



Universidade Federal do Pará  
Núcleo de Teoria e Pesquisa do Comportamento  
Programa de Pós-Graduação em Neurociências e Comportamento

**O PAPEL DO RECEPTOR SEROTONINÉRGICO 5-HT<sub>1A</sub> NO  
COMPORTAMENTO TIPO-ANSIEDADE EM ENSAIO  
BIOCOMPORTAMENTAL**

LOANNE VALÉRIA XAVIER BRUCE DE SOUZA

BELÉM-PA

2023

Universidade Federal do Pará  
Núcleo de Teoria e Pesquisa do Comportamento  
Programa de Pós-Graduação em Neurociências e Comportamento

**O PAPEL DO RECEPTOR SEROTONINÉRGICO 5-HT<sub>1A</sub> NO  
COMPORTAMENTO TIPO-ANSIEDADE EM ENSAIO  
BIOCOMPORTAMENTAL**

LOANNE VALÉRIA XAVIER BRUCE DE SOUZA

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Neurociências e Comportamento da Universidade Federal do Pará, como requisito para obtenção de Título de Mestre em Neurociências e Comportamento.

Orientador: Prof. Dr. Caio Maximino de Oliveira  
Coorientadora: Prof<sup>ª</sup>. Dra. Hellen Vivianni Veloso Corrêa

BELÉM

2023

**Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)**

UFPA/Núcleo de Teoria e Pesquisa do Comportamento/Biblioteca

---

S722p Souza, Loanne Valéria Xavier Bruce de, 1997-  
O papel do receptor serotoninérgico 5-ht<sub>1a</sub> no comportamento  
tipo-ansiedade em ensaio biocomportamental / Loanne Valéria  
Xavier Bruce de Souza. — 2023.  
64 f.: il.

Orientador: Caio Maximino de Oliveira

Coorientadora: Hellen Vivianni Veloso Corrêa

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do Pará /  
Núcleo de Teoria e Pesquisa do Comportamento, Programa de  
Pós-Graduação em Neurociências e Comportamento, Belém,  
2023.

1. Análise do comportamento. 2. Psicologia Fisiológica. 3.  
Zebrafish (organismo modelo). 4. Comportamento defensivo. I.  
Título.

---

CDD - 23. ed. 152

Catalogação na fonte: Maria Célia Santana da Silva – CRB2/780

**LOANNE VALÉRIA XAVIER BRUCE DE SOUZA**

**O PAPEL DO RECEPTOR SEROTONINÉRGICO 5-HT<sub>1A</sub> NO  
COMPORTAMENTO TIPO-ANSIEDADE EM ENSAIO  
BIOCOMPORTAMENTAL**

**Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação de Neurociências e Comportamento da Universidade Federal do Pará como requisito parcial para obtenção de título de Mestre em Neurociências e Comportamento.**

**BANCA EXAMINADORA**

Prof. Dr. Caio Maximino de Oliveira

Universidade Federal do Sul e Sudeste do Pará, Orientador.

Prof<sup>a</sup> Dra. Hellen Vivianni Veloso Corrêa

Universidade Federal do Pará, Coorientadora.

Prof<sup>a</sup>. Dra. Mônica Gomes Lima-Maximino,

Universidade Estadual do Pará, campus Marabá (Banca)

Prof. Dr. Fernando Allan de Farias Rocha,

Universidade Federal do Pará (Banca)

**RESULTADO: Aprovada**

Belém, 29 de setembro de 2023

Local e data de defesa

À minha família e aos meus amigos, que sem eles, esta jornada não seria possível.

## AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer a todos que me apoiaram até aqui, minha família, meus amigos, a meu orientador Caio Maximino, a qual eu sou extremamente agradecida pela orientação e oportunidade de aprender de maneira crítica e humana as questões mentais, e fazer parte do Lanec (Laboratório de Neurociências e Comportamento “Frederico Guilherme Graeff”), Unifesspa, e conhecer pessoas maravilhosas integrantes do grupo que me ajudaram desde os experimentos às experiências de vida. Obrigada a todos.

Agradecer ao grupo GERPA (Grupo de estudos da reprodução de peixes Amazônicos), pela parceria e pela oportunidade de ter conhecido pessoas maravilhosas que me acolheram e me ajudaram na construção dessa dissertação de alguma forma, mesmo que através das piadas e do bom humor. Paulo, Maria e Jeane, e a todos os integrantes do grupo, o meu muito obrigada.

À Bruna, que sempre se mostrou sempre solícita aos pedidos de socorro para a realização dos experimentos.

E agradeço especialmente a minha amiga Larissa, que esteve comigo nessa caminhada de mestrado desde o início como mestranda, que me acompanhou nos altos e baixos, e no fim estivemos uma pela outra. Obrigada por sempre me incentivar e fazer acreditar em mim.

Obrigada a todos que, de alguma maneira, apoiaram, incentivaram e/ou viabilizaram a realização desta dissertação.

E por fim, agradeço ao CNPq e a FAPESPA pelo auxílio a essa pesquisa através da concessão de bolsa de estudos.

“Ansiedade é quando sempre faltam muitos minutos para o que quer que seja”.

(Mário Quintana)

Souza, L.V.X.B. (2023). O papel do receptor serotoninérgico tipo 5-HT<sub>1A</sub> no comportamento tipo-ansiedade em ensaio biocomportamental. Dissertação de Mestrado. Programa de Pós-Graduação em Neurociência e Comportamento. Belém-PA, 64 p.

## RESUMO

A ansiedade é uma emoção normal representando uma reação a um perigo potencial, enquanto o medo pode ser definido como uma reação ao perigo real, explícito. Quando patológica, a ansiedade pode trazer prejuízos à qualidade de vida do indivíduo à medida que se torna persistente, incontrolável e inapropriada. Dados epidemiológicos mostram como a ansiedade pode se mostrar prejudicial em níveis tanto econômicos e sociais, além de ser considerada como um problema de saúde pública. Relacionado com algumas funções fisiológicas e comportamentais como estados de ansiedade está o receptor 5-HT<sub>1A</sub>, que faz parte do sistema serotoninérgico (5-HT). A utilização de organismos-modelo para a avaliação de fenômenos biocomportamentais é importante para fundamentar hipóteses sobre as bases biológicas desses fenômenos. Tendo isso em vista, o zebrafish (*Danio rerio* Hamilton 1822), conhecido também como paulistinha ou peixe-zebra, mostra-se um organismo-modelo ideal para estudar o papel deste receptor no comportamento, devido tanto às homologias descritas entre o receptor 5-HT<sub>1A</sub> de mamíferos e de peixes teleósteos quanto às similaridades funcionais do sistema serotoninérgico. Com base na literatura, hipotetizamos que a ativação do receptor 5-HT<sub>1A</sub> irá produzir aumento do comportamento tipo-ansiedade nesse animal. O tratamento de coortes de zebrafish com 8-OH-DPAT, um agonista pleno do receptor 5-HT<sub>1A</sub>, diminuiu o comportamento tipo-ansiedade no teste de distribuição vertical eliciada pela novidade, mas não no teste de preferência claro-escuro, ambos considerados desfechos de comportamento tipo-ansiedade para essa espécie. O mesmo tratamento diminuiu a aproximação social tanto em teste de investigação social quanto em teste de novidade social. Esses efeitos sugerem uma participação de heterorreceptores 5-HT<sub>1A</sub> na ansiedade e na preferência social do zebrafish, diminuindo ambas. Dessa maneira, o estudo desse receptor



revela-se importante para a melhor compreensão do comportamento tipo-ansiedade em zebrafish e sua relação com fenômenos semelhantes em vertebrados.

*Palavras-chave:* zebrafish; organismo modelo; homologia; vertebrados; comportamento defensivo;

Souza, L.V.X.B. (2023). O papel do receptor serotoninérgico tipo 5-HT<sub>1A</sub> no comportamento tipo-ansiedade em ensaio biocomportamental. Dissertação de Mestrado. Programa de Pós-Graduação em Neurociência e Comportamento. Belém-PA, 64 p.

### **ABSTRACT**

Anxiety is a normal emotion representing a reaction to potential danger, whereas fear can be defined as a reaction to real, explicit danger. When pathological, anxiety can be detrimental to an individual's quality of life as it becomes persistent, uncontrollable and inappropriate. Epidemiologic data show how anxiety can be detrimental at both economic and social levels, as well as being considered a public health problem. Related to some physiological and behavioral functions such as anxiety states is the 5-HT<sub>1A</sub> receptor, which is part of the serotonergic (5-HT) system. The use of model organisms for the assessment of biobehavioral phenomena is important to substantiate hypotheses about the biological basis of these phenomena. With this in mind, the zebrafish (*Danio rerio*), also known as paulistinha or zebrafish, is an ideal model organism to study the role of this receptor in behavior, due to both the homologies described between the 5-HT<sub>1A</sub> receptor of mammals and teleost fish and the functional similarities of the serotonergic system. Based on the literature, we hypothesize that activation of the 5-HT<sub>1A</sub> receptor will produce increased anxiety-like behavior in this animal. Treatment of zebrafish cohorts with 8-OH-DPAT, a full agonist of the 5-HT<sub>1A</sub> receptor, decreased anxiety-like behavior in the novelty-elicited vertical distribution test, but not in the light-dark preference test, both considered endpoints of anxiety-like behavior for this species. The same treatment decreased social approach in both the social investigation test and social novelty test. These effects suggest a participation of the 5-HT<sub>1A</sub> heteroreceptors in zebrafish anxiety and social preference, decreasing both. Thus, the study of this receptor is important for a better understanding of anxiety-like behavior in zebrafish and its relationship with similar phenomena in vertebrates.

*Keywords:* zebrafish; model organism; homology; vertebrates; defensive behavior

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Organização do sistema serotoninérgico humano. Projeções serotoninérgicas partindo dos núcleos da Rafe ao estriado e ao neocórtex.....	15
Figura 2 - Ilustração de um neurônio autorreceptor projetando-se a um neurônio pós-sináptico (heterorreceptor) dos receptores de serotonina (5-hidroxitriptamina, 5-HT) 5-HT1A ....	16
Figura 3 - Imagem do peixe zebrafish ( <i>Danio rerio</i> ) .....	20
Figura 4 - Sistema serotoninérgico do zebrafish adulto .....	23
Figura 5 - Esquema visual do tratamento farmacológico .....	28
Figura 6 - Teste de distribuição vertical eliciada pela novidade (DVEN).....	31
Figura 7 - Aparato para o teste claro-escuro.....	32
Figura 8 - Teste de investigação social e interação social. A) Teste de interação social. B) Teste de novidade social .....	35
Figura 9A - 9D - Efeitos do 8-OH-DPAT sobre desfecho primários (A e B) e secundários (C e D) do teste de distribuição eliciado pela novidade (DVEN).....	37
Figura 10A - 10G - Efeitos do 8-OH-DPAT sobre o desfecho primário (A) e desfechos secundários (B-G) do teste de preferência claro-escuro (PCE).....	41
Figura 11A - 11D - Efeitos do 8-OH-DPAT sob os desfechos comportamentais do teste de interação social (IS).....	48
Figura 12A-12D - Efeitos do 8-OH-DPAT sob os desfechos comportamentais no teste de novidade social (NS) .....	52

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Efeitos ansiolíticos da buspirona em zebrafish .....	25
Tabela 2 - Principais medidas observadas no comportamento-tipo ansiedade no zebrafish no teste de distribuição vertical eliciado pela novidade .....	31
Tabela 3 - Principais medidas observadas no comportamento-tipo ansiedade no zebrafish no teste claro/escuro .....	33
Tabela 4 - Medidas observadas no comportamento-tipo ansiedade no zebrafish no teste de interação e novidade social .....	35

## SUMÁRIO

<b>INTRODUÇÃO .....</b>	<b>13</b>
<b>1.1. Serotonina e ansiedade.....</b>	<b>14</b>
<b>1.2. Receptor 5-HT<sub>1A</sub> .....</b>	<b>15</b>
<b>1.3. Ansiedade e evolução: Paradigma para a utilização de organismos-modelos em testes comportamentais .....</b>	<b>18</b>
<b>1.4. O uso do zebrafish no estudo da neurobiologia da ansiedade .....</b>	<b>19</b>
<b>1.5. O sistema serotoninérgico do zebrafish .....</b>	<b>23</b>
<b>OBJETIVOS.....</b>	<b>26</b>
Objetivo geral .....	26
Objetivos específicos.....	26
<b>MATERIAIS E MÉTODOS .....</b>	<b>26</b>
<b>3.1. Animais.....</b>	<b>26</b>
<b>3.2. Tratamento farmacológico.....</b>	<b>28</b>
<b>3.3. Testes comportamentais.....</b>	<b>29</b>
<b>RESULTADOS.....</b>	<b>36</b>
<b>DISCUSSÃO.....</b>	<b>55</b>
<b>CONCLUSÃO E PERSPECTIVAS FUTURAS .....</b>	<b>57</b>
<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>58</b>

## **O papel do receptor serotoninérgico tipo 5-HT<sub>1A</sub> no comportamento tipo-ansiedade em ensaio biocomportamental**

A ansiedade é um comportamento básico que acompanha toda a vida do ser humano e outros vertebrados, caracterizado como uma resposta a uma situação potencialmente perigosa (Sartori, Landgraf & Singewald, 2011). Comumente pode ser relacionada ao medo, que é entendido como uma resposta a uma situação de perigo explícito (Jesuthasan, 2012). Embora os dois possam estar intimamente relacionados, há evidências crescentes que mostram que a ansiedade e o medo são emoções distintas em termos de respostas comportamentais ajustes fisiológicos, e bases neurais (Blanchard & Blanchard, 2008).

Os transtornos de ansiedade podem ser classificados por vários tipos de transtornos de acordo com o Manual Diagnóstico e Estatístico de Transtornos Mentais (DSM-5), como agorafobia, transtorno de pânico, fobias específicas, e transtorno de ansiedade generalizada (TAG) (American Psychiatric Association, 2013). Comorbidades associadas à ansiedade são frequentes, que variam entre outros transtornos psiquiátricos até doenças cardiovasculares e renais. Os transtornos de ansiedade podem prejudicar a vida do indivíduo diariamente já que, por efeito direto ou indireto de crises e sintomas, deixa de realizar suas atividades rotineiras, ocorrendo também rompimentos sociais e abandono de atividades consideradas prazerosas. (Costa, Branco, Vieira, Souza, & Silva, 2019).

Dentre os quadros mentais, os transtornos de ansiedade são a segunda principal causa de incapacitação que mais afeta a população geral (Mangolini, Andrade, & Wang, 2019). Em 2019, 301 milhões de pessoas em todo o mundo estavam vivendo com transtornos de ansiedade (31%), liderando a prevalência global de transtornos mentais em 2019. Sendo mais comum principalmente em mulheres do que em homens (5% comparado a 3% a nível global) com idade de mais de 20 anos (homens com 3.6% comparado com 5.9% em mulheres). Em

2020 esses números aumentaram significativamente por decorrência da pandemia da COVID-19 (Organização Mundial da Saúde, 2022).

De acordo com a OMS (2017), dentre os países da região das Américas, o Brasil é um dos países que mais possuem casos de transtornos de ansiedade, afetando 9,3% da população. Tendo isso em vista, há implicações diretas e indiretas socialmente e economicamente como consequência da ansiedade, como a capacidade reduzida no trabalho e o aumento de ausências laborais.

### **1.1.Serotonina e ansiedade**

Para entender a neurobiologia da ansiedade, é possível compreender a partir de alguns sistemas biológicos do sistema nervoso central (SNC); um deles é do neuromodulador serotonina (5-hidroxitriptamina ou 5-HT) (Maximino, 2012).

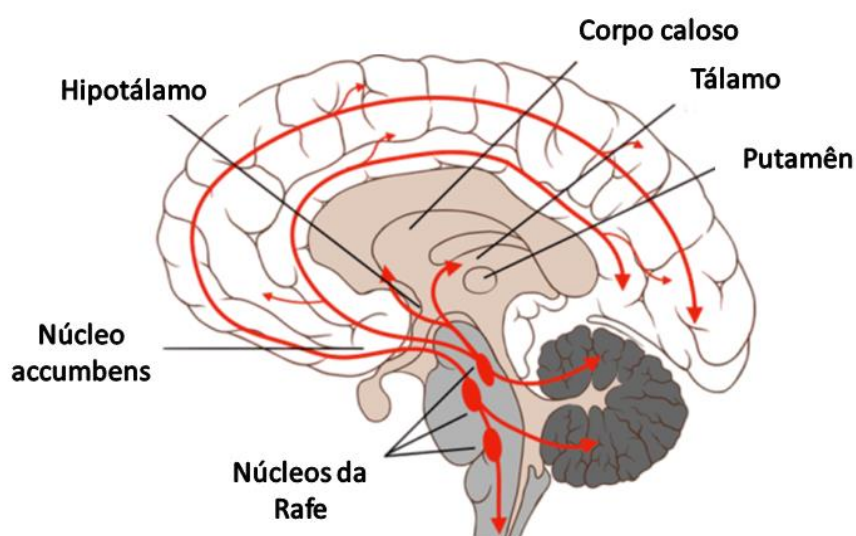
De acordo com a teoria Deakin-Graeff, algumas diferentes subpopulações de neurônios serotoninérgicos no núcleo dorsal da rafe e o núcleo medial da rafe estariam envolvidos de maneira única com a patofisiologia da ansiedade e transtornos afetivos. Isso, por meio de projeções topograficamente organizadas a diferentes áreas do encéfalo (Deakin and Graeff, 1991; Graeff et al., 1996; Paul et al., 2014;). No comportamento tipo-ansiedade, possivelmente mediado pelo núcleo amigdalóide, via receptores serotoninérgicos 5-HT<sub>2</sub> e 5-HT<sub>3</sub>, por projeções do núcleo dorsal da rafe (NDR) que liberam 5-HT, e quando ativados, aumentam o comportamento tipo-ansiedade e medo. Enquanto que, na massa cinzenta periaquedutal (MCP) via receptores 5-HT<sub>1A</sub> e 5-HT<sub>2</sub>, quando ativados, há a diminuição do comportamento tipo-ansiedade e medo (Maximino, 2012).

A teoria Deakin-Graeff postula não somente o “duplo efeito” aparentemente paradoxal da serotonina sobre comportamentos tipo-medo e tipo-ansiedade em relação a diferentes partes do neureixo, mas também a participação diferencial dos receptores de serotonina nesses efeitos. Um desses receptores, o 5-HT<sub>1A</sub>, será analisado nessa dissertação.

