



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

LARISSA NUNES DE OLIVEIRA

**O PAPEL DO RECEPTOR 5HT<sub>2C</sub> NO COMPORTAMENTO TIPO ANSIEDADE  
EM *ZEBRAFISH* (*DANIO RERIO* HAMILTON 1822)**

Belém, PA

2023

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

LARISSA NUNES DE OLIVEIRA

**O PAPEL DO RECEPTOR 5HT<sub>2C</sub> NO COMPORTAMENTO TIPO ANSIEDADE EM  
*ZEBRAFISH (DANIO RERIO, HAMILTON 1822)***

Dissertação de Mestrado, apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Neurociências e Comportamento, do Núcleo de Teoria e Pesquisa da Universidade Federal do Pará para obtenção de Título de Mestre em Neurociências e Comportamento.

Orientador: Prof. Dr. Caio Maximino de Oliveira

Coorientadora: Prof. Dra. Rachel Coelho Ripardo Teixeira

Belém - PA

2023

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

---

O48p Oliveira, Larissa Nunes de.  
O Papel Do Receptor 5HT2C no Comportamento Tipo  
Ansiedade em Zebrafish (Danio Rerio, Hamilton 1822) /  
Larissa Nunes de Oliveira. — 2023.  
48 f. : il. color.

Orientador(a): Prof. Dr. Caio Maximino de Oliveira  
Coorientação: Prof<sup>a</sup>. Dra. Rachel Coelho Ripardo Teixeira  
Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do Pará,  
Núcleo  
de Teoria e Pesquisa do Comportamento, Programa de Pós-  
Graduação em Neurociências e Comportamento, Belém,  
2023.

1. Ansiedade. 2. Psicopatologia experimental. 3.  
Serotonina. 4. Receptor 5HT2C. 5. Zebrafish. I. Título.

CDD 612.8

---

**LARISSA NUNES DE OLIVEIRA**

O PAPEL DO RECEPTOR 5HT<sub>2C</sub> NO COMPORTAMENTO  
TIPO ANSIEDADE EM *ZEBRAFISH* (DANIO RERIO  
HAMILTON 1822)

**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. Rachel Coelho Ripardo Teixeira,

Universidade Federal do Pará, Coorientadora.

Prof<sup>a</sup> Dra. Natália Bezerra Dutra,

Universidade Federal do Pará (Banca)

Prof Dr. Bruno Rodrigues dos Santos,

Universidade Federal do Pará, (Banca)

**RESULTADO:** Aprovada

Belém, 29 de Setembro de 2023

Aos que não me deixaram perder a fé (em mim e no outro)

## Agradecimentos

Agradecer inicialmente à minha família sem a qual eu não poderia sonhar em seguir uma pós-graduação. Meu pai e mãe que me deram para além de apoio financeiro todo o suporte emocional para seguir este sonho. Meus irmãos, Amanda e Rodrigo, e sobrinhos, Nathan e Heloísa, que complementaram toda a rede de amor e suporte familiar que eu poderia ter.

Aos meus compadres Kysa e João que sempre acreditaram em mim, diria inclusive que são os que mais acreditaram (até quando eu não tava oferecendo muito não) e de quebra ainda me deram uma afilhada pra somar e transbordar todo esse amor. E agradeço à Moana pelo amor mais puro e desinteressado que pode haver. Eu amo vocês.

Ao Tayan e Rhenan, meus companheiros de vida e de casa, que seguram meus B.O. quando preciso e me apoiam sem eu nem pedir. Grata por nós, do nosso jeitinho.

À Ana Ribeiro que no meio dos turbilhões e confusões seguimos, de um jeito ou de outro seguimos. Obrigada por não ir embora.

À Karla que há mais de 20 anos me ensinou como se ama alguém para além da família e com todos seu coração. Tu também fazes parte disso.

À Rede LEPEL, em especial Joselene Mota, que despertou em mim a coisa mais bonita que eu posso oferecer ao mundo que é o “ser professora”.

Ao LANEK que me recebeu de braços abertos para iniciarmos essa caminhada, em especial à Bruna Costa que com toda sua paciência me ajudou durante todo este percurso, ajudando e ensinando.

Ao grupo GERPA pelo acolhimento, em especial Jeane, Maria e Paulo que para além de acolher, me incluíram e me permitiram fazer parte de suas vidas. Grata pelos risos e afetos trocados.

Ao meu orientador Caio Maximino que sem sombra de dúvida foi para além de um orientador. Obrigada pela compreensão, apoio e suporte (inclusive emocional).

À minha co-orientadora Rachel Ripardo que me aceitou como aluna e sempre me deu todo o suporte.

À minha banca que aceitou colaborar com este trabalho.

À UFPA e Unifesspa que investem na minha formação, espero poder devolver à sociedade este investimento.

À CAPES e CNPQ que apesar de momentos tenebrosos de (des)governo conseguiram investir para que este trabalho fosse realizado. Que sigamos lutando pela ciência!

Por último, mas não menos importante (diria até o contrário disto) à Loanne minha

companheira nesta caminhada que sem nem nos conhecermos me apoiou desde o primeiro dia. Obrigada por nunca ter soltado a minha mão. Costumo dizer que sem tu isso não teria acontecido e sabes o quanto é real. Uma pela outra. Te amo mulher.

“É necessário se espantar, se indignar e se contagiar, só assim é possível mudar a realidade.”

