



CAIO MAXIMINO DE OLIVEIRA

Papel da serotonina no comportamento defensivo do paulistinha (*Danio rerio* Hamilton 1822) adulto: Diferenças entre modelos comportamentais, linhagens e efeitos do estresse predatório agudo

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Neurociências e Biologia Celular do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Pará, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Neurociências e Biologia Celular
Área de concentração: Neurociências

Orientador: Prof. Dr. Anderson Manoel Herculano

Belém/PA
2014

CIP – Catalogação na Publicação

OL48p Oliveira, Caio Maximino de, 1983-

Papel da serotonina no comportamento defensivo do paulistinha (*Danio rerio* Hamilton 1822) adulto: Diferenças entre modelos comportamentais, linhagens, e efeitos do estresse predatório agudo / Caio Maximino de Oliveira - 2014

Orientador: Anderson Manoel Herculano

Tese (Doutorado) - Universidade Federal do Pará, Programa de Pós-Graduação em Neurociências e Biologia Celular, Belém/PA, 2014

1. Neuropsicofarmacologia. 2. Neurociências. 3. Psicopatologia. I. Herculano, Anderson Manoel, orient. II. Título

CDD: 610

CDU: 615

CAIO MAXIMINO DE OLIVEIRA

Papel da serotonina no comportamento defensivo do paulistinha (*Danio rerio* Hamilton 1822) adulto: Diferenças entre modelos comportamentais, linhagens e efeitos do estresse predatório agudo

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Neurociências e Biologia Celular do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Pará, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Neurociências e Biologia Celular (Ênfase em Neurociências) pela Comissão Julgadora composta pelos membros:

COMISSÃO JULGADORA

Prof. Dr. Anderson Manoel Herculano
Universidade Federal do Pará (Presidente)

Prof. Dr. Amauri Gouveia Jr.
Universidade Federal do Pará

Prof. Dr. Fernando Allan Rocha
Universidade Federal do Pará

Prof. Dr. Manoel da Silva Filho
Universidade Federal do Pará

Local de defesa:

Dedico este trabalho a Monica
Gomes Lima

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar, agradeço a Monica Gomes Lima, minha esposa, co-orientanda e colega de trabalho, por todo o apoio e compreensão, e por mitigar minhas ansiedades.

Em seguida, ao meu orientador, Prof. Dr. Anderson Manoel Herculano, pelas oportunidades e portas abertas.

Aos colegas do LNE, pelo apoio logístico e interpessoal.

À CAPES e ao CNPq, pelo apoio financeiro.

Não há algo como o prazer puro; algo de ansiedade sempre o acompanha

(OVÍDIO)

RESUMO

Os transtornos de ansiedade apresentam a maior incidência na população mundial dentre os transtornos psiquiátricos, e a eficácia clínica das drogas ansiolíticas é baixa, em parte devido ao desconhecimento acerca das bases neuroquímicas desses transtornos. Para uma compreensão mais ampla e evolutivamente substanciada desses fenômenos, a utilização de espécies filogeneticamente mais antigas pode ser uma aproximação interessante no campo da modelagem comportamental; assim, sugerimos o uso do paulistinha (*Danio rerio* Hamilton 1822) na tentativa de compreender a modulação de comportamentos tipo-ansiedade pelo sistema serotoninérgico. Demonstramos que os níveis extracelulares de serotonina no encéfalo de paulistinhas adultos expostos ao teste de preferência claro/escuro [PCE] (mas não ao teste de distribuição vertical eliciada pela novidade [DVN]) apresentam-se elevados em relação a animais manipulados mas não expostos aos aparatos. Além disso, os níveis teciduais de serotonina no rombencéfalo e no prosencéfalo são elevados pela exposição ao PCE, enquanto no mesencéfalo são elevados pela exposição ao DVN. Os níveis extracelulares de serotonina estão correlacionados negativamente com a geotaxia no DVN, e positivamente com a escototaxia, tigmotaxia e a avaliação de risco no PCE. O tratamento agudo com uma dose baixa de fluoxetina (2,5 mg/kg) aumenta a escototaxia, a tigmotaxia e a avaliação de risco no PCE, diminui a geotaxia e o congelamento e facilita a habituação no DVN. O tratamento com buspirona diminui a escototaxia, a tigmotaxia e o congelamento nas doses de 25 e 50 mg/kg no PCE, e diminui a avaliação de risco na dose de 50 mg/kg; no DVN, ambas as doses diminuem a geotaxia, enquanto somente a maior dose diminui o congelamento e facilita a habituação. O tratamento com WAY 100635 diminui a escototaxia nas doses de 0,003 e 0,03 mg/kg, enquanto somente a dose de 0,03 mg/kg diminui a tigmotaxia e a avaliação de risco no PCE. No DVN, ambas as doses diminuem a geotaxia, enquanto somente a menor dose facilita a habituação e aumenta o tempo em uma “base” (“homebase”). O tratamento com SB 224289 não produziu efeitos sobre a escototaxia, mas aumentou a avaliação de risco na dose de 2,5 mg/kg; no DVN, essa droga diminuiu a geotaxia e o nado errático nas doses de 2,5 e 5 mg/kg, enquanto a dose de 2,5 mg/kg aumentou a formação de “bases”. O tratamento com DL-*para*-clorofenilalanina (2 injeções de 300

mg/kg, separadas por 24 horas) diminuiu a escototaxia, a tigmotaxia e a avaliação de risco no PCE, aumentou a geotaxia e a formação de bases e diminuiu a habituação no DVN. Quando os animais são pré-expostos a uma “substância de alarme” co-específica, observa-se um aumento nos níveis extracelulares de serotonina associados a um aumento na escototaxia, congelamento e nado errático no PCE; os efeitos comportamentais e neuroquímicos foram bloqueados pelo pré-tratamento com fluoxetina (2,5 mg/kg), mas não pelo pré-tratamento com WAY 100,635 (0,003 mg/kg). Animais da linhagem *leopard* apresentam maior escototaxia e avaliação de risco no PCE, assim como níveis teciduais elevados de serotonina no encéfalo; o fenótipo comportamental é resgatado pelo tratamento com fluoxetina (5 mg/kg). Esses dados sugerem que o sistema serotoninérgico dessa espécie modula o comportamento no DVN e no PCE de forma oposta; que a resposta de medo produzida pela substância de alarme também parece aumentar a atividade do sistema serotoninérgico, um efeito possivelmente mediado pelos transportadores de serotonina, e ao menos um fenótipo mutante de alta ansiedade também está associado a esses transportadores. Sugere-se que, de um ponto de vista funcional, a serotonina aumenta a ansiedade e diminui o medo em paulistinhas.

Palavras-chave: Serotonina, ansiedade, medo, paulistinha

DOI: 10.6084/m9.figshare.941096

ABSTRACT

Anxiety disorders present the highest incidence in the world population among psychiatric disorders, and the clinical efficacy of anxiolytic drugs is low, partially due to lack of knowledge on the neurochemical bases of these disorders. To reach a more ample and evolutionarily grounded comprehension of these phenomena, the use of phylogenetically older species can be an interesting approach in the field of behavioral modeling; thus, we suggest the use of zebrafish (*Danio rerio* Hamilton 1822) in the attempt to understand the modulation of these behaviors by the serotonergic system. We demonstrate that extracellular serotonin levels in the brains of adult zebrafish exposed to the light/dark preference test [LDT] (but not to the novel tank test [NTT]) are increased in relation to animals which are handled, but not exposed to the apparatuses. Moreover, serotonin tissue levels in the hindbrain and forebrain are elevated by the exposure to the LDT, while tissue levels in the midbrain are elevated by exposure to the NTT. Extracellular serotonin levels correlate positively with scototaxis, thigmotaxis and risk assessment in the LDT and negatively with geotaxis in the NTT. Acute treatment with a low dose of fluoxetine (2.5 mg/kg) increases scototaxis, thigmotaxis, and risk assessment in the LDT, and decreases geotaxis and freezing and facilitates habituation in the NTT. Treatment with buspirone decreases scototaxis, thigmotaxis and freezing at 25 and 50 mg/kg in the LDT and decreases risk assessment at 50 mg/kg; in the NTT, both doses decrease geotaxis, while the highest dose decreases freezing and facilitates habituation. Treatment with WAY 100635 decreases scototaxis at 0.003 and 0.03 mg/kg, while only the highest dose decreases thigmotaxis and risk assessment in the LDT. In the NTT, both doses decrease geotaxis, while only the lower dose facilitates habituation and increases homebase time. Treatment with SB 224289 did not alter scototaxis, but increased risk assessment at 2.5 mg/kg; in the NTT, this drug decreased geotaxis and decreased erratic swimming at 2.5 and 5 mg/kg, while at 2.5 mg/kg it increased homebase time. Treatment with DL-*para*-chlorophenylalanine (2 x 300 mg/kg injections, separated by 24 h) decreased scototaxis, thigmotaxis and risk assessment in the LDT, and increased geotaxis and homebase time and decreased habituation in the NTT. When animals were pre-exposed to a conspecific “alarm substance”, extracellular serotonin levels were raised in association with an increase in

scototaxis, freezing and erratic swimming in the LDT; both behavioral and neurochemical effects were blocked by pre-treatment with fluoxetine (2,5 mg/kg), but not with WAY 100,635 (0,003 mg/kg). Animals from the *leopard* strain show increased scototaxis and risk assessment in the LDT, as well as increased 5-HT tissue levels in the encephalon; the behavioral phenotype is rescued by treatment with fluoxetine (5 mg/kg). These data suggest that the serotonergic system of zebrafish modulates behavior in the LDT and NTT in opposite ways; that the fright response produced by alarm substance seems to increase serotonergic activity, an effect which is possibly mediated by serotonin transporters; and that at least one high-anxiety mutant phenotype is associated with serotonin uptake. It is thus suggested that from a functional point of view serotonin increases anxiety and decreases fear in zebrafish.

Keywords: Serotonin, anxiety, fear, zebrafish

DOI: 10.6084/m9.figshare.941096

SUMÁRIO

1. Transtornos de ansiedade.....	13
1.1. Sistema serotoninérgico e ansiedade.....	14
1.1.1. Síntese e metabolismo da serotonina.....	18
1.1.2. Transporte de serotonina.....	21
1.1.3. Receptores de serotonina.....	25
1.1.3.1. Receptor 5-HT _{1A}	26
1.1.3.2. Receptores 5-HT _{1B}	29
1.2. Papel duplo da serotonina nas reações de defesa.....	30
1.3. Modelos comportamentais de ansiedade no paulistinha.....	35
1.3.1. Reação de alarme (“Schrecksreaktion”).....	39
1.3.2. Distribuição vertical eliciada pela novidade e preferência claro/escuro.....	41
1.3.4. Diferenças entre linhagens.....	47
2. Hipótese de trabalho.....	53
3. Objetivos.....	54
3.1. Objetivo geral.....	54
3.2. Objetivos específicos.....	54
4. Métodos.....	55
4.1. Alojamento.....	55
4.2. Drogas e reagentes.....	55
4.3. Preparação de substância de alarme.....	56
4.4. Ensaios comportamentais.....	56
4.4.1. Distribuição vertical eliciada pela novidade.....	57
4.4.2. Preferência claro/escuro.....	57
4.5. Parcelamento do tecido nervoso e preparação de amostras.....	59
4.6. Quantificação de monoaminas.....	59
4.7. Quantificação de proteínas.....	60
4.8. Análise estatística.....	60
5. Resultados.....	61
5.1. Validação da metodologia de quantificação de indoleaminas.....	61
5.2. Níveis de 5-HT e 5-HIAA no encéfalo.....	61
5.2.2. Níveis extracelulares de 5-HT, mas não 5-HIAA, aumentam após a exposição ao PCE, mas não ao DVN.....	61
5.2.3. A exposição ao PCE aumenta o conteúdo de 5-HT no rombencéfalo e prosencéfalo, enquanto a exposição ao DVN aumenta o conteúdo no mesencéfalo.....	63
5.2.4. Os níveis extracelulares de 5-HT correlacionam-se positivamente com o comportamento no PCE e negativamente com o comportamento no DVN.....	65
5.3. O tratamento com uma dose baixa de fluoxetina é ansiogênico no PCE e ansiolítico no DVN.....	67
5.4. O tratamento com uma pCPA é ansiolítico no PCE e ansiogênico no DVN.....	71
5.5. O comportamento no DVN e no PCE está sob inibição tônica mediada pelo receptor 5-HT _{1A}	75
5.6. A ativação tônica do receptor 5-HT _{1B} controla o comportamento no DVN, mas não no PCE.....	83
5.7. Os efeitos da substância de alarme são bloqueados pelo pré-tratamento com fluoxetina.....	87
5.8. O bloqueio do receptor 5-HT _{1A} não altera os efeitos da substância de alarme.....	91

5.9. Paulistinhas da linhagem leopard apresentam menor conteúdo tecidual de serotonina no encéfalo, e maior escototaxia reversível por fluoxetina.....	95
6. Discussão.....	99
6.1. Papel da serotonina extracelular no comportamento tipo-medo e tipo-ansiedade do paulistinha.....	99
6.2. Papel do receptor 5-HT _{1A} no comportamento tipo-medo e tipo-ansiedade no paulistinha.....	105
6.3. Papel do receptor 5-HT _{1B} no comportamento tipo-medo e tipo-ansiedade no paulistinha.....	107
7. Conclusões.....	109
8. Referências.....	110
Anexos.....	133

1. Transtornos de ansiedade

Logo após o aparecimento de uma nova edição do Manual Diagnóstico e Estatístico de Transtornos Mentais (DSM) da Associação Psiquiátrica Americana, o foco sobre a prevalência e sobre o tratamento dos transtornos de ansiedade continua em ascensão. A prevalência para qualquer tipo de transtorno de ansiedade tem sido estimada entre 10-30% (BLAND; ORN; NEWMAN, 1988; DAVEY et al., 2008; KESSLER; GREENBERG, 2002; KESSLER et al., 1994), com a maior prevalência reportada no Rio de Janeiro (22,6%) e a menor em Ankara (Turquia) (1,0%) (MAIER et al., 2000). No Brasil, os transtornos de ansiedade como um todo apresentam-se como a maior categoria nosológica nos estudos epidemiológicos, com prevalência de 9,6% em Porto Alegre, 10,6% em São Paulo, e 17,6% em Brasília (ALMEIDA-FILHO et al., 2011). Ainda que grande parte dessa preocupação seja cultural – o reconhecimento da ansiedade como categoria nosológica psiquiátrica é um produto da cultura ocidental do século XX, afinal de contas (GLAS, 2003; PESSOTTI, 1978; TONE, 2008) –, também parece refletir um maior entendimento do embasamento biológico desses transtornos (GLAS, 2004).

A edição atual do DSM (quarta edição revisada) divide os transtornos de ansiedade em sete categorias maiores e três categorias residuais. Dentre essas doenças psiquiátricas, as melhor caracterizadas e estudadas – e, conseqüentemente, os maiores alvos da modelagem animal – são o **transtorno de ansiedade generalizada** e o **transtorno de pânico**. O primeiro apresenta em seu cerne um construto de “preocupação” excessiva (BARLOW, 2002; BORKOVEC, 1985; BORKOVEC et al., 1983; CORR, 2011; CRASKE et al., 1989; GANA; MARTIN; CANOUET, 2001; THAYER; FRIEDMAN; BORKOVEC, 1996), enquanto o último é caracterizado pelo início súbito de uma tendência à ação de fuga (BARLOW; CHORPITA; TUROVSKY, 1996; BARLOW, 2002; MCNAUGHTON; CORR, 2004; NUTT; MIGUEL; DAVIES, 2008).

Dentre os diversos sistemas que medeiam as respostas normais e patológicas de medo e ansiedade, destacam-se o eixo hipotálamo-pituitária-adrenal, que regula uma resposta neuroendócrina a estressores físicos e psicossociais; e o sistema serotoninérgico, que parece ser especialmente responsivo a esses estressores e seus mediadores. De fato, devido em parte à

eficácia clínica de duas drogas que agem sobre o sistema serotoninérgico – a buspirona, um agonista parcial do receptor 5-HT_{1A}, e os inibidores seletivos da recaptação de serotonina (ISRSs), que bloqueiam o transportador dessa monoamina – um interesse crescente acerca do papel desse neurotransmissor na regulação do comportamento defensivo normal e patológico vêm dominando o cenário da psicobiologia da ansiedade.

1.1. Sistema serotoninérgico e ansiedade (HERCULANO; MAXIMINO, 2014; MAXIMINO et al., 2013a)

Enquanto em mamíferos os neurônios serotoninérgicos centrais estão localizadas na rafe, o paulistinha (*Danio rerio* Hamilton 1822, a espécie que foi utilizada como organismo-modelo nesse trabalho) apresenta pelo menos dois outros conjuntos importantes de células no encéfalo (Figura 1) (LILLESAAR, 2011; MAXIMINO, LIMA, ARAUJO, et al., 2013; PANULA et al., 2010). Dada a homologia entre os neurônios 5-HTérgicos nos núcleos da rafe do paulistinha e dos mamíferos, esses grupos representam as populações mais estudadas em peixes. Diferentemente dos outros núcleos, essas células expressam o gene codificador do fator de transcrição de domínio ETS *pet-1* (LILLESAAR et al., 2007, 2009). No paulistinha, a rafe pode ser dividida em uma porção superior ou rostral e uma porção inferior ou caudal. A rafe superior pode ser dividida basicamente em três populações, baseando-se no padrão de projeções (Figura 1): 1) células dorsais, projetando-se principalmente para o telencéfalo e bulbo olfatório (população 5; PANULA et al., 2010); 2) células ventrais, projetando-se principalmente para o hipotálamo (população 6; PANULA et al., 2010); e 3) células ventrolaterais (população 7; PANULA et al., 2010), projetando-se para os núcleos migrados do hipotálamo (HERCULANO; MAXIMINO, 2014; LILLESAAR, 2011; MAXIMINO et al., 2013a). Os neurônios que se projetam para o telencéfalo dorsomedial e dorsoposterior (Dm e Dp, homólogos à amígdala basolateral e ao córtex piriforme, respectivamente; MAXIMINO, LIMA, OLIVEIRA, K. R. M., et al., 2013) localizam-se mais dorsalmente em comparação com os neurônios que se projetam para o telencéfalo lateral (LILLESAAR et al., 2009). Alguns autores consideram o núcleo dorsal homólogo ao núcleo dorsal da rafe (DRN) e o núcleo ventral homólogo ao núcleo mediano da rafe (MRN) (AIZAWA, AMO e OKAMOTO, 2011; AMO et al., 2010; OKAMOTO, AGETSUMA e AIZAWA, 2011; OKAMOTO, SATO e

AIZAWA, 2008); o núcleo ventrolateral foi considerado homólogo ao núcleo B9 (supralemniscal) em esgana-gatos (EKSTRÖM e VEEN, VAN, 1984), mas as suas projeções para o hipotálamo parecem sugerir que isso não é verdadeiro (LILLESAAR et al., 2009). Essa população localiza-se muito próxima ao núcleo interpeduncular (IPN) e interdigita-se com células catecolaminérgicas (KASLIN e PANULA, 2001), sugerindo homologia com os neurônios serotoninérgicos das porções apical e ventrolateral do IPN, que também projetam-se para o hipotálamo (HALE e LOWRY, 2011). Se esse for o caso, esse grupo celular pode representar o alvo das projeções da habênula dorsal (AGETSUMA et al., 2010; OKAMOTO; AGETSUMA; AIZAWA, 2011a).

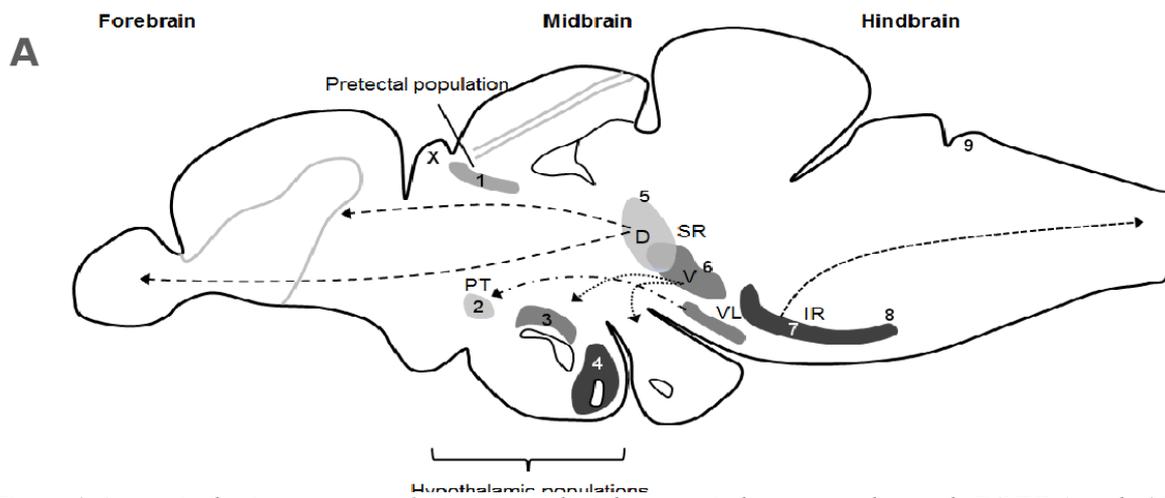


Figura 1: Anatomia do sistema serotoninérgico em paulistinhas, seguindo a nomenclatura de PANULA et al., 2010. X – População pineal; 1 – População pré-tectal; 2-4 – Populações hipotalâmicas periventriculares; 5-7 – Populações da rafe rostral; 8 – População da rafe caudal; 9 – População da area postrema. De HERCULANO E MAXIMINO (2014)

Os alvos das projeções *pet-1*-positivas provindas da rafe superior não são distribuídas no telencéfalo ou mesencéfalo de forma homogênea (Figura 2). No telencéfalo, a porção dorsolateral (possível homólogo do hipocampo; BROGLIO et al., 2005) recebe a inervação mais pesada, seguida das porções dorsomedial (homólogo da amígdala basolateral; MAXIMINO, LIMA, OLIVEIRA, K. R. M., et al., 2013), ventral pós-comissural (homólogo da amígdala central/medial; MAXIMINO, LIMA, OLIVEIRA, K. R. M., et al., 2013) e ventroventral (homólogo do septo; GANZ et al., 2012) (LILLESAAR et al., 2009), onde a densidade de terminais é concordante com a atividade da monoamina oxidase

(ANICHTCHIK et al., 2006). No mesencéfalo, um alto grau de inervação é observado no hipotálamo, seguido do núcleo do fascículo medial longitudinal, do toro lateral e do núcleo central do lobo inferior (LILLESAAR et al., 2009). As células que se projetam para os diversos núcleos hipotalâmicos originam-se nas porções ventral e ventrolateral da rafe superior, e são menores do que as células da porção dorsal (LILLESAAR et al., 2009). Pouca inervação é observada no resto do mesencéfalo, com praticamente nenhuma inervação observada no teto óptico.

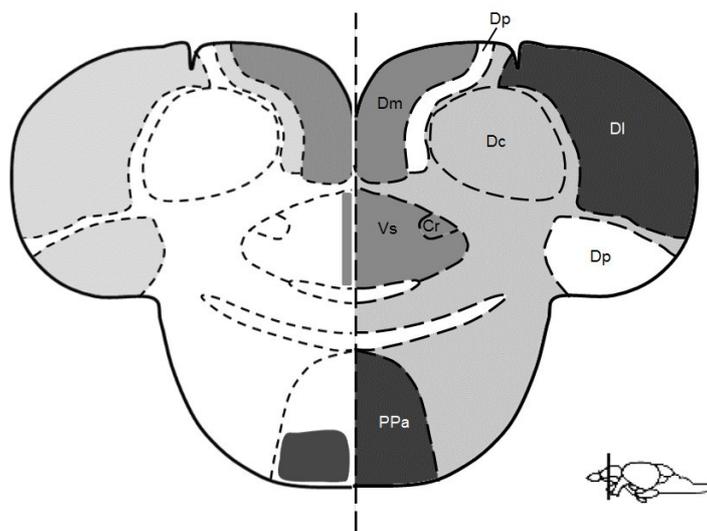


Figura 2: Atividade de monoamina oxidase (esquerda) e inervação por fibras serotoninérgicas (direita) no telencéfalo de paulistinhas no nível da comissura anterior. Níveis de cinza indicam a quantidade aproximada de inervação e/ou atividade da monoamina oxidase. Adaptado de MAXIMINO e HERCULANO, 2010. Abreviações: Cr, anel central do telencéfalo ventral subcomissural; Dc, telencéfalo dorsocentral; Dl, telencéfalo dorsolateral; Dm, telencéfalo dorsomedial; Dp, telencéfalo dorsoposterior; PPa, parte anterior do núcleo pré-óptico parvocelular; Vs, telencéfalo ventral subcomissural.

A rafe inferior (população 8; PANULA et al., 2010) projeta-se rostralmente para o núcleo da válvula lateral (LILLESAAR et al., 2009), uma estrutura pré-cerebelar que contém neurônios sem dendritos e provê fibras musgosas para as células granulares do cerebelo (BUTLER e HODOS, 2005). De forma importante, essa população projeta-se caudalmente para estruturas motoras no rombencéfalo e medula espinhal. Os corpos celulares e axônios da rafe inferior são difíceis de distinguir de outro grupo de células, descritas como grupos B1 e B2 (KASLIN e PANULA, 2001), localizadas na formação reticular intermediária, sob o fascículo longitudinal medial. Essas células expressam *tph2* e *pet-1*, sugerindo que podem produzir serotonina de forma ativa (LILLESAAR et al., 2007, 2009); é provável que essas células

sejam homólogos aos núcleos reticulares da rafe (pálido, obscuro e rubro; KASLIN e PANULA, PERTTI, 2001; LILLESAAR, 2011; MAXIMINO, LIMA, ARAUJO, et al., 2013), e elas recebem projeções dos neurônios mais rostrais da rafe inferior. Ambos os grupos celulares são caracterizados (e dependem de) pela expressão do fator IRX1A (CHENG, C. W. et al., 2007), diferenciando-se dessa forma dos grupos da rafe superior.

No paulistinha (assim como em anfíbios, répteis, aves e mamíferos não-eutérios; (LÓPEZ; GONZÁLEZ, 2014)), *clusters* majoritários de neurônios 5-HTérgicos existem no tubérculo posterior e hipotálamo (KASLIN e PANULA, 2001). Esses neurônios não expressam *pet-1*, dependendo do fator de transcrição de domínio ETS *etv5b* (BOSCO et al., 2013) e da proteína *zinc-finger* FEZF2 (RINK, E e GUO, S, 2004). Essas células expressam ambas as isoformas da *tph1*, assim como outros marcadores de neurônios serotoninérgicos maduros, como a aminoácido L-aromático descarboxilase, a zMAO, a isoforma B do transportador de serotonina, o transportador vesicular de monoaminas 2, a isoforma B do receptor 5-HT_{1A}, o receptor 5-HT_{2C}, e imunoreatividade à serotonina (LILLESAAR, 2011). As células serotoninérgicas localizam-se primariamente opostas ao hipotálamo paraventricular, e são agrupadas em três populações: 1) população 2 (PANULA et al., 2010), localizada medialmente e na porção anterior do órgão paraventricular (PPa); 2) população 3 (PANULA et al., 2010), localizada na porção intermediária do órgão paraventricular (PPi); e população 4 (PANULA et al., 2010), localizada na zona caudal do hipotálamo periventricular (Hc). Essas células contatam vasos sanguíneos e ventrículos através de processos curtos e calibrosos, e também projetam-se profusamente para áreas extra-hipotalâmicas (principalmente telencéfalo ventrodorsal [homólogo ao corpo estriado; GANZ et al., 2012], e telencéfalo dorsocentral e dorsodorsal [homólogos ao isocórtex; MUELLER et al., 2011]). A função dessas três populações é desconhecida.

Finalmente, a população 1 (PANULA et al., 2010) localiza-se no pré-teto, e expressa os marcadores maduros *tph2*, aminoácido L-aromático descarboxilase, isoforma A do transportador de serotonina, transportador vesicular de monoaminas 2, isoforma A do receptor 5-HT_{1A}, receptor 5-HT_{2C}, e imunorreatividade à serotonina (LILLESAAR, 2011); no entanto, a zMAO está ausente (ANICHTCHIK et al., 2006). A maior parte das fibras serotoninérgicas do teto óptico origina-se dessas células (KASLIN e PANULA, 2001). Os núcleos pré-tectais, assim como o teto óptico, foram implicadas na regulação do comportamento visuomotor e

integração sensorial multimodal (ROBLES, SMITH, S. J. e BAIER, 2011; SCOTT e BAIER, 2009; TORRES et al., 2005) e respostas de fuga (HERRERO et al., 1998).

1.1.1. Síntese e metabolismo da serotonina (HERCULANO; MAXIMINO, 2014)

A serotonina (5-hidróxitriptamina, 5-HT) é sintetizada em uma reação de dois passos, de triptofano a 5-hidróxitriptofano (5-HTP) e então a 5-HT. O último passo é catalizado pela amino ácido aromático descarboxilase (AADC; EC 4.1.1.28), enquanto o primeiro passo é catalizado pela triptofano hidroxilase (TPH; EC 1.14.16.4), a enzima limitante na síntese de serotonina (JÉQUIER, LOVENBERG e SJOERDSMA, 1967). Em mamíferos, a TPH está presente no encéfalo principalmente em sua segunda isoforma, TPH2 (WALTHER e BADER, 2003); invertebrados apresentam somente uma isoforma (CURRAN e CHALASANI, 2012) e peixes apresentam quatro isoformas da TPH (*tph1a*, *tph1b*, *tph2* e *tph3*) (BELLIPANNI, RINK, ELKE e BALLY-CUIF, 2002; TERAOKA et al., 2009), todas expressas no encéfalo. No paulistinha, a isoforma 1A é expressa na pineal, retina, hipotálamo, e medula espinhal; a isoforma 1B é expressa na pineal, com uma expressão transitória no hipotálamo; a isoforma 2 é expressa na pineal, retina, área pré-tectal, rafe, e formação reticular; e a isoforma 3 é expressa no diencéfalo ventral e hipotálamo caudal (BELLIPANNI; RINK; BALLY-CUIF, 2002; LILLESAAR, 2011; REN; LI; ZHONG, 2013; TERAOKA et al., 2009).

Em camundongos *knockout* para o gene *tph2*, observa-se uma diminuição na reatividade ao estresse, analisada pelo tempo de imobilidade no segundo dia do teste de nado forçado (BERGER et al., 2012); além disso, esses animais enterram mais pedras no teste de enterramento de objetos, consistente com um aumento na ansiedade ou com um fenótipo obsessivo-compulsivo (SAVELIEVA et al., 2008). Em larvas de paulistinha (6 dpf), a ablação de células expressando *tph2* através de um sistema acoplado a nitrorredutase [Tg(*tph2:nfsB-mCherry*)y226] diminui a excitabilidade comportamental (“*arousal*”), sem alterações na atividade locomotora espontânea (THOMAS et al., 2009). A inibição da triptofano hidroxilase pelo substrato falso DL-*para*-clorofenilalanina (pCPA, 25 μ M) entre 1 e 2 dpf em larvas *shortfin* produz um intenso efeito hipolocomotor que é recuperado em 7 dpf (AIRHART et al., 2007). Esse efeito do pCPA é acompanhado por uma sub-regulação do receptor 5-HT_{1A}

(isoforma não definida) no cérebro e medula espinhal, uma sub-regulação do transportador de serotonina (isoforma também indefinida) na medula espinhal, e uma hipertonicidade dos miótomos; em 7 dpf, quando o efeito hipolocomotor é recuperado, a expressão do transportador de serotonina aumenta no cérebro e na medula espinhal (AIRHART et al., 2007).

A inibição da triptofano hidroxilase em roedores pelo pCPA produz efeitos anti-conflito (RIVERA et al., 2009), diminui a supressão condicionada (ROBICHAUD; SLEDGE, 1969; SÖDERPALM; ENGEL, 1989), aumenta a interação social (HARTMANN; GELLER, 1971), e previne o desenvolvimento do desamparo aprendido após a exposição ao estresse imprevisível (FILE; HYDE, 1977). Em voluntários saudáveis, a depleção de triptofano por uma mistura de aminoácidos sem triptofano potencializa o efeito ansiogênico da ioimbina, um antagonista do adrenoceptor α_2 (MORRIS et al., 1999). Além disso, a depleção de triptofano abole a inibição comportamental após punição, sem afetar a inibição motora ou a habilidade de ajustar o viés da resposta de acordo com a contingência de punição (GODDARD et al., 1995). Pacientes com transtorno de pânico reportam maior ansiedade e sintomas de pânico após a inalação de 35% de CO₂ quando são antes submetidos à depleção de triptofano (CROCKETT; CLARK; ROBBINS, 2009). Da mesma forma, o tratamento de ratos com pCPA aumenta o responder em paradigmas de fuga nos quais a pressão de uma barra desliga a estimulação elétrica da grisea periaquedutal (SCHRUERS et al., 2000). Dessa forma, o tratamento com pCPA ou a depleção de triptofano parecem produzir um efeito ansiolítico e panicogênico.

Após a recaptação do meio extracelular, a 5-HT é metabolizada pela monoamina oxidase (MAO; EC 1.4.3.4) (KISER JR; LEBOVITZ; GERMAN, 1978; KISER JR; LEBOVITZ, 1975), uma enzima que localiza-se na membrana mitocondrial externa (HARE, 1928). Essa enzima cataliza a desaminação oxidativa da serotonina convertendo-a em 5-hidróxid-3-indolacetaldeído, que é posteriormente metabolizado em ácido 5-hidróxi-indolacético (5-HIAA) pela aldeído desidrogenase tipo 2 (EC 1.2.1.3). Em mamíferos, a MAO está presente em duas isoformas, MAO A e MAO B, com a primeira apresentando maior afinidade pela serotonina do que a MAO B (BORTOLATO; CHEN; SHIH, 2010). No paulistinha, somente uma isoforma é encontrada, a zMAO (SETINI et al., 2005). A zMAO apresenta maior afinidade pela tiramina, seguida por cinuramina, serotonina, fenetilamina, MPTP e dopamina

(ALDECO; ARSLAN; EDMONDSON, 2011; ANICHTCHIK et al., 2006). A comparação das sequências da zMAO mostra que o seu domínio de ligação do substrato é idêntico à MAO A humana, enquanto o domínio de ligação da flavina apresenta 80% de identidade com ambas as isoformas humanas (ALDECO; ARSLAN; EDMONDSON, 2011; FIERRO et al., 2013; SETINI et al., 2005). Apesar da identidade entre os domínios de ligação do substrato, a potência inibitória de diversas drogas é diferente entre a zMAO e isoformas humanas (ALDECO; ARSLAN; EDMONDSON, 2011; FIERRO et al., 2013); estudos com modelos computacionais dessas moléculas revelaram possíveis diferenças no modo como essas drogas ligam-se ao sítio ortostérico, sugerindo uma explicação para essa diferença (FIERRO et al., 2013). Histoquimicamente, os maiores níveis de atividade da zMAO são detectados em grupos celulares noradrenérgicos e serotoninérgicos, com atividade baixa a moderada em células dopaminérgicas (ALDECO; ARSLAN; EDMONDSON, 2011; SETINI et al., 2005). Em mamíferos, a inibição da MAO aumenta as concentrações de serotonina no meio extracelular, ao mesmo tempo em que diminui a taxa de disparo dos neurônios serotoninérgicos (BORTOLATO; CHEN; SHIH, 2010). Acredita-se que esses efeitos subjazem a eficácia antidepressiva dos inibidores da MAO; essa classe de drogas também apresenta eficácia clínica no tratamento dos transtornos de pânico e de estresse pós-traumático, mas não no transtorno de ansiedade generalizada (YOUDIM; EDMONDSON; TIPTON, 2006). Camundongos *knockout* para a MAO A ou para a MAO B apresentam maior reatividade ao estresse no teste de nado forçado; nenhum efeito é observado no labirinto em cruz elevado (um teste-padrão de ansiedade) em animais *knockout* para MAO A (CASES et al., 1995; GRIMSBY et al., 1997). Animais duplo *knockout* apresentam hiperatividade locomotora, sem um efeito específico no labirinto em cruz elevado ou no campo aberto (CHEN et al., 2004). O tratamento com moclobemida (10 mg/kg) produz um efeito hiperlocomotor inespecífico em camundongos em diferentes testes de ansiedade (DE ANGELIS, 1996). Em larvas de paulistinha, o tratamento com deprenil (100 μ M entre 0 e 5 dpf), um inibidor da MAO B, aumenta os níveis de 5-HT, mas não dopamina ou noradrenalina; além disso, essa droga leva à liberação de serotonina no diencéfalo de maneira dependente de captação (SALLINEN et al., 2009); em larvas Tg(-3.2*pet:eGFP*)^{ne0214} tratadas entre 3 hpf e 3 dpf, o deprenil não altera a morfologia da rafe inferior ou superior, mas um alongamento dos miótomos é observado (DAHLBOM, 2013). Esse efeito sobre a morfologia da medula espinhal pode explicar porque

o tratamento com deprenil (0-5 dpf) leva a uma diminuição na locomoção espontânea e na geotaxia e um aumento na frequência cardíaca (SALLINEN et al., 2009). Em paulistinhas adultos, o tratamento com o inibidor não-seletivo tranilcipromina diminui a latência para o topo, aumenta o número de entradas e diminui a duração de congelamento no teste de distribuição vertical eliciada pela novidade (DVN) após tratamento agudo ou crônico (STEWART et al., 2011a). O co-tratamento com fluoxetina potencializa esses efeitos (STEWART et al., 2013a). No teste de preferência claro/escuro (PCE), o tratamento com o inibidor da MAO A moclobemida não produz efeitos sobre a preferência pela escuridão ou sobre a locomoção total (MAXIMINO et al., 2011a). Assim, tanto em mamíferos quanto em peixes, a monoamina oxidase parece ter um papel na reatividade ao estresse ou em respostas tipo-pânico, mas não em respostas tipo-ansiedade.

1.1.2. Transporte de serotonina (HERCULANO; MAXIMINO, 2014; STEWART et al., 2014)

Os níveis extracelulares de 5-HT devem ser estritamente controlados pela recaptação em astrócitos e neurônios pré-sinápticos para que essa molécula possa cumprir sua função comportamental e fisiológica. Pelo menos dois mecanismos dessa recaptação foram descritos em mamíferos. O mais conhecido desses mecanismos é o transporte por um carreador de alta afinidade e dependente de sódio e cloreto, o SERT (5-HTT, SLC6A4) (BLACKBURN; FRENCH; MERRILLS, 1967). Esse transportador é encontrado comumente na forma homodimérica, e apresenta importantes interações com diversas proteínas que regulam sua atividade de maneira dependente do estado de fosforilação do carreador (ZHONG; SÁNCHEZ; CARON, 2012). Em mamíferos, uma única isoforma desse transportador é encontrada, sendo altamente concentrada nos núcleos da rafe, projeções tálamo-corticais, e córtex pré-frontal (QIAN et al., 1995). No paulistinha, duas isoformas são encontradas (WANG et al., 2006); a isoforma A é expressa na pineal, pré-tecto, e rafe, enquanto a isoforma B é expressa na retina, hipotálamo e área postrema (LILLESAAAR, 2011; MAXIMINO; HERCULANO, 2010; MAXIMINO et al., 2013a; NORTON; FOLCHERT; BALLY-CUIF, 2008; WANG et al., 2006). A isoforma SERTa apresenta afinidade 35 vezes maior pela desipramina e imipramina e 8 vezes menor pela cocaína em relação ao transportador humano,

principalmente devido a diferenças no domínio transmembrana 10 (SEVERINSEN et al., 2008). Em homogenatos de cérebro total, a captação de serotonina é inibida por desipramina e citalopram com IC₅₀ de 7 e 9 nM, respectivamente (SACKERMAN et al., 2010).

O SERT é o alvo dos inibidores seletivos da recaptção de serotonina (ISRSs), e a administração aguda dessas drogas aumenta os níveis extracelulares de 5-HT preferencialmente nos núcleos da rafe (BEL; ARTIGAS, 1992; GARTSIDE et al., 1995; HERVÁS; ARTIGAS, 1998; MALAGIÉ et al., 1995; SHARP; GARTSIDE; UMBERS, 1997). A ablação genética do SERT resulta em aumento na reatividade ao estresse no teste de nado forçado, hipoatividade, aumento de ansiedade sem alterações no condicionamento de medo, maior sensibilidade aos efeitos ansiogênicos atrasados da exposição ao odor de predador, e diminuição da impulsividade (ADAMEC et al., 2006; KALUEFF et al., 2010); esses efeitos são acompanhados de um aumento de até cinco vezes nas concentrações extracelulares de 5-HT (BENGEL et al., 1998), aumento na síntese de serotonina *in vitro* sem diminuição na atividade da TPH (KIM et al., 2005), redução na expressão do receptor 5-HT_{1A} na rafe sem redução na ligação a proteínas G (LI et al., 2000), diminuição na inibição fásica dos receptores 5-HT_{1A} e GABA_B na rafe, mas não no hipocampo (MANNOURY LA COUR et al., 2001, 2004), e menor expressão de *tph2* na rafe (JAHANSHAHI et al., 2011). A sobre-expressão do SERT, por outro lado, resulta em diminuição na ansiedade (JENNINGS et al., 2006).

O tratamento agudo com ISRSs pode produzir efeitos ansiogênicos (BARRY, 2013; GOMES et al., 2009; HANDLEY; MCBLANE, 1992; KSHAMA et al., 1990; PETKOV; BELCHEVA; KONSTANTINOVA, 1995; SALCHNER; SINGEWALD, 2002, 2006; SILVA; ALVES; SANTAREM, 1999), ansiolíticos (BARBOSA JR et al., 2012; DE ANGELIS, 1996; KASSAI; GYERTYÁN, 2012; KSHAMA et al., 1990; SACKERMAN et al., 2010; STEWART et al., 2011a; WONG; OXENDINE; GODWIN, 2013), ou nenhum efeito (CONCEIÇÃO; ZANGROSSI JR; MILENA DE BARROS VIANA, 2003; GRIEBEL et al., 1997; KASSAI; GYERTYÁN, 2012; SÁNCHEZ; MEIER, 1997; SÁNCHEZ, 1995; STEWART et al., 2011a) em modelos animais de ansiedade, dependendo do modelo, da espécie, da droga e da dose. Em geral, o tratamento agudo de roedores com ISRSs produz efeitos ansiogênicos em modelos de ansiedade e pouco ou nenhum efeito em modelos de pânico (PINHEIRO et al., 2007; ZANGROSSI JR et al., 2001). Entretanto, a variabilidade de

efeitos relatados na literatura também pode se dever a diferenças nos aspectos farmacodinâmicos dos diferentes inibidores utilizados: a fluoxetina, por exemplo, promove a neuroesteroidogênese em doses que, *in vivo*, são ineficazes no bloqueio da recaptação de 5-HT (PINNA; COSTA; GUIDOTTI, 2009), e os estereoisômeros do citalopram agem como bloqueadores diretos (S-citalopram) ou moduladores alostéricos (R-citalopram) da recaptação (CHEN et al., 2005).

Mesmo considerando essas variáveis, algumas explicações para os efeitos ansiogênicos (mas não para a falta de efeito, ou para os efeitos ansiolíticos) dos ISRSs foram aventadas. A administração aguda de fluoxetina (5 mg/kg) exacerba respostas de fuga a um jato de ar quente em ratos, um efeito que é acompanhado do aumento da expressão da proteína c-Fos no loco cerúleo e da liberação de noradrenalina do córtex pré-frontal medial (SALCHNER; SINGEWALD, 2002); esses efeitos são bloqueados pelo pré-tratamento com o antagonista dos receptores 5-HT_{2C} e 5-HT_{2B} SB 206553, mas não com antagonistas dos receptores 5-HT_{1A} (WAY 100635) ou 5-HT_{1B} (SB 224289) (SALCHNER; SINGEWALD, 2006). Em outro estudo utilizando a mesma dose, a expressão de mRNA para *cfos* foi aumentada na amígdala central e no córtex insular anterior e diminuída no septo (SLATTERY et al., 2005). O tratamento com 15 mg/kg de fluoxetina aumenta a expressão de *cfos* no hipotálamo anterior, amígdala central, núcleo parabraquial lateral e tálamo paraventricular, diminuindo a expressão no giro denteado (BECK, 1994); o tratamento com tranilcipromina, por outro lado, induziu a expressão generalizada de *cfos*. Esses dois últimos estudos, entretanto, não analisaram respostas comportamentais, e portanto é difícil saber se as condições do experimento produzem efeitos ansiogênicos ou ansiolíticos. O tratamento com 10 mg/kg de fluoxetina produz efeito ansiogênico no labirinto em cruz elevado, aumentando a excitabilidade intrínseca de neurônios principais da amígdala basolateral *ex vivo* (RAVINDER; PILLAI; CHATTARJI, 2011). Em linhas gerais, o tratamento agudo com ISRSs parece diminuir a atividade dos neurônios na rafe ao aumentar as concentrações de serotonina em autoreceptores 5-HT_{1A} (BEL; ARTIGAS, 1992; EL MANSARI et al., 2005; GARTSIDE et al., 1995; HERVÁS; ARTIGAS, 1998); esse aumento da auto-inibição levaria à liberação da atividade de núcleos inervados pela rafe, um efeito mediado (pelo menos no loco cerúleo) pelo receptor 5-HT_{2C}.