Além disso, a 5-HT é também associada a comportamentos como sono, dor, agressão, alimentação, humor e aprendizagem (Lucki, 1998). No encéfalo de mamíferos, a 5-HT é sintetizada nos núcleos da rafe, cujas fibras se projetam para várias estruturas do encéfalo (Figura 1), incluindo o córtex frontal e estruturas do sistema límbico, como hipocampo, complexo amigdalóide e MCP (Gelfuso et al., 2014).

### Figura 1

*Organização do sistema serotoninérgico humano. Projeções serotoninérgicas partindo dos núcleos da Rafe ao estriado e ao neocórtex*



*Nota.* Traduzido e adaptado de Nummenmaa, Seppälä & Putkinen (2022).

### 1.2. Receptor 5-HT<sub>1A</sub>

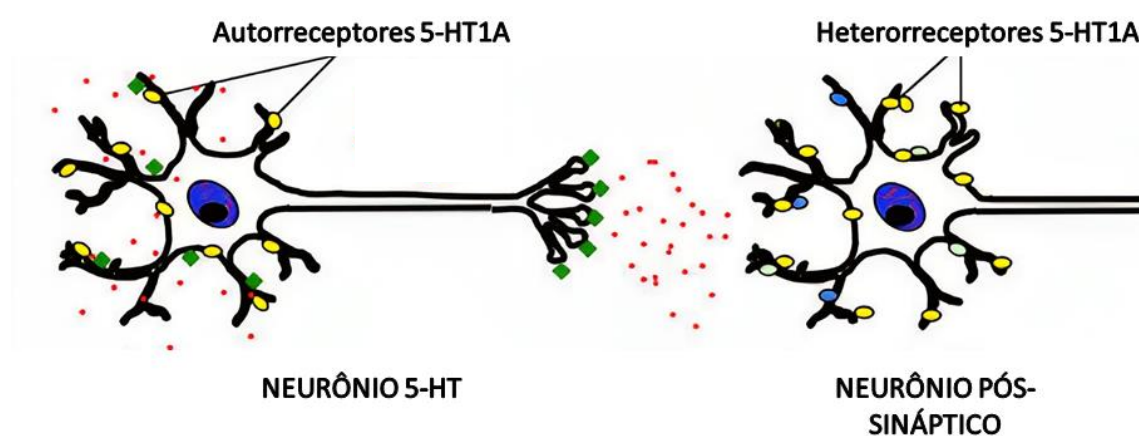
A 5-HT é encontrada tanto no SNC quanto no sistema nervoso periférico (SNP). Em mamíferos há de mais de 14 subtipos de receptores 5-HT marcados por técnicas moleculares e farmacológicas, e que diferem em sua expressão regional e função em mediar ações serotoninérgicas em ações fisiológicas, humorais e emocionais (Sari, 2004; Albert & Vahid-Ansari, 2019). Entre eles, cita-se o receptor 5-HT<sub>1A</sub>, um dos receptores mais abundantes e amplamente expressados no encéfalo e o principal receptor inibitório serotoninérgico (Akimova, Lanzenberger & Kasper, 2009; Albert & Vahid-Ansari, 2019). Esse receptor é o sub-classificado em duas populações, os autorreceptores (promovem um controle inibitório



local do disparo neuronal e da síntese de 5-HT) pré-sinápticos, que estão localizados no corpo celular e nos dendritos de neurônios de 5-HT; e heterorreceptores (modulam a liberação de outros neurotransmissores em neurônios não serotoninérgicos) pós-sinápticos que estão localizados em dendritos e no corpo celular de neurônios não serotoninérgicos em áreas de projeção de 5-HT (Figura 2) (Albert & Vahid-Ansari, 2019).

### Figura 2

*Ilustração de um neurônio autorreceptor projetando-se a um neurônio pós-sináptico (heterorreceptor) dos receptores de serotonina (5-hidroxitriptamina, 5-HT) 5-HT<sub>1A</sub>*



*Nota.* Traduzido e adaptado de Albert, Le François & Millar (2011).

Os receptores 5-HT<sub>1A</sub> são receptores ligados a proteína G inibitórias (Gi/Go), que inibem a adenilil ciclase e reduzem os níveis de cAMP (monofosfato de adenosina 3', 5'-cíclico) (Albert, & Vahid-Ansari., 2019; Haleem, 2019). Dessa forma, são reduzidas a formação de cAMP e a fosforilação da proteína mediada pela proteína cinase. Algumas drogas serotoninérgicas podem ser citadas quando falamos do receptor 5-HT<sub>1A</sub>, principalmente quando relacionado ao comportamento tipo-ansiedade. Azapironas como a buspirona, um agonista parcial do receptor 5-HT<sub>1A</sub>, é indicada para transtornos de ansiedade generalizada (TAG) (Chessick et al., 2006); e o 8-OH-DPAT (8-hidroxi-2-(di-*n*-propilano)tetralina), sendo comumente usado como agonista para avaliar os efeitos comportamentais do receptor 5-HT<sub>1A</sub> (Rock & Parker, 2017).

Doses baixas de 8-OH-DPAT e a buspirona, ativam preferencialmente os autorreceptores 5-HT<sub>1A</sub>, e conseqüentemente, a liberação de 5-HT das terminações nervosas serotoninérgicas diminuem. Portanto, a síntese de 5-HT é reduzida como um mecanismo de feedback. Os heterorreceptores 5-HT<sub>1A</sub> são expressos em muitas regiões do cérebro e a ativação deste, inibe o disparo de neurônios onde esses receptores estão localizados (Haleem, 2019).

Como agonista parcial, a buspirona promove efeitos diferentes em autorreceptores e heterorreceptores devido à diferença na densidade de receptores (maior em neurônios serotoninérgicos do que em neurônios não-serotoninérgicos) e eficácia da ligação receptor-efetor entre populações pré- e pós-sinápticas (Blier et al., 1993; Meller et al., 1990; Yocca et al., 1992). Assim, agonistas parciais agem como agonista pleno em autorreceptores e antagonista em heterorreceptores; de um ponto de vista sistêmico, portanto, o efeito da buspirona leva à inibição da atividade de neurônios serotoninérgicos (e conseqüente diminuição da liberação de 5-HT) associada ao bloqueio dos receptores pós-sinápticos. Agonistas plenos, como o 8-OH-DPAT, parecem agir como agonistas plenos tanto em autorreceptores quanto em heterorreceptores (Sprouse & Aghajanian, 1988), diminuindo a disponibilidade de 5-HT em outros subtipos de receptores ao mesmo tempo em que receptores 5-HT<sub>1A</sub> pós sinápticos são ativados.

Estudos com camundongos com ausência de receptores 5-HT<sub>1A</sub>, demonstraram aumento de evitação nos testes de labirinto em cruz elevado e campo aberto (Piszczyk et al., 2013). Quando esses animais são cruzados com animais que sobre-expressam o receptor em todas as regiões, o fenótipo é parcialmente resgatado; entretanto, o mesmo não ocorre quando os animais são cruzados com indivíduos que sobre-expressam somente na rafe (i.e. na forma de autoreceptor), sugerindo que a retroalimentação negativa causada por esses receptores não é suficiente para modular a ansiedade. Entretanto, como essas linhagens de camundongos

apresentam diferentes níveis do receptor desde a vida embrionária, é possível que esses efeitos se devam ao papel da serotonina na ontogênese de circuitos cerebrais associados à ansiedade e ao estresse (Piszczek et al., 2013).

Em estudo de File e colaboradores (1996), foram usados camundongos adultos para o testes comportamentais de interação social e o labirinto em cruz elevado para medir o comportamento tipo-ansiedade. Para isso, os receptores 5-HT<sub>1A</sub> pré-sinápticos no núcleo mediano da rafe (NMR) e pós-sinápticos na sua área de projeção do hipocampo dorsal, foram testados com microinjeção do agonista 8-OH-DPAT e do antagonista WAY 100635. Como resultado, o 8-OH-DPAT teve efeito ansiolítico em ambos os testes comportamentais quando microinjetado no NMR. O WAY 100635 confirmou a mediação do efeito ansiolítico do receptor 5-HT<sub>1A</sub> pelo papel de antagonista. Enquanto que, no hipocampo dorsal bilateral, o 8-OH-DPAT teve efeito ansiogênico em ambos os testes comportamentais. Isso sugere que, em animais adultos, a ativação de autorreceptores no NMR e heterorreceptores no hipocampo dorsal apresentam papéis opostos.

### **1.3. Ansiedade e evolução: Paradigma para a utilização de organismos-modelos em testes comportamentais**

A ansiedade do ponto de vista da evolução pode ser compreendida principalmente pela seleção natural. Desde que, além de características físicas, estratégias comportamentais foram selecionadas e preservadas ao longo das gerações, culminando em vantagens adaptativas. Nesse sentido, um conjunto básico de comportamentos defensivos compartilhados entre as espécies, podem ser identificados e relacionados à ansiedade humana (Shuhama et al., 2007). Considerando o ambiente semelhante em suas restrições, ao redor do planeta Terra, a evolução convergente ocorreu, e assim sendo possível observar as mesmas estratégias básicas de defesa exibidas por praticamente todos os vertebrados, e até mesmo espécies animais não vertebrados. No entanto, para relacionar as estratégias de defesa animal

à ansiedade humana em termos neurobiológicos, é possível fazê-lo em animais que têm cérebros filogeneticamente relacionados ao encéfalo humano (Shuhama et al., 2007).

Quando relacionada a primatas humanos, a ansiedade do ponto de vista da evolução pode ser relacionada com situações sociais, mas também a perigos não sociais. Em situações de perigo contra cobras, aranhas, existe a evitação ansiosa, que identifica esses animais como um perigo iminente. Agora quando comparamos, por exemplo, com carros e tomadas elétricas, não há a mesma reação, o que indica que a evolução não teve tempo em construir a ansiedade diante a esses perigos. E isso se explica pelo desencontro entre o presente e a Era de Adaptação Evolutiva (EEA), que é o tempo evolutivo em que as adaptações evoluíram (Scott, 2013).

#### **1.4. O uso do zebrafish no estudo da neurobiologia da ansiedade**

Por ser um fenômeno comportamental complexo e com relevância clínica, o estudo da ansiedade em testes comportamentais em animais não-humanos mostra-se necessário à medida que a pesquisa visa aprimorar medicações além de entender o mecanismo para o seu tratamento (Santos & De-Carli, 2018). Dentre os organismos-animais, o zebrafish (*Danio rerio* Hamilton 1822) (Figura 3), também conhecido como paulistinha ou peixe-zebra, é um teleóstéo (3 a 4 cm) tropical de água doce, comumente usado como modelo animal na pesquisa científica devido a ser de pequeno porte, fácil manutenção, econômico para criação e com alta taxa de reprodução, além de apresentar grande homologia com mamíferos (Maximino et al., 2013a). O zebrafish possui todos os neurotransmissores “clássicos” aos vertebrados e o sistema endócrino permite distintas respostas ao estresse (Maximino et al., 2015b; Silveira, Schneider & Hammes, 2012).

**Figura 3**

*Imagem do peixe zebrafish (Danio rerio)*



*Nota.* Imagem da própria autora.

Em zebrafish, o comportamento tipo-ansiedade (ZBC 1.6) é definido:

Comportamento complexo evocado por ambientes/estímulos perigosos ou potencialmente perigosos. Inclui exploração reduzida, e manifesta-se tipicamente em geotaxia (mergulho), tigmotaxia, escototaxia, congelamento, movimentos operculares, mudança de coloração corporal e movimentos erráticos (zigue-zague). Drogas ansiolíticas geralmente reduzem comportamentos tipo-ansiedade, enquanto agentes ansiogênicos potencializam essas respostas [...]. (Kalluef et al., 2013, p. 72)

A definição de comportamento tipo-ansiedade encontrada sugere a observação de diferentes unidades comportamentais em contextos e aparatos diferentes. Como uma maneira de avaliar o comportamento-tipo ansiedade no zebrafish, é possível citar alguns testes comportamentais que são usados para tal. São eles, distribuição vertical eliciado pela novidade (DVEN), teste de preferência claro/escuro (PCE) (Maximino et al., 2010; Fontana et al., 2022; Onarheim et al., 2022) e interação social (IS) e novidade social (NS) (Maximino et al., 2010).

As diferentes unidades comportamentais secundárias comuns nesses testes comportamentais são o nado errático (ZBC 1.51) definido como “comportamento complexo caracterizado por mudanças bruscas de direção ou velocidade”, geralmente ocorre por

exposição a predadores, liberação de sinais de alarme ou reflexo de um estado de ansiedade ou medo. É também observado após episódios de congelamento. Nas larvas de zebrafish, em mudanças repentinas de luz, há presença de movimentos erráticos (Kalluef et al., 2013); e o congelamento (ZBC 1.68) “a interrupção completa dos movimentos (com exceção das guelras e dos olhos) do peixe quando ele está no fundo do tanque”, comumente é resultado de ansiedade no animal ou comportamento submisso, que podem ser avaliados pela latência, frequência e duração do congelamento. Os movimentos operculares nesse comportamento são geralmente frequentes (Kalluef et al., 2013). Os primários e os principais de cada teste serão descritos a seguir.

No DVEN, o animal é exposto a um aquário novo, explorando-o livremente. A tendência natural do zebrafish, nesse contexto, é escapar do topo, potencialmente aversivo em seu habitat original; dessa forma, o estado de ansiedade é refletido na exploração reduzida do topo do aquário (maior latência para alcançar o topo, menos entradas ao topo, mais tempo no fundo) juntamente com elevados movimentos erráticos e congelamento (Stewart, 2012).

A principal medida comportamental analisada de no DVEN é a geotaxia (ZBC 1.46), definida como “movimento/preferência para o fundo do tanque, geralmente em resposta a uma ameaça”. A preferência pelo fundo seria explicada mais pela evitação do topo, do que pela aproximação do fundo; quando expostos em aquários com dois compartimentos diferindo em profundidade, é perceptível a preferência pelo lado mais profundo, enquanto que nenhuma preferência é vista em um aquário com dois compartimentos diferindo em distância (Blaser & Goldsteinholm, 2012). Dessa maneira, a preferência pelo fundo (geotaxia) pode representar um importante comportamento defensivo contra predadores aéreos. (Blaser & Goldsteinholm, 2012).

No teste PCE, o animal é apresentado a um aparato com dois compartimentos com substrato e paredes de cores diferentes (p.ex., preto e branco), e observa-se a preferência por

um dos compartimentos (Maximino et al., 2010). Em condições de alta iluminação ambiental, animais adultos apresentam preferência marcada pelo compartimento escuro. Via de regra, aumentos na preferência por escuridão são interpretadas como efeitos ansiogênicos (aumento de ansiedade), enquanto sua diminuição é interpretada como efeito ansiolítico (diminuição de ansiedade) (Maximino et al., 2010; Fontana et al., 2022; Onarheim et al., 2022).

A medida primária de ansiedade nesse modelo é a escototaxia (ZBC 1.137), definida como “preferência natural por iluminação/ambiente escuro (ou de evitação de iluminação/ambiente claro)”. No teste PCE é representada pela cripsis nos peixes que dependem da distribuição dorsal dos melanóforos na superfície do animal; a presença de melanóforos dorsais e dorsalmente orientados, tendem a minimizar a refração e a reflexão de luz incidente nesses animais, logo reduzindo a eficácia da informação visual para possíveis predadores. Uma coloração críptica adequada requer os antecedentes e comportamentos adequados (nesse teste, a preferência pelo substrato escuro) (Maximino, 2010).

Outro comportamento que pode ser analisado como ansiedade em zebrafish é a tigmotaxia (ZBC 1.173) definida como “uma preferência por ficar próximo à borda/lateral (e evitar as áreas abertas centrais)” (Kalluef et al., 2013).

O teste de investigação social (IS) e novidade social (NS) é considerado que o zebrafish seja um peixe social, isto é, que vive em cardume, visto que ele mostra uma alta coesão social quando comparado com roedores. Independente do ambiente, natural ou laboratorial, o zebrafish forma grupos para maximizar sua eficiência de forrageio e evitar predação. Apenas com duas semanas de vida, o zebrafish juvenil já começa a nadar junto de outros juvenis, dessa forma, já formando grupos sociais (Ogi et al., 2021).

Assim, o teste IS apresenta acesso visual a dois estímulos, um aquário vazio e um aquário com um co-específico não-familiar; nessas condições, o zebrafish tende a passar mais tempo próximo ao co-específico. Os comportamentos analisados são tempo próximo ao

estímulo e tempo longe do estímulo. Na sequência (teste SN), o aquário vazio é substituído por um aquário com um novo co-específico não-familiar, e o zebrafish tende a passar mais tempo investigando esse novo estímulo. O tratamento com buspirona aumenta a preferência pelo co-específico no teste de investigação social, mas não parece mudar a preferência no teste de novidade social. Os comportamentos analisados são o tempo próximo ao novo estímulo e tempo próximo ao co-específico conhecido (Barba-Escobedo & Gould, 2012).

### **1.5. O sistema serotoninérgico do zebrafish**

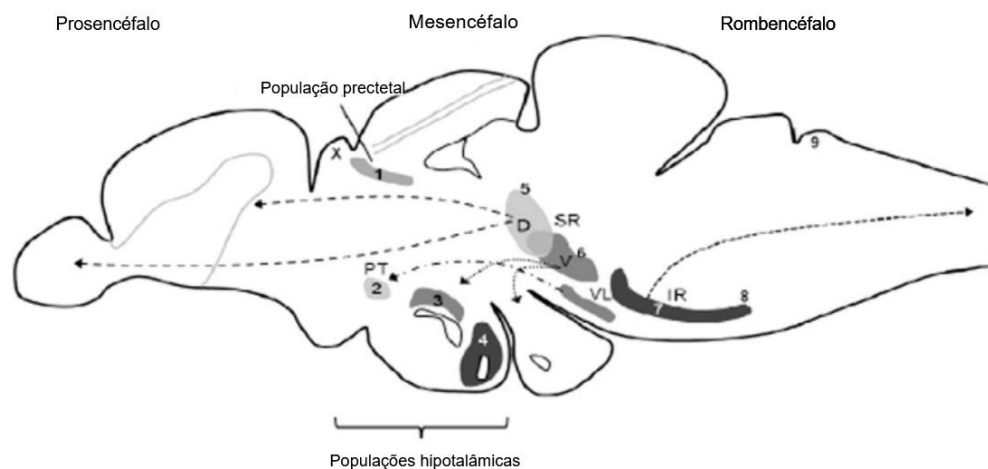
O sistema serotoninérgico é altamente conservado nas espécies de vertebrados, incluindo o zebrafish, porém existem diferenças entre o grau de conservação neuroanatômico e genômico. Dado que, em peixes, anfíbios, répteis, e aves, os neurônios serotoninérgicos encefálicos encontram-se (além da rafe, como nos mamíferos) também em núcleos hipotalâmicos e pré-tectais (Maximino et al, 2013a; Herculano & Maximino, 2014). Nos teleósteos, pelo evento de duplicação de genes (fornece condições para transições evolutivas) na base de radiação dos teleósteos (Taylor et al., 2003) o zebrafish possui três cópias do gene *tph* que codifica triptofano hidroxilase (enzima taxa-limitante da síntese de 5-HT) (Bellipanni et al., 2002), assim como duplicação também no gene *sert* (*serta* e *sertb*), responsável pelo transportador de serotonina (Wang et al., 2006; Norton et al., 2008). Apesar disso, o papel do sistema serotoninérgico parece relativamente conservado no zebrafish (Maximino et al., 2013a; Herculano & Maximino, 2014).

