quando a NOS 1 está ativada.

Rahman e Thomas (2014) identificaram que a inibição da NOS restaurava parcialmente o conteúdo de 5-HT. No qual, essa restauração de conteúdo da serotonina

de acordo com Harkin e colaboradores (2003), ocorreu utilizando baixas doses do inibidor NOS (L-NAME 10 mg/kg), que por sua vez, potencializa a inibição de recaptação de serotonina e eleva o conteúdo desta na fenda sináptica, sendo esse efeito semelhante ao de ansiolíticos clássicos como a fluoxetina.

Embora, o presente trabalho seja o primeiro a demonstrar o efeito da via nitrérgica na ansiogênese ampliada pela cafeína, Kayir e Uzbay (2004) demonstraram um bloqueio exercida pelo L-NAME no efeito hiperlocomotor gerado pela cafeína em roedores na maior dose administrada (128 mg/kg), assim sugere-se que esse efeito é regulado pelos níveis de óxido nítrico.

Além do efeito da cafeína na via nitrérgica sabe-se que essa xantina pode apresentar atividade pró-oxidante, e que em doses a partir de 100 mg/kg promove um aumento na produção de espécies reativas de oxigênio, NO e malonaldeído, assim como, estimula a produção de peroxinitrito e diminui a atividade das enzimas antioxidantes endógenas - SOD e GSH-Px - (AZAM; et al, 2003; MOUTAERY; et al, 2003; JARDIM, 2005; ALASEHIRLI; et al, 2005).

Diante do efeito pró-oxidante da cafeína amplamente reportado pela literatura, o presente trabalho se propôs a utilizar o α -tocoferol como um possível agente reversor dos efeitos comportamentais ampliados por essa droga. Baseado na curva dose resposta escolhemos a dose de 1 mg/kg, uma vez que essa dose não alterou o comportamento tipo ansiedade gerado pelo teste escotácico (alteração observada na dose de 2 mg/kg, Figura 7A) nem apresentou alteração locomotora (observada na dose de 5 mg/kg, Figura 7B) quando comparado com o grupo controle, assim como bloqueou de forma eficaz o comportamento tipo ansiedade ampliada pela cafeína (Figura 13). A partir da escolha dessa dose, nós prosseguimos com a avaliação desse efeito nos demais etogramas do teste escotácico e no teste DVN.

Em relação ao teste de preferência claro/escuro o cotratamento com α -tocoferol bloqueou de forma total o percentual de tempo no compartimento aversivo (figura 13), comportamento de avaliação de risco (figura 18), percentual de tempo em congelamento (figura 16), tempo de latência de saída para o compartimento branco (figura 19) e parcialmente o comportamento tigmotácico (figura 15), comportamentos esses que haviam sido ampliados pelo tratamento com cafeína. Assim como, no teste de distribuição vertical eliciada pela novidade o cotratamento com α -tocoferol bloqueou de forma total o tempo dispendido na porção superior (figura 20), eventos de nado erráticos (figura 24), latência de saída para porção superior (figura 25), e parcialmente o número

de eventos de congelamento (figura 22), quando comparados com os grupos tratados com cafeína. Os resultados obtidos em ambos os testes refletem um efeito de bloqueio da ansiogênese amplificada pela cafeína nos modelos de ansiedade utilizados.

Os dados obtidos no presente trabalho corroboram com outros estudos que observaram o possível efeito ansiolítico do α -tocoferol em roedores cuja condição de estresse era apenas a modulação ambiental e a administração do α -tocoferol foi por via oral, por vários dias e em doses superiores (100 – 300 mg/kg) ao que foi administrada no presente estudo (Chakraborti; Gulati; Ray, 2008; Comin; et al, 2010 e Ambrogini; et al, 2011). Portanto, esse é o primeiro estudo que utiliza o zebrafish como modelo para avaliar o efeito do α -tocoferol protegendo contra as alterações comportamentais amplificadas por cafeína nos testes comportamentais.

A dose utilizada no presente estudo pode ser considerada segura, pois encontra-se abaixo da recomendação máxima de consumo de α -tocoferol (1500UI/dia ou 1000mg) assim não apresentaria um efeito tóxico relacionados ao quadro de hipervitaminose (*National Institutes of Health*, 2013). Além de ser bem mais baixa que as doses utilizadas nos estudos supracitados que também obtiveram um possível efeito ansiolítico.

Outro ponto importante é que, a utilização de antioxidantes para bloqueio do comportamento tipo ansiedade tem emergido na última década e já foi demonstrado esse efeito utilizando flavonoides (Ognibebe; et al, 2008); vitaminas C; vitamina E (Zhang, 2011; Hughes; Lowther; Nobelen, 2011) e em destaque um estudo realizado pelo nosso grupo por Puty e colaboradores (2014), em zebrafish, observaram que o ácido ascórbico protege contra o efeito ansiogênico ampliado por metilmercúrio no teste escotático, contra o aumento nos níveis de TBARS (Substâncias Reativas ao Ácido Tiobarbitúrico) e contra a diminuição dos níveis extracelulares de serotonina gerados por esse xenobiótico.

Especificamente o interesse pelo α -tocoferol se justifica por ser uma vitamina que está sendo amplamente utilizada em diversas pesquisas envolvendo alterações no sistema nervoso central, pois apresenta uma elevada capacidade antioxidante, que permite que ele exerça um papel importante no combate à progressão de diversas doenças neurodegenerativas e pode atuar como um possível agente reversor das alterações comportamentais de doenças psiquiátricas como depressão e ansiedade. Sua principal ação nessas desordens é favorecer os mecanismos de defesas que encontram-se diminuídos (Vatassery, Bauer, Dysken; 1999). Portanto, podemos inferir que no

presente estudo o α -tocoferol demonstrou esse papel reversor do comportamento tipo ansiedade corroborando com outros estudos que obtiveram semelhante resposta.

Além disso, nós demonstramos que a bloqueio comportamental realizada pelo α -tocoferol foi semelhante ao efeito obtido após inibição da enzima óxido nítrico sintase, evidenciando a via nitrérgica como um mecanismo modulador desses efeitos comportamentais.

Outra semelhança observada entre os tratamentos com α -tocoferol e o inibidor da enzima NOS (L-NAME) é que esses tratamentos isoladamente não apresentaram efeito no comportamento tipo ansiedade gerado pelos testes comportamentais utilizados (PCE e DVN), apresentando efeito somente no comportamento tipo ansiedade potencializado pela cafeína, no qual esse efeito foi de bloqueio. Portanto, o comportamento tipo ansiedade gerado pelos testes e pela cafeína podem envolver diferentes mecanismos, e essa hipótese é suportada no presente estudo, pois os tratamentos apresentaram diferentes respostas aos contextos ansiogênicos.

Contudo, faz-se necessário a realização de mais estudos que possam melhor elucidar essa relação entre cafeína, sistema nitrérgico e as alterações comportamentais produzidas por essa droga, assim como o papel de antioxidantes como possíveis reversores. Em vista de possibilitar o uso de antioxidantes, atuando como neuroprotetores em diversas desordens, sendo uma delas os transtornos de ansiedade induzida por cafeína e fornecer uma nova possibilidade terapêutica com elevada acessibilidade para população.

6 CONCLUSÃO

A cafeína potencializou o efeito ansiogênico induzido pelos testes de preferência claro/escuro e de distribuição vertical eliciada pela novidade em *Danio rerio*.

A avaliação da curva dose resposta de α -tocoferol no teste de preferência claro/escuro mostrou que a dose de 1 mg/kg apresentou melhor eficácia por manter os comportamentos analisados nos níveis do controle.