Em peixes, os efeitos dos ISRSs também são mistos, e parte da dificuldade advém da utilização de diferentes vias de administração (STEWART et al., 2014). Em larvas de

paulistinha do tipo selvagem (*shortfin*), o tratamento com fluoxetina (4,6 μM por um período de 24 h entre 3 e 4 ou 4 e 5 dpf) produz efeitos hipolocomotores transitórios (tratamento 3-4 dpf) ou persistentes (4-5 dpf) (AIRHART et al., 2007); esses efeitos são acompanhados por uma diminuição na expressão de mRNA para SERT e para o receptor 5-HT_{1A} na medula espinhal, mas não no cérebro, sugerindo um efeito locomotor. Em outro experimento, o tratamento de larvas da linhagem AB com fluoxetina (5 μM) no período entre 4 e 5 dpf produz um efeito hipolocomotor transitório seguido de um efeito hiperlocomotor em 9 dpf; esse último efeito está associado a movimentos erráticos e perda postural, e é bloqueado pelo pós-tratamento com agonista do receptor dopaminérgico D₂ e antagonista do receptor serotoninérgico 5-HT_{2A} risperidona (PRIETO et al., 2012). O tratamento com fluvoxamina (0.5 μM) entre 3 hpf e 3 dpf, por outro lado, produziu uma sub-regulação da TPH1, receptor 5-HT_{1AB} e SERTb (DAHLBOM, 2013). Em larvas portadoras da mutação *gr^{s357}*, que elimina a capacidade transcricional do receptor glicocorticóide (ZIV et al., 2013), o tratamento com fluoxetina (4,6 μM) por 24 h entre 5 e 6 dpf resgata o efeito hipolocomotor e de hiperrresponsividade a um estímulo auditivo que leva a uma resposta de fuga (GRIFFITHS et al., 2012).

No piaçu *Leporinus macrocephalus*, o tratamento com fluoxetina (10 mg/kg) bloqueia a reação de alarme a uma substância co-específica (BARBOSA JR et al., 2012); no killifish árabe, por outro lado, o mesmo tratamento potencializa o efeito da substância de alarme (BARRY, 2013). Em paulistinhas adultos (*shortfin*), essa dose produz um efeito hiperlocomotor no teste de preferência claro/escuro (PCE), sem efeito sobre a preferência por escuridão (escototaxia) nesse teste (MAXIMINO et al., 2011a). O tratamento hídrico com fluoxetina (1,2 mg/L) diminui a latência e aumenta o número de entradas no topo no teste de distribuição vertical eliciada pela novidade (DVN), um efeito que é potencializado pelo co-tratamento com tranilcipromina (STEWART et al., 2013a); doses menores não produziram efeito nesse teste (STEWART et al., 2011a). O tratamento com citalopram (100 mg/L) diminui a preferência pelo fundo (SACKERMAN et al., 2010). Finalmente, o tratamento com fluoxetina (1-50 $\mu\text{g/L}$) inibe a elevação de cortisol induzida por estresse (ABREU et al., 2014).

O tratamento crônico com ISRSs produz efeitos ansiolíticos claros na maior parte dos testes de ansiedade, medo e pânico em roedores (PINHEIRO et al., 2007; ZANGROSSI JR et al.,

2001). Em paulistinhas adultos, o tratamento com fluoxetina por duas semanas (10 mg/kg, i.p.) diminui a preferência por escuridão (MAXIMINO et al., 2011a). O tratamento com fluoxetina (100 µg/L, via hídrica) por duas semanas também diminui a preferência pelo fundo e a frequência de nado errático no DVN, além de diminuir a concentração de cortisol corporal (CACHAT et al., 2010b; EGAN et al., 2009). Animais adultos portadores da mutação *gr^{s357}* apresentam uma taxa anormal de congelamento no campo aberto e menor tigmotaxia, um fenótipo que é resgatado após o tratamento sub-crônico (4 dias) com fluoxetina (0.8 µM) (ZIV et al., 2013). O tratamento por duas semanas bloqueia o aumento do cortisol corporal induzido pelo isolamento social por duas semanas, além de bloquear o aumento na expressão do receptor mineralocorticóide e do SERTa, efeitos que não são reproduzidos pelo tratamento com diazepam (ZIV et al., 2013). Esses animais não expressam o SERTa na rafe superior, mas a expressão desse transportador mantém-se normal no pré-teto (ZIV et al., 2013), sugerindo que o efeito da fluoxetina no mutante *gr^{s357}* deva ser mediado pelo teto óptico, e não pelo hipotálamo ou pelo telencéfalo. Em animais derivados de uma linhagem selecionada pela alta frequência de congelamento em campo aberto, o tratamento com fluoxetina racêmica (100 µg/L, via hídrica), R-fluoxetina ou S-fluoxetina (33 µg/L, via hídrica) por duas semanas diminui a geotaxia no DVN, sem alterar o congelamento; o tratamento com fluoxetina aumenta a expressão de diversos genes associados às respostas fisiológicas ao estresse, incluindo genes que codificam oxitocina e neuropeptídeo Y, diminuindo a expressão de urocortina 3 e prolactina, além do SERTa (mas não da isoforma B) e do transportador de GABA. Além disso, uma análise de microarranjo revelou que a fluoxetina racêmica crônica também altera a expressão de genes associados à neuroestereoidogênese (WONG; OXENDINE; GODWIN, 2013). Em *Pimephales promelas*, o tratamento crônico com uma concentração 10 vezes menor sub-regula a expressão de genes associados à ligação de neurotransmissores (THOMAS; JOSHI; KLAPER, 2012).

1.1.3. Receptores de serotonina (HERCULANO; MAXIMINO, 2014)

Cerca de 14 receptores de serotonina distintos foram clonados em seres humanos (BARNES; SHARP, 1999; WESTKAEMPER; ROTH, 2006), a maioria dos quais apresentando modificações pós-transcricionais que aumentam enormemente a variação da gama de

respostas que a serotonina pode produzir no encéfalo (DAVIES; CHANG; ROTH, 2006). Enquanto o receptor 5-HT₃ é ionotrópico, todas as outras classes de receptores (5-HT₁-5-HT₇) são metabotrópicos. As vias de transdução canônicas para esses receptores incluem a ligação positiva (5-HT₄, 5-HT₆ e 5-HT₇) ou negativa (5-HT₁ e 5-HT₅) à adenilato ciclase, e ligação positiva ao metabolismo do fosfatidilinositol (5-HT₂) (BARNES; SHARP, 1999; RAYMOND et al., 2001, 2006). Vias não-canônicas incluem a ativação ou inibição da óxido nítrico sintase e a ativação da fosfolipase A2 (BOCKAERT et al., 2010; RAYMOND et al., 2001, 2006). Diversos receptores foram implicados no controle da ansiedade através de experimentos farmacológicos (GUIMARÃES; CAROBREZ; GRAEFF, 2008) e genéticos (BECHTHOLT; LUCKI, 2006). Dentre esses receptores, o 5-HT_{1A} tem sido evidenciado como um importante mediador da ansiedade, enquanto o 5-HT_{1B} parece mediar a reatividade ao estresse (MCDEVITT; NEUMAIER, 2011). Nos focaremos aqui nesses dois receptores.

1.1.3.1. Receptor 5-HT_{1A}

Em vertebrados – incluindo o paulistinha (NORTON; FOLCHERT; BALLY-CUIF, 2008) –, o receptor 5-HT_{1A} apresenta expressão pré-sináptica (somatodendrítica) e pós-sináptica (MENGOD et al., 2006, 2010). Mecanismos de transdução diferentes medeiam a atividade dos receptores 5-HT_{1A} em sítios pré- e pós-sinápticos (ALTIERI et al., 2013). Na rafe, a ativação desses receptores inibe correntes ativadas por altas voltagens (I_{HVA}), e ocorre inibição somente parcial da adenilato ciclase; ambos os efeitos são mediados pela ligação à proteína G_{ai3}. No hipocampo, os heterorreceptores estão ligados principalmente à proteína G_{ao}, enquanto no isocórtex o receptor 5-HT_{1A} ativa as proteínas G_{ai3} e G_{ao} com a mesma eficácia (ALTIERI et al., 2013).

Camundongos *knockout* para o receptor 5-HT_{1A} apresentam comportamento tipo-ansiedade aumentado (RAMBOZ et al., 1998) que é resgatado após a normalização da expressão no prosencéfalo (GROSS et al., 2002), mas não na rafe (PISZCZEK et al., 2013); da mesma forma, a diminuição da densidade de autorreceptores 5-HT_{1A} na idade adulta não altera os níveis basais de ansiedade mas leva a um aumento na reatividade ao estresse nos testes de nado forçado e suspensão pela cauda após estresse prolongado (RICHARDSON-JONES et al., 2010). A sobre-expressão de receptores 5-HT_{1A} na rafe também aumenta a ansiedade em diversos modelos (PISZCZEK et al., 2013), sugerindo que a auto-regulação do tônus serotoninérgico durante o desenvolvimento tem papel importante na maturação dos circuitos que organizam o comportamento defensivo. De forma oposta, a microinjeção de agonistas do receptor 5-HT_{1A} reduz comportamentos tipo-ansiedade em diversos modelos, mas a injeção de antagonistas parece não produzir efeito (ENGIN; TREIT, 2008; MENARD; TREIT, 1999). Quando a supressão genética é feita no nascimento e mantida durante a maturação, no entanto, observam-se aumentos na ansiedade no campo aberto e preferência claro/escuro, enquanto a reatividade ao estresse permanece normal (RICHARDSON-JONES et al., 2011).

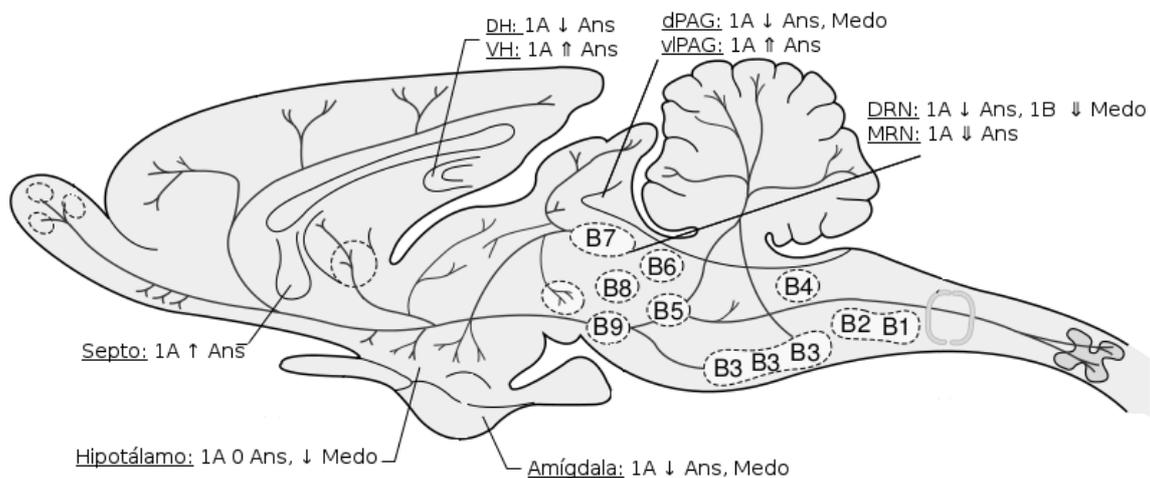


Figura 3: Papel dos receptores 5-HT_{1A} ('1A') e 5-HT_{1B} ('1B') na regulação do comportamento tipo-ansiedade ('Ans') e tipo-medo ('Medo') no encéfalo de mamíferos. '↑' refere-se à ativação fásica, '↑↑' à ativação tônica; '↓' refere-se à inibição fásica, '↓↓' à inibição tônica; '0' refere-se a falta de efeito. B1-B9, núcleos serotoninérgicos; DH, hipocampo dorsal; dPAG, grisea periaquedutal dorsal; MRN, núcleo mediano da rafe; VH, hipocampo ventral; vPAG, grisea periaquedutal ventrolateral.

No lado pós-sináptico da equação, a participação do receptor 5-HT_{1A} também é complexa. Como apontado, a normalização da expressão em estruturas prosencefálicas na idade adulta

em camundongos *knockout* para o receptor 5-HT_{1A} resgata o fenótipo de ansiedade elevada (GROSS et al., 2002). Duas estruturas importantes foram implicadas nesse papel: a amígdala central e o giro denteado do hipocampo. Em camundongos que expressam receptores 5-HT_{1A} somente na amígdala central, o tratamento com o agonista 8-OH-DPAT diminui o congelamento e aumenta a avaliação de risco, um efeito que é associado à ativação cortical dependente de núcleos colinérgicos do prosencéfalo basal (GOZZI et al., 2010). Em camundongos que expressam receptores 5-HT_{1A} somente no giro denteado, o tratamento com 8-OH-DPAT diminui o congelamento em resposta a pistas com pareamento imperfeito ao estímulo aversivo, mas não o congelamento em resposta a pistas com pareamento perfeito, enquanto camundongos *knockout* não apresentam essa resposta e animais com expressão do receptor 5-HT_{1A} somente na amígdala central apresentam diminuição do congelamento em resposta a ambos os tipos de pista (TSETSENIS et al., 2007). A microinjeção de agonistas do receptor 5-HT_{1A} no hipocampo dorsal de ratos produz efeitos ansiolíticos, mas nenhum efeito é observado no hipocampo ventral; inversamente, a microinjeção de antagonistas não produz efeitos no hipocampo dorsal, e produz efeitos ansiolíticos no hipocampo ventral (ENGIN e TREIT, 2008; MENARD e TREIT, 1999). De forma oposta, o 8-OH-DPAT facilita a esquivas inibitória no labirinto em T elevado quando injetado do hipocampo dorsal de ratos, mas o antagonista WAY 100635 não apresenta efeito (GUIMARÃES et al., 2010). No septo lateral de ratos, a microinjeção de agonistas é ansiogênica enquanto que, na amígdala, essas drogas são ansiolíticas (ENGIN e TREIT, 2008; MENARD e TREIT, 1999); é pouco provável que esse último efeito seja mediado pela amígdala basolateral, dado que microinjeções de agonistas do receptor 5-HT_{1A} nessa estrutura não alteram o comportamento tipo-ansiedade de ratos (ENGIN e TREIT, 2008). No labirinto em T elevado, a microinjeção de 8-OH-DPAT na amígdala basolateral e na amígdala medial inibem a esquivas inibitória em ratos, enquanto a fuga é inibida por esse tratamento somente na amígdala basolateral (GUIMARÃES et al., 2010). Na grisea periaqueductal dorsolateral de ratos, o 8-OH-DPAT diminui a esquivas inibitória e a fuga no labirinto em T elevado, enquanto o WAY 100635 não tem efeito; na porção ventrolateral, no entanto, tanto o 8-OH-DPAT quanto o WAY 100635 diminuem a esquivas inibitória, mas não a fuga (GUIMARÃES et al., 2010). Assim, o receptor 5-HT_{1A} parece regular de forma positiva e tônica a ansiedade no sistema septo-hipocampal e na grisea periaqueductal ventral, enquanto regula a ansiedade e o medo de forma negativa e fásica nas

outras estruturas (Figura 3).

No paulistinha, o gene que codifica o receptor 5-HT_{1A} passou por um evento de duplicação e retenção, produzindo duas isoformas (NORTON; FOLCHERT; BALLY-CUIF, 2008). O mRNA para *htr1aa* é encontrado na parte anterior do hipotálamo pré-óptico parvocelular, zona cinzenta periventricular do teto óptico, núcleo talâmico centroposterior, partes ventral e dorsal do pré-tecto, núcleo periventricular do tubérculo posterior, núcleo difuso do lobo inferior, órgão paraventricular, núcleo tegmental dorsorostral, e rafe superior; o gene *htr1ab* é expresso nas mesmas regiões, no telencéfalo ventral, hipotálamo periventricular e grisea periaqueductal. Em animais adultos, o tratamento com o agonista parcial do receptor 5-HT_{1A} buspirona produz efeitos marcadamente ansiolíticos, diminuindo a geotaxia no DVN (sem alterar a tigmotaxia ou o congelamento) (BENCAN; SLEDGE; LEVIN, 2009; MAASWINKEL; ZHU; WENG, 2012) e na tarefa de comportamento grupal (sem alterar a coesão do cardume ou o congelamento) (GEBAUER et al., 2011; MAASWINKEL et al., 2013); diminuindo a escototaxia no PCE (ARAUJO et al., 2012; LAU et al., 2011; MAXIMINO et al., 2011a) e aumentando a preferência por um co-específico (BARBA-ESCOBEDO; GOULD, 2012); além disso, em larvas a buspirona diminui a fototaxia e aumenta a duração dos períodos de descanso (RIHEL et al., 2010). O tratamento com o antagonista p-MPPF diminui a preferência por substrato (geotaxia) e diminui o nado errático, além de produzir efeito hiperlocomotor (NOWICKI et al., 2014).

1.1.3.2. Receptores 5-HT_{1B}

Em comparação com o receptor 5-HT_{1A}, pouco se sabe sobre o papel do receptor 5-HT_{1B} no controle do comportamento defensivo. A localização primariamente pré-terminal dos autorreceptores 5-HT_{1B} sugere que estes podem ter um importante papel no controle do tônus serotoninérgico (MCDEVITT; NEUMAIER, 2011) e, portanto, na reatividade ao estresse (MAXIMINO, 2012). Em paulistinhas, o antagonista do receptor 5-HT_{1B} GR 55462 diminui a geotaxia mas aumenta o nado errático no DVN (NOWICKI et al., 2014). Os efeitos do *knockout* do receptor 5-HT_{1B} em camundongos são opostos àqueles observados após a manipulação genética dos receptores 5-HT_{1A}. Camundongos *knockout* para esse receptor apresentam atividade exploratória aumentada no campo aberto que desaparece após múltiplas exposições (RAMBOZ et al., 1996), enquanto camundongos *knockout* para o receptor 5-HT_{1A}

apresentam atividade diminuída no campo aberto (RAMBOZ et al., 1998). Além disso, enquanto camundongos *knockout* para o receptor 5-HT_{1A} apresentam ansiedade aumentada no labirinto em cruz elevado e no teste de hiponeofagia, camundongos *knockout* para o receptor 5-HT_{1B} apresentam ansiedade diminuída (RAMBOZ et al., 1996, 1998). Camundongos *knockout* para o receptor 5-HT_{1B} apresentam níveis diminuídos de serotonina no núcleo acumbente, loco cerúleo e medula espinhal, mas não em regiões comumente associadas com comportamento tipo-ansiedade e tipo-medo (ASE et al., 2000). A sobre-expressão do receptor 5-HT_{1B} no DRN aumenta o comportamento tipo-ansiedade no labirinto em cruz elevado e no campo aberto após estresse inescapável, mas o diminui na ausência de estresse prévio (CLARK et al., 2002); um efeito similar é observado no sobressalto potencializado pelo medo, onde animais sobre-expressando o receptor no DRN apresentam diminuição na potencialização na ausência de estresse prévio, um efeito que é abolido pelo estresse inescapável (CLARK et al., 2004). A sobre-expressão especificamente na porção caudal do DRN diminui a imobilidade no teste de nado forçado e o medo condicional ao contexto (MCDEVITT et al., 2011). Assim, a modulação da função do receptor 5-HT_{1B} parece estar associada com a reatividade ao estresse, mas não com o comportamento tipo-ansiedade (SVENNINGSSON et al., 2011).

1.2. Papel duplo da serotonina nas reações de defesa

Os primeiros reportes do papel do sistema serotoninérgico no controle do comportamento defensivo em modelos animais data da década de 1970. ROBICHAUD e SLEDGE (1969) demonstraram que a inibição da síntese de serotonina com a *para*-clorofenilalanina (pCPA) aumenta a frequência de uma resposta apetitiva que havia sido punida anteriormente (i.e., tem efeitos anti-conflito). Pouco depois, GRAEFF e SCHOENFELD (GRAEFF; SCHOENFELD, 1970; SCHOENFELD, 1976) demonstraram que a metisergida, o ácido lisérgico e o ácido bromolisérgico, todos antagonistas não-seletivos de receptores 5-HTérgicos, produzem efeitos similares, enquanto o agonista não-seletivo α -metiltryptamina aumenta o efeito da punição. Na mesma direção, a destruição de fibras serotoninérgicas (através da 5,7-DHT) no tegmento ventromedial de ratos bloqueia a aquisição da supressão condicionada (TYE; EVERITT; IVERSEN, 1977). WISE e colaboradores (1972) reportaram que o agonista benzodiazepínico

oxazepam diminui o metabolismo da serotonina no mesencéfalo na mesma dose que produz um efeito anti-conflito em ratos. Esses resultados levaram à noção de que a serotonina teria um efeito ansiogênico.

Entretanto, observações posteriores sugeriram que a serotonina tem efeitos opostos sobre respostas mediadas pela grisea periaqueductal, dado que manipulações que diminuem a transmissão serotoninérgica (como administração de pCPA ou de antagonistas não-seletivos) aumentam as respostas de pressão à barra que desligam a estimulação elétrica dessa região, e tratamentos que aumentam a transmissão serotoninérgica reduzem esse responder (KISER JR; GERMAN; LEBOVITZ, 1978; KISER JR; LEBOVITZ; GERMAN, 1978; KISER JR; LEBOVITZ, 1975; SCHENBERG; GRAEFF, 1978). Conforme aventado acima, o receptor 5-HT_{1A} parece regular de forma positiva e tônica a ansiedade no sistema septo-hipocampal e na grisea periaqueductal ventral, enquanto regula a ansiedade e o medo de forma negativa e fásica nas outras estruturas (Figura 3).

DEAKIN e GRAEFF (1991) sugeriram que a serotonina exerce ações opostas sobre a ansiedade – possivelmente mediada pelos núcleos amigdalóides (via receptores 5-HT₂ e 5-HT₃) – e sobre o medo – possivelmente mediado pela grisea periaqueductal (via receptores 5-HT_{1A} e 5-HT₂) –, aumentando a primeira e inibindo a última.

Esse modelo teórico foi refinado através da observação cuidadosa do comportamento defensivo em diversos contextos após a microinjeção de agonistas e antagonistas serotoninérgicos em regiões do circuito defensivo de roedores (Figura 3). Assim, em um contexto de evitação defensiva (i.e., quando a resposta apropriada é a fuga ou retirada do contexto aversivo) a serotonina diminuiria o medo na amígdala, hipotálamo e grisea periaqueductal, enquanto em situações de aproximação defensiva (i.e., quando o animal deve mover-se na direção do contexto aversivo ou inibir seu comportamento de exploração de um contexto potencialmente aversivo) a serotonina pode aumentar (hipocampo ventral, grisea periaqueductal ventral) ou diminuir (hipocampo dorsal, amígdala, grisea periaqueductal dorsal) o comportamento defensivo (Figura 4) (GRAEFF; VIANA; MORA, 1996; GUIMARÃES et al., 2010; PAUL et al., 2014; ZANGROSSI JR et al., 2001).

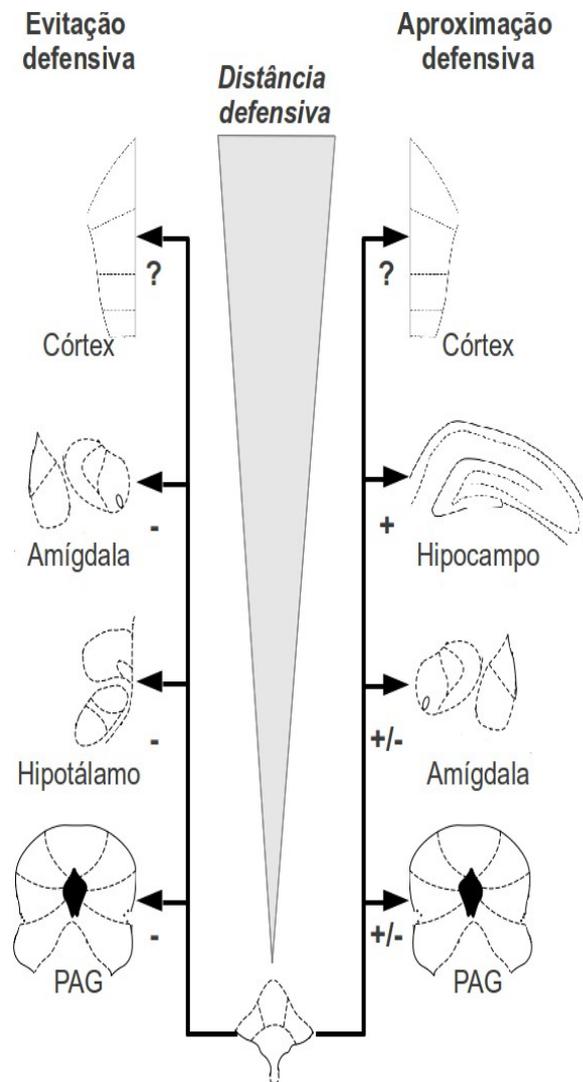


Figura 4: Duplo papel da serotonina na regulação do comportamento defensivo. A serotonina regula o comportamento defensivo em dois sistemas paralelos organizados de forma rostrocaudal (MCNAUGHTON; CORR, 2004). A figura também ilustra os resultados obtidos após a injeção intracerebral de agonistas serotoninérgicos (cf. Figura 3) na grisea periaquedutal (PAG), hipotálamo medial, amígdala, sistema septo-hipocampal ou córtex pré-frontal medial em modelos de ansiedade ou medo em roedores. + indica facilitação; - indica inibição; ? Indica áreas onde os efeitos dessas drogas não foram testados. Adaptado de GUIMARÃES et al. (2010).

Esse modelo é complexificado pelas observações utilizando antagonistas dos receptores serotoninérgicos. Por definição, um antagonista não possui eficácia (BINDSLEV, 2008), e portanto só pode produzir um efeito fisiológico na presença de um agonista endógeno ou exógeno; se o antagonista por si só tem um efeito fisiológico, isso implica em uma ativação tônica do receptor. Essas observações sugerem que, na grisea periaquedutal ventral (mas não dorsal) e no sistema septo-hipocampal a serotonina parece regular a ansiedade de forma

tônica, enquanto a ansiedade e o medo são regulados de forma fásica nas outras estruturas (Figura 3). No entanto, o comportamento defensivo não ocorre em um vácuo, e depende de um contexto.

Da mesma forma, a liberação de serotonina no encéfalo também depende de aspectos do ambiente que compõem esse contexto defensivo (MAXIMINO, 2012). O conflito motivacional é um aspecto importante para a liberação de serotonina no hipocampo: enquanto a exposição a um labirinto em cruz elevado normal aumenta a liberação de serotonina no hipocampo ventral de ratos, a exposição a um labirinto “inativado” (i.e., um aparato sem braços abertos, que poderia gerar excitação comportamental [“arousal”] pela novidade, mas não conflito) ou a exposição a ruído branco no alojamento não o faz (REX; VOIGT; FINK, 2005). Da mesma forma, ratos sujeitados ao teste de conflito de Vogel apresentam aumento na liberação de serotonina no hipocampo dorsal (MATSUO et al., 1996). A exposição ao labirinto em cruz elevado (BEIJAMINI; GUIMARÃES, 2006) e a performance de esquiva (mas não fuga) no labirinto em T elevado (SILVEIRA et al., 2001) aumentam a expressão de c-Fos no DRN de ratos, assim como a exposição a um campo aberto sob condições de alta iluminação (HALE et al., 2006).

A controlabilidade do estressor também parece ser um importante aspecto na liberação de serotonina. O estresse de contenção (incontrolável por definição) aumenta a liberação de serotonina da amígdala central (MO et al., 2008), colículo inferior (HALL et al., 2012), hipotálamo dorsomedial (LOWRY et al., 2003) e córtex frontal (MONGEAU et al., 2010) em roedores. Da mesma forma, em trutas (*Oncorhynchus mykiss*) selecionadas para menor liberação de cortisol após estresse de contenção há um aumento no *turnover* basal de serotonina no telencéfalo, apesar de não haver diferenças entre animais selecionados para maior ou menor responsividade ao estresse nessa medida *após* estresse (ØVERLI; WINBERG; POTTINGER, 2005; ØVERLI et al., 2007). O choque inescapável, mas não a administração de choque escapável, aumentam a liberação de 5-HT na amígdala basolateral e hipocampo ventral de ratos, e animais expostos previamente a choques inescapáveis apresentam um aumento nessa liberação em resposta a dois choques breves (AMAT et al., 1998a, 1998b). A expressão da proteína c-Fos também é elevada no DRN após choque inescapável, mas não após choque escapável (GRAHN et al., 1999). A exposição de camundongos a um predador em situação inescapável aumenta a liberação de 5-HT no

hipocampo, córtex pré-frontal medial, e septo, mas não no corpo estriado (BEEKMAN; FLACHSKAMM; LINTHORST, 2005; HAYLEY et al., 2001). No momento, não se sabe se a presença de vias de fuga durante a exposição ao predador altera a liberação de serotonina nessas regiões.

Em linhas gerais, situações de aversividade mediana a alta tendem a aumentar a atividade no DRN com aumentos concomitantes da liberação de 5-HT em alvos prosencefálicos desse núcleo. Além disso, peptídeos ansiogênicos aumentam a liberação de serotonina no hipocampo, amígdala e córtex pré-frontal, enquanto peptídeos ansiolíticos apresentam efeito oposto (MAXIMINO, 2012). Finalmente, diversos outros sistemas de neurotransmissores e neuropeptídeos que mediam o comportamento tipo-ansiedade modulam diretamente a liberação de serotonina em situações ansiogênicas (Tabela 1; MAXIMINO, 2012).

Substância	Efeito comportamental	Liberação de serotonina
Fator de liberação da corticotropina (CRF)	Ansiogênico	↑ Hipocampo, amígdala, córtex pré-frontal ↓ Septo lateral
Colecistocinina (CCK)	Ansiogênico	↑ Córtex pré-frontal
Substância P	Ansiogênico	↑ Hipocampo
Galanina	Ansiolítico	↓ Hipocampo
Hipocretina	Ansiogênico	↑ DRN
Urocortina 1, 2	Ansiogênico	↑ Hipocampo, amígdala
Somatostatina (SST)	Ansiolítico	↑ Hipocampo
Agonistas A ₁ R	Ansiolítico	↓ Hipocampo
Agonistas canabinóides	Ansiolítico	↓ Hipocampo, córtex pré-frontal
Doadores de óxido nítrico	Bifásico	Bifásico DRN, hipotálamo, hipocampo, córtex pré-frontal
Benzodiazepínicos	Ansiolítico	↓ Hipocampo
Triazolo-benzodiazepínicos	Ansiolítico	↑ Hipocampo

Tabela 1: Peptídeos ansiolíticos e ansiogênicos, assim como drogas ansiolíticas e ansiogênicas, produzem efeitos previsíveis sobre a liberação de serotonina. Adaptado de MAXIMINO, 2012

1.3. Modelos comportamentais de ansiedade no paulistinha (MAXIMINO et al., 2012)

Nas sessões anteriores, antevemos os efeitos de algumas drogas que agem sobre o sistema serotoninérgico sobre o comportamento nos modelos de preferência claro/escuro (PCE) e distribuição vertical eliciada pela novidade (DVN), nos abstendo de prover mais detalhes sobre esses testes. No paulistinha, como em roedores, a maioria dos modelos que avaliam construtos de ansiedade e efeitos de estressantes utiliza o comportamento exploratório do animal em um ambiente novo aversivo (centro de um campo aberto, topo de um aquário novo no DVN, compartimento claro no PCE, região mais próxima a um predador, região mais próxima a um co-específico desconhecido, região mais próxima a um objeto novo) como índice de ansiedade, provendo controles para a variabilidade locomotora através da avaliação do comportamento exploratório em ambiente novo menos aversivo (periferia do campo aberto, fundo do aquário novo, compartimento escuro no teste de PCE, região mais distante ao predador, objeto ou co-específico novo) ou locomoção total (KALUEFF et al., 2012; MAXIMINO et al., 2010a; STEWART et al., 2011b; SUBBIAH; KAR, 2013).

Além das observações da distribuição espaço-temporal do comportamento exploratório, a utilização de medidas “etológicas” – ou seja, em atos comportamentais específicos e discretos que ocorrem quando o animal está explorando o aparato (RODGERS et al., 1997) – é bastante útil; em alguns casos, esses padrões são identificados com algoritmos de mineração de dados sem intervenção do experimentador (p. ex., (CACHAT et al., 2011a; KOKEL et al., 2010; MAXIMINO et al., 2014b; RIHEL et al., 2010; STEWART et al., 2013b), diminuindo o antropomorfismo na seleção das variáveis independentes mas ao mesmo tempo diminuindo a validade de construto (CRABBE; MORRIS, 2004; MAXIMINO; BRITO; GOUVEIA JR, 2010). No paulistinha, essa aproximação ainda é incipiente, mas apresenta grande potencial. Uma importante contribuição vem do trabalho do International Zebrafish Neuroscience Research Consortium (KALUEFF et al., 2013), que formulou um catálogo de unidades discretas de comportamento observado em diversos domínios nessa espécie. Ali, o termo ZBC 1.6, “comportamento de ansiedade (ou “tipo-ansiedade””, é definido como

o comportamento complexo evocado por ambientes / estímulos perigosos ou potencialmente perigosos. Inclui exploração reduzida, e manifesta-se tipicamente em **geotaxia (mergulho), tigmotaxia, escototaxia, congelamento, movimentos**

operculares, mudança de coloração corporal, e movimentos erráticos (zig-zague) [...]. Drogas ansiolíticas geralmente reduzem comportamentos tipo-ansiedade, enquanto agentes ansiogênicos potenciam essas respostas. O comportamento tipo-ansiedade do paulistinha frequentemente se sobrepõe ao **comportamento relacionado ao medo** [...]” (KALUEFF et al., 2013).

A geotaxia (ZBC 1.46) e a escototaxia (ZBC 1.137) são os comportamentos observados nos dois testes mais comumente utilizados – a distribuição vertical eliciada pela novidade (“*novel tank test*”) e a preferência claro/escuro, respectivamente –, e serão tratados com maior cuidado abaixo. Dentre os outros padrões, tigmotaxia, congelamento, nado errático e formação de bases são comumente analisadas em diferentes modelos (LÓPEZ-PATIÑO et al., 2008a; MAXIMINO et al., 2010a; RICHENDRER et al., 2011; STEWART et al., 2010; SUBBIAH; KAR, 2013). A tigmotaxia (ZBC 1.173) é definida como “a preferência por permanecer em proximidade a um canto/parede (e evitar áreas centrais abertas)”. Foi reportada pela primeira vez no paulistinha em modelos de campo aberto (AHMAD; RICHARDSON, 2013; DADDA et al., 2010; LÓPEZ-PATIÑO et al., 2008a; STEWART et al., 2012b), e permanece a medida primária de ansiedade nesse modelo. Esse comportamento é aumentado após o tratamento com o antagonista do sítio benzodiazepínico FG-7142 (LÓPEZ-PATIÑO et al., 2008a) e a retirada de cocaína (LÓPEZ-PATIÑO et al., 2008a, 2008b), e diminuído após o tratamento com buspirona (AHMAD; RICHARDSON, 2013). Animais que apresentam uma mutação que afeta a capacidade transcricional do receptor glicocorticóide ($gr^{s357/s357}$) não apresentam tigmotaxia no campo aberto ou resposta de camuflagem, um efeito que é revertido após o tratamento com fluoxetina por quatro dias (GRIFFITHS et al., 2012; ZIV et al., 2013). No PCE, a tigmotaxia no compartimento branco não apresenta habituação intra- ou inter-sessões, mas diminui após confinamento nesta porção do aparato antes do teste (MAXIMINO et al., 2010b). No entanto, a tigmotaxia é mais frequente no compartimento preto no que no compartimento branco (e mais frequente em um compartimento transparente do que em um compartimento branco) (BLASER; PEÑALOSA, 2011), e animais que apresentam maior evitação do compartimento branco também apresentam maior tigmotaxia quando confinados no compartimento preto antes do teste (BLASER; CHADWICK; MCGINNIS, 2010). BLASER e colaboradores sugeriram que as paredes do compartimento preto podem fornecer a oportunidade de fuga, enquanto as paredes do compartimento branco não o fazem, produzindo congelamento em seu lugar; no entanto, a

frequência de congelamento parece também ser maior no compartimento preto do que no compartimento branco (BLASER; CHADWICK; MCGINNIS, 2010), dificultando a interpretação dessa medida.

O congelamento (ZBC 1.68) refere-se à “cessação completa de movimento (com exceção das guelras e olhos) pelo peixe no fundo do aquário”; essa medida é aumentada no compartimento branco do PCE (MAXIMINO et al., 2010b), e parece ser o melhor preditor do aumento da ansiedade nesse teste (BLASER; CHADWICK; MCGINNIS, 2010). No entanto, ainda que o animal só emita congelamento por cerca de um terço do tempo em que permanece no compartimento preto, virtualmente todo o congelamento de uma sessão parece ser emitido nessa porção do aparato (BLASER; PEÑALOSA, 2011). O confinamento repetido no compartimento branco diminui o congelamento sem diminuir a preferência pelo compartimento preto (MAXIMINO, 2011a; MAXIMINO et al., 2010b); esses elementos sugerem que, em paulistinhas, o congelamento parece fazer parte de uma categoria de “avaliação de risco”, diferentemente do que é observado em roedores. No DVN, o congelamento apresenta habituação intra- e inter-sessões (WONG et al., 2010), o que não é observado no PCE (MAXIMINO et al., 2010b). No entanto, a habituação do congelamento no DVN não difere entre animais com maior ou menor preferência pelo fundo (STEWART et al., 2013b). Animais selecionados para maior ou menor congelamento no campo aberto apresentam alterações concordantes no congelamento no DVN e após a exposição a uma substância de alarme co-específica; animais selecionados para maior congelamento apresentam maior preferência pelo fundo, maior preferência por escuridão, e maior hiponeofagia do que animais selecionados para menor congelamento (WONG et al., 2012). No campo aberto, animais *gr^{s357/s357}* apresentam respostas de congelamento exageradas associadas a uma diminuição na expressão do SERTa na rafe superior; esse fenótipo é resgatado com o tratamento agudo com diazepam ou sub-crônico (4 dias) com fluoxetina (ZIV et al., 2013). Curiosamente, o tratamento agudo ou crônico com fluoxetina não parece alterar o congelamento no DVN em animais do tipo selvagem do fenótipo *shortfin*, ainda que o tratamento com o diazepam diminua essa medida nesse teste (CACHAT et al., 2010b; EGAN et al., 2009; STEWART et al., 2013a).

O nado errático (ZBC 1.51) é definido como “pulsos de alta aceleração em sucessão rápida nos quais a direção do movimento também muda de maneira aparentemente estocástica entre

eventos”. Esse padrão de nado não é afetado pela exposição a um predador simpátrico (BASS; GERLAI, 2008), mas é afetado pela exposição a um modelo de predador (AHMED; FERNANDES; GERLAI, 2012; BLASER; GERLAI, 2006; LUCA; GERLAI, 2012a) ou a uma substância de alarme ou seus constituintes hipoxantina-3-*N*-óxido ou fragmentos de condroitina (MATHURU et al., 2012; PARRA; ADRIAN JR; GERLAI, 2009; SPEEDIE; GERLAI, 2008) – sugerindo participação em uma síndrome de reações de medo. No PCE, não foram observadas diferenças entre animais que evitam mais ou menos o compartimento branco em termos de nado errático, mas esse comportamento co-varia com a preferência por escuridão em uma análise fatorial (BLASER; CHADWICK; MCGINNIS, 2010); além disso, esse comportamento não ocorre com maior frequência em nenhum dos dois compartimentos do aparato (BLASER; PEÑALOSA, 2011). No DVN, também não são observadas diferenças no nado errático em animais com maior ou menor preferência pelo fundo (STEWART et al., 2013b), e o nado errático co-varia positivamente com o congelamento e negativamente com o tempo no topo em uma análise de *cluster* incluindo comportamentos e manipulações farmacológicas e ambientais (CACHAT et al., 2011a); no PCE, o nado errático co-varia com a latência para primeira entrada no compartimento branco e com a avaliação de risco (MAXIMINO et al., 2014b). No PCE ou no DVN, o nado errático não apresenta habituação intra- ou inter-sessões (MAXIMINO et al., 2010b; STEWART et al., 2013b; WONG et al., 2010). O tratamento crônico com fluoxetina diminui a frequência de nado errático no DVN (EGAN et al., 2009). Finalmente, o tratamento crônico com diazepam não altera o nado errático no DVN, mas a retirada do diazepam aumenta essa medida (CACHAT et al., 2010a).

A formação de bases (ZBC 1.76) é a “tendência em estabelecer uma localização-chave 'segura' na qual o peixe passa mais tempo e retorna com maior frequência após explorar um ambiente novo”. Tal comportamento foi observado inicialmente no campo aberto em ratos selvagens (EILAM; GOLANI, 1989), e é aumentado pelo tratamento com o bloqueador do transporte de catecolaminas D-anfetamina. Em paulistinhas, a escolha da base não parece depender de características do aparato, representando uma estratégia exploratória ativa (STEWART et al., 2010). No DVN, o confinamento prévio em um aparato branco diminui o tempo em uma base, assim como o número de entradas na base, em oposição ao confinamento prévio em um aparato preto ou transparente (ROSEMBERG et al., 2011). No DVN, o tratamento com etanol por 60 min (mas não por 20 min) diminui o número de transições para

a base, um efeito que é acompanhado por sedação (ROSEMBERG et al., 2012), enquanto o tratamento com ibogaína (um inibidor não-competitivo do transportador de serotonina que o estabiliza em uma conformação voltada para o interior da célula) aumenta o número de visitas e o tempo na base (CACHAT et al., 2013).

1.3.1. Reação de alarme (“*Schrecksreaktion*”)

A reação de alarme de peixes ostariofisianos a uma substância liberada pela destruição de células “*club*” epidérmicas de co-específicos foi descrita pela primeira vez por von Frisch (1938). Em seu formato atual, a reação de alarme é usualmente quantificada como a frequência e duração de episódios de nado errático e congelamento (GERLAI, 2010; JESUTHASAN; MATHURU, 2008). As substâncias de alarme de diversas espécies da superordem Ostariophysi foram identificadas, e dois componentes – hipoxantina 3-*N*-óxido e fragmentos de condroitina (BROWN et al., 2000; MATHURU et al., 2012) – parecem ser comuns a todas as substâncias. Essas reações são mediadas pelo sistema olfatório medial (DØVING; LASTEIN, 2009; HAMDANI; DØVING, 2003; HAMDANI et al., 2000; LASTEIN; HAMDANI; DØVING, 2008). No véu-de-noiva (*Carassius auratus*), a hipoxantina 3-*N*-óxido aumenta a atividade de células mitrais e diminui a atividade de células “*ruffed*” do bulbo olfatório (ZIPPEL et al., 2000); além disso, extratos de pele e fragmentos de condroitina aumentam o sinal de um indicador genético de cálcio, GCaMP2, na porção glomerular mediodorsal do bulbo olfatório de paulistinhas transgênicos (MATHURU et al., 2012). Células mitrais dessa região que expressam *lhx2a* projetam-se para a habênula dorsal direita e para o telencéfalo ventral *via* porção medial do trato olfatório medial (GAYOSO et al., 2012; MIYASAKA et al., 2009), mas não são ativadas por fragmentos de condroitina ou extratos de pele de co-específicos (DECARVALHO et al., 2013); além disso, não é observada expressão de *cfos* na habênula dorsal direita após a exposição a esses estímulos olfatórios (DECARVALHO et al., 2013). A expressão da toxina tetânica (TeTXlc) na habênula ventral, por outro lado, aumenta a magnitude da resposta de alarme a um estímulo menos concentrado (MATHURU; JESUTHASAN, 2013), sugerindo uma especialização funcional dessa estrutura.

A exposição de salmões (*Oncorhynchus kisutch*) e paulistinhas a uma substância co-específica

produz elevações nos níveis plasmáticos de cortisol e glicose (OLIVEIRA et al., 2014; REHNBERG; SCHRECK, 1987), sugerindo ajustes neurovegetativos consistentes com a ativação do eixo hipotálamo-pituitária-interrenal (HPI) e/ou simpático. Em paulistinhas do fenótipo *shortfin*, a exposição a uma substância de alarme co-específica aumenta a preferência pelo fundo e o número de episódios de nado errático e de congelamento (CACHAT et al., 2010b; EGAN et al., 2009); em animais testados em grupos, no entanto, a substância de alarme não parece alterar a preferência pelo fundo ou a incidência de congelamento, apesar de aumentar a coesão do cardume (GREEN et al., 2012; SPEEDIE; GERLAI, 2008) e a frequência de nado errático (SPEEDIE; GERLAI, 2008). Além disso, a exposição a substância de alarme diminui a performance em uma tarefa de memória espacial (PARK et al., 2008) e diminui o comportamento nocifensivo em animais do fenótipo *shortfin* (LIMA et al., 2012; MAXIMINO, 2011b). Um efeito analgésico semelhante é observado no piaçu, e a injeção do antagonista μ -opióide naloxona bloqueia essa analgesia induzida por medo (ALVES; BARBOSA JR; HOFFMANN, 2013). A hipoxantina 3-*N*-óxido aumenta de forma dose-dependente o número de episódios de nado errático e saltos em paulistinhas do tipo selvagem (fenótipo *shortfin*), mas não altera a incidência de congelamento ou a preferência pelo fundo (MATHURU et al., 2012; PARRA; ADRIAN JR; GERLAI, 2009). Já os fragmentos de condroitina aumentam a frequência de nado errático e congelamento e a preferência pelo fundo (MATHURU et al., 2012). SUBOSKI e colegas (HALL; SUBOSKI, 1995; SUBOSKI et al., 1990) observaram que a latência, profundidade e duração da mudança na distribuição vertical no tanque são os melhores índices de alarme no paulistinha.