No zebrafish, o sistema serotoninérgico (Figura 4) possui pelo menos três grupos de neurônios serotoninérgicos (núcleos da rafe, populações hipotalâmicas e área pretectal), porém apenas os que estão localizados no rombencéfalo (núcleos da rafe) são encontrados em tetrápodes, incluindo mamíferos (Herculano & Maximino, 2014).

#### **Figura 4**

*Sistema serotoninérgico do zebrafish adulto*





*Nota.* Traduzido de Herculano & Maximino, 2014

Algumas evidências sugerem um papel do receptor 5-HT<sub>1A</sub> no comportamento tipo-ansiedade em zebrafish. Via de regra, a bupiriona produz consistentes efeitos tipo-ansiolíticos em ensaios comportamentais com zebrafish (Tabela 1), independente da via de administração, dose, ou teste.

Maximino et al. (2013b) avaliaram o comportamento caracterizados pela escototaxia (preferência por ambientes escuro em detrimento a ambientes claros) e a geotaxia (a medida de tempo no topo ou no fundo do aparato). Observaram comportamento tipo-ansiedade correlacionado positivamente com níveis extra-celulares de 5-HT no encéfalo no teste DVEN, enquanto que a correlação foi negativa no teste claro/escuro. Essa pesquisa sugere a sensibilidade diferencial desses testes comportamentais para avaliação das drogas serotoninérgicos; alternativamente, a 5-HT pode regular o comportamento do zebrafish de forma diferente nos testes DVEN e no PCE. A bupiriona produziu efeito ansiolítico ao diminuir a permanência no fundo do DVEN, e também aumentando o tempo de permanência no compartimento branco do PCE. Enquanto o WAY 100635 (antagonista pleno do receptor 5-HT<sub>1A</sub>) produziu efeitos ansiolíticos também, por aumentar o tempo no topo no DVEN e no PCE tempo gasto no compartimento branco e diminuiu a tigmotaxia e avaliação de risco.

Nowicki et al. (2014), por outro lado, observaram efeito tipo-ansiogênico no DVEN após tratamento com 4-fluoro-N-[2-[4-(2-metoxifenil)piperazin-1-il]etil]-N-piridin-2-ilbenzamida (MPPF), outro antagonista do receptor 5-HT<sub>1A</sub>.

**Tabela 1**

*Efeitos ansiolíticos da buspirona em zebrafish*

Referência	Dose/concentração	Teste comportamental
Facchin et al., 2015	0 ou 50 mg/L	DVEN
Maaswinkel et al., 2012	0 ou 5 mg/L	DVEN
Gebauer et al., 2011	0-3 mg/L	DVEN Group behavior test
Maximino et al., 2011, 2014	0-50 mg/kg	PCE
Bencan et al., 2009	0-50 mg/L	DVEN
Connors et al., 2014	0-50 mg/L	Labirinto em cruz aquático
Maaswinkel et al., 2013	0-5 mg/L	Group behavior test
Lau et al., 2011	0-13.878 mg/L	PCE
Abozaid & Gerlai, 2022	0-80 mg/L	Exploração em placa de Petri (juvenis)
Hawkey et al., 2021	0-100 µM	DVEN

As discrepâncias em relação aos resultados de experimentos com buspirona, que age como agonista parcial e antagonista do receptor 5-HT<sub>1A</sub> (WAY 100635 e m-MPPF) em zebrafish sugerem que esses efeitos podem se dever à reserva de receptores. Ademais, não

existem estudos com agonistas plenos nessa espécie, e esses estudos são limitados em roedores. Assim, o objetivo do presente trabalho é avaliar o efeito do tratamento com 8-OH-DPAT, um agonista pleno do receptor 5-HT<sub>1A</sub>, em comportamentos relevantes para a ansiedade e para a sociabilidade em zebrafish.

Maximino et al. (2013b) avaliaram o comportamento caracterizados pela escototaxia (preferência por ambientes escuro em detrimento a ambientes claros) e a geotaxia (a medida de tempo no topo ou no fundo do aparato). Observaram comportamento tipo-ansiedade correlacionado positivamente com o 5-HT no teste DVEN, enquanto que a correlação foi negativa no teste claro/escuro. Essa pesquisa sugere a sensibilidade diferencial desses testes comportamentais para avaliação das drogas serotoninérgicos; alternativamente, a 5-HT pode regular o comportamento do zebrafish de forma diferente nos testes DVEN e no PCE.

### **Justificativa**

Apesar de ser um dos receptores mais estudados e mais abundantes do sistema de 5-HT, o 5-HT<sub>1A</sub> é um receptor que está comumente ligado a drogas ansiolíticas (p.ex. buspirona), então sendo importante seu estudo e sua compreensão. Além de que, as consequências econômicas e sociais resultantes do transtorno da ansiedade, é perceptível a necessidade de estudos em prol de uma melhor compreensão aos mecanismos neurobiológicos a nível receptor 5-HT<sub>1A</sub> com a interação do sistema serotoninérgico.

### **Objetivos**

#### **Objetivo geral:**

Avaliar a participação do receptor serotoninérgico 5-HT<sub>1A</sub> no padrão de comportamento tipo-ansiedade em zebrafish.

#### **Objetivos específicos:**

Avaliar os efeitos do 8-OH-DPAT sobre desfechos primários em testes comportamentais de ansiedade em zebrafish (DVEN, PCE).

Avaliar os efeitos do 8-OH-DPAT sobre desfechos secundários de comportamento tipo-medo e sedação em zebrafish (DVEN, PCE).

Analisar os efeitos do 8-OH-DPAT sobre desfechos de aproximação/evitação social em teste de investigação social (IS) e novidade social (NS) em zebrafish.

## **Materiais e Métodos**

### **3.1. Animais**

Foram utilizados 48 zebrafish (*Danio rerio*), linhagem *shortfin*, selvagens adultos (4-6 meses de idade) de ambos os sexos da linhagem obtidos de colônia resultante de cruzamentos entre animais adquiridos em lojas especializadas. O tamanho amostral foi com base de efeito típico para efeitos ansiolíticos em testes comportamentais com zebrafish, ou seja, um tamanho de efeito pequeno. Todos os animais foram mantidos em aquários de 50 L (com uma densidade de 80-100 animais por tanque) e aclimatados em laboratório por um período de 14 dias antes dos experimentos sob condições otimizadas de manutenção. Os aquários foram preenchidos com água decolorada, a qual foi mantida sob aeração e filtração química e mecânica constante a uma temperatura de  $26 \pm 2^\circ\text{C}$  e pH 7,2. A iluminação da sala foi fornecida por lâmpadas fluorescentes, sob um ciclo claro/escuro de 14/10 controlado por fotoperíodo (luzes acesas das 8 às 22 h). Os animais foram alimentados duas vezes por dia com ração comercial flocada. A água dos aquários foi trocada pelo menos duas vezes por semana e a qualidade da mesma foi monitorada utilizando fotômetro. A densidade de animais adotada será de acordo com o protocolo adotado na diretriz brasileira para o cuidado com zebrafish em laboratório (CONSELHO NACIONAL DE CONTROLE DE EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL - CONCEA, 2017). Todos os delineamentos experimentais foram sempre guiados pelos preceitos dos 3 Rs (reposição, refinamento e redução), visando a garantir o melhor aproveitamento e uso de menor número de animais. O projeto foi executado com aprovação do Comitê de Ética em Uso de Animais da UNIFESSPA (Universidade

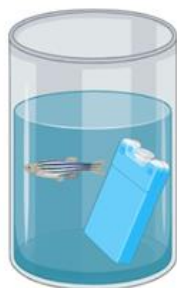
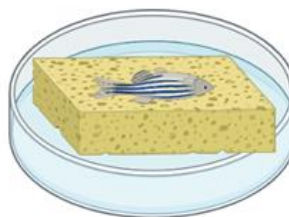
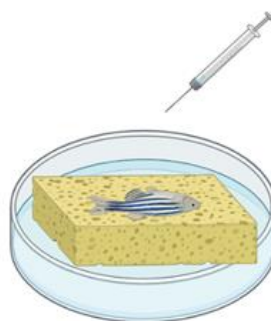
Federal do Sul e Sudeste do Pará) sob o protocolo de nº23479.019576/2022-43; e envolveu pessoal treinado e capacitado. Não foram utilizados zebrafish que demonstraram estar doentes. Foram seguidos critérios de avaliação da saúde do animal pelo protocolo ([https://zebrafish.org/wiki/media/protocols/health/daily\\_monitoring\\_fish\\_morbidity\\_07\\_2015.pdf](https://zebrafish.org/wiki/media/protocols/health/daily_monitoring_fish_morbidity_07_2015.pdf)) fornecido pela *Zebrafish International Resource Center (ZIRC)*, onde foi observado se os animais tinham mudanças físicas e comportamentais como na coloração das escamas, letargia, esfregar-se nas laterais do tanque, presença de ectoparasitas.

### 3.2. Tratamento farmacológico

Para a manipulação farmacológica, foram usados 48 peixes, 24 foram aplicados a solução-veículo (grupo A), com a solução salina de Cortaland (NaCl 124.1 mM, KCl 5,1 mM, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 2.9 Mm, MgSO<sub>4</sub> 1.9 mM, CaCl<sub>2</sub> 1.4 mM, NaHCO<sub>3</sub> 11.9 mM, 1000 unidades de heparina (Perry et al., 1984)). E os outros 24 foram aplicados o agonista do receptor 5-HT<sub>1A</sub>, o agonista 8-hidroxi-2-(di-n-propilamino)tetralina (8-OH-DPAT) (grupo B). Para ambos os tratamentos, as soluções foram injetadas intraperitonealmente em peixes crioanestesiados em água fria em temperatura ~5°C, e uma vez anestesiados, foram posicionados em cama cirúrgica para aplicação da droga serotoninérgica (Figura 5) conforme método descrito por Kinkel et al. (2010). Para ambos os tratamentos, a injeção foi realizada usando uma microseringa (Hamilton 701N, agulha tamanho 26 gauge, calibre em ponta cônica 200, 10 µL), com dose proporcional ao peso corporal do animal (0,3 mg/kg) e volume de injeção de 5 µL. Após a injeção, o peixe ficou em um tanque de recuperação de 2,5L, por 30 min., e em seguida realocado para o aparato comportamental, para o início dos testes.

#### **Figura 5**

*Esquema visual do tratamento farmacológico. O peixe é anestesiado em água fria (crioanestesiado). Uma vez anestesiado ele é posicionado em cama cirúrgica, e então é feita a aplicação da injeção intraperiotoneamene..*

**1) Crioanestesia****2) Cama cirúrgica com o peixe posicionado****3) Injeção intraperitoneal**

*Nota.* Elaborado pela própria autora.

**3.3. Testes comportamentais**

Os testes comportamentais descritos abaixo se propõem a avaliar parâmetros relacionados à sociabilidade, ansiedade sendo que os mesmos foram realizados no período que compreende das 08:00 às 13:00 horas. A iluminação da sala é uma variável crítica, pois pode alterar o comportamento dos peixes, portanto, antes de cada tentativa nos testes, os níveis de luz foram medidos; durante todos os experimentos os níveis médios de iluminação foram de 469 lux (mínimo 423; máximo 552). Para cobrir ruídos injustificados na sala experimental, foi usado ruído branco gaussiano (média 65,2) durante todos os experimentos comportamentais. Tanto a ordem de testes, quanto a ordem dos grupos foi sorteada, de maneira que tirasse o efeito de ordem. Todos os testes comportamentais foram filmados, para posterior transcrição das variáveis.

### **Distribuição vertical eliciada pela novidade**

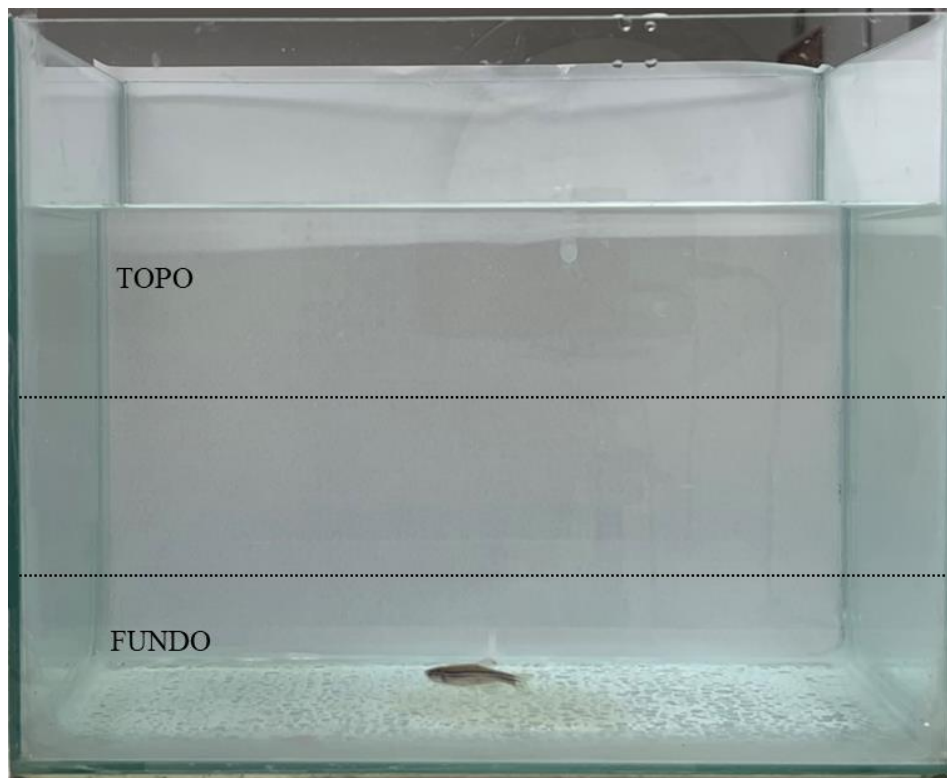
De modo geral, esta tarefa se propõe em avaliar a locomoção/exploração vertical do zebrafish, bem como comportamentos de medo/ansiedade relacionados à resposta à novidade (Cachat et al., 2010; Egan et al., 2009; Levin, Bencan & Cerutti, 2007). A avaliação comportamental dos animais foi realizada de acordo com a metodologia descrita previamente em trabalhos do grupo de pesquisa, nos quais foram avaliados parâmetros relacionados à locomoção e à posição vertical que o animal ocupa no aquário (15 cm x 25 cm x 20 cm; largura, comprimento, altura) de teste (Figura 6).

Foram utilizados 12 zebrafish adultos, onde 6 peixes foram injetados intraperitonealmente com a solução-veículo (solução salina de Cortland), designados por grupo A, e 6 peixes com o agonista dos receptores 5-HT<sub>1A</sub> 8-hidroxi-2-(di-n-propilamino)tetralina (8-OH-DPAT), designados por grupo B.

Logo após a injeção intraperitoneal, o peixe é realocado com uma rede de aquário, para um tanque de recuperação, onde permanece pelo período de 30 min. Em seguida, utilizando a rede de aquário, o peixe é transferido para o aquário de teste, onde permaneceu pelo período de habituação de 6 minutos, onde durante esse tempo, o comportamento do peixe foi gravado, gerando um padrão de perfil exploratório espaço-temporal (Maximino et al., 2013, 2015a). Água declorada foi utilizada tanto para o tanque de recuperação quanto para o aquário de teste. As medidas comportamentais (Tabela 2) (velocidade de nado, nado errático, tempo no topo e tempo no fundo) filmados foram transcritas pelo software The Real Fish Tracker (0.4.0).

### Figura 6

*Teste de distribuição vertical eliciada pela novidade (DVEN) dividido em duas zonas para avaliar o comportamento ansiedade, topo e fundo. Dimensões do aquário 15cm x 25cm x 20 cm.*



*Nota.* Elaborado pela autora.

### Tabela 2

*Principais medidas observadas no comportamento-tipo ansiedade no zebrafish no teste de distribuição vertical eliciado pela novidade*

Teste comportamental	Comportamento observado	Código ZBC	Descrição
DVEN	Geotaxia	1.46	Preferência pelo fundo do aquário, fuga do topo
	Nado errático	1.51	Comportamento complexo onde o nado fica sem direção definida e a velocidade muda abruptamente



### **Teste de preferência claro/escuro**

O comportamento de escototaxia em zebrafish, caracterizado pela preferência por ambientes escuro em detrimento a ambientes claros (figura 6), tem sido descrito e validado como um modelo para a avaliação do comportamento tipo-ansiedade para a espécie (Maximino et al., 2010, 2012, 2014; Araujo et al., 2012; Stewart et al., 2011).

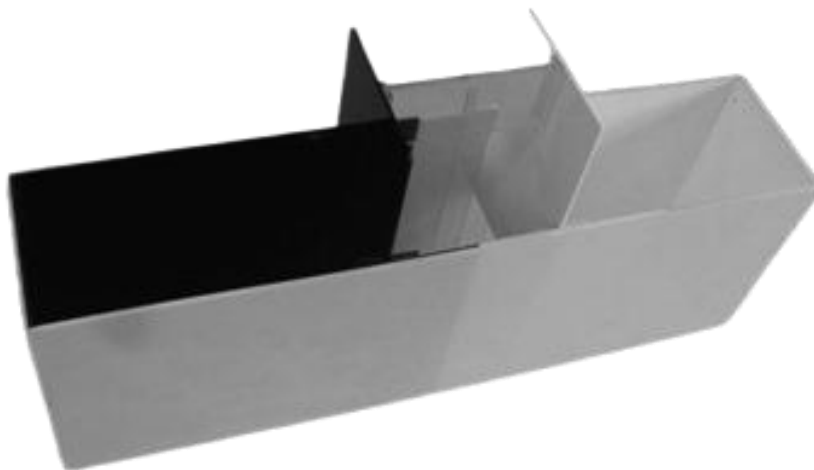
Foram utilizados 12 zebrafish adultos, onde 6 peixes foram injetados intraperitonealmente com a solução-veículo (solução salina de Cortland), designados por grupo A, e 6 peixes com o agonista dos receptores 5-HT<sub>1A</sub> 8-hidroxi-2-(di-n-propilamino)tetralina (8-OH-DPAT), designados por grupo B.