- Nise da Silveira



Oliveira, L. N. (2023). O Papel do Receptor 5HT2C No Comportamento Tipo Ansiedade em *Zebrafish* (*Danio rerio*, Hamilton 1822). Dissertação de Mestrado, Programa de Pós-Graduação em Neurociência e Comportamento. Belém: Universidade Federal Do Pará, 48 Páginas.

## RESUMO

O transtorno de ansiedade é muitas vezes incapacitante e demonstra-se em crescimento numérico no âmbito global. A psicopatologia experimental é uma área de estudo dos fenômenos psíquicos geradores de tal transtorno, utilizando-se muitas vezes de experimentos com modelos animais em busca de possíveis causas e tratamentos. Identifica-se a participação do sistema serotoninérgico neste transtorno. Este sistema é composto por diversos receptores, à exemplo do 5-HT2C. De forma geral, sabe-se que os agonistas do 5-HT2C aumentam os comportamentos de ansiedade, mas o seu papel nos transtornos do humor permanece controverso. O *zebrafish* (*Danio rerio*) pode servir como um modelo animal interessante para aprofundar-se acerca do tema, pois combina a relevância de ser um vertebrado com a escala de um invertebrado que demanda de um pequeno espaço para a sua manutenção, o baixo custo e a praticidade para triagens em larga escala. O presente estudo tem o objetivo de descrever o papel do receptor 5-HT2C em testes comportamentais relacionados à ansiedade. Para isso, foram utilizados três grupos de peixes: um grupo tratado com o fármaco MK-212, agonista do receptor 5-HT2C; um outro grupo tratado com o fármaco RS-102221, antagonista ao receptor 5-HT2C; e um terceiro grupo, o grupo controle, com utilização de solução-veículo. Os três grupos foram expostos a dois testes comportamentais: distribuição vertical eliciada pela novidade (DVEN) e preferência claro-escuro (PCE). O MK-212 não produziu efeitos no DVEN, enquanto o RS-102221 diminuiu a geotaxia nesse teste; esses efeitos são consistentes com uma excitação tônica da ansiedade no DVEN. No PCE os fármacos MK-212 e RS-102221 não produziram efeitos significativos. Assim, efeitos tônicos da ativação desse receptor são observadas a depender do tipo de teste comportamental empregado.

Palavras-chave: ansiedade, psicopatologia experimental, serotonina, 5-HT2C, *zebrafish*

Oliveira, L. N. (2023). O Papel do Receptor 5HT2C No Comportamento Tipo Ansiedade em Zebrafish (*Danio rerio*, Hamilton 1822). Dissertação de Mestrado, Programa de Pós-Graduação em Neurociência e Comportamento. Belém: Universidade Federal Do Pará, 48 Páginas.

### **ABSTRACT**

Anxiety disorders are often disabling and are showing increasing numbers globally. Experimental psychopathology is an area of study of the psychic phenomena that generate such a disorder, often using experiments with animal models in search of possible causes and treatments. The involvement of the serotonergic system in this disorder is identified. This system is made up of several receptors, such as 5-HT<sub>2C</sub>. In general, it is known that 5-HT<sub>2C</sub> agonists increase anxiety behaviors, but their role in mood disorders remains controversial. The zebrafish (*Danio rerio*) can serve as an interesting animal model to delve deeper into the topic, as it combines the relevance of being a vertebrate with the scale of an invertebrate that requires a small space for its maintenance, low cost and practicality for large-scale screening. The present study aims to describe the role of the 5-HT<sub>2C</sub> receptor in behavioral tests related to anxiety. For this, three groups of fish were used: a group treated with the drug MK-212, a 5-HT<sub>2C</sub> receptor agonist; another group treated with the drug RS-102221, a 5-HT<sub>2C</sub> receptor antagonist; and a third group, the control group, using a vehicle solution. The three groups were exposed to two behavioral tests: novelty-elicited vertical distribution (DVEN) and light-dark preference (PCE). MK-212 produced no effects on DVEN, while RS-102221 decreased geotaxis in this test; these effects are consistent with a tonic arousal of anxiety in the DVEN. In PCE, the drugs MK-212 and RS-102221 did not produce significant effects. Thus, tonic effects of the activation of this receptor are observed depending on the type of behavioral test used.

Keywords: anxiety, experimental psychopathology, serotonin, 5-HT<sub>2C</sub>, zebrafish

## LISTA DE FIGURAS

|  |    |
|--|----|
| <b>Figura 1</b> – Zebrafish (Danio Rerio Hamilton 1822).....   | 19 |
| <b>Figura 2</b> – Preparação, aplicação do fármaco no indivíduo e recuperação.....   | 25 |
| <b>Figura 3</b> – Representação do Aparato de Teste de Distribuição Vertical Elicida pela<br>Novidade.....   | 27 |
| <b>Figura 4</b> – Representação do tanque para realização do teste claro/escuro.....   | 29 |
| <b>Figura 5A-5D</b> – Efeitos do uso dos fármacos MK-212 e RS-102221 no tempo do fundo,<br>congelamento, nado errático e velocidade em ambiente de novidade.....                     | 30 |
| <b>Figura 6A-6E</b> – Efeitos do uso dos fármacos MK-212 e RS-102221 no tempo no<br>compartimento branco, número de entradas, nado errático, tigmotaxia e avaliação de<br>risco..... | 35 |