A farmacologia da reação de alarme é inconsistente. Em roedores, mudanças comportamentais associadas à exposição a odores de predador são bloqueadas pelo pré-tratamento com benzodiazepínicos, mas não com agentes serotoninérgicos (BLANCHARD; GRIEBEL; BLANCHARD, 2001; YANG et al., 2004). Em *Pimephales promelas*, o aumento no uso de áreas cobertas e a diminuição no forrageamento após exposição a substância de alarme são revertidos pelo pré-tratamento com clordiazepóxido (REHNBERG et al., 1989); no piaçu, o tratamento agudo com fluoxetina reduz a reação de alarme (BARBOSA JR et al., 2012), enquanto esta é potencializada no killifish árabe, *Aphanius dispar* (BARRY, 2013).

1.3.2. Distribuição vertical eliciada pela novidade e preferência claro/escuro

O DVN foi inicialmente descrito por BLASER e GERLAI (2006) e explicitamente introduzido como um ensaio comportamental para ansiedade por LEVIN e colaboradores (BENCAN; SLEDGE; LEVIN, 2009; EGAN et al., 2009), que reportaram que paulistinhas adultos passam cerca de 50% de uma sessão de 5 minutos no fundo de um aquário novo, e que a nicotina diminui essa preferência. Drogas ansiolíticas, como buspirona, diazepam, e fluoxetina (crônica) também diminuem a preferência pelo fundo do tanque (LEVIN; BENCAN; CERUTTI, 2007), assim como o inibidor da monoamina oxidase tranilcipromina (STEWART et al., 2011a). Além disso, a preferência pelo fundo parece depender da iluminação: animais da linhagem AB preferem o topo do aquário quando testados no escuro, e o fundo deste quando testados no claro (SINGH et al., 2013); de forma interessante, o tratamento com o antagonista do adrenoceptor α_1 prazosin diminui a preferência pelo fundo na condição clara e a aumenta na condição escura (SINGH et al., 2013). O confinamento em um aquário branco (em oposição em um aquário preto ou em um aquário transparente) antes do teste de distribuição vertical diminui a preferência pelo fundo, a latência para entrada no topo do aquário novo, e o tempo gasto em uma “base” (ROSEMBERG et al., 2011). Em contraste, a preferência pelo fundo é reduzida quando o animal é testado em um aquário com fundo preto, em relação a um aquário branco ou transparente (BLASER; ROSEMBERG, 2012).

Trabalhos posteriores demonstraram que essa preferência diminui com o tempo (BENCAN; SLEDGE; LEVIN, 2009; STEWART et al., 2013b; WONG et al., 2010), um efeito que depende da novidade do aquário, dado que é abolido quando os animais são testados em um aparato igual ao aquário de alojamento (BENCAN; SLEDGE; LEVIN, 2009). Em animais com maior preferência pelo fundo, a habituação é mais lenta (STEWART et al., 2013b), e esta é abolida pelo tratamento com as drogas ansiogênicas pentilenotetrazol (antagonista do receptor GABA_A) e cafeína (antagonista não-seletivo de receptores adenosinérgicos), assim como pela pré-exposição a uma substância de alarme co-específica (“Shreckstoff”) (MATHURU et al., 2012; STEWART et al., 2013b; WONG et al., 2010). Em véus-de-noiva, a injeção intracerebroventricular do fator liberador de corticotropina (CRF) ou do FG-7142 aumentam a latência de entrada no topo do aquário (MATSUDA et al., 2013). O estresse de contenção agudo aumenta os níveis corporais de cortisol e a expressão de CRF no encéfalo de paulistinhas (*shortfin*) e produz um efeito hiperlocomotor, além de aumentar o nado errático,

mas não altera a preferência pelo fundo (GHISLENI et al., 2012); entretanto, quando os animais são testados em grupos (tarefa de comportamento grupal), a estresse de contenção aumenta a preferência pelo fundo, associado a uma resposta melanofórica intensa e alterações no sistema purinérgico (PIATO et al., 2011a). Após a exposição a um protocolo de estresse crônico imprevisível, a preferência pelo fundo é aumentada na tarefa de comportamento grupal, um efeito que é acompanhado de uma resposta melanofórica intensa, hipolocomoção e diminuição na coesão do cardume, além de uma diminuição na expressão do receptor glicocorticóide e aumento da expressão do CRF no encéfalo, assim como um aumento no cortisol corporal (PIATO et al., 2011b). O tratamento com dexametasona aos 4 dias pós-fertilização aumenta a preferência pelo fundo em animais adultos sem alterar o congelamento (KHOR; SOGA; PARHAR, 2013). Finalmente, em animais com uma mutação na isoforma A da OTP (*otpa^{m866/-}*) – e que não apresentam elevações na expressão de CRF após choque osmótico – a preferência pelo fundo é diminuída nos 4 primeiros minutos do teste (AMIR-ZILBERSTEIN et al., 2012). Em linhas gerais, portanto, o eixo HPI parece estar envolvido na preferência pelo fundo. No entanto, a exposição a uma cianobactéria, que também aumenta a preferência pelo fundo, não aumenta o cortisol total (KIST et al., 2011). Além disso, ainda que exista uma concordância entre a preferência pelo fundo e níveis de cortisol com tratamentos farmacológicos ansiogênicos (CACHAT et al., 2011a), o mesmo não é necessariamente verdadeiro para manipulações ansiolíticas – em especial no caso de drogas psicotomiméticas (CACHAT et al., 2013; GROSSMAN et al., 2010; KYZAR et al., 2012).

Existem algumas evidências da participação da habenula medial na geotaxia. Em animais que expressam a toxina tetânica de cadeia leve (TeTXlc) nessa região do diencéfalo apresentam maior preferência pelo fundo, além de apresentarem respostas de nado lento e congelamento exageradas a uma concentração baixa de substância de alarme associada a uma sombra em movimento sobre o aquário (MATHURU; JESUTHASAN, 2013). Os autores sugerem que o mecanismo pelo qual a habenula medial controla a geotaxia e a resposta de alarme se dá pela regulação da atividade de neurônios serotoninérgicos da rafe.

A falta de reprodutibilidade dos efeitos de uma substância de alarme ou da hipoxantina-3*N*-óxido pode se dever à baixa sensibilidade do teste a manipulações eliciadoras de medo, ou uma característica do tipo de manipulação feita. De fato, a exposição a um modelo tridimensional (BLASER; GERLAI, 2006), a um modelo computadorizado (AHMED;

FERNANDES; GERLAI, 2012), ou a um predador vivo (CACHAT et al., 2011b) não afetaram a preferência pelo fundo, enquanto a apresentação de uma imagem computadorizada de uma silhueta de pássaro em movimento sobre o aquário de teste no momento aumenta fortemente essa preferência (LUCA; GERLAI, 2012a, 2012b). Essas observações sugerem que a preferência pelo fundo do aquário pode representar um importante comportamento defensivo contra predadores aéreos, o que seria corroborado por evidências de que esse comportamento é motivado pela evitação do topo, mas não pela aproximação ao fundo. De fato, quando os animais são expostos a um aquário com dois compartimentos diferindo em profundidade, uma forte preferência é observada pelo lado mais profundo, enquanto nenhuma preferência é observada em um aquário com dois compartimentos diferindo em distância ao substrato (BLASER; GOLDSTEINHOLM, 2012). Esses resultados sugerem que a motivação para a preferência pelo fundo não representa uma aproximação ao fundo, mas a fuga da superfície da água.

Estudos recentes usando etanol proveram evidências de que esse comportamento também pode não refletir um único construto (“ansiedade”), mas uma combinação de efeitos locomotores e motivacionais. A exposição ao etanol pode aumentar (GERLAI et al., 2009; ROSEMBERG et al., 2012) ou diminuir (EGAN et al., 2009; GERLAI et al., 2009; MATHUR; GUO, 2011; ROSEMBERG et al., 2012) a preferência pelo fundo. Recentemente, demonstrou-se que a duração da exposição aguda pode ser parcialmente responsável por esses efeitos, com a administração por 20 ou 60 minutos induzindo efeitos diferentes na exploração (ROSEMBERG et al., 2012). Os resultados combinados desses estudos indicam que o álcool promove dois efeitos dissociáveis sobre o comportamento: um locomotor (estimulante/sedativo) e diretamente relacionado às concentrações cerebrais de etanol; e outro motivacional (ansiolítico/ansio gênico) e indiretamente relacionado às concentrações de etanol. Esses resultados sublinham a necessidade de cautela ao interpretar uma medida unidimensional do comportamento (tempo no topo ou fundo do aquário), e ilustram a utilidade de uma aproximação mais integrativa (CACHAT et al., 2011a; MAXIMINO; BRITO; GOUVEIA JR, 2010; MAXIMINO et al., 2012; STEWART et al., 2013b).

O teste de preferência claro/escuro, em seu formato atual, foi proposto por SERRA e colaboradores (1999) no paulistinha, e posteriormente por MAXIMINO *et al.* (MAXIMINO et al., 2007, 2010c) como ensaio comportamental para avaliar a ansiedade em teleósteos

pequenos. Evidências farmacológicas posteriores sugeriram que esse ensaio é sensível a drogas ansiolíticas, mas não a drogas panicolíticas (ARAUJO *et al.*, 2012; MAXIMINO *et al.*, 2011a). Ainda que uma preferência pela porção escura do aparato tenha sido amplamente replicada, o comportamento do paulistinha nessa tarefa é bastante sensível ao estímulo utilizado. GERLAI *et al.* (2000) observaram uma preferência pelo ambiente claro ao invés de preferência por escuridão. A discrepância provavelmente se deve às configurações do aquário usado nesse último experimento, no qual o compartimento branco é substituído por um compartimento transparente, e o compartimento escuro é criado cobrindo o topo e os lados do aparato. Resultados similares foram obtidos no trabalho de CHAMPAGNE *et al.* (2010), no qual animais da linhagem AB expostos a um aquário preto/transparente passaram mais tempo no lado transparente, e essa preferência foi abolida após estresse de contenção.

Enfatizando o papel da cor e da iluminação em ambos os lados do aquário no estabelecimento da preferência claro/escuro, STEPHENSON *et al.* (2011) variaram os níveis de iluminação sobre o aquário de teste e demonstraram que, em níveis mais baixos de irradiância, os animais passam mais tempo no compartimento preto, tornando-se indiferentes em níveis intermediários de luz, e recuperando a preferência pelo compartimento preto em níveis mais altos de irradiância. Quando o aumento de luz é concentrado no compartimento branco, a preferência pelo compartimento preto é aumentada (STEWART *et al.*, 2011c). De forma similar, os animais preferem a porção escura do aparato quando a outra porção é branca, mas não quando a outra porção é transparente com iluminação acima do compartimento (BLASER; PEÑALOSA, 2011). Assim, a manipulação da aversividade do compartimento claro pela mudança dos níveis de luz ou da cor do compartimento leva a mudanças predizíveis no repertório comportamental observado no teste. Resultados similares são observados com animais juvenis (6 dias pós-fertilização), que apresentam preferência pelo compartimento escuro (STEENBERGEN; RICHARDSON; CHAMPAGNE, 2011). Utilizando filtros fotográficos para variar a intensidade da escuridão no compartimento escuro, CHAMPAGNE e colaboradores observaram que a evitação desse compartimento diminui quando a intensidade da escuridão é menor (STEENBERGEN; RICHARDSON; CHAMPAGNE, 2011).

Em trabalhos anteriores, BLASER e colegas demonstraram que paulistinhas que apresentam alta evitação do compartimento branco congelam mais quando confinados nesse

compartimento do que aqueles que apresentam baixa evitação (BLASER; CHADWICK; MCGINNIS, 2010); em uma análise de componentes principais, o congelamento no compartimento branco correlaciona-se positivamente com o nado errático e negativamente com o tempo no branco (BLASER; CHADWICK; MCGINNIS, 2010). Curiosamente, o congelamento ocorre com maior frequência no compartimento preto do que no branco – somente cerca de 30% do tempo passado no compartimento escuro envolve congelamento, mas virtualmente todo o congelamento ocorre nesse compartimento –, apesar do confinamento no compartimento preto não produzir congelamento (BLASER; PEÑALOSA, 2011). A tigmotaxia, por outro lado, parece aumentar após o confinamento em animais que apresentam alta ou baixa evitação, ocorre mais no compartimento preto, e correlaciona-se com o tempo no branco antes do confinamento (BLASER; CHADWICK; MCGINNIS, 2010). O confinamento em um compartimento branco por três vezes antes de permitir que o animal explore o aparato claro/escuro não muda a preferência por escuridão, mas diminui a frequência de nado errático, tigmotaxia e congelamento (MAXIMINO et al., 2010b); em animais da linhagem AB, o confinamento no compartimento branco aumenta a preferência por escuridão em animais que apresentam alta evitação antes desse procedimento, mas a diminui em animais que apresentam baixa evitação (BLASER; CHADWICK; MCGINNIS, 2010). A exposição a um aquário branco/transparente produz preferência pelo lado transparente, e a exposição a um aquário branco/cinza produz preferência pelo lado cinza em animais das linhagens *shortfin* (ARAUJO et al., 2012; MAXIMINO, 2011a) e AB (BLASER; PEÑALOSA, 2011; LAU et al., 2011). Tomados em conjunto, esses resultados sugerem a aversividade do compartimento branco como um importante fator no controle do comportamento no teste de preferência claro/escuro. Apesar disso, eles também sugerem que a fuga desse compartimento não é a única motivação para isso. Em apoio a essa última conclusão, observou-se que a preferência por escuridão não apresenta habituação intra- ou inter-sessões, enquanto a tigmotaxia e o congelamento apresentam um padrão bifásico (MAXIMINO et al., 2010b).

A evitação do compartimento escuro em larvas (STEENBERGEN; RICHARDSON; CHAMPAGNE, 2011) e do compartimento claro em adultos (BLASER; PEÑALOSA, 2011; MAXIMINO et al., 2011a) é previsivelmente alterada por tratamentos farmacológicos. O tratamento com diazepam, buspirona e etanol diminuem a preferência pelo compartimento

claro em larvas, enquanto o tratamento com cafeína e FG-7142 aumenta esta medida (STEENBERGEN; RICHARDSON; CHAMPAGNE, 2011); em adultos, o tratamento com benzodiazepínicos, etanol, buspirona e fluoxetina crônica diminuem a preferência por escuridão, enquanto o tratamento com cafeína a aumenta (LAU et al., 2011; MAXIMINO et al., 2011a). A injeção intracerebroventricular do octadecaneuropeptídeo (uma endozepina que desloca benzodiazepínicos de seus sítios de ligação) em véus-de-noiva (*Carassius auratus*) aumenta a latência para entrada no branco, um efeito que é bloqueado pelo tratamento com o cDLOP (antagonista do receptor metabotrópico para o octadecaneuropeptídeo), mas não com flumazenil (antagonista do sítio benzodiazepínico) (MATSUDA et al., 2011). O neuropeptídeo Y diminui a escototaxia no véu-de-noiva, um efeito que não é bloqueado pelo antagonista do receptor Y1 BIBP-3226 (MATSUDA et al., 2012). Em larvas (6 dpf) *knockdown* para a variante longa do receptor PAC1 do peptídeo pituitário ativador de adenilato ciclase (PACAP), a preferência pelo compartimento transparente diminui. Quando as larvas do tipo selvagem são submetidas a choque osmótico, observa-se um aumento na preferência pelo compartimento transparente que recupera-se cerca de 60 min após o estresse; essa recuperação não ocorre em larvas sem o variante longo, que é responsável por terminar a resposta de estresse do eixo HPI (AMIR-ZILBERSTEIN et al., 2012). Enquanto o estresse agudo de contenção *diminui* a preferência pelo compartimento transparente em animais da linhagem AB expostos a um aquário preto/transparente (CHAMPAGNE et al., 2010), o estresse crônico imprevisível aumenta a escototaxia em animais da linhagem *shortfin* expostos a um aquário preto/branco (CHAKRAVARTY et al., 2013). De forma semelhante, a privação de sono aumenta a escototaxia em animais da linhagem AB, um efeito que é revertido pelo tratamento com prazosin, um antagonista do adrenoceptor α_1 (SINGH et al., 2013).

A exposição ao aparato de preferência claro/escuro sobrerregula a expressão de c-Fos no telencéfalo dorsomedial (LAU et al., 2011; VON TROTHA; VERNIER; BALLY-CUIF, 2014) e no telencéfalo ventrodorsal (LAU et al., 2011). Em animais manipulados antes da exposição ao aparato, não são observadas alterações comportamentais, mas o clordiazepóxido só diminui a escototaxia nesses animais previamente manipulados (diferentemente da buspirona) (LAU et al., 2011). De forma consistente com essas observações, a manipulação prévia aumenta a expressão de *cfos* nos telencéfalos dorsocentral e dorsoposterior, ventral subcomissural e ventral pós-comissural, habenula medial e no núcleo periventricular no tubérculo posterior

(LAU et al., 2011).

Existem algumas mutações genéticas que podem produzir alterações na escototaxia. NORTON e colaboradores (NORTON; BALLY-CUIF, 2012; NORTON et al., 2011) demonstraram que uma mutação em um gene que codifica um receptor para o fator de crescimento de fibroblastos (*fgfr1ar*^{3R705H/13R705Hm}, também conhecido como *spiegelanio* ou *spd*) – um receptor que participa na diferenciação de neurônios serotoninérgicos do hipotálamo caudal – diminui a preferência por escuridão, o tempo necessário para explorar um ambiente novo, e a neofobia, e aumentam a agressividade (NORTON; BALLY-CUIF, 2012; NORTON et al., 2011). Esses efeitos comportamentais são acompanhados de uma diminuição da expressão da *dusp6* e da fosforilação da proteína cinase regulada por sinal extracelular (ERK), assim como uma menor expressão da isoforma B do transportador de serotonina (*slc6a4b*, SERTb) (mas não da monoamina oxidase), no núcleo periventricular do hipotálamo. Aumentos na expressão da isoforma A do transportador de serotonina (*slc6a4a*, SERTa) foram observadas na rafe superior, mas não no *cluster* serotoninérgico pré-tectal. No entanto, apesar do tratamento agudo com fluoxetina (3 µg/L) diminuir a agressão e a escototaxia em ambos os fenótipos, os níveis desses comportamentos continuam menores nos animais mutantes, sugerindo que o sistema serotoninérgico não está diretamente ligado às alterações comportamentais observadas no *spiegelanio* (NORTON; BALLY-CUIF, 2012; NORTON et al., 2011).

1.3.4. Diferenças entre linhagens

Linhagens diferentes de animais apresentam variações genéticas importantes que podem produzir uma variação comportamental relevante (COE et al., 2009). De fato, algumas dessas variações foram sistematicamente investigadas em paulistinhas do tipo selvagem, e algumas diferenças comportamentais importantes foram observadas. Em animais do tipo selvagem (fenótipo não informado) criados em laboratório por quatro gerações, observam-se maior geotaxia e escototaxia do que animais da linhagem AB, assim como maior reação de alarme (WONG et al., 2012). Diferenças em comportamentos de excitabilidade (“arousal”) também são observadas entre as linhagens AB e TU: quando ocorre uma súbita diminuição na iluminação, os animais de ambas as linhagens aumentam dramaticamente sua atividade, mas

os animais da linhagem TU apresentam aumentos muito maiores. Além disso, animais da linhagem TU apresentam menos geotaxia do que os animais da linhagem AB (VIGNET et al., 2013), e animais da linhagem WIK apresentam menos geotaxia do que animais das linhagens AB, GloFish e *shortfin* (SACKERMAN et al., 2010), mas não apresentam diferenças na escototaxia em relação à linhagem AB ou EK (LAU et al., 2011). Animais da linhagem AB e WIK apresentam maior latência para entrada em um braço claro no labirinto em cruz aquático, uma variação do PCE (SACKERMAN et al., 2010). Animais da linhagem AB apresentam maior neofobia e menor tendência a cardumeamento do que animais da linhagem Santal, a geração F2 de uma população coletada em Bangladesh (WRIGHT et al., 2006); uma análise de locos quantitativos sugeriu que essas diferenças se devem a uma variação no loci 18p12 e 9p10; essa última variação é modulada pela interação com o locus 12p39, na qual dois loci homozigotos interagem para produzir o fenótipo com maior neofobia (WRIGHT; BUTLIN; CARLBORG, 2006). Em relação a animais das linhagens *leopard*, *shortfin* e *longfin*, animais da linhagem AB apresentam maior geotaxia e evitação de um estímulo de predador, enquanto animais da linhagem *leopard* apresentam menor preferência por cardumes (GERLAI et al., 2009). De forma interessante, animais das linhagens *leopard*, *shortfin* e *longfin* apresentam uma curva dose-resposta em “U”-invertido quando expostos ao etanol no DVN, enquanto animais da linhagem AB apresentam o padrão inverso (GERLAI et al., 2009). Animais da linhagem AB passam mais tempo em investigação social quando um animal desconhecido é apresentado do que animais das linhagens WIK e *shortfin*; diferente dos animais da linhagem WIK, os animais da linhagem *shortfin* preferem uma porção azul vazia do tanque, sugerindo uma influência do nível de ansiedade (BARBA-ESCOBEDO; GOULD, 2012). EGAN e colegas (EGAN et al., 2009) observaram que animais da linhagem *shortfin* apresentam menor geotaxia do que animais das linhagens *longfin* e *leopard*. Animais da linhagem *leopard* também apresentam menor habituação do congelamento e maior habituação da distância percorrida no DVN (STEWART et al., 2013b). Animais da linhagem Nadia (derivada de uma população selvagem e reproduzida em laboratório por pelo menos 5 gerações) apresentam maior atividade e menor geotaxia em relação aos animais das linhagens TM1 e SH, criadas em laboratório por pelo menos 30 gerações (DREW et al., 2012; MORETZ; MARTINS; ROBISON, 2007); animais da linhagem TM1 são mais agressivos, aproximam-se mais de um predador e demoram menos para retomar o comportamento normal

após perturbação (transferência de aquário) do que animais das outras duas linhagens (MORETZ; MARTINS; ROBISON, 2007), e animais da linhagem SH demoram menos para retomar a alimentação após a exposição a uma substância de alarme em relação às linhagens Gaighatta, Nadia e TM1 (OSWALD; ROBISON, 2011). Sugeriu-se que essas linhagens representam extremos de uma “síndrome comportamental” de agressão-coragem (“aggression-boldness”), em que animais mais agressivos também são mais propensos a “correr mais riscos”. Essa propensão, no entanto, pode representar impulsividade aumentada, e não ansiedade diminuída (DUGATKIN, 2013). A direção das diferenças também parece depender da linhagem: animais das linhagens Nadia e TM1 que são mais agressivos tem maior probabilidade de sair do cardume, enquanto a probabilidade de sair do cardume é menor em animais SH mais agressivos. Além disso, todos os testes comportamentais utilizados para mensurar agressão e “coragem” por MORETZ e colaboradores (2007) apresentam alta correlação com o nível de atividade, mas não parecem apresentar correlação entre si, sugerindo que, nessas três linhagens, variações nos níveis de atividade levam a alterações na agressão e na “coragem”.

Algumas dessas diferenças comportamentais foram correlacionadas com alterações em sistemas associados ao comportamento de defesa. Em relação à linhagem AB, animais da linhagem *shortfin* (derivada de populações selvagens e mantida em laboratório por 2 gerações) não apresentam alterações na preferência por cardumes, mas o tratamento com o antagonista do receptor dopaminérgico D₁ SCH23390 diminui essa preferência em animais da linhagem AB, mas não da linhagem *shortfin* (SCERBINA; CHATTERJEE; GERLAI, 2012); animais da linhagem AB apresentam níveis cerebrais de DOPAC maiores do que animais da linhagem *shortfin*, e, apesar dos níveis de serotonina serem semelhantes, o tratamento com SCH23390 só diminui os níveis de 5-HT em animais da linhagem AB. Em outro estudo, GERLAI e colaboradores demonstraram que a expressão de mRNA para o receptor D₁ e as quantidades teciduais de aspartato, dopamina, GABA, glutamato, glicina, serotonina e taurina são menores no cérebro de em animais da linhagem *shortfin*, enquanto os níveis do receptor GABA_{B1} e do transportador SERTa são maiores na linhagem AB (PAN; CHATERJEE; GERLAI, 2012). Em animais da linhagem Nadia, a expressão de mRNA para a isoforma 2 da ácido glutâmico descarboxilase (*gad2*), a enzima que cataliza a formação de GABA, está diminuída em relação a animais da linhagem SH, mas não da linhagem TM1 (DREW et al.,

2012). No entanto, tanto as linhagens Nadia quanto SH apresentam maior expressão de genes associados ao eixo HPI (*pomca*, *ucn2*) e menor expressão do receptor 8b do neuropeptídeo Y e da GSK3 β do que as linhagens Gaighatta e TM1, um resultado que não é concordante com as diferenças comportamentais (maior geotaxia e menor atividade em animais da linhagem Nadia vs. TM1 e SH; maior agressividade e inspeção de predadores em animais da linhagem TM1; DREW et al., 2012). Em relação às linhagens TM1 e SH, observam-se maior expressão da proteínocinase ativada por mitógeno ERK1/2 e da isoforma 1A da glutathiona peroxidase (GPX1A) nos animais da linhagem Nadia.

A interpretação da relação entre diferenças neuroquímicas e comportamentais não é simples, como podemos depreender da Tabela 1. Animais da linhagem AB apresentam maior geotaxia e evitação de predadores do que animais da linhagem *shortfin*, que poderiam ser interpretados como maior reatividade ao estresse ou maior ansiedade/medo; no teste de investigação social, no entanto, animais da linhagem *shortfin* passam mais tempo em um compartimento azul do que próximo ao co-específico desconhecido, sugerindo maior ansiedade nessa linhagem. Diferenças no sistema dopaminérgico dessas duas linhagens parecem explicar, ao menos em parte, essa contradição: animais da linhagem AB apresentam maior conteúdo de dopamina e menor expressão do autoreceptor D₁R, cujo bloqueio diminui a interação social e o conteúdo tecidual de serotonina no cérebro de animais da linhagem AB, mas não *shortfin*. A visão de co-específicos aumenta os níveis de dopamina e DOPAC, mas não 5-HT e 5-HIAA, no cérebro de animais da linhagem AB (SAIF et al., 2013). Assim, a diferença de comportamento social parece dever-se principalmente ao sistema dopaminérgico.

O perfil neuroquímico dos animais AB em relação aos animais *shortfin* é bastante complicado do ponto de vista do controle da ansiedade. Os níveis elevados de 5-HT e glutamato, por exemplo, parecem sugerir um mecanismo simples para a elevação da geotaxia e da evitação de predador; entretanto, os níveis elevados de GABA e glicina, assim como do receptor GABA_{B1}, contradizem achados anteriores em roedores (CRYAN; KAUPMANN, 2005; KALUEFF; NUTT, 1997).

Em relação às diferenças observadas entre as linhagens Nadia, TM1 e SH, o quadro também é complicado. O experimento reportado apresentou uma análise de microarranjo, e diversos genes com funções na organização do ciclo celular (e.g., caspases), estado redox e função mitocondrial (citocromo c oxidase, glutathiona peroxidases e selenoproteínas) apresentaram-se

sub- ou sobre-regulados em diferentes linhagens. Aparentemente, a principal diferença entre as linhagens Nadia e SH no tocante à ansiedade é a sub-regulação da *gad2*, enquanto a diferença entre as linhagens Nadia e TM1 é a sobre-regulação de genes do eixo HPI. Entretanto, não foram observadas diferenças na geotaxia entre TM1 e SH.

<i>Linhagens comparadas</i>	<i>Diferenças comportamentais</i>	<i>Diferenças neuroquímicas</i>
<i>AB vs. TU</i>	↓ “Arousal” (AB) ↑ Geotaxia (AB)	
<i>AB vs. WIK</i>	↑ Geotaxia (AB) ↑ Investigação social (AB)	
<i>AB vs shortfin</i>	↑ Geotaxia (AB) ↑ Evitação de predador (AB) ↑ Investigação social (AB) Efeitos diferentes do etanol	↑ DA (AB) ↑ DOPAC (AB) ↑ ASP (AB) ↑ GABA (AB) ↑ Glu (AB) ↑ Gly (AB) ↑ 5-HT (AB) ↑ Tau (AB) ↑ SERTa (AB) ↑ GABA _{B1} R (AB) ↓ D ₁ R (AB) Ant. D ₁ R ↓ 5-HT em AB, mas não <i>shortfin</i> Ant. D ₁ R ↓ investigação social em AB, mas não <i>shortfin</i>
<i>AB vs. leopard</i>	↑ Geotaxia (AB) ↑ Preferência por cardume (AB) Efeitos diferentes do etanol	
<i>WIK vs. GloFish, shortfin</i>	↓ Geotaxia (WIK) ↑ Latência para o claro (WIK)	
<i>Shortfin vs. leopard</i>	↓ Geotaxia (<i>shortfin</i>) ↓ Habituação da exploração ↑ Habituação do congelamento (<i>shortfin</i>)	
<i>Nadia vs. SH</i>	↓ Atividade (Nadia)	↓ GAD2 (Nadia)

	↑ Geotaxia (Nadia)	↑ ERK1/2 (Nadia)
	↑ Latência para alimentação após substância de alarme (Nadia)	↑ GPX1A (Nadia) ↑ GPX4A (Nadia)
<i>Nadia vs. TM1</i>	↓ Atividade (Nadia)	↑ POMCA (Nadia)
	↑ Geotaxia (Nadia)	↑ UCN2 (Nadia)
	↓ Agressividade (Nadia)	↓ NPY _{8B} R (Nadia)
	↓ Investigação de predadores (Nadia)	↓ GSK3β (Nadia) ↑ ERK1/2 (Nadia)
	↑ Latência para alimentação após perturbação (Nadia)	↑ GPX1A (Nadia) ↓ GPX4A (Nadia)

Tabela 2: Diferenças comportamentais e neuroquímicas entre linhagens do tipo selvagem do paulistinha.

Concluimos que as diferenças comportamentais entre diferentes linhagens do tipo selvagem não podem ser explicadas por um único mecanismo, e de fato é provável que mais de um fator seja responsável pela variação comportamental observada entre linhagens. Entretanto, o uso de linhagens que diferem nos níveis de uma determinada característica comportamental é uma estratégia que pode ajudar a identificar alguns dos determinantes dessas características, mesmo que não seja prático identificá-los todos em um único experimento (CRABBE; MORRIS, 2004; LAPORTE et al., 2008; SOUSA; ALMEIDA; WOTJAK, 2006) dado que variações genéticas importantes podem representar modelos importantes no entendimento dos transtornos de ansiedade (FINN; RUTLEDGE-GORMAN; CRABBE, 2003; KALUEFF; WHEATON; MURPHY, 2007; SINGEWALD, 2007; VAN DER STAAY; ARNDT; NORDQUIST, 2009).

2. Hipótese de trabalho

Considerando a conservação da organização anatômica e funcional do sistema serotoninérgico em peixes e mamíferos (LILLESAAAR, 2011; MAXIMINO; HERCULANO, 2010; MAXIMINO et al., 2013a), hipotetizamos, no presente trabalho, que deve haver correlação positiva entre a atividade do sistema serotoninérgico e indicadores de comportamento tipo-

medo e tipo-ansiedade no paulistinha. Se essa hipótese for verdadeira, manipulações que aumentam ou diminuem a atividade do sistema serotoninérgico também devem aumentar ou diminuir medidas comportamentais de medo e ansiedade nesse animal, e manipulações que aumentam o medo devem aumentar a atividade do sistema serotoninérgico em determinadas regiões. Além disso, em linhagens com maior ansiedade “basal”, como a linhagem *leopard* (CACHAT *et al.*, 2011a; EGAN *et al.*, 2009), a atividade do sistema serotoninérgico estará diminuída, e drogas serotoninérgicas devem produzir efeitos diferentes nesses animais.

3. Objetivos

3.1. Objetivo geral

O presente trabalho procura investigar o papel da neurotransmissão serotoninérgica de paulistinhas (*Danio rerio* Hamilton 1822) adultos na modulação do comportamento tipo-ansiedade e tipo-medo na preferência claro/escuro e na distribuição vertical eliciada pela novidade, após exposição a substância de alarme ou não, na linhagem *longfin* ou na linhagem *leopard*, de forma a subsidiar um entendimento melhor acerca das bases neurobiológicas da ansiedade em seus aspectos comparados, ecológicos e evolutivos.

3.2. Objetivos específicos

Dentro desses objetivos gerais, o presente trabalho pretende

- Avaliar os níveis extracelulares de serotonina no cérebro de paulistinhas após exposição ao modelo de preferência claro/escuro e distribuição vertical eliciada pela novidade, bem como suas possíveis correlações com as variáveis comportamentais observadas nesses testes;
- Verificar o efeito da variação dos níveis extracelulares de serotonina no cérebro de paulistinhas nos modelos de preferência claro/escuro e distribuição vertical eliciada pela novidade através do tratamento através do tratamento agudo com fluoxetina (2,5, 5 e 10 mg/kg) ou *para*-clorofenilalanina (duas injeções de 300 mg/kg separadas entre

- si por 24 horas);
- Analisar o papel do receptor 5-HT_{1A} e 5-HT_{1B} no comportamento tipo-ansiedade do paulistinha, avaliado nos modelos de preferência claro/escuro e distribuição vertical eliciada por novidade, através do tratamento agudo com o agonista parcial do receptor 5-HT_{1A} buspirona (25 e 50 mg/kg), com o antagonista do receptor 5-HT_{1A} WAY 100635 (0.003 e 0.03 mg/kg), ou com o agonista inverso do receptor 5-HT_{1B} SB 224289 (2.5 e 5 mg/kg);
 - Avaliar o papel dos receptores 5-HT_{1A} e do transporte de serotonina no comportamento tipo-medo, avaliado no modelo de preferência claro/escuro após exposição a uma substância de alarme co-específica, através do tratamento agudo com fluoxetina ou com WAY 100635;
 - Avaliar o papel dos níveis teciduais de serotonina e da fluoxetina no fenótipo de ansiedade elevada observada na linhagem *leopard*.

4. Métodos

4.1. Alojamento

Em todos os experimentos, os animais foram alojados seguindo recomendações do CANADIAN COUNCIL ON ANIMAL CARE (2005) e as recomendações mínimas para o alojamento de paulistinhas (LAWRENCE, 2007). Paulistinhas adultos, de sexo indeterminado, das linhagens *longfin* (n = 175) e *leopard* (n = 20), foram adquiridos com fornecedores locais. Os animais foram alojados em grupos (densidade 1 animal/2 L) por pelo menos 2 semanas antes do início dos experimentos. Os aquários foram mantidos em condições de temperatura (28 °C), oxigenação, filtragem e ciclo luminoso constantes (fotoperíodo 14L:10E), e os animais foram alimentados diariamente com ração floculada.

4.2. Drogas e reagentes

A dl-para-clorofenilalanina (pCPA), o maleato de WAY 100635 (Sigma-Aldrich, St. Louis, EUA), o cloridrato de buspirona e o cloridrato de fluoxetina (Roche, São Paulo, Brasil) foram

dissolvidos em solução salina de Cortland (NaCl 124,1 mM, KCl 5,1 mM, Na₂HPO₄ 2,9 mM, MgSO₄ 1,9 mM, CaCl₂ 1,4 mM, NaHCO₃ 11,9 mM, 1000 unidades de heparina, pH 7,4; (WOLF, 1963)). O SB 224289 (Sigma-Aldrich, St. Louis, EUA) foi dissolvido em dimetilsulfóxido (DMSO) a 0,1%. Todas as drogas foram administradas por via intraperitoneal em animais anestesiados em água gelada (> 12 ° C) (KINKEL et al., 2010).

Para os ensaios de cromatografia líquida de alta eficácia (CLAE), serotonina e ácido 5-hidróxi-indolacético (5-HIAA) (Tocris, Bristol, Reino Unido) foram dissolvidas em solução eluidora (HClO₄ 70%, EDTA 0,3 mM, metabissulfito de sódio 0,5 mM) para uso como padrões. Todos os reagentes utilizados foram grau CLAE.

4.3. Preparação de substância de alarme

A preparação da substância de alarme seguiu protocolo proposto por SPEEDIE e GERLAI (2008). Um animal doador foi retirado do tanque, o excesso de água foi removido com toalha de papel, e os animais foram anestesiados em gelo e sacrificados por decapitação. 15 cortes rasos foram feitos em cada lado do tronco, e os cortes foram lavados com água ultrapura. Durante o processo de coleta e até o uso, a solução foi mantida em gelo. Um total de 10 ml de substância foi obtido dessa maneira. Os animais foram expostos à substância de alarme ou água ultrapura (3,5 ml/litro) por 6 min, após os quais eles foram removidos do béquer de exposição e testados em um dos dois modelos.

4.4. Ensaios comportamentais

Para os ensaios comportamentais, as drogas mencionadas foram administradas por via intraperitoneal (i.p.) e, após um período de 10 min, os animais foram submetidos a ambos os ensaios comportamentais descritos abaixo. A ordem de teste foi pseudo-aleatória e balanceada, sem intervalo entre os ensaios. Todas as unidades comportamentais analisadas utilizaram as definições estabelecidas em KALUEFF et al. (2013), e seguiram a convenção proposta de codificação por edição do catálogo seguida do número da entrada (p. ex., “ZBC1.46” refere-se à geotaxia).

4.4.1. 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 ($n = 9 - 10$ por tratamento) 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) iluminado por duas lâmpadas fluorescentes de 25 W, produzindo uma iluminação média de 120 lumens sobre o aparato. Assim que o animal foi transferido para o aparato, uma *webcam* foi ativada, e o teste inicia-se. A *webcam* filmou o aparato de frente, portanto registrando a distribuição vertical e lateral do animal. Os animais puderam explorar livremente o aparato por 6 min, após os quais foram removidos e expostos ao teste de preferência claro/escuro ou sacrificados (ver abaixo). Os vídeos foram analisados utilizando o software X-Plo-Rat 2005 v. 1.1 (<http://scotty.ffclrp.usp.br>), e as imagens foram divididas em um gradil 3 x 3 compostos de quadrados de 10 cm². As seguintes variáveis foram analisadas:

- **Tempo no topo:** O tempo passado no terço superior do aparato; refere-se à geotaxia (ZBC1.46).
- **Quadrantes cruzados:** O número de quadrados de 10 cm² cruzados pelo animal durante toda a sessão; refere-se à atividade exploratória (ZBC1.54).
- **Nado errático:** O número de eventos de “nado errático” (ZBC1.51), definidos como múltiplas ocorrências de “surto de alta aceleração em rápida sucessão nos quais a direção do movimento também muda de maneira aparentemente estocástica”.
- **Congelamento:** A duração total de eventos de congelamento (ZBC1.68), definidos como “cessação completa de movimento (com exceção dos opérculos e olhos) emitidos pelo peixe quando no fundo do aquário”.
- **Formação de bases (“homebase”):** Proporção do tempo (em %) que o animal passa em uma base estabelecida (ZBC1.76), definida como o quadrante que o animal passa o maior percentual da sessão.

4.4.2. Preferência claro/escuro

O protocolo para o teste de preferência claro/escuro (PCE) foi adaptado de MAXIMINO et al (2010) e ARAUJO et al. (2012). Os animais foram transferidos individualmente ao

compartimento central de um aquário metade preto, metade branco (15 cm x 10 cm x 45 cm, altura x largura x comprimento) por um período de aclimatação de 3 min, após o qual as portinholas que delimitam esse compartimento foram removidas e os animais puderam explorar o aparato por 15 min. O compartimento branco foi dividido em 5 retângulos de 4,5 x 10 cm. Os vídeos foram analisados usando-se o software X-Plo-Rat 2005 v 1.1, e as seguintes variáveis foram registradas:

- **Tempo no compartimento branco:** O tempo passado na porção branca do aquário, em percentual da tentativa; refere-se à escototaxia (ZBC1.137).
- **Latência:** O tempo (em s) passado entre o início do teste e a primeira entrada no compartimento branco após a primeira entrada no compartimento preto.
- **Quadrantes cruzados:** O número de quadrados (4,5 x 10 cm) cruzados pelo animal no compartimento branco; refere-se à atividade exploratória (ZBC1.54).
- **Entradas no compartimento branco:** O número de entradas que o animal executa no compartimento branco, definidas como o cruzamento da linha média pela nadadeira peitoral; refere-se à atividade exploratória (ZBC1.54).
- **Nado errático:** O número de eventos de “nado errático” (ZBC1.51), definidos como múltiplas ocorrências de “surto de alta aceleração em rápida sucessão nos quais a direção do movimento também muda de maneira aparentemente estocástica”.
- **Congelamento:** A duração proporcional de eventos de congelamento (ZBC1.68), definidos como “cessação completa de movimento (com exceção dos opérculos e olhos) emitidos pelo peixe quando no fundo do aquário”; registrada em % do tempo no compartimento branco.
- **Tigmotaxia:** Duração proporcional de eventos de tigmotaxia (ZBC1.173), definidos como o nado executado a uma distância de no máximo 2 cm das paredes do compartimento branco, e registrada em % do tempo nesse compartimento.
- **Avaliação de risco:** Número de eventos de avaliação de risco, definidos como entradas rápidas (< 1s) no compartimento branco seguidas de retornos ao compartimento preto, ou como entradas parciais no compartimento branco (i.e., a nadadeira peitoral não cruza a linha média).

4.5. Parcelamento do tecido nervoso e preparação de amostras

Após o último ensaio comportamental, cada animal foi anestesiado em água gelada e decapitado com um bisturi. Seus cérebros foram dissecados em solução tampão fosfato livre de cálcio e magnésio (CMF) a 4 °C e incubados em 2 mL de solução de extração (tampão Tris 50 mM, NaCl 90 mM, CaCl₂ 2,5 mM, glutatona 1 mM, pH 7,4; PRADEL; SCHACHNER; SCHMIDT, 1999) por 30 min a 4 °C. Essa solução foi então separada, constituindo a fração do fluido extracelular (ECF). Para análise das monoaminas teciduais, os cérebros inteiros ou divididos em prosencéfalo, mesencéfalo e rombencéfalo foram homogeneizados em 200 µL de solução eluidora (HClO₄ 70%, EDTA 0,3 mM, metabissulfito de sódio 0,5 mM). Esses homogenatos ou o ECF foram adicionados de ácido tricloroacético 1% para precipitação de proteínas e centrifugados a 500 g por 5 min a 4 °C, alíquotas de sobrenadante foram filtradas em filtro de seringa de 0,2 µm, o padrão interno (DHBA) foi adicionado e as amostras resultantes foram congeladas a -20 °C para análise subsequente. Os precipitados dessa centrifugação foram dissolvidos em NaOH 0,1 N para análise do conteúdo de proteínas (ver abaixo).

4.6. Quantificação de monoaminas

As concentrações de 5-HT e 5-HIAA nas amostras foram quantificadas por cromatografia líquida de alta eficácia (CLAE) de fase reversa, usando método descrito em MAXIMINO et al., (2011b). O sistema de CLAE consistiu em uma bomba peristáltica (LC20-AT, Shimadzu, Japão), um injetor de amostras (Rheodyne, EUA) e um desgasificador (DGA-20A5, Shimadzu). A fase estacionária consistiu em uma coluna analítica VP-ODS (Shimadzu Shim-Pack, diâmetro interno 250 x 4,6 mm), e a fase móvel consistiu em uma solução de tampão fosfato 70 mM (pH 2,9), EDTA 0,2 mM, SDS 0,2 mM, metanol 5% em metabissulfito de sódio 20%. As amostras foram eluídas em um fluxo isocrático de 1,8 ml/min. Após eluição e separação pela coluna, as monoaminas foram detectadas por um detector eletroquímico (modelo L-ECD-6A) com eletrodo de carbono ajustado para 0.83 V e sensibilidade de até 2 nA.

As amostras foram injetadas no sistema CLAE e a concentração foi definida pela comparação com curva-padrão, obtida através da injeção de concentrações decrescentes dos padrões (5-

HT, 5-HIAA ou DHBA) diluídos em solução eluidora, através do cálculo da altura do pico do analito (5-HT ou 5-HIAA) dividida pela altura do pico do padrão interno (DHBA); esses valores foram corrigidos pela quantidade de proteína na amostra (abaixo).

4.7. Quantificação de proteínas

Para determinação da quantidade de proteínas nas amostras, uma linearização da análise por azul brilhante de Coomassie de Bradford foi utilizada (ZOR; SELINGER, 1996). As proteínas precipitadas após centrifugação foram adicionadas de NaOH 1 M e 5 ml do reagente de Bradford (100 mg azul brilhante de Coomassie G-250, 50 ml etanol 95%, 100 ml ácido fosfórico 85% e 850 ml água ultrapura) em uma proporção de 20% (v:v), agitadas para homogeneização, e submetidas a leitura em espectrofotômetro em 590 nm e em 450 nm; a razão da absorvância das amostras nesses comprimentos de onda foi comparada a curva-padrão realizada com concentrações decrescentes de albumina bovina.

4.8. Análise estatística

A diferença entre os grupos foi analisada através de análises paramétricas ou não-paramétricas de variância de uma via seguidas de pós-testes de Tukey ou Bonferroni quando apropriado. Dados de latência foram analisados com testes de Mantell-Cox para o logaritmo do posto, extraído a partir de curvas de sobrevivência (JAHN-EIMERMACHER; LASARZIK; RABER, 2011), com α ajustado para comparações múltiplas através do método de Bonferroni. As diferenças entre níveis de monoaminas entre linhagens foram analisadas através de testes *t*. As correlações entre o conteúdo de serotonina e os parâmetros comportamentais foram analisadas com o coeficiente de correlação de Pearson; os valores de *p* para esses testes serão corrigidos para comparações múltiplas através do método de taxas locais de descobertas falsas (STRIMMER, 2008). Os resultados dessas análises serão considerados estatisticamente significativos quando *p* corrigido < 0,05.

