



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

**VARIAÇÃO TEMPORAL DOS NÍVEIS DE GABA E GLUTAMATO NO
CÉREBRO DE *Danio rerio* (ZEBRAFISH) SUBMETIDOS A AMBIENTES
ANSIOGÊNICOS**

WALDO LUCAS LUZ DA SILVA

BELÉM/PA

2018

WALDO LUCAS LUZ DA SILVA

**VARIAÇÃO TEMPORAL DOS NÍVEIS DE GABA E GLUTAMATO NO
CÉREBRO DE *Danio rerio* (ZEBRAFISH) SUBMETIDOS A AMBIENTES
ANSIOGÊNICOS**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Neurociências e Biologia Celular da Universidade Federal do Pará como requisito parcial para obtenção do título de mestre.

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

Co-orientadora: Prof^a Dr^a Karen Renata Herculano Matos Oliveira

BELÉM/PA

2018

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Sistema de Bibliotecas da Universidade Federal do Pará
Gerada automaticamente pelo módulo Ficat, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

- D111v Da Silva, Waldo Lucas Luz
VARIAÇÃO TEMPORAL DOS NÍVEIS DE GABA E GLUTAMATO NO CÉREBRO DE Danio rerio (ZEBRAFISH) SUBMETIDOS A AMBIENTES ANSIOGÊNICOS / Waldo Lucas Luz Da Silva.
— 2018
79 f. : il. color
- Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-graduação em Neurociências e Biologia celular (PPGNBC), Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Pará, Belém, 2018.
Orientação: Prof. Dr. Anderson Manoel Herculano Oliveira da Silva
Coorientação: Profa. Dra. Karen Renata Herculano Matos Oliveira.
1. Comportamento tipo ansiedade. 2. Zebrafish. 3. Sistema glutamatérgico. 4. Sistema GABAérgico. 5. Cromatografia Líquida de Alta Eficácia. I. Oliveira da Silva, Anderson Manoel Herculano, *orient.* II. Título
-

WALDO LUCAS LUZ DA SILVA

**VARIAÇÃO TEMPORAL DOS NÍVEIS DE GABA E GLUTAMATO NO
CÉREBRO DE *Danio rerio* (ZEBRAFISH) SUBMETIDOS A AMBIENTES
ANSIOGÊNICOS**

Dissertação de Mestrado submetido 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 grau de Mestre em Neurociências e Biologia Celular – área de concentração em Neurociências.

Banca examinadora:

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

Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Pará - UFPA.

Co-orientador: Prof^a Dr^a Karen Renata Herculano Matos Oliveira

Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Pará - UFPA.

Membro da Banca: Prof. Dr. Amauri Gouveia Jr

Núcleo de Teoria e Pesquisa em Comportamento, Universidade Federal do Pará - UFPA

Membro da Banca: Prof. Dr. Evander de Jesus Oliveira Batista

Núcleo de Medicina Tropical, Universidade Federal do Pará - UFPA.

BELÉM/PA
2018

Dedico este trabalho às mulheres da minha vida:

Júlia Souza (*in memoriam*) e Tamara Soares.

AGRADECIMENTOS

A Deus, meu Pai celestial, o qual me permite viver de acordo com a Sua vontade e que está sempre comigo e que me levanta quando estou caído. Por onde quer que eu esteja, sempre o louvarei. A Ele, toda a gratidão da minha vida.

À Tamara Soares, minha namorada, a qual me ensina constantemente sobre amor, paciência, Deus. Aquela com quem sonho, com quem planejo e sempre me apoia sempre. Muito obrigado por tudo.

À minha família, em especial às minhas tias-mães Fátima, Cláudia e Odiléia, meu pai Clarivaldo e à minha irmãzinha Sophya. Muito do que hoje sou foi por causa da ajuda de vocês. Vocês são a minha base, meu suporte, minha casa. O que tenho hoje devo a vocês.

Às pessoas com quem estive morando ao longo do meu tempo de mestrado: Rives Lopes, Lorena Santos e Roseane Cordovil, muito obrigado pelo apoio e ajuda.

Aos amigos de laboratório, os quais fazem do meu ambiente de trabalho ser divertido e menos estressante: Nadyme Assad, Nayara Kauffmann, Tati Nascimento, Brenda Ataíde, Diego Rodrigues, Analu Maciel e Marjorie Torres.

Na vida, tive a sorte de ser adotado por muitas mães. Na universidade, não foi diferente. Agradeço a Ana Paula Araújo e Tayana Carvalho por sempre estarem comigo e me apoiarem e me ouvirem em absolutamente tudo, principalmente ao longo do meu mestrado. Muito obrigado por tudo.

Agradeço também aos meus colegas de laboratório, em especial meu grupo de pesquisa, o grupo “do peixe”, Nadyme Assad, Mateus Santos, Patrick Cardoso e Emerson Feio. Obrigado pelas discussões científicas e apoios.

Agradeço aos professores do Laboratório de Neurofarmacologia Experimental, Adelaide Passos, Evander Batista e, em especial, à Prof Dra Karen Renata, a qual muito admiro e sempre me aconselha a nunca desistir e sempre ter foco.

Agradeço ao meu orientador, Prof Dr Anderson Manoel Herculano, o qual é bem mais que um orientador, mas também um pai que a vida me deu. Muito obrigado pelo apoio, confiança, suporte, ensinamentos, brigas e correções. Registro aqui minha gratidão por tudo que o senhor fez e faz por mim.

Ao CNPq e CAPES pelo apoio financeiro.

Ao Programa de Pós-graduação em Neurociências e Biologia Celular.

Muito obrigado a todos!

“A ansiedade é o resultado natural de centralizarmos nossas esperanças em qualquer coisa menor do que Deus e Sua vontade para nós.”

Billy Graham

RESUMO

O comportamento tipo ansiedade pode ser definido como um estado de apreensão, onde o perigo é iminente, podendo ocorrer a partir da exposição a ambientes novos ou a estímulos aversivos incontroláveis. Muitos sistemas de neurotransmissão podem estar envolvidos na modulação dos estados de ansiedade em mamíferos assim como em teleósteos. Dentre estes, os sistemas GABAérgico e glutamatérgico, apresentam-se como as principais vias de modulação do comportamento tipo ansiedade. Assim, o presente trabalho tem por objetivo avaliar os níveis extracelulares de GABA e glutamato ao longo do processo de geração da ansiedade nos testes de Preferência Claro/Escuro (PCE) e Distribuição Vertical Elicida pela Novidade (DVN) em *Danio rerio*. Foram utilizados 60 animais da espécie *Danio rerio* (selvagem, *longfinn*), os quais foram expostos aos Testes PCE e DVN nos tempos 5, 10 e 15 min. Os parâmetros analisados para o PCE foram: tempo no compartimento claro, número de quadrantes cruzados no compartimento claro e cruzamentos entre os compartimentos; para o DVN, os parâmetros foram: Tempo na região superior do aquário, número de quadrantes cruzados, entradas no topo, velocidade máxima, velocidade média e Distância total percorrida. Em seguida, os cérebros foram dissecados e incubados com Hank/Na⁺ para quantificação de GABA e Glutamato por Cromatografia Líquida de Alta Eficácia (CLAE). Todos os testes foram filmados e os vídeos avaliados utilizando o software Zebtrack. Foi aplicado o teste ANOVA de uma via com pós-teste *Tukey*, considerando significativos valores com $p < 0,05$. Os dados foram expressos em média \pm erro padrão e todos os experimentos foram previamente aprovados pelo comitê de ética local (CEPAE UFPA 213-14). Nossos resultados demonstram exploração do compartimento claro no teste PCE, sem diferença entre os tempos ($F_{[3, 20]} = 17.10$) e sem alteração entre número de cruzamentos entre os minutos 5, e 10 ($F_{[3, 20]} = 6.28$; $p < 0.05$). Há aumento do número de cruzamento entre os quadrantes no tempo de 15 minutos em relação aos demais tempos de exploração ($F_{[3, 20]} = 6.28$; $p < 0.05$). Além disso, há aumento de conteúdo extracelular de glutamato no decorrer do teste ($F_{[4, 10]} = 8.98$) e diminuição de GABA nos últimos minutos em comparação aos animais não expostos ao teste ($F_{[4, 9]} = 20.83$; $p < 0.05$). Os padrões comportamentais dos animais expostos ao teste DVN também variam de acordo com o tempo de exposição, onde, conforme há aumento do tempo, há aumento do tempo de exploração do topo ($F_{[3, 28]} = 15.99$; $p < 0.01$), aumento do número de transições para o topo ($F_{[3, 22]} = 16.86$ $p < 0.05$), aumento do número de quadrantes cruzados ($F_{[3, 21]} = 38.70$; $p < 0.01$), aumento da distância total percorrida ($F_{[3, 27]} = 61.44$; $p < 0.01$), sem alteração das velocidades máximas ($F_{[3, 28]} = 19.73$; $p < 0.01$) e média em todos os tempos. Os níveis de glutamato aumentam na exposição ao teste ($F_{[4, 10]} = 24.62$) e os níveis de GABA permanecem inalterados ($F_{[4, 9]} = 1.76$). Concluimos, assim, que os sistemas glutamatérgicos e gabaérgicos modulam de maneira diferente o comportamento tipo ansiedade em *Danio rerio*.

Palavras-chave: comportamento tipo ansiedade, zebrafish, sistema glutamatérgico, sistema GABAérgico, Cromatografia Líquida de Alta Eficácia

ABSTRACT

TEMPORAL VARIATION OF GLUTAMATE AND GABA LEVELS IN *Danio rerio* (ZEBRAFISH) BRAIN SUBMITTED AT ANSIOGENIC ENVIRONMENTS

Anxiety-like behavior can be defined as a state of apprehension where the danger is imminent and may occur from exposure to new environments or uncontrollable aversive stimuli. Many neurotransmission systems may be involved in the modulation of anxiety states in mammals as well as in teleosts. Among these, the GABAergic and glutamatergic systems are the main modulation pathways of anxiety-like behavior. Therefore, the present work aims to evaluate the extracellular levels of GABA and glutamate throughout the process of anxiety generation in *Danio rerio* exposed in Dark/light Preference (DLP) and Novel Tank (NT) tests. Sixty animals (*Danio rerio*, (wild type, longfinn) were used, which were exposed to DLP and NT at times 5, 10 and 15 minutes. The parameters analyzed for DLP were: time in the white compartment, number of quadrants crossed in the white compartment and transitions between compartments; for the NT, the parameters were: Time in the upper half, number of squares crossed, entrances at the top, maximum speed, average speed and total distance traveled. Then, the brains were dissected and incubated with Hank/Na⁺ for further quantification of GABA and Glutamate by High Performance Liquid Chromatography (HPLC). All tests were filmed and videos evaluated using Zebtrack software. One-way ANOVA test with Tukey post-test was applied, considering significant values $p < 0.05$. Data were expressed as mean \pm standard error mean and all experiments were previously approved by the local ethics committee (CEPAE UFPA 213-14). Our results demonstrate exploration of the white compartment in the LDT test, with no difference between the times ($F [3, 20] = 17.10$) and no change in the number of midline crossings between the compartments between minutes 5 and 10 ($F [3, 20] = 6.28$, $p < 0.05$). There was an increase in the number of squares crossed in the time of 15 minutes in relation to the other exploration times ($F [3, 20] = 13.04$, $p < 0.03$). In addition, there was an increase in extracellular glutamate content during the test ($F [4, 10] = 8.98$) and decrease of GABA in the last minutes compared to animals not exposed to the test ($F [4, 9] = 20.83$; < 0.05). The behavioral patterns of the animals exposed to the NT test also vary according to the time of exposure, where, as time increases, there is an increase in the time of the top exploration ($F [3, 28] = 15.99$, $p < 0.01$), ($F [3, 22] = 16.86$ $p < 0.05$), increase in the number of squares crossed ($F [3, 21] = 38.70$, $p < 0.01$), increase in the total distance traveled [$3, 27] = 61.44$, $p < 0.01$), with no change in maximum speed ($F [3, 28] = 19.73$, $p < 0.01$) and mean speed at all times. Glutamate levels increase on exposure to the test ($F [4, 10] = 24.62$) and GABA levels remain unchanged ($F [4, 9] = 1.76$). We conclude, therefore, that glutamatergic and gabaergic systems modulate the anxiety-like behavior in *Danio rerio* differently.

Key words: anxiety-like behavior, GABAergic system, glutamatergic system, High Performance Liquid Chromatography

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1:** Esquema hipotético que demonstra a atividade e função sináptica geral dos receptores e transportadores dos sistemas GABAérgico e glutamatérgico. Adaptado de SWANSON *et al.*, 2005.....23
- Figura 2:** Representação esquemática do teste de Preferência Claro/Escuro.....37
- Figura 3:** Representação esquemática do teste de Distribuição Vertical Eliciada pela Novidade.....40
- Figura 4: Parâmetros de avaliação do comportamento tipo ansiedade dos animais expostos aos tempos de 5, 10 e 15 minutos no teste de Preferência Claro/Escuro.** (A) Tempo gasto pelo animal no compartimento branco, (B) cruzamentos entre os compartimentos, (C) número de quadrantes cruzados, (D) % de tempo de tigmotaxia, (E) número de episódios de nado errático, (F) % de episódios de congelamento. ANOVA com pós-teste Tukey, sendo os dados expressos em média±erro padrão da média.....45
- Figura 5: Parâmetros de avaliação do comportamento tipo ansiedade dos animais expostos aos tempos de 5, 10 e 15 minutos no teste de Distribuição Vertical eliciada pela Novidade.** (A) Tempo gasto pelo animal no topo, (B) Número de entradas na região superior do aparato, (C) Distância total percorrida, (D) Quadrantes cruzados, (E) velocidade máxima, (F) velocidade média. ANOVA com pós-teste Tukey, sendo os dados expressos em média±erro padrão da média.....47

Figura 6: Níveis extracelulares de (A) Glutamato e (B) GABA no encéfalo do *D. rerio* de animais apenas manuseados (0) e expostos pelos tempos de 5, 10 e 15 minutos no teste de Preferência Claro/Escuro. ANOVA de uma via com pós-teste *Tukey*, sendo os dados expressos em média \pm desvio padrão da média. * = $p > 0.05$ vs 0 min.....49

Figura 7: Níveis extracelulares de (A) Glutamato e (B) GABA no encéfalo do *D. rerio* de animais apenas manuseados (0) e expostos pelos tempos de 5, 10 e 15 minutos no teste de Distribuição Vertical Elicida pela Novidade. ANOVA de uma via com pós-teste *Tukey*, sendo os dados expressos em média \pm desvio padrão da média. Letras iguais = $p > 0.05$, letras diferentes = $p < 0.05$51

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AMPA	Ácido α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazole propriônico
ANOVA	Análise de Variância
BSA	Albumina sérica bovina
cAMP	Monofosfato de adenosina cíclica intracelular
CEPAE	Comitê de Ética em Pesquisa com Animais de Experimentação da Universidade Federal do Pará
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficácia
CPP	Ácido 3-(2-carboxipiperazin-4-il)-propil-1-fosfónico
DAG	Diacilglicerol
DI	Telencéfalo dorsal
Dm	Telencéfalo medial
DVN	Distribuição vertical eliciada pela novidade
EAAT	Transportadores de aminoácidos excitatórios
GABA	Ácido γ -aminobutírico
GABA-T	GABA-transaminase
GAD	Ácido glutâmico descarboxilase
GAT	Transportadores de GABA específicos
Gi	Proteínas G inibitórias
GLAST	Transportador de glutamato e aspartato glial
HPA	Eixo hipotálamo-pituitário-adrenal
HPI	Eixo Hipotalâmico-Pituitário-Interrinal
IP3	Inositol-1,4,5-trifosfato
mGluR	Receptores metabotrópicos de glutamato
NMDA	N-methyl-D-aspartato
OPA	Orto-ftaldeído
PBS	Tampão fosfato salina
PCE	Teste de Preferência Claro/Escuro