## SUMÁRIO

|  |           |
|--|-----------|
| <b>1 – Introdução.</b> ....  | <b>13</b> |
| Serotonina e Transtorno de Ansiedade .....                                   | 14        |
| Modelos Animais em Psicopatologia Experimental .....                         | 16        |
| <i>Zebrafish</i> como Organismo Modelo em Comportamento Tipo Ansiedade ..... | 18        |
| <b>2 – Objetivos</b> .....   | <b>23</b> |
| Objetivo Geral.....  | 23        |
| Objetivos Específicos.....   | 23        |
| <b>3 – Método</b> .....  | <b>24</b> |
| Sujeitos e Condições de Manutenção .....                                     | 24        |
| Tratamento Farmacológico.....  | 24        |
| Testes Comportamentais.....  | 26        |
| <b>4 – Resultados</b> .....  | <b>29</b> |
| <b>5 – Discussão</b> .....   | <b>40</b> |
| <b>6 – Considerações Finais</b> .....  | <b>41</b> |
| <b>7 – Referências</b> .....   | <b>42</b> |

**O Papel do Receptor 5HT<sub>2C</sub> no Comportamento tipo Ansiedade em *Zebrafish* (*Danio Rerio* Hamilton 1822)**

Roman e Savoia (2003) trazem a ansiedade como um estado considerado normal e frequente em todos os seres humanos, sendo importante para a sobrevivência e proteção do indivíduo. Porém, quando sentida em alta intensidade e frequência, deixa de ser um estado normal e passa a prejudicar o indivíduo e sua qualidade de vida, produzindo um estado emocional desagradável e angustiante, acarretando desconforto e muitas queixas.

Os transtornos de ansiedade referem-se a um grupo de transtornos mentais caracterizados por sentimentos de ansiedade e medo, incluindo transtorno de ansiedade generalizada (TAG), transtorno do pânico, fobias, e transtorno de ansiedade social com sintomas que podem variar de leve a grave. A duração dos sintomas normalmente experimentados pelas pessoas com transtornos de ansiedade toma mais um distúrbio crônico do que episódico (Organização Mundial da Saúde, 2017).

Nos transtornos de ansiedade o funcionamento do corpo e as experiências de vida são prejudicadas pela ansiedade, apresentando sintomas muito mais intensos aos que se referem à ansiedade que afeta as pessoas ao longo de sua rotina, como preocupações, tensões ou medos exagerados (a pessoa não consegue relaxar); sensação contínua de que um desastre ou que algo muito ruim vai acontecer; preocupações exageradas com saúde, dinheiro, família ou trabalho; medo extremo de algum objeto ou situação em particular; medo exagerado de ser humilhado publicamente; falta de controle sobre os pensamentos, imagens ou atitudes, que se repetem independentemente da vontade; pavor depois de uma situação muito difícil (Ministério da Saúde, Brasil, 2011)

Dados referentes ao ano de 2015 presentes no relatório Depression and Other Common

Mental Disorders da OMS (Organização Mundial da Saúde, 2017, p.18) demonstraram que o número de pessoas com transtornos de ansiedade era de 264 milhões, com um aumento de 14,9% em relação a 2005 e prevalência na população de 3,6%. Nesse estudo, o Brasil foi tido como o recordista mundial em prevalência de transtornos de ansiedade, com 9,3% da população acometida, seguido pelo Paraguai com 7,3%. Dados posteriores publicados pela OMS indicam que, com o acontecimento da pandemia da COVID-19, a incidência global de problemas de saúde mental, como depressão e ansiedade, teve um aumento de cerca de 25%, sendo identificado aumento expressivo em países mais acometidos pelo vírus. Identificou-se também um aumento da lacuna, já existente, entre indivíduos afetados por problemas de saúde mental pré-pandemia e seu tratamento (Organização Mundial da Saúde, 2022)

Buscar compreender mecanismos desencadeadores e geracionais do comportamento tipo ansiedade pode se apresentar como um caminho para maior compreensão dos transtornos de ansiedade.

### **Serotonina e Transtorno de Ansiedade**

Compreender a atuação da serotonina na manifestação da ansiedade mostra-se como um caminho promissor para ampliar a compreensão sobre a mesma. A serotonina exerce um duplo papel na regulação da ansiedade: ansiogênico na amígdala e ansiolítico na substância cinzenta periaquedutal dorsal (SCPD) (Graeff et al., 1999). Na teoria Deakin-Graeff, diferentes regiões encefálicas teriam funções únicas e relevantes para a patofisiologia da ansiedade, relacionada a subpopulações de serotonina localizadas no núcleo dorsal da rafe (NR) e núcleo mediano do rafe (NMR) (Deakin & Graeff, 1991; Graeff et al., 1996). Dessa forma, a serotonina exerce um duplo papel na regulação da ansiedade: ansiogênico (aumenta a ansiedade) na amígdala e ansiolítico (diminui a ansiedade) na substância cinzenta periaquedutal dorsal (SCPD) (Graeff et al., 1999) por meio de projeções do NR ao SCPD e do NR à amígdala (Deakin & Graeff, 1991; Graeff et al., 1996). Em relação a esta teoria, alguns avanços foram possíveis de observar quando

relacionadas à ansiedade, como o sistema serotoninérgico no sistema de conflitos de ansiedade, um sistema serotoninérgico nas partes dorsal e caudal da linha média do núcleo dorsal da rafe (NDCR/NDR), projetando-se para o núcleo basolateral da amígdala (BLA) que é ativado por drogas ansiogênicas (Paul et al., 2014).