5. Resultados

5.1. Validação da metodologia de quantificação de indoleaminas

A Tabela 3 apresenta os resultados relativos ao tempo de retenção, especificidade, recuperação e linearidade para o ensaio cromatográfico relativo à quantificação de 5-HT, 5-HIAA e DHBA. O ensaio apresentou reprotubidade, separabilidade, especificidade e linearidade suficientes.

	5-HT	5-HIAA	DHBA
<i>Variabilidade do tempo de retenção (%RSD)</i>	0,626	1,178	1,785
<i>Recuperação (%RSD)</i>	1,866	1,979	2,136
<i>Linearidade (r^2)</i>	0,998	0,994	0,998
<i>Precisão intra-dia (%CV)</i>	2,521	1,163	0,391
<i>Acurácia intra-dia (%DP)</i>	93,944	95,104	93,811
<i>Precisão inter-dias (%CV)</i>	2,756	2,678	0,316
<i>Acurácia inter-dias (%DP)</i>	107,879	125,998	106,814
	<i>Fator de capacidade (k')</i>		
<i>5-HT</i>	0,113		
<i>5-HIAA</i>	7,360		
<i>DHBA</i>	6,977		
<i>DHBA:5-HT</i>	62,138		
<i>DHBA:5-HIAA</i>	65,411		
<i>5-HIAA:5-HT</i>	65,411		

Tabela 3: Validação do protocolo de quantificação de indoleaminas por CLAE.

5.2. Níveis de 5-HT e 5-HIAA no encéfalo

5.2.2. Níveis extracelulares de 5-HT, mas não 5-HIAA, aumentam após a exposição ao PCE, mas não ao DVN (MAXIMINO et al., 2013c)

A Figura 5A apresenta as concentrações de serotonina no ECF extraído do cérebro de paulistinhas (*longfin*) após a exposição ao teste de preferência claro/escuro e ao teste de distribuição vertical eliciada pela novidade. A exposição ao PCE, mas não ao DVN, aumentou o conteúdo de 5-HT no ECF ($F_{2,17} = 3,894$, $p = 0,0434$). Nenhuma diferença foi observada entre os grupos nas concentrações de 5-HIAA ($F_{2,17} = 0,4839$, NS; Figura 5B).

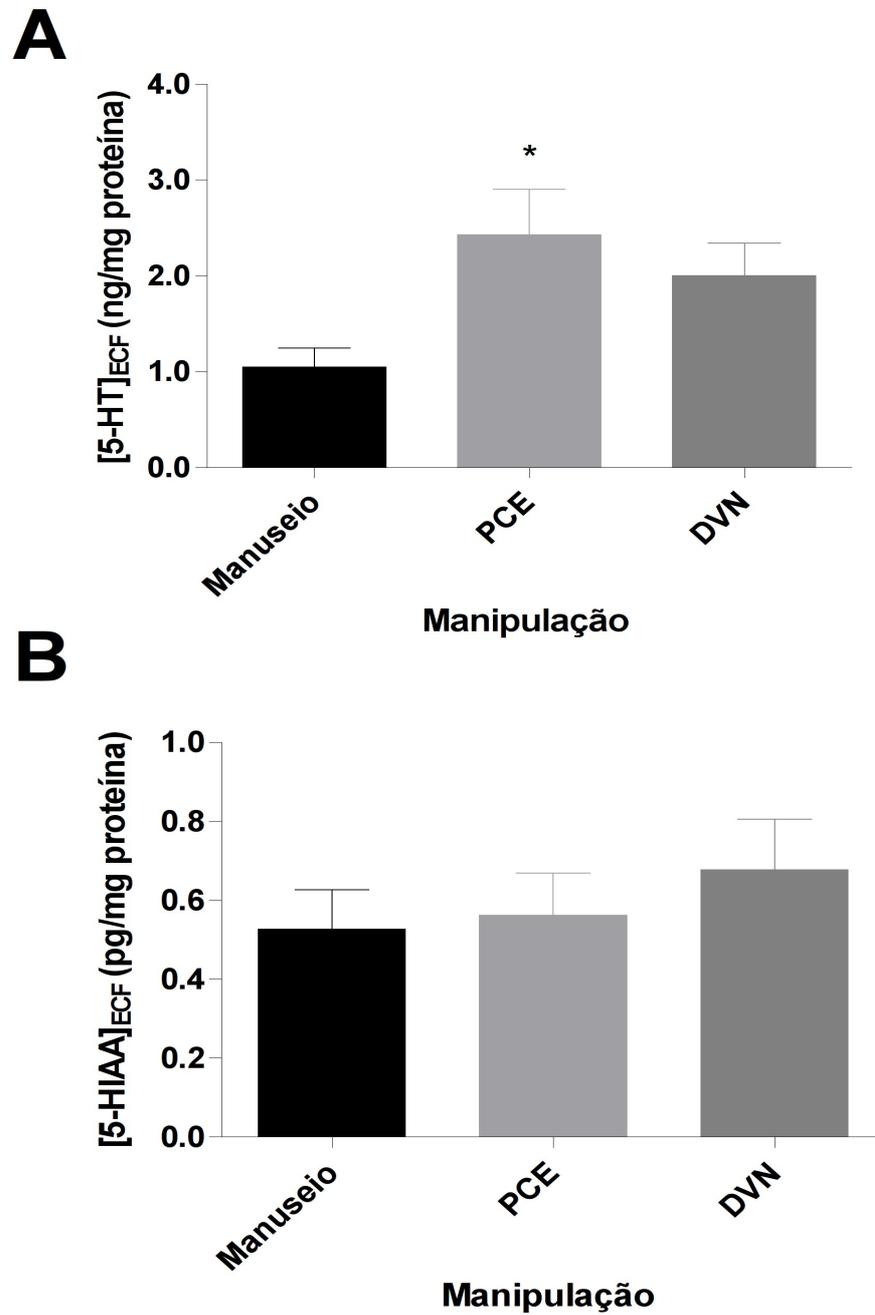


Figura 5: Conteúdo de (A) serotonina (5-HT) e (B) ácido 5-hidróxindoleacético (5-HIAA) no fluido extracelular (ECF) do cérebro de paulistinhas manuseados, expostos a um aparato de distribuição vertical eliciada pela novidade (DVN) por 6 min, ou expostos a um aparato de preferência por escuridão (PCE) por 15 minutos. As barras de erro representam erros-padrão da média. *, $p < 0,05$.

5.2.3. A exposição ao PCE aumenta o conteúdo de 5-HT no rombencéfalo e prosencéfalo, enquanto a exposição ao DVN aumenta o conteúdo no mesencéfalo (MAXIMINO et al., 2013c)

O cérebro de quatro animais de cada grupo (manuseio, DVN e PCE) foram parcelados em rombencéfalo, mesencéfalo e prosencéfalo, e o tecido foi homogeneizado. No rombencéfalo, os níveis de serotonina elevaram-se em aproximadamente 20% após exposição ao PCE, mas não quando os animais eram expostos ao DVN ($F_{2, 11} = 4,508$, $p = 0,044$; Figura 6A). Da mesma forma, os níveis de 5-HT no prosencéfalo foram elevados em aproximadamente 80% em animais expostos ao PCE, mas não ao DVN ($F_{2, 11} = 76,36$, $p < 0,0001$; Figura 6C). Um fenômeno oposto é observado no mesencéfalo, no qual a exposição ao DVN, mas não ao PCE, aumenta o conteúdo de serotonina ($F_{2, 11} = 13,81$, $p = 0,0018$; Figura 6B).

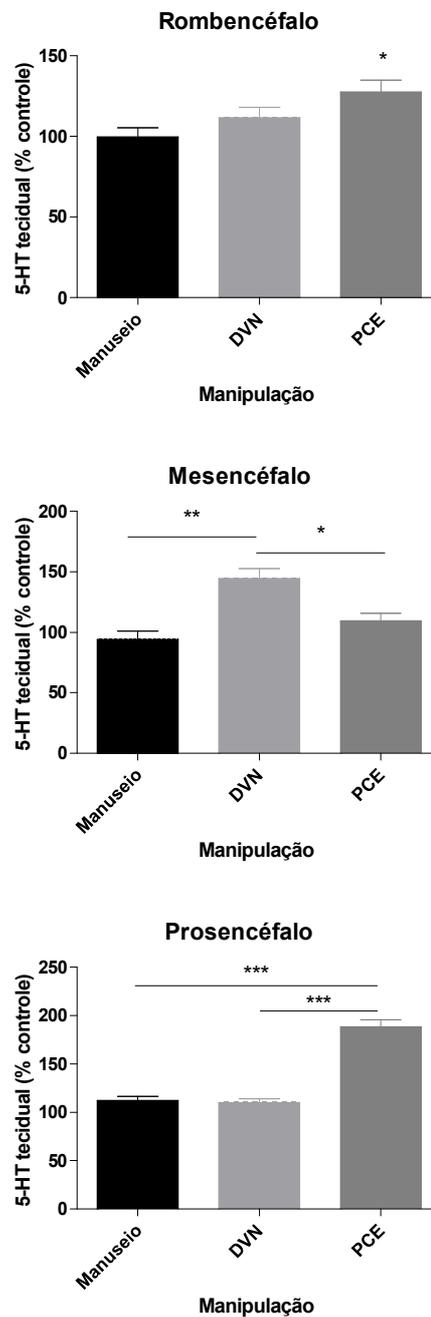


Figura 6: Conteúdo de serotonina tecidual no (A) rombencéfalo, (B) mesencéfalo ou (C) prosencéfalo de paulistinhas manuseados, expostos a um aparato de distribuição vertical eliciada pela novidade (DVN) por 6 min, ou expostos a um aparato de preferência por escuridão (PCE) por 15 minutos. As barras de erro representam erros-padrão da média. ***, $p < 0,001$; **, $p < 0,01$; *, $p < 0,05$.

5.2.4. Os níveis extracelulares de 5-HT correlacionam-se positivamente com o comportamento no PCE e negativamente com o comportamento no DVN

Em linhas gerais, os níveis de 5-HT estão associados ao aumento do tempo no topo do DVN ($r^2 = 0,7225$, $p = 0,01828$; $n = 8$; Figura 7), sem associação com as outras variáveis nesse teste ($r^2 < 0,5$, $p > 0,01$; $n = 8$). Inversamente, níveis mais altos de 5-HT estão associados a menor tempo no compartimento branco, maior latência para entrada nesse compartimento e maior avaliação de risco ($r^2 > 0,7$, $p < 0,01$; $n = 8$; Figura 8). Nenhuma relação foi observada com o número de quadrantes cruzados no compartimento branco, número de entradas nesse compartimento, e número ou duração de eventos de nado errático, tigmotaxia ou congelamento ($r^2 < 0,55$, $p > 0,01$; $n = 8$).

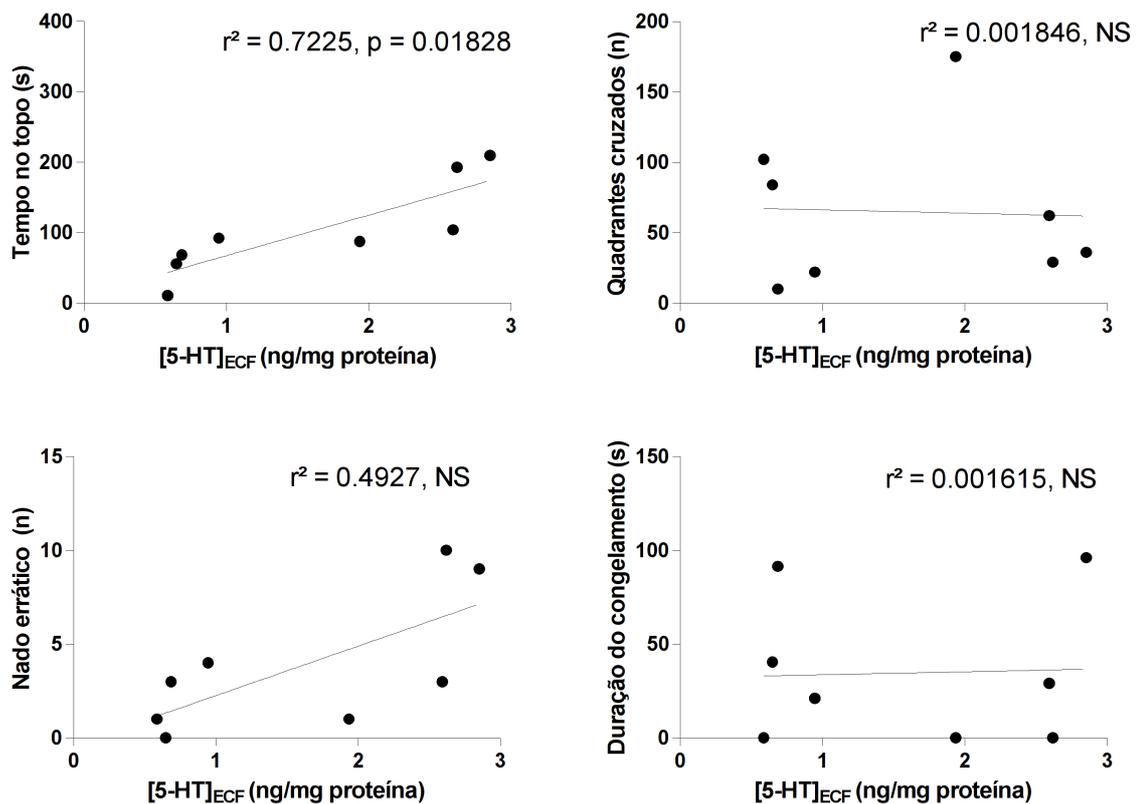


Figura 7: Correlações entre o conteúdo extracelular de serotonina no cérebro de paulistinhas expostos ao DVN e as diferentes medidas comportamentais nesse teste.

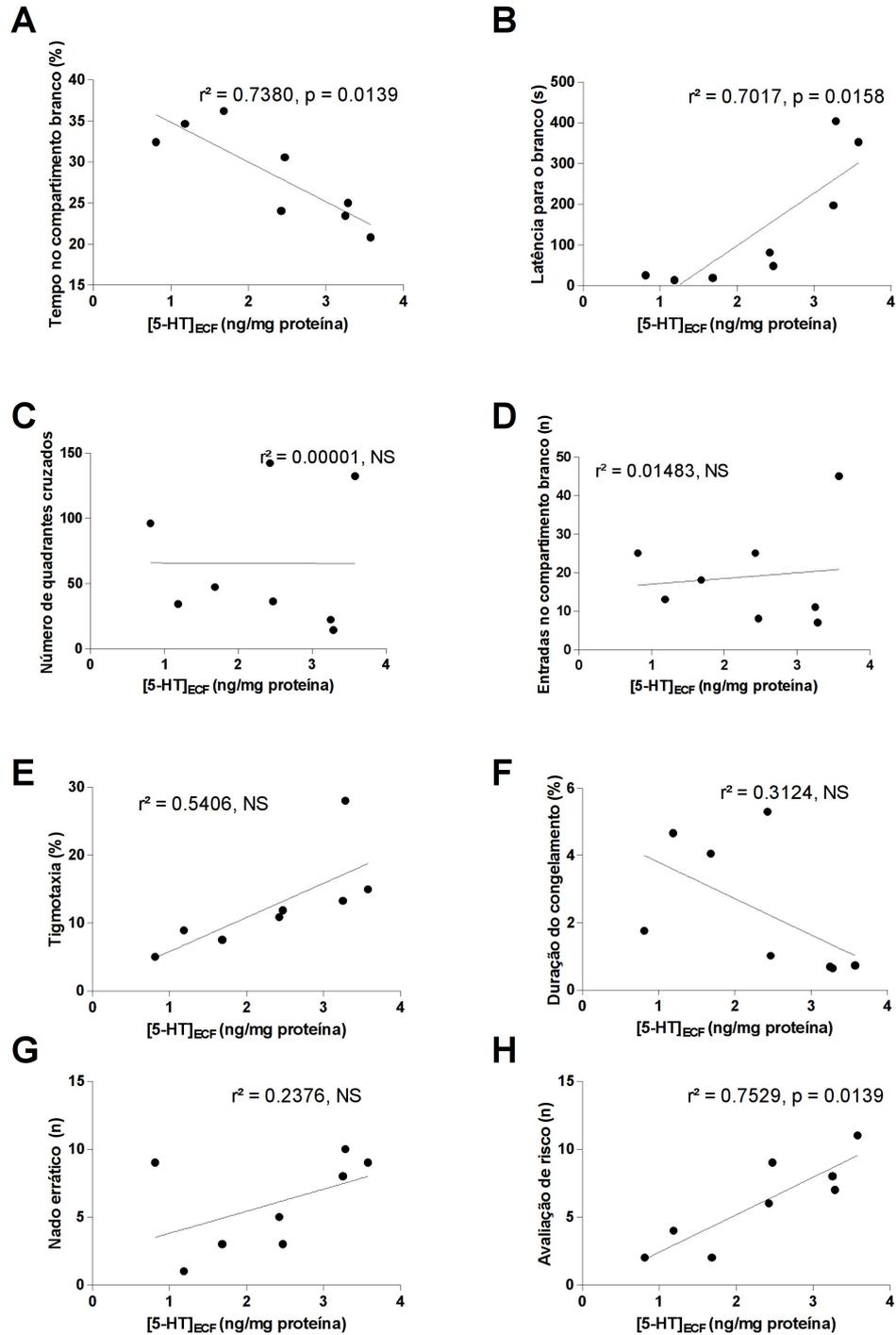
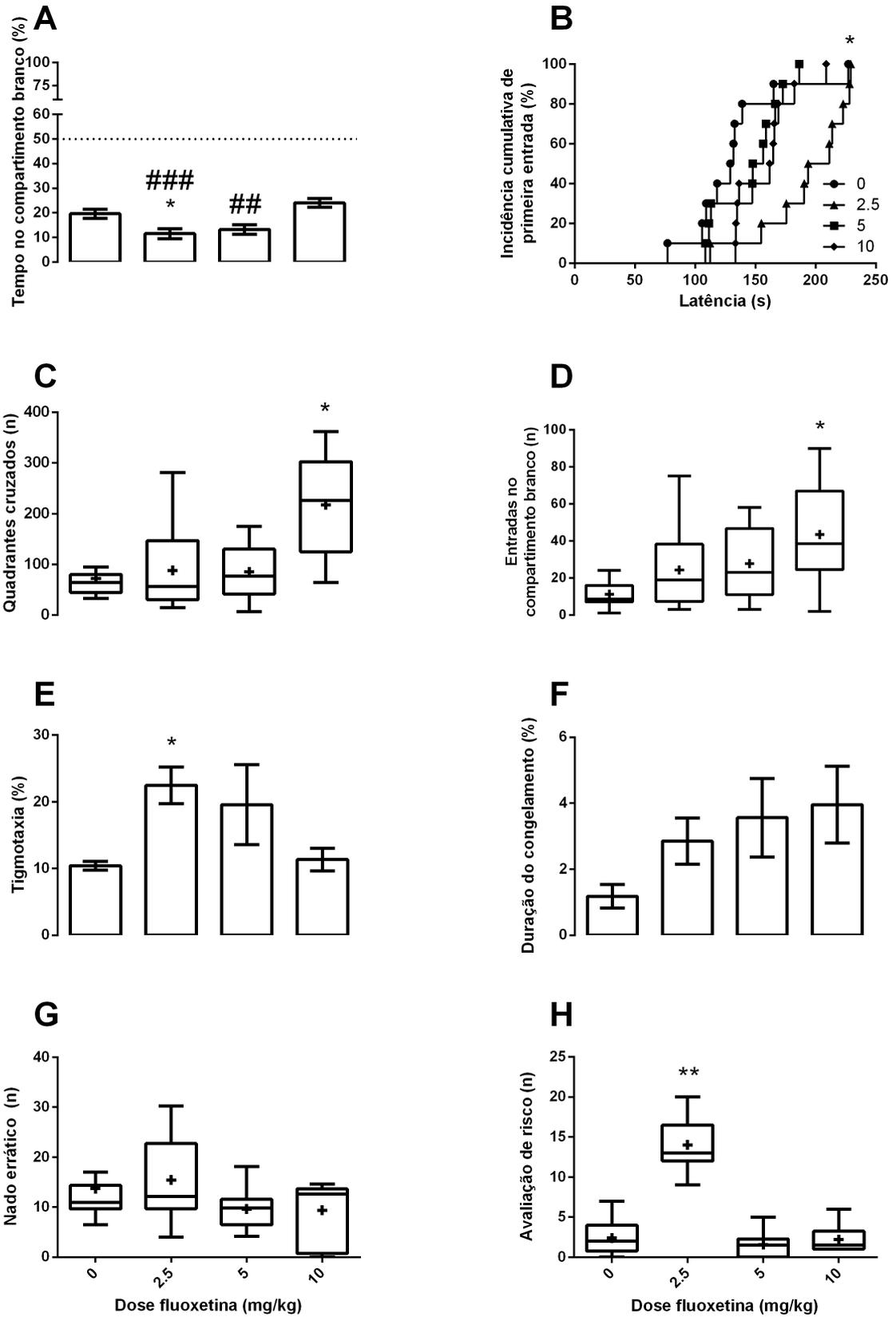


Figura 8: Correlações entre o conteúdo extracelular de serotonina no cérebro de paulistinhas expostos ao PCE e as diferentes medidas comportamentais nesse teste.

5.3. O tratamento com uma dose baixa de fluoxetina é ansiogênico no PCE e ansiolítico no DVN

A administração do ISRS fluoxetina em 2,5 mg/kg diminuiu o tempo no compartimento branco (Figura 9A; $F_{3, 39} = 9,251$, $p = 0,0001$) e aumentou a latência para entrada no branco (Figura 9B; $\chi^2 = 6,417$, razão de risco = 3,909, $p = 0,0113$), tempo em tigmotaxia (Figura 9E; $F_{3, 39} = 3,054$, $p = 0,0407$) e a frequência de avaliação de risco (Figura 9H; $H = 22,89$, $p < 0,0001$; $n = 10$ em cada grupo). A maior dose (10 mg/kg) aumentou o número de entradas no compartimento branco (Figura 9D; $H = 9,638$, $p = 0,0215$; $n = 10$ em cada grupo) e o número de quadrantes cruzados nessa área (Figura 9C; $H = 13$, $p = 0,0046$; $n = 10$ em cada grupo).



← *Figura 9: Efeitos do tratamento agudo com fluoxetina (2,5, 5 ou 10 mg/kg) no (A) tempo no compartimento branco, (B) latência para a entrada no branco, (C) número de quadrantes cruzados no compartimento branco, (D) entradas no compartimento branco, (E) tigmotaxia, (F) congelamento, (G) nado errático, e (H) avaliação de risco no PCE. Os gráficos de barras representam média ± erro padrão, enquanto os boxplots representam os dados do 25o ao 75o percentis (caixas) e do valor mínimo ao valor máximo (barras); nesses gráficos, a cruz (+) indica a posição da média. Os gráficos de sobrevivência representam estimativas de Kaplan-Meier para as incidências cumulativas de latência de primeira entrada no compartimento branco. **, $p < 0,01$ vs controle; *, $p < 0,05$ vs controle; ##, $p < 0,01$ vs 10 mg/kg.*

Inversamente, a fluoxetina aumentou o tempo no topo no DVN em todas as doses (Figura 10A; $F_{3, 39} = 28,99$, $p < 0,0001$), facilitando a habituação no sexto minuto nas doses maiores (Figura 10A'; $F_{3, 216} = 11,45$, $p < 0,0001$). A maior dose produziu efeitos hiperlocomotores (Figura 10B; $H = 10,34$, $p = 0,0159$, $n = 10$ em cada grupo). Nenhum efeito foi observado na formação de bases (Figura 10C; $F_{3, 39} = 1,29$, NS). Na dose de 5 mg/kg, a fluoxetina diminuiu o número de eventos de nado errático (Figura 10D; $H = 14,23$, $p = 0,0026$) e a duração do congelamento (Figura 10E; $F_{3, 39} = 17,5$, $p < 0,0001$); esse último parâmetro também foi diminuído pelo tratamento com 2,5 mg/kg de fluoxetina.

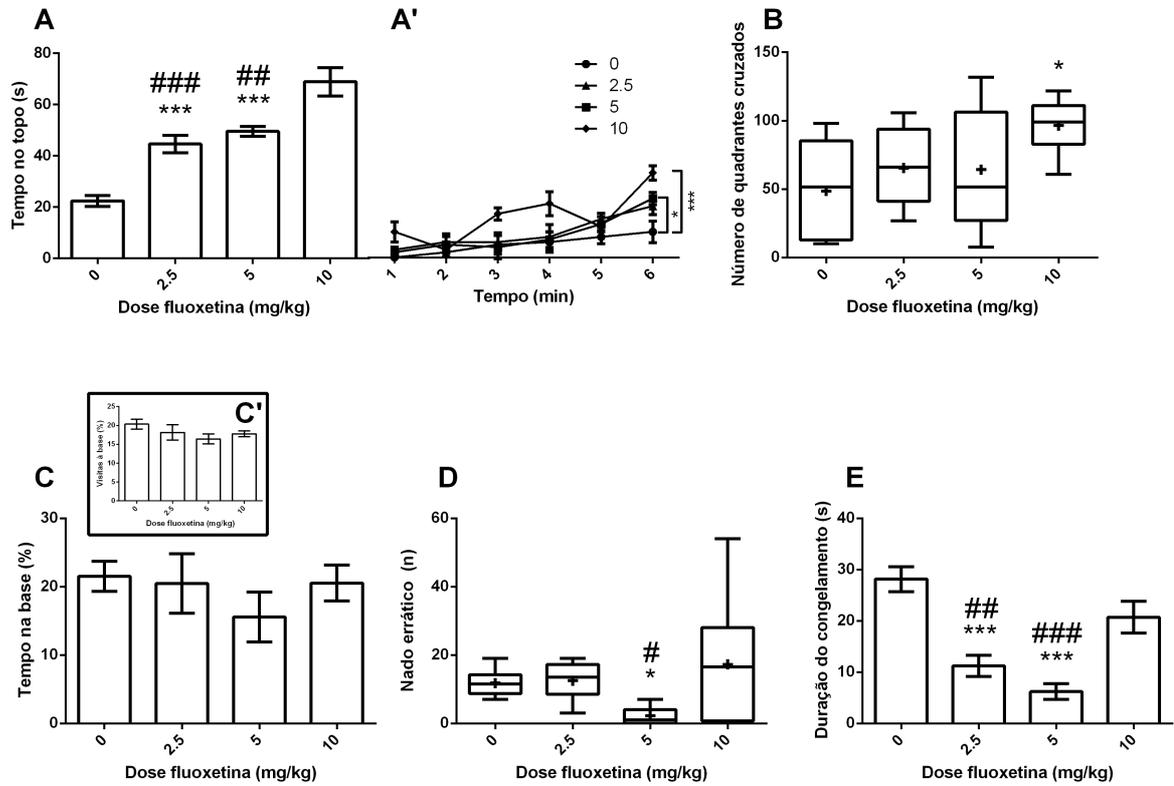


Figura 10: Efeitos do tratamento agudo com fluoxetina (2,5, 5 ou 10 mg/kg) no (A) tempo no topo e (A') sua habituação, (B) número de quadrantes cruzados, (C) tempo dispendido e (C') número de entradas na base no compartimento branco, (D) nado errático, e (E) congelamento no DVN. Os gráficos de barras representam média \pm erro padrão, enquanto os boxplots representam os dados do 25o ao 75o percentis (caixas) e do valor mínimo ao valor máximo (barras); nesses gráficos, a cruz (+) indica a posição da média. Os gráficos de sobrevivência representam estimativas de Kaplan-Meier para as incidências cumulativas de latência de primeira entrada no compartimento branco. ***, $p < 0,001$ vs controle; *, $p < 0,05$ vs controle; ###, $p < 0,01$ vs 10 mg/kg.

5.4. O tratamento com uma pCPA é ansiolítico no PCE e ansiogênico no DVN

Duas injeções de 300 mg/kg de pCPA espaçadas por 24 h entre as injeções reduziram os níveis extracelulares de 5-HT a 10% dos níveis observados nos controles, enquanto o tratamento com 2,5 mg/kg de fluoxetina aumentou esses valores para cerca de 150% desses valores (Figura 11; $F_{2, 15} = 94,69$, $p < 0,001$). O pCPA aumentou o tempo no branco (Figura 12A; $t_{gl = 12} = 6,265$, $p < 0,0001$) e diminuiu a tigmotaxia (Figura 12E; $t_{gl = 12} = 2,528$, $p = 0,0265$) e a avaliação de risco (Figura 12H; $U = 6$, $p = 0,0212$; $n = 7$ em cada grupo). Não foram observados efeitos nas outras variáveis (Figuras 12B-D e F-G; $\chi^2 = 0,0706$; $t_{gl = 12} < 0,14$; $U < 23$; NS). O mesmo tratamento diminuiu o tempo no topo do DVN (Figura 13A; $t_{gl = 12} = 2,711$, $p = 0,0351$) e aboliu a habituação (Figura 13A'; $F_{5, 84} = 2,799$, $p = 0,0218$). Nenhum outro efeito foi observado ($U < 13,5$; $t_{gl = 12} = 1,842$; NS).

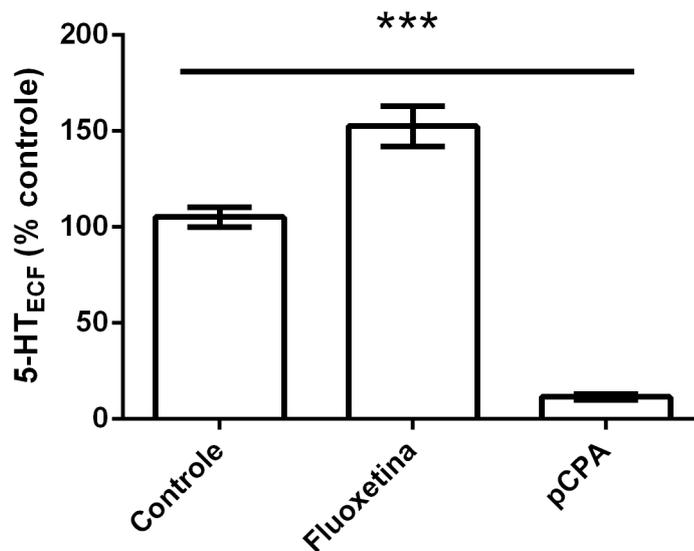
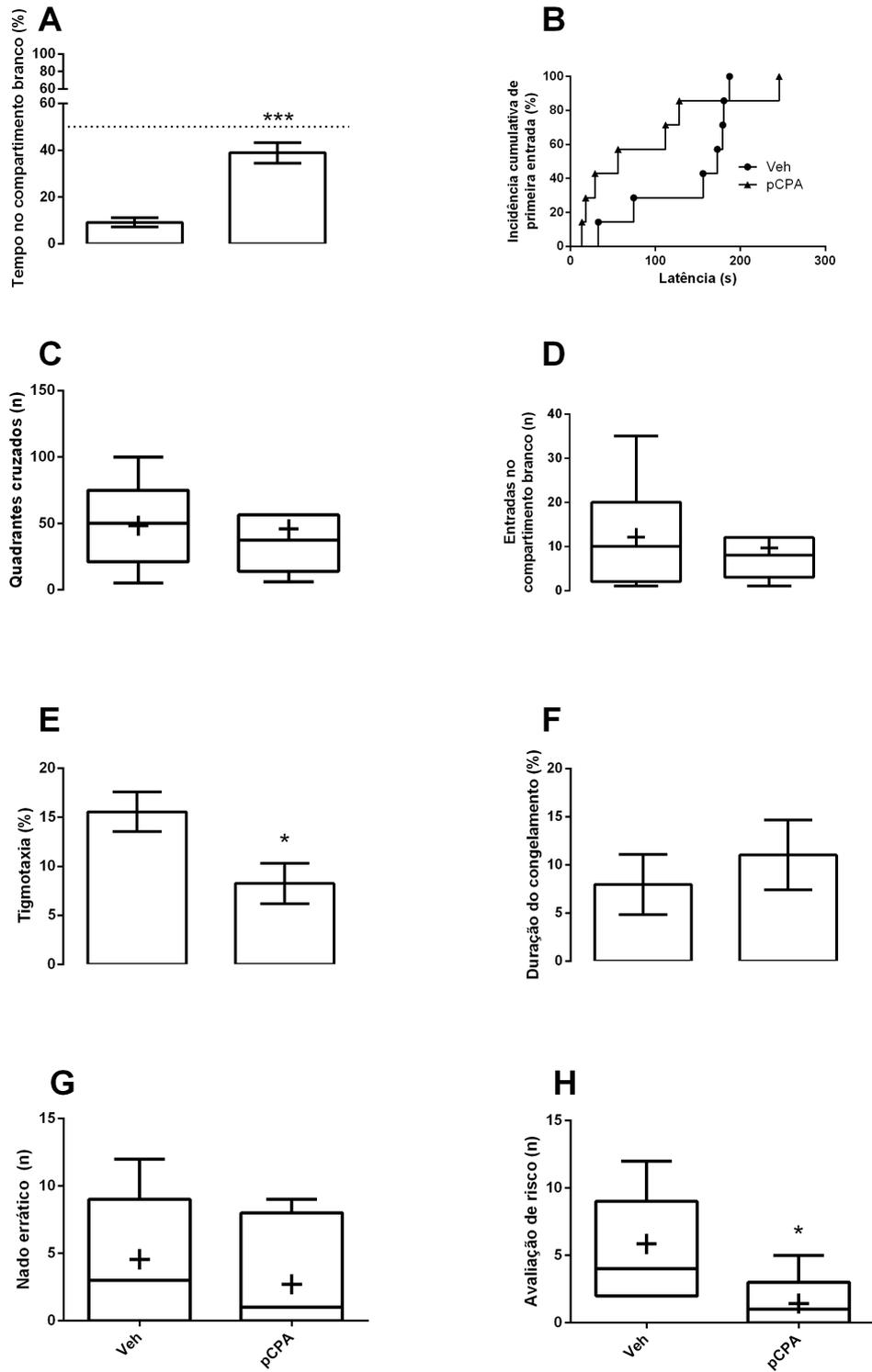


Figura 11: Efeitos do tratamento com fluoxetina (2,5 mg/kg) ou pCPA (2 x 300 mg/kg) nos níveis extracelulares de serotonina (5-HT_{ECF}) no cérebro de paulistinhas adultos da linhagem longfin. ***, $p < 0,0001$ vs. controle.



← *Figura 12: Efeitos do tratamento agudo com pCPA (2 x 300 mg/kg) no (A) tempo no compartimento branco, (B) latência para a entrada no branco, (C) número de quadrantes cruzados no compartimento branco, (D) entradas no compartimento branco, (E) tigmotaxia, (F) congelamento, (G) nado errático, e (H) avaliação de risco no PCE. Os gráficos de barras representam média ± erro padrão, enquanto os boxplots representam os dados do 25º ao 75º percentis (caixas) e do valor mínimo ao valor máximo (barras); nesses gráficos, a cruz (+) indica a posição da média. Os gráficos de sobrevivência representam estimativas de Kaplan-Meier para as incidências cumulativas de latência de primeira entrada no compartimento branco. ***, $p < 0,01$ vs controle; *, $p < 0,05$ vs controle.*

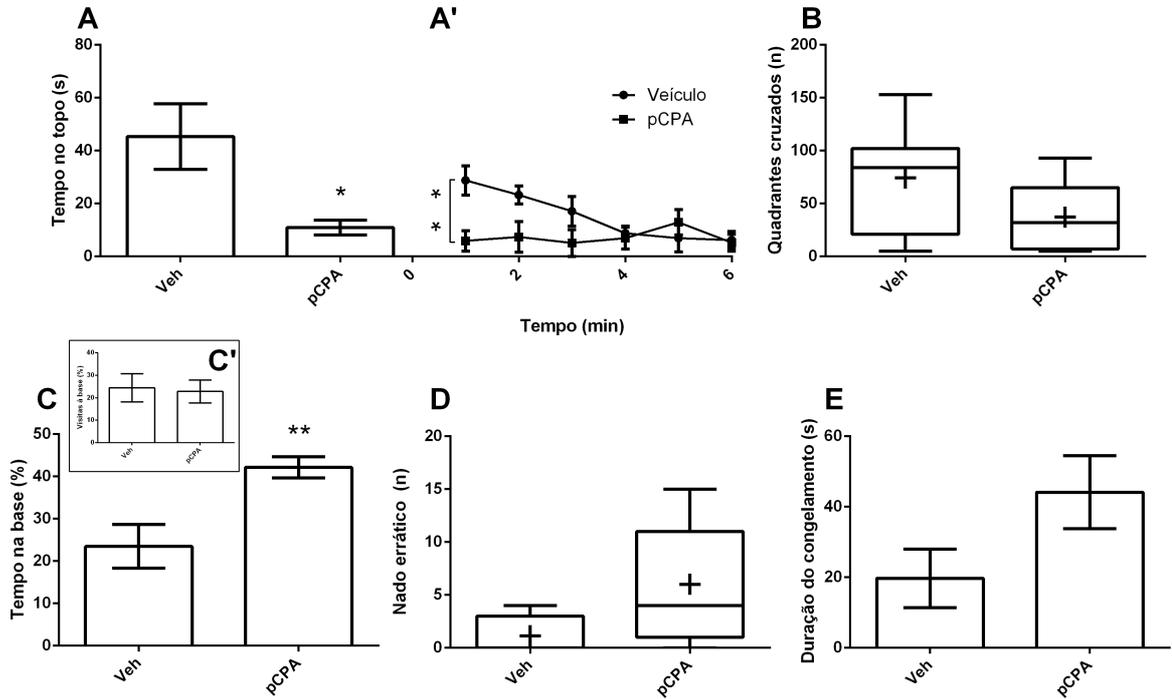
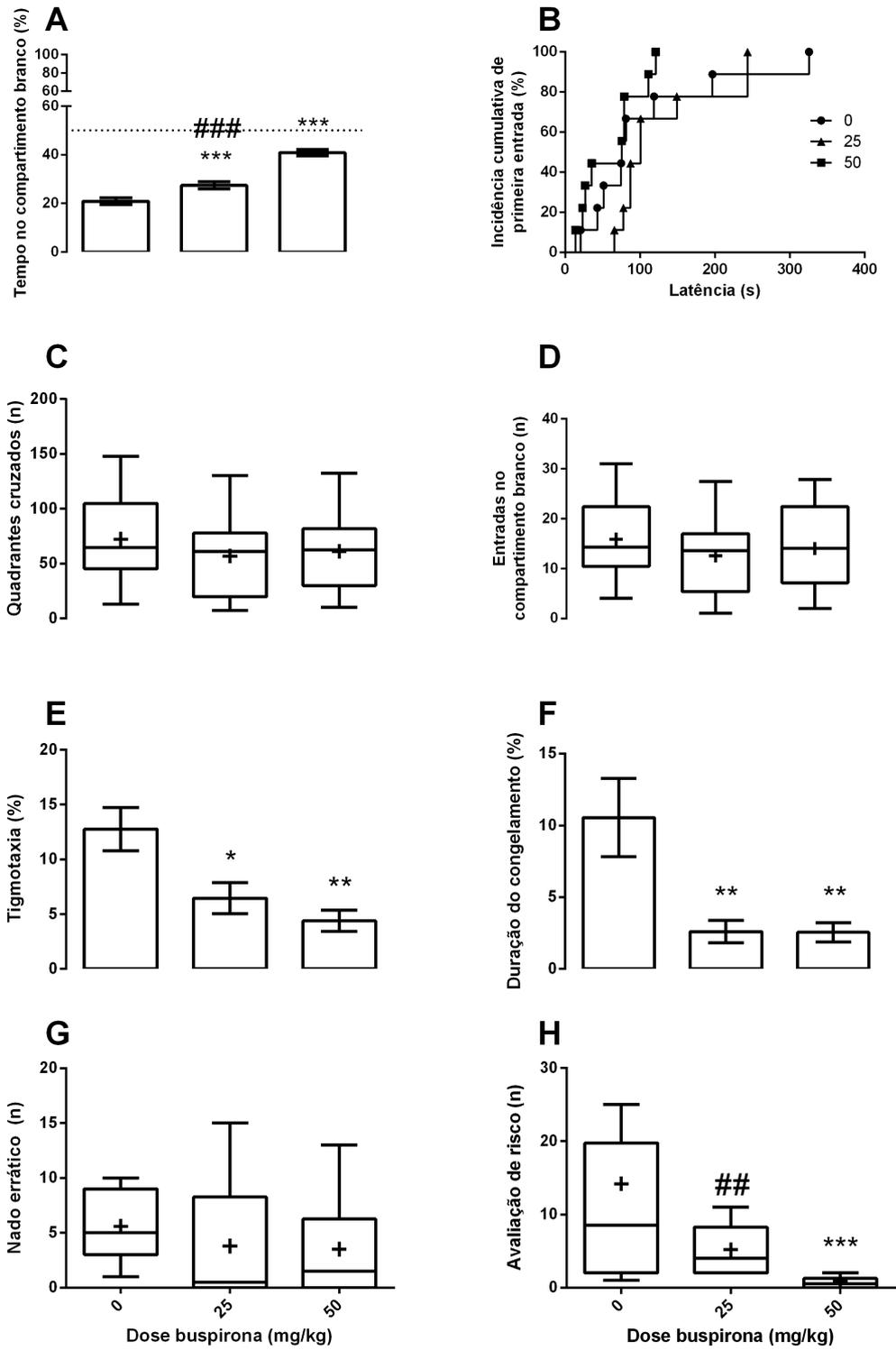


Figura 13: Efeitos do tratamento agudo com pCPA (2x 300 mg/kg) no (A) tempo no topo e (A') sua habituação, (B) número de quadrantes cruzados, (C) tempo dispendido e (C') número de entradas na base no compartimento branco, (D) nado errático, e (E) congelamento no DVN. Os gráficos de barras representam média \pm erro padrão, enquanto os boxplots representam os dados do 25o ao 75o percentis (caixas) e do valor mínimo ao valor máximo (barras); nesses gráficos, a cruz (+) indica a posição da média. Os gráficos de sobrevivência representam estimativas de Kaplan-Meier para as incidências cumulativas de latência de primeira entrada no compartimento branco. **, $p < 0,001$ vs controle; *, $p < 0,05$ vs controle.

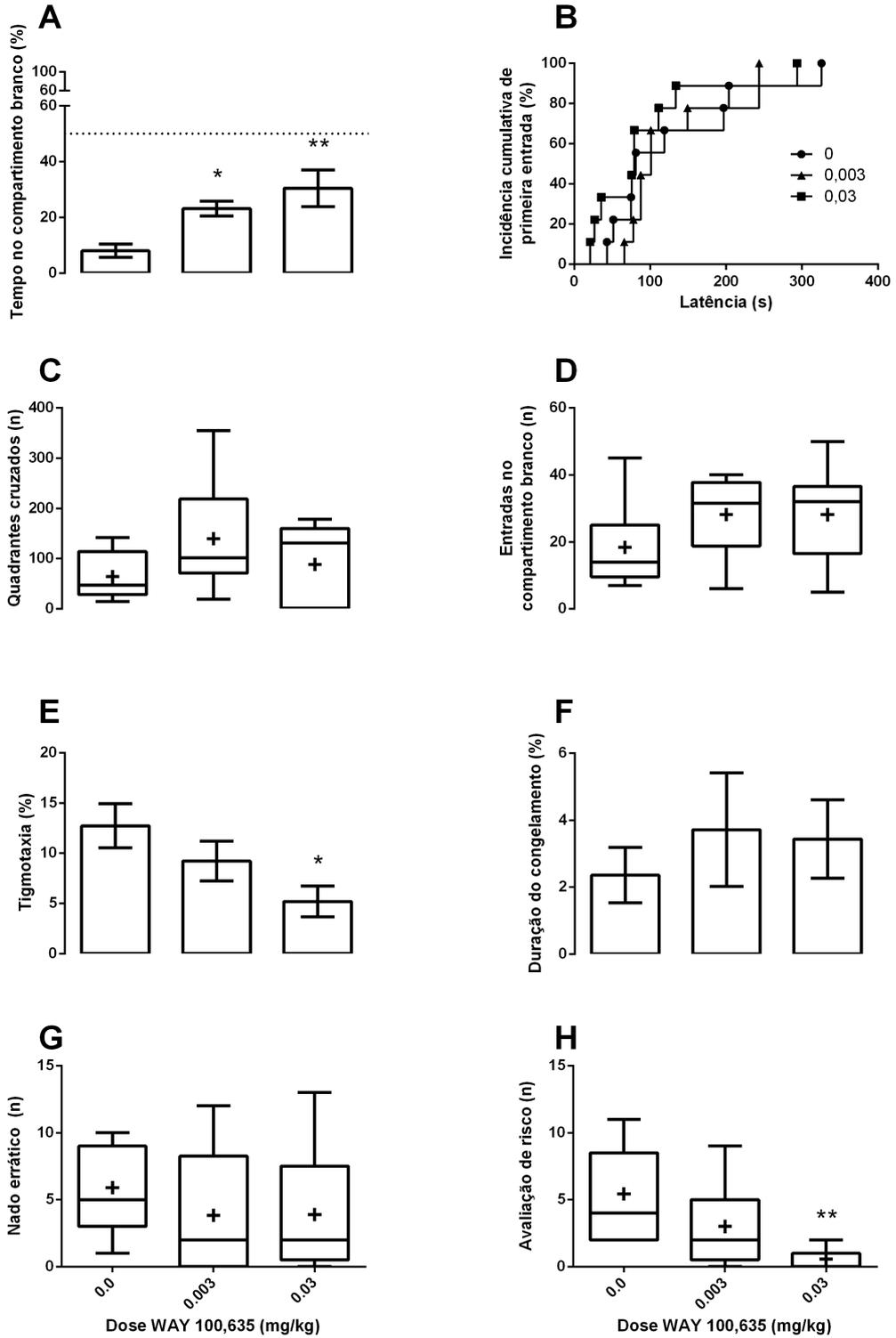
5.5. O comportamento no DVN e no PCE está sob inibição tônica mediada pelo receptor 5-HT_{1A} (MAXIMINO et al., 2013c)

O tratamento com o agonista parcial buspirona (25 e 50 mg/kg) aumentou o tempo no branco de forma dose-dependente (Figura 14A; $F_{2, 29} = 5,458$, $p = 0,0105$) sem afetar a locomoção total ou o número de entradas nesse compartimento (Figuras 14C-D; $H < 0,62$, NS; $n = 10$ em cada grupo). Nenhum efeito foi observado sobre a latência para entrada no compartimento branco (Figura 14B; $\chi^2 < 1,2$, NS) ou sobre o nado errático (Figura 14G; $H = 3,574$, NS; $n = 10$ em cada grupo). A tigmotaxia foi reduzida de forma dose-dependente (Figura 14E; $F_{2, 29} = 8,396$, $p = 0,0015$), enquanto o congelamento foi diminuído de forma igual por ambas as doses (Figura 14F; $F_{2, 29} = 7,439$, $p = 0,0027$). A maior dose diminuiu a avaliação de risco (Figura 14G; $H = 15,48$, $p = 0,0004$; $n = 10$ em cada grupo).