PKA	Proteína cinase A
PKC	Proteína cinase C
SNC	Sistema nervoso central
TCA	Ácido tricloroacético
VGAT	Transportador vesicular do GABA
VGLUT	Transportadores vesiculares de glutamato

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	17
1.1 ANSIEDADE: CONSIDERAÇÕES GERAIS	17
1.2 NEUROQUÍMICA DO SISTEMA GABAérgio E O COMPORTAMENTO TIPO ANSIEDADE	19
1.3 NEUROQUÍMICA DO SISTEMA GLUTAMATÉRGICO E O COMPORTAMENTO TIPO ANSIEDADE	24
1.4 O <i>Danio rerio</i> COMO MODELO PARA ESTUDO DO COMPORTAMENTO TIPO ANSIEDADE	28
1.5 TESTES COMPORTAMENTAIS PARA AVALIAÇÃO DO COMPORTAMENTO TIPO ANSIEDADE NO <i>D. rerio</i>	31
1.5.1 O teste de Preferência Claro/Escuro	31
1.5.2 O teste de Distribuição Vertical Eliciada pela Novidade	32
2. OBJETIVO	34
2.1 OBJETIVO GERAL	34
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	34
3. MATERIAL E MÉTODOS	35
4. ANIMAIS E ALOJAMENTO	35
4.2 TESTE DE PREFERÊNCIA CLARO/ESCURO (PCE).....	35
4.3 DISTRIBUIÇÃO VERTICAL ELICIADA PELA NOVIDADE (DVN)	38
4.4 PREPARO DAS AMOSTRAS	41
4.5 QUANTIFICAÇÃO DE GABA E GLUTAMATO POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICÁCIA (CLAE)	41
3.6.1 Condições cromatográficas	42
4.6 QUANTIFICAÇÃO DE PROTEÍNA	43
4.7 ANÁLISES ESTATÍSTICAS	43
5. RESULTADOS	44
5.1 PADRÃO COMPORTAMENTAL DOS ANIMAIS EXPOSTOS AO TESTE DE PREFERÊNCIA CLARO/ESCURO	44
5.2 PADRÃO COMPORTAMENTAL DOS ANIMAIS EXPOSTOS AO TESTE DE DISTRIBUIÇÃO VERTICAL ELICIADA PELA NOVIDADE	46
4.3 NÍVEIS EXTRACELULARES DE GLUTAMATO E GABA DO ENCÉFALO DO <i>D. rerio</i>	48

4.3.1 Níveis extracelulares de GABA assim como os níveis de Glutamato variam de acordo com o tempo de exposição ao Teste PCE	48
4.3.2 Níveis extracelulares de Glutamato, mas não de GABA, variam de acordo com o tempo de exposição ao Teste DVN	50
6. DISCUSSÃO	52
7. CONCLUSÃO.....	58
8. REFERÊNCIAS	59

1. INTRODUÇÃO

1.1 ANSIEDADE: CONSIDERAÇÕES GERAIS

Os distúrbios de ansiedade e estresse juntos constituem o maior grupo de transtornos mentais observados nas sociedades ocidentais (WITTCHEN *et al.*, 2011; HARO *et al.*, 2014; CHRISTOPHER *et al.*, 2016). De acordo com a 5ª edição do Manual de Diagnóstico e Estatístico de Transtornos Mentais (DSM-5), esta classe de desordens inclui o transtorno do pânico, fobia específica, transtorno de ansiedade social, transtorno do estresse pós-traumático e distúrbio de ansiedade generalizada (American Psychiatric Association, 2013).

As características essenciais dos transtornos de ansiedade são excessivas sensações de preocupação, esquiva de ameaças percebidas, seja no ambiente externo (por exemplo, situações sociais) ou interno (por exemplo, sensações corporais). Os comportamentos de esquiva são características que podem variar de uma recusa para entrar em certas situações para uma sutil confiança em objetos ou lidar com pessoas (CRASKE, 2017; BEESDO, 2010).

Atualmente, estima-se que 264 milhões de pessoas apresentam sinais clínicos de ansiedade em todo o mundo, uma média de 3,6%, representando uma alta de 15% em comparação a 2005. No Brasil, 23,93% da população apresenta algum distúrbio de ansiedade, caracterizando o país com maior taxa no mundo (OMS, 2017). Apesar de muitos fatores aparecerem em sua gênese, entre eles culturais e estilos de vida do século XXI (GLAS, 2003; PESSOTI, 1978; TONE 2008), o entendimento da neurobiologia da ansiedade

também se apresenta como um importante papel para avaliação destes transtornos (CRASKE, 2017).

Dentre os diversos sistemas fisiológicos que modulam as repostas comportamentais normais e patológicas da ansiedade, destacam-se principalmente o eixo hipotálamo-pituitário-adrenal (HPA). Este componente regula respostas neuroendócrinas frente a estressores físicos e psicossociais. Estudos demonstram a ativação do eixo HPA em modelos de estresse pós-traumático, onde é visto baixos níveis de cortisol e hipersensibilidade a glicocorticoides (ROOZENDAAL *et al.*, 2009; DASKALAKIS *et al.*, 2016).

Além do eixo HPA, mecanismos neuroquímicos específicos parecem estar envolvidos na modulação dos estados de ansiedade. Dentre eles, os sistemas serotoninérgico e noradrenérgico têm sido descritos como sistemas que estão intimamente relacionados à sua modulação no sistema nervoso central (SNC) (SANDFORD, 2000; MILLAN, 2003). A literatura também aponta que os sistemas GABAérgico e glutamatérgico como protagonistas da regulação da ansiedade, produzindo tanto efeitos ansiolíticos (HINDERER, 1990) quanto ansiogênicos (WALLMICHRATH, SZABO, 2002).

Entretanto, ainda não é esclarecido como ocorre as variações endógenas de GABA e Glutamato no cérebro frente ao estímulo ansiogênico.

1.2 NEUROQUÍMICA DO SISTEMA GABAérgico E O COMPORTAMENTO TIPO ANSIEDADE

O ácido γ -aminobutírico (GABA) é um aminoácido que atua como principal neurotransmissor inibitório no SNC (DUDEL, 1963; ROBERTS, KURIYAMA, 1968). Sua síntese é mediada pela enzima ácido glutâmico descarboxilase (GAD), a qual catalisa a descarboxilação do glutamato e o transforma em GABA em terminações nervosas GABAérgicas (KAUFMAN, 1991). Uma vez sintetizado, ele é então estocado em vesículas sinápticas em função da atividade do transportador vesicular do GABA (VGAT), podendo assim ser liberado na fenda sináptica (CHAUDHRY, 1998).

O término da ação do GABA na sinapse depende de sua remoção do espaço extracelular. Os neurônios e a glia captam o GABA através de transportadores de GABA específicos (GAT). No interior das células, a enzima mitocondrial amplamente distribuída, a GABA-transaminase (GABA-T), catalisa a conversão do GABA em semi-aldeído succínico (SSA), que é oxidado a ácido succínico pela SSA desidrogenase, entrando, a seguir, no ciclo de Krebs, onde é transformado em α -cetoglutarato (NUTT & MALIZIA, 2001).

As ações do GABA são mediadas pela ativação de seus receptores, os quais se apresentam tanto sob a forma ionotrópica (GABA_A e GABA_C) quanto metabotrópica (GABA_B) (KALUEFF & NUTT, 2007).

Os receptores GABA_A são os receptores ionotrópicos mais abundantes do GABA no SNC e, quando ativados, inibem neurônios de gerarem novos potenciais de ação e são cruciais para controle da excitabilidade no SNC (KORPI, 2002; CHANG, 2003). Eles consistem em

proteínas de membrana que formam um poro iônico central seletivo para o cloreto de múltiplas subunidades que, quando ativados pela ligação do GABA, abrem-se e permitem o influxo do íon cloreto. Além do GABA, eles contém sítios de ligação para diversos agonistas, tais como barbitúricos, benzodiazepinas, esteroides e etanol (SIEGHART, 1999; KORPI, 2002; OLSEN, 2004).

Os receptores de GABA metabotrópicos (GABA_B) são receptores acoplados à proteína G e afetam as correntes iônicas neuronais através de segundos mensageiros. Eles são formados a partir de duas subunidades, GABA_{B1} e GABA_{B2}, cada uma com sete elementos transmembranas que se unem para formar heterodímeros em que ambas as subunidades são necessárias para que o receptor seja funcional (MOMBEREAU, 2004). Os receptores GABA_B são encontrados tanto em terminações pré-sinápticas quanto regiões pós sinápticas (MIHALEK, 1999).

Os receptores GABA_A, GABA_B e GABA_C estão envolvidos em diversas regulações e mecanismos fisiológicos, assim como patológicos, incluindo sono, memória, epilepsia e tem sido considerado central para a regulação dos estados de ansiedade (KALUEFF & NUTT, 1996; KALUEFF, 1997; MIHALEK, 1999; ENRICH *et al.*, 1980; LLOYD *et al.*, 1985).

O uso da benzodiazepinas, um agonistas do receptor GABA_A, é amplamente usado na clínica para a modulação dos estados de ansiedade (Nishimura *et al.*, 1989, 1992; Bourin *et al.*, 1991). Sua administração provoca efeito ansiolítico em diversos modelos animais (NUTT & MALIZIA, 2001;

BALLENGER, 1990). Tal efeito é possível devido sua alta ligação ao receptor GABA_A, promovendo aumento de afinidade ao GABA (BALLENGER, 1998).

A administração do baclofeno, agonista do receptor GABA_B, revelou efeitos ansiolíticas em roedores (FILE, 1991, SHEPHARD, 1992), porém foi considerado ineficaz em outros estudos (UMEZU, 1999; DALVI E RODGERS, 1996; ZARRINDAST, 2001). Tal variabilidade de resultados pode ser explicada, por exemplo, pela dose utilizada e modelo animal. No geral, dependendo da dose administrada, moduladores alostéricos do receptor GABA_B geram efeitos ansiolíticos (FROESTL, 2011).

A inibição da enzima GAD65 e GAD67 provoca diminuição dos níveis de GABA (CHAO *et al.*, 2010). Assim, é demonstrado em roedores um aumento a suscetibilidade ao estresse, assim como convulsão (QI *et al.*, 2018). Além disso, a inibição da GAD65 diminui a respostas a drogas ansiolíticas, prejudica o aprendizado e também induz o comportamento tipo ansiedade (KASH *et al.*, 1999; CHAO *et al.*, 2010). Estudos recentes demonstram a relação do polimorfismo da GAD65 e inibição do comportamento tipo ansiedade em crianças (SMOLLER *et al.*, 2001), enquanto que os níveis de GAD65 e GAD67 no córtex pré frontal e cerebelo de pacientes com depressão estão diminuídos (GUIDOTTI *et al.*, 2000; FATEMI *et al.*, 2005).

Os inibidores da enzima GABA-T elevam os níveis de GABA, o que consequentemente aumentou comportamentos exploratórios e sociais em roedores (SHERIF & ORELAND, 1995), assim como exercem efeitos anti-depressivos (ROGAWSKI & LOSCHER, 2004; GAJWANI *et al.*, 2005, ZWANZGER & RUPPRECHT, 2005). Tais resultados podem ser assim

observados pois há considerável aumento dos níveis de GABA (LANG & DE ANGELIS, 2003).

A administração de inibidores de GAT-1 aumentam os níveis de GABA e exercem efeitos ansiolíticos em roedores (DALVI & RODGERS, 1996; SCHMITT & HIEMKE, 1999) e também em humanos (CRANE, 2003; SCHALLER *et al.*, 2004; CONNOR *et al.*, 2006). A tiagabina, por exemplo, casou ansiólise durante o tratamento combinado de vários distúrbios de ansiedade (ZWANZGER & RUPPRECHT, 2005). Da mesma forma, a tiagabina também pode ser usada como estabilizadores do humor, indicando sua utilidade em terapia para desordens da depressão via modulação GABAérgica. (KAUFMAN, 1998; SCHAFFER *et al.*, 2002; SCHWARTZ, 2002).

A exposição ao estresse agudo, a qual geralmente é utilizada para eliciar ansiedade, mostrou ação em vias GABAérgicas nas áreas do prosencéfalo, incluindo o hipotálamo dorsomedial e o hipocampo (HERMAN, 2003). Além disso, dependendo do tipo de modelo de estresse, há alteração estrutural de sítios alostéricos dos receptores GABAérgicos, tais como os sítios para ligação de benzodiazepinas, onde pode haver aumento (BRAESTRUP *et al.*, 1979) assim como diminuição de afinidade de ligação (MOTOHASHI *et al.*, 1993).

Apesar da importância dos estudos que avaliam o papel do sistema GABAérgico na modulação do comportamento tipo ansiedade, ainda faz-se necessário estudos que possam avaliar como tal sistema está regulando a gênese deste comportamento, assim como elucidar os possíveis mecanismos e

relações com outros sistemas de neurotransmissão, como o sistema glutamatérgico (figura 1).

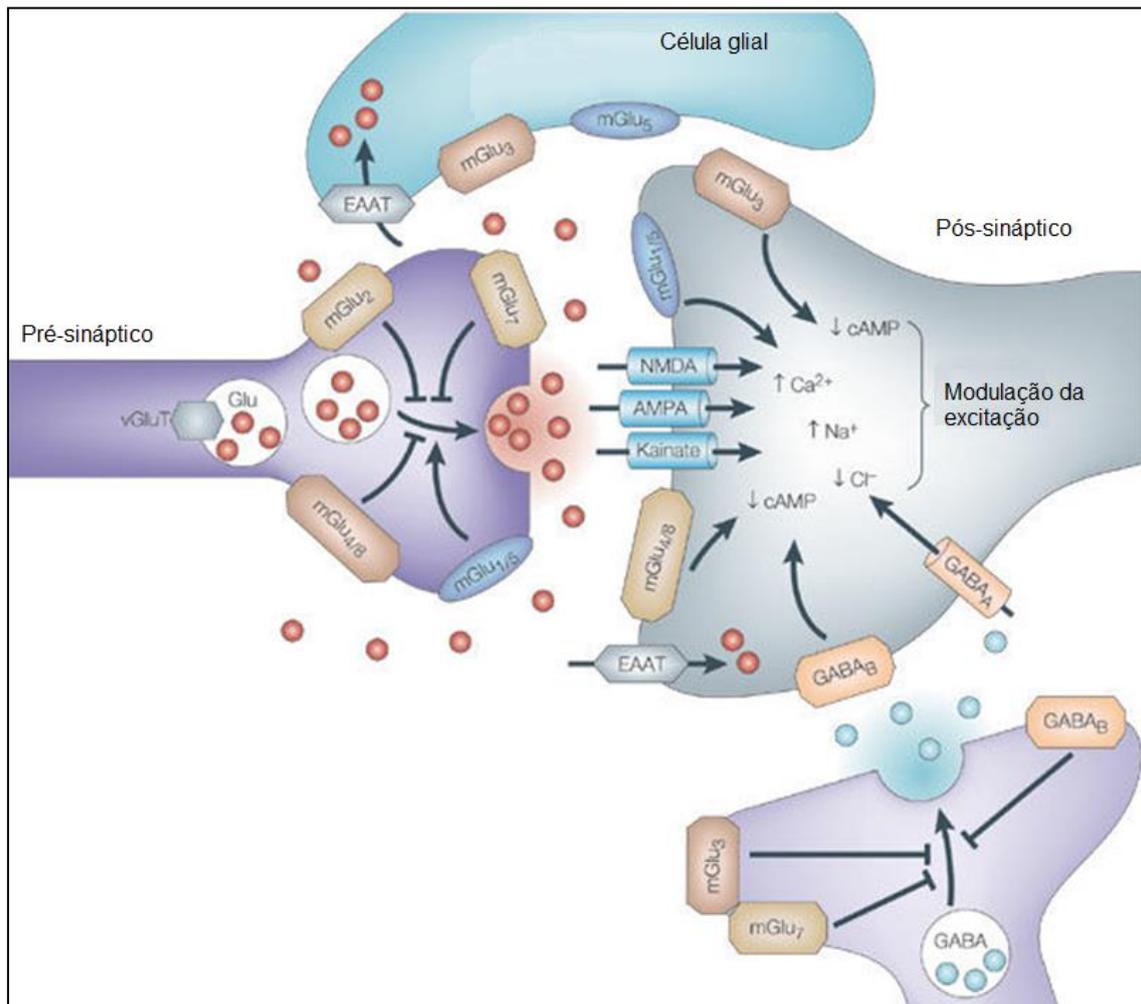


Figura 1: Esquema hipotético que demonstra a atividade e função sináptica geral dos receptores e transportadores dos sistemas GABAérgico e glutamatérgico. Adaptado de SWANSON *et al.*, 2005.