Alterações locomotoras foram observadas apenas nos animais tratados com α -tocoferol na dose 5 mg/kg que apresentaram hiperlocomoção.

O α -tocoferol bloqueou o efeito ansiogênico potencializado pela cafeína em ambos os testes (preferência claro/escuro e de distribuição vertical eliciada pela novidade).

A inibição da enzima óxido nítrico sintase bloqueou o efeito ansiogênico da cafeína no teste escotático, sugerindo que a ativação da via nitrérgica poderia exercer um papel fundamental na potencialização do comportamento tipo ansiedade induzida por cafeína.

O tratamento com α -tocoferol e o inibidor da enzima NOS (L-NAME) apresentam especificamente efeito no comportamento tipo ansiedade ampliado pela cafeína, sugerindo que o padrão de ansiedade induzido pelo ambiente pode ser diferente do padrão de ansiedade induzida pela cafeína.

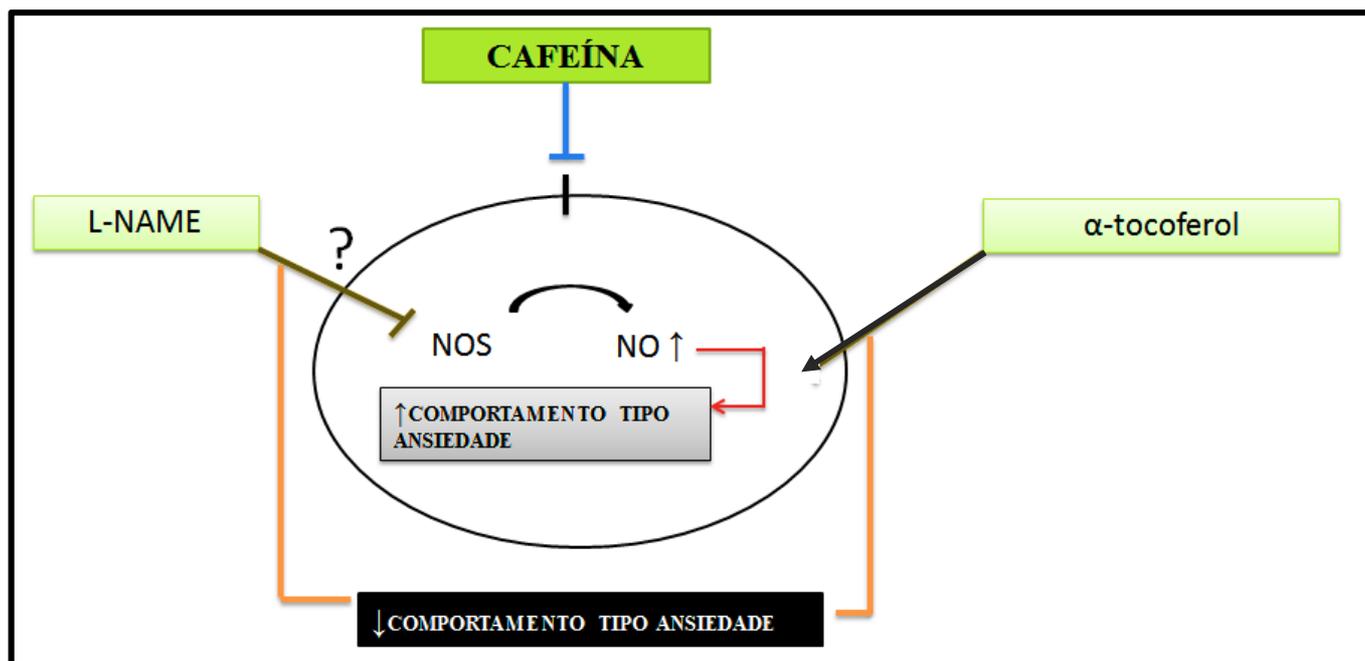


Figura 33: Representação esquemática do efeito dos tratamentos com α -tocoferol e L-NAME associado a cafeína no comportamento tipo ansiedade. A cafeína (100 mg/kg) bloqueou receptores adenosinérgicos e possivelmente ativou a enzima óxido nítrico sintase (NOS) promovendo um aumento na produção de óxido nítrico (NO) gerando uma potencialização do comportamento tipo ansiedade. O cotratamento com L-NAME da dose 10 mg/kg (inibidor da enzima NOS) inibiu a ação da NOS reduzindo a produção de óxido nítrico culminando em uma redução no comportamento tipo ansiedade ampliado pela cafeína. O cotratamento com tocoferol (1 mg/kg) bloqueou o comportamento tipo ansiedade potencializado pela cafeína.

REFERÊNCIA

ABDALLA, F. H.; SCHMATZ, R.; CARDOSO, A. M.; CARVALHO, F. B.; BALDISSARELLI, J.; OLIVEIRA, J. S.; MICHELLE M. R.; NUNES, M. A. G.; RUBIN, M. A.; CRUZ, I. B. M.; BARBISAN, F.; DRESSLER, V. L.; PEREIRA, L. B.; SCHETINGER, M. R. C.; MORSCHA, V. M., GONÇALVES, J. F.; MAZZANTI, C. M. Quercetin protects the impairment of memory and anxiogenic-like behavior in rats exposed to cadmium: Possible involvement of the acetylcholinesterase and Na⁺,K⁺-ATPase activities. **Physiology & Behavior**, 135: 152–167, 2014.

ALASEHIRLI, B.; CEKRNEN, M.; NACAK, M.; BALAT, A. Effects of Caffeine on Placental Total Nitrite Concentration: A 21-Day, Vehicle-Controlled Study in Rats. **Current therapeutic research**, 66: 2, 2005.

ALLAM, F.; et al. Grape powder supplementation prevents oxidative stress-induced anxiety-like behavior, memory impairment, and high blood pressure in rats. **Journal of Nutrition**, 2013

ALMEIDA FILHO, N.; et al. Estudo multicêntrico de morbidade psiquiátrica em áreas urbanas brasileiras (Brasília, São Paulo, Porto Alegre). **Revista ABP-APAL**, 14 (3):93-104, 1992.

ALZOUBI, K. H.; et al. The neuroprotective effect of vitamin E on chronic sleep deprivation-induced memory impairment: The role of oxidative stress. **Behavioural Brain Research**. 2012.

AMBROGINI, P.; CIUFFOLI, S.; LATTANZI, D.; MINELLI, A.; BUCHERELLI, C.; BALDI, E.; BETTI, M.; CUPPINI, R Maternal dietary loads of α -tocopherol differentially influence fear conditioning and spatial learning in adult offspring. **Physiology & Behavior**. 2011.

ANDERSON, D. Antioxidant defences against reactive oxygen species causing genetic and other damage. **Mutation Research**, Amsterdam, v.350, n.1, p.103-108,1996.

ANDRADE, L. H. S. G.; GORESTEIN, C. “Aspectos gerais das escalas de avaliação de ansiedade”. **Revista de psiquiatria clínica**. 25(6), pp- 285-90. 1998.

ANHUAMÁN, L. A. L. Fatores Comportamentais, hormonais e neuroanatômicos associados à vulnerabilidade ao estresse em ratos Carioca High – Conditioned – Freezing (CHF) e Carioca Low – Conditioned – Freezing (CLF). **Tese de doutorado**. Universidade de São Paulo, 2013.