Logo após a injeção intraperitoneal, o peixe é realocado com uma rede de aquário, para um tanque de recuperação, onde permanece pelo período de 30 min. Em seguida, utilizando a rede de aquário, o peixe é transferido para um aparato (15 cm x 10 cm x 45 cm; altura, largura, comprimento) dividido em compartimento branco e compartimento preto, com portinholas no meio, onde o peixe é colocado para aclimatação por 3 min. Após isso, as portinholas são retiradas, e então o peixe é livre para explorar o aparato por 15 min. Foi utilizado o protocolo estabelecido no grupo de pesquisa (<https://dx.doi.org/10.17504/protocols.io.puydnxw>), onde as variáveis analisadas foram tempo de permanência no compartimento branco, avaliação de risco, frequência de nado errático, tempo de congelamento, duração de tigmotaxia, avaliação do número de entradas detalhadas conforme a tabela 3.

Para a análise dos comportamentos filmados, foram utilizados o software The Real Fish Tracker (0.4.0) e X-Plo-Rat.

### **Figura 7**

*Aparato para o teste de preferência claro/escuro, dividido em dois compartimentos (preto e branco), com portinhola móvel para permitir o acesso do peixe ao restante do aparato. Dimensões do aparato 15cm x 10cm x 45cm.*



*Nota.* Adaptado de Maximino (2020).

**Tabela 3**

*Principais medidas observadas no comportamento-tipo ansiedade no zebrafish no teste claro/escuro*

Teste comportamental	Comportamento observado	Código ZBC	Descrição
PCE	Escototaxia	1.137	Preferência pela parte escura do aquário
	Avaliação de risco	n/a	Avaliar o ambiente afim de investigar possíveis ameaças
	Nado errático	1.51	Comportamento complexo onde o nado fica sem direção definida e a velocidade muda abruptamente
	Congelamento	1.68	Completa cessão de movimentos (exceto das brânquias e olhos)
	Tigmotaxia	1.173	Preferência pelas paredes do aquário

	Entradas no branco	1.54	Perfil de exploração do compartimento branco
--	--------------------	------	--

### **Interação social e novidade social**

Os testes de interação e novidade social (Figura 7) foram realizados baseados no protocolo descrito por Barba-Escobedo e Gould (2012). Estas tarefas visam analisar a tendência do zebrafish em aproximar-se de co-específicos e investigar novas situações sociais.

Foram utilizados 24 zebrafish adultos como peixes focais, e 48 como co-específicos no teste, onde 12 animais foram injetados intraperitonealmente com a solução-veículo (solução salina de Cortland), designados por grupo A, e 12 animais com o agonista dos receptores 5-HT<sub>1A</sub> 8-hidroxi-2-(di-n-propilamino)tetralina (8-OH-DPAT), designados por grupo B.

Logo após a injeção intraperitoneal, o peixe é realocado com uma rede de aquário, para um tanque de recuperação, onde permanece pelo período de 30 min. Em seguida, utilizando a rede de aquário, o peixe focal é transferido para o aquário de teste onde permanece por 3 min. para a aclimatação. Para os testes de interação social e novidade social, foram usados três aquários. O aquário principal (15 cm x 25 cm x 20 cm; largura, comprimento, altura), para o animal focal, e outros dois aquários para os co-específicos (15 cm x 17 cm x 16 cm; largura, comprimento, altura) para as suas duas fases operacionais. Ambas laterais do aquário principal foram separadas com barreiras para impedir o acesso visual aos aquários laterais. Assim que o período de aclimatação do peixe terminou, as barreiras foram removidas permitindo acesso visual do peixe focal aos co-específicos.

No teste de interação social (IS), foi avaliado o comportamento concomitante de 1 animal focal por um período inicial de 6 min., no qual este terá acesso visual a um co-

específico desconhecido (i.e., criado em outro aquário) e a um aquário vazio; a preferência por um dos estímulos será medida como um escore de preferência (tempo próximo ao co-específico / tempo próximo ao aquário vazio + tempo próximo ao co-específico).

No teste de novidade social (NS), um novo co-específico foi transferido para o aquário que estava vazio, sendo observada novamente a novidade com duração de 6 min. O teste comportamental filmado foi analisado via o software The Real Fish Tracker (0.4.0), onde as variáveis analisadas no IS foram tempo próximo ao estímulo, tempo longe do estímulo, velocidade de nado e nado errático; no NS, tempo próximo ao novo estímulo, tempo próximo ao co-específico conhecido, velocidade de nado e nado errático.

No teste de IS o animal deve escolher entre um ou mais co-específicos e um tanque vazio, enquanto que, no teste NS, os animais devem escolher entre o co-específico que foi previamente mostrado e um novo co-específico (Barba-Escobedo & Gould, 2012).

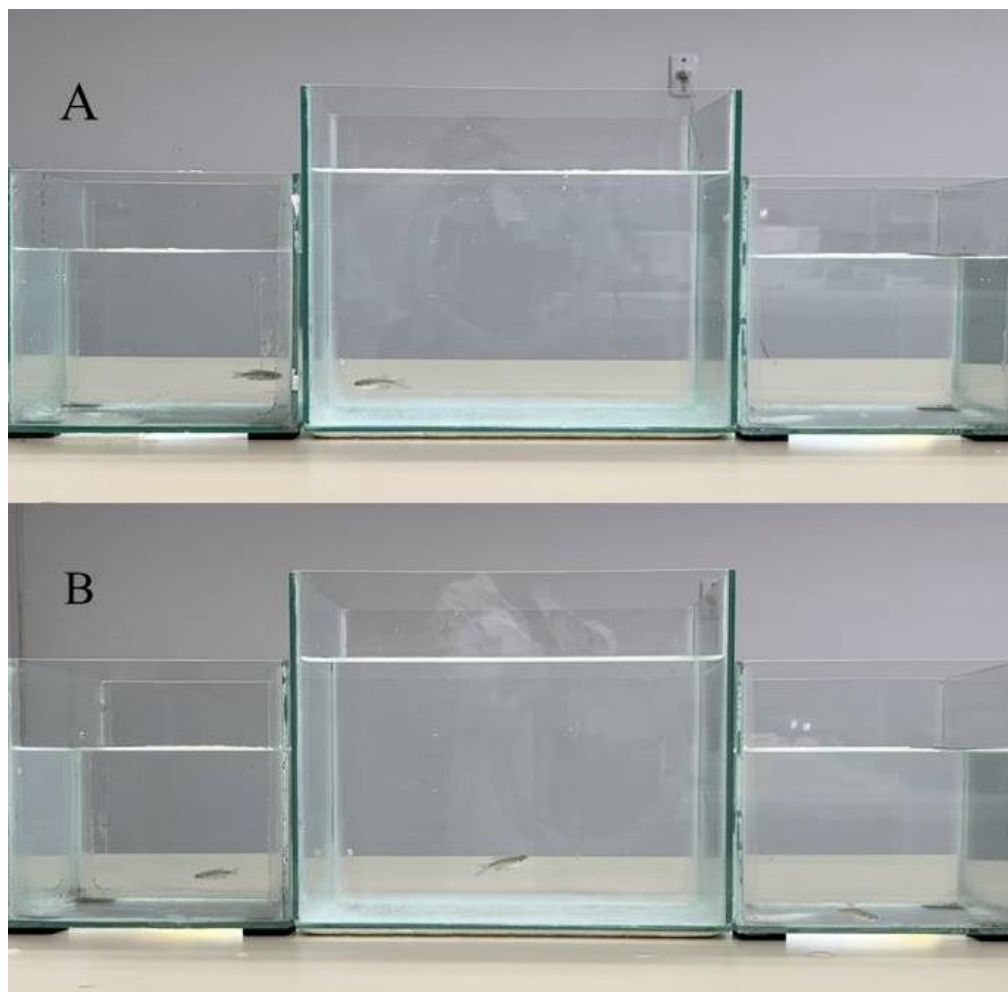
#### **Tabela 4**

*Medidas observadas no comportamento-tipo ansiedade no zebrafish no teste de interação e novidade social*

Teste comportamental	Comportamento observado	Código ZBC	Descrição
IS/NS	Nado errático	1.51	Comportamento complexo onde o nado fica sem direção definida e a velocidade muda abruptamente

#### **Figura 8**

*Teste de investigação social e interação social. A) Teste de interação social, com o animal focal no aquário do centro, com os aquários laterais, um a esquerda com o co-específico e outro vazio a direita. B) Teste de novidade social, com a introdução de um novo co-específico no aquário vazio a direita. Dimensões do aquário principal 15cm x 25 cm x 20 cm*



*Nota.* Elaborado pela própria autora.

### **Análise estatística**

Os resultados obtidos pelos testes comportamentais foram analisados através de teste *t* não-pareados. Os dados foram representados como pontos individuais sobrepostos sobre média  $\pm$  intervalo de confiança de 95% (paramétricos) ou sobre mediana  $\pm$  intervalo interquartil (não paramétricos). Valores de  $p \leq 0,05$  foram considerados estatisticamente significativos. Para a análise dos resultados, foi utilizado o programa R 3.4.4.

### **Resultados**

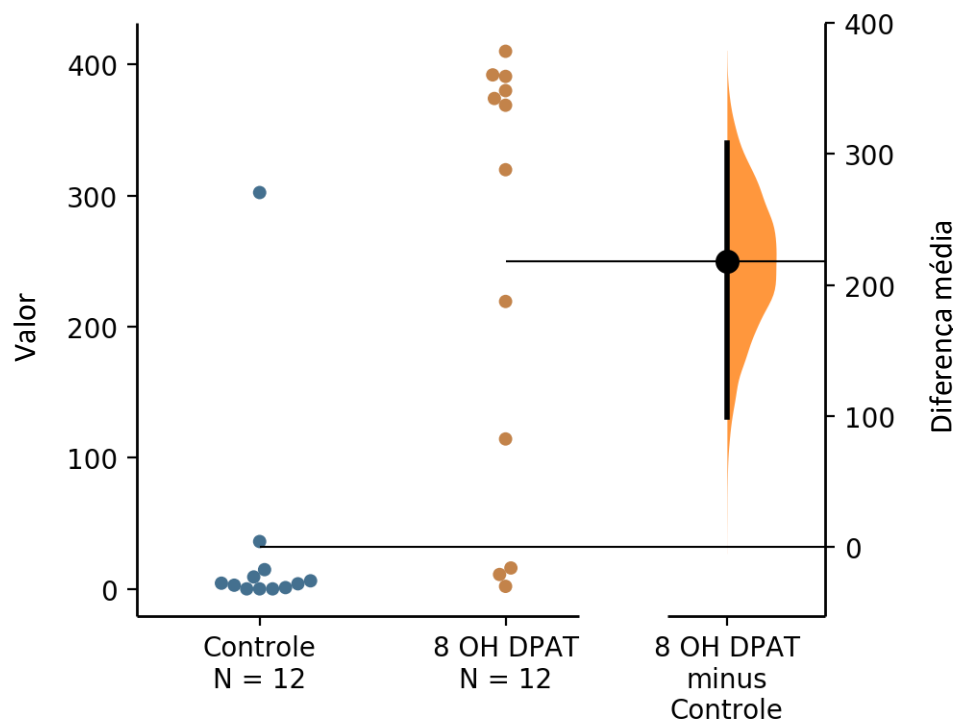
#### **Distribuição eliciada pela novidade**

Houve diferenças significativas entre os grupo controle e o grupo tratado com 8-OH-DPAT no DVEN, em variáveis como tempo no topo ( $t_{(16.39)} = -4,00$ ,  $p < 000.1$ ,  $d = -1.6$ ,

IC95%[-333.22, 103,014]), onde o grupo tratados com o 8-OH-DPAT passaram mais tempo no topo do aparato e menos tempo no fundo ( $t_{(22)} =$ ,  $p < 0,001$ ,  $d = 2,13$ , IC 95%[147,98, 342,95]) quando comparado com o grupo-controle, sugerindo efeito ansiolítico causado pela droga. Não foram observados efeitos significativos do 8-OH-DPAT (Figuras 9A-9D) nas variáveis de nado errático ( $t_{(22)} = -0.16$ ,  $p=0.87$ ,  $d = -0.06$ , IC95%[-4.59, 3.94]) e velocidade de nado ( $t_{(22)}=0.97$ ,  $p=0.34$ ,  $d=0.39$ , IC95%[-0.71, 1.96]).

### Figura 9A

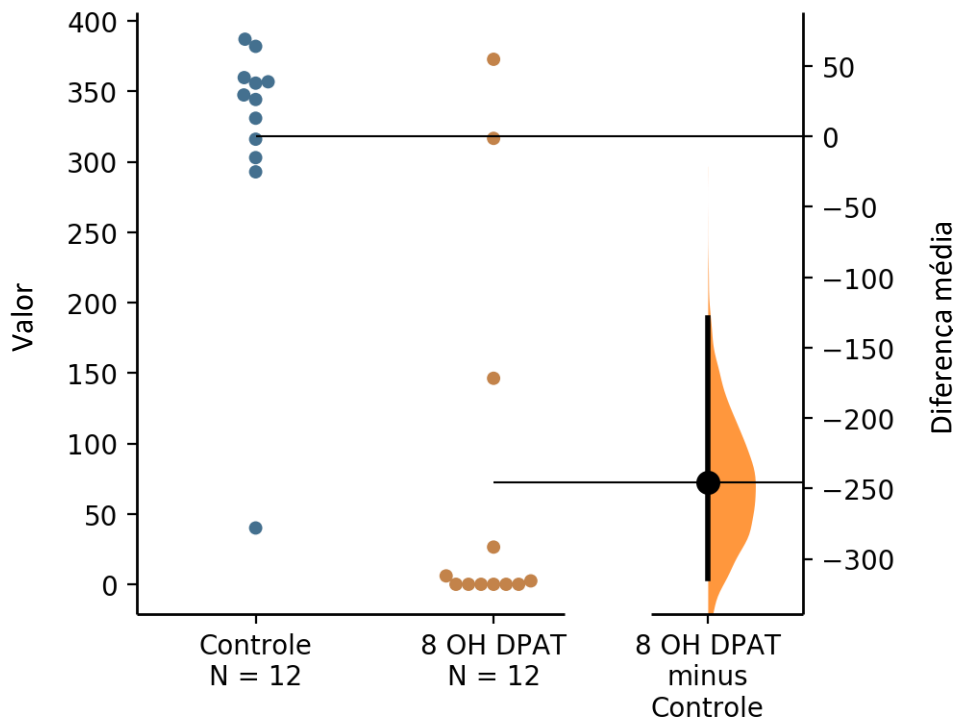
*Efeitos do 8-OH-DPAT sobre desfecho primário (tempo no topo) do teste de distribuição eliciado pela novidade (DVEN)*



Efeito do tratamento com 8-OH-DPAT (0,3 mg/kg) no tempo no topo no DVEN. A diferença média entre o grupo-controle e o grupo 8-OH-DPAT é apresentada no gráfico de estimativa de Gardner-Altman acima. Ambos os grupos são representados nos eixos à esquerda; a diferença média é representada num eixo flutuante à direita como uma distribuição de amostragem bootstrap. A diferença média é representada como um ponto; o intervalo de confiança de 95% é indicado pelas extremidades da barra de erro vertical.

### Figura 9B

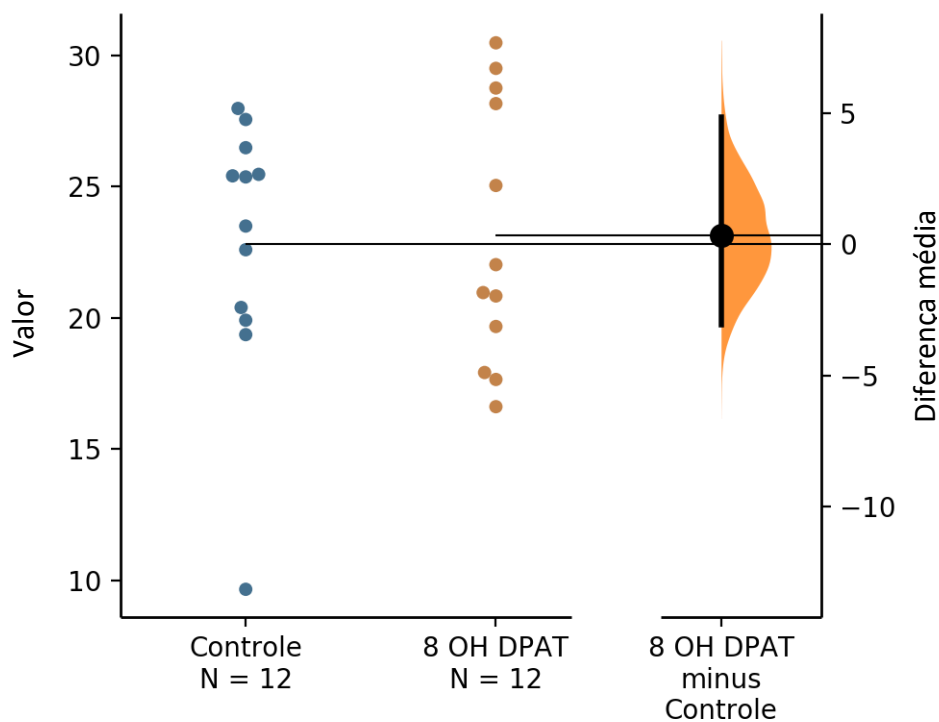
*Efeitos do 8-OH-DPAT sobre desfecho primário (tempo no fundo) do teste de distribuição eliciado pela novidade (DVEN)*



Efeito do tratamento com 8-OH-DPAT (0,3 mg/kg) no tempo no fundo no DVEN. A diferença média entre o grupo-controle e o grupo 8-OH-DPAT é apresentada no gráfico de estimativa de Gardner-Altman acima. Ambos os grupos são representados nos eixos à esquerda; a diferença média é representada num eixo flutuante à direita como uma distribuição de amostragem bootstrap. A diferença média é representada como um ponto; o intervalo de confiança de 95% é indicado pelas extremidades da barra de erro vertical.