1.3 NEUROQUÍMICA DO SISTEMA GLUTAMATÉRGICO E O COMPORTAMENTO TIPO ANSIEDADE

O sistema de neurotransmissão glutamatérgico é o principal sistema de neurotransmissão excitatório no SNC e é essencial para diversos mecanismos fisiológicos e fisiopatológicos, incluindo o desenvolvimento de uma sensação aumentada de dor (hiperalgesia), neurotoxicidade cerebral e alterações sinápticas envolvidas em certos tipos de formação da memória no hipocampo. (HAYASHI 1952; CURTIS, WATKINS 1960).

A síntese do glutamato ocorre através de duas vias diferentes: em uma dessas, o α -cetoglutarato formado no ciclo de Krebs é convertido em glutamato em terminações nervosas do SNC. Alternativamente, a glutamina produzida e secretada pelas células da glia é transportada nas terminações nervosas e convertida em glutamato pela enzima glutaminase (PELLERIN & MAGISTRETTI, 2004).

Uma vez sintetizado, ele é empacotado em vesículas sinápticas, os transportadores vesiculares de glutamato (VGLUT) (TAKAMORI, 2006) e liberado na fenda sináptica por um processo dependente de Ca^{+2} . O glutamato é removido da fenda sináptica por transportadores de aminoácidos excitatórios (EAATs), os quais estão localizados nas terminações nervosas pré-sinápticas e nas membranas plasmáticas das células gliais, sendo estes conhecidos como transportador de glutamato e aspartato (GLAST) (SEAL & AMARA, 1999). Tais proteínas transportadoras são dependentes de Na^{+} e possuem alta afinidade pelo glutamato (LEVY, 1998). Em células gliais, a enzima glutamina sintetase converte o glutamato em glutamina, a qual é reciclada em terminações nervosas adjacentes para nova

conversão em glutamato. A glutamina gerada nas células gliais também pode entrar no ciclo de Krebs e sofre oxidação; o α -cetogluturato resultante é captado pelos neurônios para repor o α -cetogluturato consumido durante a síntese de glutamato e reiniciar, então, uma nova síntese do glutamato (ERECINSKA, SILVER, 1990).

Assim como todo neurotransmissor, para efetivar suas ações, o glutamato demanda receptores, os quais se apresentam sob as formas ionotrópicas e metabotrópica (OLSEN & SIEGHART, 2008).

Os receptores ionotrópicos foram identificados e nomeados de acordo com a seletividade de seu agonista: N-methyl-D-aspartato (NMDA), ácido α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazole propriônico (AMPA) e ácido caínico ou cainato (KA) (NICIU, 2011).

Já os receptores metabotrópicos de glutamato (mGluR), diferentemente dos receptores inotrópico, são receptores transmembranares de 7 passos, com domínios extracelulares, onde ocorre a ligação com o agonista e domínios intracelulares, onde encontra-se acoplada a proteína G. Os receptores metabotrópicos de glutamato foram então identificados e subdivididos em três grupos funcionais com base na homologia da sequência de seus aminoácidos, ligação agonista e segundo mensageiro ativado na cascata de transdução de sinal (CONN & PIN, 1997; KIM, 2008).

Os receptores metabotrópicos de glutamato do grupo I consistem em mGluR1 e mGluR5. Eles provocam seus efeitos por dois mecanismos: (1) fosfolipase C via inositol-1,4,5-trifosfato (IP3) para liberação Ca^{+2} de estocamento intracelulares e (2) diacilglicerol (DAG) para estimular a proteína

cinase C (PKC) via proteína Gq. Os grupos II (mGluR2 e mGluR3) e III (mGluR4-8) são acoplados a proteínas G inibitórias (Gi), as quais diminuem o monofosfato de adenosina cíclica intracelular (cAMP) por inibição da via adenilil ciclase/proteína cinase A (PKA) (CONN & PIN, 1997).

O sistema glutamatérgico é conhecido por desempenhar um papel importante na cognição, como em testes para avaliação de aprendizagem e aquisição de memória (MAREN, 1996; LEDOUX, 1994). Além disso, agonistas e antagonistas dos receptores glutamatérgicos têm sido utilizados em modelos animais para estudo de modelos de ansiedade (BERGINK *et al.*, 2004).

Fármacos que tem como alvo os mGluRs são agentes promissores para o tratamento de distúrbios relacionados à ansiedade (KRYSTAL *et al.*, 2010). Estudos utilizando moduladores alostéricos negativos de mGluR5, MPEP demonstraram efeito ansiolítico em modelos animais de ansiedade (KLODZINSKA *et al.*, 2000 ; KLODZINSKA *et al.*, 2004; PALUCHA & PILC, 2007; RITZEN *et al.*, 2005; WIERONSKA & PILC, 2009). Além disso, também tem sido reportado que o uso de alostéricos negativos do receptor mGluR7, como o AMN082, também resultam em diminuição da ansiedade (FENDT *et al.*, 2008; JULIO-PIEPER *et al.*, 2010; O'CONNOR *et al.*, 2010; SIEGL *et al.*, 2008).

Os receptores AMPA e cainato também demonstram ter atividade na modulação da ansiedade. Enquanto injeções de agonista do receptor de AMPA/Cainato na porção dorsal do PAG levam ao aumento no sobressalto potenciado pelo medo (FENDT, 2000), os antagonistas de AMPAR demonstram ter atividade ansiogênica em estudos de paradigmas não

condicionados e condicionados (KAPUS *et al.*, 2008, KOTLINSKA & LILJEQUIST, 1998, MATHEUS & GUIMARAES, 1997, MENARD TREIT, 2000; SAJDYK & SHEKHAR, 1997).

Muitos estudos que avaliam o efeito do uso de antagonistas do receptor NMDA na modulação do comportamento tipo ansiedade têm sido realizados. O ácido 3-(2-carboxipiperazin-4-il)-propil-1-fosfónico (CPP), por exemplo, aumentou a interação social e o tempo gasto nos braços abertos do labirinto em cruz elevado em modelo murino, o que pode ser interpretado como redução da ansiedade (CORBETT & DUNN, 1993; DUNN *et al.*, 1989). Além disso, o bloqueio farmacológico deste receptor especificamente na amígdala interrompe a aquisição do condicionamento do medo assim como causa ansiólise (MISERANDINO *et al.*, 1990).

Injeções de AP5, outro antagonista de NMDA, também apresentaram efeitos ansiolíticos em testes de ansiedade condicionada (CAMPEAU *et al.*, 1992; FENDT *et al.*, 1996; LEHMANN *et al.*, 2000). Porém, tais resultados só puderam ser reproduzidos quando as injeções foram realizadas diretamente no hipocampo ventral (NASCIMENTO HACKL & CAROBREZ, 2007), pois no hipocampo dorsal podem não apresentou efeito significativo (BARROS *et al.*, 2000 NASCIMENTO HACKL E CAROBREZ, 2007).

Várias evidências sugerem que a neurotransmissão glutamatérgica límbica desempenha um papel fundamental na patogênese dos transtornos de ansiedade (BERGINK *et al.*, 2004; GARAKANI *et al.*, 2006; MILLAN, 2003; VAQUERO-LORENZO *et al.*, 2008). Estudos demonstram que o estresse

agudo aumenta a liberação de glutamato na amígdala em modelo murino e também em humanos (REZNIKOV *et al.*, 2007; ZHANG *et al.*, 2011; MODI *et al.*, 2014). Além disso, a baixos níveis de glutamato por meio de sua receptação na habenula lateral impede a geração do comportamento tipo ansiedade e também de transtornos depressivos (KANG, LI, JIANG-HONG, 2017).

Apesar de todas essas ressalvas, testes utilizando modelos animais de transtornos de ansiedade provam ser cruciais para as pesquisas biomédicas, incluindo testes rápidos de alto débito de drogas ansiolíticas e antidepressivas (FLINT, 2003; WONG & LICINIO, 2004), testando hipóteses neurobiológicas (GEYER & MARKOU, 1995). Portanto, a compreensão dos potenciais benefícios do uso de modelos animais pode nos permitir a obtenção de dados de experimentação válidos para paralelizar e/ou complementar os achados experimentais já disponíveis, levando a novos entendimentos e correlatos neuroquímicos e comportamentais.

1.4 O *Danio rerio* COMO MODELO PARA ESTUDO DO COMPORTAMENTO TIPO ANSIEDADE

O *Danio rerio* (popularmente conhecido como zebrafish, ou no Brasil conhecido como paulistinha) é um pequeno peixe ciprinídeo tropical de água doce, proveniente da Índia e do sudeste asiático (SUBBIAH E KAR, 2013). O crescente interesse pelo uso desse animal como modelo experimental em diversas pesquisas está no seu rápido desenvolvimento, fácil manutenção em laboratório e elevada produção de ovos que são transparentes e permitem

manipulações farmacológicas desde os estágios iniciais do desenvolvimento. O ciclo reprodutivo desses animais é curto e atingem a maturidade sexual com três semanas de vida (CARVAN, 2000).

O zebrafish tem ganhado destaque no meio científico, sendo utilizado como modelo experimental para estudos farmacológicos (MA, 2017; MAXIMINO, 2011, 2013), genéticos (HU, 2017), toxicológicos (PUTY, 2014) em modelos de ansiedade como o de Preferência de Claro/Escuro (MAXIMINO, 2010; STEWART, 2011) e de Distribuição Vertical Eliciada pela Novidade (WONG, 2010), além também de estudos de aprendizagem, como na esQUIVA inibitória (AMORIN, 2017). Além disso, o paulistinha é um organismo de manutenção econômica e fácil armazenamento se comparado a outros animais usados como modelos experimentais como, por exemplo, mamíferos (MONLEO'N, 2002). Segundo os estudos de Maximino e colaboradores (2011), por ele possuir neurotransmissores clássicos de vertebrados, este modelo animal possui alto rendimento em estudos comportamentais e neuroquímicos, e neuroanatômicos.

Tal afirmativa se dá pelo alto padrão organizacional do SNC dessa espécie e sua homologia com estruturas de mamíferos. Estudos neuroanatômicos, genéticos e evolutivos sugerem que os hemisférios telencefálicos de peixes teleósteos e de vertebrados se desenvolvem de maneira diferente: em teleósteos, ocorre um processo de eversão dos hemisférios, implica reversão da topografia medial a lateral observada no telencéfalo evaginado de outros vertebrados (NIEUWENHUYS, 1962, 1969) (Figura 2). O telencéfalo medial (Dm) e a zona lateral do telencéfalo dorso-lateral (DI) de peixes teleósteos contem estruturas homólogas à amígdala

mamífera e ao hipocampo, respectivamente (NORTHCUTT, 2006; MARTIN, 2011; MUELLER, 2011; MAXIMINO, 2012a).

Além disso, o eixo funcional Hipotalâmico-Pituitário-Interrinal (Eixo HPI) do *D. rerio* apresenta similaridade funcional ao eixo HPA de mamífero (EACHUS, 2017). A respeito de sistemas neuroquímicos de transmissão, tem sido identificados neurotransmissores gabaérgicos, serotoninérgicos, colinérgicos, dopaminérgicos, noradrenérgicos, histaminérgicos, glutamatérgicos, assim como sistemas monoaminérgicos (BARROS, 2008; MAXIMINO, HERCULANO, 2010).

Tendo em vista então todas essas semelhanças e homologias, o zebrafish torna-se útil para estudos translacionais de desordens humanas (EGAN, 2009; CACHAT, 2010). Com isso, o *D. rerio* tem emergido como modelo para estudos do comportamento tipo ansiedade, pois reagem por vias endócrinas e comportamentais aos modelos de estresse e ansiedade, tais como o teste de Preferência Claro/Escuro (PCE) e distribuição vertical eliciada pela novidade (DVN) (MAXIMINO, 2010).

Sabendo disso e diante das evidências científicas reportadas aqui que atestam a confiabilidade na utilização do zebrafish como modelo experimental para o estudo do comportamento tipo ansiedade, o presente trabalho fará uso deste modelo biológico. Ademais, assim como uso dos testes supracitados, os quais são altamente sensíveis a estes comportamentos e que possam vir a responder a ensaios para avaliação comportamental de forma a esclarecer a natureza neuroquímica (MAXIMINO, 2010; STEWART, KALUEFF 2014).

1.5 TESTES COMPORTAMENTAIS PARA AVALIAÇÃO DO COMPORTAMENTO TIPO ANSIEDADE NO *D. rerio*

1.5.1 O teste de Preferência Claro/Escuro

O teste de preferência claro/escuro (PCE) é caracterizado por um comportamento de fototaxia negativa representada por uma preferência pelo escuro (SERRA, 1999). O comportamento neste teste reflete um conflito motivacional intrínseca entre a preferência do animal em áreas de proteção, (sendo, neste caso, o lado escuro) e uma motivação inata para explorar ambientes novos em que ele se encontra (MAXIMINO *et al*, 2010a).

Nesse contexto, a preferência pelo compartimento escuro foi descrito primeiramente por Serra; e colaboradores (1999), que realizaram diversos protocolos experimentais, os quais consistiam em expor os animais de formas diferentes aos ambientes (claro ou escuro), onde se observou que a latência de saída do compartimento escuro para o claro era muito maior que a avaliação inversa. Assim, essa observação indicou a preferência natural do animal pelo compartimento escuro.

As medidas de avaliação produzidas pelo teste de preferência claro/escuro são simples e demonstram que os agentes ansiolíticos aumentam o tempo que o animal explora o compartimento claro em relação ao grupo não tratado, enquanto que os agentes ansiogênicos apresentam efeito oposto (MANSUR, 2014, CHEN, 2015). Neste teste, são estabelecidos etogramas, o qual representa um conjunto de parâmetros que auxiliam na avaliação do comportamento gerado pelo teste, facilitando o delineamento do grau de

motivação e/ou exploração no compartimento branco a partir de manipulações farmacológicas ou manuseios. Tais parâmetros utilizados são: tigmotaxia (exploração nas extremidades do aquário), congelamento (imobilidade corporal), nado errático (nado em *zig-zag*) e avaliação de risco (entradas com menos de um segundo no compartimento branco e retorno sequencial ao compartimento escuro) (MAXIMINO, 2012).

1.5.2 O teste de Distribuição Vertical Eliciada pela Novidade

Outro teste utilizado como modelo de ansiedade em zebrafish é o teste de distribuição vertical eliciada pela novidade (DVN), o qual é baseado na observação de uma tendência do animal em se afastar da superfície (geotaxia), buscando um local considerado seguro no ambiente novo em que ele se encontra (CACHAT, 2010; STEWART, 2010).

Neste teste, o comportamento tipo ansiedade pode ser observado a partir de uma significativa diminuição na exploração na porção superior, acompanhada de uma elevada latência para atingir essa porção, assim como, episódios de congelamento longo, ou elevada frequência de movimentos erráticos. Logo, manipulações farmacológicas ou situações em que o animal evita o topo do aquário e permanece no fundo do aquário indicam efeito ansiogênico e situações que aumentam a exploração na superfície do ambiente indica efeito ansiolítico (EGAN 2009).