ARAUJO, J. et al. Behavioral and pharmacological aspects of anxiety in the light/dark preference test. apud: KALUEFF, A. V; STEWART, A. M. (Eds.). **Zebrafish ProTOCOls for Neurobehavioral Research**. New York: Humana Press, 2012.

ARENDASH, G., W.; et al. Caffeine protects Alzheimer's mice against cognitive impairment and reduces brain β - amyloid production. **Neuroscience**,142, pp. 941 -952, 2006.

AZAM, S.; HADI, N.; KHAN, N. U.; HADI, S. M. Antioxidant and prooxidant properties of caffeine, theobromine and xanthine. **Med Sci Monit.** 9(9): BR325-30, 2003.

AZULAY, M. M.; et al. Vitamina C. **An.bras.Dematol.** Rio de Janeiro,78(3):265-274, 2003.

BALDWIN, H. A.; FILE, S. E. Caffeine-Induced Anxiogenesis: The Role of Adenosine, Benzodiazepine and Noradrenergic Receptors.**Pharmacology Biochemistry & Behavio.** 1988.

BLANCHARD, D. C.; BLANCHARD, R. J. Effects of ethanol, benzodiazepines and serotonin compounds on ethopharmacological models of anxiety. In Anxiety (ed. N. McNaughton and G. Andrews), pp. 188–99. **Otago University Press**, Dunedin., 1990.

BARBOSA JR, A.; et al. Rapid Method for Acute Intracerebroventricular Injection in Adult Zebrafish. **Neuromethods**. Springer Science+Business Media, LLC. 2012.

BARBOSA, L. F.; MEDEIROS, M. H.G; AUGUSTO, O. Danos oxidativos e neurodegeneração: o quê aprendemos com animais transgênicos e nocautes?. **Quim. Nova**, Vol. 29, No. 6, 1352-1360, 2006.

BARREIROS, A. L. B. S.; DAVID, J. M. Estresse Oxidativo: Relação Entre Geração De Espécies Reativas E Defesa Do Organismo. **Quim. Nova**, Vol. 29, No. 1, 113-123, 2006

BARROS, T. P.; et al. 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.

BENCAN, Z.; SLEDGE, D. e LEVIN, E. D. Buspirone, chlordiazepoxide and diazepam effects in a zebrafish model of anxiety. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior**, v. 94, p. 75-80, doi:10.1016/j.pbb.2009.07.009, 2009.

BELZUNG, C.; GRIEBEL, G.. Measuring normal and pathological anxiety-like behavior in mice: a review. **Behavioural Brain Research**. 125: 141-149, 2001.

BELZUNG, C.; LE PAPE, G. Comparison of different behavioral test situations used in psychopharmacology for measurement of anxiety. **Psychology and behavior**. 1994.

BERNIK, M A. “Ansiedade normal e patológica”. In **Benzodiazepínicos: Quatro décadas de experiências**. São Paulo. Edusp, 1999.

BETTIO, L. E; et al. Guanosine produces an antidepressant-like effect through the modulation of NMDA receptors, nitric oxide/cGMP and PI3K/mTOR pathways. **Behav Brain Res** 234:137–148, 2012.

BIANCHI, M. L. P.; ANTUNES, L. M. G. Radicais Livres E Os Principais Antioxidantes da Dieta. Artigo de revisão. **Rev. Nutr., Campinas**, 1999.

BOEHMLER, W.; et al. Identification of Zebrafish A2 adenosine receptors and expression in developing embryos. **Gene Expr Patt**. 2009.

BOEKEMA, P. J., SAMSON, M., VAN BERGE HENEGOUWEN, G. P., et al. Coffee and gastrointestinal function: facts and fiction. A review. **Scandinavian Journal of Gastroenterology Supplementum**, 230, 35–39. 1999.

BOYLE, M.; CASTILLO, V. D. Monster on the loose. **Fortune**. 154:116–22: 2006.

BRACKEN, M.B.; et al. Coffee consumption during pregnancy. **N Engl J Med** 306: 1548-9. 1982.

BRADLEY, B. F.; et al. Anxiolytic and anxiogenic drug effects on male and female gerbils in the black-white box. **Behav Brain Res**; 216(1): 285-92, 2011.

BREDER, C. M.; BREDER Jr, C. M.; HALPEON, F. Innate and acquired behavior affecting the aggregation of fishes. *Physiological Zoology*, 1946, 19: 154-190. APUD SERRA, E.L.; MEDALHA, C.C.; MATTIOLLI, R. Natural preference of

zebrafish(*Danio rerio*) for a dark environment. Short Communication. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**. 1999.

BREDT, D.S.; SNYDER, S.H. Nitric oxide mediates glutamate-linked enhancement of GMPc levels in the cerebellum. **proc. natl. acad. sci.USA**, 86, 9030–9033, 1989.

BREDT, D. S.; SNYDER, S. H. Nitric oxide: a physiologic messenger molecule. **Annu. Rev. Biochem**, 63, 175–195, 1994.

BRIGELIUS-FLOHÉ, R.; TRABER, M. G.; Vitamin E: function and metabolism. **FASEB J**. 13: 1145-1155, 1999;

CACHAT, J.; CANAVELLO, P.; ELEGANTE, M.; BARTELS, B.; HART, P.; BERGNER C, et al. Modeling withdrawal syndrome in zebrafish. **Behavioural Brain Research**, v. 208, p. 371-376, 2010.

CACHAT, J. M.; et al. Developing zebrafish models of complex phenotypes relevant to human brain disorders Tulane University School Of Science And Engineering. **PhD thesis**, 2013

CANADIAN COUNCIL ON ANIMAL CARE. CCAC guidelines on: **The care and use of fish in research, teaching and testing**. . [S.l: s.n.]. Disponível em: <http://www.ccac.ca/en/CCAC_Programs/Guidelines_Policies/GDLINES/Fish/Fish_Guidelines_English.pdf>, 2005.

CANCELA, L. M.; BASSO, A.M.; MARTIJENA, I.D.; CAPRILES, N.R.; MOLINA, V.A. A dopaminergic mechanism is involved in the ‘anxiogenic-like’ response induced by chronic amphetamine treatment: a behavioral and neurochemical study. **Brain Research**. 909:79–186, 2001.

CARVAN, M. J.; et al. Transgenic Zebrafish as Sentinels for Aquatic Pollution. **Annals New York Academy Of Sciences**. 2000.

CASINI, M. L.; et al. Psychological assessment of the effects of treatment with phytoestrogens on postmenopausal women: A randomized, double-blind, crossover, placebo-controlled study. **Fertil Steril**; 85:972-8, 2006.

CATANIA, A. S.; BARROS, C. R.; FERREIRA, S. R. G. Vitaminas e minerais com propriedades antioxidantes e risco cardiometabólico: controvérsias e perspectivas. **Artigo de Revisão. Arq Bras Endocrinol Metab**. São Paulo, 2009

CHAPMAN, P.F.; ATKINS, C. M.; ALLEN, M.T.; HALEY, J. E.; STEINMETZ, J. E. Inhibition of nitric oxide synthesis impairs two different forms of learning. **NeuroReport** 3:567–570, 1992.

CHAE, Y.; YEOM, M.; HAN, J. H.; PARK, H. J.; HAHM, D. H.; SHIM, I.; et al. Effect of acupuncture on anxiety-like behavior during nicotine withdrawal and relevant mechanisms. **Neurosci Lett**;430:98-102. 2008.

CHAKRABORTI, A.; GULATI, K.; RAY, A. Corresponding author contact information Age related differences in stress-induced neurobehavioral responses in rats: Modulation by antioxidants and nitregeric agents. **Behavioural Brain Research**. 2008.