### Figura 9C

*Efeitos do 8-OH-DPAT sobre desfecho secundário (nado errático) do teste de distribuição eliciado pela novidade (DVEN)*

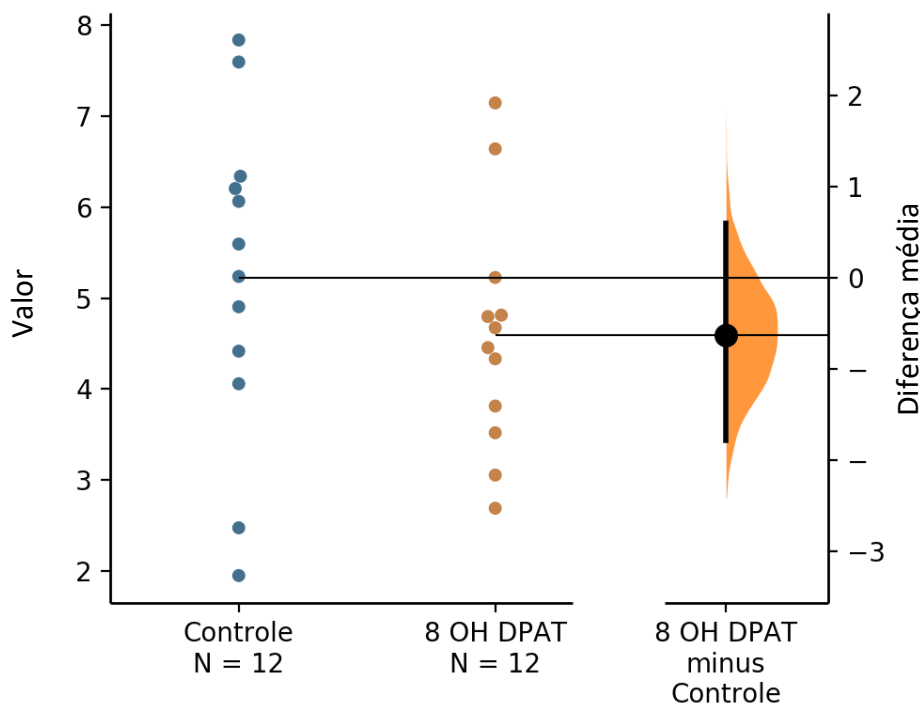


Efeito do tratamento com 8-OH-DPAT (0,3 mg/kg) no nado errático no DVEN. A diferença média entre o grupo-controle e o grupo 8-OH-DPAT é apresentada no gráfico de estimativa de Gardner-Altman acima. Ambos os grupos são representados nos eixos à esquerda; a diferença média é representada num eixo flutuante à direita como uma distribuição de amostragem bootstrap. A diferença média é representada como um ponto; o intervalo de confiança de 95% é indicado pelas extremidades da barra de erro vertical.



## Figura 9D

*Efeito do 8-OH-DPAT sobre desfecho secundário (velocidade de nado) do teste de distribuição eliciado pela novidade (DVEN)*



Efeito do tratamento com 8-OH-DPAT (0,3 mg/kg) na velocidade de nado no DVEN. A diferença média entre o grupo-controle e o grupo 8-OH-DPAT é apresentada no gráfico de estimativa de Gardner-Altman acima. Ambos os grupos são representados nos eixos à esquerda; a diferença média é representada num eixo flutuante à direita como uma distribuição de amostragem bootstrap. A diferença média é representada como um ponto; o intervalo de confiança de 95% é indicado pelas extremidades da barra de erro vertical.

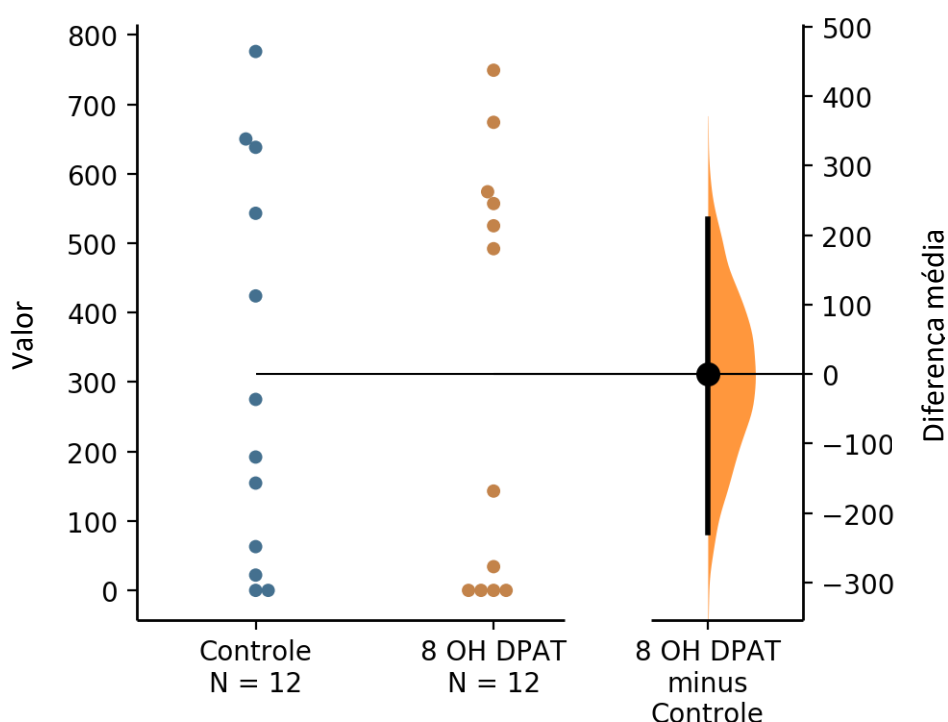
### Teste de preferência claro/escuro

Os resultados obtidos demonstraram que não houveram diferenças significativas entre o grupo aplicado com o agonista 8-OH-DPAT e o grupo controle em nenhuma variável. Variáveis medidas foram: tempo no claro ( $t_{(20)} = -0.184$ ,  $p = 0.85$ ,  $d = -1.6$ ,  $IC_{95\%}[-333.22, 0.763]$ ), avaliação de risco ( $t_{(22)} = 1.77$ ,  $p = 0.09$ ,  $d = 0.72$ ,  $IC_{95\%}[-0.1435, 1.565]$ ), entradas no branco ( $t_{(22)} = 0.55$ ,  $p = 0.58$ ,  $d = 0.22$ ,  $IC_{95\%}[-0.5844, 1.027]$ ), nado errático ( $t_{(22)} = 0.72$ ,  $p = 0.47$ ,  $d = -0.07$ ,  $IC_{95\%}[-0.9168, 1.100]$ ), frequência de nado errático ( $t_{(22)} = 2.06$ ,  $p = 0.051$ ,  $d = -1.6$ ,  $IC_{95\%}[-0.5844, 1.027]$ ), tempo de congelamento ( $t_{(22)} = 0.20$ ,  $p = 0.79$ ,  $d = 0.79$ ,  $IC_{95\%}[-$

0.9080, 0.695]), avaliação de risco ( $t_{(22)}= 1.77$ ,  $p=0.09$ ,  $d= 0.72$  ,  $IC95\%[-0.1435, 1.565]$ ), tigmotaxia ( $t_{(22)}= 0.20$ ,  $p=0.84$ ,  $d= 0.84$ ,  $IC95\%[-0.7200, 0.882]$ ) e velocidade de nado ( $t_{(22)}= 1.71$ ,  $p = 0.10$ ,  $d= 0.69$ ,  $IC95\%[-0.1663, 1.535]$ ). Essas figuras são apresentados nas Figuras 10A-10G.

### Figura 10A

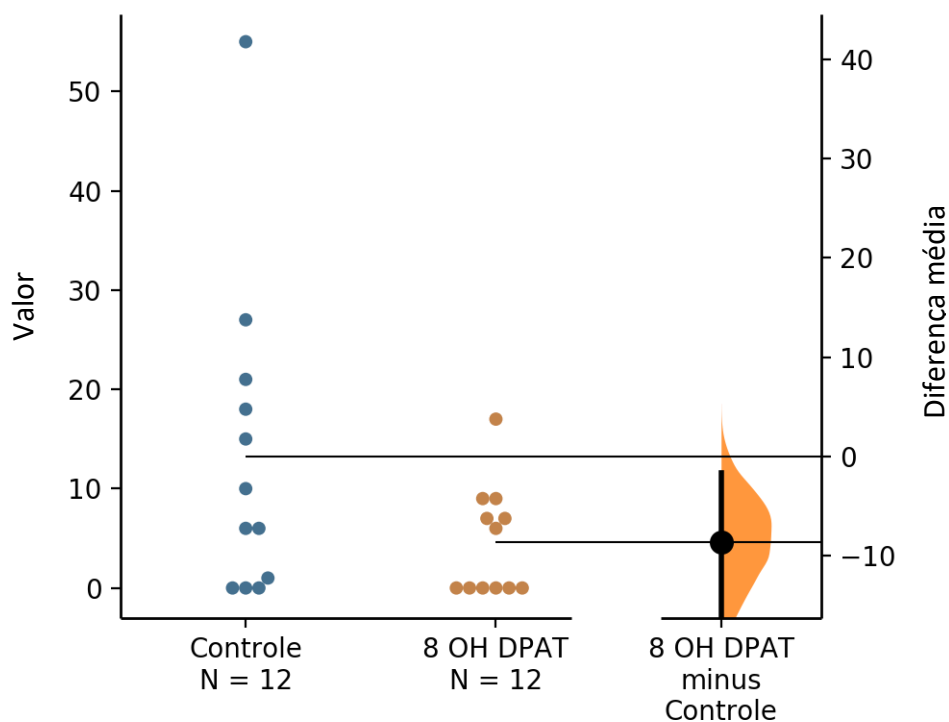
*Efeitos do 8-OH-DPAT sobre o desfecho primário (tempo no claro) do teste de preferência claro-escuro (PCE)*



Efeito do tratamento com 8-OH-DPAT (0,3 mg/kg) no tempo no claro no PCE. A diferença média entre o grupo-controle e o grupo 8-OH-DPAT é apresentada no gráfico de estimativa de Gardner-Altman acima. Ambos os grupos são representados nos eixos à esquerda; a diferença média é representada num eixo flutuante à direita como uma distribuição de amostragem bootstrap. A diferença média é representada como um ponto; o intervalo de confiança de 95% é indicado pelas extremidades da barra de erro vertical.

**Figura 10B**

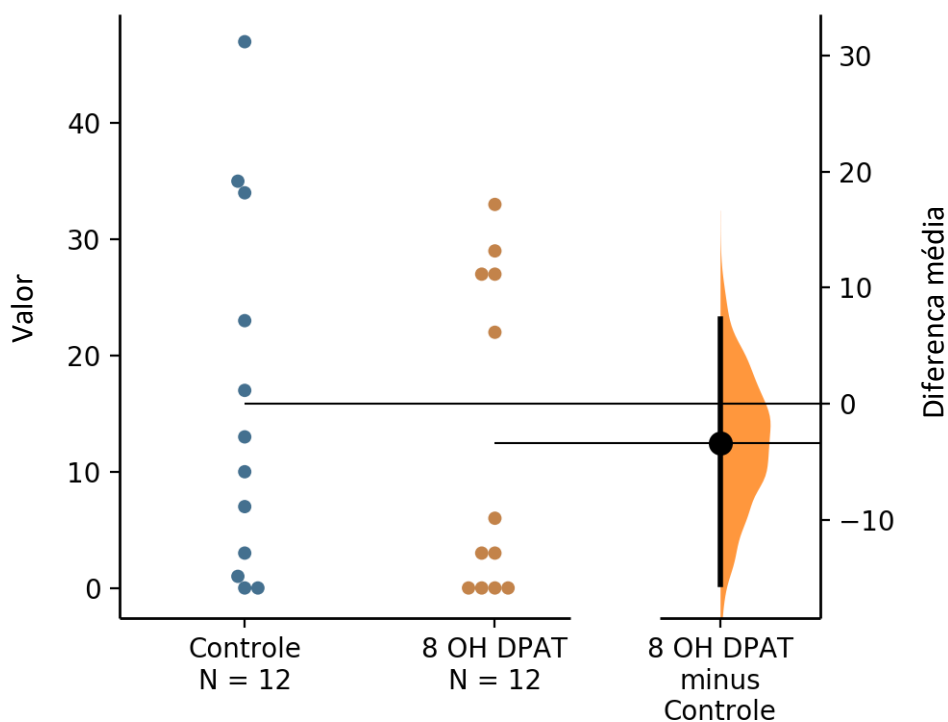
*Efeitos do 8-OH-DPAT sobre o desfecho secundário (avaliação de risco) do teste de preferência claro-escuro (PCE)*



Efeito do tratamento com 8-OH-DPAT (0,3 mg/kg) na avaliação de risco no PCE. A diferença média entre o grupo-controle e o grupo 8-OH-DPAT é apresentada no gráfico de estimativa de Gardner-Altman acima. Ambos os grupos são representados nos eixos à esquerda; a diferença média é representada num eixo flutuante à direita como uma distribuição de amostragem bootstrap. A diferença média é representada como um ponto; o intervalo de confiança de 95% é indicado pelas extremidades da barra de erro vertical.

### Figura 10C

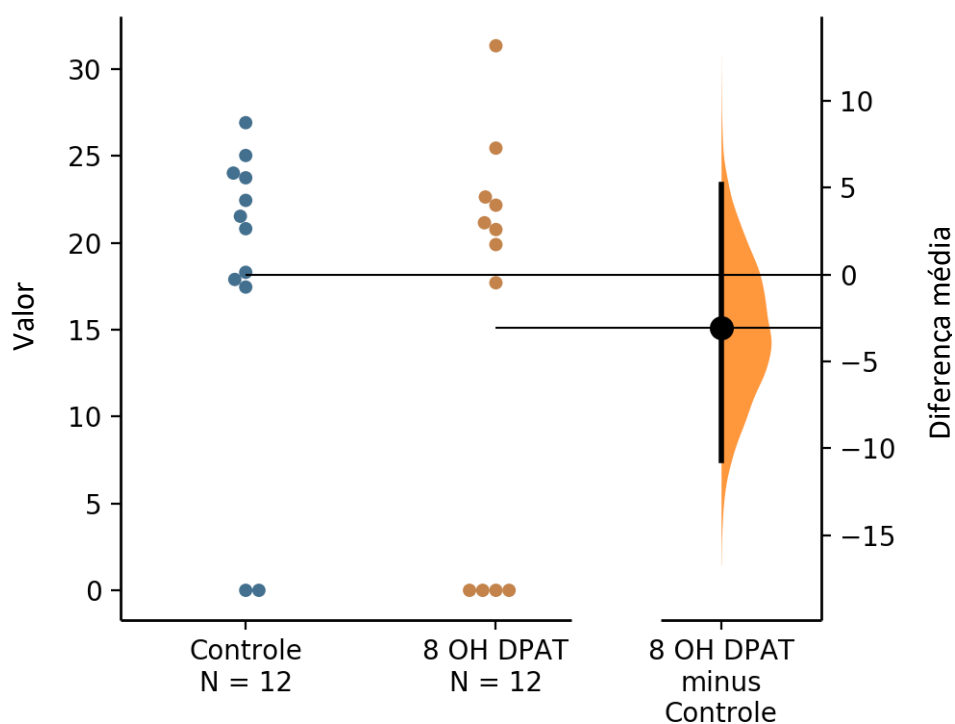
*Efeitos do 8-OH-DPAT sobre o desfecho secundário (entradas no branco) do teste de preferência claro-escuro (PCE)*



Efeito do tratamento com 8-OH-DPAT (0,3 mg/kg) em entradas no branco no PCE. A diferença média entre o grupo-controle e o grupo 8-OH-DPAT é apresentada no gráfico de estimativa de Gardner-Altman acima. Ambos os grupos são representados nos eixos à esquerda; a diferença média é representada num eixo flutuante à direita como uma distribuição de amostragem bootstrap. A diferença média é representada como um ponto; o intervalo de confiança de 95% é indicado pelas extremidades da barra de erro vertical.

**Figura 10D**

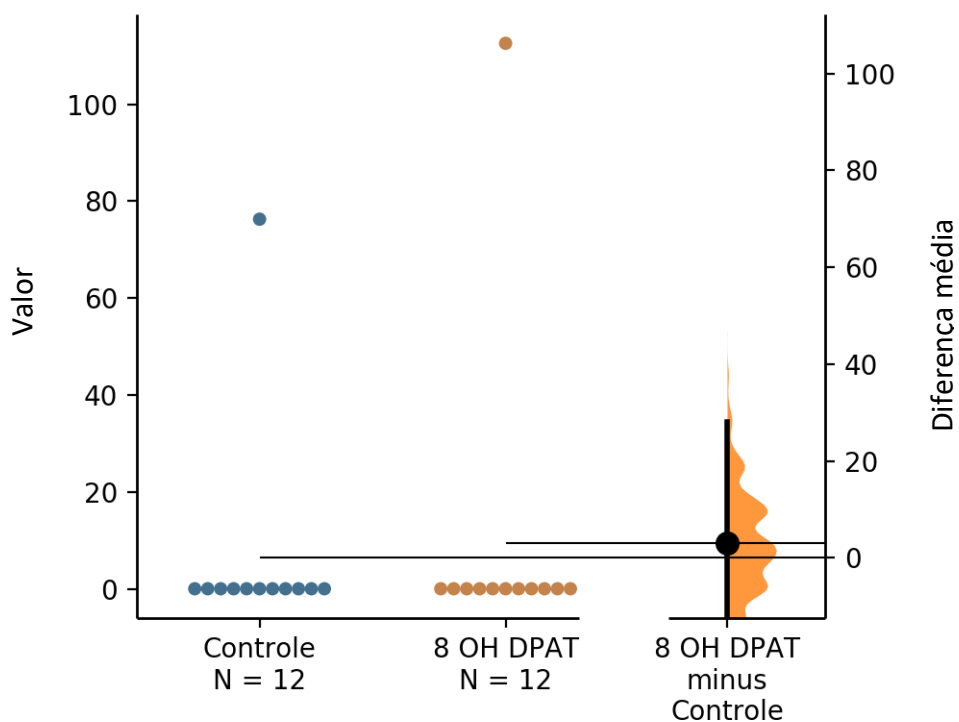
*Efeitos do 8-OH-DPAT sobre o desfecho secundário (nado errático) do teste de preferência claro-escuro (PCE)*



Efeito do tratamento com 8-OH-DPAT (0,3 mg/kg) nado errático no PCE. A diferença média entre o grupo-controle e o grupo 8-OH-DPAT é apresentada no gráfico de estimativa de Gardner-Altman acima. Ambos os grupos são representados nos eixos à esquerda; a diferença média é representada num eixo flutuante à direita como uma distribuição de amostragem bootstrap. A diferença média é representada como um ponto; o intervalo de confiança de 95% é indicado pelas extremidades da barra de erro vertical.