← *Figura 14: Efeitos do tratamento agudo com buspirona (25 e 50 mg/kg) no (A) tempo no compartimento branco, (B) latência para a entrada no branco, (C) número de quadrantes cruzados no compartimento branco, (D) entradas no compartimento branco, (E) tigmotaxia, (F) congelamento, (G) nado errático, e (H) avaliação de risco no PCE. Os gráficos de barras representam média ± erro padrão, enquanto os boxplots representam os dados do 25º ao 75º percentis (caixas) e do valor mínimo ao valor máximo (barras); nesses gráficos, a cruz (+) indica a posição da média. Os gráficos de sobrevivência representam estimativas de Kaplan-Meier para as incidências cumulativas de latência de primeira entrada no compartimento branco. ***, $p < 0,001$ vs controle; **, $p < 0,01$; *, $p < 0,05$ vs controle; ###, $p < 0,001$ vs. 50 mg/kg; ##, $p < 0,01$ vs. 50 mg/kg.*

Da mesma forma, o tratamento com o antagonista WAY 100635 (0,03 mg/kg, mas não 0,003 mg/kg) aumentou o tempo no compartimento branco (Figura 15A; $F_{2,26} = 6,962$, $p = 0,0041$) e diminuiu a tigmotaxia (Figura 15E; $F_{2,26} = 6,962$, $p = 0,0041$) e a avaliação de risco (Figura 15H; $H = 12,62$, $p = 0,0018$; $n = 9$ por grupo). Nenhum outro efeito foi observado.



← *Figura 15: Efeitos do tratamento agudo com WAY 100,635 (0,003 e 0,03 mg/kg) no (A) tempo no compartimento branco, (B) latência para a entrada no branco, (C) número de quadrantes cruzados no compartimento branco, (D) entradas no compartimento branco, (E) tigmotaxia, (F) congelamento, (G) nado errático, e (H) avaliação de risco no PCE. Os gráficos de barras representam média ± erro padrão, enquanto os boxplots representam os dados do 25º ao 75º percentis (caixas) e do valor mínimo ao valor máximo (barras); nesses gráficos, a cruz (+) indica a posição da média. Os gráficos de sobrevivência representam estimativas de Kaplan-Meier para as incidências cumulativas de latência de primeira entrada no compartimento branco. **, $p < 0,01$ *, $p < 0,05$ vs controle.*

No DVN, o tratamento com buspirona aumentou o tempo no topo em ambas as doses (Figura 16A; $F_{2, 28} = 5,458$, $p = 0,0105$), enquanto a maior dose facilitou a habituação (Figura 16A'; $F_{10, 150} = 1,948$, $p = 0,0429$) e diminuiu a duração do congelamento (Figura 16D; $F_{2,28} = 3,508$, $p = 0,0454$). Nenhum outro efeito foi observado.

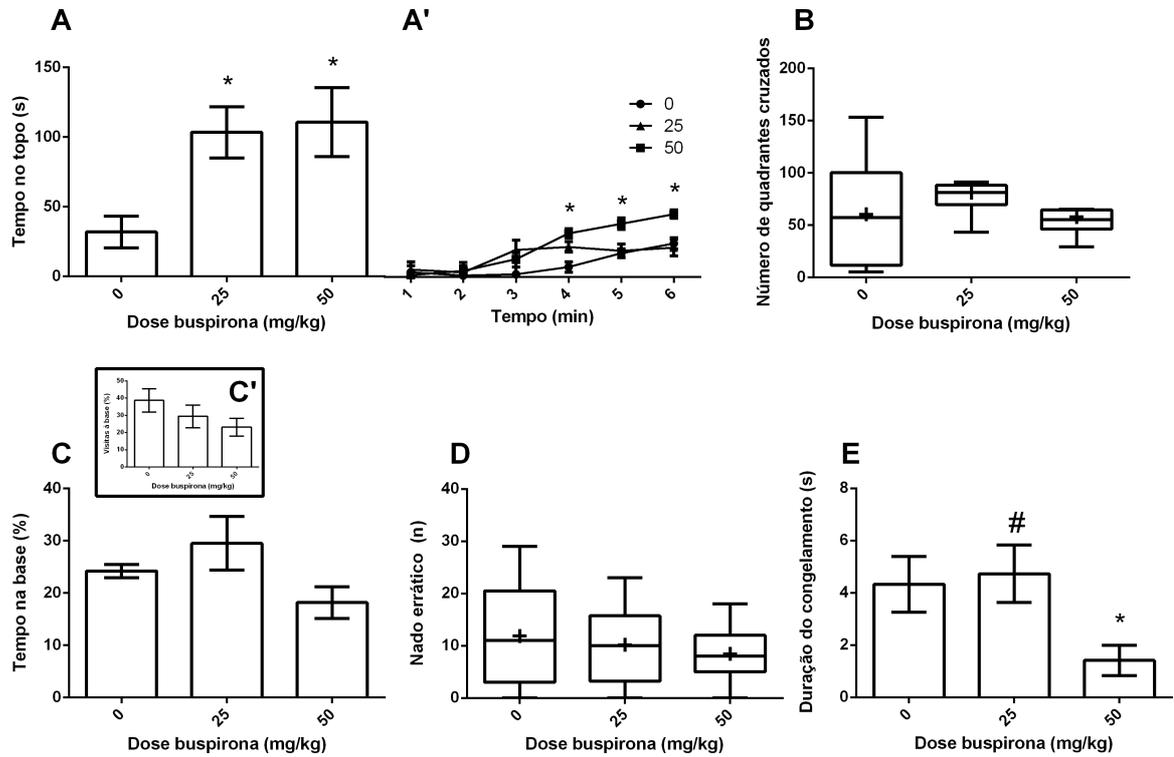


Figura 16: Efeitos do tratamento agudo com buspirona (25 e 50 mg/kg) no (A) tempo no topo e (A') sua habituação, (B) número de quadrantes cruzados, (C) tempo dispendido e (C') número de entradas na base no compartimento branco, (D) nado errático, e (E) congelamento no DVN. Os gráficos de barras representam média \pm erro padrão, enquanto os boxplots representam os dados do 25^o ao 75^o percentis (caixas) e do valor mínimo ao valor máximo (barras); nesses gráficos, a cruz (+) indica a posição da média. Os gráficos de sobrevivência representam estimativas de Kaplan-Meier para as incidências cumulativas de latência de primeira entrada no compartimento branco. *, $p < 0,05$ vs controle; #, $p < 0,05$ vs. 50 mg/kg.

O antagonista WAY 100635 aumentou o tempo no topo no DVN em ambas as doses (Figura 17A; $F_{2, 23} = 5,406$, $p = 0,0128$). A dose mais baixa também promoveu a habituação (Figura 17A'; $F_{2, 150} = 3,507$, $p = 0,0325$) e aumentou o tempo em uma “base” (Figura 19C; $F_{2,23} = 6,428$, $p = 0,0056$). Nenhum outro efeito foi observado.

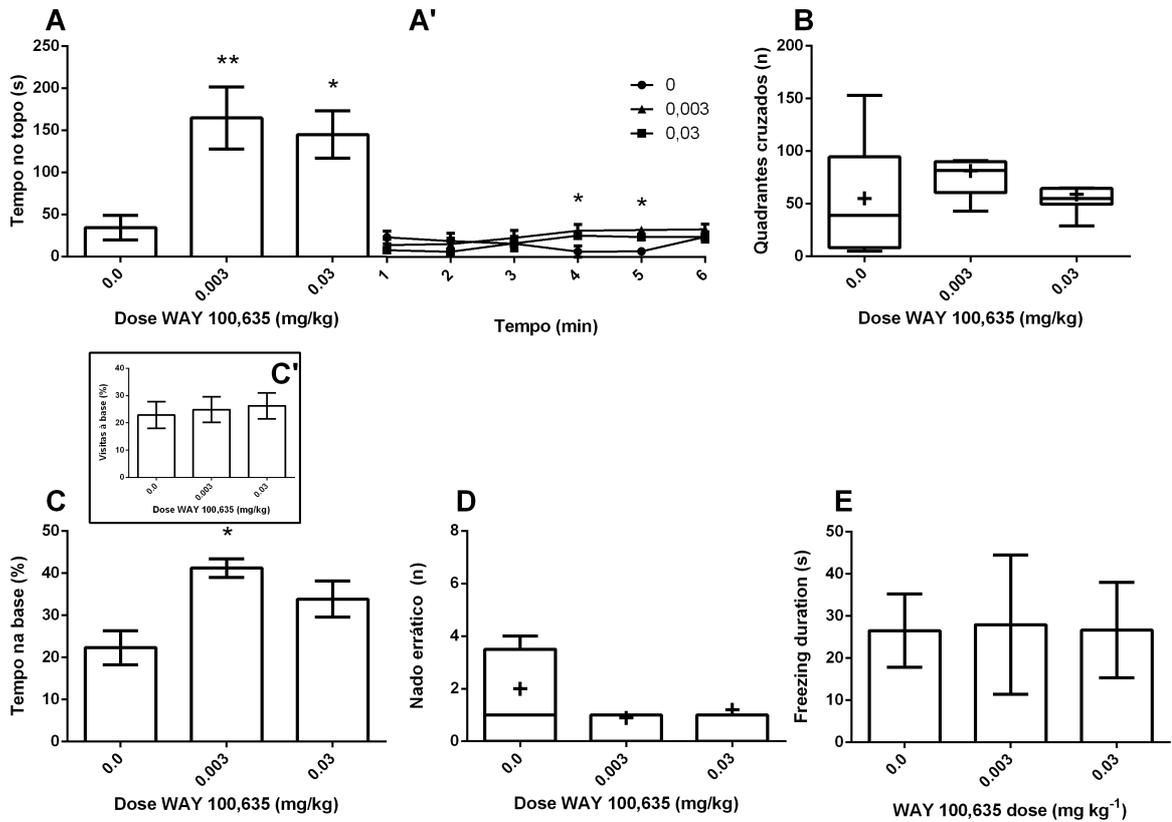
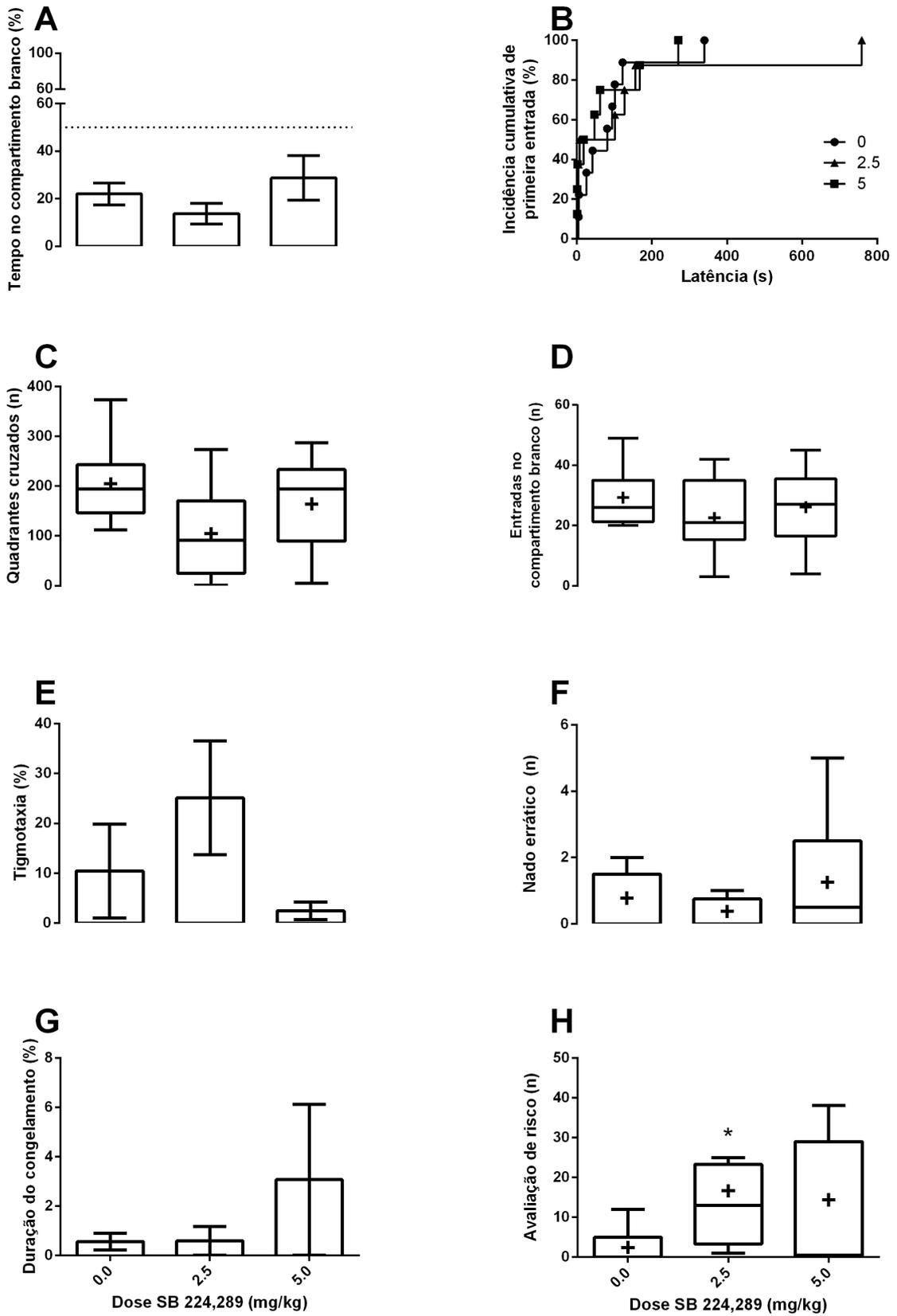


Figura 17: Efeitos do tratamento agudo com WAY 100,635 (0,003 e 0,03 mg/kg) no (A) tempo no topo e (A') sua habituação, (B) número de quadrantes cruzados, (C) tempo dispendido e (C') número de entradas na base no compartimento branco, (D) nado errático, e (E) congelamento no DPN. Os gráficos de barras representam média \pm erro padrão, enquanto os boxplots representam os dados do 25^o ao 75^o percentis (caixas) e do valor mínimo ao valor máximo (barras); nesses gráficos, a cruz (+) indica a posição da média. Os gráficos de sobrevivência representam estimativas de Kaplan-Meier para as incidências cumulativas de latência de primeira entrada no compartimento branco. **, $p < 0,01$ vs controle; *, $p < 0,05$ vs controle.

5.6. A ativação tônica do receptor 5-HT_{1B} controla o comportamento no DVN, mas não no PCE (MAXIMINO et al., 2013c)

O tratamento com a menor dose (2,5 mg/kg) de SB 224289 aumentou a frequência de avaliação de risco no PCE (Figura 18H; $H = 8,165$, $p = 0,0169$), sem outros efeitos nesse teste. Ambas as doses aumentaram o tempo no topo no DVN (Figura 18A; $F_{2, 25} = 8,701$, $p = 0,0015$), com um maior efeito da menor dose no terceiro minuto do teste (Figura 18A'; $F_{10, 138} = 1,99$, $p = 0,0388$). A formação de bases foi aumentada pela dose menor (Figura 18B; $F_{2, 25} = 7,645$, $p = 0,0028$). Ambas as doses diminuíram a frequência de nado errático (Figura 18C; $H = 13,8$, $p = 0,001$; $n = 8-9$ em cada grupo). Outros efeitos não foram observados.



← *Figura 18: Efeitos do tratamento agudo com SB 224,289 (2,5 e 5,0 mg/kg) no (A) tempo no compartimento branco, (B) latência para a entrada no branco, (C) número de quadrantes cruzados no compartimento branco, (D) entradas no compartimento branco, (E) tigmotaxia, (F) congelamento, (G) nado errático, e (H) avaliação de risco no PCE. Os gráficos de barras representam média \pm erro padrão, enquanto os boxplots representam os dados do 25° ao 75° percentis (caixas) e do valor mínimo ao valor máximo (barras); nesses gráficos, a cruz (+) indica a posição da média. Os gráficos de sobrevivência representam estimativas de Kaplan-Meier para as incidências cumulativas de latência de primeira entrada no compartimento branco. $p < 0,05$ vs controle.*

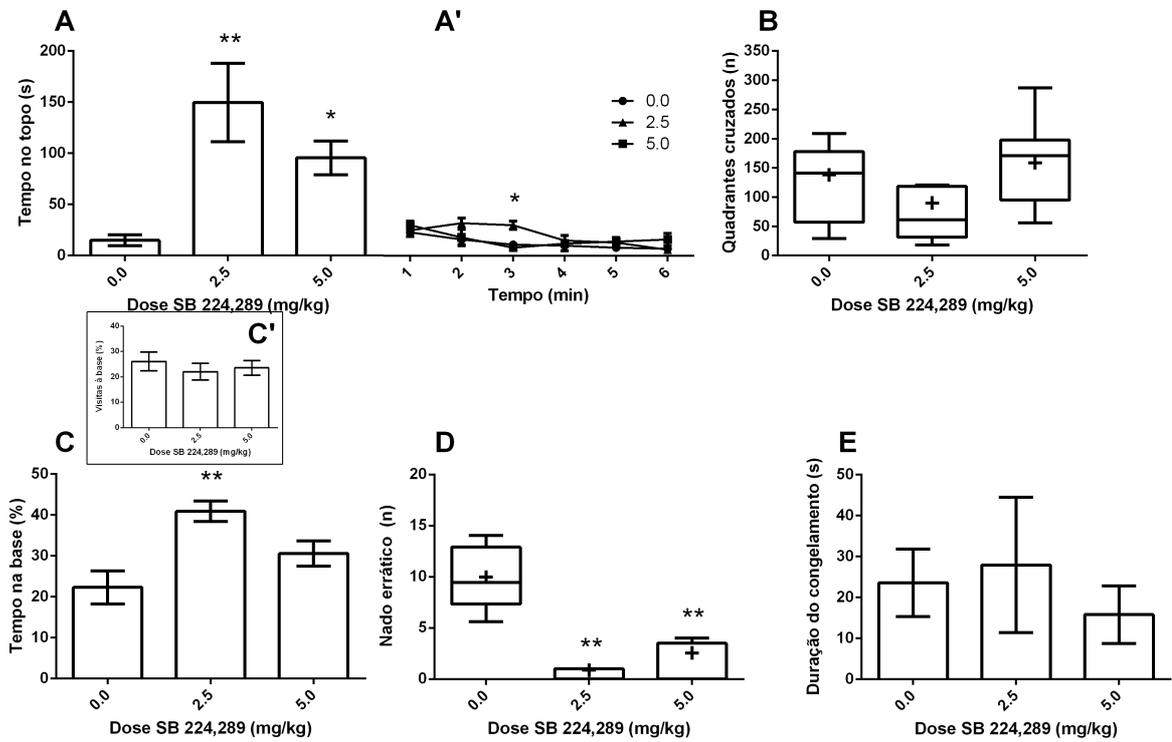
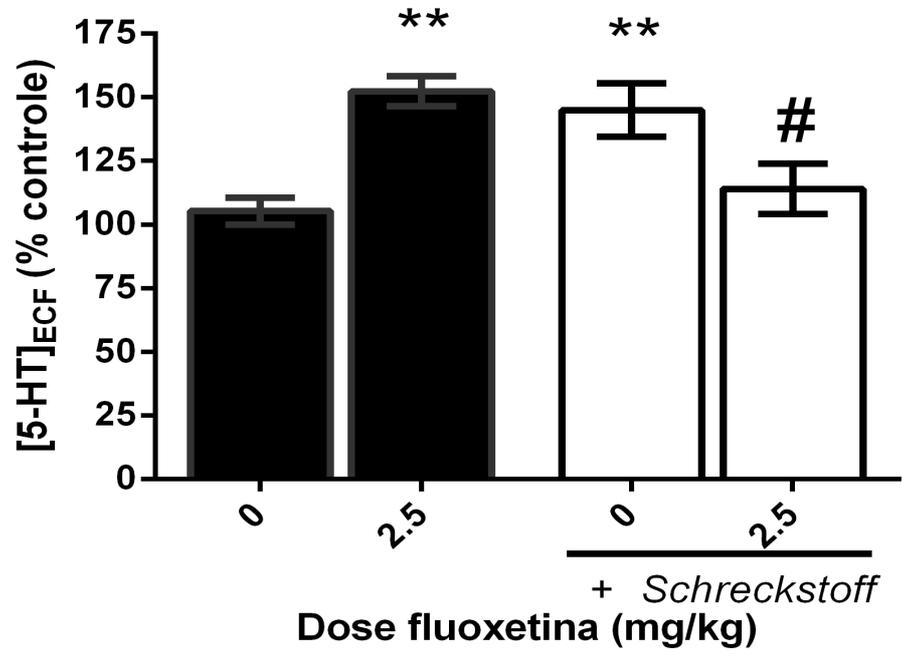
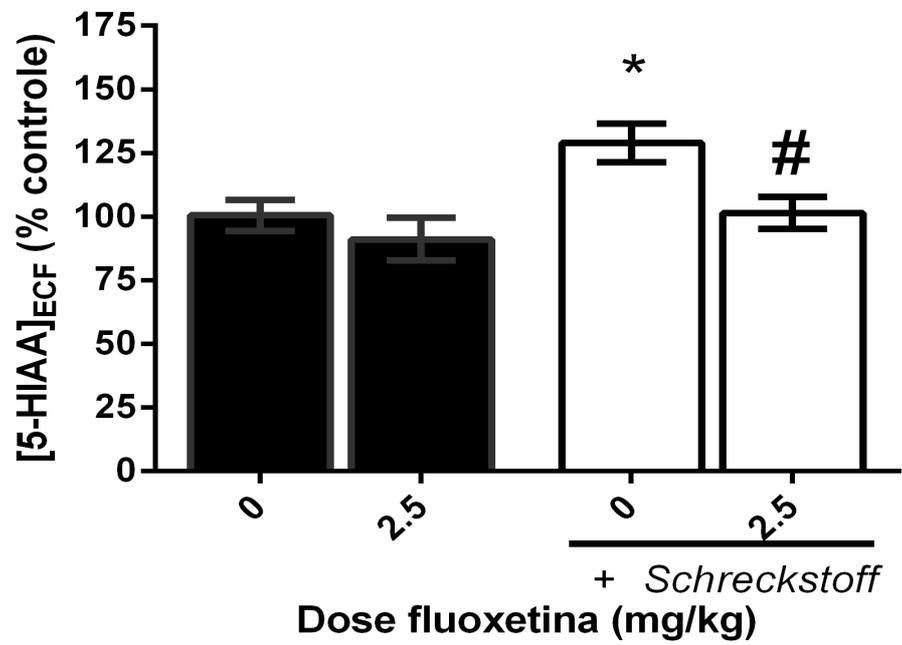


Figura 19: Efeitos do tratamento agudo com buspirona (25 e 50 mg/kg) no (A) tempo no topo e (A') sua habituação, (B) número de quadrantes cruzados, (C) tempo dispendido e (C') número de entradas na base no compartimento branco, (D) nado errático, e (E) congelamento no DVN. Os gráficos de barras representam média \pm erro padrão, enquanto os boxplots representam os dados do 25^o ao 75^o percentis (caixas) e do valor mínimo ao valor máximo (barras); nesses gráficos, a cruz (+) indica a posição da média. Os gráficos de sobrevivência representam estimativas de Kaplan-Meier para as incidências cumulativas de latência de primeira entrada no compartimento branco. **, $p < 0,01$ vs controle; *, $p < 0,05$ vs controle.

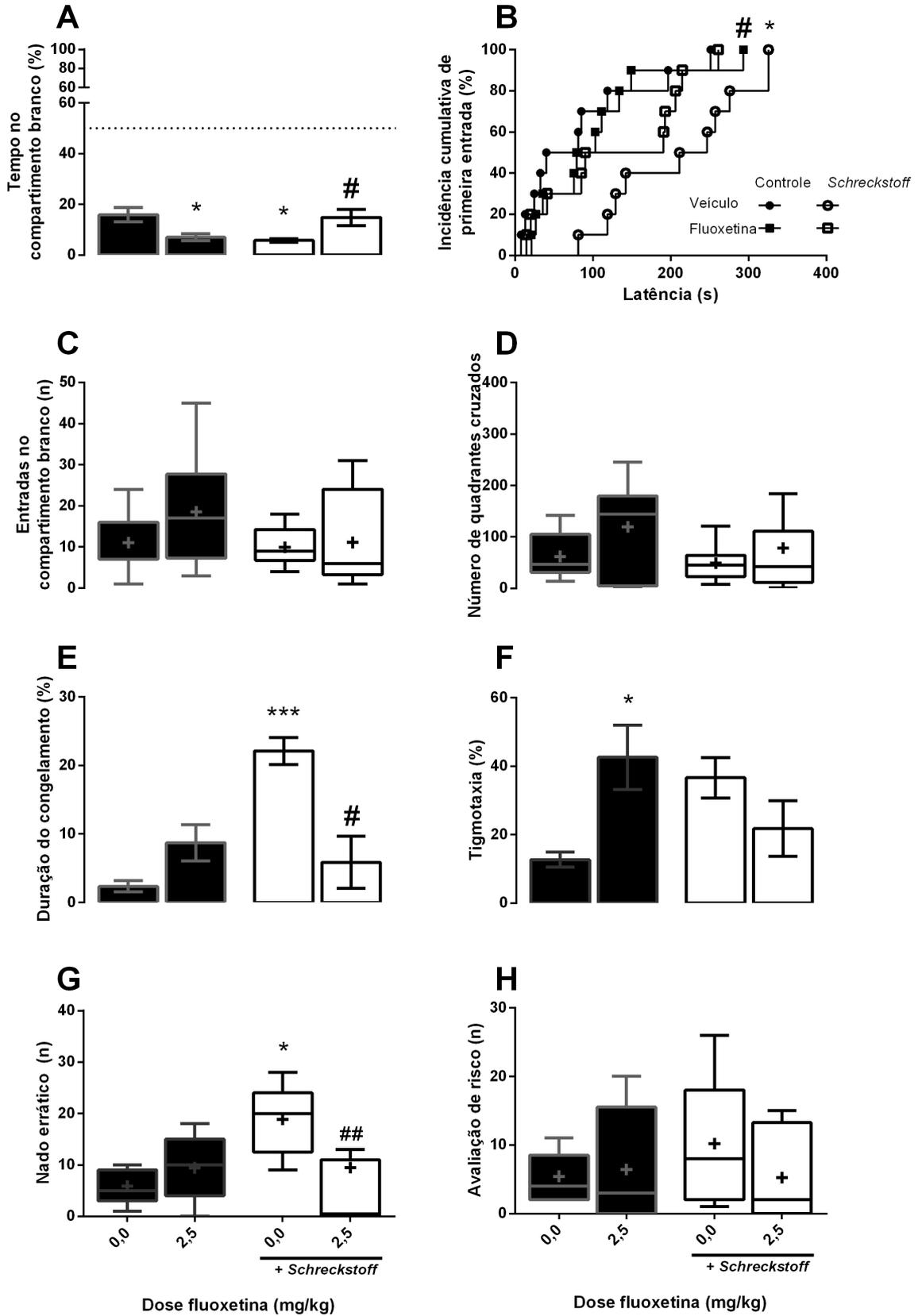
5.7. Os efeitos da substância de alarme são bloqueados pelo pré-tratamento com fluoxetina (MAXIMINO et al., 2014a)

A exposição a uma substância de alarme co-específica por 6 min aumentou os níveis extracelulares de serotonina em cerca de 50%, um efeito que foi bloqueado pelo pré-tratamento com fluoxetina (2,5 mg/kg; Figura 20A); por si só, o tratamento com essa dose de fluoxetina aumentou os níveis extracelulares de 5-HT na mesma proporção ($F_{[3, 31]} = 7,789$, $p = 0,0006$). O tratamento com a substância de alarme também aumentou os níveis extracelulares de 5-HIAA, mas os outros tratamentos não alteraram essa medida (Figura 20B; $F_{[3, 31]} = 5,219$, $p = 0,0055$).

A**B**

← *Figura 20: Efeitos do tratamento agudo com fluoxetina (2,5 mg/kg) no conteúdo extracelular de (A) serotonina (5-HT) e (B) ácido 5-hidroxiindoleacético (5-HIAA) após exposição à substância de alarme co-específica (“Schreckstoff”). Os gráficos de barras representam média ± erro padrão. **, $p < 0,01$ vs 0 mg/kg; *, $p < 0,05$ vs 0 mg/kg; #, $p < 0,05$ vs 2,5 mg/kg.*

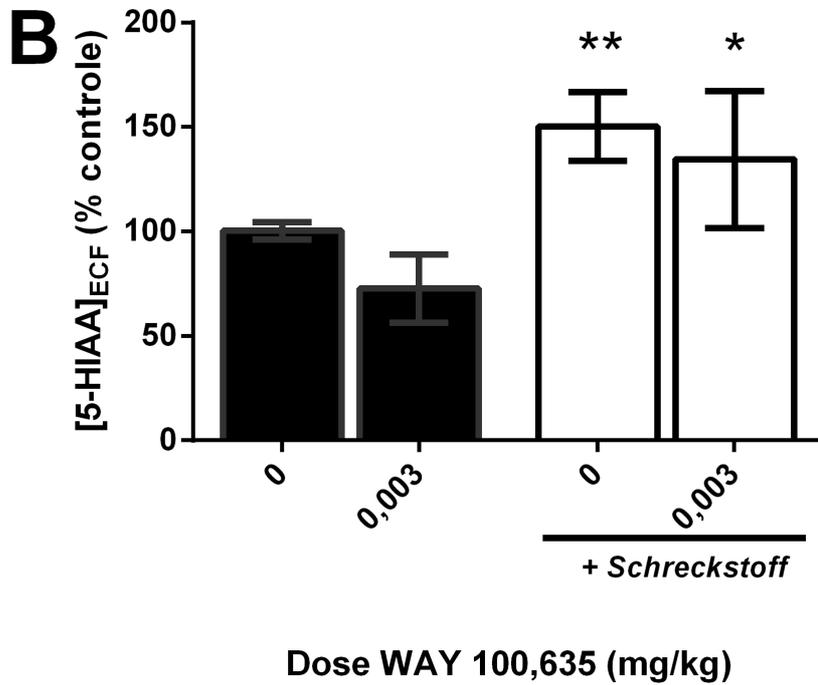
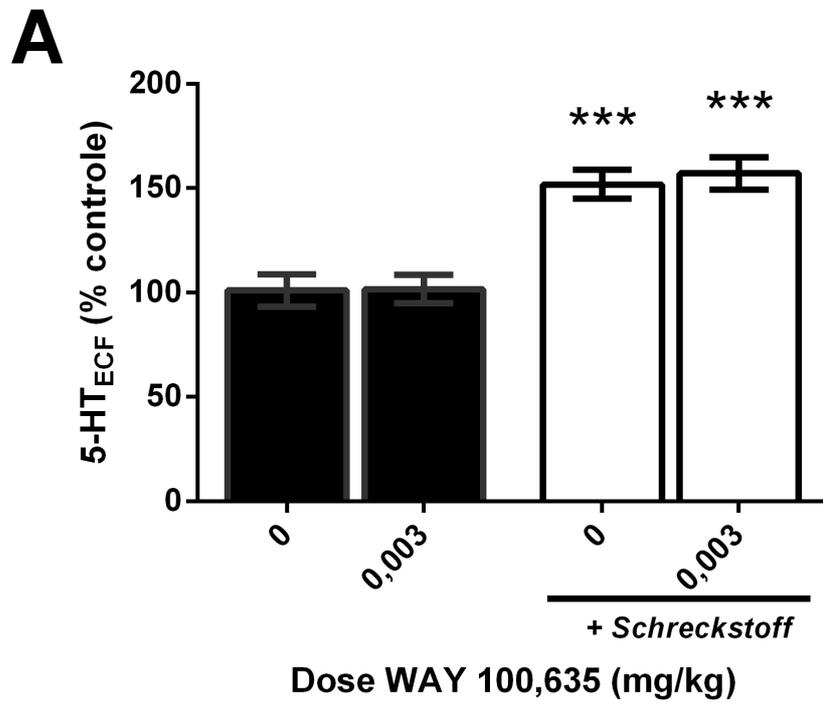
A exposição à substância de alarme, assim como o tratamento com fluoxetina, diminuiu o tempo no compartimento branco (Figura 21A); o efeito da substância de alarme foi bloqueado pelo pré-tratamento com fluoxetina ($F_{[3, 39]} = 5,299$, $p = 0,004$). A latência para entrada no branco foi aumentada pelo tratamento com fluoxetina ou pela substância de alarme, e o efeito dessa última foi reduzido pela fluoxetina (Figura 21B; $\chi^2 = 8,217$, $p = 0,0417$). O número de entradas no branco (Figura 21C) e o número de quadrantes cruzados (Figura 21D) não foram alterados ($H < 3,4$, NS). A substância de alarme aumentou o tempo em congelamento (Figura 21E), um efeito que novamente foi bloqueado pelo pré-tratamento com fluoxetina ($F_{[3, 33]} = 11$, $p < 0,0001$). O mesmo fenômeno foi observado em relação à frequência de nado errático (Figura 21F; $H_{gl=4} = 15,68$, $p = 0,0013$). Somente o tratamento com fluoxetina aumentou a tigmotaxia (21G; $F_{[3, 33]} = 4,093$, $p = 0,0151$). Nenhum efeito foi observado sobre a avaliação de risco (Figura 21H; $H_{gl=4} = 2,866$, NS).



← *Figura 21: Efeitos do tratamento agudo com fluoxetina (2,5 mg/kg) no (A) tempo no compartimento branco, (B) latência para a entrada no branco, (C) número de quadrantes cruzados no compartimento branco, (D) entradas no compartimento branco, (E) tigmotaxia, (F) congelamento, (G) nado errático, e (H) avaliação de risco no PCE após exposição à substância de alarme (“Schreckstoff”). Os gráficos de barras representam média ± erro padrão, enquanto os boxplots representam os dados do 25º ao 75º percentis (caixas) e do valor mínimo ao valor máximo (barras); nesses gráficos, a cruz (+) indica a posição da média. Os gráficos de sobrevivência representam estimativas de Kaplan-Meier para as incidências cumulativas de latência de primeira entrada no compartimento branco. ***, $p < 0,001$ vs controle; *, $p < 0,05$ vs. controle; #, $p < 0,05$ vs. substância de alarme.*

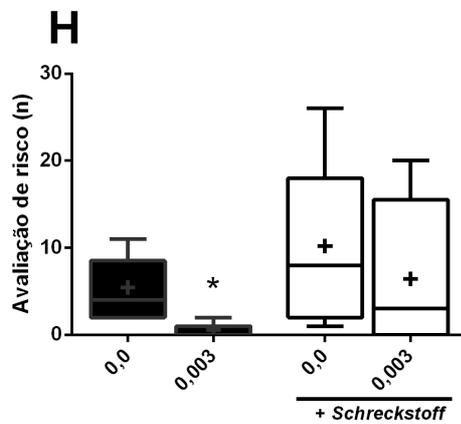
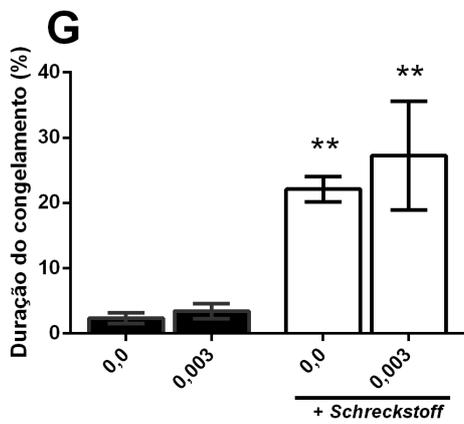
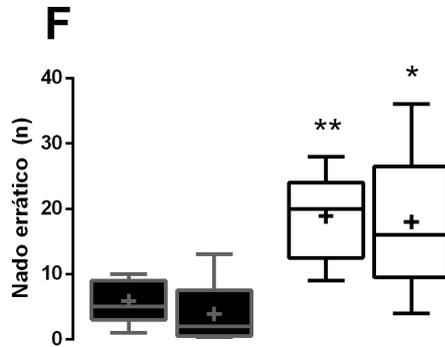
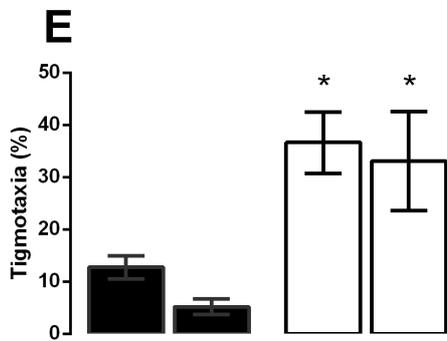
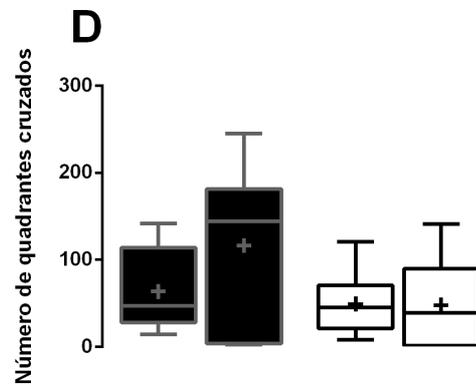
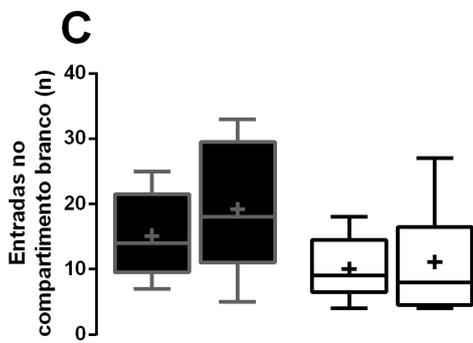
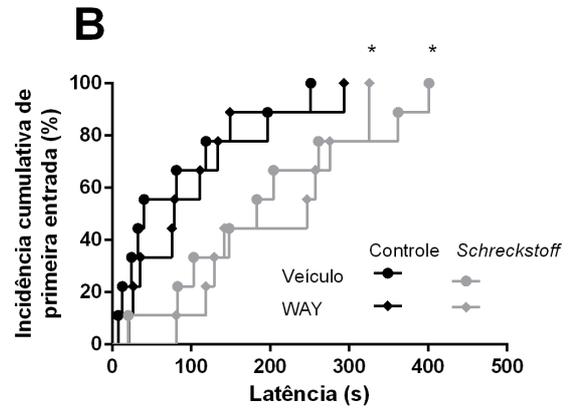
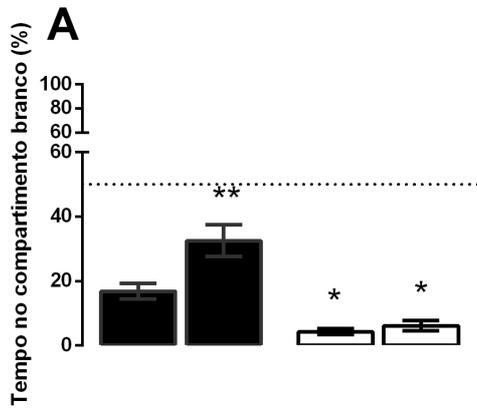
5.8. O bloqueio do receptor 5-HT_{1A} não altera os efeitos da substância de alarme (MAXIMINO et al., 2014a)

O WAY 100,635 não diminuiu os níveis extracelulares de 5-HT (Figura 22A) ou 5-HIAA (Figura 22B); a exposição à substância de alarme aumentou ambos os parâmetros, um efeito que não foi bloqueado pelo pré-tratamento com WAY 100,635 ($F > 2,95$, $p < 0,05$).



← *Figura 22: Efeitos do tratamento agudo com WAY 100,635 (0,003 mg/kg) no conteúdo extracelular de (A) serotonina (5-HT) e (B) ácido 5-hidroxiindoleacético (5-HIAA) após exposição à substância de alarme co-específica (“Schreckstoff”). Os gráficos de barras representam média ± erro padrão. **, $p < 0,01$ vs controle; *, $p < 0,05$ vs controle.*

O tratamento com WAY 100635 (0,003 mg/kg) aumentou o tempo no branco (Figura 23A; $F_{[3, 35]} = 19,92$, $p < 0,0001$) e diminuiu a avaliação de risco (Figura 23H; $H_{gl = 4} = 14,12$, $p = 0,0027$), mas não foi capaz de bloquear os efeitos da substância de alarme (Figura 25).



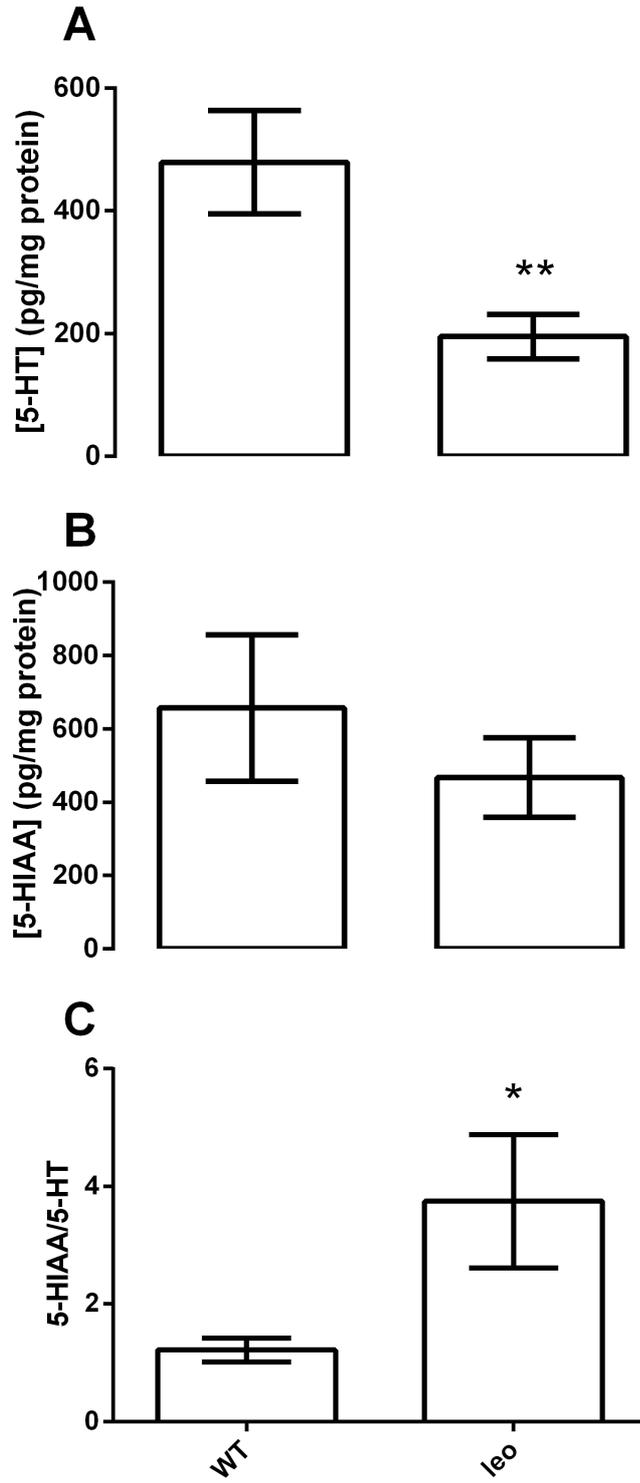
Dose WAY 100,635 (mg/kg)

Dose WAY 100,635 (mg/kg)

← Figura 23: Efeitos do tratamento agudo com WAY 100,635 (0,003 mg/kg) no (A) tempo no compartimento branco, (B) latência para a entrada no branco, (C) número de quadrantes cruzados no compartimento branco, (D) entradas no compartimento branco, (E) tigmotaxia, (F) congelamento, (G) nado errático, e (H) avaliação de risco no PCE após exposição à substância de alarme (“Schreckstoff”). Os gráficos de barras representam média \pm erro padrão, enquanto os boxplots representam os dados do 25º ao 75º percentis (caixas) e do valor mínimo ao valor máximo (barras); nesses gráficos, a cruz (+) indica a posição da média. Os gráficos de sobrevivência representam estimativas de Kaplan-Meier para as incidências cumulativas de latência de primeira entrada no compartimento branco. ***, $p < 0,001$ vs controle; *, $p < 0,05$ vs. controle.