CHILDS, E.; et al. Association between ADORA2A and DRD2 polymorphisms and caffeine-induced anxiety. **Neuropsychopharmacology** 2008;33:2791–800.

COMIN, D.; et al. Vitamin E improves learning performance and changes the expression of nitric oxide-producing neurons in the brains of diabetic rats. **Behavioural Brain Research**. 2010.

CONCAS, A.; PORCU, P.; SOGLIANO, C.; SERRA, M.; PURDY, R. H.; BIGGIO, G. Caffeine – Induced increases in the brain and plasma concentrations of neuroactive steroid in the rat. **Pharmacology Biochemistry and Behavior** 66, (1):39 -45, 2000.

DAMMSKI, A. P.; et al. **Zebrafish Manual de Criação em Biotério**. Universidade Federal do Pará, 2011.

DALY, J. W.; FREDHOLM, B. B. Caffeine--an atypical drug of dependence. **Drug Alcohol Depend**. 51(1-2):199-206, 1998.

DE CARVALHO M, MARCELINO E, DE MENDONCA A. Electrophysiological studies in healthy subjects involving caffeine. **Journal of Alzheimer's disease: JAD**.;20 Suppl 1:S63-9, 2010

DE CHIARA, G.; et al. Infectious agents and neurodegeneration. **Mol Neurobiol**;46(3):614–38. 2012.

DUARTE, F. S.; HOELLER, A. A.; DUZZIONI M.; GAVIOLI, E. C.; CANTERAS, N. S.; LIMA, T. C. M. NK1 receptors antagonism of dorsal hippocampus counteract the anxiogenic-like effects induced by pilocarpine in non-convulsive Wistar rats. **Behavioural Brain Research**. 265: 53–60, 2014.

DUNWIDDIE, T. V.; MASINO, S. A.; Annu. **Rev. Neurosci.**, 24, 31. 2001.

EL YACOUBI M; et al. The anxiogeniclike effect of caffeine in two experimental procedures measuring anxiety in the mouse is not shared by selective A(2A) adenosine receptor antagonists. **Psychopharmacology** (Berl) 2000;148:153–63.

EGAN, R. J.; et al. Understanding behavioral and psychological phenotypes of stress and anxiety in zebrafish. **Behav Brain Res.** 2009.

EGGERMONT, E. Recent advances in vitamin E metabolism and deficiency. **Eur. J. Pediatr.**, 165: 429-434, 2006..

FARIAS, M.S. Acute inhibition of nitric oxide synthesis induces anxiolysis in the plus maze test. **European Journal of Pharmacology.** 323 37 -43.1997.

FAUST, C. B.; Coffee from Berry to Brew. **Educ. Chem.** 30, 149. 1993.

FERRÉ, S. An update on the mechanisms of the psychostimulant effects of caffeine. **J. Neurochem.** 105, 1067–1079. 2008.

FERRÉ, S. Role of the central ascending neurotransmitter systems in the psychostimulant effects of caffeine. **J. Alzheimers Dis.** 20 (Suppl. 1), S35–S49. 2010.

FILE, S. E.; BOND, A. J.; LISTER, R. J. Interaction between effects of caffeine and lorazepam in performance tests and self-ratings. **J. Clin. Psychopharmacol.** 2:102-106; 1982.

FILE, S. E. Recent developments in anxiety, stress, and depression. **Pharmacol Biochem Behav**;54(1):3–12. 1996.

FISONE, G.; BORGKVIST, A.; USIELLO, A. Caffeine as a psychomotor stimulant: mechanism of action, **Cell. Mol. Life Sci.** 61: 857–872. 2004.

FRANCO, G. **Tabela de Composição Química de alimentos.** 9ª ED. Atheneu. 2008.

FREDHOLM, B. B. Purinoceptors in the nervous system. **Pharmacol Toxicol**;769:228–39, 1995.

FREDHOLM, B.; et al. Actions of caffeine in the brain with special reference to factors that contribute to its widespread use. **Pharmacol Rev.**51:83–133, 1999.

FREDHOLM, B. B.; **Pharmacol. Toxicol.**, 76, 93, 1995.

GATCH, M. B.; WALLIS, C. J.; LAL, H. Effects of ritanserin on ethanol withdrawal-induced anxiety in rats. **Alcohol.** 21: 11-17, 2000.

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

GOUVEA. JR, et al; Preference of Goldfish (*Carassius auratus*) for Dark Places.**Revista de Etologia.** 2005.

GRAEFF, F. G. Anxiety, panic and the hypothalamic-pituitary-adrenal axis. **Rev.Bras. Psiquiatr.** 2007.

GRAEFF, F. G.; CAROBREZ, A.P.; SILVEIRA, M. C. L. Excitatory amino acids and the brain aversive system. In: CAVALHEIRO, E. A.; LEHMAN, J.; TURSKI L, eds. **Frontiers in excitatory amino acid research.** New York: Alan R Liss; p. 325-32. 1988.

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

GORMAN, J. M.; KENT, J. M.; SULLIVAN, G. M.; COPLAN, J. D.: Neuroanatomical hypothesis of panic disorder, revised. **Am J Psychiatry** 157:493–505, 2000.

GRAY, J.A.. The Psychology of Fears and Stress. **Cambridge University Press**, Cambridge. 1987.

GRAY; J. A.; McNAUGHTON, N. **The Neuropsychology of Anxiety: An Enquiry into the Functions of the Septo-Hippocampal System.** Second Edition, Oxford Psychology Series. NO. 33, 2003.

GARTHWAITE, J.; GARTHWAITE, G.; PALMER, R.M.; MONCADA, S. NMDA receptor activation induces nitric oxide synthesis from arginine in rat brain slices. **Eur. J. Pharmacol**, 172, 413–416, 1989.

GREEN, D.; et al. Beneficial effect of vitamin E administration on nitric oxide function in subjects with hypercholesterolaemia. **Clinical Science** (1998) 95, (361–367).

GUILHOTRA, N.; JAIN, H.; DHINGRA, D. Differential effects of nitric oxide synthase inhibitors on anxiety in unstressed and stressed mice. **Indian journal of experimental biology**, Vol 48, pp365-372, april 2010.

GURELA, A.; et al. Protective role of a-tocopherol and caffeic acid phenethyl ester on ischemia–reperfusion injury via nitric oxide and myeloperoxidase in rat kidneys **Clinica Chimica Acta** 339 (2004) 33–41

HADFIELD, M.G.; Milio, C.. Caffeine and regional brain monoamine utilization in mice. **Life Sci.**, 45, 2637–2644. 1989.

HALLIWELL, B. The antioxidant paradox. **The Lancet.**, 355, 1179, 2000.

HALLIWELL, B. Role of free radicals in the neurodegenerative diseases: therapeutic implications for antioxidant treatment. **Drugs Aging** 18: 685, 2001.

HALLIWELL B, GUTTERIDGE JMC. Oxygen radicals and the nervous system. **Trends Neurosci.** 8:22-6; 1985.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C. Antioxidant protection by low-molecular mass agents: Compounds derived from the diet. In: Halliwell B, Gutteridge JMC, editors. **Free Radicals in Biology and Medicine**. New York: Oxford University Press; p. 208-219, 1999.

HARKIN, A.; et al. Serotonergic mediation of the antidepressant-like effects of nitric oxide synthase inhibitors. **Neuropharmacol.** 44, 616– 623, 2003.

HOLTZMAN, S. G. Caffeine as a model drug of abuse. **Trends Pharmacol Sci.** 11:355–356, 1990.