**Figura 10E**

*Efeitos do 8-OH-DPAT sobre o desfecho secundário (tempo de congelamento) do teste de preferência claro-escuro (PCE)*

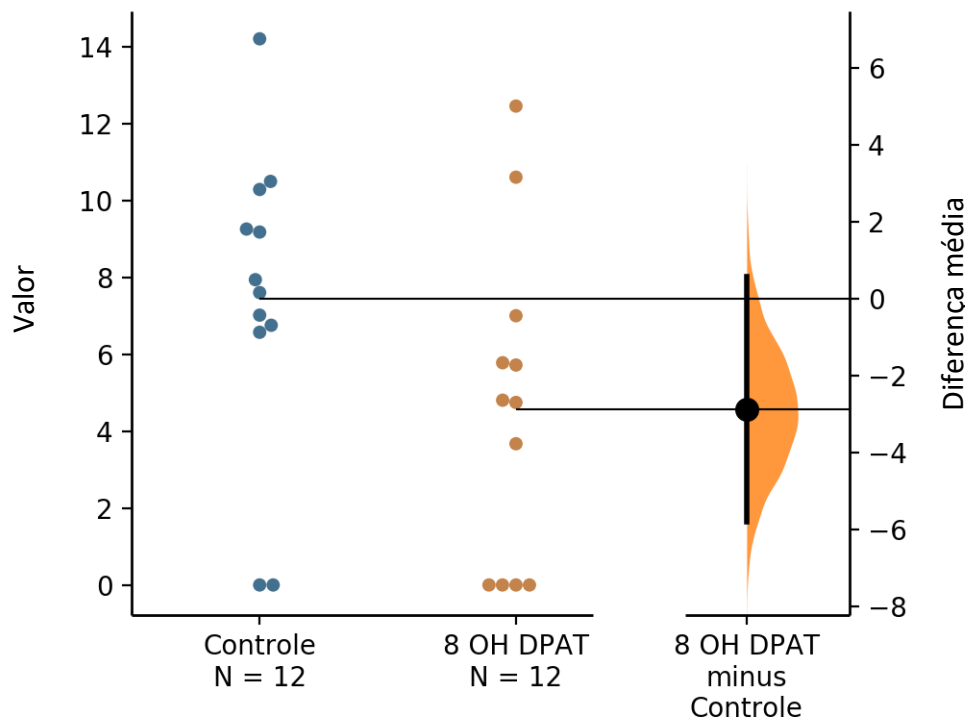


Efeito do tratamento com 8-OH-DPAT (0,3 mg/kg) no tempo de congelamento no PCE. A diferença média entre o grupo-controle e o grupo 8-OH-DPAT é apresentada no gráfico de estimativa de Gardner-Altman acima. Ambos os grupos são representados nos eixos à esquerda; a diferença média é representada num eixo flutuante à direita como uma distribuição de amostragem bootstrap. A diferença média é representada como um ponto; o intervalo de confiança de 95% é indicado pelas extremidades da barra de erro vertical.



## Figura 10G

*Efeitos do 8-OH-DPAT sobre o desfecho secundário (velocidade de nado) do teste de preferência claro-escuro (PCE)*



Efeito do tratamento com 8-OH-DPAT (0,3 mg/kg) na velocidade de nado no PCE. A diferença média entre o grupo-controle e o grupo 8-OH-DPAT é apresentada no gráfico de estimativa de Gardner-Altman acima. Ambos os grupos são representados nos eixos à esquerda; a diferença média é representada num eixo flutuante à direita como uma distribuição de amostragem bootstrap. A diferença média é representada como um ponto; o intervalo de confiança de 95% é indicado pelas extremidades da barra de erro vertical.

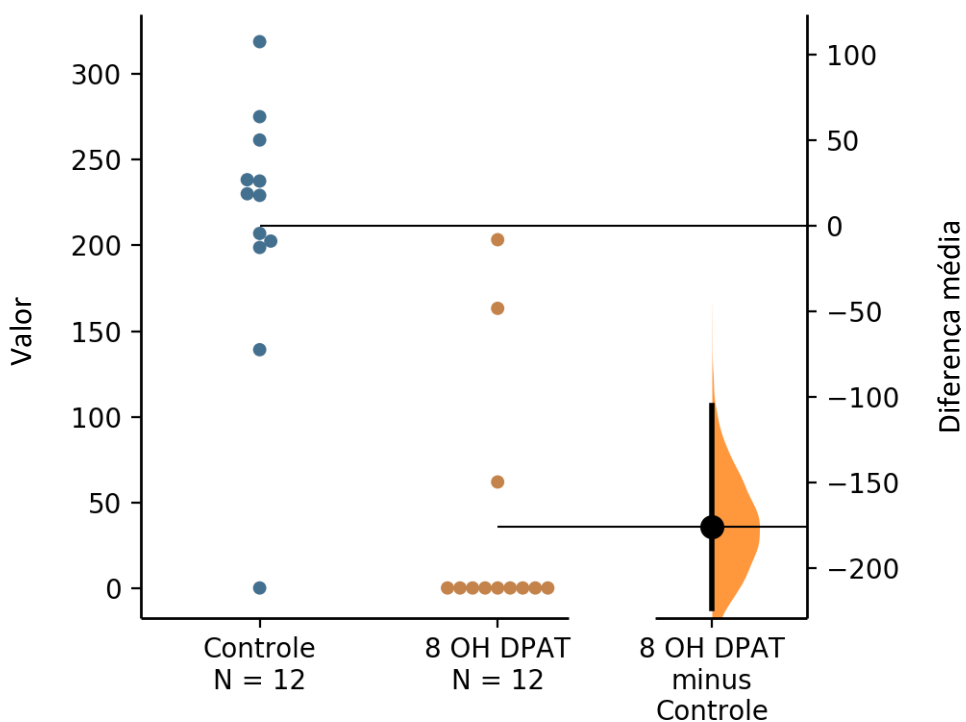
### Interação social e novidade social

No teste de interação social, efeitos significativos do 8-OH-DPAT foram observados no tempo próximo ao estímulo estranho ( $t_{(22)}=5.67$ ,  $p < 0.001$ ,  $d=2.23$ ,  $IC95\%[111.53, 240,18]$ ) e no tempo longe do estímulo ( $t_{(21.33)}=$ ,  $p=0.04$ ,  $d=0.83$ ,  $IC95\%[1.32, 56.06]$ ). Também foram observados efeitos do 8-OH-DPAT no nado errático ( $t_{(22)}=4.08$ ,  $p < 0.001$ ,  $d=1.67$ ,  $IC95\%[7.96, 24.44]$ ) e na velocidade de nado ( $t_{(22)}=2.78$ ,  $p=0.011$ ,  $d=1.05$ ,  $IC95\%[0.69, 4.74]$ ). Esses efeitos estão sumarizados nas Figuras 11A-11D.



**Figura 11A**

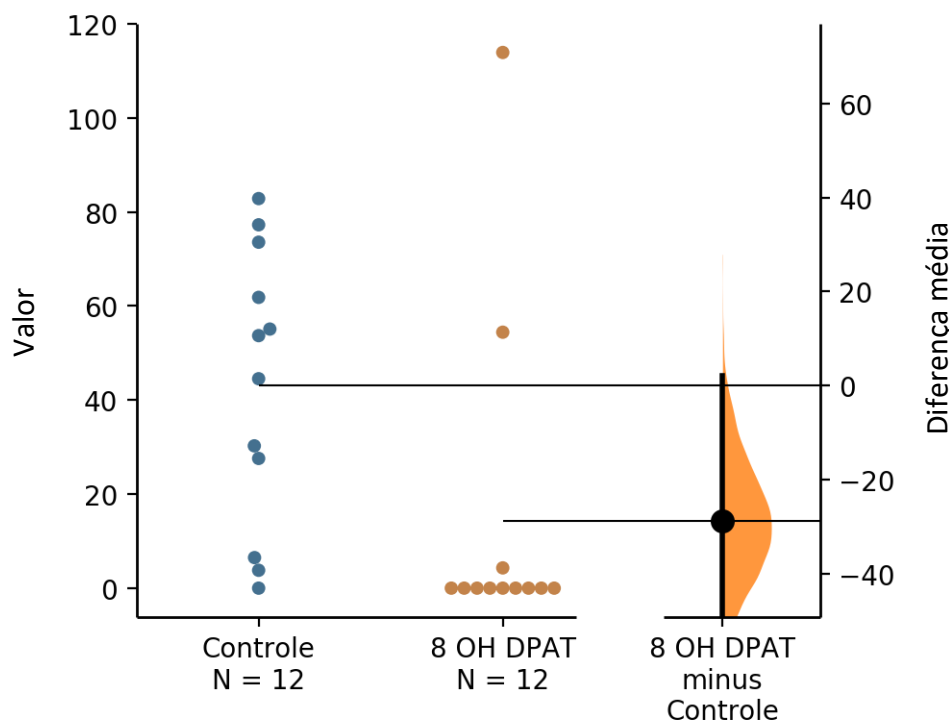
*Efeitos do 8-OH-DPAT sob o desfecho comportamental (tempo próximo ao estímulo estranho) do teste de interação social (IS)*



Efeito do tratamento com 8-OH-DPAT (0,3 mg/kg) no tempo próximo ao estímulo estranho no teste IS. A diferença média entre o grupo-controle e o grupo 8-OH-DPAT é apresentada no gráfico de estimativa de Gardner-Altman acima. Ambos os grupos são representados nos eixos à esquerda; a diferença média é representada num eixo flutuante à direita como uma distribuição de amostragem bootstrap. A diferença média é representada como um ponto; o intervalo de confiança de 95% é indicado pelas extremidades da barra de erro vertical.

**Figura 11B**

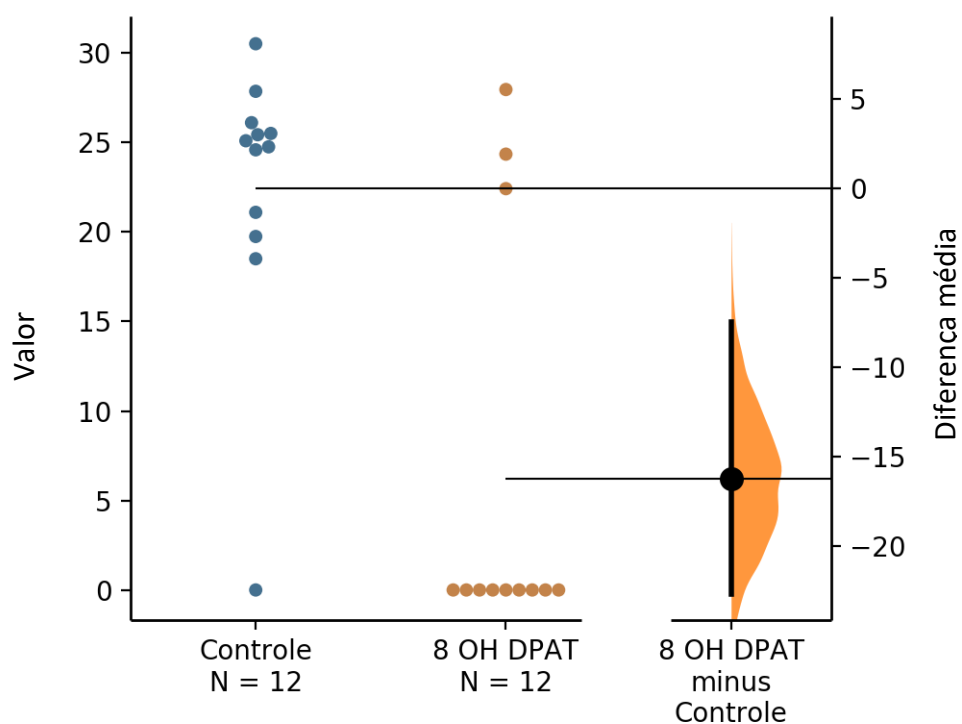
*Efeitos do 8-OH-DPAT sob o desfecho comportamental (tempo longe do estímulo) do teste de interação social (IS)*



Efeito do tratamento com 8-OH-DPAT (0,3 mg/kg) no tempo longe do estímulo no teste IS. A diferença média entre o grupo-controle e o grupo 8-OH-DPAT é apresentada no gráfico de estimativa de Gardner-Altman acima. Ambos os grupos são representados nos eixos à esquerda; a diferença média é representada num eixo flutuante à direita como uma distribuição de amostragem bootstrap. A diferença média é representada como um ponto; o intervalo de confiança de 95% é indicado pelas extremidades da barra de erro vertical.

### Figura 11C

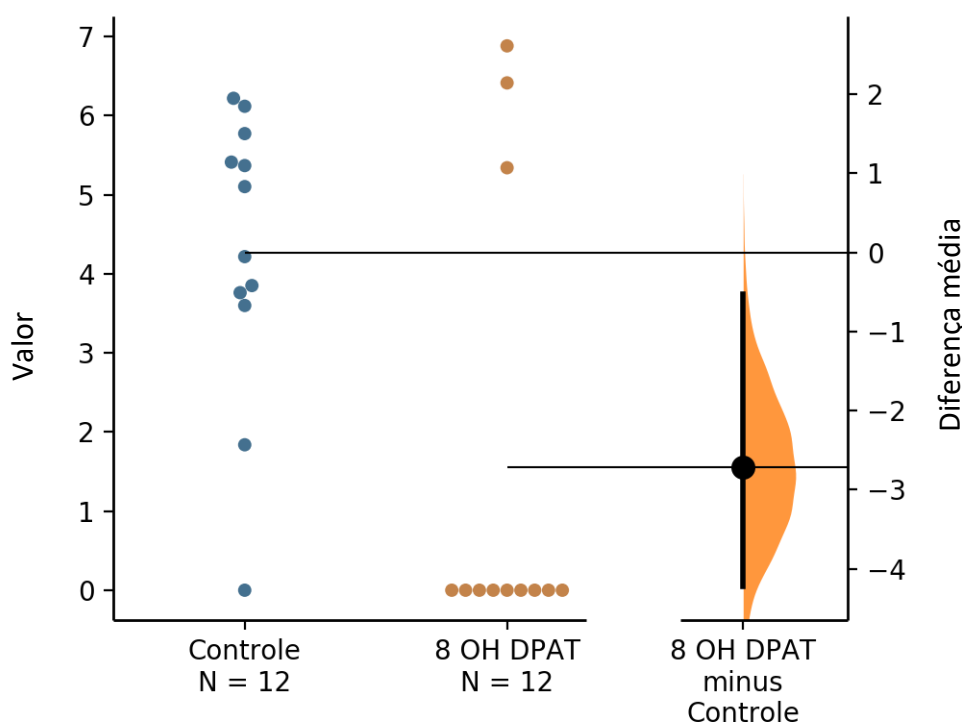
*Efeitos do 8-OH-DPAT sob o desfecho comportamental (nado errático) do teste de interação social (IS)*



Efeito do tratamento com 8-OH-DPAT (0,3 mg/kg) nado errático no teste IS. A diferença média entre o grupo-controle e o grupo 8-OH-DPAT é apresentada no gráfico de estimativa de Gardner-Altman acima. Ambos os grupos são representados nos eixos à esquerda; a diferença média é representada num eixo flutuante à direita como uma distribuição de amostragem bootstrap. A diferença média é representada como um ponto; o intervalo de confiança de 95% é indicado pelas extremidades da barra de erro vertical.

**Figura 11D**

*Efeitos do 8-OH-DPAT sob o desfecho comportamental (velocidade de nado) do teste de interação social (IS)*

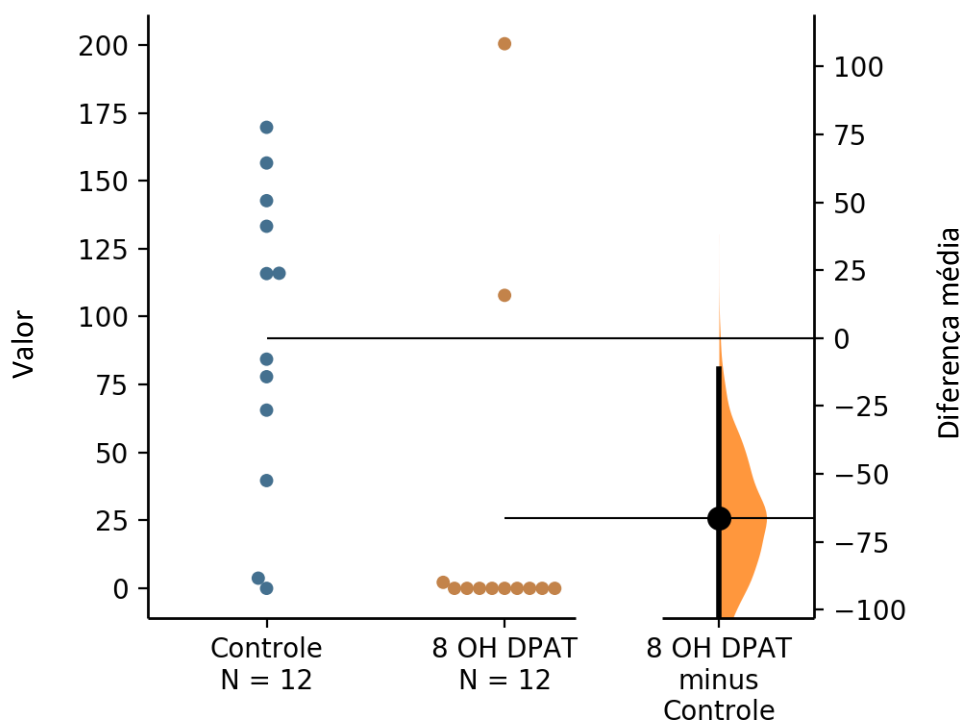


Efeito do tratamento com 8-OH-DPAT (0,3 mg/kg) na velocidade de nado no teste IS. A diferença média entre o grupo-controle e o grupo 8-OH-DPAT é apresentada no gráfico de estimativa de Gardner-Altman acima. Ambos os grupos são representados nos eixos à esquerda; a diferença média é representada num eixo flutuante à direita como uma distribuição de amostragem bootstrap. A diferença média é representada como um ponto; o intervalo de confiança de 95% é indicado pelas extremidades da barra de erro vertical.

No teste de novidade social, foi observado efeito significativo do 8-OH-DPAT no tempo próximo ao novo estímulo ( $t_{(22)}=4.99$ ,  $p < 0,001$ ,  $d=1.02$ ,  $IC95\%[15.38, 117,06]$ ) e tempo próximo ao co-específico conhecido ( $t_{(22)}=4.25$ ,  $p < 0.001$ ,  $d=1.76$ ,  $IC95\%[61.94, 179.97]$ ). Também foram observados efeitos sobre nado errático ( $t_{(22)}=4.99$ ,  $p < 0.001$ ,  $d=1.98$ ,  $IC95\%[10.47, 25.37]$ ) e velocidade de nado ( $t_{(22)}=4.99$ ,  $p < 0.001$ ,  $d=1$ ,  $IC95\%[0.62, 5.29]$ ). Esses efeitos são sumarizados nas Figuras 12A-12D.