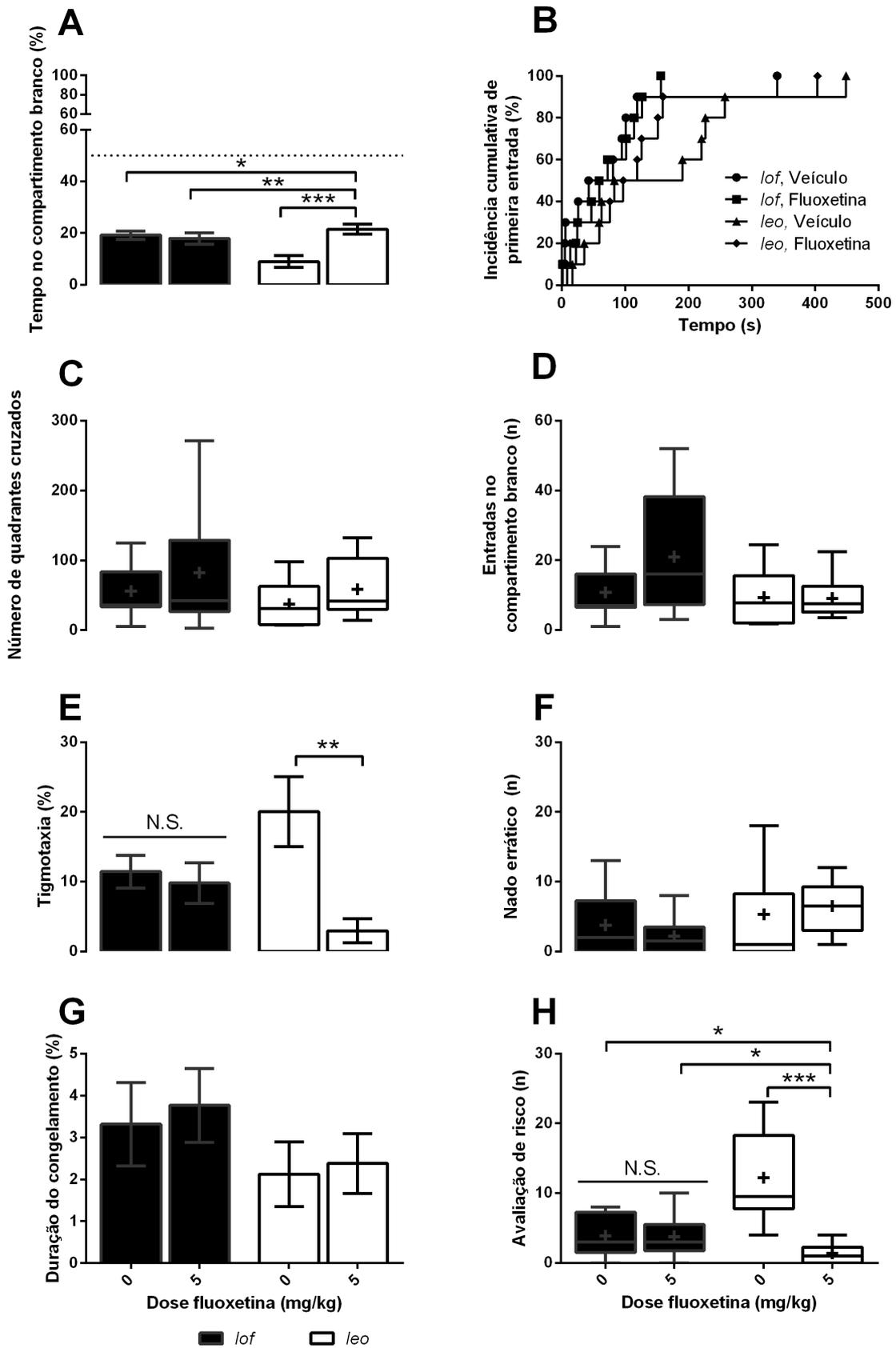
5.9. Paulistinhas da linhagem leopard apresentam menor conteúdo tecidual de serotonina no encéfalo, e maior escototaxia reversível por fluoxetina (MAXIMINO et al., 2013d)

Em relação a animais da linhagem *longfin*, animais da linhagem *leopard* (*leo*) apresentam concentrações menores de serotonina ($t_{[gl=18]} = 3,093$, $p = 0,0063$; Figura 24A), mas não de 5-HIAA ($t_{[gl=18]} = 0,8371$, NS; Figura 24B), no encéfalo.



← Figura 24: Diferenças entre linhagens nos níveis teciduais de (A) serotonina (5-HT) e (B) ácido 5-hidroxiindoleacético (5-HIAA), assim como no turnover desse neurotransmissor (C). **, $p < 0,01$ vs. tipo selvagem (WT); *, $p < 0,05$ vs. tipo selvagem.

Em relação aos animais da linhagem *longfin*, os animais da linhagem *leopard* apresentam maior escototaxia (Figura 25A), um fenótipo que é recuperado pelo tratamento agudo com fluoxetina (5 mg/kg) ($F_{[3, 39]} = 7,647$, $p = 0,0004$). Não foram observadas diferenças nas latências para entrada no branco entre *longfin* e *leo*, nem efeitos do tratamento com fluoxetina ($\chi^2 = 4,154$, $p = 0,2453$; Figura 25B). Não foram observadas diferenças no número de entradas no branco (Figura 25C) ou no número de quadrantes cruzados no compartimento branco (Figura 25D) ($H_{[gl=4]} < 3,9$, NS). Também não foram observadas diferenças no congelamento ($F_{[3, 39]} = 0,8265$, $p = 0,488$; Figura 25E) ou no nado errático ($H_{[gl=4]} = 6,656$, $p = 0,0837$; Figura 25F). Ainda que não fossem observadas diferenças na tigmotaxia entre *leo* e *longfin* (Figura 25G), o tratamento com fluoxetina diminuiu a tigmotaxia no *leopard*, mas não no *longfin* ($F_{[3, 39]} = 4,699$, $p = 0,0072$). Finalmente, o *leopard* apresenta maior frequência de avaliação de risco do que o *longfin*, e esse fenótipo foi resgatado pelo tratamento com fluoxetina ($H_{[gl=4]} = 21,19$, $p < 0,0001$; Figura 25H).



← *Figura 25: Diferenças entre linhagens no (A) tempo no compartimento branco, (B) latência para a entrada no branco, (C) número de quadrantes cruzados no compartimento branco, (D) entradas no compartimento branco, (E) tigmotaxia, (F) congelamento, (G) nado errático, e (H) avaliação de risco no PCE. Os gráficos de barras representam média ± erro padrão, enquanto os boxplots representam os dados do 25º ao 75º percentis (caixas) e do valor mínimo ao valor máximo (barras); nesses gráficos, a cruz (+) indica a posição da média. Os gráficos de sobrevivência representam estimativas de Kaplan-Meier para as incidências cumulativas de latência de primeira entrada no compartimento branco. ***, $p < 0,001$; **, $p < 0,01$; *, $p < 0,05$.*

6. Discussão

6.1. Papel da serotonina extracelular no comportamento tipo-medo e tipo-ansiedade do paulistinha

Os presentes resultados demonstraram que o conteúdo extracelular de serotonina estão bastante elevados após a exposição ao teste de preferência claro/escuro e levemente elevados após a exposição ao teste de distribuição vertical eliciada pela novidade. Quando parcelados por macro-áreas anatômicas, observa-se que os níveis teciduais de serotonina são elevados no rombencéfalo e prosencéfalo após exposição ao PCE, e no mesencéfalo após exposição ao DVN. Além disso, enquanto os níveis extracelulares de 5-HT estavam inversamente relacionados à evitação do terço superior do aparato no DVN, a mesma medida estava diretamente relacionada à evitação do compartimento branco na escototaxia. Esses resultados sugerem que há uma modulação bidirecional ou dual da serotonina sobre o comportamento do paulistinha.

Drogas serotoninérgicas também produzem resultados diferentes em ambos os testes (Tabela 4); em geral, o tratamento com uma dose pequena de fluoxetina (2,5 mg/kg) aumentou os níveis extracelulares de serotonina e produziu efeitos tipo-ansiedade no PCE (aumento no tempo no branco, aumento na latência, aumento da tigmotaxia e aumento na avaliação de risco). No DVN, a fluoxetina aumentou o tempo no topo e diminuiu o nado errático e o congelamento. Além disso, a fluoxetina também acelerou a habituação nas doses de 5 e 10 mg/kg; esse efeito pode sugerir tanto uma diminuição na sensibilidade ao estresse quando um efeito sobre a memória não-associativa (KALUEFF; MURPHY, 2007; STEWART et al., 2013b; WONG et

al., 2010). De fato, STEWART e colaboradores (2013b) demonstraram que a habituação de uma série de comportamentos no DVN independe do efeito ansiolítico ou ansiogênico de uma dada manipulação; além disso, animais com maior geotaxia apresentam maior habituação do tempo no topo. É difícil especular sobre o papel da habituação no início e no final de uma sessão do DVN, mas é provável que alterações na habituação dos primeiros minutos sugiram uma diminuição na neofobia. No presente trabalho, a fluoxetina produziu alterações na habituação nos últimos minutos, dificultando a interpretação dos resultados. Em relação às outras variáveis, no entanto, os resultados sugerem que o tratamento agudo com fluoxetina (2,5 mg/kg) produz um efeito tipo-ansiolítico no DVN e tipo-ansio-gênico no PCE.

<i>Variável</i>	<i>Fluoxetina</i>	<i>pCPA</i>	<i>Buspirona</i>	<i>WAY 100635</i>	<i>SB 224289</i>
	↓ SERT ↑ 5-HT	↓ TPH ↓ 5-HT	→ 1A pré ↓ 1A pós	↓ 1A pré ↓ 1A pós	↓ 1B pós ↓ 1B pré
DISTRIBUIÇÃO VERTICAL ELICIADA PELA NOVIDADE					
Tempo no topo	↑	↓	↑	↑	↑
Habituação	↑	↓	↑	↑	-
Tempo na base	-	↑	-	↑	↑
Nado errático	↓	-	-	-	↓
Congelamento	↓	-	↓	-	-
PREFERÊNCIA CLARO/ESCURO					
Tempo no branco	↓	↑	↑	↑	-
Latência	↑	-	-	-	-
Tigmotaxia	↑	↓	↓	↓	-
Nado errático	-	-	-	-	-
Congelamento	-	-	↓	-	-
Avaliação de risco	↑	↓	↓	↓	↑

Tabela 4: Resumo do efeitos das drogas serotoninérgicas sobre as variáveis comportamentais no DVN e no PCE.

Experimentos anteriores demonstraram que a administração de fluoxetina por via hídrica (100-1000 µg/L) não afetam o comportamento do paulistinha (fenótipo *shortfin*) no DVN (STEWART et al., 2011a); entretanto, a exposição a uma dose maior (1200 µg/L) diminui a latência para o topo e o número de transições para o topo, sem alterar o congelamento ou o

tempo total no topo do aquário (STEWART et al., 2013a). É necessário observar, no entanto, que os trabalhos de KALUEFF e colaboradores (CACHAT et al., 2010b) definem o “topo” do aquário como a metade superior, enquanto em nosso trabalho o definimos como o terço superior; essas diferenças metodológicas podem explicar porque um efeito da fluoxetina foi observada nos nossos experimentos, mas não nos experimentos de KALUEFF *et alii*. Por outro lado, SACKERMAN e colaboradores (SACKERMAN et al., 2010) demonstraram uma diminuição na geotaxia com a exposição de 100 µg/L de citalopram, mas o “topo” do aquário era definido com os $\frac{2}{3}$ superiores. ITURRIAGA-VÁSQUEZ e colaboradores (ITURRIAGA-VÁSQUEZ et al., 2012) observaram que a exposição a 50 e 100 µg/L de fluoxetina diminui a geotaxia, definido o “topo” da mesma forma como SACKERMAN e colaboradores (2010). Além disso, o tratamento com 4-metiltoanfetamina, uma metanfetamina similar ao MDMA, também produziu efeito similar (ITURRIAGA-VÁSQUEZ et al., 2012). Nesse sentido, o MDMA, que inverte a direção do transportador de serotonina (i.e., produz efluxo de 5-HT *via* SERT), também diminui a geotaxia, reduz o congelamento e a habituação intra-sessão (STEWART et al., 2012a).

Em nossos resultados (Tabela 4), sugerimos que a fluoxetina produz um efeito ansiogênico no PCE e ansiolítico no DVN. Em experimentos com roedores, drogas que aumentam a liberação de serotonina ou bloqueiam seu transporte produzem efeito ansiogênico e panicolítico (PINHEIRO et al., 2007). Para testar a hipótese de que o efeito da fluoxetina no DVN é do tipo panicolítico, expusemos os animais à substância de alarme co-específica (“*Schreckstoff*”) e analisamos seu comportamento posterior no PCE (Tabela 5). Conforme previsto, a substância de alarme aumentou a preferência por escuridão, a latência para primeira entrada no compartimento branco, a duração do congelamento e a frequência de nado errático. Esses resultados diferem daqueles obtidos por MANSUR et al. (2014), que não observaram efeitos da substância de alarme sobre o tempo no branco; entretanto, o método de extração de substância de alarme naquele experimento difere do método utilizado aqui. Enquanto a fluoxetina não alterou o congelamento e o nado errático no PCE em condições basais, a droga foi capaz de bloquear o aumento nessas medidas causado pela exposição anterior à “*Schreckstoff*”. Além disso, o pré-tratamento com fluoxetina bloqueou os efeitos da “*Schreckstoff*” sobre a escototaxia e a latência para o branco. Esses resultados são similares aos descritos por BARBOSA JR. e colaboradores (2012), que demonstraram que o pré-

tratamento com fluoxetina (10 mg/kg) bloqueia o aumento na geotaxia e na coesão de cardume causada pela exposição à “*Schreckstoff*”; assim, é provável que a fluoxetina produza efeito “ansio gênico” e “panicolítico”. Em nossos resultados, a própria substância de alarme aumentou os níveis extracelulares de serotonina a valores similares aos efetuados pela fluoxetina, e, curiosamente, o pré-tratamento com fluoxetina bloqueou o efeito da exposição à “*Schreckstoff*” nos níveis extracelulares de 5-HT e 5-HIAA (Tabela 5). Se o aumento na serotonina extracelular em resposta à substância de alarme fosse causada por um aumento na liberação, esperaríamos que o pré-tratamento com fluoxetina produzisse um aumento sinérgico, o que não foi observado. Isso sugere que a exposição à substância de alarme pode modificar o estado funcional do transportador, diminuindo o transporte ou invertendo sua direção.

Variável	<i>Schreckstoff</i>	+FLX	+WAY	<i>leo</i>	+FLX
[5-HT] _{ECF}	↑	Bloqueia	Ñ bloqueia	↑	NT
Tempo no branco	↓	Bloqueia	Ñ bloqueia	↓	Bloqueia
Latência	↑	Bloqueia	Ñ bloqueia	-	-
Tigmotaxia	-	-	Ñ bloqueia	-	-
Nado errático	↑	Bloqueia	Ñ bloqueia	-	-
Congelamento	↑	Bloqueia	Ñ bloqueia	-	-
Avaliação de risco	-	-	Ñ bloqueia	↑	Bloqueia

Tabela 5: Resumo dos efeitos da exposição a uma substância de alarme (“*Schreckstoff*”) e do fenótipo leopardo (*leo*) sobre os níveis de 5-HT e variáveis comportamentais no PCE, assim como sua reversão pela fluoxetina (FLX).

É difícil especular acerca das estruturas envolvidas nessa resposta. A habênula dorsal é uma estrutura que foi implicada em respostas condicionadas de medo em paulistinhas (AGETSUMA et al., 2010; AMO et al., 2014; OKAMOTO; AGETSUMA; AIZAWA, 2011b), e é ativada após exposição ao PCE (LAU et al., 2011). Em animais que expressam a toxina tetânica de cadeia leve (TeTXlc) na habênula dorsolateral, a concentração de substância de alarme necessária para produzir uma reação de alarme é 10 vezes menor do que a de animais controle (MATHURU; JESUTHASAN, 2013). Essa estrutura apresenta extensas projeções para o núcleo interpeduncular dorsal e intermediário (AGETSUMA et al., 2010; AMO et al.,

2010; OKAMOTO; AGETSUMA; AIZAWA, 2011a); do IPN dorsal, saem projeções massivas para a rafe superior e para a grísea central (AMO et al., 2014; OKAMOTO; AGETSUMA; AIZAWA, 2011a). Entretanto, esses animais também apresentam maior preferência pelo fundo do que os animais controle (MATHURU; JESUTHASAN, 2013), sugerindo ansiedade basal elevada, e não necessariamente um papel específico da habênula dorsolateral na resposta de alarme. De fato, a exposição à substância de alarme ou a fragmentos de condroitina não altera a expressão de *fos* na habênula dorsolateral (DECARVALHO et al., 2013).

O transportador de serotonina foi implicado em respostas de estresse em outros modelos comportamentais. No mutante *gr^{s357}*, a capacidade transcricional do receptor glicocorticóide é abolida (ZIV et al., 2013), e esse fenômeno é acompanhado de algumas mudanças comportamentais que são abolidas pelo tratamento sub-crônico com fluoxetina (GRIFFITHS et al., 2012; ZIV et al., 2013). Em animais adultos, o principal fenótipo comportamental observado no campo aberto é o aumento no congelamento e a diminuição na tigmotaxia (ZIV et al., 2013), e nossos resultados demonstraram que, no DVN, o tratamento com fluoxetina diminui o congelamento, enquanto no PCE ocorre um aumento na tigmotaxia. Curiosamente, o tratamento agudo ou sub-crônico não normaliza os níveis elevados de cortisol nos animais *gr^{s357}* (GRIFFITHS et al., 2012; ZIV et al., 2013), sugerindo que os efeitos comportamentais desse tipo de tratamento não são dependentes da integridade dos mecanismos de *feedback* do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal. Somente após tratamento por 2 semanas esses níveis são normalizados (ZIV et al., 2013), mas essa redução também é observada em animais do tipo selvagem (fenótipo *shortfin*) (EGAN et al., 2009) e pode ser uma consequência, ao invés de uma causa, do efeito comportamental. Talvez mais importante, a mutação *gr^{s357}* diminui a expressão de SERTa na rafe superior, o que pode explicar tanto o efeito comportamental quanto a normalização pela fluoxetina (ZIV et al., 2013).

De forma similar, observamos que o tratamento com fluoxetina (5 mg/kg, uma dose inefetiva nos animais *longfin*) resgatou o fenótipo de alta ansiedade observada em animais *leopard* (Tabela 4). Em animais da linhagem Tu, o fenótipo *leopard* é causado por uma mutação no gene *cx41.8*, que codifica uma conexina (WATANABE et al., 2006). No momento, não é possível identificar se os animais *leopard* utilizados em nossos experimentos carregam de fato essa mutação. Assim como KALUEFF e colaboradores (CACHAT et al., 2011a; EGAN et al., 2009), demonstramos que o *leo* apresenta maior geotaxia, sem diferenças nas outras variáveis

do DVN. Além disso, demonstramos que o *leo* também apresenta maior escototaxia e avaliação de risco no PCE. Esses animais também apresentam menor conteúdo tecidual de serotonina, e os fenótipos comportamentais observados foram revertidos pelo tratamento com fluoxetina (Tabela 5). Esses resultados sugerem fortemente que o fenótipo *leo* apresenta uma desregulação na captação de serotonina.

Se o efeito ansiogênico e panicolítico da fluoxetina se deve ao aumento nas concentrações extracelulares de serotonina no encéfalo, a diminuição dessas concentrações deve produzir efeito oposto. De fato, o tratamento com pCPA produziu um efeito inverso em ambos os testes – ou seja, diminuição na concentração extracelular de serotonina, diminuição do tempo no topo, diminuição da habituação no primeiro minuto, e aumento no tempo na “base” no DVN; e aumento no tempo no branco, diminuição na tigmotaxia e diminuição na avaliação de risco no PCE (Tabela 5). Tomados em conjunto, esses resultados sugerem que a diminuição da serotonina disponível no encéfalo (pela inibição da triptofano hidroxilase) produz um efeito tipo-ansiolítico no PCE e tipo-ansio-gênico no DVN. Esse efeito no DVN parece ser específico para a serotonina, já que a depleção de monoaminas (incluindo serotonina, noradrenalina e dopamina) pelo bloqueio do transportador vesicular de monoaminas (VMAT) através da reserpina aumenta a latência para o topo e a duração do congelamento 7 dias após o tratamento (KYZAR et al., 2013). Curiosamente, o tratamento com pCPA aumentou o tempo na base. Essa medida foi proposta como homóloga ao mesmo comportamento observado em roedores no campo aberto (STEWART et al., 2010) que, por sua vez, foi proposto como um sintoma “tipo-obsessivo” (EILAM; IZHAR; MORT, 2011). Em roedores, drogas dopaminérgicas influenciam a probabilidade de estabelecimento de uma “base” no campo aberto. O tratamento com ibogaína, um inibidor não-competitivo do transporte de serotonina e dopamina que se liga a esses transportadores na conformação “aberta para dentro” (BULLING et al., 2012), aumenta a formação de bases no paulistinha adulto, e essa é diminuída após confinamento em um aquário branco (em comparação com um aquário transparente ou com um aquário preto) (CACHAT et al., 2013). O significado eto-ecológico desse comportamento ainda é completamente desconhecido, e é difícil julgar se o pCPA está de fato produzindo um sintoma obsedante.

6.2. Papel do receptor 5-HT_{1A} no comportamento tipo-medo e tipo-ansiedade no paulistinha

Após identificarmos um papel dual para a serotonina na regulação do comportamento defensivo do paulistinha, buscamos analisar o papel do receptor 5-HT_{1A} nessas respostas. Inicialmente, utilizamos a buspirona, um agonista parcial, e o WAY 100635, um antagonista, nos testes de distribuição vertical eliciada pela novidade e preferência claro/escuro. Como agonista parcial, a buspirona age como agonista em sítios pré-sinápticos e antagonista em sítios pós-sinápticos – diminuindo a liberação de serotonina ao mesmo tempo em que bloqueia os heterorreceptores (ALTIERI et al., 2013). No PCE, ambas as doses produziram aumento do tempo no branco, diminuição da tigmotaxia e diminuição do congelamento; somente a maior dose diminuiu a avaliação de risco (Tabela 3); esses resultados são semelhantes a relatos prévios de que a buspirona diminuiu a escototaxia (LAU et al., 2011; MAXIMINO et al., 2011a). Além disso, ambas as doses aumentaram o tempo no topo e diminuíram o congelamento no DVN, enquanto somente a maior dose promoveu a habituação nos três últimos minutos (Tabela 3). Relatos prévios na literatura sugerem diminuição na geotaxia (BENCAN; SLEDGE; LEVIN, 2009) assim como no comportamento social (BARBA-ESCOBEDO; GOULD, 2012; GEBAUER et al., 2011; MAASWINKEL et al., 2013).

Mais interessantes são os resultados relativos ao tratamento com o antagonista WAY 100,635 (Tabela 3). Essa droga age como antagonista tanto em auto- quanto em heterorreceptores. Nos presentes experimentos, o WAY 100,635 aumentou o tempo no branco em ambas as doses e diminuiu a tigmotaxia e a avaliação de risco na dose de 0,03 mg/kg. No DVN, o WAY 100-635 aumentou o tempo no topo em ambas as doses e promoveu a habituação na dose de 0,003 mg/kg; essa mesma dose aumentou o tempo na “base”. Entretanto, o WAY 100,635 não foi capaz de bloquear os efeitos do tratamento com a substância de alarme.

Alguns autores propuseram que a diminuição na liberação de 5-HT após a ativação de receptores pré-sinápticos seria responsável pelos efeitos ansiolíticos de agonistas plenos e parciais do receptor 5-HT_{1A} (MCDEVITT; NEUMAIER, 2011). A heterogeneidade dos autoreceptores na rafe sugere que essa explicação é, no mínimo, ingênua. No paulistinha, o receptor 5-HT_{1AA} é expresso em porções mais ventrais da rafe superior, enquanto a isoforma 5-HT_{1AB} é expressa em porções mais dorsais, incluindo a porção mais dorsolateral que cerca a

grísea central (NORTON; FOLCHERT; BALLY-CUIF, 2008); a porção ventral apresenta maior densidade de projeções para o hipotálamo do que a porção dorsal, que por sua vez projeta-se extensamente para o telencéfalo (LILLESAAR et al., 2009). Essa heterogeneidade sugere que, assim como em roedores (ALTIERI et al., 2013), os neurônios serotoninérgicos da rafe apresentam um mecanismo autônomo de retroalimentação que agrupa neurônios funcionalmente similares em regulação homeostática, assim como um mecanismo não-autônomo, no qual grupos distintos provêm “inibição lateral”, promovendo padrões de ativação diferentes (ABRAMS et al., 2004; ALTIERI et al., 2013; MAXIMINO, 2012). Como consequência, a regulação auto-inibitória pode não ser necessária ou suficiente para o controle da ansiedade. Camundongos *knockout* para o receptor 5-HT_{1A} – que não apresentam auto- ou heterorreceptores – apresentam ansiedade aumentada em diversos testes (GROSS et al., 2000; RAMBOZ et al., 1998). Em animais que só expressam o receptor 5-HT_{1A} em tecidos prosencefálicos, mas não na rafe, esse fenótipo é revertido (GROSS et al., 2002); da mesma forma, animais com supressão induzida da expressão do receptor 5-HT_{1A} na rafe apresentam níveis normais de ansiedade, mas maior reatividade ao estresse (RICHARDSON-JONES et al., 2010). Da mesma forma, o pré-tratamento com WAY 100,635 não bloqueou o aumento de ansiedade no PCE, nem a elevação dos níveis extracelulares de serotonina (Tabela 4). Esses resultados nos levam a hipotetizar que o efeito da buspirona e do WAY 100,635 observado no presente trabalho se deve ao bloqueio de receptores pós-sinápticos (heterorreceptores).

Novamente, é difícil especular acerca das áreas envolvidas nessas respostas. A isoforma 5-HT_{1AA} é expressa principalmente em regiões hipotalâmicas e pré-ópticas associadas às respostas neuroendócrinas a estressores, enquanto a isoforma 5-HT_{1AB} também é expressa nos núcleos Vv e Vd do telencéfalo (septo e corpo estriado, respectivamente) e na grísea central (NORTON; FOLCHERT; BALLY-CUIF, 2008); em conjunto com a expressão de serotonina e dos genes que codificam o SERT, esses receptores agem como autorreceptores na rafe, no órgão paraventricular e no *cluster* pré-tectal (NORTON; FOLCHERT; BALLY-CUIF, 2008). LAU e colegas (2011) sugeriram que um circuito envolvendo o telencéfalo dorsomedial, o corpo estriado e o hipotálamo na escototaxia; a inibição desse circuito levaria a uma diminuição na evitação do branco. Sugerimos que o bloqueio dos receptores 5-HT_{1A} em algum ponto desse circuito poderia produzir o efeito observado no presente trabalho.

6.3. Papel do receptor 5-HT_{1B} no comportamento tipo-medo e tipo-ansiedade no paulistinha

Nossos resultados demonstram que, com exceção de um aumento na avaliação de risco na menor dose, o tratamento com SB 224,289 não altera o comportamento no PCE (Tabela 3). Por outro lado, uma curva em “U” invertido (hormese) é observada em relação ao tempo no topo e ao tempo na “base”, enquanto uma curva em “U” é observada em relação ao nado errático.

Principalmente devido à ausência recente de drogas seletivas para o receptor 5-HT_{1B}, poucos trabalhos procuraram investigar o papel deste no comportamento defensivo, apesar de sua expressão extensa em neurônios serotoninérgicos. Diferente dos autoreceptores 5-HT_{1A}, no entanto – que são somatodendríticos –, o receptor 5-HT_{1B} é expresso principalmente nos terminais das projeções provindas da rafe (RIAD et al., 2000). Como autorreceptor, parece atuar principalmente inibindo a liberação de serotonina (REX et al., 2008) ou aumentando sua recaptação (DAWS; GERHARDT; FRAZER, 1999; HAGAN et al., 2012). Como heterorreceptor, também age de forma pré-sináptica, inibindo a liberação de dopamina nos gânglios da base (NORTON; FOLCHERT; BALLY-CUIF, 2008). Ao contrário do receptor 5-HT_{1A}, somente uma isoforma do receptor 5-HT_{1B} parece ser expressa no paulistinha (NORTON; FOLCHERT; BALLY-CUIF, 2008). No encéfalo, o mRNA para esse receptor é encontrado em uma linha paraventricular de células estendendo-se do telencéfalo dorsomedial aos núcleos dorsal e ventral do telencéfalo ventral (NORTON; FOLCHERT; BALLY-CUIF, 2008); além disso, também é expresso na habênula dorsal e regiões hipotalâmicas neurosecretoras.

Do ponto de vista comportamental, o receptor 5-HT_{1B} foi implicado principalmente na impulsividade, agressão e reatividade ao estresse em roedores (CLARK et al., 2002; HOPLIGHT; VINCOW; NEUMAIER, 2005; SUMMERS; WINBERG, 2006; SVENNINGSSON et al., 2011; ZHUANG et al., 1997). Nesse sentido, a sobre-expressão viral do receptor 5-HT_{1B} na rafe dorsal de camundongos diminui o sobressalto potencializado por medo (CLARK et al., 2004), mas aumenta a ansiedade no labirinto em cruz elevado após exposição a estresse inescapável (CLARK et al., 2002); da mesma forma, o primeiro efeito é invertido (i.e., há um *aumento* na resposta de sobressalto) quando os animais são expostos a

nado forçado (CLARK et al., 2004). Os autores sugeriram que o receptor 5-HT_{1B} regula negativamente a liberação/transporte de 5-HT na amígdala, aonde receptores pós-sinápticos do tipo 5-HT_{1A} diminuem a liberação de GABA, levando a ansiogênese; o estresse inescapável aumenta a liberação de 5-HT, “vencendo” o freio inibitório dos receptores 5-HT_{1B}. Da mesma forma, o tratamento com SB 224,289 aumenta a tigmotaxia e reduz a exploração de um objeto novo em roedores (HOPLIGHT; VINCOW; NEUMAIER, 2005). Em paulistinhas, o antagonista do receptor 5-HT_{1B} GR 55562 também apresenta efeito tipo-ansiolítico no DVN, diminuindo a geotaxia e o nado errático (NOWICKI et al., 2014). Evidências semelhantes são apresentadas quando observamos o bloqueio da inibição endógena dos receptores 5-HT_{1B} pela 5-HT-modulina, um tetrapeptídeo endógeno que age como modulador alostérico negativo deste receptor (CLÉNET et al., 2004). Em camundongos Swiss o HG1, um antagonista da 5-HT-modulina, tem efeito anti-conflito no teste de quatro placas e ansiolítico na preferência claro/escuro e no labirinto em cruz elevado (CLÉNET et al., 2004). Esse último efeito é bloqueado pelo pré-tratamento com WAY 100635 ou com NAN 190, e parcialmente bloqueado pelo pré-tratamento com o antagonista benzodiazepínico flumazenil (CLÉNET et al., 2005), sugerindo um forte efeito sobre a homeostasia pré-sináptica do sistema serotoninérgico, assim como um papel do sítio benzodiazepínico central.

Esses resultados são, em certo sentido, condizentes com o pequeno efeito ansiogênico observado com o tratamento com SB 224,289 no PCE. Entretanto, enquanto o bloqueio dos receptores 5-HT_{1B} – principalmente dos autorreceptores – em roedores parece ser ansiogênico, no DVN foram observados efeitos condizentes com uma *diminuição* do comportamento tipo-ansiedade. Esses resultados são difíceis de interpretar, mas sugerem que, no paulistinha, o receptor 5-HT_{1B} module negativamente a reatividade ao estresse. Experimentos posteriores – talvez envolvendo estressores “genéricos”, como o estresse de confinamento (PIATO et al., 2011a) ou o agitação (FUZZEN; VAN DER KRAAK; BERNIER, 2010) – podem refinar melhor essa hipótese.

7. Conclusões

- Existe uma correlação negativa entre os níveis extracelulares de serotonina e a escototaxia, e uma correlação positiva entre esses mesmos níveis e a geotaxia.
- O aumento farmacológico dos níveis extracelulares de serotonina aumentam a escototaxia e diminuem a geotaxia; a diminuição farmacológica produz efeito contrário.
- Situações que aumentam medo (p. ex., substância de alarme) aumentam a serotonina extracelular, por um mecanismo que talvez seja transportador-dependente, e consequentemente aumentam a ansiedade no PCE.
- Esses efeitos diferenciais provavelmente não se devem aos receptores 5-HT_{1A}.
- Pelo menos um fenótipo comportamental associado a desregulação no transporte de serotonina também está associado a aumento de ansiedade em ambos os testes;
- Sugere-se uma possível participação do receptor 5-HT_{1B} na diminuição da geotaxia promovida pelo aumento da 5-HT extracelular.

8. Referências

- ABRAMS, J. K. et al. Anatomic and functional topography of the dorsal raphe nucleus. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1018, p. 46–57, 2004. , DOI:10.1196/annals.1296.005
- ABREU, M. S. DE et al. Diazepam and fluoxetine decrease the stress response in zebrafish. **PLoS ONE**, v. 9, p. e103232, 2014. , DOI:10.1371/journal.pone.0103232
- ADAMEC, R. E. et al. Vulnerability to mild predator stress in serotonin transporter knockout mice. **Behavioural Brain Research**, v. 170, p. 126–140, 2006. , DOI:10.1016/j.bbr.2006.02.012
- AGETSUMA, M. et al. The habenula is crucial for experience-dependent modification of fear responses in zebrafish. **Nature Neuroscience**, v. 13, p. 1354–1356, 2010. , DOI:10.1038/nn.2654
- AHMAD, F.; RICHARDSON, M. K. Exploratory behaviour in the open field test adapted for larval zebrafish: Impact of environmental complexity. **Behavioural Processes**, v. 92, p. 88–98, 2013. , DOI:10.1016/j.beproc.2012.10.014
- AHMED, T. S.; FERNANDES, Y.; GERLAI, R. Effects of animated images of sympatric predators and abstract shapes on fear responses in zebrafish. **Behaviour**, v. 149, p. 1125–1153, 2012. , DOI:10.1163/1568539X-00003011
- AIRHART, M. J. et al. Movement disorders and neurochemical changes in zebrafish larvae after bath exposure to fluoxetine (PROZAC). **Neurotoxicology and Teratology**, v. 29, p. 652–664, 2007. , DOI:10.1016/j.ntt.2007.07.005
- ALDECO, M.; ARSLAN, B. K.; EDMONDSON, D. E. Catalytic and inhibitor binding properties of zebrafish monoamine oxidase (zMAO): Comparisons with human MAO A and MAO B. **Comparative Biochemistry and Physiology, Part B**, v. 159, p. 78–83, 2011. , DOI:10.1016/j.cbpb.2011.02.002
- ALMEIDA-FILHO, N. et al. Brazilian multicentric study of psychiatric morbidity. Methodological features and prevalence estimates. **British Journal of Psychiatry**, v. 171, p. 524–529, 2011. , DOI:10.1192/bjp.171.6.524
- ALTIERI, S. C. et al. Rethinking 5-HT_{1A} receptors: Emerging modes of inhibitory feedback of relevance to emotion-related behavior. **ACS Chemical Neuroscience**, v. 4, p. 72–83, 2013. , DOI:10.1021/cn3002174
- ALVES, F. L.; BARBOSA JR, A.; HOFFMANN, A. Antinociception in piauçu fish induced by exposure to the conspecific alarm substance. **Physiology & Behavior**, v. 110-111, p. 58–62, 2013. , DOI:10.1016/j.physbeh.2012.12.003
- AMAT, J. et al. Escapable and inescapable stress differentially alter extracellular levels of 5-HT in the basolateral amygdala of the rat. **Brain Research**, v. 812, p. 113–120, 1998a.
- AMAT, J. et al. Escapable and inescapable stress differentially and selectively alter extracellular levels of 5-HT in the ventral hippocampus and dorsal periaqueductal gray of the rat. **Brain Research**, v. 797, p. 12–22, 1998b.

- AMIR-ZILBERSTEIN, L. et al. Homeodomain protein Otp and activity-dependent splicing modulate neuronal adaptation to stress. **Neuron**, v. 73, p. 279–291, 2012. , DOI:10.1016/j.neuron.2011.11.019
- AMO, R. et al. Identification of the zebrafish ventral habenula as a homolog of the mammalian lateral habenula. **Journal of Neuroscience**, v. 30, p. 1566–1574, 27 jan. 2010. , DOI:10.1523/JNEUROSCI.3690-09.2010
- AMO, R. et al. The habenulo-raphe serotonergic circuit encodes an aversive expectation value essential for adaptive active avoidance of danger. **Neuron**, 2014. , DOI:10.1016/j.neuron.2014.10.035
- ANICHTCHIK, O. et al. Distinct structure and activity of monoamine oxidase in the brain of zebrafish (*Danio rerio*). **Journal of Comparative Neurology**, v. 498, p. 593–610, 2006. , DOI:10.1002/cne
- ARAUJO, J. et al. Behavioral and pharmacological aspects of anxiety in the light/dark preference test. In: KALUEFF, A. V; STEWART, A. M. (Eds.). **Zebrafish Protocols for Neurobehavioral Research**. New York: Humana Press, 2012.
- ASE, A. R. et al. Altered serotonin and dopamine metabolism in the CNS of serotonin 5-HT_{1A} or 5-HT_{1B} receptor knockout mice. **Journal of Neurochemistry**, v. 75, p. 2415–2426, 2000.
- BARBA-ESCOBEDO, P. A.; GOULD, G. G. Visual social preferences of lone zebrafish in a novel environment: Strain and anxiolytic effects. **Genes, Brain and Behavior**, v. 11, p. 366–373, 2012. , DOI:10.1111/j.1601-183X.2012.00770.x
- BARBOSA JR, A. et al. Behavioral characterization of the alarm reaction and anxiolytic-like effect of acute treatment with fluoxetine in piauçu fish. **Physiology & Behavior**, v. 105, p. 784–790, 2012. , DOI:10.1016/j.physbeh.2011.10.007
- BARLOW, D. H. **Anxiety and its disorders. The nature and treatment of anxiety and panic**. 2nd. ed. New York, NY: The Guilford Press, 2002. p. 704 pp
- BARLOW, D. H.; CHORPITA, B. F.; TUROVSKY, J. Fear, panic, anxiety, and disorders of emotion. **Nebraska Symposia on Motivation**, v. 43, p. 251–328, 1996.
- BARNES, N. M.; SHARP, T. A review of central 5-HT receptors and their function. **Neuropharmacology**, v. 38, p. 1083–1152, 1999.
- BARRY, M. J. Effects of fluoxetine on the swimming and behavioural responses of the Arabian killifish. **Ecotoxicology**, v. 22, n. 2, p. 425–32, mar. 2013. , DOI:10.1007/s10646-012-1036-7
- BASS, S. L. S.; GERLAI, R. Zebrafish (*Danio rerio*) responds differentially to stimulus fish: The effects of sympatric and allopatric predators and harmless fish. **Behavioural Brain Research**, v. 186, p. 107–117, 2008. , DOI:10.1016/j.bbr.2007.07.037
- BECHTHOLT, A. J.; LUCKI, I. Effects of serotonin-related gene deletion on measures of anxiety, depression, and neurotransmission. In: ROTH, B. L. (Ed.). **The serotonin receptors: From molecular pharmacology to human therapeutics**. Totowa, NJ: Humana Press, 2006. p. 577–606.

- BECK, C. H. M. Acute treatment with antidepressant drugs selectively increases the expression of c-fos in the rat brain. **Journal of Psychiatry & Neuroscience**, v. 20, p. 25–32, 1994.
- BEEKMAN, M.; FLACHSKAMM, C.; LINTHORST, A. C. E. Effects of exposure to a predator on behaviour and serotonergic neurotransmission in different brain regions of C57bl/6N mice. **European Journal of Neuroscience**, v. 21, p. 2825–2836, 2005. , DOI:10.1111/j.1460-9568.2005.04107.x
- BEIJAMINI, V.; GUIMARÃES, F. S. Activation of neurons containing the enzyme nitric oxide synthase following exposure to an elevated plus maze. **Brain Research Bulletin**, v. 69, p. 347–355, 2006. , DOI:10.1016/j.brainresbull.2006.02.006
- BEL, N.; ARTIGAS, F. Fluvoxamine preferentially increases extracellular 5-hydroxytryptamine in the raphe nuclei: An in vivo microdialysis study. **European Journal of Pharmacology**, v. 229, p. 101–103, 1992.
- BELLIPANNI, G.; RINK, E.; BALLY-CUIF, L. Cloning of two tryptophan hydroxylase genes expressed in the diencephalon of the developing zebrafish brain. **Mechanisms of Development**, v. 119S, p. S215–S220, 2002.
- BENCAN, Z.; SLEDGE, D.; LEVIN, E. D. Buspirone, chlordiazepoxide and diazepam effects in a zebrafish model of anxiety. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior**, v. 94, p. 75–80, 2009. , DOI:10.1016/j.pbb.2009.07.009
- BENGEL, D. et al. Altered brain serotonin homeostasis and locomotor insensitivity to 3,4-methylenedioxymethamphetamine (“ecstasy”) in serotonin transporter-deficient mice. **Molecular Pharmacology**, v. 53, p. 649–655, 1998.
- BERGER, S. M. et al. A functional Tph2 C1473G polymorphism causes an anxiety phenotype via compensatory changes in the serotonergic system. **Neuropsychopharmacology**, v. 37, p. 1986–1998, 2012. , DOI:10.1038/npp.2012.46
- BINDSLEV, N. Simple Ant-agonism - Simple Intervention. In: **Drug-Acceptor Interactions**. [s.l: s.n.]. p. 33–60.
- BLACKBURN, K. J.; FRENCH, P. C.; MERRILLS, R. J. 5-hydroxytryptamine uptake by rat brain in vitro. **Life Sciences**, v. 6, p. 1653–1663, 1967.
- BLANCHARD, D. C.; GRIEBEL, G.; BLANCHARD, R. J. Mouse defensive behaviors: Pharmacological and behavioral assays for anxiety and panic. **Neuroscience & Biobehavioral Reviews**, v. 25, p. 205–18, maio 2001.
- BLAND, R. C.; ORN, H.; NEWMAN, S. C. Lifetime prevalence of psychiatric disorders in Edmonton. **Acta Psychiatrica Scandinavica**, v. 338, p. 24–32, 1988.
- BLASER, R. E.; CHADWICK, L.; MCGINNIS, G. C. Behavioral measures of anxiety in zebrafish (*Danio rerio*). **Behavioural Brain Research**, v. 208, p. 56–62, 2010. , DOI:10.1016/j.bbr.2009.11.009
- BLASER, R. E.; GOLDSTEINHOLM, K. Depth preference in zebrafish, *Danio rerio*: Control by surface and substrate cues. **Animal Behaviour**, v. 83, p. 953–959, 2012. , DOI:10.1016/j.anbehav.2012.01.014

- BLASER, R. E.; PEÑALOSA, Y. M. Stimuli affecting zebrafish (*Danio rerio*) behavior in the light / dark preference test. **Physiology & Behavior**, v. 104, p. 831–837, 2011. , DOI:10.1016/j.physbeh.2011.07.029
- BLASER, R. E.; ROSEMBERG, D. B. Measures of anxiety in zebrafish (*Danio rerio*): Dissociation of black / white preference and novel tank test. **PLoS ONE**, v. 7, p. e36931, 2012. , DOI:10.1371/journal.pone.0036931
- BLASER, R.; GERLAI, R. Behavioral phenotyping in zebrafish: Comparison of three behavioral quantification methods. **Behavior Research Methods**, v. 38, p. 456–469, 2006.
- BOCKAERT, J. et al. Classification and signaling characteristics of 5-HT receptors. In: MÜLLER, C.; JACOBS, B. (Eds.). **Handbook of Behavioral Neurobiology of Serotonin**. Amsterdam: Elsevier B. V., 2010. p. 103–121.
- BORKOVEC, T. D. et al. Preliminary exploration of worry: Some characteristics and processes. **Behaviour Research and Therapy**, v. 21, p. 9–16, 1983.
- BORKOVEC, T. D. Worry: A potentially valuable concept. **Behaviour Research and Therapy**, v. 23, p. 481–482, 1985.
- BORTOLATO, M.; CHEN, K.; SHIH, J. C. The degradation of serotonin: Role of MAO. In: MÜLLER, C.; JACOBS, B. L. (Eds.). **Handbook of Behavioral Neurobiology of Serotonin**. Amsterdam: Elsevier B. V., 2010. p. 203–218.
- BROWN, G. E. et al. Ostariophysan alarm pheromones: Laboratory and field tests of the functional significance of nitrogen oxides. **Journal of Chemical Ecology**, v. 26, p. 139–154, 2000.
- BULLING, S. et al. The mechanistic basis for noncompetitive ibogaine inhibition of serotonin and dopamine transporters. **Journal of Biological Chemistry**, v. 287, p. 18524–18534, 2012. , DOI:10.1074/jbc.M112.343681
- CACHAT, J. et al. Modeling withdrawal syndrome in zebrafish. **Behavioural Brain Research**, v. 208, p. 371–376, 2010a.
- CACHAT, J. et al. Three-dimensional neurophenotyping of adult zebrafish behavior. **PloS ONE**, v. 6, p. e17597, 2011a. , DOI:10.1371/journal.pone.0017597
- CACHAT, J. et al. Unique and potent effects of acute ibogaine on zebrafish: The developing utility of novel aquatic models for hallucinogenic drug research. **Behavioural Brain Research**, v. 236, p. 258–269, 2013. , DOI:10.1016/j.bbr.2012.08.041
- CACHAT, J. M. et al. Measuring behavioral and endocrine responses to novelty stress in adult zebrafish. **Nature Protocols**, v. 5, p. 1786–1799, 2010b. , DOI:10.1038/nprot.2010.140
- CACHAT, J. M. et al. Modelling stress and anxiety in zebrafish. In: KALUEFF, A. V.; CACHAT, J. M. (Eds.). **Zebrafish Models in Neurobehavioral Research**. Nova Iorque: Humana Press, 2011b. p. 73–88.
- 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>.