HOVATTA, I.; et al. Glyoxalase I and glutathione reductase I regulate anxiety in mice. **Nature.** 438:662–666, 2005.

IMAIZUMI, M.; MIYAZAKI, S.; ONODERA, K. Effects of xanthine derivatives in a light/dark test in mice and the contribution of adenosine receptors. **Methods Find Exp Clin Pharmacol.** v;16(9):639-44, 1994.

IZÍDIO, G. S.; RAMOS, A. Positive association between ethanol consumption and anxiety-related behaviors in two selected rat lines. **Alcohol**. 41:517-524, 2007.

JARDIM, F. M. A. Efeito da Ingestão Crônica de Cafeína na Atividade de Enzimas Antioxidantes, Peroxidação de Lipídeos e na produção de radicais livres em diferentes regiões do sistema nervoso central de ratos adultos. **Dissertação de mestrado**. Porto Alegre, 2005.

JAIN, N.S.; HIRANI, K.; CHOPDE, C.T. Reversal of caffeine-induced anxiety by neurosteroid 3-alpha-hydroxy-5-alpha-pregnane-20-one in rats. **Neuropharmacology** 48: 627-638, 2005.

JUNG, M. E.; LAL, H.; GATCH, M. B. The discriminative stimulus effects of pentylentetrazole as a model of anxiety: recent developments. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**.; 26: 429- 439, 2002.

KAYIR, H.; UZBAY, I. T. Evidence for the role of nitric oxide in caffeine-induced locomotor activity in mice. **Psychopharmacology** (Berl). Feb;172(1):11-5. 2004

KALUEFF, A. V.; STEWART, A. M.; GERLAI, R. Zebrafish as an emerging model for studying complex brain disorders. **Trends in pharmacological Science**. Cell press. Volume 35, Issue 2, Pages 63–75, February 2014.

KALRA, H.; KAMATH,P.; TRIVEDI, K. J.; A. Janca, Caregiver burden in anxiety disorders, **Curr.Opin.Psychiatry**. 21: 70–73, 2008.

KAPLAN, G.B., et al. Dose-dependent pharmacokinetics and psychomotor effects of caffeine in humans. **J. Clin. Pharmacol**. 37, 693–703, 1997.

KATAN, M. B.; SCHOUTEN, E. Caffeine and arrhythmia. **American Journal of Clinical Nutrition**, 81, 539–540, 2005.

KEY, B. E.; DEVINE, C. A. Zebrafish as an experimental model: Strategies for developmental and molecular neurobiology studies. **Methods in Cell Science**, v. 25, n. 1-2, p. 1-6, doi:10.1023/B:MICS.0000006849.98007.03, 2003.

KHOR, Y. M.; SOGA, T.; PARHAR, I. S. Caffeine neuroprotects against dexamethasone-induced anxiety-like behavior in the Zebrafish (*Danio rerio*). **General and Comparative Endocrinology**. 181:310–315, 2013.

KIM, J.; GORMAN, J. The psychobiology of anxiety. **Clinical Neuroscience Research**. 2005

KNOTT, A.B.; BOSSY-WETZEL, E. Nitric oxide in health and disease of the nervous system. *Antioxid. Redox Signal.*, 11, doi:10.1089/ars.2008.2234, 2009.

KUBERA M, OBUCHOWICZ E, GOEHLER L, BRZESZCZ J, MAES M. In animal models, psychosocial stress-induced (neuro) inflammation, apoptosis and reduced neurogenesis are associated to the onset of depression. **Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry**.35(3):744–59. 2011.

KYZARA, E.; et al. Behavioral effects of bidirectional modulator of brain monoamines reserpine and d-amphetamine in zebrafish. **Brain research** 1527:108 – 116, 2013.

LACERDA, G. F. M. L. Ansiedade em modelos animais: efeito de drogas nas Dimensões extraídas da análise fatorial. **Dissertação de Mestrado**. Universidade Federal do Paraná. 2006.

LANDNER L.; et al. Short-term test for predicting the potential of xenobiotics to impair reproductive success in fish. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 1985, 9: 282-293. APUD SERRA, E.L.; MEDALHA, C.C.; MATTIOLLI, R. Natural preference of zebrafish (*Danio rerio*) for a dark environment. Short Communication. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**. 1999.

LEE, M. A.; CAMERON, O. G.; GREDEN, J. F. Anxiety and Caffeine Consumption in People With Anxiety Disorders. **Psychiatry Research**, 15, 21 I-2 I7, 1984.

LEVIN, E. D.; BENCAN, Z.; CERUTTI, D.T. Anxiolytic effects of nicotine in zebrafish. **Physiol. Behav** .90 (1), 54–58 (2007).

LIMA, M G.; MAZIMINO, C.; OLIVEIRA, K. R. M.; BRASIL, A.; CRESPO-LOPEZ, M. E.; BATISTA, E. J. B.; ROCHA, F. A. F.; PICANÇO-DINIZ, D. L. ; HERCUANO, A. M. Nitric oxide as a regulatory molecule in the processing of the visual Stimulus. **Nitric Oxide**, 36: 44–50, 2014.

LOBATO, K. R.; et al. α -tocopherol administration produces an antidepressant-like effect in predictive animal models of depression. **Behavioural Brain Research**. 2010.

LOPEZ, A. P.; REZENDE, M. M. Ansiedade e consumo de substâncias psicoativas em adolescents. **Estud. psicol.** (Campinas) vol.30 no.1 Campinas Jan./Mar. 2013.

LOKE, W. H.; HINRICHS, J. V.; GHONHEIM, M. M. Caffeine and diazepam: Separate and combined effects on mood, memory, and psychomotor performance. **Psychopharmacology** (Berlin) 87:344-350; 1985.

LOWRY, C. A.; HALE, M. W. Serotonin and the Neurobiology of Anxious States. In: Müller, C.; Jacobs, B. **Handbook of Behavioral Neurobiology of Serotonin**. United States of America: Elsevier, p.379-398, 2010.

MAES, M.; GALECKI, P.; CHANG, Y. S.; BERK, M. A review on the oxidative and nitrosative stress (O&NS) pathways in major depression and their possible contribution to the (neuro) degenerative processes in that illness. **Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry**;35(3):676–92, 2011.

MANOSSO, L. M.; et al. Antidepressant-like effect of α -Tocopherol in a mouse model of depressive-like behavior induced by TNF- α . **Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry**. 2013.

MASOOD, A.; NADEEM, A.; MUSTAFA, S. J.; O'DONNELL, J. M. Reversal of oxidative stress-induced anxiety by inhibition of phosphodiesterase-2 in mice. **J Pharmacol Exp Ther**. 326(2): 369–79, 2008.

MASOOD, A.; et al. Anxiolytic effects of phosphodiesterase-2 inhibitors associated with increased cGMP signaling. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics** 331,690–699, 2009.

MATTIOLI, R. Natural preference of zebrafish (*Danio rerio*) for a dark environment. Short Communication. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**. 1999.

MAXIMINO, C.; et al. Scototaxis as anxiety in fish. **Nat Protoc**. 5:209–16, 2010.

MAXIMINO, C.; et al. Measuring anxiety in zebrafish: A critical review. **Behavioural Brain Research**. 2010.

MAXIMINO, C. et al. Pharmacological analysis of zebrafish (*Danio rerio*) scototaxis. **Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry**, v. 35, p. 624–631, doi:10.1016/j.pnpbp.2011.01.006, 2011a.