Apesar de o papel da serotonina nestes comportamentos já apresentarem-se de forma relativamente clara a forma como essa relação se manifesta dada a complexidade do sistema e de sua ampla distribuição encefálica. O sistema serotoninérgico é um sistema complexo, constituído de 7 famílias que estão divididas (em mamíferos) em 14 subtipos de receptores. Um destes subtipos é o receptor 5-HT<sub>2C</sub>, um héteroreceptor excitatório acoplado à proteína G que se encontra em diversas regiões encefálicas e com localização geralmente pós-sináptica (Bécamel et al., 2004). De forma geral, sabe-se que os agonistas<sup>1</sup> do receptor 5-HT<sub>2C</sub> aumentam os comportamentos de ansiedade e induzem a hipofagia (consumo reduzido de alimentos), mas o papel exato destes receptores nos transtornos do humor permanece controverso, alguns sugerindo agonistas e outros sugerindo que os antagonistas podem ser antidepressivos eficazes, capazes de reduzir sintomas resultantes da depressão embora haja um consenso geral de que os antagonistas<sup>1</sup> são ansiolíticos benéficos, capazes de diminuir comportamentos típicos da ansiedade (Kimura et al., 2009).

Diversos estudos com camundongos vem buscando ampliar o conhecimento da participação dos receptores 5HT<sub>2C</sub> na manifestação do comportamento tipo ansiedade. Graeff, Viana e Mora (1997) demonstraram que no Labirinto em T Elevado a administração dos

---

<sup>1</sup> Agonistas são moléculas que, quando presentes, se ligam e ativam os seus receptores, ou seja, aumentam a quantidade de receptores em funcionamento. Por outro lado, moléculas antagonistas não possuem eficácia intrínseca, ligando-se a seus receptores mas não os ativando; como os antagonistas competem com os ligantes endógenos (p. ex., neurotransmissores) pelo receptor, sua presença pode produzir efeitos fisiológicos ao impedir a ação do neurotransmissor endógeno (Golan et al., 2014).

antagonistas seletivos 5-HT<sub>2C</sub> SB 200646A e SDZ SER 082 e pelo antagonista misto 5-HT<sub>2A/2C</sub> ritanserina prejudicou a evitação inibitória. Todos os antagonistas 5-HT<sub>2</sub> utilizados foram ineficazes na fuga só de ida. Portanto, o medo condicionado parece ser tonicamente facilitado através do receptor 5-HT<sub>2C</sub>. O medo incondicionado pode ser fasicamente inibido pela ativação do receptor 5HT<sub>2C</sub>.

No Labirinto em Cruz Elevada a administração aguda do agonista seletivo do 5HT<sub>2C</sub> WAY 161503 em ratos Wistar reduziram seletivamente a exploração dos braços abertos e aumentaram a avaliação de risco sem afetar a atividade locomotora. (Gomes et al., 2010).

Os resultados apresentados demonstram a necessidade de se ampliar estudos para que se busque uma maior compreensão do papel deste receptor nos comportamentos relacionados à ansiedade.

### **Modelos Animais em Psicopatologia Experimental**

O campo da psicopatologia atua diretamente na tentativa de se compreender os fenômenos relacionados aos transtornos mentais. Dentro da psicopatologia, a psicopatologia experimental é o ramo que busca, através do método experimental, a compreensão de fundamentos neurocomportamentais de um transtorno e assim, de seu potencial tratamento (Maximino & Van Der Staay, 2019). Na literatura, diversos autores apresentam definições acerca destes modelos, a exemplo dos modelos animais, como em Van der Staay (2006, p.133-134):

um modelo animal com características biológicas e/ou clínicas relevantes nas neurociências comportamentais é um método com organismos vivos, usado para estudar as relações neuro-comportamentais sob condições controladas, com o objetivo final de obter *insights* e permitir previsões sobre essas relações em humanos e/ou uma espécie outra do que a estudada, ou na mesma espécie sob condições diferentes daquelas em que o estudo foi realizado (Van Der Staay, 2006, p.133-134).

Temos então nos modelos animais a possibilidade de uma maior compreensão acerca dos transtornos através de condições análogas às apresentadas nos seres experimentados.



Kalueff et al. (2008) trazem o frequente aparecimento da coexistência de diversos transtornos comportamentais, reconhecendo-se uma mesma base de elementos de diversas psicopatologias: emocionais, de personalidade e comportamentais.

Para determinar qual o tipo de teste e/ou modelo será empregado na sua pesquisa é preciso compreender as diferenças de aplicabilidade entre eles. Maximino & Van Der Staay (2019, p.5) detalham essas diferenças na tabela a seguir:

**Tabela 1 – Diferenças entre Testes e/ou Modelo Comportamental**

| <b>Tipo de Categoria</b> |                          | <b>Propósito</b>   | <b>Trabalho Epistêmico</b>  |
|--------------------------|--------------------------|--|---|
| Testes                   | Ensaio de Triagem        | Permite que a compreensão limitada de um aspecto isolado de um mecanismo biológico complexo seja mapeada<br>Utilidade preditiva limitada (por exemplo, prever a atividade desejada do medicamento) | Baixa fidelidade (o mecanismo subjacente não precisa ser semelhante)<br>Baixa capacidade de discriminação (não necessariamente sensível a, por exemplo, fatores desencadeantes)<br>Não necessariamente baseado em hipóteses<br>Baixa validade de construto; validade preditiva moderada (somente isomorfismo farmacológico) |
|                          | Ensaio Biocomportamental | Permitem uma compreensão mais ampla de um mecanismo, sem necessidade de analogia causal<br>Utilidade preditiva moderada [por exemplo,  | Baixa fidelidade (mecanismo semelhante, mas não causalmente análogo).<br>Alta capacidade de discriminação (sensível a perturbações por  |

|         |           |   |  |
|---------|-----------|---|--|
|         |           | estudo de bases neurais de (dis)funções comportamentais]  | definição)<br>Alta validade preditiva, na melhor das hipóteses<br>moderada validade de construto<br>moderada   |
| Modelos | Simulação | Pode permitir inferências e extrapolações para a desordem humana, com alta probabilidade de que a hipótese assim gerada seja verdadeira | Alta fidelidade (mecanismos semelhantes com provável analogia)<br>Alta capacidade de discriminação (sensível a perturbações por definição)<br>Alta validade facial, preditiva e de construto (considera a necessidade de abordar construtos teóricos sobre etiologia, sintomatologia e tratamento) |