Sabendo então que o sistemas GABAérgicos e glutamatérgicos estão intimamente relacionados com a modulação do comportamento tipo ansiedade, ainda não está claro na literatura como tais sistemas de neurotransmissão estão regulando este comportamento durante as respostas

iniciais a estímulos ansiogênicos, como a exposição a ambientes desconhecidos.

2. OBJETIVO

2.1 OBJETIVO GERAL

O presente estudo tem por objetivo avaliar o padrão de liberação dos neurotransmissores GABA e Glutamato no encéfalo do *Danio rerio* ao longo do processo de geração e estabelecimento do comportamento tipo ansiedade induzido pela exposição aos testes de Preferência Claro/Escuro e Distribuição Vertical Eliciada pela Novidade

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Expor o *Danio rerio* nos tempos de 5, 10 e 15 minutos aos testes Preferência Claro/Escuro e Distribuição Vertical Eliciada pela Novidade;
- Avaliar os parâmetros comportamentais utilizados para avaliação do comportamento tipo ansiedade nos determinados tempos acima citados;
- Avaliar os níveis extracelulares de GABA do tecido encefálico do *D. rerio* após exposição aos testes de preferência Claro/Escuro e Distribuição Vertical Eliciado pela Novidade nos tempos de 5, 10 e 15 minutos para correlação com variáveis comportamentais eventualmente observadas nos testes;
- Avaliar os níveis extracelulares de Glutamato do tecido encefálico do *D. rerio* após exposição aos testes de preferência Claro/Escuro e Distribuição Vertical Eliciado pela Novidade nos tempos de 5, 10 e 15 minutos para correlação com variáveis comportamentais eventualmente observadas nos testes.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 ANIMAIS E ALOJAMENTO

Foram utilizados 55 peixes da espécie *Danio rerio*, de sexo indeterminado, do tipo selvagem da linhagem *longfinn* com massa corporal em torno de 300-400 mg, comprados em uma piscicultura de distribuição nacional chamada RS Discus, localizada na cidade de São Paulo, SP. Eles foram mantidos sob condições controladas de alimentação e alojados em local arejado e iluminado (ciclo claro-escuro 14h:10h), cuja densidade do aquário é de 1 animal para cada litro do mesmo por um período de no mínimo 7 dias anteriores ao início dos testes (período de aclimatação). As manutenções dos aquários são realizadas de 15 em 15 dias (dosagens de amônia, nitrito, nitrato, oxigênio e medição do pH) e todas as áreas do aquário estavam iluminadas com a mesma intensidade de luz. Este estudo foi previamente aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Animais de Experimentação da Universidade Federal do Pará (CEPAE) através do processo CEPAE – UFPA: 213-14.

3.2 TESTE DE PREFERÊNCIA CLARO/ESCURO (PCE)

O protocolo utilizado para o estudo foi adaptado de MAXIMINO *et al.* (2010) e ARAÚJO *et al.* (2012). O teste consiste na utilização de uma caixa retangular de acrílico, com comprimentos de 15cmx45cmx10cm dividida em duas partes iguais: um lado preto e outro branco. A caixa possui duas portinholas correspondentes a cada cor da caixa, conectadas por um eixo na parte superior, separando-as num espaço de 10 cm. Tais portinholas delimitam um espaço no centro da caixa, onde o peixe fica confinado por cento e oitenta

segundos (três minutos) que precedem os testes. Esse compartimento foi utilizado no início do teste, para que o animal se habituassem ao aparato, como demonstrado na figura 3 (MAXIMINO, 2010). Após este tempo, a porta é removida e inicia-se o teste, sendo que os animais serão expostos aos tempos de 5, 10 e 15 minutos ao teste. São utilizados como parâmetros de análise:

- 1- **Tempo no compartimento branco do aparato** (comportamento escototático quantificado pelo tempo em porcentagem que o animal permaneceu no compartimento claro);
- 2- **Número de quadrantes cruzados no compartimento claro** (parâmetro utilizado para indicação de atividade locomotora);
- 3- **Tigmotaxia** (percentual tempo que o animal permaneceu explorando a periferia do aparato a uma distância de no máximo 2 cm das paredes do compartimento claro);
- 4- **Congelamento** (tempo em que o animal permaneceu imóvel no compartimento claro do aparato);
- 5- **Nado errático** (número de eventos que o animal apresentou um comportamento natatório em *zig-zag*, com alta velocidade e mudança de direção no compartimento claro);
- 6- **Avaliação de risco** (número de entradas no compartimento claro, seguidas de um retorno imediato ao compartimento escuro em menos de 1 segundo ou como um cruzamento apenas parcial do corpo do animal em direção ao compartimento branco);
- 7- **Cruzamentos entre os compartimentos** (número total de cruzamentos entre os compartimentos claro e escuro do aparato).

Para a análise deste experimento, é utilizado o software X-Plo-Rat 2005.

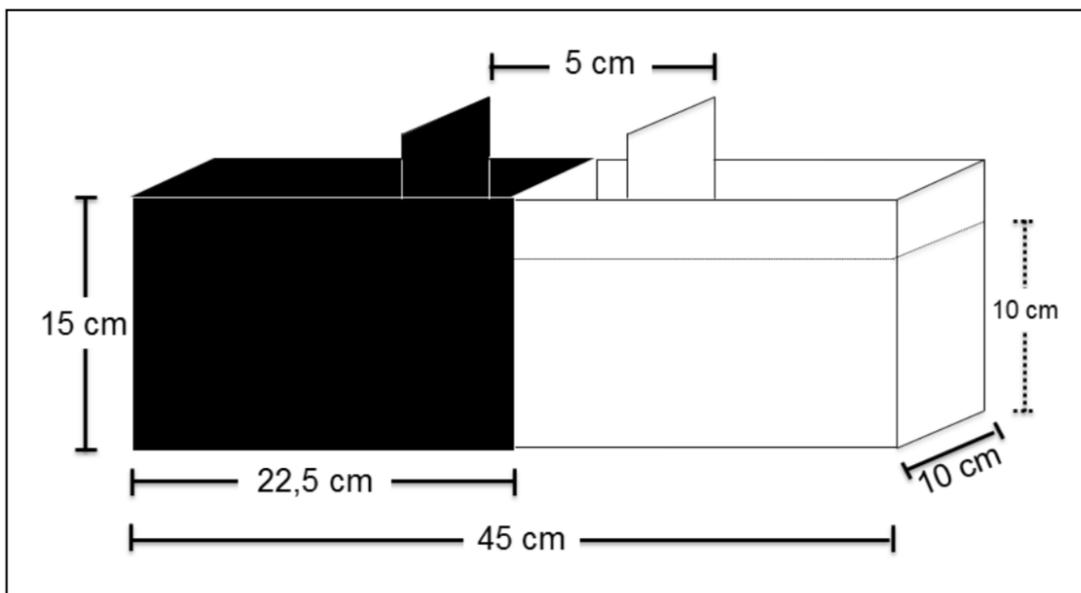


Figura 3: Representação esquemática do teste de Preferência Claro/Escuro.

Adaptado de MAXIMINO, 2010.

3.3 DISTRIBUIÇÃO VERTICAL ELICIADA PELA NOVIDADE (DVN)

O protocolo utilizado para o presente estudo foi modificado de CACHAT e colaboradores (2010). Os animais serão transferidos individualmente para o aquário de teste, o qual consiste em um aquário de 15 x 25 x 20 cm (largura x comprimento x altura), onde o aquário é cheio com água até a sua extremidade. O aquário é dividido igualmente em duas seções de 10 cm de altura cada (topo e fundo) e subdivididos em quadrantes (para avaliação da atividade locomotora), sendo que tais divisões são como linhas de separação marcadas externamente como demonstrado na figura 4. Assim que o animal é transferido para o aparato, o teste será totalmente filmado, onde a filmadora é colocada à frente do aquário para captar a livre exploração em todo o ambiente, registrando, assim, uma distribuição vertical dos peixes. Os parâmetros aqui utilizados são:

- 1- **Tempo na região superior do aquário** (tempo despendido na parte superior do aquário);
- 2- **Número de quadrantes cruzados** (para indicação de atividade locomotora);
- 3- **Nado errático** (quantidade de vezes que o animal apresentou o comportamento natatório em zig-zag com alta velocidade e mudança de direção súbita em todo aparato);
- 4- **Congelamento** (tempo que o animal permanece imóvel no aparato, apenas apresentando comportamentos operculomotores);
- 5- **Entradas no topo** (número total de entradas no compartimento superior do aparato de teste).

- 6- **Tempo no fundo do aparato** (tempo despendido na parte inferior do aquário);
- 7- **Velocidade máxima** (velocidade máxima obtida durante a exploração);
- 8- **Velocidade média** (velocidade média durante a exploração);
- 9- **Distância total percorrida** (distância total percorrida durante a exposição ao aparato).

Os animais foram expostos pelos tempos de 5, 10 e 15 minutos ao teste, tempos esses em que eles tinham livre acesso a todo o aparato. O teste foi inteiramente gravado e posteriormente analisado com o software de análise comportamental de trajeto e exploração ZebTrack desenvolvido na plataforma MATLAB descrito por PINHEIRO-DA-SILVA e colaboradores (2011).

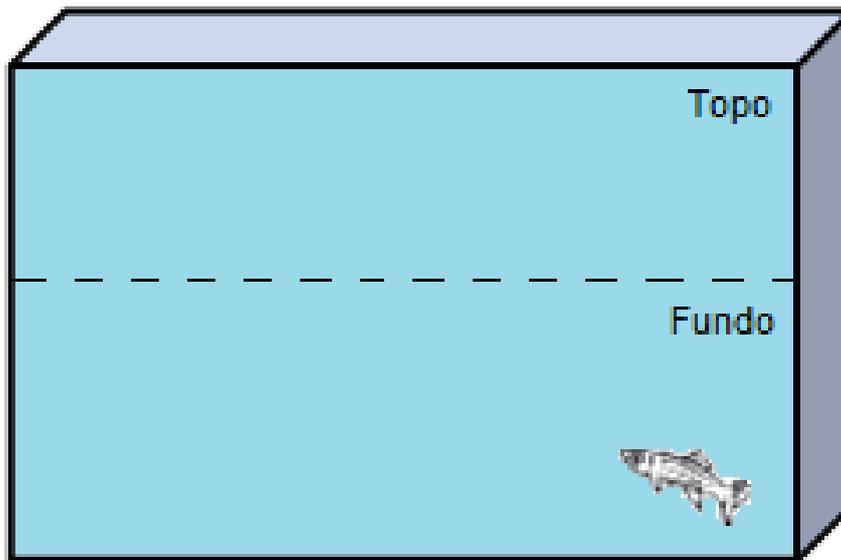


Figura 4: Representação esquemática do teste de Distribuição Vertical Eliciada pela Novidade. Adaptada de STWEART, 2014a.

3.4 PREPARO DAS AMOSTRAS

Logo após a exposição aos testes, os animais foram anestesiados em água gelada e decapitados utilizando uma lâmina de bisturi. Seus encéfalos foram dissecados e mantidos em solução tampão fosfato (70 mM) até a incubação em 500 µl de solução Hank (NaCl 128 mM, KCl 4 mM, MgCl₂ 1 mM, CaCl₂ 2 mM, C₆H₁₆O₆ 12 mM, Hepes 20 mM) enriquecida com sódio para em estufa de CO₂ 5% por 20 minutos.

Após este tempo de incubação, foi adicionado 20 µL de ácido tricloroacético (TCA) 1%, seguida de agitação em agitador *vortex* e centrifugação a 5000 rpm por 10 minutos. O sobrenadante foi então transferido para microtubos e mantido a uma temperatura de -20 °C para posterior quantificação extracelular de Glutamato e GABA utilizando Cromatografia Líquida de Alta Eficácia (CLAE). Para a análise, 20 µL do padrão interno (homoserina, 100 µM) são adicionados a 300 µL da amostra e, em seguida, homogeneizados. O padrão interno é utilizado com o intuito de melhorar a precisão e exatidão da análise. O tecido cerebral será utilizado para determinar a quantidade de proteína.

3.5 QUANTIFICAÇÃO DE GABA E GLUTAMATO POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICÁCIA (CLAE)

Em todos os experimentos foram utilizados água ultrapura (Sistema Mili-Q Milipore, USA) e metanol grau CLAE (SIGMA Aldrich, USA). Foram preparadas

também soluções analíticas de estoque de ácido glutâmico, GABA e homoserina (padrão interno).

3.5.1 Condições cromatográficas

Foi utilizado Cromatógrafo líquido de alta eficiência da marca Shimadzu, equipado com bomba (LC20-AT), detector de fluorescência (RF-10Axl), degaseificador (DGA-20A5), módulo comunicador (CBM-20A), injetor de amostras Rheodyne com alça de injeção de 20 μ L, coluna cromatográfica (Shimadzu, Shim-Pack VP-ODS, dimensão 250 x 4,6 mm), um sistema de aquisição de dados LC-Solution, e uma microsseringa de 50 μ l (*Hamilton*). A fase móvel foi composta por duas fases: Fase A (95% de tampão acetato, 5% de metanol); e Fase B (70% de metanol e 30% de água ultra pura). A corrida se iniciou com a fase móvel composta por 100% de Fase A, alcançando a relação 70% A/ 30% B em dez minutos de corrida, 50% A/ 50% B em vinte minutos de corrida e 100% de Fase A em 25 minutos. O fluxo da fase móvel foi de 1,2 mL/min e os comprimentos de onda, de excitação e emissão, foram de 340 e 460 nm, respectivamente.

Uma vez que aminoácidos não são naturalmente fluorescentes, é então realizado um mix contendo Orto-ftaldeído (OPA) 13 mg, N-acetil-cisteína 16,3 mg e metanol 300 μ L. Antes da injeção no equipamento, 60 μ L da amostra em temperatura ambiente foram misturadas a 40 μ L de tampão borato (60 mL de Ácido Bórico 0,1 M e 40 mL NaOH 1M) e 10 μ L de solução derivatizante. A solução resultante foi homogeneizada em vórtex e injetada no sistema cromatográfico após 5 minutos de reação.

3.6 QUANTIFICAÇÃO DE PROTEÍNA

A dosagem de proteína foi realizada pelo método descrito por Bradford (1976). Para esta quantificação, foram separadas alíquotas de 500 µl de amostra dos homogenatos (200 µl de amostra diluídas em PBS, 200 µl de NaOH e 100 µl de água destilada), em seguida foram adicionadas a 200 µl do reagente de Bradford (100 mg Azul Brilhante de Coomassie, 50 ml de etanol 95%, 100 ml de ácido fosfórico 85%) e incubadas por 2 minutos a temperatura ambiente. Em seguida, foi realizada a leitura por espectrofotometria observada em um comprimento de onda de 595 nm. As concentrações das proteínas foram determinadas pela comparação com uma curva-padrão com albumina sérica bovina (BSA).

3.7 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Todos os dados foram analisados estatisticamente, sendo realizado primeiramente o teste de normalidade Shapiro-Wilk para todos os grupos e, em seguida, análise de variância (ANOVA) de uma via seguido de pós-teste de Tukey para os testes PCE e DVN, tendo como software de análise o Graph Pad Prisma versão 6.0. Os dados comportamentais estão expressos em média \pm erro padrão da média, os dados de quantificação de glutamato e GABA estão expressos em média \pm desvio padrão e foi considerado $p < 0,05$.

4. RESULTADOS

4.1 PADRÃO COMPORTAMENTAL DOS ANIMAIS EXPOSTOS AO TESTE DE PREFERÊNCIA CLARO/ESCURO

Nossos dados demonstram que haver exploração do compartimento claro do aparato, porém sem habituação entre os tempos analisados ($F_{[3, 20]}= 17.10$; Figura 5A).

Nossos dados também demonstram não haver habituação em relação ao número de cruzamentos entre os compartimentos claro e escuro do aparato entre os tempos analisados ($F_{[3, 20]}= 6.28$; Figura 5B).