MAXIMINO, C. et al. Neuromethods. **Chapter: Behavioral and Pharmacological Aspects of Anxiety in the Light/Dark Preference Test**. Springer Science+Business Media, LLC. 2012

MAXIMINO, C. et al. A comparison of the light / dark and novel tank tests in zebrafish. **Behaviour**, v. 149, p. 1099-1123, doi:10.1163/1568539X-00003029, 2012.

MAXIMINO, C.; et al. Role of serotonin in zebrafish (*Danio rerio*) anxiety: Relationship with serotonin levels and effect of buspirone, WAY 100635, SB 224289, fluoxetine and para-chlorophenylalanine (pCPA) in two behavioral models. **Neuropharmacology**. Brazil, 2013.

MAXIMINO, C.; et al. A Comparative Analysis of the preference for Dark Environments in Five Teleosts. **International Journal of Comparative Psychology**, 2007.

MAXIMINO, C. et al. Pharmacological analysis of Zebrafish(*Danio rerio*) Scotaxos. **Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry**. 2011.

MAXIMINO, PUTY, B.; OLIVEIRA, K. R. M.; HERCULANO, A. Behavioral and neurochemical changes in the zebrafish leopard strain. Zebrafish Neuroscience Research Consortium. **Genes Brain and Behavior** (Impact Factor: 3.6). 05/2013; DOI: 10.1111/gbb.12047

MAXIMINO, C. et al. Adenosine A1, but not A2, Receptor blockade increases anxiety and arousal in Zebrafish. **Basic & Clinical pharmacology & Toxicology**. 2011b.

MAXIMINO, C. **Serotonin and Anxiety** - Chapter 2 Serotonin in the Nervous System of Vertebrates, SpringerBriefs in Neuroscience, DOI: 10.1007/978-1-4614-4048-2_2, 2012b

MCINTOSH LJ, CORTOPASSI KM, SAPOLSKY RM. Glucocorticoids may alter antioxidant enzyme capacity in the brain: kainic acid studies. **Brain Res**.791:215-22; 1998.

MELLO CRUZ, A. P.; LANDEIRA-FERNANDEZ, J. Modelos animais de ansiedade e o estudo experimental de drogas serotoninérgicas. **Métodos em Psicopatologia**. 2012.

MICHEL, T. M.; et al. Evidence for oxidative stress in the frontal cortex in patients with recurrent depressive disorder a postmortem study. **Psychiatry Res.**;151(1):145–50, 2007.

MICHAEL, T; ZETSCHKE U; MARGRAF J. Epidemiology of anxiety disorders. **Epidemiology and Psychopharmacology**. 2007.

MIGUEL, T. T.; NUNES-de-SOUZA, R. L. Anxiogenic-like effects induced by NMDA receptor activation are prevented by inhibition of neuronal nitric oxide synthase in the periaqueductal gray in mice. **Brain Research**. 1240:39–46, 2008.

MILEI, J.; BOVERIS, A.; LLESUY, S.; MOLINA, H. A.; STORINO, R.; ORTEGA, D.; et al. Amelioration of dexamethasone-induced cardiotoxicity in rabbits by prenylamine and vitamins A and E. **Am Heart J**.;111:95-102, 1986.

MILLAN, M. J. The neurobiology and control of anxious states. **Progress in Neurobiology**. 2003.

MINATTO, K. M. estudo do efeito da cafeína sobre níveis de ansiedade e parâmetros de estresse oxidativo em camundongos treinados em piscina. **Dissertação de mestrado**. 2009.

MONTEZUMA, K. Inhibition of iNOS induces antidepressant-like effects in mice: pharmacological and genetic evidence. **Neuropharmacology** 62:485–491, 2012.

MOUTAERY, K. A.; DEED, S. A.; KHAN, H. A.; TARIQ, M. Caffeine Impairs Short-term Neurological Outcome after Concussive Head Injury in Rats. **Neurosurgery**, 53:704-712, 2003.

MYUNG AE LEE, OLIVER G. C.; GREDEN J F. Anxiety and Caffeine Consumption in People With Anxiety Disorders. Elsevier. **Psychiatry Research**,15, 2 1 I-2 I7. 1984.

MURAD, F. Discovery of some of the biological effects of nitric oxide and its role in cell signaling, **Biosci. Rep.** 24 (2004) 452–474.

NAGEL, R. DAR, T. The embryo test with the zebrafish *Danio rerio*-a general model in ecotoxicology and toxicology. **Altex**. 2002.

NAHESI, M.; Mafi, F.; Oryan, S.; Nasri, S.; Zarrindast, M. R. The effects of dopaminergic drugs in the dorsal hippocampus of mice in the nicotine-induced

anxiogenic-like response. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior**. 98:468–473, 2011.

NATIONAL INSTITUTES OF HEALTH. **Vitamin E - Fact Sheet for Health Professionals. Strengthening Knowledge and Understanding of Dietary Supplements**. 2013. Disponível em:<< <http://ods.od.nih.gov/factsheets/VitaminE-HealthProfessional/>>>.

NELSON RJ; et al. Behavioral abnormalities in male mice lacking neuronal nitric oxide synthase. **Nature** 378(6555):383-386,1995.

NG F, et al. Oxidative stress in psychiatric disorders, evidence base and therapeutic implications. **Int J Neuropsychopharmacol** 11(6):851–76. [21], 2008.

NOSCHANG, C. G. Cafeína e estresse: influências sobre o comportamento e sobre parâmetros bioquímicos avaliando estresse oxidativo no sistema nervoso central. **Dissertação de mestrado**. Porto Alegre, 2009.

OGNIBENE, E.; BOVICELLI, P; ADRIANI, W.; SASO, L.; LAVIOLA, G. Behavioral effects of 6-bromoflavanone and 5-methoxy-6, 8-dibromoflavanone as anxiolytic compounds. **Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry** 32, 128–134, 2008.

OTTEWILL, G.; **Educ. Chem.** , 36, 4. 1999.

OSAKADA, F.; et al. Neuroprotective effects of a-tocopherol on oxidative stress in rat striatal cultures. **Eur J Pharmacol** 465:15–22. 2003

OSHIMA, N.; YAMAJI, N.; FUJII R. Adenosine receptors mediate pigment dispersion in leucophores of the medaka, *Oryzias latipes*. **Comp Biochem Physiol C**;85:245–8. 1986

PADAYATTY, S. J.; LEVINE, M. Reevaluation of ascorbate in cancer treatment: emerging evidence, open minds and serendipity [Jornal]. - [s.l.] : **Journal of the American College of Nutrition**, - Vol. 19 (4), 2005.

PADAYATTY SEBASTIAN, J.; LEVINE, M. New insights into the physiology and pharmacology of vitamin C [Jornal]. **CMAJ**, Vol. 164 (3), 2001.

PADOVAN, C. M.; DEL BEL, E. A.; GUIMARAES, F. S. Behavioral effects in the elevated plus maze of an NMDA antagonist injected into the dorsal hippocampus: influence of restraint stress. **Pharmacol Biochem Behav.**;67:325–30,2000.

PARK, K. S.; OH, J. H.; YOO, H. S.; LEE, Y. M.; LEE, M. K.; HONG, J. T.; OH, K. W. (–)-Epigallocatechin-3-O-gallate (EGCG) reverses caffeine-induced anxiogenic-like effects. **Neuroscience Letters** 481:131–134, 2010.

PIATO, Â. L. et al. Acute restraint stress in zebrafish: Behavioral parameters and purinergic signaling. **Neurochemical Research**, v. 36, p. 1876-1886, doi:10.1007/s11064-011-0509-z, 2011.