*Nota:* Traduzido de Maximino & Van Der Staay (2019, p.5)

### **Zebrafish como Organismo Modelo em Comportamento Tipo Ansiedade**

A psicologia evolucionária e psiquiatria evolucionária colaboram com a análise do comportamento da ansiedade através da identificação de um conjunto de estratégias defensivas que são comuns a várias espécies que foram associadas a ansiedade humana e emoções relacionadas. Com a presença de restrições ambientais prevalentes no planeta Terra de forma semelhantes, ocorreu uma evolução convergente, acarretando na mesma base de estratégias de defesa em praticamente todos os vertebrados e até algumas espécies animais não vertebradas. Porém, com o propósito de relacionar estratégias de defesa animal com ansiedade humana em termos neurobiológicos, apenas animais que têm cérebros filogeneticamente relacionados ao cérebro humanos são úteis (Shuhama et al., 2007).

Para o desenvolvimento de tais estudos, vê-se no *zebrafish* (Figura 1) uma opção viável e de grande vantagem em comparação a outros modelos animais, à exemplo dos camundongos. O *zebrafish* (*Danio rerio* Hamilton 1822), também conhecido como peixe paulistinha, é um pequeno teleósteo de 3-4 cm pertencente a família *Cyprinidae*, que combina a relevância de ser um vertebrado com a escala de um invertebrado que demande um pequeno espaço para a manutenção, o baixo custo e a praticidade para triagens em larga escala, ao mesmo tempo em que apresenta complexidade fisiológica grande (Kokel & Peterson, 2008; Rinkwitz et al., 2011; Zon & Peterson, 2005).

### **Figura 1**

*Zebrafish (Danio Rerio Hamilton 1822)*



*Fonte:* Imagem da própria autora

Diversos estudos recentes demonstram o alto potencial do *zebrafish* como um organismo-modelo para estudos que abordam fenômenos como resposta a novidade, ansiedade, estresse e medo (Gerlai, 2013; Guo et al., 2012; Iturriaga-Vasquez et al., 2012; Jesuthasan & Mathuru, 2008; Kalueff et al., 2012; Maximino et al., 2010a, 2012; Nguyen et al., 2014; Perathoner et al., 2016; Stewart et al., 2012; Alves, 2022; de Moura et al., 2022). Um importante avanço para a utilização do *zebrafish* como potencial modelo para a ansiedade foi a definição do “comportamento de ansiedade (ou tipo ansiedade)” nestes indivíduos por Kalueff (2012):

“comportamento complexo evocado por ambientes/estímulos perigosos ou potencialmente perigosos,

incluindo exploração reduzida, preferência pelo fundo (mergulho), tigmotaxia, preferência pelo escuro, congelamento, mudança na coloração corporal, e nado errático.” (Kalueff, 2012, p.1022)

Esses comportamentos podem ser observados durante a realização de testes comportamentais, como o teste de Distribuição Vertical Eliciado pela Novidade, em que o animal explora livremente um aquário novo, e a novidade do ambiente elicia respostas de fuga do topo (Blaser & Goldsteinholm, 2012). No geral, drogas e tratamentos ansiogênicos aumentam o tempo no fundo do aquário, com aumento concomitante de nado errático e congelamento, enquanto drogas e tratamentos ansiolíticos produzem padrão inverso (Cachat et al., 2011). A medida de tempo no topo ou no fundo (geotaxia) parece indicar o estado de ansiedade, enquanto as medidas de nado errático e congelamento estão mais associadas a um estado de medo; as entradas no topo e entradas totais, bem como a formação de *homebases* (Stewart et al., 2011), medem exploração.

Um outro exemplo de testes comportamentais é o teste de preferência claro-escuro: um conflito aproximação-evitação elicia a preferência pela escuridão, com explorações cuidadosas e breves do compartimento branco associadas a avaliação de risco e tigmotaxia (Maximino et al., 2010b, 2014). Também é observado nado errático e congelamento nesse teste.

O sistema serotoninérgico no *zebrafish* apresenta ao menos três grupos de neurônios serotoninérgicos (núcleos da rafe, populações hipotalâmicas e área pretectal), porém apenas os referentes ao núcleos da rafe, localizados no rombencéfalo, são encontrados em mamíferos (Herculano & Maximino, 2014).

O fato de o *zebrafish* possuir um gene capaz de realizar a decodificação do receptor 5HT<sub>2C</sub> faz com que o animal seja promissor nas pesquisas que envolvem mecanismos que dependam deste receptor (Schneider et al., 2012). Porém, devido ao processo de duplicação genômica ocorrida com os peixes teleósteos, este gene encontra-se duplicado no *zebrafish* desde seu período larval (Sourbron et al., 2016) o que pode vir a dificultar, considerando não ser possível identificar qual dos dois genes recebe (HTR2CL1 ou HTR2C12) influência

do fármaco aplicado (do Carmo Silva et al., 2021).