**Figura 12A**

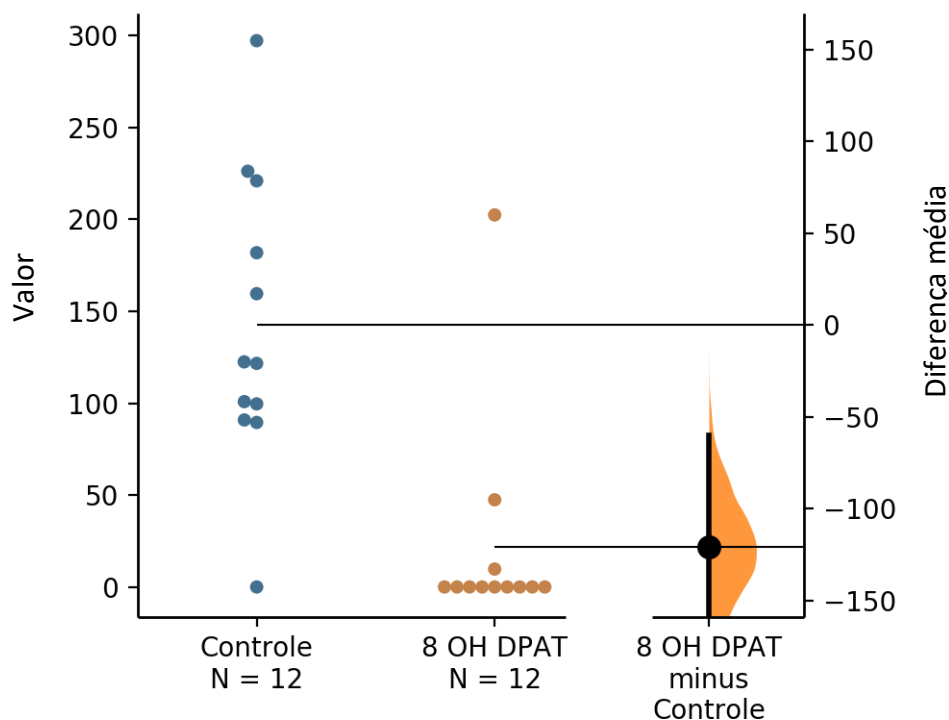
*Efeitos do 8-OH-DPAT sob o desfecho comportamental (tempo próximo ao novo estímulo) no teste de novidade social (NS)*



Efeito do tratamento com 8-OH-DPAT (0,3 mg/kg) na tempo próximo ao novo estímulo no teste NS. A diferença média entre o grupo-controle e o grupo 8-OH-DPAT é apresentada no gráfico de estimativa de Gardner-Altman acima. Ambos os grupos são representados nos eixos à esquerda; a diferença média é representada num eixo flutuante à direita como uma distribuição de amostragem bootstrap. A diferença média é representada como um ponto; o intervalo de confiança de 95% é indicado pelas extremidades da barra de erro vertical.

**Figura 12B**

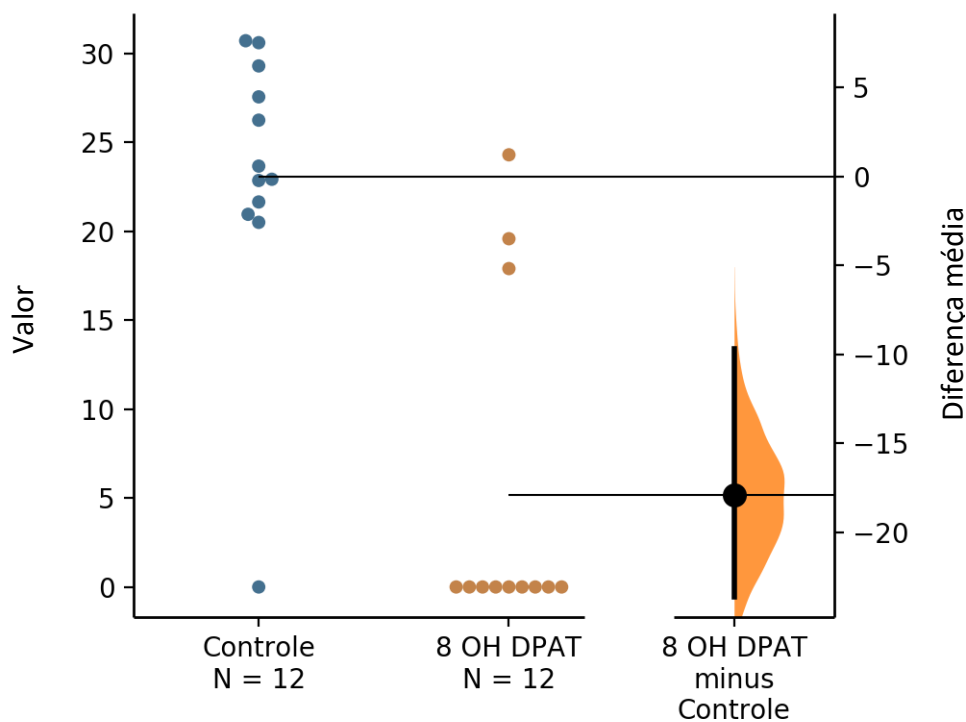
*Efeitos do 8-OH-DPAT sob o desfecho comportamental (tempo próximo ao co-específico conhecido) no teste de novidade social (NS)*



Efeito do tratamento com 8-OH-DPAT (0,3 mg/kg) tempo próximo ao co-específico conhecido no teste NS. A diferença média entre o grupo-controle e o grupo 8-OH-DPAT é apresentada no gráfico de estimativa de Gardner-Altman acima. Ambos os grupos são representados nos eixos à esquerda; a diferença média é representada num eixo flutuante à direita como uma distribuição de amostragem bootstrap. A diferença média é representada como um ponto; o intervalo de confiança de 95% é indicado pelas extremidades da barra de erro vertical.

**Figura 12C**

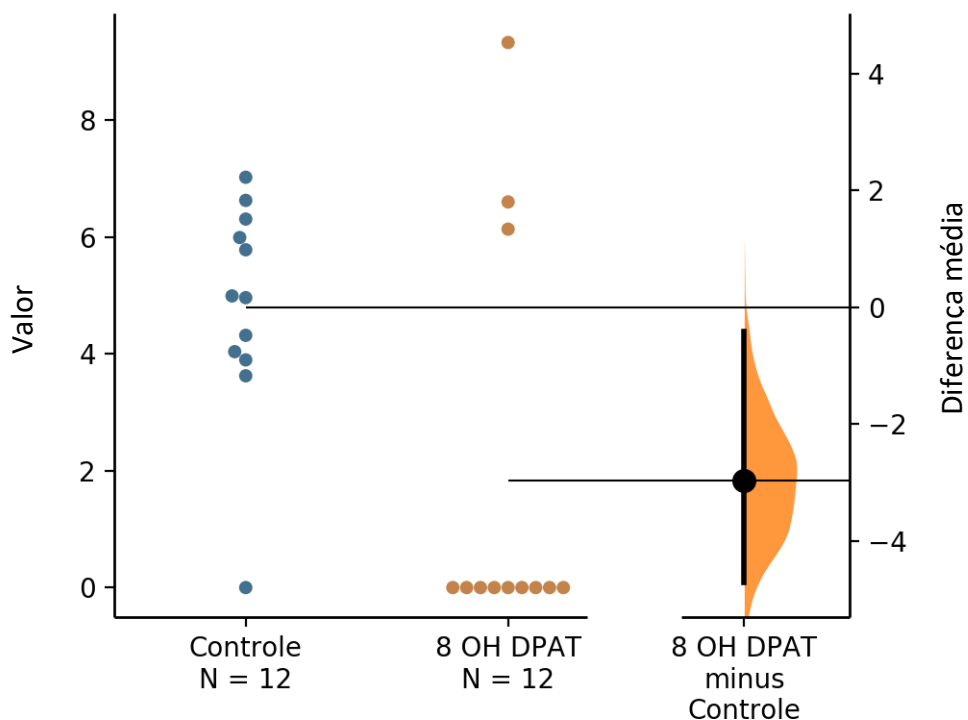
*Efeitos do 8-OH-DPAT sob o desfecho comportamental (nado errático) no teste de novidade social (NS)*



Efeito do tratamento com 8-OH-DPAT (0,3 mg/kg) nado errático no teste NS. A diferença média entre o grupo-controle e o grupo 8-OH-DPAT é apresentada no gráfico de estimativa de Gardner-Altman acima. Ambos os grupos são representados nos eixos à esquerda; a diferença média é representada num eixo flutuante à direita como uma distribuição de amostragem bootstrap. A diferença média é representada como um ponto; o intervalo de confiança de 95% é indicado pelas extremidades da barra de erro vertical.

**Figura 12D**

*Efeitos do 8-OH-DPAT sob o desfecho comportamental (velocidade de nado) no teste de novidade social (NS)*



Efeito do tratamento com 8-OH-DPAT (0,3 mg/kg) na velocidade de nado no teste NS. A diferença média entre o grupo-controle e o grupo 8-OH-DPAT é apresentada no gráfico de estimativa de Gardner-Altman acima. Ambos os grupos são representados nos eixos à esquerda; a diferença média é representada num eixo flutuante à direita como uma distribuição de amostragem bootstrap. A diferença média é representada como um ponto; o intervalo de confiança de 95% é indicado pelas extremidades da barra de erro vertical.

**Discussão**

Nos experimentos descritos nessa dissertação, observou-se diferenças nos desfechos comportamentais do tipo-ansiedade, no grupo aplicado com o agonista pleno do receptor 5-HT<sub>1A</sub> (8-OH-DPAT), em variáveis de testes de distribuição eliciado pela novidade (DVEN) e interação social (IS) e novidade social (NS). Enquanto que, no teste de preferência claro/escuro (PCE) não houve diferenças significativas. No teste DVEN, estávamos interessados em analisar os efeitos do 8-OH-DPAT no comportamento tipo-ansiedade no zebrafish. Nesse contexto, os resultados demonstraram que os animais passaram mais tempo no topo do aparato e menos tempo no fundo quando comparado com o grupo-controle,



sugerindo efeito ansiolítico do agonista pela tendência natural do zebrafish de escapar do topo, que é potencialmente aversivo em seu habitat original (Stewart, 2012). Sendo assim, sugerindo possível efeito ansiolítico do 8-OH-DPAT no desfecho comportamental do tipo-ansiedade no zebrafish. No presente estudo, no teste IS e NS, estávamos interessados em avaliar a sociabilidade e/ou comportamento tipo-ansiedade no zebrafish sob o efeito do 8-OH-DPAT, um agonista pleno do receptor 5-HT<sub>1A</sub>.

### **Efeitos do 8-OH-DPAT nos testes de ansiedade**

Um dos achados mais salientes desse trabalho é a diferença de efeitos do 8-OH-DPAT entre o PCE e o teste de DVEN. Em estudos anteriores com drogas serotoninérgicas nesses dois testes, demonstrou-se que o aumento dos níveis de 5-HT com fluoxetina aguda aumenta a geotaxia (desfecho principal do DVEN) e diminui a escototaxia (desfecho principal do PCE), enquanto a diminuição dos níveis de 5-HT com pCPA produz efeitos opostos (Maximino et al., 2013). Por outro lado, tanto a bupirona (agonista parcial do receptor 5-HT<sub>1A</sub>) quanto o WAY 100635 (antagonista pleno do receptor 5-HT<sub>1A</sub>) diminuíram a geotaxia e a escototaxia. O SB 224289, agonista inverso do receptor 5-HT<sub>1B</sub>, produziu diminuição da geotaxia, mas não da escototaxia, um efeito similar ao observado no presente experimento.

Diferentemente da bupirona, que produz consistentes efeitos tipo-ansiolíticos tanto no PCE quanto no DVEN (Tabela 1), o 8-OH-DPAT pareceu produzir efeitos específicos no DVEN. Apesar de serem agonistas do receptor 5-HT<sub>1A</sub>, existem diferenças importantes entre a bupirona e o 8-OH-DPAT. A bupirona age como agonista completo no autorreceptor 5-HT<sub>1A</sub>, enquanto que no receptor pós sináptico 5-HT<sub>1A</sub>, como agonista parcial. Enquanto que, o 8-OH-DPAT é uma droga serotoninérgica que afeta o autorreceptor 5-HT<sub>1A</sub>. Sendo assim, sendo possível supor que também seja a razão por quais os resultados diferenciaram entre os testes.

Uma questão correlata é o motivo do efeito ser observado somente no DVEN, e não no PCE. Uma possibilidade é de que o DVEN seja mais sensível ao tratamento farmacológico do que o PCE. Entretanto, em metanálise dos efeitos de drogas nos dois testes, Kysil et al. (2017) não encontraram efeitos do teste na sensibilidade. Uma segunda possibilidade é a de que os dois testes modelam processos defensivos diferentes. Blaser et al. (2012) analisaram o controle de estímulos nos dois testes, e sugeriram que a geotaxia é controlada principalmente por fuga do topo (mais próximo, portanto, do medo), enquanto a escototaxia é controlada principalmente por um conflito aproximação-evitação (mais próximo, portanto, da ansiedade). No DVEN, seria uma preferência pelo substrato mais profundo, de maneira que

seja possível fugir de predadores aéreos, justificando a tendência comportamental de fuga. Enquanto, no PCE, seria a tendência comportamental de evitação ou esquiva do animal, gerando curiosidade em investigar a parte clara do aparato para recolher informações do ambiente. Outra possibilidade, seria pela diferença nos efeitos da ativação entre os autorreceptores e heterorreceptores de 5-HT<sub>1A</sub>.

#### **Efeitos do 8-OH-DPAT na aproximação social**

As diferentes fases dos testes de preferência social utilizados no presente experimento enfatizam o papel da aproximação social vs. novidade social. Nossos resultados com o 8-OH-DPAT mostraram a diminuição da IS e a NS, sugerindo um efeito mais amplo sobre a aproximação social. Barba-Escobedo e Gould (2012) demonstraram que a buspirona aumenta a aproximação social no teste de IS (o oposto do observado aqui com o 8-OH-DPAT), sem efeitos no teste de NS.

#### **Conclusão e perspectivas futuras**

O uso do agonista pleno do receptor 5-HT<sub>1A</sub>, o 8-OH-DPAT, no tratamento farmacológico do zebrafish, diminuiu o comportamento tipo-ansiedade no teste de distribuição vertical eliciada pela novidade (DVEN), mas não no teste de preferência claro/escuro, ambos considerados desfechos de comportamento tipo-ansiedade para essa espécie.

O mesmo tratamento diminuiu a aproximação social tanto em teste de investigação social quanto em teste de novidade social. Algumas lacunas permanecem abertas em relação aos achados desses experimentos. Os estudos e os resultados aqui apresentados, demonstraram a relação da agonista 8-OH-DPAT com a ansiedade, considerando que há diferenças entre os heterorreceptores e autorreceptores de 5-HT<sub>1A</sub>. Sugere sinergismo de diminuição da 5-HT nos outros receptores e aumento na ativação dos heterorreceptores 1A. Mais estudos são necessários.

Portanto, possibilidade de se trabalhar com outras drogas serotoninérgicas que tenham como alvo o receptor 5-HT<sub>1A</sub>, e aplica-los nos mesmos testes que foram usados nessa presente dissertação, afim de verificar as diferenças com agonista 8-OH-DPAT.

## Referências

- Abozaid, A., & Gerlai, R. (2022). Behavioral Effects of Buspirone in Juvenile Zebrafish of Two Different Genetic Backgrounds. *Toxics*, 10(1), 22. <https://doi.org/10.3390/toxics10010022>
- Akimova, E., Lanzenberger, R., & Kasper, S. (2009). The serotonin-1A receptor in anxiety disorders. *Biological psychiatry*, 66(7), 627–635. <https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2009.03.012>
- Albert, P. R., Le François, B., & Millar, A. M. (2011). Transcriptional dysregulation of 5-HT1A autoreceptors in mental illness. *Molecular brain*, 4, 1-14. <https://doi.org/10.1186/1756-6606-4-21>
- Araujo, J., Maximino, C., Brito, T. M., Silva, A. W .B., Oliveira, K. R. M., Batista, E. J. O., Morato, S., Herculano A.M. & Gouveia A. (2012). Behavioral and pharmacological aspects of anxiety in the light/dark preference test. In: Kalueff, A. V; Stewart, A. M. (Eds.). *Zebrafish Protocols for Neurobehavioral Research*. New York: Humana Press. [https://doi.org/10.1007/978-1-61779-597-8\\_14](https://doi.org/10.1007/978-1-61779-597-8_14)
- Barba-Escobedo, P. A., & Gould, G. G. (2012). Visual social preferences of lone zebrafish in a novel environment: strain and anxiolytic effects. *Genes, brain, and behavior*, 11(3), 366–373. <https://doi.org/10.1111/j.1601-183X.2012.00770.x>
- Bencan, Z., Sledge, D., & Levin, E. D. (2009). Buspirone, chlordiazepoxide and diazepam effects in a zebrafish model of anxiety. *Pharmacology, biochemistry, and behavior*, 94(1), 75–80. <https://doi.org/10.1016/j.pbb.2009.07.009>
- Blanchard, D. C., & Blanchard, R. J. (2008). Defensive behaviors, fear, and anxiety. In R. J. Blanchard, D. C. Blanchard, G. Griebel, & D. Nutt (Eds.), *Handbook of anxiety and fear* (pp. 63–79). Elsevier Academic Press. [https://doi.org/10.1016/S1569-7339\(07\)00005-7](https://doi.org/10.1016/S1569-7339(07)00005-7)
- Blaser, R. E., & Goldsteinholm, K. (2012). Depth preference in zebrafish, *Danio rerio*: Control by surface and substrate cues. *Animal Behaviour*, 83(4), 953–959. <https://doi.org/10.1016/j.anbehav.2012.01.014>
- Blier, P., Lista, A., & De Montigny, C. (1993). Differential properties of pre- and postsynaptic 5-hydroxytryptamine1A receptors in the dorsal raphe and hippocampus: I. Effect of spiperone. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics*, 265(1), 7–15.
- Cachat, J. M., Stewart, A., Grossman, L., Gaikwad, S., Kadri, F., Chung, K. M., ... Kalueff, A. V. (2010). Measuring behavioral and endocrine responses to novelty stress in adult zebrafish. *Nature Protocols*, (5)11, 1786–1799. <https://doi.org/10.1038/nprot.2010.140>
- Cardenas, F. (2017). *X-Plo-Rat software*. <https://github.com/lanec-unifesspa/x-plo-rat>
- Chessick, C. A., Allen, M. H., Thase, M., Batista Miralha da Cunha, A. B., Kapczinski, F. F., de Lima, M. S., & dos Santos Souza, J. J. (2006). Azapirones for generalized anxiety