PIRI, M.; AYAZI, E.; ZARRINDAST, M. R. Involvement of the dorsal hippocampal dopamine D2 receptors in histamine-induced anxiogenic-like effects in mice. **Neuroscience letters**. 550: 139-144, 2013.

PORTAVELLA, M.; TORRES, B.; SALAS, C. Avoidance response in goldfish: emotional and temporal involvement of medial and lateral telencephalic pallium. **J Neurosci**. 24:2335–42, 2004.

POST, R.M. Transduction of psychosocial stress in to the neurobiology of recurrent affective disorder. **The American Journal of Psychiatry**. 149,999–1010, 1992.

PREDIGER, R. D. S.; et al. Activation of adenosine A1 receptors reduces anxiety-like behavior during acute ethanol withdrawal (hangover) in mice. **Neuropsychopharmacology** 2006;31:2210–20.

PUTY, B.; MAXIMINO, C.; BRASIL, A.; DA SILVA, W. L.; GOUVEIA, A. JR.; OLIVEIRA, K. R.; BATISTA, E. D.; CRESPO-LOPEZ, M. E.; ROCHA, F. A.; HERCULANO, A. M. Ascorbic Acid Protects Against Anxiogenic-Like Effect Induced by Methylmercury in Zebrafish: Action on the Serotonergic System. **Zebrafish**. 2014.

QIN, L., et al. Systemic LPS causes chronic neuroinflammation and progressive neurodegeneration. **Glia** 55, 453–462, 2007.

QUILES, J. L.; HUERTAS, J. R.; BATTINO, M.; MATAIX, J.; RAMÍREZ-TORTOSA MC. Antioxidant Nutrients and Adryamicin Toxicity. **Toxicology** ;180:79-95, 2002.

RAHMAN, S.; THOMAS, P. Restoration of tryptophan hydroxylase functions and serotonin content in the Atlantic croaker hypothalamus by antioxidant treatment during hypoxic stress. *Front Neurosci.* .doi: 10.3389/fnins.2014.00130, 8: 130, 2014.

RANA, N.; et al. Caffeine-induced effects on heart rate in zebrafish embryos and possible mechanisms of action: an effective system for experiments in chemical biology. **Zebrafish.** 2010 Mar;7(1):69-81. doi: 10.1089/zeb.2009.0631.

RAY, A.; CHAKRABORTI, A.; GULATI, K. Current trends in nitric oxide research, **Cell. Mol. Biol.** 53 (2007) 3–14.

RHOADS, D. E.; HUGGLER, A. L.; RHOADS, L. J.. Acute and adaptive motor responses to caffeine in adolescent and adult rats. **Pharmacol. Biochem. Behav.** 99, 81–86, 2011.

RICHENDRIFERA, H.; et al. On the edge: Pharmacological evidence for anxiety-related behavior in zebrafish larvae. **Behavioural Brain Research** 228 (2012) 99– 106

RICO, E. P; et al. Zebrafish neurotransmitter system as potential pharmacological and toxicological targets. **Neurotoxicology & teratology.** xxx (2011) xxx-xxx

RINKWITZ, S.; MOURRAIN, P.; BECKER, T. S. Zebrafish: an integrative system for neurogenomics and neurosciences. **Prog Neurobiol.** 93(2):231-43, 2011.

RODRIGUES, I. R. Composição química do café do alto vale do jequitinhonha e comparação dos efeitos sub- crônicos da cafeína e do café em ratos. **dissertação.** universidade federal dos vales do jequitinhonha e mucuri – UFVJM. 2012.

ROGERS, P.J.; et al. Association of the anxiogenic and alerting effects of caffeine with ADORA2A and ADORA1 polymorphisms and habitual level of caffeine consumption. **Neuropsychopharmacology.** 201035, 1973–1983.

ROSEMBERG, D. B; et al. Differences in Spatio-Temporal Behavior of Zebrafish in the Open Tank Paradigm after a Short-Period Confinement into Dark and Bright Environments. **PLoS ONE** 6(5): e19397. doi:10.1371/journal.pone.0019397(2011)

SALAS, C.; et al. Neuropsychology of learning and memory in teleost fish. **Zebrafish** ;3:157–71, 2006.

SANO, M.; et al. A controlled trial of selegiline, alpha-tocopherol, or both as treatment for Alzheimer's disease. The Alzheimer's Disease Cooperative Study. **New Engl J Med** 336:1216-22, 1997.

SCHNEIDER, C. Chemistry and biology of vitamin E. **Mol. Nutr. Food Res.**, 49: 7-30, 2005.

SCHNÖRR, S. J.; et al. Measuring thigmotaxis in larval zebrafish **Behav Brain Res.** Mar 17;228(2):367-74. doi: 10.1016/j.bbr.2011.12.016. Epub 2011 Dec 19. 2012.

SERRA, E. L.; MEDALHA, C. C.; MATIOLLI, R. Natural Preferences of Zebrafish (*Danio rerio*) for a dark environment. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, 32, 1551-53, 1999.

SHAHZAD, N.; et al. Interactions of atenolol with alprazolam/escitalopram on anxiety, depression and oxidative stress. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior**. 2014.

SHI, D., NIKODIJEVIC', O., JACOBSON, K.A., DALY, J.W. Chronic caffeine alters the density of adenosine, adrenergic, cholinergic, GABA, and serotonin receptors and calcium channels in mouse brain. **Cell. Mol. Neurobiol.** 13, 247–261, 1993.

SHI, D; PADGETT, W. L. DAILY. Caffeine analogs: effects on ryanodine-sensitive calcium-release channels and GABAA receptors. **J. W. Cell Mol Neurobiol.** 2003 Jun;23(3):331-47.

SHIBATA, H; et al. c-Jun N-terminal kinase inhibition and alpha-tocopherol protect midbrain dopaminergic neurons from interferon-gamma/lipopolysaccharide-induced injury without affecting nitric oxide production. **J Neurosci Res.** 2006 Jan;83(1):102-9.

SIES, H. Oxidative stress: oxidants and antioxidants. **Exp. Physiol.** 82, 291–5, 1997.

SILVA, R. H.; FRUSSA-FILHO, R. The plus-maze discriminative avoidance task: a new model to study memory–anxiety interactions. Effects of chlordiazepoxide and caffeine. **Journal of Neuroscience Methods.** 102: 117–125, 2000.

SMITH, A. P.; et al. Vitamin C, mood and cognitive functioning in the elderly. **Nutr Neurosci**; 2:249-56, 1999.

SMITH,A. Effects of caffeine on human behavior. **Food and Chemical Toxicology** 40 1243–1255, 2002.

SMITH, J.E.; et al. Storm in a coffee cup: caffeine modifies brain activation to social signals of threat. *Scan*. doi:10.1093/scan/nsr058, 2011

SOLINAS, M.; et al. Caffeine induces Dopamine and glutamate release in the shell of the nucleus accumbens. **Journal of neuroscience**. 2002.

SPENCE R, GERLACH G, LAWRENCE C, SMITH C. The behaviour and ecology of the zebrafish, *Danio rerio*. **Biol Rev Camb Philos Soc**. 2008 Feb;83(1):13-34. Epub 2007 Dec 17.

SRISUPHAN, W.; BRACKEN, M. B. Caffeine consumption during pregnancy and association with late spontaneous abortion. **Am J Obstet Gynecol** 154: 14-20. 1986.

STEENBERGEN, P.; RICHARDSON, M.; CHAMPAGNE, D. The use of the zebrafish model in stress research, *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry* 35 1432–1451.2010.