Sendo assim, destacando a necessidade de se aumentar a compreensão acerca do papel do sistema serotoninérgico e os domínios comportamentais importantes para a psicopatologia, busca-se entender o papel do receptor 5-HT<sub>2C</sub> sobre os parâmetros comportamentais relacionados ao comportamento tipo ansiedade no peixe *zebrafish*.

Alguns estudos apontam o papel desse receptor em processos comportamentais relevantes para o medo e para a ansiedade em *zebrafish*. Após a exposição de *zebrafish* adultos à substância de alarme co-específico (CAS), tratados com os agonistas do receptor 5-HT<sub>2C</sub> MK-212 ou WAY-161503 ou com o antagonista RS-102221 observou-se comportamento durante (ameaça distal) e depois (ameaça potencial) da exposição. Os agonistas bloquearam o comportamento defensivo induzido pelo CAS (ameaça distal), mas não aumentaram pós-exposição no comportamento defensivo (ameaça potencial), sugerindo inibição de respostas à ameaça distal. MK-212 bloqueou alterações no congelamento provocadas por estresse agudo de contenção, um modelo de ameaça proximal, enquanto RS-102221 bloqueou mudanças na geotaxia suscitou esse estressor. Descobriu-se também que o RS-102221, produziu pequeno efeito no comportamento durante e após a exposição ao CAS (Do Carmo Silva et al., 2021).

No quesito sociabilidade e agressividade, *zebrafish* tratados com MK-212 e testados com testes de interação e investigação social, teste de abordagem condicional ou testes agressivos induzidos por espelho aumentaram a preferência por um co-específico desconhecido no teste de investigação social, mas também aumentaram a preferência pelo co-específico conhecido no teste de novidade social e diminuiu a inspeção de predadores no teste de abordagem condicional e aumentou a duração da exibição no espelho em teste agressivos, enquanto que os testados sob efeito de RS-102221 diminuiu a preferência no teste de investigação social, mas aumentou a preferência pelo co-específico no teste de novidade social e diminuiu o tempo na zona de exibição no espelho durante o teste de exibição agressivo (De

Moura et al., 2022), demonstrando o papel complexo dos receptores 5HT<sub>2C</sub> em diferentes contextos sociais no *zebrafish*, revelando uma participação na plasticidade social em vertebrados.

Assim, a investigação dos processos comportamentais envolvidos, bem como a padronização e uma melhor validação no nível de construto de novos testes comportamentais em *zebrafish*, permitirá a criação de modelos animais mais sólidos para diferentes transtornos. Além disso, essa abordagem corresponde a uma estratégia para fomentar novas hipóteses experimentais, a formação de recursos humanos, bem como para auxiliar na transposição dos resultados da pesquisa básica para uma abordagem psicobiológica.

No mais, este ensaio biocomportamental busca avaliar a ansiedade como comportamento normal, sem que os animais passem por manipulação que simule os transtornos de ansiedade e/ou TMCs em humanos, buscando contribuições significativa para uma melhor compreensão e caracterização dos mecanismos envolvidos nos diversos efeitos comportamentais de drogas serotoninérgicas, além de tornar possível a elaboração de novas ferramentas para o estudo e triagem de novas moléculas com potencial psicoativo em larga escala.

**Objetivos:****Objetivo Geral**

- Realizar uma caracterização sistemática dos efeitos da ativação e inativação do receptor serotoninérgico 5-HT<sub>2C</sub> sobre comportamento tipo-ansiedade, utilizando o *zebrafish* como organismo-modelo.

**Objetivos Específicos**

- Avaliar os efeitos de agonistas e antagonistas do receptor 5-HT<sub>2C</sub>) sobre parâmetros comportamentais associados a transtornos de ansiedade (locomoção, exploração) no teste claro escuro;
- Avaliar os efeitos de fármacos serotoninérgicos (agonistas e antagonistas do receptor 5-HT<sub>2C</sub>) sobre parâmetros comportamentais associados a transtornos de ansiedade (locomoção, exploração) no teste de distribuição vertical eliciada pela novidade;

## **Método**

### **Sujeitos e Condições de Manutenção**

Foram utilizados 18 *zebrafish* (*Danio rerio*, Hamilton 1822) selvagens adultos (4-6 meses de idade), de ambos os sexos, obtidos de colônia resultante de cruzamentos entre animais adquiridos em lojas especializadas. 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 declorada, a qual foi mantida sob aeração e filtração química e mecânica constante a uma temperatura de  $28 \pm 2^\circ\text{C}$  e pH 7,2. A iluminação da sala foi fornecida por lâmpadas fluorescentes. Os animais foram alimentados duas vezes por dia com ração comercial (28% de proteína bruta). Cerca de 30% da água dos aquários era trocada diariamente. As normas para manuseio dos indivíduos seguiram o texto ditado pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) (Concea, 2017) e o presente trabalho foi submetido à Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA/Unifesspa) sob o protocolo 23479.020944/2022-04.