- CAO, B.-J.; RODGERS, R. J. Influence of 5-HT_{1A} receptor antagonism on plus-maze behaviour in mice. II. WAY 100635, SDZ 216-525 and NAN-190. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior**, v. 58, p. 593–603, 1997a.
- CAO, B.-J.; RODGERS, R. J. Influence of 5-HT_{1A} receptor antagonism on plus-maze behaviour in mice. I. Pindolol enantiomers and pindobind 5-HT_{1A}. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior**, v. 58, p. 583–591, 1997b.
- CASES, O. et al. Aggressive behavior and altered amounts of brain serotonin and norepinephrine in mice lacking MAO A. **Science**, v. 268, p. 1763–1766, 1995.
- CHAKRAVARTY, S. et al. Chronic unpredictable stress (CUS)-induced anxiety and related mood disorders in a zebrafish model: Altered brain proteome profile implicates mitochondrial dysfunction. **PLoS ONE**, v. 8, p. e63302, jan. 2013. , DOI:10.1371/journal.pone.0063302
- CHAMPAGNE, D. L. et al. Translating rodent behavioral repertoire to zebrafish (*Danio rerio*): Relevance for stress research. **Behavioural Brain Research**, v. 214, p. 332–342, 2010. , DOI:10.1016/j.bbr.2010.06.001
- CHEN, F. et al. Characterization of an allosteric citalopram-binding site at the serotonin transporter. **Journal of Neurochemistry**, v. 92, p. 21–28, 2005. , DOI:10.1111/j.1471-4159.2004.02835.x
- CHEN, K. et al. A spontaneous point mutation produces monoamine oxidase A / B knock-out mice with greatly elevated monoamines and anxiety-like behavior. **Journal of Biological Chemistry**, v. 279, p. 39645–39652, 2004. , DOI:10.1074/jbc.M405550200
- CLARK, M. S. et al. Overexpression of 5-HT_{1B} receptor in dorsal raphe nucleus using herpes simplex virus gene transfer increases anxiety behavior after inescapable stress. **Journal of Neuroscience**, v. 22, p. 4550–4562, 2002.
- CLARK, M. S. et al. Increased expression of 5-HT_{1B} receptor in dorsal raphe nucleus decreases fear-potentiated startle in a stress dependent manner. **Brain Research**, v. 1007, p. 86–97, 2004. , DOI:10.1016/j.brainres.2004.01.070
- CLÉNET, F. et al. Anxiolytic profile of HG1, a 5-HT-moduline antagonist, in three mouse models of anxiety. **European Neuropsychopharmacology**, v. 14, p. 449–456, 2004. , DOI:10.1016/j.euroneuro.2003.12.004
- CLÉNET, F. et al. Role of GABA-ergic and serotonergic systems in the anxiolytic-like mechanism of action of a 5-HT-moduline antagonist in the mouse elevated plus maze. **Behavioural Brain Research**, v. 158, p. 339–348, 2005. , DOI:10.1016/j.bbr.2004.09.015
- COE, T. S. et al. Genetic variation in strains of zebrafish (*Danio rerio*) and the implications for ecotoxicology studies. **Ecotoxicology**, v. 18, p. 144–150, 2009. , DOI:10.1007/s10646-008-0267-0
- CONCEIÇÃO, S.; ZANGROSSI JR, H.; MILENA DE BARROS VIANA. Antipanic-like effect of serotonin reuptake inhibitors in the elevated T-maze. **Behavioural Brain Research**, v. 147, p. 185–192, 2003. , DOI:10.1016/S0166-4328(03)00151-7
- CORR, P. J. Anxiety: Splitting the phenomenological atom. **Personality and Individual Differences**, v. 50, p. 889–897, maio 2011. , DOI:10.1016/j.paid.2010.09.013

- CRABBE, J. C.; MORRIS, R. G. M. Festina lente: Late-night thoughts on high-throughput screening of mouse behavior. **Nature Neuroscience**, v. 7, p. 1175–1179, 2004. , DOI:10.1038/nm1343
- CRASKE, M. G. et al. Qualitative dimensions of worry in DMS-III-R generalized anxiety disorder subjects and nonanxious controls. **Behaviour Research and Therapy**, v. 27, p. 397–402, 1989.
- CROCKETT, M. J.; CLARK, L.; ROBBINS, T. W. Reconciling the role of serotonin in behavioral inhibition and aversion: Acute tryptophan depletion abolishes punishment-induced inhibition in humans. **Journal of Neuroscience**, v. 29, p. 11993–11999, 2009. , DOI:10.1523/JNEUROSCI.2513-09.2009
- CRYAN, J. F.; KAUPMANN, K. Don't worry "B" happy!: A role for GABAB receptors in anxiety and depression. **Trends in Pharmacological Sciences**, v. 26, p. 36–43, 2005. , DOI:10.1016/j.tips.2004.11.004
- DADDA, M. et al. Early differences in epithalamic left–right asymmetry influence lateralization and personality of adult zebrafish. **Behavioural Brain Research**, v. 206, p. 208–215, 2010. , DOI:10.1016/j.bbr.2009.09.019
- DAHLBOM, S. J. **Bully or bullied? The zebrafish as a model for social stress and depression**. [s.l.] Uppsala University, 2013.
- DAVEY, G. C. L. et al. The epidemiology of worry and generalized anxiety disorder. In: **Worry and its psychological disorders: Theory, assessment and treatment**. [s.l.] John Wiley & Sons, Ltd, 2008.
- DAVIES, M. A.; CHANG, C.-Y.; ROTH, B. L. Polymorphic and posttranscriptional modifications of 5-HT receptor structure: Functional and pathological implications. In: ROTH, B. L. (Ed.). **The serotonin receptors: From molecular pharmacology to human therapeutics**. Totowa, NJ: Humana Press, 2006. p. 59–90.
- DAWS, L. C.; GERHARDT, G. A.; FRAZER, A. 5-HT_{1B} antagonists modulate clearance of extracellular serotonin in rat hippocampus. **Neuroscience Letters**, v. 266, p. 165–168, 1999.
- DE ANGELIS, L. Experimental anxiety and antidepressant drugs: The effects of moclobemide, a selective reversible MAO-A inhibitor, fluoxetine and imipramine in mice. **Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology**, v. 354, p. 379–383, 1996.
- DEAKIN, J. F. W.; GRAEFF, F. G. 5-HT and mechanisms of defense. **Journal of Psychopharmacology**, v. 5, p. 305–315, 1991.
- DECARVALHO, T. N. et al. Aversive cues fail to activate fos expression in the asymmetric olfactory-habenula pathway of zebrafish. **Frontiers in Neural Circuits**, v. 7, p. Article 98, jan. 2013. , DOI:10.3389/fncir.2013.00098
- DØVING, K. B.; LASTEIN, S. The alarm reaction in fishes — Odorants, modulations of responses, neural pathways. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1170, p. 413–423, 2009. , DOI:10.1111/j.1749-6632.2009.04111.x
- DREW, R. E. et al. Brain transcriptome variation among behaviorally distinct strains of zebrafish (*Danio rerio*). **BMC Genomics**, v. 13, p. 323, 2012. , DOI:10.1186/1471-2164-13-323

- DUGATKIN, L. A. The evolution of risk-taking. **Cerebrum**, 2013.
- DVORKIN, A.; BENJAMINI, Y.; GOLANI, I. Mouse cognition-related behavior in the open-field: Emergence of places of attraction. **PLoS Computational Biology**, v. 4, p. e1000027, 2008.
- EGAN, R. J. et al. Understanding behavioral and physiological phenotypes of stress and anxiety in zebrafish. **Behavioural Brain Research**, v. 205, p. 38–44, 2009. , DOI:10.1016/j.bbr.2009.06.022
- EILAM, D.; GOLANI, I. Home base behavior of rats (*Rattus norvegicus*) exploring a novel environment. **Behavioural Brain Research**, v. 34, p. 199–211, 1989.
- EILAM, D.; GOLANI, I. Home base behavior in amphetamine-treated tame wild rats (*Rattus norvegicus*). **Behavioural Brain Research**, v. 36, p. 161–170, 1990.
- EILAM, D.; IZHAR, R.; MORT, J. Threat detection: Behavioral practices in animals and humans. **Neuroscience & Biobehavioral Reviews**, v. 35, p. 999–1006, 2011. , DOI:10.1016/j.neubiorev.2010.08.002
- EL MANSARI, M. et al. Effects of acute and long-term administration of escitalopram and citalopram on serotonin neurotransmission: An in vivo electrophysiological study in rat brain. **Neuropsychopharmacology**, v. 30, p. 1269–1277, 2005. , DOI:10.1038/sj.npp.1300686
- ENGIN, E.; TREIT, D. The effects of intra-cerebral drug infusions on animals' unconditioned fear reactions: A systematic review. **Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry**, v. 32, p. 1399–1419, 2008. , DOI:10.1016/j.pnpbp.2008.03.020
- FIERRO, A. et al. Similarities between the binding sites of monoamine oxidase (MAO) from different species — Is zebrafish a useful model for the discovery of novel MAO inhibitors? In: **An Integrated View of the Molecular Recognition and Toxinology - From Analytical Procedures to Biomedical Applications**. [s.l: s.n.]. p. 405–431.
- FILE, S. E.; HYDE, J. R. G. The effectss of p-chlorophenylalanine and ethanolamine-O-sulfate in an animal test of anxiety. **Journal of Pharmaceutical Pharmacology**, v. 29, p. 735–738, 1977.
- FINN, D. A.; RUTLEDGE-GORMAN, M. T.; CRABBE, J. C. Genetic animal models of anxiety. **Neurogenetics**, v. 4, n. 3, p. 109–35, 2003. , DOI:10.1007/s10048-003-0143-2
- FUZZEN, M. L. M.; VAN DER KRAAK, G.; BERNIER, N. J. Stirring up new ideas about the regulation of the hypothalamic-pituitary-interrenal axis in zebrafish (*Danio rerio*). **Zebrafish**, v. 7, p. 349–358, dez. 2010. , DOI:10.1089/zeb.2010.0662
- GANNA, K.; MARTIN, B.; CANOQUET, M. Worry and anxiety: Is there a causal relationship? **Psychopathology**, v. 34, p. 221–229, 2001.
- GANZ, J. et al. Subdivisions of the adult zebrafish subpallium by molecular marker analysis. **Journal of Comparative Neurology**, v. 520, p. 633–655, 2012. , DOI:10.1002/cne.22757
- GARTSIDE, S. E. et al. Interaction between a selective 5-HT_{1A} receptor antagonist and an SSRI in vivo: Effects on 5-HT cell firing and extracellular 5-HT. **British Journal of Pharmacology**, v. 115, p. 1064–1070, 1995.
- GAYOSO, J. Á. et al. Crypt cells of the zebrafish *Danio rerio* mainly project to the

dorsomedial glomerular field of the olfactory bulb. **Chemical Senses**, v. 37, p. 357–369, 2012. , DOI:10.1093/chemse/bjr109

GEBAUER, D. L. et al. Effects of anxiolytics in zebrafish: Similarities and differences between benzodiazepines, buspirone and ethanol. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior**, v. 99, p. 480–486, 2011. , DOI:10.1016/j.pbb.2011.04.021

GERLAI, R. et al. Drinks like a fish: Zebra fish (*Danio rerio*) as a behavior genetic model to study alcohol effects. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior**, v. 67, p. 773–82, 2000.

GERLAI, R. et al. Differences in acute alcohol-induced behavioral responses among zebrafish populations. **Alcoholism: Clinical and Experimental Research**, v. 32, p. 1763–1773, 2009. , DOI:10.1111/j.1530-0277.2008.00761.x.Differences

GERLAI, R. Zebrafish antipredatory responses: A future for translational research? **Behavioural Brain Research**, v. 207, p. 223–231, 2010. , DOI:10.1016/j.bbr.2009.10.008

GHISLENI, G. et al. The role of CRH in behavioral responses to acute restraint stress in zebrafish. **Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry**, v. 36, p. 176–182, 2012. , DOI:10.1016/j.pnpbp.2011.08.016

GLAS, G. A conceptual history of anxiety and depression. In: KASPER, S.; DEN BOER, J. A.; AD SITSEN, J. M. (Eds.). **Handbook of Depression and Anxiety: Second Edition, Revised and Expanded**. Segunda ed ed. Nova Iorque: Marcel Dekker, Inc., 2003. p. 1–47.

GLAS, G. Philosophical aspects of neurobiological research on anxiety and anxiety disorders. **Anxiety**, p. 1–9, 2004.

GODDARD, A. W. et al. Effects of tryptophan depletion on responses to yohimbine in healthy human subjects. **Biological Psychiatry**, v. 38, p. 74–85, 1995.

GOMES, K. S. et al. Contrasting effects of acute and chronic treatment with imipramine and fluoxetine on inhibitory avoidance and escape responses in mice exposed to the elevated T-maze. **Brain Research Bulletin**, v. 78, p. 323–327, 2009. , DOI:10.1016/j.brainresbull.2008.11.003

GOZZI, A. et al. A neural switch for active and passive fear. **Neuron**, v. 67, p. 656–666, 2010. , DOI:10.1016/j.neuron.2010.07.008

GRAEFF, F. G.; SCHOENFELD, R. I. Tryptaminergic mechanisms in punished and nonpunished behavior. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 173, p. 277–283, 1970.

GRAEFF, F. G.; VIANA, M. DE B.; MORA, P. O. Opposed regulation by dorsal raphe nucleus 5-HT pathways of two types of fear in the elevated T-maze. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior**, v. 53, p. 171–177, 1996.

GRAHN, R. E. et al. Activation of serotonin-immunoreactive cells in the dorsal raphe nucleus in rats exposed to an uncontrollable stressor. **Brain Research**, v. 826, p. 35–43, 1999.

GREEN, J. et al. Automated high-throughput neurophenotyping of zebrafish social behavior. **Journal of Neuroscience Methods**, v. 210, p. 266–271, 30 set. 2012. , DOI:10.1016/j.jneumeth.2012.07.017

GRIEBEL, G. et al. Risk assessment behaviour: Evaluation of utility in the study of 5-HT-

- related drugs in the rat elevated plus-maze test. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior**, v. 57, p. 817–827, 1997.
- GRIEBEL, G. et al. Behavioural profiles in the mouse defence test battery suggest anxiolytic potential of 5-HT_{1A} receptor antagonists. **Psychopharmacology**, v. 144, p. 121–130, 1999.
- GRIFFITHS, B. B. et al. A zebrafish model of glucocorticoid resistance shows serotonergic modulation of the stress response. **Frontiers in Behavioral Neuroscience**, v. 6, p. Article 68, 2012. , DOI:10.3389/fnbeh.2012.00068
- GRIMSBY, J. et al. Increased stress response and β -phenylethylamine in MAO-B deficient mice. **Nature Genetics**, v. 17, p. 1–5, 1997.
- GROSS, C. et al. Altered fear circuits in 5-HT_{1A} receptor KO mice. **Biological Psychiatry**, v. 48, p. 1157–1163, 2000.
- GROSS, C. et al. Serotonin_{1A} receptor acts during development to establish normal anxiety-like behaviour in the adult. **Nature**, v. 416, p. 396–400, 2002.
- GROSSMAN, L. et al. Characterization of behavioral and endocrine effects of LSD on zebrafish. **Behavioural Brain Research**, v. 214, p. 277–284, 2010. , DOI:10.1016/j.bbr.2010.05.039
- GUIMARÃES, F. S. et al. Serotonin in panic and anxiety disorders. In: MÜLLER, C.; JACOBS, B. (Eds.). **Handbook of Behavioral Neurobiology of Serotonin**. Amsterdam: Elsevier B. V., 2010. p. 667–685.
- GUIMARÃES, F. S.; CAROBREZ, A. P.; GRAEFF, F. G. Modulation of anxiety behaviors by 5-HT-interacting drugs. In: **Handbook of Anxiety and Fear**. [s.l: s.n.]. p. 241–268.
- HAGAN, C. E. et al. 5-HT_{1B} autoreceptor regulation of serotonin transporter activity in synaptosomes. **Synapse**, v. 66, p. 1024–1034, 2012. , DOI:10.1002/syn.21608
- HALE, M. W. et al. Exposure to high- and low-light conditions in an open-field test of anxiety increases c-Fos expression in specific subdivisions of the rat basolateral amygdaloid complex. **Brain Research Bulletin**, v. 71, p. 174–182, 2006. , DOI:10.1016/j.brainresbull.2006.09.001
- HALL, D.; SUBOSKI, M. D. Visual and olfactory stimuli in learned release of alarm reactions by zebra danio fish (*Brachydanio rerio*). **Neurobiology of Learning and Memory**, v. 63, p. 229–240, 1995.
- HALL, I. C. et al. Stress-evoked increases in serotonin in the auditory midbrain do not directly result from elevations in serum corticosterone. **Behavioural Brain Research**, v. 226, p. 41–49, 2012. , DOI:10.1016/j.bbr.2011.08.042
- HAMDANI, E. H.; DØVING, K. B. Sensitivity and selectivity of neurons in the medial region of the olfactory bulb to skin extract from conspecifics in Crucian carp, *Carassius carassius*. **Chemical Senses**, v. 28, p. 181–189, 2003.
- HAMDANI, E.-H. et al. Alarm reaction in the crucian carp is mediated by the medial bundle of the medial olfactory tract. **Chemical Senses**, v. 25, p. 103–109, 2000.
- HANDLEY, S. L.; MCBLANE, J. W. Opposite effects of fluoxetine in two animal models of anxiety. **British Journal of Pharmacology**, v. 107, p. 446P, 1992.
- HARE, M. L. Tyramine oxidase: A new enzyme system in liver. **Biochemical Journal**, v. 22,

p. 968–979, 1928.

HARTMANN, R. J.; GELLER, I. p-Chlorophenylalanine effects on a conditioned emotional response in rats. **Life Sciences**, v. 10, p. 927–933, 1971.

HAYLEY, S. et al. Central monoamine activity in genetically distinct strains of mice following a psychogenic stressor: Effects of predator exposure. **Brain Research**, v. 892, p. 293–300, 2001.

HERCULANO, A. M.; MAXIMINO, C. Serotonergic modulation of zebrafish behavior: Towards a paradox. **Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry**, v. 55, p. 50–66, 2014. , DOI:10.1016/j.pnpbp.2014.03.008

HERVÁS, I.; ARTIGAS, F. Effect of fluoxetine on extracellular 5-hydroxytryptamine in rat brain. Role of 5-HT autoreceptors. **European Journal of Pharmacology**, v. 358, p. 9–18, 1998.

HOPLIGHT, B. J.; VINCOW, E. S.; NEUMAIER, J. F. The effects of SB 224289 on anxiety and cocaine-related behaviors in a novel object task. **Physiology & Behavior**, v. 84, p. 707–714, 2005. , DOI:10.1016/j.physbeh.2005.02.016

ITURRIAGA-VÁSQUEZ, P. et al. Zebrafish: A model for behavioral pharmacology. **Farmacología de Chile**, v. 5, p. 27–32, 2012.

JAHANSHAH, A. et al. Altered expression of neuronal tryptophan hydroxylase-2 mRNA in the dorsal and median raphe nuclei of three genetically modified mouse models relevant to depression and anxiety. **Journal of Chemical Neuroanatomy**, v. 41, p. 227–233, 2011. , DOI:10.1016/j.jchemneu.2011.05.015

JAHN-EIMERMACHER, A.; LASARZIK, I.; RABER, J. Statistical analysis of latency outcomes in behavioral experiments. **Behavioural Brain Research**, v. 221, p. 271–275, 2011. , DOI:10.1016/j.bbr.2011.03.007. Statistical

JENNINGS, K. A. et al. Increased expression of the 5-HT transporter confers a low-anxiety phenotype linked to decreased 5-HT transmission. **Journal of Neuroscience**, v. 26, p. 8955–8964, 2006. , DOI:10.1523/JNEUROSCI.5356-05.2006

JESUTHASAN, S. J.; MATHURU, A. S. The alarm response in zebrafish: Innate fear in a vertebrate genetic model. **Journal of Neurogenetics**, v. 22, p. 211–229, 2008. , DOI:10.1080/01677060802298475

KAFKAFI, N. Extending SEE for large-scale phenotyping of mouse open-field behavior. **Behavior research methods, instruments, & computers : a journal of the Psychonomic Society, Inc**, v. 35, n. 2, p. 294–301, maio 2003.

KALUEFF, A. V et al. Conserved role for the serotonin transporter gene in rat and mouse neurobehavioral endophenotypes. **Neuroscience & Biobehavioral Reviews**, v. 34, p. 373–386, 2010. , DOI:10.1016/j.neubiorev.2009.08.003

KALUEFF, A. V et al. Time to recognize zebrafish “affective” behavior. **Behaviour**, v. 149, p. 1019–1036, 2012. , DOI:10.1163/1568539X-00003030

KALUEFF, A. V et al. Towards a comprehensive catalog of zebrafish behavior 1.0 and beyond. **Zebrafish**, v. 10, p. 70–86, mar. 2013. , DOI:10.1089/zeb.2012.0861

- KALUEFF, A. V; MURPHY, D. L. The importance of cognitive phenotypes in experimental modeling of animal anxiety and depression. **Neural Plasticity**, v. 2007, p. Article ID 52087, 2007. , DOI:10.1155/2007/52087
- KALUEFF, A. V; NUTT, D. J. Role of GABA in memory and anxiety. **Depression and Anxiety**, v. 4, p. 100–110, 1997.
- KALUEFF, A. V; WHEATON, M.; MURPHY, D. L. What's wrong with my mouse model? Advances and strategies in animal modeling of anxiety and depression. **Behavioural Brain Research**, v. 179, p. 1–18, 2007. , DOI:10.1016/j.bbr.2007.01.023
- KASSAI, F.; GYERTYÁN, I. Shock priming enhances the efficacy of SSRIs in the foot shock-induced ultrasonic vocalization test. **Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry**, v. 36, n. 1, p. 128–135, 2012. , DOI:10.1016/j.pnpbp.2011.10.012
- KESSLER, R. C. et al. Lifetime and 12-month prevalence of DSM-III-R psychiatric disorders in the United States. Results from the National Comorbidity Survey. **Archives of General Psychiatry**, v. 51, p. 8–19, 1994.
- KESSLER, R. C.; GREENBERG, P. E. The economic burden of anxiety and stress disorders. In: DAVIS, K. L. et al. (Eds.). **Neuropsychopharmacology. The Fifth Generation of Progress**. Nova Iorque: American College of Neuropsychopharmacology, 2002. p. 981–992.
- KHOR, Y. M.; SOGA, T.; PARHAR, I. S. Caffeine neuroprotects against dexamethasone-induced anxiety-like behaviour in the zebrafish (*Danio rerio*). **General and Comparative Endocrinology**, v. 181, p. 310–315, 2013. , DOI:10.1016/j.ygcen.2012.09.021
- KIM, D.-K. et al. Altered serotonin synthesis, turnover and dynamic regulation in multiple brain regions of mice lacking the serotonin transporter. **Neuropharmacology**, v. 49, p. 798–810, 2005. , DOI:10.1016/j.neuropharm.2005.08.010
- KINKEL, M. D. et al. Intraperitoneal injection into adult zebrafish. **Journal of Visualized Experiments**, v. Aug 30, p. pii 2126, 2010. , DOI:10.3791/2126
- KISER JR, R. S.; GERMAN, D. C.; LEOVITZ, R. M. Serotonergic reduction of dorsal central gray area stimulation-produced aversion. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior**, v. 9, p. 27–31, 1978.
- KISER JR, R. S.; LEOVITZ, R. M. Monoaminergic mechanisms in aversive brain stimulation. **Physiology & Behavior**, v. 15, p. 47–53, 1975.
- KISER JR, R. S.; LEOVITZ, R. M.; GERMAN, D. C. Anatomic and pharmacologic differences between two types of aversive midbrain stimulation. **Brain Research**, v. 155, p. 331–342, 1978.
- KIST, L. W. et al. Acute exposure to microcystin-producing cyanobacterium *Microcystis aeruginosa* alters adult zebrafish (*Danio rerio*) swimming performance parameters. **Journal of Toxicology**, v. 2011, p. Article ID 280304, 2011. , DOI:10.1155/2011/280304
- KOKEL, D. et al. Rapid behavior-based identification of neuroactive small molecules in the zebrafish. **Nature Chemical Biology**, v. 6, p. 231–237, 2010. , DOI:10.1038/nchembio.307
- KSHAMA, D. et al. Modulation of baseline behavior in rats by putative serotonergic agents in three ethoexperimental paradigms. **Behavioral and Neural Biology**, v. 54, p. 234–253, 1990.

- KYZAR, E. et al. Behavioral effects of bidirectional modulation of brain monoamines by reserpine and d-amphetamine in zebrafish. **Brain Research**, 2013. , DOI:10.1016/j.brainres.2013.06.033
- KYZAR, E. J. et al. Effects of hallucinogenic agents mescaline and phencyclidine on zebrafish behavior and physiology. **Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry**, v. 37, n. 1, p. 194–202, 2012. , DOI:10.1016/j.pnpbp.2012.01.003
- LAPORTE, J. L. et al. Refining psychiatric genetics: From “mouse psychiatry” to understanding complex human disorders. **Behavioral Pharmacology**, v. 19, p. 377–384, 2008. , DOI:10.1097/FBP.0b013e32830dc09b.Refining
- LASTEIN, S.; HAMDANI, E. H.; DØVING, K. B. Single unit responses to skin odorants from conspecifics and heterospecifics in the olfactory bulb of crucian carp *Carassius carassius*. **Journal of Experimental Biology**, v. 211, p. 3529–3535, 2008. , DOI:10.1242/jeb.018739
- LAU, B. Y. B. et al. Identification of a brain center whose activity discriminates a choice behavior in zebrafish. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 108, p. 2581–2586, 2011. , DOI:10.1073/pnas.1018275108
- LAWRENCE, C. The husbandry of zebrafish (*Danio rerio*): A review. **Aquaculture**, v. 269, p. 1–20, 2007. , DOI:10.1016/j.aquaculture.2007.04.077
- LEVIN, E. D.; BENCAN, Z.; CERUTTI, D. T. Anxiolytic effects of nicotine in zebrafish. **Physiology & Behavior**, v. 90, p. 54–58, 2007. , DOI:10.1016/j.physbeh.2006.08.026
- LI, Q. et al. Reduction in the density and expression, but not G-protein coupling, of serotonin receptors (5-HT1A) in 5-HT transporter knock-out mice: Gender and brain region differences. **Journal of Neuroscience**, v. 20, p. 7888–7895, 2000.
- LILLESAAR, C. et al. Axonal projections originating from raphe serotonergic neurons in the developing and adult zebrafish, *Danio rerio*, using transgenics to visualize raphe-specific *pet1* expression. **Journal of Comparative Neurology**, v. 512, p. 158–182, 2009. , DOI:10.1002/cne.21887
- LILLESAAR, C. The serotonergic system in fish. **Journal of Chemical Neuroanatomy**, v. In press, 2011. , DOI:10.1016/j.jchemneu.2011.05.009
- LIMA, M. G. et al. Nocifensive behavior in adult and larval zebrafish. In: KALUEFF, A. V.; STEWART, A. M. (Eds.). **Zebrafish Protocols for Neurobehavioral Research**. New York: Humana Press, 2012. v. 66.
- LÓPEZ, J. M.; GONZÁLEZ, A. Organization of the serotonergic system in the central nervous system of two basal actinopterygian fishes: the *Cladistians Polypterus senegalus* and *Erpetoichthys calabaricus*. **Brain, Behavior and Evolution**, v. 83, p. 54–76, jan. 2014. , DOI:10.1159/000358266
- LÓPEZ-PATIÑO, M. A. et al. Anxiogenic effects of cocaine withdrawal in zebrafish. **Physiology & Behavior**, v. 93, p. 160–171, 2008a. , DOI:10.1016/j.physbeh.2007.08.013
- LÓPEZ-PATIÑO, M. A. et al. Gender differences in zebrafish responses to cocaine withdrawal. **Physiology & Behavior**, v. 95, p. 36–47, 2008b. , DOI:10.1016/j.physbeh.2008.03.021

- LOWRY, C. A. et al. Anatomical and functional evidence for a stress-responsive, monoamine-accumulating area in the dorsomedial hypothalamus of adult rat brain. **Hormones and Behavior**, v. 43, p. 254–262, 2003. , DOI:10.1016/S0018-506X(02)00009-0
- LUCA, R. M.; GERLAI, R. In search of optimal fear inducing stimuli: Differential behavioral responses to computer animated images in zebrafish. **Behavioural Brain Research**, v. 226, p. 66–76, 2012a. , DOI:10.1016/j.bbr.2011.09.001
- LUCA, R. M.; GERLAI, R. Animated bird silhouette above the tank: Acute alcohol diminishes fear responses in zebrafish. **Behavioural Brain Research**, v. 229, p. 194–201, 2012b. , DOI:10.1016/j.bbr.2012.01.021
- MAASWINKEL, H. et al. Dissociating the effects of habituation, black walls, buspirone and ethanol on anxiety-like behavioral responses in shoaling zebrafish. A 3D approach to social behavior. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior**, v. 108, p. 16–27, 2013. , DOI:10.1016/j.pbb.2013.04.009
- MAASWINKEL, H.; ZHU, L.; WENG, W. The immediate and the delayed effects of buspirone on zebrafish (*Danio rerio*) in an open field test: A 3-D approach. **Behavioural Brain Research**, v. 234, p. 365–374, 2012. , DOI:10.1016/j.bbr.2012.07.014
- MAIER, W. et al. Generalized anxiety disorder (ICD-10) in primary care from a cross-cultural perspective: A valid diagnostic entity? **Acta Psychiatrica Scandinavica**, v. 101, p. 29–36, 2000.
- MALAGIÉ, I. et al. Effects of acute fluoxetine on extracellular serotonin levels in the raphe: An in vivo microdialysis study. **European Journal of Pharmacology**, v. 286, p. 213–217, 1995.
- MANNOURY LA COUR, C. et al. Functional consequences of 5-HT transporter gene disruption on 5-HT(1a) receptor-mediated regulation of dorsal raphe and hippocampal cell activity. **Journal of Neuroscience**, v. 21, p. 2178–2185, 2001.
- MANNOURY LA COUR, C. et al. GABAB receptors in 5-HT transporter- and 5-HT1A receptor-knock-out mice: Further evidence of a transduction pathway shared with 5-HT1A receptors. **Journal of Neurochemistry**, v. 89, p. 886–896, 2004. , DOI:10.1111/j.1471-4159.2004.02367.x
- MANSUR, B. D. M.; JR, A. G. Efeitos da substância de alarme no teste claro/escuro no Zebrafish, p. 87–93, 2014.
- MATHUR, P.; GUO, S. Differences of acute versus chronic ethanol exposure on anxiety-like behavioral responses in zebrafish. **Behavioural Brain Research**, v. 219, p. 234–239, 2011. , DOI:10.1016/j.bbr.2011.01.019
- MATHURU, A. S. et al. Chondroitin fragments are odorants that trigger fear behavior in fish. **Current Biology**, v. 22, p. 538–544, 2012. , DOI:10.1016/j.cub.2012.01.061
- MATHURU, A. S.; JESUTHASAN, S. The medial habenula as a regulator of anxiety in adult zebrafish. **Frontiers in Neural Circuits**, v. 7, p. Article 99, 2013. , DOI:10.3389/fncir.2013.00099
- MATSUDA, K. et al. The octadecaneuropeptide exerts an anxiogenic-like action in goldfish. **Neuroscience**, v. 181, p. 100–108, 2011. , DOI:10.1016/j.neuroscience.2011.02.058

- MATSUDA, K. et al. Neuroendocrine control of feeding behavior and psychomotor activity by neuropeptide Y in fish. **Neuropeptides**, v. 46, p. 275–283, 2012. , DOI:10.1016/j.npep.2012.09.006
- MATSUDA, K. et al. Ovine corticotropin-releasing hormone (oCRH) exerts an anxiogenic-like action in the goldfish, *Carassius auratus*. **General and Comparative Endocrinology**, v. 188, p. 118–122, 2013. , DOI:10.1016/j.ygcen.2013.01.001
- MATSUO, M. et al. Conflict situation increases serotonin release in rat dorsal hippocampus: In vivo study with microdialysis and Vogel test. **Neuroscience Letters**, v. 215, p. 197–200, 1996.
- MAXIMINO, C. et al. A comparative analysis of the preference for dark environments in five teleosts. **International Journal of Comparative Psychology**, v. 20, n. 4, p. 351–367, 2007.
- MAXIMINO, C. et al. Measuring anxiety in zebrafish: A critical review. **Behavioural Brain Research**, v. 214, p. 157–171, 2010a. , DOI:10.1016/j.bbr.2010.05.031
- MAXIMINO, C. et al. Parametric analyses of anxiety in zebrafish scototaxis. **Behavioural Brain Research**, v. 210, p. 1–7, 2010b. , DOI:10.1016/j.bbr.2010.01.031
- MAXIMINO, C. et al. Scototaxis as anxiety-like behavior in fish. **Nature Protocols**, v. 5, n. 2, p. 209–216, 2010c. , DOI:10.1038/nprot.2009.225
- MAXIMINO, C. et al. Pharmacological analysis of zebrafish (*Danio rerio*) scototaxis. **Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry**, v. 35, n. 2, p. 624–631, 2011a. , DOI:10.1016/j.pnpbp.2011.01.006
- MAXIMINO, C. **Parâmetros da escototaxia como modelo comportamental de ansiedade no paulistinha (*Danio rerio*, Cyprinidae, Pisces)**. [s.l.] Universidade Federal do Pará, 2011a.
- MAXIMINO, C. Modulation of nociceptive-like behavior in zebrafish (*Danio rerio*) by environmental stressors. **Psychology & Neuroscience**, v. 4, p. 149–155, 2011b. , DOI:10.3922/j.psns.2011.1.017
- MAXIMINO, C. et al. Possible role of serotonergic system in the neurobehavioral impairment induced by acute methylmercury exposure in zebrafish (*Danio rerio*). **Neurotoxicology and Teratology**, v. 33, p. 727–734, 2011b. , DOI:10.1016/j.ntt.2011.08.006
- MAXIMINO, C. **Serotonin and anxiety. Neuroanatomical, pharmacological, and functional aspects**. New York, NY: Springer, 2012. p. 111
- MAXIMINO, C. et al. A comparison of the light / dark and novel tank tests in zebrafish. **Behaviour**, v. 149, p. 1099–1123, 2012. , DOI:10.1163/1568539X-00003029
- MAXIMINO, C. et al. The serotonergic system of zebrafish: Genomics, neuroanatomy and neuropharmacology. In: HALL, F. S. (Ed.). **Serotonin: Biosynthesis, regulation and health implications**. New York, NY: Nova Science, 2013a. p. 53–67.
- MAXIMINO, C. et al. “Limbic associative” and “autonomic” amygdala in teleosts: A review of the evidence. **Journal of Chemical Neuroanatomy**, v. 48-49, p. 1–13, 2013b. , DOI:10.1016/j.jchemneu.2012.10.001
- 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 parachlorophenylalanine in two behavioral models. **Neuropharmacology**, v. 71, p. 83–97, 2013c. , DOI:10.1016/j.neuropharm.2013.03.006

MAXIMINO, C. et al. Behavioral and neurochemical changes in the zebrafish leopard strain. **Genes, Brain and Behavior**, v. 12, p. 576–582, 2013d. , DOI:10.1111/gbb.12047

MAXIMINO, C. et al. Fluoxetine and WAY 100,635 dissociate increases in scototaxis and analgesia induced by conspecific alarm substance in zebrafish (*Danio rerio* Hamilton 1822). **Pharmacology, Biochemistry, and Behavior**, v. 124C, p. 425–433, 2014a. , DOI:10.1016/j.pbb.2014.07.003

MAXIMINO, C. et al. Fingerprinting of psychoactive drugs in zebrafish anxiety-like behaviors. **PLoS ONE**, v. 9, p. e103943, jan. 2014b. , DOI:10.1371/journal.pone.0103943

MAXIMINO, C.; BRITO, T. M. DE; GOUVEIA JR, A. Construct validity of behavioral models of anxiety : where experimental psychopathology meets ecology and evolution. **Psychology & Neuroscience**, v. 3, p. 117–123, 2010. , DOI:10.3922/j.psns.2010.1.015

MAXIMINO, C.; HERCULANO, A. M. A review of monoaminergic neuropsychopharmacology in zebrafish. **Zebrafish**, v. 7, n. 4, p. 359–378, 2010. , DOI:10.1089/zeb.2010.0669

MCDEVITT, R. A. et al. Serotonin 1B autoreceptors originating in the caudal dorsal raphe nucleus reduce expression of fear and depression-like behavior. **Biological Psychiatry**, v. 69, p. 780–787, 2011. , DOI:10.1016/j.biopsych.2010.12.029

MCDEVITT, R. A.; NEUMAIER, J. F. Regulation of dorsal raphe nucleus function by serotonin autoreceptors: A behavioral perspective. **Journal of Chemical Neuroanatomy**, v. 41, n. 4, p. 234–246, 2011. , DOI:10.1016/j.jchemneu.2011.05.001

MCNAUGHTON, N.; CORR, P. J. A two-dimensional neuropsychology of defense: Fear/anxiety and defensive distance. **Neuroscience & Biobehavioral Reviews**, v. 28, p. 285–305, 2004. , DOI:10.1016/j.neubiorev.2004.03.005

MENARD, J.; TREIT, D. Effects of centrally administered anxiolytic compounds in animal models of anxiety. **Neuroscience & Biobehavioral Reviews**, v. 23, p. 591–613, 1999.

MENGOD, G. et al. Chemical neuroanatomy of 5-HT receptor subtypes in the mammalian brain. In: ROTH, B. L. (Ed.). **The serotonin receptors: From molecular pharmacology to human therapeutics**. Totowa, NJ: Humana Press, 2006. p. 319–364.

MENGOD, G. et al. Distribution of 5-HT receptors in the central nervous system. In: MÜLLER, C.; JACOBS, B. (Eds.). **Handbook of Behavioral Neurobiology of Serotonin**. Amsterdam: Elsevier B. V., 2010. p. 123–138.

MIYASAKA, N. et al. From the olfactory bulb to higher brain centers: Genetic visualization of secondary olfactory pathways in zebrafish. **Journal of Neuroscience**, v. 29, p. 4756–4767, 2009. , DOI:10.1523/JNEUROSCI.0118-09.2009

MO, B. et al. Restraint stress increases serotonin release in the central nucleus of the amygdala via activation of corticotropin-releasing factor receptors. **Brain Research Bulletin**, v. 76, p. 493–498, 2008.

- MONGEAU, R. et al. 5-HT_{2C} receptor activation prevents stress-induced enhancement of brain 5-HT turnover and extracellular levels in the mouse brain: Modulation by chronic paroxetine treatment. **Journal of Neurochemistry**, v. 115, p. 438–449, 2010. , DOI:10.1111/j.1471-4159.2010.06932.x
- MORETZ, J. A.; MARTINS, E. P.; ROBISON, B. D. Behavioral syndromes and the evolution of correlated behavior in zebrafish. **Behavioral Ecology**, v. 18, p. 556–562, 2007. , DOI:10.1093/beheco/arm011
- MORRIS, J. S. et al. Covariation of activity in habenula and dorsal raphé nuclei following tryptophan depletion. **NeuroImage**, v. 172, p. 163–172, 1999.
- MUELLER, T. et al. The dorsal pallium in zebrafish, *Danio rerio*. **Brain Research**, v. 1381, p. 95–105, 2011. , DOI:10.1016/j.brainres.2010.12.089
- NORTON, W. H. J.; FOLCHERT, A.; BALLY-CUIF, L. Comparative analysis of serotonin receptor (HTR1A/HTR1B families) and transporter (slc6a4a/b) gene expression in the zebrafish brain. **Journal of Comparative Neurology**, v. 511, p. 521–542, 2008. , DOI:10.1002/cne.21831
- NOWICKI, M. et al. Serotonin antagonists induce anxiolytic and anxiogenic-like behavior in zebrafish in a receptor-subtype dependent manner. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior**, 2014. , DOI:10.1016/j.pbb.2014.09.022
- NUTT, D.; MIGUEL, B. G.; DAVIES, S. J. C. Phenomenology of anxiety disorders. In: BLANCHARD, R. J. et al. (Eds.). **Handbook of Anxiety and Fear**. Amsterdam: Elsevier B. V., 2008. p. 365–393.
- OKAMOTO, H.; AGETSUMA, M.; AIZAWA, H. Genetic dissection of the zebrafish habenula, a possible switching board for selection of behavioral strategy to cope with fear and anxiety. **Developmental Neurobiology**, v. 72, p. 386–394, 2011a. , DOI:10.1002/dneu.20913
- OKAMOTO, H.; AGETSUMA, M.; AIZAWA, H. Genetic dissection of the zebrafish habenula, a possible switching board for selection of behavioral strategy to cope with fear and anxiety. **Developmental Neurobiology**, v. 72, p. 386–394, 2011b. , DOI:10.1002/dneu.20913
- OLIVEIRA, T. A. et al. Death-associated odors induce stress in zebrafish. **Hormones and Behavior**, v. 65, p. 340–344, 2014. , DOI:10.1016/j.yhbeh.2014.02.009
- OSWALD, M.; ROBISON, B. D. Strain-specific alteration of zebrafish feeding behavior in response to aversive stimuli. **Canadian Journal of Zoology**, v. 86, p. 1085–1094, 2011. , DOI:10.1139/Z08-085.Strain-specific
- ØVERLI, Ø. et al. Evolutionary background for stress-coping styles: Relationships between physiological, behavioral, and cognitive traits in non-mammalian vertebrates. **Neuroscience & Biobehavioral Reviews**, v. 31, p. 396–412, 2007. , DOI:10.1016/j.neubiorev.2006.10.006
- ØVERLI, Ø.; WINBERG, S.; POTTINGER, T. G. Behavioral and neuroendocrine correlates of selection for stress responsiveness in rainbow trout. **Integrative and Comparative Biology**, v. 45, p. 463–474, 2005.
- PAN, Y.; CHATERJEE, D.; GERLAI, R. Strain dependent gene expression and neurochemical levels in the brain of zebrafish transcriptome: Focus on a few alcohol related targets. **Physiology & Behavior**, v. In press, 2012. , DOI:10.1016/j.physbeh.2012.01.017

- PARK, C. R. et al. Acute predator stress impairs the consolidation and retrieval of hippocampus-dependent memory in male and female rats. **Learning & Memory**, v. 15, p. 271–280, 2008. , DOI:10.1101/lm.721108
- PARRA, K. V; ADRIAN JR, J. C.; GERLAI, R. The synthetic substance hypoxanthine 3-N-oxide elicits alarm reactions in zebrafish (*Danio rerio*). **Behavioural Brain Research**, v. 205, p. 336–341, 2009. , DOI:10.1016/j.bbr.2009.06.037
- PAUL, E. D. et al. The Deakin/Graeff hypothesis: Focus on serotonergic inhibition of panic. **Neuroscience & Biobehavioral Reviews**, 2014. , DOI:10.1016/j.neurobiorev.2014.03.010
- PESSOTTI, I. **Ansiedade**. São Paulo: E. P. U., 1978. p. 136 pp.
- PETKOV, V. D.; BELCHEVA, S.; KONSTANTINOVA, E. Anxiolytic effects of dotarizine, a possible antimigraine drug. **Methods and Findings in Experimental and Clinical Pharmacology**, v. 17, p. 659–668, 1995.
- PIATO, Â. L. et al. Acute restraint stress in zebrafish: Behavioral parameters and purinergic signaling. **Neurochemical Research**, v. 36, p. 1876–1886, 2011a. , DOI:10.1007/s11064-011-0509-z
- PIATO, Â. L. et al. Unpredictable chronic stress model in zebrafish (*Danio rerio*): Behavioral and physiological responses. **Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry**, v. 35, p. 561–567, 2011b. , DOI:10.1016/j.pnpbp.2010.12.018
- PINHEIRO, S. H. et al. Elevated mazes as animal models of anxiety: Effects of serotonergic agents. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 79, p. 71–85, mar. 2007.
- PINNA, G.; COSTA, E.; GUIDOTTI, A. SSRIs act as selective brain steroidogenic stimulants (SBSSs) at low doses that are inactive on 5-HT reuptake. **Current Opinion in Pharmacology**, v. 9, p. 24–30, 2009.
- PISZCZEK, L. et al. Serotonin 1A auto-receptors are not sufficient to modulate anxiety in mice. **European Journal of Neuroscience**, 22 maio 2013. , DOI:10.1111/ejn.12260
- PRADEL, G.; SCHACHNER, M.; SCHMIDT, R. Inhibition of memory consolidation by antibodies against cell adhesion molecules after active avoidance conditioning in zebrafish. **Journal of Neurobiology**, v. 39, p. 197–206, 1999.
- PRIETO, M. J. et al. Effect of risperidone and fluoxetine on the movement and neurochemical changes of zebrafish. **Open Journal of Medicinal Chemistry**, v. 2, p. 129–138, 2012. , DOI:10.4236/ojmc.2012.24016
- QIAN, Y. et al. Identification and characterization of antidepressant-sensitive serotonin transporter proteins using site-specific antibodies. **Journal of Neuroscience**, v. 15, p. 1261–1274, 1995.
- RAMBOZ, S. et al. 5-HT_{1B} receptor knock out - Behavioral consequences. **Behavioural Brain Research**, v. 73, p. 305–312, 1996.
- RAMBOZ, S. et al. Serotonin receptor 1A knockout: An animal model of anxiety-related disorder. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 95, p. 14476–14481, 1998.
- RAVINDER, S.; PILLAI, A. G.; CHATTARJI, S. Cellular correlates of enhanced anxiety

caused by acute treatment with the selective serotonin reuptake inhibitor fluoxetine in rats. **Frontiers in Behavioral Neuroscience**, v. 5, p. Article 88, 2011. , DOI:10.3389/fnbeh.2011.00088

RAYMOND, J. R. et al. Multiplicity of mechanisms of serotonin receptor signal transduction. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 92, p. 179–212, 2001.