Em relação aos quadrantes cruzados, houve aumento considerativo no tempo de 15 minutos de teste quando comparado aos demais tempos. Os demais tempos também não diferem estatisticamente entre si ($F_{[3, 20]}= 13.04$; $p<0.03$; Figura 5C).

Quanto aos parâmetros tigmotaxia ($F_{[3, 18]}= 5.48$; Figura 5D), nado errático ($F_{[3, 18]}= 1.60$; Figura 5E), congelamento ($F_{[3, 18]}= 2.68$; Figura 5F), não houve alteração significativa nos tempos analisados.

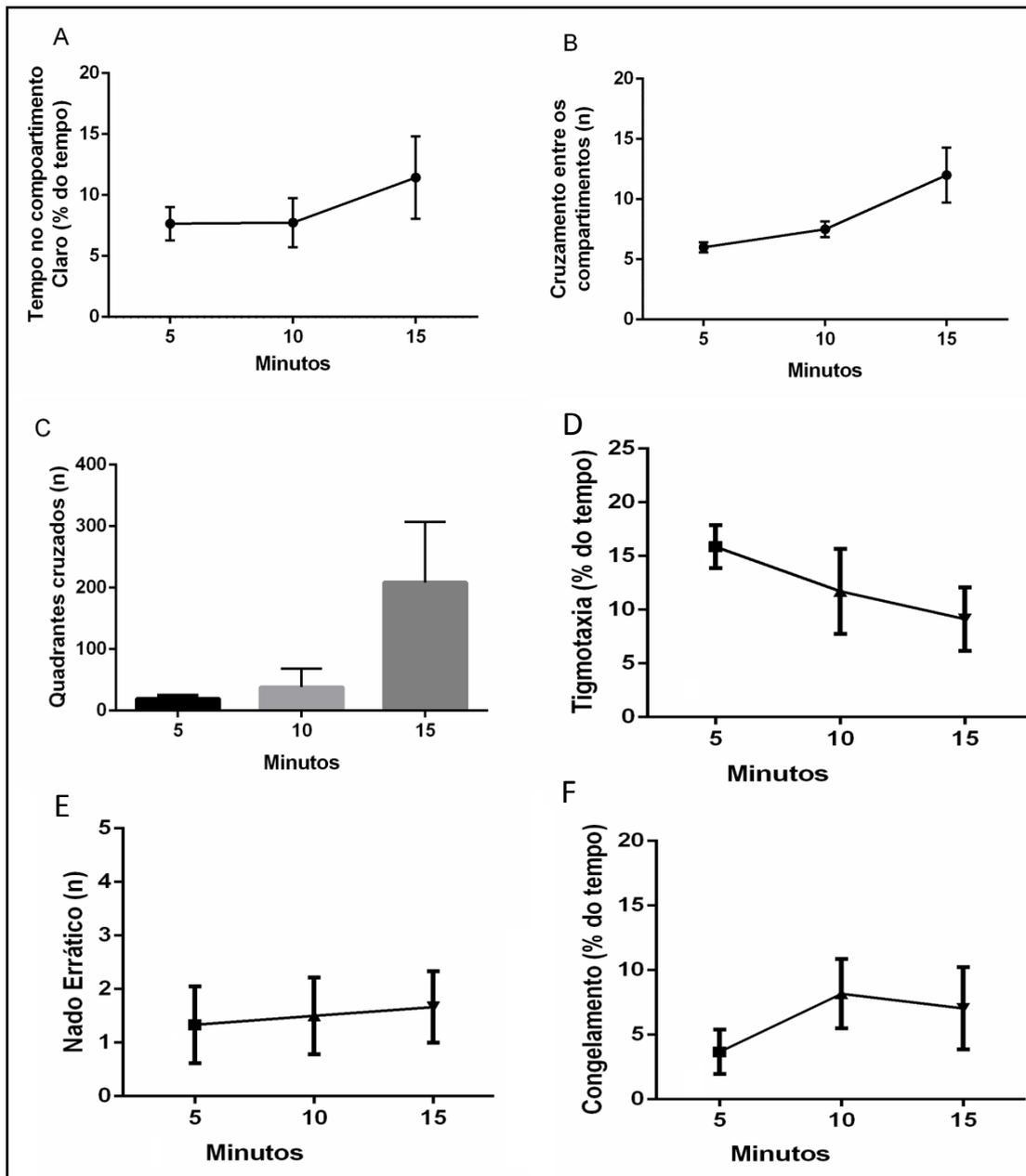


Figura 5: Parâmetros de avaliação do comportamento tipo ansiedade dos animais expostos aos tempos de 5, 10 e 15 minutos no teste de Preferência Claro/Escuro. (A) Tempo gasto pelo animal no compartimento branco, **(B)** cruzamentos entre os compartimentos, **(C)** número de quadrantes cruzados, **(D)** % de tempo de tigmotaxia, **(E)** número de episódios de nado errático, **(F)** % de episódios de congelamento. ANOVA com pós-teste Tukey, sendo os dados expressos em média±erro padrão da média.

4.2 PADRÃO COMPORTAMENTAL DOS ANIMAIS EXPOSTOS AO TESTE DE DISTRIBUIÇÃO VERTICAL ELICIADA PELA NOVIDADE

Nossos dados demonstram aumento significativo do tempo que os animais dispendem no topo comparado ao longo do tempo de exposição, havendo habituação ao longo do teste ($F_{[3, 28]}= 15.99$; Figura 6A; $p<0.01$).

Além disso, a quantidade de entradas na região superior, há gradativo aumento conforme o tempo de exposição, sendo o número de entradas maior no tempo de 15 minutos de exposição ($F_{[3, 22]}= 16.86$; Figura 6B; $p<0.05$). Também observa-se aumento gradativo do número de quadrantes cruzados no decorrer do teste, sendo nos tempos de 10 e 15 minutos houve maior cruzamento de quadrantes ($F_{[3, 21]}= 38.70$; $p<0.01$, Figura 6D).

Ademais, não há aumento das velocidades máximas dos animais no decorrer do teste ($F_{[3, 28]}= 19.73$, Figura 6E) assim como não houve aumento da velocidade média ($F_{[3, 27]}= 3.83$, Figura 6F).

Conforme aumenta do tempo de exposição ao aparato, pode-se observar que há um gradativo aumento de distância percorrida total dos animais, sendo maior a distância percorrida no tempo de 15 minutos de exposição comparados aos demais tempos ($F_{[3, 27]}= 61.44$; $p<0.01$, Figura 6C).

Em relação aos demais parâmetros, não houve observação significativa em todos os tempos analisados de exposição ao teste.

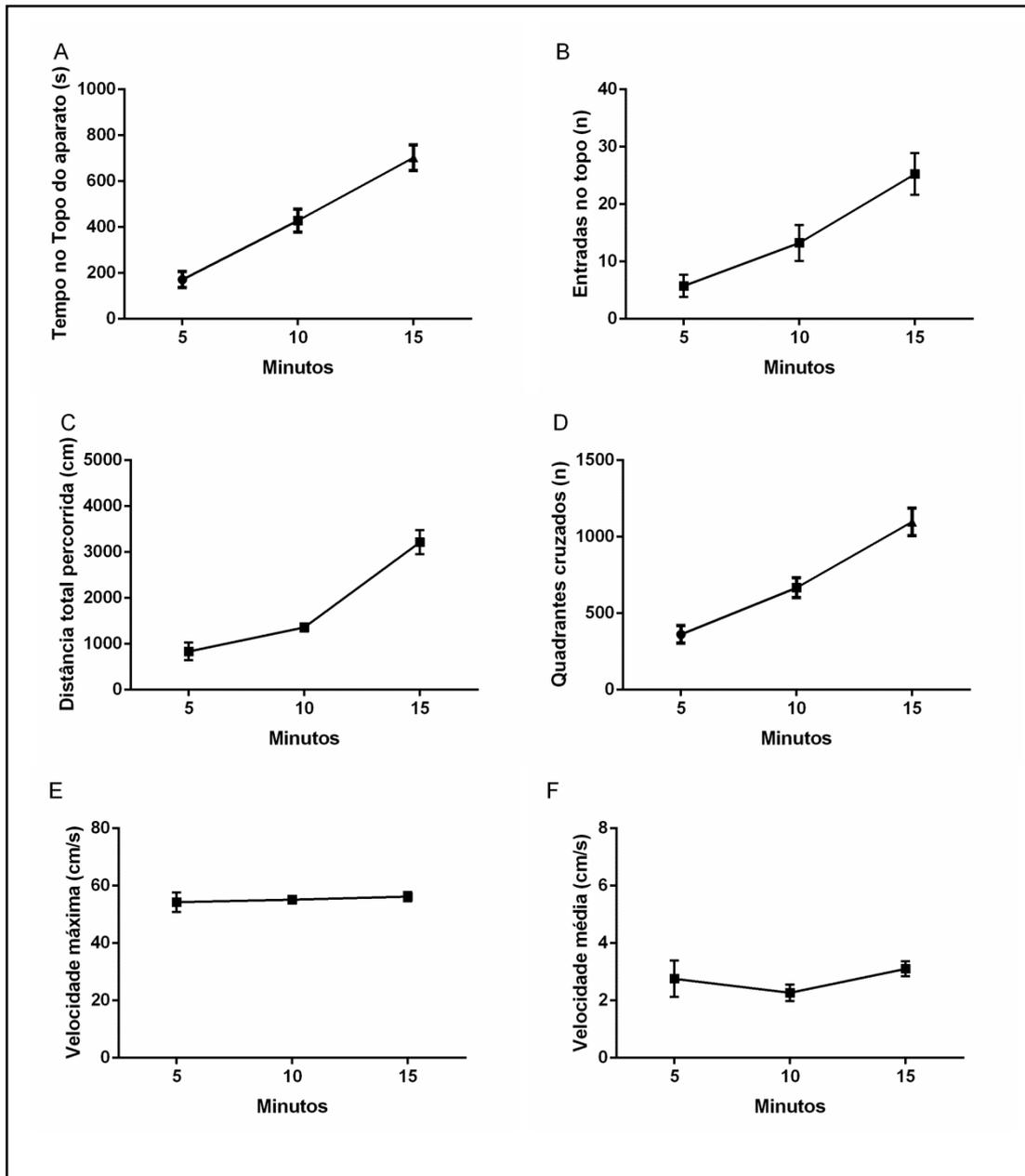


Figura 6: Parâmetros de avaliação do comportamento tipo ansiedade dos animais expostos aos tempos de 5, 10 e 15 minutos no teste de Distribuição Vertical eliciada pela Novidade.

(A) Tempo gasto pelo animal no topo, (B) Número de entradas na região superior do aparato, (C) Distância total percorrida, (D) Quadrantes cruzados, (E) velocidade máxima, (F) velocidade média. ANOVA com pós-teste Tukey, sendo os dados expressos em média \pm erro padrão da média.

4.3 NÍVEIS EXTRACELULARES DE GLUTAMATO E GABA DO ENCÉFALO DO *D. rerio*

4.3.1 Níveis extracelulares de GABA assim como os níveis de Glutamato variam de acordo com o tempo de exposição ao Teste PCE

De acordo com nossos dados, há aumento significativo nos níveis extracelulares de glutamato nos tempos de exposição em relação ao grupo controle ($F_{[4, 9]} = 8.97$, $p < 0.05$; Figura 7A).

Em relação aos níveis de GABA, ocorre uma acentuada diminuição nos tempos de exposição de 10 e 15 minutos em relação aos demais tempos de exposição e ao grupo de manuseio ($F_{[4, 8]} = 10.88$; $p < 0.05$; Figura 7B).

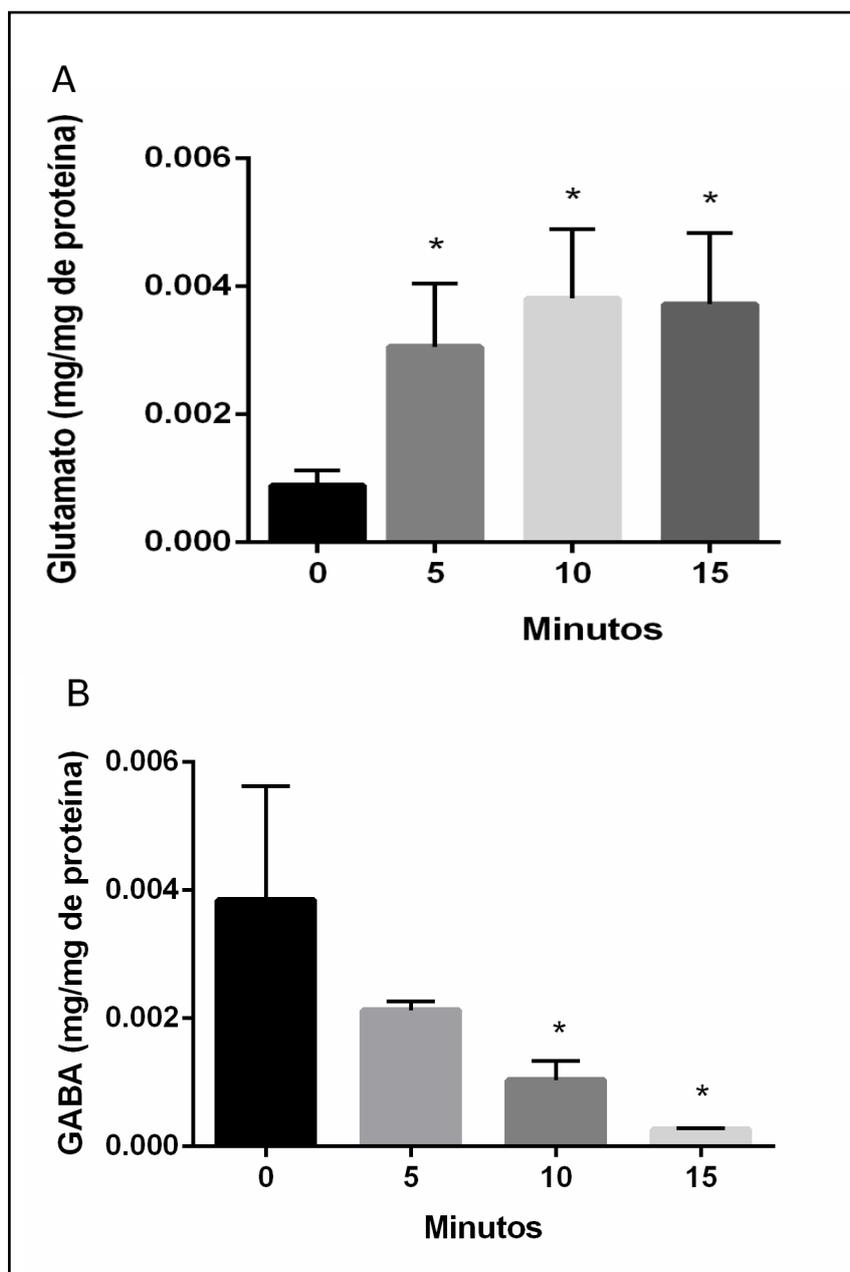


Figura 7: Níveis extracelulares de (A) Glutamato e (B) GABA no encéfalo do *D. rerio* de animais apenas manuseados (0) e expostos pelos tempos de 5, 10 e 15 minutos no teste de Preferência Claro/Escuro. ANOVA de uma via com pós-teste *Tukey*, sendo os dados expressos em média \pm desvio padrão da média. * = $p < 0.05$ vs 0 min.

4.3.2 Níveis extracelulares de Glutamato, mas não de GABA, variam de acordo com o tempo de exposição ao Teste DVN

Nossos dados demonstram haver aumento significativo nos níveis extracelulares de glutamato em todos os tempos de exposição em relação ao grupo que foi apenas manuseado ($F_{[4, 10]} = 47.25$; $p < 0.05$; Figura 8A). Entretanto, em relação aos níveis de GABA, não é vista alteração significativamente entre todos os tempos de exposição, nos quais os níveis extracelulares de GABA estão iguais aos animais apenas manuseados ($F_{[4, 9]} = 4.125$; Figura 8B).