- disorder. *The Cochrane database of systematic reviews*, 2006(3), CD006115. <https://doi.org/10.1002/14651858.CD006115>
- Connors, K. A., Valenti, T. W., Lawless, K., Sackerman, J., Onaivi, E. S., Brooks, B. W., & Gould, G. G. (2014). Similar anxiolytic effects of agonists targeting serotonin 5-HT<sub>1A</sub> or cannabinoid CB receptors on zebrafish behavior in novel environments. *Aquatic toxicology (Amsterdam, Netherlands)*, 151, 105–113. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2013.12.005>
- Costa, C. O., Branco, J. C., Vieira I. S., Souza, L. D. M., Silva, R. A. (2019). Prevalência de ansiedade e fatores associados em adultos. *Jornal Brasileiro de Psiquiatria*, 68(2), 92-100. <https://doi.org/10.1590/0047-2085000000232>.
- Crocq M. A. (2015). A history of anxiety: from Hippocrates to DSM. *Dialogues in clinical neuroscience*, 17(3), 319–325. <https://doi.org/10.31887/DCNS.2015.17.3/macrocq>
- Deakin, J. F., & Graeff, F. G. (1991). 5-HT and mechanisms of defence. *Journal of psychopharmacology (Oxford, England)*, 5(4), 305–315. <https://doi.org/10.1177/026988119100500414>
- Egan, R. J., Bergner, C. L., Hart, P. C., Cachat, J. M., Canavello, P. R., Elegante, . . . & Kalueff, A. V. (2009). Understanding behavioral and physiological phenotypes of stress and anxiety in zebrafish. *Behavioural brain research*, 205(1), 38–44. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2009.06.022>
- Facchin, L., Duboué, E. R., & Halpern, M. E. (2015). Disruption of Epithalamic Left-Right Asymmetry Increases Anxiety in Zebrafish. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 35(48), 15847–15859. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2593-15.2015>
- File, S. E., Gonzalez, L. E., & Andrews, N. (1996). Comparative study of pre- and postsynaptic 5-HT<sub>1A</sub> receptor modulation of anxiety in two ethological animal tests. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 16(15), 4810–4815. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.16-15-04810.1996>
- Fontana, B. D., Alnassar, N., & Parker, M. O. (2022). The zebrafish (*Danio rerio*) anxiety test battery: comparison of behavioral responses in the novel tank diving and light-dark tasks following exposure to anxiogenic and anxiolytic compounds. *Psychopharmacology*, 239(1), 287–296. <https://doi.org/10.1007/s00213-021-05990-w>
- Gebauer, D. L., Pagnussat, N., Piato, A. L., Schaefer, I. C., Bonan, C. D., & Lara, D. R. (2011). Effects of anxiolytics in zebrafish: similarities and differences between benzodiazepines, buspirone and ethanol. *Pharmacology, biochemistry, and behavior*, 99(3), 480–486. <https://doi.org/10.1016/j.pbb.2011.04.021>
- Gelfuso, É. A., Rosa D. S., Fachin A. L., Mortari M. R., Cunha A. O., & Belebony R. O. (2014). Anxiety: a systematic review of neurobiology, traditional pharmaceuticals and novel alternatives from medicinal plants. *CNS Neurol Disord Drug Targets*. Feb;13(1):150-65. <http://doi.org/10.2174/18715273113129990102>

- Graeff, F. G., Guimarães, F. S., De Andrade, T. G., & Deakin, J. F. (1996). Role of 5-HT in stress, anxiety, and depression. *Pharmacology, biochemistry, and behavior*, *54*(1), 129–141. [https://doi.org/10.1016/0091-3057\(95\)02135-3](https://doi.org/10.1016/0091-3057(95)02135-3)
- Grimaldi, B., Bonnin, A., Fillion, M.P., Prudhomme, N., & Fillion, G. (1999). 5-Hydroxytryptamine-moduline: a novel endogenous peptide involved in the control of anxiety. *Neuroscience*, *93*(4), 1223–1225. [https://doi.org/10.1016/s0306-4522\(99\)00322-x](https://doi.org/10.1016/s0306-4522(99)00322-x)
- Haleem D. J. (2019). Targeting Serotonin1A Receptors for Treating Chronic Pain and Depression. *Current neuropharmacology*, *17*(12), 1098–1108. <https://doi.org/10.2174/1570159X17666190811161807>
- Hawkey, A. B., Hoeng, J., Peitsch, M. C., Levin, E. D., & Koshibu, K. (2021). Subchronic effects of plant alkaloids on anxiety-like behavior in zebrafish. *Pharmacology, biochemistry, and behavior*, *207*, 173223. <https://doi.org/10.1016/j.pbb.2021.173223>
- Herculano, A. M., & Maximino, C. (2014). Serotonergic modulation of zebrafish behavior: towards a paradox. *Progress in neuro-psychopharmacology & biological psychiatry*, *55*, 50–66. <https://doi.org/10.1016/j.pnpbp.2014.03.008>
- Kalueff, A. V., Gebhardt, M., Stewart, A. M., Cachat, J. M., Brimmer, M., Chawla, J. S., Craddock, C., Kyzar, E. J., Roth, A., Landsman, S., Gaikwad, S., Robinson, K., Baatrup, E., Tierney, K., Shamchuk, A., Norton, W., Miller, N., Nicolson, T., Braubach, O., Gilman, C. P., ... Zebrafish Neuroscience Research Consortium (2013). Towards a comprehensive catalog of zebrafish behavior 1.0 and beyond. *Zebrafish*, *10*(1), 70–86. <https://doi.org/10.1089/zeb.2012.0861>
- Kinkel, M. D., Eames, S. C., Philipson, L. H., & Prince, V. E. (2010). Intraperitoneal injection into adult zebrafish. *Journal of visualized experiments : JoVE*, (42), 2126. <https://doi.org/10.3791/2126>.
- Kysil, E. V., Meshalkina, D. A., Frick, E. E., Echevarria, D. J., Rosemberg, D. B., Maximino, C., Lima, M. G., Abreu, M. S., Giacomini, A. C., Barcellos, L. J. G., Song, C., & Kalueff, A. V. (2017). Comparative Analyses of Zebrafish Anxiety-Like Behavior Using Conflict-Based Novelty Tests. *Zebrafish*, *14*(3), 197–208. <https://doi.org/10.1089/zeb.2016.1415>
- Jesuthasan S. (2012). Fear, anxiety, and control in the zebrafish. *Developmental neurobiology*, *72*(3), 395–403. <https://doi.org/10.1002/dneu.20873>
- Lau, B. Y., Mathur, P., Gould, G. G., & Guo, S. (2011). Identification of a brain center whose activity discriminates a choice behavior in zebrafish. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *108*(6), 2581–2586. <https://doi.org/10.1073/pnas.1018275108>
- Levin, E. D., Bencan, Z., & Cerutti, D. T. (2007). Anxiolytic effects of nicotine in zebrafish. *Physiology & behavior*, *90*(1), 54–58. <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2006.08.026>
- Lucki I. (1998). The spectrum of behaviors influenced by serotonin. *Biological psychiatry*, *44*(3), 151–162. [https://doi.org/10.1016/s0006-3223\(98\)00139-5](https://doi.org/10.1016/s0006-3223(98)00139-5)

- Maaswinkel, H., Zhu, L., & Weng, W. (2012). The immediate and the delayed effects of buspirone on zebrafish (*Danio rerio*) in an open field test: a 3-D approach. *Behavioural brain research*, 234(2), 365–374. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2012.07.014>
- Maaswinkel, H., Le, X., He, L., Zhu, L., & Weng, W. (2013). Dissociating the effects of habituation, black walls, buspirone and ethanol on anxiety-like behavioral responses in shoaling zebrafish. A 3D approach to social behavior. *Pharmacology, biochemistry, and behavior*, 108, 16–27. <https://doi.org/10.1016/j.pbb.2013.04.009>
- Mangolini, V. I., Andrade, L. H., & Wang, Y.-P. (2019). Epidemiologia dos transtornos de ansiedade em regiões do Brasil: uma revisão de literatura. *Revista De Medicina*, 98(6), 415-422. <https://doi.org/10.11606/issn.1679-9836.v98i6p415-422>
- Maximino, C., Brito, T. M., Dias, C., Gouveia, A. & Morato, S. (2010). Scototaxis as anxiety-like behavior in fish. *Nat Protoc* 5, 209–216. <https://doi.org/10.1038/nprot.2009.225>
- Maximino, C., da Silva, A. W., Gouveia, A., Jr, & Herculano, A. M. (2011). Pharmacological analysis of zebrafish (*Danio rerio*) scototaxis. *Progress in neuro-psychopharmacology & biological psychiatry*, 35(2), 624–631. <https://doi.org/10.1016/j.pnpbp.2011.01.006>
- Maximino, C. (2012). Serotonin and anxiety. Neuroanatomical, pharmacological, and functional aspects. New York, NY: Springer.
- Maximino, C., Lima, M. G., Araujo, J., Oliveira, K. R. M., Herculano, A. M., Stewart, A. M., ... & Kalueff, A. V. (2013a). The serotonergic system of zebrafish: genomics, neuroanatomy and neuropharmacology. *Serotonin Biosynthesis, Regul Heal Implic*. New York, NY: Nova Science, 53-67.
- Maximino, C., Puty, B., Benzecry, R., Araújo, J., Lima, M. G., Batista, E. D. J. O. & Herculano, A. M. (2013b). 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*, 71, 83-97. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2013.03.006>
- Maximino C., Silva A. W. B., Araújo J., Lima M. G., Miranda V, Puty, B., . Herculano, A.M. (2014). Fingerprinting of Psychoactive Drugs in Zebrafish Anxiety-Like Behaviors. *PLOS ONE* 9(7): e103943. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0103943>
- Maximino, C., Lima, M. G., Batista, E. D. J. O., Oliveira, K. R. H. M., & Herculano, A. M. (2015a). Interaction between 5-HT1B receptors and nitric oxide in zebrafish responses to novelty. *Neuroscience Letters*, 588, 54-56. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2014.12.049>
- Maximino, C., Silva, R. X., da Silva, S., Rodrigues, L., Barbosa, H., de Carvalho, T. S., . . . & Herculano, A. M. (2015b). Non-mammalian models in behavioral neuroscience: consequences for biological psychiatry. *Frontiers in behavioral neuroscience*, 9, 233. <https://doi.org/10.3389/fnbeh.2015.00233>
- Maximino, C. (2018). *Protocolo Zebrafish (Danio rerio) Environmental Summary, LaNec (Marabá/PA, Brazil)*. <https://dx.doi.org/10.17504/protocols.io.pyvdpw6>



- Maximino, C. (2020). *Protocolo Light/dark preference test for adult zebrafish (Danio rerio)*. V.2. [dx.doi.org/10.17504/protocols.io.srfed3n](https://doi.org/10.17504/protocols.io.srfed3n)
- Meller, E., Goldstein, M., & Bohmaker, K. (1990). Receptor reserve for 5-hydroxytryptamine<sub>1A</sub>-mediated inhibition of serotonin synthesis: possible relationship to anxiolytic properties of 5-hydroxytryptamine<sub>1A</sub> agonists. *Molecular pharmacology*, 37(2), 231–237
- Nowicki, M., Tran, S., Muraleetharan, A., Markovic, S., & Gerlai, R. (2014). Serotonin antagonists induce anxiolytic and anxiogenic-like behavior in zebrafish in a receptor-subtype dependent manner. *Pharmacology, biochemistry, and behavior*, 126, 170–180. <https://doi.org/10.1016/j.pbb.2014.09.022>
- Norton, W. H., Folchert, A., & Bally-Cuif, L. (2008). Comparative analysis of serotonin receptor (HTR1A/HTR1B families) and transporter (slc6a4a/b) gene expression in the zebrafish brain. *The Journal of comparative neurology*, 511(4), 521–542. <https://doi.org/10.1002/cne.21831>
- Nummenmaa, L., Seppälä, K., & Putkinen, V. (2022). Molecular imaging of the human emotion circuit. In *Social and Affective Neuroscience of Everyday Human Interaction: From Theory to Methodology* (pp. 3-21). Cham: Springer International Publishing. [https://doi.org/10.1007/978-3-031-08651-9\\_1](https://doi.org/10.1007/978-3-031-08651-9_1)
- Ogi, A., Licitra, R., Naef, V., Marchese, M., Fronte, B., Gazzano, A., & Santorelli, F. M. (2021). Social Preference Tests in Zebrafish: A Systematic Review. *Frontiers in veterinary science*, 7, 590057. <https://doi.org/10.3389/fvets.2020.590057>
- Onarheim, T., Janczak, A. M., & Nordgreen, J. (2022). The Effects of Social vs. Individual Housing of Zebrafish on Whole-Body Cortisol and Behavior in Two Tests of Anxiety. *Frontiers in veterinary science*, 9, 859848. <https://doi.org/10.3389/fvets.2022.859848>
- Paul, E. D., Johnson, P. L., Shekhar, A., & Lowry, C. A. (2014). The Deakin/Graeff hypothesis: focus on serotonergic inhibition of panic. *Neuroscience and biobehavioral reviews*, 46 Pt 3, 379–396. <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2014.03.010>
- Perry, S. F., Davie, P. S., Daxboeck, C., Ellis, A. G., & Smith, D. G. (1984). 10 Perfusion methods for the study of gill physiology. In *Fish physiology* (Vol. 10, pp. 325-388). Academic Press.
- Piszczek, L., Schlax, K., Wyrzykowska, A., Piszczek, A., Audero, E., & Thilo Gross, C. (2013). Serotonin 1A auto-receptors are not sufficient to modulate anxiety in mice. *The European journal of neuroscience*, 38(4), 2621–2627. <https://doi.org/10.1111/ejn.12260>
- Raymond, J. R., Mukhin, Y. V., Gelasco, A., Turner, J., Collinsworth, G., Gettys, T. W., Grewal, J. S., & Garnovskaya, M. N. (2001). Multiplicity of mechanisms of serotonin receptor signal transduction. *Pharmacology & therapeutics*, 92(2-3), 179–212. <https://doi.org/10.1016>
- Rock, E. M., & Parker, L. A. (2017). The role of 5-HT<sub>1A</sub> receptor, and nausea and vomiting relief by cannabidiol (CBD), cannabidiolic acid (CBDA), and cannabigerol (CBG). In V. R. Preedy (Ed.), *Handbook of cannabis and related pathologies: Biology, pharmacology,*

- diagnosis, and treatment* (pp. 703–712). Elsevier Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-800756-3.00083-1>
- Sari Y. (2004). Serotonin1B receptors: from protein to physiological function and behavior. *Neuroscience and biobehavioral reviews*, 28(6), 565–582. <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2004.08.008>
- Sartori, S. B., Landgraf, R., & Singewald, N. (2011). The clinical implications of mouse models of enhanced anxiety. *Future Neurology*. 6:4, 531-571. <https://doi.org/10.2217/fnl.11.34>
- Santos, L. L., & De-Carli, B. P. (2018). Comportamento de zebrafish exposto a benzodiazepínico. *J Health Sci Inst.*;36(3):165-169
- Scott, J. (2013). An Evolutionary Perspective on Anxiety and Anxiety Disorders. InTech. doi: 10.5772/52902
- Shuhama, R., Del-Ben, C. M., Loureiro, S. R., & Graeff, F. G. (2007). Animal defense strategies and anxiety disorders. *Anais da Academia Brasileira de Ciencias*, 79(1), 97–109. <https://doi.org/10.1590/s0001-37652007000100012>
- Silveira, T. R., Schneider, A. C., & Hammes, T. O. (2012). Zebrafish: modelo consagrado para estudos de doenças humanas. *Ciência e Cultura*, 64(2), 4-5. <https://dx.doi.org/10.21800/S0009-67252012000200002>
- Sprouse, J. S., & Aghajanian, G. K. (1988). Responses of hippocampal pyramidal cells to putative serotonin 5-HT1A and 5-HT1B agonists: a comparative study with dorsal raphe neurons. *Neuropharmacology*, 27(7), 707–715. [https://doi.org/10.1016/0028-3908\(88\)90079-2](https://doi.org/10.1016/0028-3908(88)90079-2)
- Stewart, A., Maximino C., Marques de Brito, T. M., Herculano, A.M., Gouveia, A., Morato, . . . Kalueff, A.V. (2011). Neurophenotyping of adult zebrafish using the light/dark box paradigm. In: Kalueff, A. V; Cachat, J. M. (Eds.). *Zebrafish Neurobehavioral Protocols*. New York: Humana Press. p. 157–167. [https://doi.org/10.1007/978-1-60761-953-6\\_13](https://doi.org/10.1007/978-1-60761-953-6_13)
- Stewart, A., Gaikwad, S., Kyzar, E., Green, J., Roth, A., & Kalueff, A. V. (2012). Modeling anxiety using adult zebrafish: a conceptual review. *Neuropharmacology*, 62(1), 135–143. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2011.07.037>
- Taylor, J. S., Braasch, I., Frickey, T., Meyer, A., & Van de Peer, Y. (2003). Genome duplication, a trait shared by 22000 species of ray-finned fish. *Genome research*, 13(3), 382–390. <https://doi.org/10.1101/gr.640303>
- Wang, Y., Takai, R., Yoshioka, H., & Shirabe, K. (2006). Characterization and expression of serotonin transporter genes in zebrafish. *The Tohoku journal of experimental medicine*, 208(3), 267–274. <https://doi.org/10.1620/tjem.208.267>
- World Health Organization. (2017). *Depression and other common mental disorders: global health estimates* (No. WHO/MSD/MER/2017.2).
- World Health Organization. (2022). *World mental health report: transforming mental health for all*.



Yocca, F. D., Iben, L., & Meller, E. (1992). Lack of apparent receptor reserve at postsynaptic 5-hydroxytryptamine<sub>1A</sub> receptors negatively coupled to adenylyl cyclase activity in rat hippocampal membranes. *Molecular pharmacology*, *41*(6), 1066–1072

Żmudzka, E., Sałaciak, K., Sapa, J., & Pytka, K. (2018). Serotonin receptors in depression and anxiety: Insights from animal studies. *Life sciences*, *210*, 106–124. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2018.08.050>

Zebrafish International Resource Center (ZIRC). (2015). [https://zebrafish.org/wiki/media/protocols/health/daily\\_monitoring\\_fish\\_morbidity\\_07\\_2015.pdf](https://zebrafish.org/wiki/media/protocols/health/daily_monitoring_fish_morbidity_07_2015.pdf)