STEINERT, J. R.; CHERNOVA, T.; FORSYTHE, I. D. Nitric oxide signaling in brain function, dysfunction, and dementia. **Neuroscientist**,. 16: 435–452. 2010

STEWART; A.; et al. Modeling anxiety using adult zebrafish: A conceptual review. **Neuropharmacology**. Volume 62, Issue 1, Pages 135–143, January 2012.

STEWART; A. M.; et al. Zebrafish models for translational neuroscience research: from tank to bedside. **Trends in neuroscience**. Cell press. Volume 37, Issue 5, Pages 264–278, May 2014

STEWART; A. M; KALUEFF; A. V. Developing better and more valid animal models of brain disorders. **Behavioural Brain Research**. Volume 276, , Pages 28–31, 2015.

STEWART, A.; et al. Neurophenotyping of adult Zebrafish using the light/dark box paradigm. In: Kallueff, A. V.; CACHAT, J. **Zebrafish Neurobehavioral protocols**. **Human Press**, New York, 2010.

STEWART, A.; et al. Pharmacological modulation of anxiety-like phenotypes in adult zebrafish behavioral models. **Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry** Volume 35, Issue 6, Pages 1421–1431, 1 August 2011.

STOCKER, A., AZZI, A. Tocopherol-binding proteins: their function and physiological significance. **Antioxid. Redox Signal.**, 2: 397-404, 2000.

SUBBIAH, S.; KAR, B. Adult zebrafish as a new animal model to study anxiety. **Asian Journal of Experimental Biological Science**, 4, 167-171, 2013.

SUDAKOV, S. K.; MEDVEDEVA, O. F.; RUSAKOVA, I.V., Effect of shortterm and chronic caffeine intake on rats with various anxiety level. **Bull. Exp. Biol. Med.** 132, 1177–1179. 2011.

SWERDLOW, R. H. Treating neurodegeneration by modifying miTOChondria: potential solutions to a “complex” problem. **Antioxid. Redox Signal.** 9, 1591–1603, 2007.

GREEN, D.; et al. Beneficial effect of vitamin E administration on nitric oxide function in subjects with hypercholesterolaemia. **Clinical Science**, 95, (361–367), 1998.

TODA, N.; AYAJIKI, K.; OKAMURA, T. Cerebral blood flow regulation by nitric oxide: recent advances, **Pharmacol. Rev.** 61: 62–97, 2009.

TRABER, M.G. Cellular and molecular mechanisms of oxidants and antioxidants. **Mineral and Electrolyte Metabolism**, Basel, v.23, n.3/6, p.135-139, 1997.

TRABER, M. G.; ATKINSON, J. Vitamin E, antioxidant and nothing more. **Free Radic Biol Med**; 43:4-15, 2007.

TSUBOI, H; et al. Possible connections among job stress, depressive symptoms, lipid modulation and antioxidants. **J Affect Disord**;91(1):63–70, 2006.

URSO, M. L.; CLARKSON, P. M. Oxidative stress, exercise and antioxidant supplementation. **Toxicology**. 189:4154, 2003.

UMEMURA, T; et al. Effects of acute administration of caffeine on vascular function. **Am J Cardiol**. 2006 Dec 1;98(11):1538-41. Epub 2006.

VALKO, M.; Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int. J. Biochem. Cell Biol.*39: 44–84, 2007.

VAN EEDEN F. J. M.; et al. Genetic analysis of fin formation in the zebrafish, *Danio rerio*. *Development*, 1996, 123: 255-262. APUD SERRA, E.L.; MEDALHA, C.C.; MATTIOLLI, R. Natural preference of zebrafish (*Danio rerio*) for a dark environment. Short Communication. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**. 1999.

VASCOTO, S.G.; BECKHAM, Y & Kelly, G. M. The zebrafish's swim to fame as an experimental model in biology. *Biochemical and Cell Biology*, 1997, 75: 479-485. APUD SERRA, E.L.; MEDALHA, C.C.; MATTIOLLI, R. Natural preference of zebrafish (*Danio rerio*) for a dark environment. Short Communication. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**. 1999.

VATASSERY, G. T.; BAUER, T.; DYSKEN, M. High doses of vitamin E in the treatment of disorders of the central nervous system in the aged 1–3 Review article. **Am J Clin Nutr**70:793–801, 1999.

VILELA, D. de A.; et al. Análise da ausência do teor de cafeína nas rotulagens dos cafés comercializados. **Revista Bras. De Obesidade, Nutrição e Emagrecimento**. v. 1, n. 5, p. 92 – 105, 2007.

VINCENT, S. R.; KIMURA, H. Histochemical mapping of nitric oxide synthase in the rat brain, **Neuroscience** 46: 755–784, 1992.

WASHIO, M.; NANISHI, F.; OKUDA, S.; ONOYAMA, K.; FUJISHIMA, M. Alpha tocopherol improves focal glomerulosclerosis in rats with adriamycin-induced progressive renal failure. **Nephron**, 68:347-352, 1994.

WEIA, T.; et al The antioxidant EPC-K1 attenuates NO-induced mitochondrial dysfunction, lipid peroxidation and apoptosis in cerebellar granule cells. **Toxicology**. Volume 134, Issues 2–3, Pages 117–126, 1999.

WEGENER, G.; VOLKE, V. Nitric Oxide Synthase Inhibitors as Antidepressants. **Pharmaceuticals**. 2009.

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

WORKMAN, J. L.; TRAINOR, B. C.; FINY, M. S.; NELSON R. J. Inhibition of neuronal nitric oxide reduces anxiety-like responses to pair housing. **Behavioural Brain Research**. 187 109–115, 2008.

YAMADA, K.; NODA, Y.; NAKAYAMA, S.; KOMORI, Y.; SUGIHARA, H. HASEGAWA T, NABESHIMA T. Role of nitric oxide in learning and memory and in monoamine metabolism in the rat brain. **Br J Pharmacol**, 115:852–858, 1995.

YU, T.W.; ANDERSON, D. Reactive oxygen species induced DNA damage and its modification: a chemical investigation. **Mutation Research**, Amsterdam, v.379, n.2, p.201-210, 1997. *Environmental Toxicology and Pharmacology*. 37(3):916–927, 2014.

ZAIDI, S. M.; BANU, N. Antioxidant potential of vitamins A, E and C in modulating oxidative stress in rat brain. **Clin Chim Acta**340: 229-33, 2004.

ZARRINDAST, M. R.; HOMAYOUN, H.; BABAIE, A.; et al. Involvement of adrenergic and cholinergic systems in nicotine-induced anxiogenesis in mice. **Eur J Pharmacol** 407: 145–158, 2000.

ZARRINDAST, M. R.; NAGHDI-SEDEH, N.; NASEHI, M.; et al. The effects of dopaminergic drugs in the ventral hippocampus of rats in the nicotine-induced anxiogenic-like response. **Neurosci Lett** 475: 156–160, 2010.

ZHANG, J.; SNYDER, S. H. Nitric oxide in the nervous system. **Annu Rev Pharmacol Toxicol.**, 35:213-33, 1995.

ZHANG, M. L. R.; et al. Vitamin C provision improves mood in acutely hospitalized patients. **Nutrition**. 27(5):530-3, 2011.

ZHANG, G. F; et al. Inhibition of the L-arginine-nitric oxide pathway mediates the antidepressant effects of ketamine in rats in the forced swimming test. **Pharmacol Biochem Behav** 24:8–12, 2013.