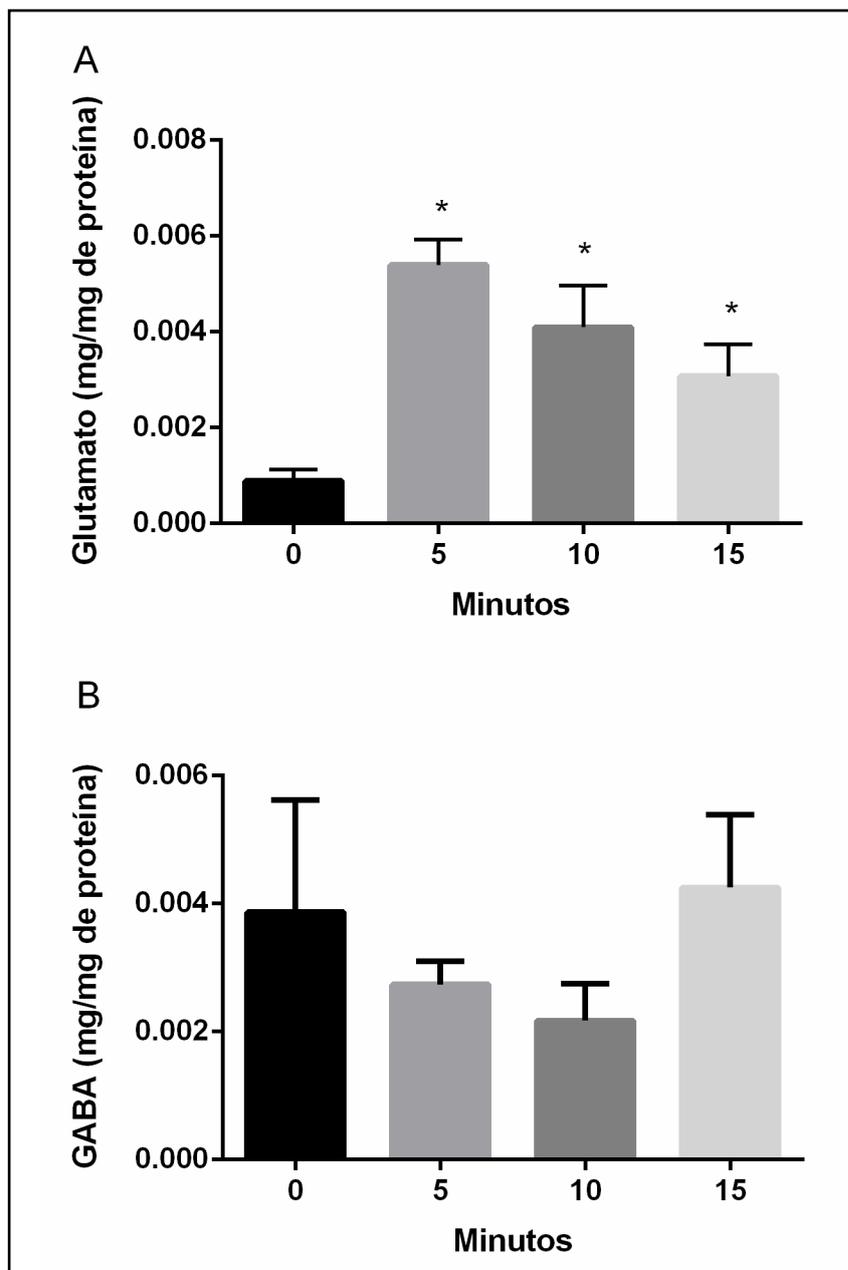


Figura 8: Níveis extracelulares de (A) Glutamato e (B) GABA no encéfalo do *D. rerio* de animais apenas manuseados (0) e expostos pelos tempos de 5, 10 e 15 minutos no teste de Distribuição Vertical Elicida pela Novidade. ANOVA de uma via com pós-teste *Tukey*, sendo os dados expressos em média \pm desvio padrão da média. * = $p > 0.05$ vs 0 min

5. DISCUSSÃO

Os resultados do presente estudo demonstram que, de acordo com o estabelecimento e geração do comportamento tipo ansiedade, há variação do conteúdo extracelular de GABA e glutamato vistos após a exposição dos animais tanto ao teste de preferência Claro/Escuro quanto ao teste de Distribuição Vertical Elicida pela Novidade. Além disso, o tempo de exploração e os parâmetros para a avaliação do comportamento tipo ansiedade não se alteram ao longo dos tempos de exposição ao teste PCE, mas sim no DVN, levando a um momento de habituação dos mesmos.

A exploração diminuída do compartimento aversivo dos testes pode ser observada quando são realizadas administrações farmacológicas de doses ansiogênicas, exposição a substâncias de alarme (substância química extraída da epiderme da própria espécie do animal) ou até mesmo exposição a estresse de confinamento (WONG et al., 2010; PIATO et al., 2011). Portanto, no teste PCE (MAXIMINO 2010), a ansiedade pode ser verificada quando ocorre uma diminuição súbita do tempo de exploração no compartimento claro do aparato e no teste DVN, quando ocorre uma diminuição no tempo de permanência no topo do aparato assim como número de entradas no compartimento (CACHAT, 2010; STEWART, 2010).

De acordo com nossos dados, não é vista diferença significativa do tempo dispendido no compartimento claro do aparato entre os tempos analisados, não visto, assim, processo de habituação, já que não há aumento de exploração conforme o aumento do tempo de exposição ao aparato (Figura 5A).

Além disso, corroborando ao fato de que não há habituação, não houve diferenças significativas do número de cruzamentos entre os ambientes claro e escuro do aparato (Figura 5). Podemos observar também aumento no número de quadrantes cruzados no tempo de 15 minutos de exposição comparado aos demais tempos. Tal dado pode ser explicado pela atividade exploratória total dos animais durante o tempo total do teste (Figura 5B).

Além das observações acima citadas, houve apresentação dos parâmetros indicativos do comportamento tipo ansiedade ao longo dos tempos de exposição ao teste, tais como tigmotaxia, congelamento e nada errático, não havendo processo de habituação entre os tempos analisados. Tais resultados entram em consonância com dados da literatura científica, nos quais MAXIMINO e colaboradores (2010) também demonstram não haver diferença no percentual de exploração do compartimento aversivo em diferentes tempos de exposição, assim como não há alteração de tais parâmetros avaliativos.

Ademais, evitar a exploração inicial do compartimento considerado aversivo nos momentos iniciais do teste também pode ser visto em modelos murinos, onde se observa preferência inicial do compartimento seguro do ambiente, no qual passam dois terços da sessão inicial antes da exploração do compartimento claro (MCNAUGHTON; CORR, 2004).

No teste de Distribuição Vertical Eliciada pela Novidade, nossos dados demonstram que não ocorrer habituação do tempo de exploração a partir do quinto minuto de exposição ao teste. Ao longo dos tempos analisados, houve aumento significativo do tempo de exploração do compartimento superior do aparato, aumento este ocorrendo conforme aumenta o tempo de exposição ao

teste (Figura 6A). Assim, nossos dados corroboram com demais encontrados na literatura, onde é visto que o zebrafish adulto gasta em torno de 50% do tempo de uma sessão de 5 minutos na região inferior (MAXIMINO, 2012; BENCAN, 2009; EGAN, 2009;)

No DVN, diferentemente do que é visto no PCE, podemos ver um aumento do número de entradas na região superior a medida que há maior tempo de exposição ao aparato de teste, demonstrando processo de habituação neste ambiente (Figura 6B). De forma também gradativa, o número de quadrantes cruzados também aumenta de acordo com o aumento do tempo, sendo tal fato podendo ser explicado pelo aumento exploratório dos animais, que de início preferem a região inferior do aparato, a qual é considerada assim sendo a mais segura. Com o passar do tempo, os animais exploram o ambiente (Figura 6B). Em relação aos demais parâmetros do etograma, tais como o nado errático e congelamento, não houve apresentações significativas ao longo dos tempos de exposição ao teste.

Corroborando nossos resultados, outros estudos também demonstram respostas de habituação ao longo do tempo de exposição no teste DVN (BENCAN, 2009; WONG, 2010). Além disso, STEWART e colaboradores (2013) reportam, em um refinado trabalho, a habituação de uma série de parâmetros utilizados para a avaliação do comportamento tipo ansiedade em zebrafish no teste DVN e também em outro teste para avaliação comportamental, o campo aberto. Neste trabalho, é visto que o processo de habituação pode ocorrer de forma independente de tratamentos ansiolíticos ou ansiogênicos de uma determinada manipulação neste teste. Além disso, animais com maior geotaxia apresentam maior habituação no tempo do topo do

teste DVN, o que sugere uma diminuição de neofobia apresentada nos primeiros minutos do teste.

A habituação aqui apresentada pelo zebrafish no DVN e estudos que utilizam campo aberto também pode ser vista em modelos murinos de ansiedade no campo aberto (STEWART, 2013). Em paralelo, a motilidade e exploração do *D. rerio* do ambiente aumentam gradualmente no decorrer dos minutos de exposição do teste, sem alteração da velocidade do nado e da tigmotaxia, a qual pode ocorrer em roedores (LAMPREA, 2008).

Quando se trata da neuroquímica do comportamento tipo ansiedade, diversos sistemas de neurotransmissão têm sido reportados na literatura científica que estão intimamente ligados com a indução e/ou modulação do comportamento tipo ansiedade. Dentre eles, os sistemas glutamatérgico e GABAérgico atuam como sistemas centrais no controle da ansiedade (KASH, 1999; BAGLEY; MOGHADDAM, 1997).

Ao longo dos tempos de exposição ao teste PCE, observamos que o conteúdo extracelular de glutamato encontra-se elevados no decorrer do tempo de exposição ao teste em comparação a animais apenas manuseados. De forma interessante, observamos um alto nível de conteúdo extracelular de glutamato a partir dos 5 minutos de teste ao teste em relação ao grupo controle (Figura 7A). Dados similares podem ser vistos na literatura científica, haja vista que a hiperativação do sistema glutamatérgico tem sido amplamente associada a efeito ansiogênico em vários modelos experimentais (MUSAZZI, 2010; MOGHADDAM, 1993).

Em contrapartida, nos primeiros cinco minutos de exposição ao teste, os níveis extracelulares de GABA encontram-se iguais aos dos animais apenas manuseados. Observamos, entretanto que, no decorrer da exposição, especificamente a partir de dez minutos de exposição, há uma acentuada diminuição dos níveis de GABA em comparação aos demais tempos de exposição e aos animais apenas manuseados (Figura 7B).

Tais dados entram em consonância com a literatura, haja vista que manipulações farmacológicas que inibem a produção de GABA, o que conseqüentemente leva a diminuição de suas concentrações, ou a inibição de seus receptores gera assim a produção do comportamento tipo ansiedade em diversos modelos animais (CHAO *et al.*, 2010). Assim como o aumento na produção de glutamato ou a ativação de seus receptores por meio do uso de agonistas gera ansiogênese (FENDT, 2000).

Logo, a exposição ao teste escototáxico elicia ansiedade nos animais, estando aqui demonstrados que os sistemas glutamatérgico e GABAérgicos estão intimamente relacionado a esta gênese, sendo que o primeiro aumenta de acordo com o tempo de exposição ao teste e o segundo diminui na medida que o animal está sendo exposto ao ambiente.

Já no teste DVN, o conteúdo extracelular de glutamato também encontram-se elevado em todos os tempos de exposição, quando comparados ao grupo apenas manuseado, não havendo diferença entre os tempos de exposição (Figura 8A). Por outro lado, em relação ao GABA, em todos os tempos de exposição, os níveis encontram-se iguais aos níveis dos animais apenas manuseados.

Assim como visto no PCE, no DVN há aumento dos níveis de glutamato, porém aqui sem alteração dos níveis de GABA. Tais conflitos de resultados podem assim indicar que no DVN não há somente a aparição da ansiedade, mas sim, ocorre também uma combinação de efeito motivacional e locomotor. RIEHL e colaboradores (2011) avaliam a participação do sistema glutamatérgico na ansiedade utilizando o DVN e constataram que a administração de quetamina (antagonista de receptores NMDA) diminui o número de transições para o topo e aumenta o tempo de duração neste compartimento, caracterizando efeito ansiolítico do tratamento, o que sugere, então, que a modulações glutamatérgicas contribuem para a habituação espacial observada no DVN.

Tais resultados sugerem que a exposição a estes dois testes eliciam no *D. rerio* comportamento tipo ansiedade, sendo que a modulação em ambos ocorre de maneira diferente, sendo no PCE pela diminuição de GABA e aumento de glutamato, e no DVN aumento somente de Glutamato. Nesse sentido, nosso trabalho torna-se pioneiro em demonstrar como tais sistemas de neurotransmissão estão regulando o processo de gênese e estabelecimento do comportamento tipo ansiedade gerada a partir da exposição a novos ambientes.

6. CONCLUSÃO

O padrão de liberação do glutamato e GABA variam de acordo com o tempo e tipo de ambiente o qual o zebrafish é exposto, sendo que em ambientes para avaliação da escototaxia, há aumento dos níveis de glutamato e baixos níveis de GABA e em ambiente para a avaliação de geotaxia, há somente participação glutamatérgica.

7. REFERÊNCIAS

American Psychiatric Association. The Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders. 5th ed. Arlington, VA: **American Psychiatric Association; 2013.**

AMORIM R., SILVA P., LUCHIARI A.C. Effects of Alcohol on Inhibitory Avoidance Learning in Zebrafish (*Danio rerio*). **Zebrafish. 2017**; Oct;14(5):430-437. Epub 2017 Jul 17.

BAGLEY, J. & MOGHADDAM, B. Temporal dynamics of glutamate efflux in the prefrontal cortex and in the hippocampus following repeated stress: effects of pretreatment with saline or diazepam. **Neurosci. 1997**; 77(1); 65-73.

BALLENGER J. C. Efficacy of benzodiazepines in panic disorder and agoraphobia. **J Psychiatr Res. 1990**;24 Suppl 2:15-25.

BARROS DM, IZQUIERDO LA, MELLO E SOUZA T, ARDENGHI PG, PEREIRA P, MEDINA JH, IZQUIERDO I. Molecular signalling pathways in the cerebral cortex are required for retrieval of one-trial avoidance learning in rats. **Behav Brain Res. 2000 Sep**;114(1-2):183-92.

BARROS, T. P.; *et al.* Zebrafish: an emerging for in vivo pharmacological assessment to identify potential safety liabilities in early drug discovery. **British Journal of Pharmacology. 2008**; v. 154, p. 1400 - 1413.

BEESDO, K., PINE, D. S., LIEB, R., WITTCHEN, H.-U. Incidence and risk patterns of anxiety and depressive disorders and categorization of generalized anxiety disorder. **Arch. Gen. Psychiatry. 2010** 67, 47–57.

BENCAN, Z., SLEDGE, D. & LEVIN, E.D. Buspirone, chlordiazepoxide and diazepam effects in a zebrafish model of anxiety. **Pharmacol. Biochem. Behav.** **2009**; 94: 75-80.

BERGINK V., VAN MEGEN H. J., WESTENBERG H. G. Glutamate and anxiety. **Eur Neuropsychopharmacol.** **2004**;14(3):175-83.

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

BLOOM F. E., IVERSEN L. L. Localizing H-GABA in nerve terminals of rat cerebral cortex by electron microscopic autoradiography. **Nature.** **1971**; 229, 628–630.

BOURIN M, COLOMBEL M. C., MALINGE M., BRADWEJN J. Clonidine as a sensitizing agent in the forced swimming test for revealing antidepressant activity. **J Psychiatry Neurosci.** **1991**; Nov;16(4):199-203.