### **Tratamento Farmacológico**

Para a manipulação dos animais, utilizou-se tratamentos farmacológicos com agonistas e antagonistas do receptor 5-HT<sub>2C</sub>. Os animais foram escolhidos nos tanques de aclimatação de forma aleatória, totalizando n = 18 sujeitos, divididos em três grupos de n = 6 sujeitos cada. Estes grupos são Grupo Controle, RS-102221 e MK 212. O grupo controle recebeu injeção de solução-veículo, a solução salina de Cortland (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), enquanto o grupo tratado com RS-102221 recebeu injeção intraperitoneal na dose de 2 mg/kg do antagonista ao receptor 5HT<sub>2C</sub>, e o grupo tratado com MK-212 recebeu injeção intraperitoneal de 2 mg/kg do agonista ao receptor 5HT<sub>2C</sub>. Essas doses foram escolhidas com

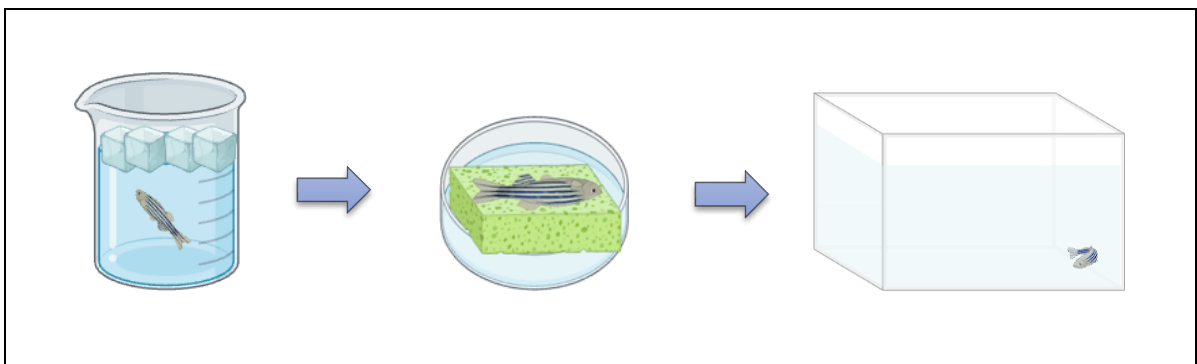


base em seus efeitos comportamentais descritos em *zebrafish* (Do Carmo Silva et al., 2021; Moura et al., 2022).

Os indivíduos foram transferidos para sala de teste onde, um a um, iniciou-se o manuseio para o tratamento farmacológico. A escolha de indivíduo ocorreu de forma aleatória em relação ao grupo pertencente, por meio de sorteio. O sujeito de teste iniciou sendo crioanestesiado com água fria (~ 12 °C); imediatamente após o aparecimento dos sinais de plano anestésico, foi transferido para uma cama cirúrgica umedecida onde injetou-se o fármaco correspondente utilizando uma microseringa (Hamilton 701N, agulha tamanho 26, calibre em ponta cônica 200, 10 µL), de acordo com protocolo descrito em Kinkel et al. (2010). Após a injeção, o sujeito foi transferido imediatamente para um tanque de recuperação, composto por um aquário de medidas 15cm x 25cm x20cm (largura x comprimento x altura) com uma coluna de água de clorada de 10cm, por 15 minutos (Figura 2). Findando os 15 minutos de recuperação iniciou-se a testagem seguindo a sequência: Teste de Distribuição Eliciada pela Novidade e Teste Claro e Escuro, ambos descritos a seguir. Cada peixe realizou ambos os testes, de forma sequencial, a fim de não exceder o tempo e o fármaco ser eliminado antes do final dos testes.

## Figura 2

*Preparação, aplicação do fármaco no indivíduo e recuperação*



*Nota* Elaborada pela própria autora

## Testes Comportamentais

De maneira geral, as tarefas descritas abaixo se propõem a avaliar parâmetros relacionados à locomoção/exploração e ansiedade, sendo que as mesmas se realizaram no período de 10:00 às 15:00, a fim de respeitar o fotoperíodo do indivíduo. A iluminação da sala é uma variável crítica, pois pode alterar o comportamento dos peixes (Facciol et al., 2017, 2019), assim imediatamente antes de cada tentativa aferiu-se a sua medida através de luxímetro resultando uma média de  $518,7 \text{ lux} \pm 39,7$  acima do tanque. A fim de bloquear possíveis interferências sonoras, o experimento foi executado sob o ruído branco Gaussiano constante, produzindo uma média de  $63,2 \text{ dB} \pm 3,96$  acima do tanque.

## Distribuição Vertical Eliciada Pela Novidade

De modo geral, esta tarefa se propõe a avaliar a locomoção/exploração vertical do *zebrafish*, bem como comportamentos de medo/ansiedade relacionados a respostas à novidade (Cachat et al. 2010; Egan et al., 2009; Levin et al. 2007). A avaliação comportamental dos animais foi realizada de acordo com os parâmetros relacionados à locomoção e à posição vertical que o animal ocupou no aparato de teste durante o período de testagem de 6 min, gerando um padrão de perfil exploratório espaço-temporal (Maximino et al., 2013, 2015).

Nesta primeira tarefa, o animal explorou livremente um aquário novo por 6 minutos, e a novidade do ambiente elicia respostas de fuga do topo (Blaser & Goldsteinholm, 2012); via de regra, drogas e tratamentos ansiogênicos aumentam o tempo no fundo do aquário, com aumento concomitante de nado errático e congelamento, enquanto drogas e tratamentos ansiolíticos produzem padrão inverso (Cachat et al., 2011).