RAYMOND, R. J. et al. 5-HT receptor signal transduction pathways. In: ROTH, B. L. (Ed.). **The serotonin receptors: From molecular pharmacology to human therapeutics**. Totowa, NJ: Humana Press, 2006. p. 143–206.

REHNBERG, B. G. et al. Brain benzodiazepine receptors in fathead minnows and the behavioral response to alarm pheromone. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior**, v. 33, p. 435–442, 1989.

REHNBERG, B. G.; SCHRECK, C. B. Chemosensory detection of predators by coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*): Behavioral reaction and the physiological stress response. **Canadian Journal of Zoology**, v. 65, p. 481–485, 1987.

REN, G.; LI, S.; ZHONG, H. Zebrafish tyrosine hydroxylase 2 gene encodes tryptophan hydroxylase. **Journal of Biological Chemistry**, 2013. , DOI:10.1074/jbc.M113.485227

REX, A. et al. *In vivo/ex vivo* and behavioural study on central effects of 5-HT1B/1D and 5-HT1A antagonists in guinea pigs. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior**, v. 88, p. 196–204, 2008. , DOI:10.1016/j.pbb.2007.07.016

REX, A.; VOIGT, J. P.; FINK, H. Anxiety but not arousal increases 5-hydroxytryptamine release in the rat ventral hippocampus *in vivo*. **Neuroscience**, v. 22, p. 1185–1189, 2005. , DOI:10.1111/j.1460-9568.2005.04251.x

RIAD, M. et al. Somatodendritic localization of 5-HT1A and preterminal axonal localization of 5-HT1B serotonin receptors in adult rat brain. **Journal of Comparative Neurology**, v. 417, p. 181–194, 2000.

RICHARDSON-JONES, J. W. et al. 5-HT1A autoreceptor levels determine vulnerability to stress and response to antidepressants. **Neuron**, v. 65, p. 40–52, 2010. , DOI:10.1016/j.neuron.2009.12.003

RICHARDSON-JONES, J. W. et al. Serotonin-1A autoreceptors are necessary and sufficient for the normal formation of circuits underlying innate anxiety. **Journal of Neuroscience**, v. 31, p. 6008–6018, 2011. , DOI:10.1523/JNEUROSCI.5836-10.2011

RIHEL, J. et al. Zebrafish behavioral profiling links drugs to biological targets and rest/wake regulation. **Science**, v. 347, p. 348–351, 2010. , DOI:10.1126/science.1183090

RIVERA, H. M. et al. Estradiol increases Pet-1 and serotonin transporter mRNA in the midbrain raphe nuclei of ovariectomized rats. **Brain Research**, v. 1259, p. 51–58, 2009.

ROBICHAUD, R. C.; SLEDGE, K. L. The effects of p-chlorophenylalanine on experimentally induced conflict in the rat. **Life Sciences**, v. 8, p. 965–969, 1969.

RODGERS, R. J. et al. Animal models of anxiety: An ethological perspective. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 30, p. 289–304, 1997.

RODGERS, R. J.; CAO, B.-J. Anxiolytic-like profile of p-MPPI, a novel 5HT1A receptor

antagonist, in the murine elevated plus-maze. **Psychopharmacology**, v. 129, p. 365–371, 1997.

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**, v. 6, p. e19397, 2011. , DOI:10.1371/journal.pone.0019397

ROSEMBERG, D. B. et al. Behavioral effects of taurine pretreatment in zebrafish acutely exposed to ethanol. **Neuropharmacology**, v. 63, p. 613–23, set. 2012. , DOI:10.1016/j.neuropharm.2012.05.009

SACKERMAN, J. et al. Zebrafish behavior in novel environments: Effects of acute exposure to anxiolytic compounds and choice of *Danio rerio* line. **International Journal of Comparative Psychology**, v. 23, p. 43–61, 2010.

SAIF, M. et al. Sight of conspecific images induces changes in neurochemistry in zebrafish. **Behavioural Brain Research**, v. 243, p. 294–299, 2013. , DOI:10.1016/j.bbr.2013.01.020

SALCHNER, P.; SINGEWALD, N. Neuroanatomical substrates involved in the anxiogenic-like effect of acute fluoxetine treatment. v. 43, p. 1238–1248, 2002. , DOI:10.1016/S0028-3908(02)00329-5

SALCHNER, P.; SINGEWALD, N. 5-HT receptor subtypes involved in the anxiogenic-like action and associated Fos response of acute fluoxetine treatment in rats. p. 282–288, 2006. , DOI:10.1007/s00213-005-0247-5

SALLINEN, V. et al. Hyperserotonergic phenotype after monoamine oxidase inhibition in larval zebrafish. **Journal of Neurochemistry**, v. 109, p. 403–415, 2009. , DOI:10.1111/j.1471-4159.2009.05986.x

SÁNCHEZ, C. Serotonergic mechanisms involved in the exploratory behaviour of mice in a fully automated two-compartment black and white test box. **Pharmacology & Toxicology**, v. 77, p. 71–78, 1995.

SÁNCHEZ, C.; MEIER, E. Behavioral profiles of SSRIs in animal models of depression, anxiety and aggression: Are they all alike? **Psychopharmacology**, v. 129, p. 197–205, 1997.

SAVELIEVA, K. V et al. Genetic disruption of both tryptophan hydroxylase genes dramatically reduces serotonin and affects behavior in models sensitive to antidepressants. **PLoS ONE**, v. 3, p. e3301, 2008. , DOI:10.1371/journal.pone.0003301

SCERBINA, T.; CHATTERJEE, D.; GERLAI, R. Dopamine receptor antagonism disrupts social preference in zebrafish: A strain comparison study. **Amino Acids**, 2012. , DOI:10.1007/s00726-012-1284-0

SCHENBERG, L. C.; GRAEFF, F. G. Role of the periaqueductal gray substance in the antianxiety action of benzodiazepines. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior**, v. 9, p. 287–295, 1978.

SCHOENFELD, R. I. Lysergic acid diethylamide- and mescaline-induced attenuation of the effect of punishment in the rat. **Science**, v. 192, p. 801–803, 1976.

SCHRUERS, K. et al. Effects of tryptophan depletion on carbon dioxide provoked panic in panic disorder patients. **Psychiatry Research**, v. 93, p. 179–187, 2000.

- SERRA, E. L.; MEDALHA, C. C.; MATTIOLI, R. Natural preference of zebrafish (*Danio rerio*) for a dark environment. **Brazilian Journal Of Medical And Biological Research**, v. 32, p. 1551–1553, 1999.
- SETINI, A. et al. Molecular characterization of monoamine oxidase in zebrafish (*Danio rerio*). **Comparative Biochemistry and Physiology Part B**, v. 140, p. 153–161, 2005. , DOI:10.1016/j.cbpc.2004.10.002
- SEVERINSEN, K. et al. Characterisation of the zebrafish serotonin transporter functionally links TM10 to the ligand binding site. **Journal of Neurochemistry**, v. 105, p. 1794–1805, 2008. , DOI:10.1111/j.1471-4159.2008.05285.x
- SHARP, T.; GARTSIDE, S. E.; UMBERS, V. Effects of co-administration of a monoamine oxidase inhibitor and a 5-HT1A receptor antagonist on 5-hydroxytryptamine cell firing and release. **European Journal of Pharmacology**, v. 320, p. 15–19, 1997.
- SILVA, M. T.; ALVES, C. R.; SANTAREM, E. M. Anxiogenic-like effect of acute and chronic fluoxetine on rats tested on the elevated plus-maze. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 32, p. 333–339, mar. 1999.
- SILVEIRA, M. C. L. et al. Differential expression of Fos protein in the rat brain induced by performance of avoidance or escape in the elevated T-maze. **Behavioural Brain Research**, v. 126, p. 13 – 21, 2001.
- SINGEWALD, N. Altered brain activity processing in high-anxiety rodents revealed by challenge paradigms and functional mapping. **Neuroscience & Biobehavioral Reviews**, v. 31, p. 18–40, jan. 2007. , DOI:10.1016/j.neubiorev.2006.02.003
- SINGH, A. et al. Involvement of the α 1-adrenoceptor in sleep-waking and sleep loss-induced anxiety behavior in zebrafish. **Neuroscience**, v. In press, 2013. , DOI:10.1016/j.neuroscience.2013.04.026
- SLATTERY, D. A. et al. Comparison of alterations in *c-fos* and Egr-1 (*zif 268*) expression throughout the rat brain following acute administration of different classes of antidepressant compounds. **Neuropsychopharmacology**, v. 30, p. 1278–1287, 2005. , DOI:10.1038/sj.npp.1300717
- SÖDERPALM, B.; ENGEL, J. A. Does the PCPA induced anticonflict effect involve activation of the GABAA/benzodiazepine chloride ionophore receptor complex? **Journal of Neural Transmission**, v. 76, p. 145–153, 1989.
- SOUSA, N.; ALMEIDA, O. F. X.; WOTJAK, C. T. A hitchhiker’s guide to behavioral analysis in laboratory rodents. **Genes, brain, and behavior**, v. 5 Suppl 2, p. 5–24, 2006. , DOI:10.1111/j.1601-183X.2006.00228.x
- SPEEDIE, N.; GERLAI, R. Alarm substance induced behavioral responses in zebrafish (*Danio rerio*). **Behavioural Brain Research**, v. 188, p. 168–177, 2008. , DOI:10.1016/j.bbr.2007.10.031
- STEENBERGEN, P. J.; RICHARDSON, M. K.; CHAMPAGNE, D. L. Patterns of avoidance behaviours in the light / dark preference test in young juvenile zebrafish: A pharmacological study. **Behavioural Brain Research**, v. 222, p. 15–25, 2011. , DOI:10.1016/j.bbr.2011.03.025
- STEPHENSON, J. F.; WHITLOCK, K. E.; PARTRIDGE, J. C. Zebrafish preference for light

or dark is dependent on ambient light levels and olfactory stimulation. **Zebrafish**, v. 8, p. 17–22, 2011. , DOI:10.1089/zeb.2010.0671

STEWART, A. et al. Homebase behavior of zebrafish in novelty-based paradigms. **Behavioural Processes**, v. 85, p. 198–203, 2010. , DOI:10.1016/j.beproc.2010.07.009

STEWART, A. et al. Pharmacological modulation of anxiety-like phenotypes in adult zebrafish behavioral models. **Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry**, v. 35, n. 6, p. 1421–1431, 2011a. , DOI:10.1016/j.pnpbp.2010.11.035

STEWART, A. et al. Modeling anxiety using adult zebrafish: A conceptual review. **Neuropharmacology**, v. 62, p. 135–143, 2011b. , DOI:10.1016/j.neuropharm.2011.07.037

STEWART, A. et al. Neurophenotyping of adult zebrafish using the light/dark box paradigm. In: KALUEFF, A. V; CACHAT, J. M. (Eds.). **Zebrafish Neurobehavioral Protocols**. New York: Humana Press, 2011c. p. 157–167.

STEWART, A. et al. Behavioral effects of MDMA (“Ecstasy”) on adult zebrafish. **Behavioral Pharmacology**, v. 22, p. 275–280, 2012a. , DOI:10.1097/FBP.0b013e328345f758.Behavioral

STEWART, A. M. et al. Understanding spatio-temporal strategies of adult zebrafish exploration in the open field test. **Brain Research**, p. 1–9, 2012b. , DOI:10.1016/j.brainres.2012.02.064

STEWART, A. M. et al. Perspectives on experimental models of serotonin syndrome in zebrafish. **Neurochemistry International**, v. 62, p. 893–902, 2013a. , DOI:10.1016/j.neuint.2013.02.018

STEWART, A. M. et al. Constructing the habituome for phenotype-driven zebrafish research. **Behavioural Brain Research**, v. 236, p. 110–117, 2013b. , DOI:10.1016/j.bbr.2012.08.026

STEWART, A. M. et al. Aquatic toxicology of fluoxetine: Understanding the knowns and the unknowns. **Aquatic Toxicology**, v. 156, p. 269–273, 23 set. 2014. , DOI:j.aquatox.2014.08.014

STRIMMER, K. A unified approach to false discovery rate estimation. **BMC Bioinformatics**, v. 9, p. 303, 2008. , DOI:10.1186/1471-2105-9-303

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

SUBOSKI, M. D. et al. Alarm reaction in acquisition and social transmission of simulated-predator recognition by zebra danio fish (*Brachydanio rerio*). **Journal of Comparative Psychology**, v. 104, p. 101–112, 1990.

SUMMERS, C. H.; WINBERG, S. Interactions between the neural regulation of stress and aggression. **Journal of Experimental Biology**, v. 209, p. 4581–4589, 2006. , DOI:10.1242/jeb.02565

SVENNINGSSON, P. et al. Alterations in 5-HT1B receptor function by p11 in depression-like states. **Science**, v. 311, p. 77–80, 2011. , DOI:10.1126/science.1117571

TERAOKA, H. et al. Hedgehog and Fgf signaling pathways regulate the development of tphR-expressing serotonergic raphe neurons in zebrafish embryos. **Journal of Neurobiology**, v. 60, p. 275–288, 2009. , DOI:10.1002/neu.20023.Hedgehog

- THAYER, J. F.; FRIEDMAN, B. H.; BORKOVEC, T. D. Autonomic characteristics of generalized anxiety disorder and worry. **Biological Psychiatry**, v. 39, p. 255–266, 1996.
- THOMAS, A. et al. Marble burying reflects a repetitive and perseverative behavior more than novelty-induced anxiety. **Psychopharmacology**, v. 204, p. 361–73, jun. 2009. , DOI:10.1007/s00213-009-1466-y
- THOMAS, M. A.; JOSHI, P. P.; KLAPER, R. D. Gene-class analysis of expression patterns induced by psychoactive pharmaceutical exposure in fathead minnow (*Pimephales promelas*) indicates induction of neuronal systems. **Comparative Biochemistry and Physiology, Part C**, v. 155, p. 109–120, 2012. , DOI:10.1016/j.cbpc.2011.05.014
- TONE, A. **The age of anxiety: A history of America's turbulent affair with tranquilizers**. Nova Iorque: Basic Books, 2008.
- TSETSENIS, T. et al. Suppression of conditioning to ambiguous cues by pharmacogenetic inhibition of the dentate gyrus. **Nature Neuroscience**, v. 10, p. 896–902, 2007. , DOI:10.1038/nn1919
- TYE, N. C.; EVERITT, B. J.; IVERSEN, S. D. 5-hydroxytryptamine and punishment. **Nature**, v. 268, p. 741–742, 1977.
- VAN DER STAAY, F. J.; ARNDT, S. S.; NORDQUIST, R. E. Evaluation of animal models of neurobehavioral disorders. **Behavioral and Brain Functions**, v. 5, p. 11, 2009. , DOI:10.1186/1744-9081-5-11
- VIGNET, C. et al. Systematic screening of behavioral responses in two zebrafish strains. **Zebrafish**, 5 jun. 2013. , DOI:10.1089/zeb.2013.0871
- VON FRISCH, K. Zur Psychologie des Fisch-Schwarmes. **Naturwissenschaften**, v. 26, p. 601–606, 1938.
- VON TROTHA, J. W.; VERNIER, P.; BALLY-CUIF, L. Emotions and motivated behavior converge on an amygdala-like structure in the zebrafish. **The European journal of neuroscience**, 22 ago. 2014. , DOI:10.1111/ejn.12692
- WANG, Y. et al. Characterization and expression of serotonin transporter genes in zebrafish. **Tohoku Journal of Experimental Medicine**, v. 208, p. 267–274, 2006.
- WATANABE, M. et al. Spot pattern of leopard Danio is caused by mutation in the zebrafish connexin41.8 gene. **EMBO Reports**, v. 7, p. 893–897, 2006. , DOI:10.1038/sj.embor.7400757
- WESTKAEMPER, R. B.; ROTH, B. L. Structure and function reveal insights in the pharmacology of 5-HT receptor subtypes. In: ROTH, B. L. (Ed.). **The serotonin receptors: From molecular pharmacology to human therapeutics**. Totowa, NJ: Humana Press, 2006. p. 39–58.
- WISE, C. D.; BERGER, B. D.; STEIN, L. Benzodiazepines: Anxiety-reducing activity by reduction of serotonin turnover in the brain. **Science**, v. 177, p. 180–183, 1972.
- WOLF, K. Physiological salines for freshwater teleosts. **Progress in Fish-Culture**, v. 25, p. 135–140, 1963.
- WONG, K. et al. Analyzing habituation responses to novelty in zebrafish (*Danio rerio*).

- Behavioural Brain Research**, v. 208, p. 450–457, 2010. , DOI:10.1016/j.bbr.2009.12.023
- WONG, R. Y. et al. Comparing behavioral responses across multiple assays of stress and anxiety in zebrafish (*Danio rerio*). **Behaviour**, v. 149, p. 1205–1240, 2012. , DOI:10.1163/1568539X-00003018
- WONG, R. Y.; OXENDINE, S. E.; GODWIN, J. Behavioral and neurogenomic transcriptome changes in wild-derived zebrafish with fluoxetine treatment. **BMC Genomics**, v. 14, n. 1, p. 348, 2013. , DOI:10.1186/1471-2164-14-348
- WRIGHT, D. et al. QTL analysis of behavioral and morphological differentiation between wild and laboratory Zebrafish (*Danio rerio*). **Behavior Genetics**, v. 36, p. 271–284, 2006. , DOI:10.1007/s10519-005-9029-4
- WRIGHT, D.; BUTLIN, R. K.; CARLBORG, Ö. Epistatic regulation of behavioural and morphological traits in the zebrafish (*Danio rerio*). **Behavior Genetics**, v. 36, p. 914–922, 2006. , DOI:10.1007/s10519-006-9080-9
- YANG, M. et al. The rat exposure test: A model of mouse defensive behaviors. **Physiology & Behavior**, v. 81, p. 465–473, 2004. , DOI:10.1016/j.physbeh.2004.02.010
- YOUDIM, M. B. H.; EDMONDSON, D.; TIPTON, K. F. The therapeutic potential of monoamine oxidase inhibitors. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 7, p. 295–309, 2006. , DOI:10.1038/nrn1883
- ZANGROSSI JR, H. et al. Serotonergic regulation of inhibitory avoidance and one-way escape in the rat elevated T-maze. **Neuroscience & Biobehavioral Reviews**, v. 25, p. 637–645, 2001.
- ZHONG, H.; SÁNCHEZ, C.; CARON, M. G. Consideration of allosterism and interacting proteins in the physiological functions of the serotonin transporter. **Biochemical Pharmacology**, v. 83, p. 435–442, 2012. , DOI:10.1016/j.bcp.2011.09.020
- ZHUANG, X. et al. Altered emotional states in knockout mice lacking 5-HT1A or 5-HT1B receptors. **Neuropsychopharmacology**, v. 21, p. 52S–60S, 1997.
- ZIPPEL, H. P. et al. Pheromone discrimination ability of olfactory bulb mitral and ruffed cells in the goldfish (*Carassius auratus*). **Chemical Senses**, v. 25, p. 339–349, 2000.
- ZIV, L. et al. An affective disorder in zebrafish with mutation of the glucocorticoid receptor. **Molecular Psychiatry**, v. 18, p. 681–691, 2013. , DOI:10.1038/mp.2012.64
- ZOR, T.; SELINGER, Z. Linearization of the Bradford protein assay increases its sensitivity: Theoretical and experimental studies. **Analytical Biochemistry**, v. 236, p. 302–308, 1996.



A comparison of the light/dark and novel tank tests in zebrafish

**Caio Maximino^{a,b,*}, Rancés Benzecry^c, Karen Renata Matos Oliveira^a,
Evander de Jesus Oliveira Batista^a, Anderson Manoel Herculano^{a,b},
Denis Broock Rosemberg^{b,d,e}, Diogo Losch de Oliveira^{b,d,e} and Rachel Blaser^f**

^a Laboratório de Neuroendocrinologia, Instituto de Ciências Biológicas,
Universidade Federal do Pará, Belém, PA, Brazil

^b Zebrafish Neuroscience Research Consortium, New Orleans, LA, USA

^c Faculdade de Biomedicina, Instituto de Ciências Biológicas,
Universidade Federal do Pará, Belém, PA, Brazil

^d Departamento de Bioquímica, Instituto de Ciências Básicas e da Saúde,
Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil

^e Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia em Excitotoxicidade e Neuroproteção
(INCT-EN), Porto Alegre, RS, Brazil

^f Department of Psychology, University of San Diego, San Diego, CA, USA

*Corresponding author's e-mail address: caio.maximino@gmail.com

Accepted 15 October 2012

Abstract

The recent introduction of tasks to assess the behavior of zebrafish in novel and/or aversive environments has spurred great interest, prompting attempts to determine which constructs are modeled by these tasks (e.g., fear, anxiety, or some other construct). A review of the pharmacological and behavioral experiments indicates that not all behavioral testing models are equivalent. A more precise understanding of the parameters that influence task performance affords a wider selection of experimental procedures for investigating a particular construct, and also provides tools for differentiating the various constructs that may ultimately be of interest. In this review we will more closely examine two behavioral assays commonly used to measure the construct of 'anxiety' in adult zebrafish, with the conclusion that they do not both appear to be measuring a single underlying state.

Keywords

zebrafish, anxiety, fear, scototaxis, geotaxis.

THE SEROTONERGIC SYSTEM OF ZEBRAFISH: GENOMICS, NEUROANATOMY AND NEUROPHARMACOLOGY

*Caio Maximino^{*1,2}, Monica Gomes Lima¹, Juliana Araujo¹,
Karen Renata Matos Oliveira¹, Anderson Manoel Herculano^{1,2},
Adam Michael Stewart^{2,3}, Evan J. Kyzar^{2,3}, Jonathan Cachat^{2,3},
Allan V. Kalueff^{2,3}*

¹ Laboratory of Neuroendocrinology, Institute of Biological Sciences,
Federal University do Para, Belem, Brazil

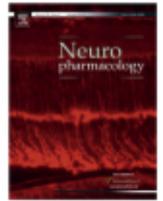
² Zebrafish Neuroscience Research Consortium

³ Department of Pharmacology and Neuroscience Program, Tulane University
Medical School, New Orleans, USA

Abstract

The serotonergic system is highly conserved in vertebrate species, including zebrafish. In spite of a genome duplication in teleost fish (which altered the number of genes encoding proteins related to synthesis, transport and signaling within the serotonergic system), the expression pattern of these proteins in zebrafish is similar to other vertebrates. Pharmacological manipulations of the serotonergic system also produce similar behavioral and neuroendocrinological effects in zebrafish and mammals, suggesting that zebrafish represent a promising model for drug discovery and translational research focusing on central serotonergic mechanisms.

* E-mail address: caio@ufpa.br



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

Caio Maximino^{a,b,*}, Bruna Puty^a, Rancés Benzecry^c, Juliana Araújo^d, Monica Gomes Lima^a, Evander de Jesus Oliveira Batista^a, Karen Renata de Matos Oliveira^a, Maria Elena Crespo-Lopez^e, Anderson Manoel Herculano^{a,b}

^a Laboratório de Neuroendocrinologia, Instituto de Ciências Biológicas, UFPA, Belém, PA, Brazil

^b Zebrafish Neuroscience Research Consortium, Brazil

^c Faculdade de Biomedicina, Instituto de Ciências Biológicas, UFPA, Belém, PA, Brazil

^d Grupo de Ecologia Aquática, Instituto de Ciências Biológicas, UFPA, Belém, PA, Brazil

^e Laboratório de Farmacologia Molecular, Instituto de Ciências Biológicas, UFPA, Belém, PA, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 5 October 2012

Received in revised form

4 March 2013

Accepted 12 March 2013

Keywords:

Serotonin

Zebrafish

Anxiety

Fear

Scototaxis

Geotaxis

ABSTRACT

Serotonin (5-HT) is a neurotransmitter that is involved in many behavioral functions, including the organization of defense, and its putative pathological correlate, anxiety and stress disorders. Recently, behavioral tests for anxiety have been proposed in zebrafish. Exposure to the novel tank test or to the light/dark test increased extracellular fluid 5-HT content in the brain; anxiety-like behavior correlated positively with 5-HT content in the novel tank test, while the correlation was negative in the light/dark test. Acute treatment with a low dose of fluoxetine was anxiolytic in the geotaxis test and anxiogenic in the scototaxis test, while treatment with a higher dose produced a hyperlocomotor effect in both tasks. Buspirone and WAY 100635 were anxiolytic in both tests, while SB 224289 was anxiolytic in the geotaxis and slightly anxiogenic in the scototaxis test. Serotonin depletion with pCPA was anxiogenic in the geotaxis and anxiolytic in scototaxis. These results underline the differential sensitivity of these tasks to assess serotonergic agents; alternatively, serotonin might regulate zebrafish behavior differently in the novel tank test and in the light/dark test.

© 2013 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Serotonin is a ubiquitous neurotransmitter that has many behavioral functions in vertebrates, from ingestive behavior to impulse control (Guimarães et al., 2008, 2010; Lee and Clifton, 2010; Lowry and Hale, 2010; Maximino, 2012; Robbins and Crockett, 2010). In teleost fish, a duplication event produced many different genes which were later lost, but presumably code for functional proteins; among those, the synthesizing enzyme tryptophan hydroxylase, the 5-HT_{1A} receptor, and the serotonin transporter are duplicated in zebrafish (Bellipanni et al., 2002; Lillesaar, 2011; Maximino and Herculano, 2010; Maximino et al., in

press; Norton et al., 2008; Wang et al., 2006). In spite of these differences between the serotonergic system of zebrafish and that of mammals, the pharmacological effects of drugs which target these proteins seem to be conserved. In the group behavior task – a model of anxiety and social interaction – the 5-HT_{1A}R partial agonist buspirone produces an anxiolytic-like effect (Gebauer et al., 2011). The same drug produces an anxiolytic-like profile in the light/dark test (Maximino et al., 2011; Steenbergen et al., 2011) and in the novel tank diving tests (Bencan et al., 2009). On the other hand, acute treatment with serotonin reuptake inhibitors (SSRIs) produce a less clear profile, with either no effect (Egan et al., 2009; Maximino et al., 2011) or anxiolytic effect (Sackerman et al., 2010). With monoamine oxidase inhibitors, either no effect (Maximino et al., 2011) or an anxiolytic effect (Stewart et al., 2011) is observed. Other results regarding the effects of these and other drugs on zebrafish anxiety-like behavior can be found on the Zebrafish Neurophenome Database (<http://www.kaluefflab.com/znpindex.html>) (Kalueff et al., 2010–2011; Kyzar et al., 2012).

* Corresponding author. Laboratório de Neuroendocrinologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Pará, r. Augusto Corrêa 01, 66085-110 Belém, PA, Brazil. Tel.: +55 9181850747.

E-mail addresses: caio@ufpa.br, caio.maximino@gmail.com (C. Maximino).

Behavioral and neurochemical changes in the zebrafish leopard strain

C. Maximino^{†,‡,*}, B. Puty[§], K. R. Matos Oliveira[§]
and A. M. Herculano^{‡,§,*}

[†]Departamento de Morfologia e Ciências Fisiológicas, Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Estadual do Pará, Av. Hiléia Agrópolis do INCRA s/n, 68503-120 Marabá, Brazil,

[‡]Zebrafish Neuroscience Research Consortium, Belém, Brazil, and [§]Laboratório de Neuroendocrinologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Pará, Belém, Brazil

*Corresponding authors: C. Maximino, Departamento de Morfologia e Ciências Fisiológicas, Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Estadual do Pará, Av. Hiléia Agrópolis do INCRA s/n, 68503-120 Marabá, Brazil. E-mail: caio.maximino@gmail.com; and A. M. Herculano, Laboratório de Neuroendocrinologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Pará, Av. Augusto Corrêa 01, 66075-110 Belém, PA, Brazil. E-mail: herculano@ufpa.br

The zebrafish leopard phenotype (*leo*) displays abnormal pigmentation and shows increased anxiety-like behavior. The neurochemical changes associated with this anxious phenotype are not known. Here, we demonstrate that *leo* show increased anxiety-like behavior in the light/dark box and in the novel tank test. This anxious phenotype is rescued by acute treatment with a dose of a serotonin reuptake inhibitor, fluoxetine, that is inactive in wild-type animals. Moreover, *leo* show decreased tissue levels of serotonin, increased serotonin turnover and slightly increased monoamine oxidase activity. These results suggest that the anxious phenotype observed in *leo* zebrafish is caused by a decrease in serotonin uptake. This work could open an important avenue in defining the neurochemical underpinning of natural variation in anxiety disorders.

Keywords: Anxiety, scototaxis, serotonin uptake, strain, zebrafish

Received 16 January 2013, revised 15 April 2013, accepted for publication 9 May 2013

Anxiety-like behavior in animals is controlled by a multiplicity of genes, leading to a plethora of strain effects in different organisms. In zebrafish, for example, increased anxiety-like behavior has been described in the *leopard* skin mutant, *leo* (Cachat *et al.* 2011; Egan *et al.* 2009), which present spots instead of stripes (Gilbert 2003). This phenotype has been described as caused by mutations in the *cx41.8* gene which codes for an orthologue of the mammalian connexin 40 (Watanabe *et al.* 2006). Connexins are multimeric proteins which mediate cell-to-cell signaling by forming hemichannels

and gap junctions; in the central nervous system, they mediate electrical coupling between neurons, metabolic coupling between glial cells, as well as the release of gliotransmitters such as glutamate and ATP (Sáez *et al.* 2003a,b). Mice with astrocyte-targeted inactivation of connexin 43 show a phenotype of motor impairment and increased exploratory behavior in an open-field, but not in the elevated plus-maze (Frisch *et al.* 2003). Deletion of *cx30*, a protein which is expressed in astrocytes, increases centrophobism/thigmotaxis in mice associated with decreased serotonin turnover in the hippocampus (Dere *et al.* 2003).

It is not known if the *leopard* phenotype results only from the *cx41.8* mutation. Nonetheless, the increased anxiety-like behavior of this strain suggests that they may be an important tool in understanding the genetic underpinnings of anxiety and stress disorders. In spite of these initial observations, the neurochemical basis of this behavioral phenotype was not investigated. An important system in the control of anxiety is the serotonergic system (Maximino 2012; Pinheiro *et al.* 2007), suggesting an avenue of inquiry to interpret the neurochemical correlates of strain-dependent anxiety-like behavior in zebrafish. Here, we test whether this phenotype is generalized to other behavioral contexts thought to reflect anxiety/fear, and whether it is associated with changes in the serotonergic system.

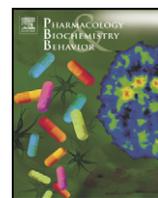
Methods

Drugs and reagents

Fluoxetine was bought from Roche (São Paulo, Brazil). High-performance liquid chromatography (HPLC) standards (serotonin [5-HT], 5-hydroxyindoleacetic acid [5-HIAA] and 3,4-dihydroxybenzylamine [DHBA]) and kynuramine hydrobromide were bought from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). The HPLC-grade methanol was bought from Tedia (Fairfield, CA, USA), and biotechnology-grade sodium dodecyl sulfate was bought from Amresco (Solon, OH, USA). All other reagents were analytical-grade and bought from Synth (Diadema, Brazil).

Animals

Wild-type (WT) longfin ($n = 20$) and leopard mutant ($n = 20$) zebrafish, bought from the same local ornamental aquarium shop, were used in the experiments. Phenotypically, *leo* zebrafish were identified as homozygous *t1* variants (Haffter *et al.* 1996; Watanabe *et al.* 2006), although this allele has been identified in *Tü*, and not WT, zebrafish. Animals were collectively maintained in 40 l tanks, separated by stripe pattern phenotype, for at least 2 weeks before onset of experiments. Tanks were kept at constant temperature (28°C), oxygenation and light cycle [14:10 light–dark (LD) photoperiod]. Animals were fed daily with Alcon flake food, and twice a week with live brine shrimp. Animals were housed, handled and disposed humanely in accordance to the American Fisheries Society's Guidelines for the use of fishes in research (http://fisheries.org/docs/policy_useoffishes.pdf).



Fluoxetine and WAY 100,635 dissociate increases in scototaxis and analgesia induced by conspecific alarm substance in zebrafish (*Danio rerio* Hamilton 1822)



Caio Maximino^{a,b,*}, Monica Gomes Lima^{a,b}, Carina Cardoso Costa^c,
Iêda Maria Louzada Guedes^{c,d}, Anderson Manoel Herculano^{b,e}

^a Departamento de Morfologia e Ciências Fisiológicas, Universidade do Estado do Pará, Marabá, PA, Brazil

^b International Zebrafish Neuroscience Research Consortium, USA

^c Programa de Educação Tutorial PET Medicina/Enfermagem, Instituto de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Pará, Belém, PA, Brazil

^d Laboratório de Biologia Celular e Molecular do Citoesqueleto, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Pará, Belém, PA, Brazil

^e Laboratório de Neuroendocrinologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Pará, Belém, PA, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 17 September 2013

Received in revised form 30 June 2014

Accepted 6 July 2014

Available online 11 July 2014

Keywords:

Alarm substance

Fear

Scototaxis

Nocifensive behavior

Zebrafish

Serotonin

ABSTRACT

Alarm reactions to a substance secreted by the damaged skin of conspecifics and closely-related species are increasingly being recognized as fear-like responses in fish. The neurochemical underpinnings of these effects are so far unknown; however, given the role of the serotonergic system on defensive behavior, it is possible that the alarm reaction is mediated by this monoamine. Exposure to conspecific alarm substance (CAS) increased anxiety-like behavior in the light/dark test in zebrafish and decreased nocifensive behavior. These effects were accompanied by increases in blood glucose, hemoglobin, epinephrine and norepinephrine levels, as well as extracellular levels of serotonin in the brain. Pretreatment with fluoxetine blocked the anxiogenic effects of CAS on the light/dark test as well as all physiological parameters and the increase in extracellular brain 5-HT, but not the reduction in nocifensive behavior. Conversely, pretreatment with the 5-HT_{1A}R antagonist WAY 100635 blocked the effects on nocifensive behavior, but not the effects on anxiety-like behavior nor on physiological parameters. These results point to an important and complex role of the serotonergic system in the mediation of fear-potentiated behavior in the light/dark test and in fear-induced analgesia in zebrafish.

© 2014 Elsevier Inc. All rights reserved.

1. Introduction

A dual role for serotonin (5-HT) has been proposed in the control of mammalian defensive behavior, with the neurotransmitter increasing anxiety-like and decreasing fear-like behavior (Graeff et al., 1996, 1997). Although it is yet unknown if such a behavioral specialization exists in teleost fish (Kalueff et al., 2012), two of the most widely used behavioral tasks in zebrafish – the novel tank test and the light/dark test – show differential pharmacological sensitivity to anxiolytic and panicolytic drugs: dark preference is sensitive to anxiolytic, but not panicolytic drugs (Maximino et al., 2011), while bottom-dwelling is also sensitive to panicolytic drugs (Stewart et al., 2011). Besides their differential pharmacological sensitivity, both tests are also under different stimulus control; while the light/dark preference test is controlled by an approach/avoidance conflict (Blaser et al., 2010; Maximino et al., 2010; Blaser and Peñalosa, 2011; Araujo et al., 2012), the novel

tank test is controlled by escape from the surface (Blaser and Goldsteinholm, 2012; Luca and Gerlai, 2012). These observations closely parallel Gray's model in which anxiety involves defensive approach, generating an approach–avoidance conflict, while fear involves defensive avoidance, generating escape/withdrawal responses (Gray and McNaughton, 2000; McNaughton and Corr, 2004). Interestingly, increasing 5-HTergic transmission by blocking uptake has been shown to reduce bottom-dwelling but increase white avoidance in adult zebrafish (Sackerman et al., 2010; Maximino et al., 2013a), while 5-HT depletion produces the opposite effect (Maximino et al., 2013a).

These behavioral observations suggest different stimulus control, and coordinate well with the “dual role” of serotonin proposed by Deakin and Graeff (1991), Graeff et al. (1997), and Guimarães et al. (2010). However, the differences observed in the effects of fluoxetine and pCPA in both tests (Maximino et al., 2013a) could also be due to other factors, including, e.g., alterations in contrast discrimination (in the case of dark preference) or effects on the swim bladder (in the case of bottom-dwelling). To better discriminate these hypotheses, a clearer fear-inducing stimulus is needed. A behavioral response to an “alarm substance” released by the damaged skin of conspecifics (conspecific alarm substance, CAS), dubbed Schrecksreaktion by Von

* Corresponding author at: Departamento de Morfologia e Ciências Fisiológicas, Universidade do Estado do Pará, Campus Marabá Av. Hiléia Agrópolis do INCRA, s/n, 68503-120 Marabá, PA, Brazil.

E-mail address: caio.maximino@gmail.com (C. Maximino).



Contents lists available at ScienceDirect

Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry

journal homepage: www.elsevier.com/locate/pnp

Serotonergic modulation of zebrafish behavior: Towards a paradox

Anderson Manoel Herculano^{a,b}, Caio Maximino^{b,c,*}^a Neuroendocrinology Laboratory, Biological Sciences Institute, Federal University of Pará, Belém, PA, Brazil^b "Frederico Graeff" Neurosciences and Behavior Laboratory, Department of Morphology and Physiological Sciences, Biological and Health Sciences Center, State University of Pará, Marabá, PA, Brazil^c International Zebrafish Neuroscience Research Consortium, United States

ARTICLE INFO

Available online xxxx

Keywords:

Defensive behavior
 Offensive behavior
 Psychedelic drugs
 Serotonin
 Zebrafish

ABSTRACT

Due to the fish-specific genome duplication event (~320–350 mya), some genes which code for serotonin proteins were duplicated in teleosts; this duplication event was preceded by a reorganization of the serotonergic system, with the appearance of the raphe nuclei (dependent on the isthmus organizer) and prosencephalic nuclei, including the paraventricular and pretectal complexes. With the appearance of amniotes, duplicated genes were lost, and the serotonergic system was reduced to a more complex raphe system. From a comparative point of view, then, the serotonergic system of zebrafish and that of mammals shows many important differences. However, many different behavioral functions of serotonin, as well as the effects of drugs which affect the serotonergic system, seem to be conserved among species. For example, in both zebrafish and rodents acute serotonin reuptake inhibitors (SSRIs) seem to increase anxiety-like behavior, while chronic SSRIs decrease it; drugs which act at the 5-HT_{1A} receptor seem to decrease anxiety-like behavior in both zebrafish and rodents. In this article, we will expose this paradox, reviewing the chemical neuroanatomy of the zebrafish serotonergic system, followed by an analysis of the role of serotonin in zebrafish fear/anxiety, stress, aggression and the effects of psychedelic drugs.

© 2014 Published by Elsevier Inc.

1. Introduction

Serotonin (5-hydroxytryptamine, 5-HT) has been proposed to have a plethora of functions in vertebrates, including the control of defensive behavior (Maximino, 2012), the control of sympathetic outflow and the hypothalamus–pituitary–adrenal axis (Lowry,

2002), immunomodulation (Baganz and Blakely, 2013; Khan and Deschaux, 1997), and aggression (Carrillo et al., 2009; Takahashi et al., 2011). These functions have usually been studied largely in mammalian species. With the advent of teleost species, including zebrafish, as important model organisms in the neurosciences (Rinkwitz et al., 2011), however, a paradox begun to shape: while

Abbreviations: 5-HIAA, 5-hydroxyindoleacetic acid; 5-HT, Serotonin, 5-hydroxytryptamine; 5-HTP, 5-hydroxytryptophan; 8-OH-DPAT, 7-(Dipropylamino)-5,6,7,8-tetrahydronaphthalen-1-ol; AADC, Aromatic l-amino-acid decarboxylase (EC 4.1.1.28); ACTH, Adrenocorticotrophic hormone, corticotropin; AP, Area postrema; *bdnf*, Brain-derived neurotrophic factor; BSF, Blue shortfin wild-type zebrafish; cAMP, 3',5'-Cyclic adenosine monophosphate; *crh*, *crf*, Corticotropin-releasing hormone; CUS, Chronic unpredictable stress; dpf, Days post-fertilization; DRN, Dorsal raphe nucleus; *etv5b*, ETS variant 5b, erm; *fezf2*, FEZ family zinc finger 2; *tof*, *fezl*, Forebrain embryonic zinc finger-like protein 2; GBT, Group behavior task; GC, Griseum centrale, central gray; GR, Glucocorticoid receptor; GR 125,487, 5-Fluoro-2-methoxy-[1-[2-[(methylsulfonyl)amino]ethyl]-4-piperidinyl]-1H-indole-3-methylcarboxylate sulfamate; Ha, Anterior paraventricular hypothalamus; Hc, Caudal paraventricular hypothalamus; HEK293, Human Embryonic Kidney 293 cells; HEK293-MSR, HEK293 cells expressing the human macrophage scavenger receptor; Hi, Intermediate paraventricular hypothalamus; hpf, Hours post-fertilization; HPI, Hypothalamus–pituitary–interrenal; HSB, High Stationary Behavior zebrafish line; IC₅₀, Half maximal inhibitory concentration; IR, Inferior raphe; K_d, Dissociation constant at equilibrium; K_m, Michaelis–Menten constant; LDT, Light/dark test; LFS, Longfin stripped wild-type zebrafish; *lmx1b*, LIM homeobox transcription factor 1b; LSD, Lysergic acid diethylamide, (6aR,9R)-N,N-diethyl-7-methyl-4,6,6a,7,8,9-hexahydroindolo-[4,3-fg]quinoline-9-carboxamide; MAO, l-Monoamine oxidase (EC 1.4.3.4); MC-LR, Microcystin-LR; MDMA, 3,4-Methylenedioxy-N-methylamphetamine, (RS)-1-(benzo[d][1,3]dioxol-5-yl)-N-methylpropan-2-amine; MiD3cm, Mauthner cell homologue MiD3cm; MK-801, Dizocilpine, [5R,10S]-[+]-5-methyl-10,11-dihydro-5H-dibenzol[a,d]cyclohept-5,10-imine; MPTP, 1-Methyl-4-phenyl-1,2,5,6-tetrahydropyridine; *mr*, Mineralocorticoid receptor; NAN-190, 1-(2-Methoxyphenyl)-4-(4-phthalimidobutyl)piperazine; NE, Norepinephrine; NMDA, N-methyl-D-aspartic acid; NOS-1, Nitric oxide synthase isoform 1; *npy*, Neuropeptide Y; NTT, novel tank test, Novel tank diving test; OCT-3, Organic cation transporter 3, extraneuronal monoamine transporter, solute carrier family 22, member 3; OFT, Open-field test; *oxl*, Oxytocin-like; *p.o.*, *Per os*; PCP, Phenylcyclidine, 1-(1-phenylcyclohexyl)piperidine; pCPA, *para*-Chlorophenylalanine; *pet1*, ETS domain-containing transcription factor 1, FEV; PMAT, Plasma membrane monoamine transporter, equilibrative nucleoside transporter 4, ENT4, solute carrier family 29, member 4; *pomca*, Pro-opiomelanocortin isoform A; *prl2*, Prolactin isoform 2; Rd, Dorsal raphe nucleus; Rm, Medial raphe nucleus; SB 224,289, 1'-Methyl-5-[[2'-methyl-4'-(5-methyl-1,2,4-oxadiazol-3-yl)biphenyl-4-yl]carbonyl]-2,3,6,7-tetrahydrospiro[furo[2,3-f]indole-3,4'-piperidine]hydrochloride; SERT, Serotonin transporter, 5-HTT, solute carrier family 6 (neurotransmitter transporter), member 4; SIN-1, 3-Morpholinopyridinone, 5-imino-3-morpholin-4-yl-5H-1,2,3-oxadiazol-3-ium-2-ide; SR, Superior raphe; SSRI, Selective serotonin reuptake inhibitor; TH, Tyrosine hydroxylase, tyrosine 3-monoxygenase (EC 1.14.16.2); TPH, Tryptophan hydroxylase, tryptophan 5-monoxygenase (EC 1.14.16.4); *ucn3l*, Urocortin-like isoform 3; UH-301, (S)-5-Fluoro-8-hydroxy-2-(dipropylamino)tetralin; VMAT2, Vesicular monoamine transporter 2, solute carrier family 18 (vesicular monoamine), member 2; WAY 100,635, N-[2-[4-(2-methoxyphenyl)-1-piperazinyl]ethyl]-N-(2-pyridyl)cyclohexanecarboxamide; ZBC, Zebrafish Behavior Catalog.

* Corresponding author at: Laboratório de Neurociências e Comportamento "Frederico Graeff", Departamento de Morfologia e Ciências Fisiológicas, Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade do Estado do Pará, Av. Hiléia do INCRA, S/N, Marabá, PA, Brazil.

E-mail address: caio.maximino@gmail.com (C. Maximino).

<http://dx.doi.org/10.1016/j.pnpbp.2014.03.008>

0278-5846/© 2014 Published by Elsevier Inc.

Please cite this article as: Herculano AM, Maximino C, Serotonergic modulation of zebrafish behavior: Towards a paradox, Prog Neuro-Psychopharmacol Biol Psychiatry (2014), <http://dx.doi.org/10.1016/j.pnpbp.2014.03.008>