BRAESTRUP C., NIELSEN M., NIELSEN E. AND LYON M. Benzodiazepine receptors in the brain as affected by different experimental stresses: the changes are small and not unidirectional. **Psycho-pharmacology** **1979**; 65, 273–277.

BRAFORD JR., M.R. Stalking the everted telencephalon: Comparisons of forebrain organization in basal ray-finned fishes and teleosts. **Brain, Behavior and Evolution.** **2009**; 74, 56–76.

BUTLER, A.B., HODOS, W. Comparative vertebrate neuroanatomy. Evolution and Adaptation, John Wiley & Sons. **Hoboken. 2005**

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

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

CHANG L, CLOAK CC, ERNST T. Magnetic resonance spectroscopy studies of GABA in neuropsychiatric disorders. **J Clin Psychiatry. 2003**; v 64(Suppl 3):7–14.

CHAO HT, CHEN H, SAMACO RC, XUE M, CHAHROUR M, YOO J, NEUL JL, GONG S, LU HC, HEINTZ N, EKKER M, RUBENSTEIN JL, NOEBELS JL, ROSENMUND C, ZOGHBI HY. Dysfunction in GABA signalling mediates autism-like stereotypies and Rett syndrome phenotypes. **Nature. 2010** Nov 11;468(7321):263-9.

CHAOULOFF, F.; DURAND, M.; MORMÀDE, P. Anxiety- and activity related effects of diazepam and chlordiazepoxide in the rat light/dark and dark/light tests. **Behavioural Brain Research. 1997**; v. 85, p. 27-35.

CHAUDHRY FA, REIMER RJ, BELLOCCHIO EE, DANBOLT NC, OSEN KK, EDWARDS RH, STORM-MATHISEN J. The vesicular GABA transporter, VGAT, localizes to synaptic vesicles in sets of glycinergic as well as GABAergic neurons. **J Neurosci. 1998**; Dec 1;18(23):9733-50.

CHEN F, CHEN S, LIU S, ZHANG C, PENG G. Effects of lorazepam and WAY-200070 in larval zebrafish light/dark choice test. **Neuropharmacology**. **2015** Aug;95:226-33. Epub 2015 Apr 1.

CHHATWAL JP, MYERS KM, RESSLER KJ, DAVIS M. Regulation of gephyrin and GABAA receptor binding within the amygdala after fear acquisition and extinction. **J Neurosci**. **2005**; v 25:502–506.

CHRISTOPHER, P. & MURRAY, J. L. Global, regional, and national comparative risk assessment of 79 behavioural, environmental and occupational, and metabolic risks or clusters of risks, 1990–2015: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study. **Lancet**. **2016**; v 388, 1659–1724.

CONNOR KM, DAVIDSON JR, WEISLER RH, ZHANG W, ABRAHAM K. Tiagabine for posttraumatic stress disorder: effects of open-label and double-blind discontinuation treatment. **Psychopharmacology (Berl)**. **2006**;184(1):21-5. Epub 2005 Dec 10.

CORBETT R, DUNN RW. Effects of 5,7 dichlorokynurenic acid on conflict, social interaction and plus maze behaviors. **Neuropharmacology**. **1993**; 32(5):461-6.

CRANE D. Tiagabine for the treatment of anxiety. **Depress Anxiety**. **2003**;18(1):51-2.

CRASKE MG, RAPEE RM, JACKEL L, BARLOW DH. Qualitative dimensions of worry in DSM-III-R generalized anxiety disorder subjects and nonanxious controls. **Behav Res Ther**. **1989** ;27(4):397-402.

CRESTANI F, LOPEZ M., BEAR K., et al. Decreased GABA_A-receptor clustering results in enhanced anxiety and bias for threat cues. **Nat Neuroscience**. 1999, 2:833:839

CURTIS, D. R. & WATKINS, J. C. The excitation and depression of spinal neurones by structurally related amino acids. **J. Neurochem**. 1960; 6: 117–141.

DALVI A., RODGERS RJ. GABAergic influences on plus-maze behaviour in mice. **Psychopharmacology (Berl)**. 1996; 128(4):380-97.

DASKALAKIS, N. P. *ET AL*. New translational perspectives for blood-based biomarkers of PTSD: from glucocorticoid to immune mediators of stress susceptibility. **Exp. Neurol**. 2016; 284, 133–140.

DAVIS M, WHALEN PJ. The amygdala: vigilance and emotion. **Mol Psychiatry**. 2001 6:13–34.

DREVETS WC. Prefrontal cortical-amygdalar metabolism in major depression. **Ann N Y Acad Sci**. 1999;877:614–637.

DUDEL J., GRYDER R., KAJI A., KUFFLER S. W., POTTER D. D. Gamma-aminobutyric acid and other blocking compounds in crustacea I. Central nervous system. **Journal of Neurophysiology**. 1963; 26, 721–728.

EACHUS H., BRIGHT C., CUNLIFFE V. T., PLACZEK M., WOOD J. D., WATT P. J. Disrupted-in-Schizophrenia-1 is essential for normal hypothalamic-pituitary-interrenal (HPI) axis function. **Hum Mol Genet**. 2017; v 1;26(11):1992-2005.

EGAN, R. J.; *et al.* Understanding behavioral and psychological phenotypes of stress and anxiety in zebrafish. **Behav Brain Res.** **2009.** 14;205(1):38-44.

EGAN, R.J., BERGNER, C.L., HART, P.C., CACHAT, J.M., CANAVELLO, P.R., ELEGANTE, M.F., ELKHAYAT, S.I., BARTELS, B.K., TIEN, A.K., TIEN, D.H., MOHNOT, S., BEESON, E., GLASGOW, E., AMRI, H., ZUKOWSKA, Z. & KALUEFF, A.V. Understanding behavioral and physiological phenotypes of stress and anxiety in zebrafish. **Behav. Brain Res.** **2009;** 205: 38-44.

EMRICH H. M., VON ZERSEN D., KISSLING W., MOLLER H. J., WINDORFER A. Effect of sodium valproate on mania. The GABA-hypothesis of affective disorders. **Arch Psychiatr Nervenkr.** **1980;** 229:1–16.

ERECINSKA M., SILVER I. A. Metabolism and role of glutamate in mammalian brain. **Prog Neurobio.** **1990;** 35:245-96.

FATEMI SH, STARY JM, EARLE JA, ARAGHI-NIKHAM M, EAGAN E. GABAergic dysfunction in schizophrenia and mood disorders as reflected by decreased levels of glutamic acid decarboxylase 65 and 67 and Reelin proteins in cerebellum. **Schizophr Res.** **2005;** 72:109–122.

FILE SE, MABBUTT PS, ANDREWS N. Diazepam withdrawal responses measured in the social interaction test of anxiety and their reversal by baclofen. **Psychopharmacology.** **1991;** 104:62–66.

FROESTL, W. (2011). A histological perspective on GABAergic drugs. **Future Med. Chem.** **2011;** v. 3 (2): 163-175.

GAJWANI P, FORSTHOFF A, MUZINA D, AMANN B, GAO K, ELHAJ O, CALABRESE JR, GRUNZE H. Antiepileptic drugs in mood-disordered patients. **Epilepsia** **46**. **2005**;(4):38–44.

GLAS, A conceptual history of anxiety and depression. In: J.A. den Boer & A. Sitsen (Eds.) Handbook on Anxiety and Depression. **Marcel Dekker: New York/Basel/Hong Kong, 2003**; [2], 1-48.

GRAEFF, F. G. Anxiety, panic and the hypothalamic-pituitary-adrenal axis. **Rev.Bras. Psiquiatr.** **2007**. 29 (1):3-6.

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

GROSSMAN L, STEWART A, GAIKWAD S, UTTERBACK E, WU N, DILEO J. Effects of piracetam on behavior and memory in adult zebrafish. **Brain Research Bulletin** **2011**;85(1–2):58–63.

WONG K, ELEGANTE M, BARTELS B, ELKHAYAT S, TIEN D, ROY S. Analyzing habituation responses to novelty in zebrafish (*Danio rerio*). **Behavioural Brain Research** **2010**;208(2):450–7.

GUIDOTTI A, AUTA J, DAVIS JM, DI-GIORGI-GEREVINI V, DWIVEDI Y, GRAYSON DR, IMPAGNATIELLO F, PANDEY G, PESOLD C, SHARMA R, UZUNOV D, COSTA E. Decrease in reelin and glutamic acid decarboxylase67 (GAD67) expression in schizophrenia and bipolar disorder: a postmortem brain study. **Arch Gen Psychiatry** **57**. **2000**: 1061–1069.

HARO, J. M. *et al.* ROAMER: roadmap for mental health research in Europe. **Int. J. Methods Psychiatr. Res.** **2014**; 23 (1), 1–14.

HAYASHI, T. A physiological study of epileptic seizures following cortical stimulation in animals and its application to human clinics. **Jpn. J. Physiol.** **1952**; 3: 46–64.

HERMAN JP, RENDA A, BODIE B. Norepinephrine-gammaaminobutyric acid (GABA) interaction in limbic stress circuits: effects of reboxetine on GABAergic neurons. **Biol Psychiatry** **2003**; 53:166–174.

HINDERER S. R. The supraspinal anxiolytic effect of baclofen for spasticity reduction. **Am J Phys Med Rehabil.** **1990**; 69:254–258.

HU Z. Y., CHEN B., ZHANG J. P., MA Y.Y. Up-regulation of autophagy-related gene 5 (ATG5) protects dopaminergic neurons in a zebrafish model of Parkinson's disease. **J Biol Chem.** **Nov. 2017**; 3;292(44):18062-18074. doi: 10.1074/jbc.M116.764795. Epub 2017 Sep 19.

JASNOW AM, HUHMAN KL. Activation of GABA(A) receptors in the amygdala blocks the acquisition and expression of conditioned defeat in Syrian hamsters. **Brain Res.** **2001**; 920:142–150.

KALUEFF A. V., NUTT D. J. Role of GABA in anxiety and depression. **Depress Anxiety.** **2007**;24(7):495-517.

KANG S, LI J, BEKKER A, YE JH. Rescue of glutamate transport in the lateral habenula alleviates depression- and anxiety-like behaviors in ethanol-withdrawn rats. **Neuropharmacology.** **2018**; 129:47-56. Epub 2017 Nov 8.

KASH SF, TECOTT LH, HODGE C, BAEKKESKOV S. Increased anxiety and altered responses to anxiolytics in mice deficient in the 65-kDa isoform of glutamic acid decarboxylase. **Proceedings of the National Academy of**

Sciences of the United States of America. 1999; 96(4):1698–703. Epub 1999/02/17.

KASH, SF. TECOTT, LH. HODGE, C. & BAEKKESKOV, S. Increased anxiety and altered responses to anxiolytics in mice deficient in the 65-kDa isoform of glutamic acid decarboxylase. **Proc Natl Acad Sci. 1999.** 96(4), 1698-703.

KAUFMAN D. L., HOUSER C. R., TOBIN A.J. Two forms of the aminobutyric acid synthetic enzyme glutamate decarboxylase have distinct intraneuronal distribution and cofactor interactions. **J Neurochem. 1991;** 56:720–723.

KIM C. H., LEE J., LEE J. Y., ROCHE K. W. Metabotropic glutamate receptors: phosphorylation and receptor signaling. **J Neurosci. 2008;**86:1-10.

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

KŁODZIŃSKA A, TATARCZYŃSKA E, CHOJNACKA-WÓJCIK E, PILC A. Anxiolytic-like effects of group I metabotropic glutamate antagonist 2-methyl-6-(phenylethynyl)-pyridine (MPEP) in rats. **Pol J Pharmacol. 2000;** 52(6):463-6.

KŁODZINSKA A, TATARCZYŃSKA E, CHOJNACKA-WÓJCIK E, NOWAK G, COSFORD ND, PILC A. Anxiolytic-like effects of MTEP, a potent and selective mGlu5 receptor agonist does not involve GABA(A) signaling. *Neuropharmacology.* 2004 Sep;47(3):342-50.

KORPI E. R., GRUNDER G., LUDDENS H. Drug interactions at GABA(A) receptors. **Prog Neurobiol. 2002;** 67:113–159.

KOSEL M., RUDOLPH U., WIELEPP P., LUGINBUHL M., SCHMITT W., FISCH H. U., SCHLAEPER T. E. Diminished GABA_A receptor-binding capacity and a DNA base substitution in a patient with treatment-resistant depression and anxiety. **Neuropsychopharmacology**. 2004; 29: 347–350.

KOTLINSKA J, LILJEQUIST S. The putative AMPA receptor antagonist, LY326325, produces anxiolytic-like effects without altering locomotor activity in rats. **Pharmacol Biochem Behav**. 1998;60(1):119-24.

Lamprea MR, Cardenas FP, Setem J, Morato S. Thigmotactic responses in an open-field. **Braz J of Med and Biolog Res**. 2008;41(2):135–40.

LANG AP, DE ANGELIS L. Experimental anxiety and antiepileptics: the effects of valproate and vigabatrin in the mirrored chamber test. **Methods Find Exp Clin Pharmacol**. 2003; 25:265–271.

LEDOUX JE. Emotion, memory and the brain. *Sci Am*. 1994 Jun;270(6):50-7.

LEVY, L. M., WARR, O. & ATTWELL, D. Stoichiometry of the glial glutamate transporter GLT-1 expressed inducibly in a Chinese hamster ovary cell line selected for low endogenous Na⁺-dependent glutamate uptake. **J. Neurosci**. 1998; 19: 9620–9628.

LLOYD K. G., THURET F., PILC A. Upregulation of gammaaminobutyric acid (GABA) B binding sites in rat frontal cortex: a common action of repeated administration of different classes of antidepressants and electroshock. **J Pharmacol Exp Ther**. 1985; 235: 191–199.

LOW K., CRESTANI F., KEIST R., *et al*. Molecular and neuronal substrate for the selective attenuation of anxiety. **Science**. 2000; 290: 131-134.

LYDIARD RB. The role of GABA in anxiety disorders. **J Clin Psychiatry.** **2003**;64(Suppl 3):21–27.

MA L., DEMIN K. A., KOLESNIKOVA T. O., KHARSKO S. L., ZHU X., YUAN X., SONG C., MESHALKINA D. A., LEONARD B. E., TIAN L., KALUEFF A. V. Animal inflammation-based models of depression and their application to drug discovery. **Expert Opin Drug Discov.** **2017**; 12(10):995-1009.

MACPHAIL RC, BROOKS J, HUNTER DL, PADNOS B, IRONS TD, PADILLA S. Locomotion in larval zebrafish: influence of time of day, lighting and ethanol. **Neurotoxicology** **2009**;30(1):52–8.

MANSUR B., DOS SANTOS B. R., DIAS C. A., PINHEIRO M., GOUVEIA A. JR. Effects of the number of subjects on the dark/light preference of Zebrafish (*Danio rerio*). **Zebrafish.** **2014**;11(6):560-6.

MAREN S, AHARONOV G, STOTE DL, FANSELOW MS. N-methyl-D-aspartate receptors in the basolateral amygdala are required for both acquisition and expression of conditional fear in rats. **Behav Neurosci.** **1996**; 110(6):1365-74.

MARTIN, I., GOMEZ, A., SALAS, C., PUERTO, A., RODRIGUEZ, F. Dorsomedial pallium lesions impair taste aversion learning in goldfish. **Neurobiol. Learn. Mem.** **2011**; 96, 297–305.

MAXIMINO C, BRITO TM, DIAS CAGM, GOUVEIA JR A. MORATO S. Scototaxis as anxiety in fish. **Nat Protoc** **2010a**;5:209–16.

MAXIMINO C, HERCULANO., A review of monoaminergic neuropsychopharmacology in zebrafish. **Zebrafish.** **2010**; 7(4):359-78.

MAXIMINO C., BRITO TM., PONTES AAA., et al. Parametric analyses of anxiety in zebrafish scototaxis. **Behavioural Brain Research**. 2010;210 (1), 26:1-7

MAXIMINO C., MARQUES DE BRITO T., DA SILVA BATISTA A.W, HERCULANO A.M., MORATO A., GOUVEIA A. JR. Measuring anxiety in zebrafish: A critical review. **Behavioural Brain Research**. 2014; (2): 157-71.

MAXIMINO C., OLIVEIRA K.R., LIMA M., BATISTA E., HERCULANO A.M. “Limbic associative” and “autonomic” amygdala in teleosts: A review of the evidence. **J Chem Neuroanat**. 2012a; 2: 204:159.

MAXIMINO et al. A comparison of the light/dark and novel tank tests in zebrafish. **Behaviour**. 2012 149:1099–1123.

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

MAXIMINO, C.; *et al.* Role of serotonin in zebrafish (*Danio rerio*) anxiety: Relationship with serotonin levels and effect of buspirone, WAY 100635, SB 224289, fluoxetine and para-chlorophenylalanine (pCPA) in two behavioral models. **Neuropharmacology**. 2013; 71:83-97

MCNAUGHTON N, CORR PJ. A two-dimensional neuropsychology of defense: fear/anxiety and defensive distance. **Neurosci Biobehav Rev** 2004; 28: 285–305.

MICHELLE G. CRASKE, MURRAY B. STEIN, THALIA C. ELEY, MOHAMMED R. MILAD, ANDREW HOLMES, RONALD M.

RAPEE, HANS-ULRICH WITTCHEN. Anxiety disorders Nature Reviews **Disease Primers. 2017**; 3, 17024.

MIHALEK R. M., et al. Attenuated sensitivity to neuroactive steroids in gamma-aminobutyrate type A receptor delta subunit knockout mice. **Proc Natl Acad Sci U S A. 1999**; 2(22):12905-10.

MILLAN M. J. The neurobiology and control of anxious states. **Prog Neurobiol. 2003**; 70:83–244. 2003

MISERENDINO MJ, SANANES CB, MELIA KR, DAVIS M. Blocking of acquisition but not expression of conditioned fear-potentiated startle by NMDA antagonists in the amygdala. **Nature. 1990**; 21;345(6277):716-8.

MODI S, RANA P, KAUR P, RANI N, KHUSHU S. Glutamate level in anterior cingulate predicts anxiety in healthy humans:a magnetic resonancespectroscopy study. **Psychiatry Res. 2014**; 224(1):34-41.

MOGHADDAM, B., *et al.*, Stress preferentially increases extraneuronal levels of excitatory amino acids in the prefrontal cortex: comparison to hippocampus and basal ganglia. **J. Neurochem. 1993**; 60, 1650–1657

MOLEÓN, S. *et al.* Chronic administration of fluoxetine impairs inhibitory avoidance in male but not female mice. **Behavioral Brain Research. 2002**; 15;136(2):483-8.

MOMBEREAU C, KAUPMANN K, FROESTL W, SANSIG G, VAN DER PUTTEN H, CRYAN JF. Genetic and pharmacological evidence of a role for GABA(B) receptors in the modulation of anxiety- and

antidepressant-like behavior. **Neuropsychopharmacology**. 2004. 29:1050–1062.

MOTOHASHI N., OKAMOTO Y., OSADA M. AND YAMAWAKI S. Acute swim stress increases benzodiazepine receptors, but not GABA_A or GABA_B receptors, in the rat cerebral cortex. **Neurochem. Int.** 1993; 23:327–330.

MUELLER, T., DONG, Z., BERBEROGLU, M.A. & GUO, S. The dorsal pallium in zebrafish, *Danio rerio* (Cyprinidae, Teleostei). **Brain Res.** 2011; 1381, 95–105.

MUSAZZI L, MILANESE M, FARISELLO P, ZAPPETTINI S, TARDITO D, *et al.* Acute Stress Increases Depolarization-Evoked Glutamate Release in the Rat Prefrontal/Frontal Cortex: The Dampening Action of Antidepressants. **PLoS ONE**. 2010; 5(1): e8566.

NASCIMENTO HÄCKL LP, CAROBREZ AP. Distinct ventral and dorsal hippocampus AP5 anxiolytic effects revealed in the elevated plus-maze task in rats. **Neurobiol Learn Mem.** 2007; 88(2):177-85.

NICIU M. J., KELMENDI B, SANACORA G. Glutamatergic neurotransmission in the nervous system. **Pharmacol Biochem Behav.** 2012;100(4):656-64.

NIEUWENHUYS, R. The morphogenesis and the general structure of the actinopterygian forebrain. **Acta Morphologica Neerlando-Scandinavica** 1962; 5, 65–78.

NIEUWENHUYS, R., 1969. A survey of the structure of the forebrain in higher bony fishes. **Annals of the New York Academy of Science** 1969; 167, 31–64.

NISHIMURA Y., HATA T, KAWABATA A, ITOH E, KITA T. Impairment of passive avoidance performance in SART-stressed mice and the action of drugs. **Jpn J Pharmacol.** **1989**;49(1):111-7.

NORTHCUTT, R.G. Connections of the lateral and medial divisions of the goldfish telencephalic pallium. **J. Comp. Neurol.** **2006**; 494, 903–943.

NUTT DJ, MALIZIA AL. New insights into the role of the GABA(A)-benzodiazepine receptor in psychiatric disorder. **Br J Psychiatry** **2001**; 179:390–396.

NUTT DJ, MALIZIA AL. New insights into the role of the GABA(A)-benzodiazepine receptor in psychiatric disorder. **Br J Psychiatry.** **2001** Nov;179:390-6.

OLSEN R. W., CHANG C. S., LI G., HANCHAR H. J., WALLNER M. Fishing for allosteric sites on GABA(A) receptors. **Biochem Pharmacol** **68**: 1675–1684. Conn PJ, Pin JP. Pharmacology and functions of metabotropic glutamate receptors. **Annu Rev Pharmacol Toxicol** **1997**;37:205–37.

PALUCHA A, PILC A. Metabotropic glutamate receptor ligands as possible anxiolytic and antidepressant drugs. **Pharmacol Ther.** **2007**;115(1):116-47.

PELLERIN L., MAGISTRETTI P. J. Neuroenergetics: calling upon astrocytes to satisfy hungry neurons. **Neuroscientist.** **2004**;10:53–62.

PENCE, R. et al. The behaviour and ecology of the zebrafish *Danio rerio*. **Biological Reviews.** **2008**; v. 83 p. 13–34.

PESSOTTI I. Ansiedade. São Paulo: **E. Pedagógica e Universitária. 1978**; p. 136.

PETTY F., SHERMAN A. D. GABAergic modulation of learned helplessness. **Pharmacol Biochem Behav. 1981**; 15:567–570.

PIATO ÂL, CAPIOTTI KM, TAMBORSKI AR, OSES JP, BARCELLOS LJ, BOGO MR, LARA DR, VIANNA MR, BONAN CD. Unpredictable chronic stress model in zebrafish (*Danio rerio*): behavioral and physiological responses. **Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry. 2011** Mar 30;35(2):561-7.

PINHEIRO-DA-SILVA J, SILVA PF, NOGUEIRA MB, LUCHIARI AC. Sleep deprivation effects on object discrimination task in zebrafish (*Danio rerio*). **Anim Cogn. Springer Berlin Heidelberg**; 2016; 1–11

PUTY B., MAXIMINO C., BRASIL A., SILVA W. L. L., GOUVEIA A. JR., OLIVEIRA K. R., BATISTA E., CRESPO-LOPEZ M. E., ROCHA F., HERCULANO A. M. Ascorbic Acid Protects Against Anxiogenic-Like Effect Induced by Methylmercury in Zebrafish: Action on the Serotonergic System. **Zebrafish Journal. 2014**; 11 (4): 365-70.

QI J, KIM M, SANCHEZ R, ZIAEE SM, KOHTZ JD, KOH S. Enhanced susceptibility to stress and seizures in GAD65 deficient mice. **PLoS One. 2018** Jan 29;13(1):e0191794.

RECTOR N.A., BOURDEAU D., KITCHEN K., JOSEPH-MASSIAH L. Anxiety disorders: an information guide: a guide for people with anxiety and their families. **Camh. 2005**

REZNIKOV LR, GRILLO CA, PIROLI GG, PASUMARTHI RK, REAGAN LP, FADEL J. Acute stress-mediated increases in extracellular glutamate levels in the rat amygdala: differential effects of antidepressant treatment. **Eur J Neurosci.** 2007;25(10):3109-14.

ROBERTS E, KURIYAMA K. Biochemical-physiological correlations in studies of the c-aminobutyric acid system. **Brain Res.** 1968; 8:1–35.

ROGAWSKI MA, LOSCHER W. The neurobiology of antiepileptic drugs for the treatment of nonepileptic conditions. **Nat Med.** 2004; 10:685–692.

ROOZENDAAL, B., MCEWEN, B. S. & CHATTARJI, S. Stress, memory and the amygdala. *Nat. Rev. Neurosci.* 2009; 10, 423–433.

SAJDYK TJ, SHEKHAR A. Excitatory amino acid receptor antagonists block the cardiovascular and anxiety responses elicited by gamma-aminobutyric acidA receptor blockade in the basolateral amygdala of rats. **J Pharmacol Exp Ther.** 1997;283(2):969-77.

SANDFORD JJ, ARGYROPOULOS SV, NUTT DJ. The psychobiology of anxiolytic drugs: Part 1R Basic neurobiology. **Pharmacol Ther.** 2000;88:197–212.

SCHALLER JL, THOMAS J, RAWLINGS D. Low-dose tiagabine effectiveness in anxiety disorders. **MedGenMed.** 2004;17;6(3):8.

SCHMITT U, HIEMKE C. Effects of GABA-transporter (GAT) inhibitors on rat behaviour in open-field and elevated plus-maze. **Behav Pharmacol.** 1999;10(2):131-7.

SEAL, R. P. & AMARA, S. G. Excitatory amino acid transporters: a family in flux. **Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.** **1999**; 39: 431–456.

SERRA E. L., MEDALHA C. C., Mattioli R. Natural preference of zebrafish (*Danio rerio*) for a dark environment. **Braz J Med Biol Res.****1999**;32:1551–1553.

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.** **1999**; v. 32, p. 1551- 1553.

SHELIN YI. Neuroimaging studies of mood disorder effects on the brain. **Biol Psychiatry** **2003**; 54:338–352.

SHEPHERD RA, WEDLOCK P, WILSON NE. Direct evidence for mediation of an anticonflict effect of baclofen by GABA_B receptors. **Pharmacol Biochem Behav** **1992**; 41:651–653.

SHERIF F, ORELAND L. Effect of the GABA-transaminase inhibitor vigabatrin on exploratory behavior in socially isolated rats. **Behav Brain Res.** **1995**; 72:135–140.

SIEGHART W, FUCHS K, TRETTER V, EBERT V, JECHLINGER M, HOGER H, ADAMIKER D. Structure and subunit composition of GABA(A) receptors. **Neurochem Int.** **1999**; 34:379–385.

SIEGHART W. Structure and pharmacology of gammaaminobutyric acidA receptor subtypes. **Pharmacol.** **1995**; 47: 181–234.

SMOLLER JW, ROSENBAUM JF, BIEDERMAN J, SUSSWEIN LS, KENNEDY J, KAGAN J, SNIDMAN N, LAIRD N, TSUANG MT, FARAONE SV, SCHWARZ

A, SLAUGENHAUPT SA. Genetic association analysis of behavioral inhibition using candidate loci from mouse models. **Am J Med Genet.** **2001**; 105:226–235.

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

STEWART A. M., KALUEFF A. V. The behavioral effects of acute Δ^9 -tetrahydrocannabinol and heroin (diacetylmorphine) exposure in adult zebrafish. **Brain Res.** **2014**; 16;1543:109-19.

STEWART A., BRAUBACH O., SPITSBERGEN J., GERLAI R., KALUEFF A. Zebrafish models for translational neuroscience research: from tank to bedside **Trends Neurosci.** **2014**; May; 37(5): 264–278.

STEWART, A., MAXIMINO, C., MARQUES DE BRITO T., HERCULANO A.M., GOUVEIA A. JR., MORATO S., CACHAT J. M., GAIKWAD S., ELEGANTE M. F., KALUEFF A. V. Neurophenotyping of adult zebrafish using the light/dark box paradigm. **Zebrafish Neurobehavior Protocols.** **2010**; 51: 157-167.

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

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

SWANSON CJ, BURES M, JOHNSON MP, LINDEN AM, MONN JA, SCHOEPP DD. Metabotropic glutamate receptors as novel targets for anxiety and stress disorders. **Nat Rev Drug Discov.** **2005**; 4(2):131-44.

TAKAMORI S. VGLUTs: 'exciting' times for glutamatergic research? **Neurosci Res.** **2006**;55(4):343-51.

TONE A. The Age of Anxiety: A History of America's Turbulent Affair with Tranquilizers. Nova York: **Basic Books, 2008.**

UMEZU T. 1999. Effects of psychoactive drugs in the Vogel conflict test in mice. **Jpn J Pharmacol.** **1999**; 80:111–118.

WALKER, D.L., DAVIS, M. The role of amygdala glutamate receptors in fear learning, fear-potentiated startle, and extinction. **Pharmacol. Biochem. Behav.** **2002**; 71, 379 – 392.

WALLMICHATH, I., AND SZABO, B. Cannabinoids inhibit striatonigral GABAergic neurotransmission in the mouse. **Neuroscience.** **2002**; 113, 671–682.

WIEROŃSKA JM, PILC A. Metabotropic glutamate receptors in the tripartite synapse as a target for new psychotropic drugs. **Neurochem Int.** **2009**; 55(1-3):85-97.

WITTCHEN, H. U. *et al.* The size and burden of mental disorders and other disorders of the brain in Europe. **Eur. Neuropsychopharmacol.** **2010**; 21, 655–679.

WONG K., ELEGANTE M., BARTELS B., ELKHAYAT S., TIEN D., ROY S., GOODSPEED J., SUCIU C., TAN J., GRIMES C., CHUNG A., ROSENBERG M., GAIKWAD S., DENMARK A., JACKSON A., KADRI F., CHUNG K., STEWART A., GILDER T., BEESON E., ZAPOLSKY I., WU N., CACHAT J.,

KALUEFF A.V. Analyzing habituation responses to novelty in zebrafish (*Danio rerio*). **Behav Brain Res.** **2010**; 208: 450-457.

WONG, K., ELEGANTE, M., BARTELS, B., ELKHAYAT, S., TIEN, D., ROY, S., GOODSPEED, J., SUCIU, C., TAN, J.L., GRIMES, C., CHUNG, A., ROSENBERG, M., GAIKWAD, S., DENMARK, A., JACKSON, A., KADRI, F., CHUNG, K.M., STEWART, A., GILDER, T., BEESON, E., ZAPOLSKY, I., WU, N.D., CACHAT, J. & KALUEFF, A.V. Analyzing habituation responses to novelty in zebrafish (*Danio rerio*). **Behav. Brain Res.** **2010**; 208: 450-457.

WULLIMANN, M. F., MUELLER, T. Teleostean and mammalian forebrains contrasted: Evidence from genes to behavior. **Journal of Comparative Neurology.** **2004**; 475, 143–162.

ZHANG, Y., FILIOU, M.D., RECKOW, S., GORMANNS, P., MACCARRONE, G., KESSLER, M.S., FRANK, E., HAMBSCH, B., HOLSBOER, F., LANDGRAF, R., TURCK, C.W. Proteomic and metabolomic profiling of a trait anxiety mouse model implicate affected pathways. **Molecular & Cellular Proteomics.** **2011**; 10, 12.

ZWANZGER P, RUPPRECHT R. Selective GABAergic treatment for panic? Investigations in experimental panic induction and panic disorder. **J Psychiatry Neurosci.** **2005**; 30:167–175.