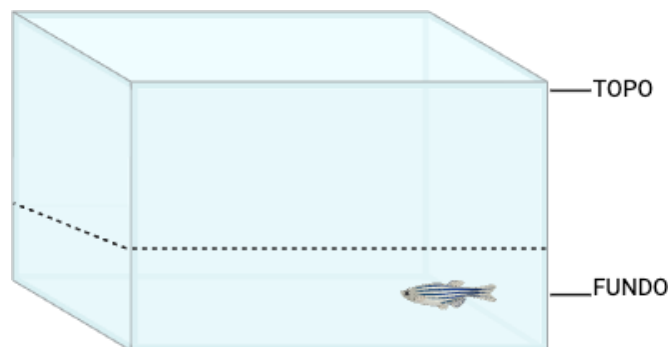
O aparato de teste é composto por um aquário de medidas 15 x 25 x 20 (largura x comprimento x altura) (Figura 3) preenchido por água até a sua extremidade (Egan et al., 2009). Toda a atividade foi registrada por filmagem. A análise do vídeo se deu utilizando o *software* TheRealFishTracker v. 0.4.0 (<https://www.dgp.toronto.edu/~mccrae/projects/FishTracker/>).

Na análise os parâmetros considerados basearam-se em Kalueff et al. (2013) com legenda correspondente informada:

- geotaxia (duração): Tempo dispendido no terço inferior do aquário (ZBC1.46);
- congelamento (duração): Imobilidade na qual somente os opérculos e olhos se movem, com velocidade de deslocamento menor do que 0,5 cm/s; (ZBC1.68))
- nado errático (ângulo absoluto de virada): movimentos em zigue-zague caracterizados por mudanças rápidas na aceleração linear e angular em sequências curtas, mensurado pelo ângulo absoluto de virada. (ZBC1.51)
- velocidade: avaliou-se a velocidade a fim de investigar se a droga possuía caráter sedativo ao animal

### Figura 3

*Representação do Aparato de Teste de Distribuição Vertical Elicida pela Novidade*



*Nota* Elaborada pela própria autora

### Teste de Preferência Claro-Escuro

O comportamento de escototaxia em *zebrafish*, caracterizado pela preferência por ambientes escuros em detrimento a ambientes claros, tem sido descrito e validado como um modelo para a avaliação do comportamento tipo-ansiedade para a espécie (Araújo et al., 2012;

Maximino et al., 2010b, 2012, 2014; Stewart et al., 2011). Seguiu-se o protocolo estabelecido no grupo de pesquisa <https://www.protocols.io/view/light-dark-preference-test-for-adult-zebrafish-dan-bp2165yzgqe5/v2> com avaliação do número de entradas e o tempo de permanência no compartimento branco, frequência de nado errático e avaliação de risco, frequência e duração de congelamento, e duração de tigmotaxia. O aparato de teste do Teste Claro e Escuro constitui-se de um tanque de acrílico (15 cm × 10 cm × 45cm de altura × largura × comprimento) que é dividido igualmente em metade preto e metade branco (Figura 4). As paredes e o fundo são pretos ou brancos, de modo a garantir substratos uniformes para cada compartimento. A coluna de água foi mantida a 10 cm, obtendo-se um volume final de 4,5 litros. A água utilizada foi declorada. O material colorido escolhido não deve ser refletivo, para evitar a manifestação dos animais que apresentam tendência ao cardume de se comportarem em relação ao próprio reflexo. O tanque contém portas deslizantes centrais, coloridas com a mesma cor da lateral do aquário, definindo assim um compartimento central sem cor.

Imediatamente após a saída do animal do aparato de testes referente à Distribuição Vertical Elicida a Novidade o animal é posto no centro do aparato de testes referente ao Teste Claro e Escuro, por 3 minutos para reaclimação. Após os 3 minutos as portas deslizantes centrais são retiradas e o teste e seu registro por imagem é iniciado. Esta testagem tem uma duração de 15 minutos. Os dados coletados foram analisados através do *software* X-plo-rat (<https://github.com/lanec-unifesspa/x-plo-rat>).

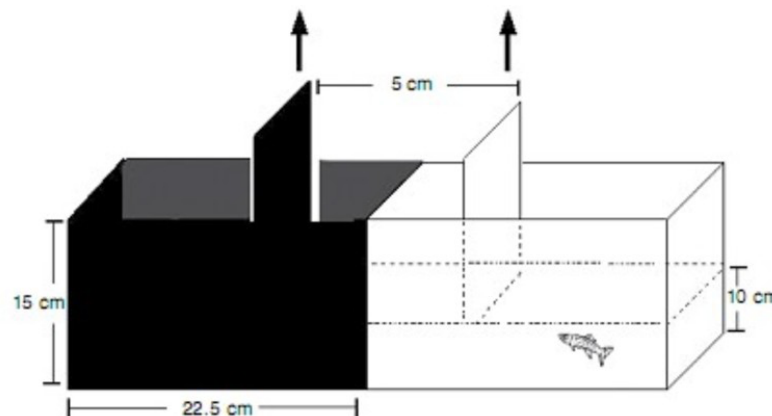
Na análise os parâmetros considerados basearam-se em Kalueff et al. (2013) com legenda correspondente informada:

- número de entradas (frequência): momento em que o animal realiza entradas superiores a 5 segundos no compartimento branco (ZBC1.54);
- permanência no compartimento branco (duração): tempo em que o animal permanece no compartimento branco (ZBC1.137);

- nado errático (frequência): movimentos em zigue-zague caracterizados por mudanças rápidas na aceleração linear e angular em sequências curtas, mensurado pelo ângulo absoluto de virada. (termo ZBC1.51)
- avaliação de risco (frequência): entrada total ou parcial do animal no compartimento branco com duração abaixo de 5 segundos (n/a)
- tigmotaxia (duração): nado somente pelas bordas do aparato de testes (ZBC1.173)

#### Figura 4

*Representação do tanque para realização do teste claro/escuro*



*Nota:* Maximino et al. (2010b, p.224)

#### Análise Estatística

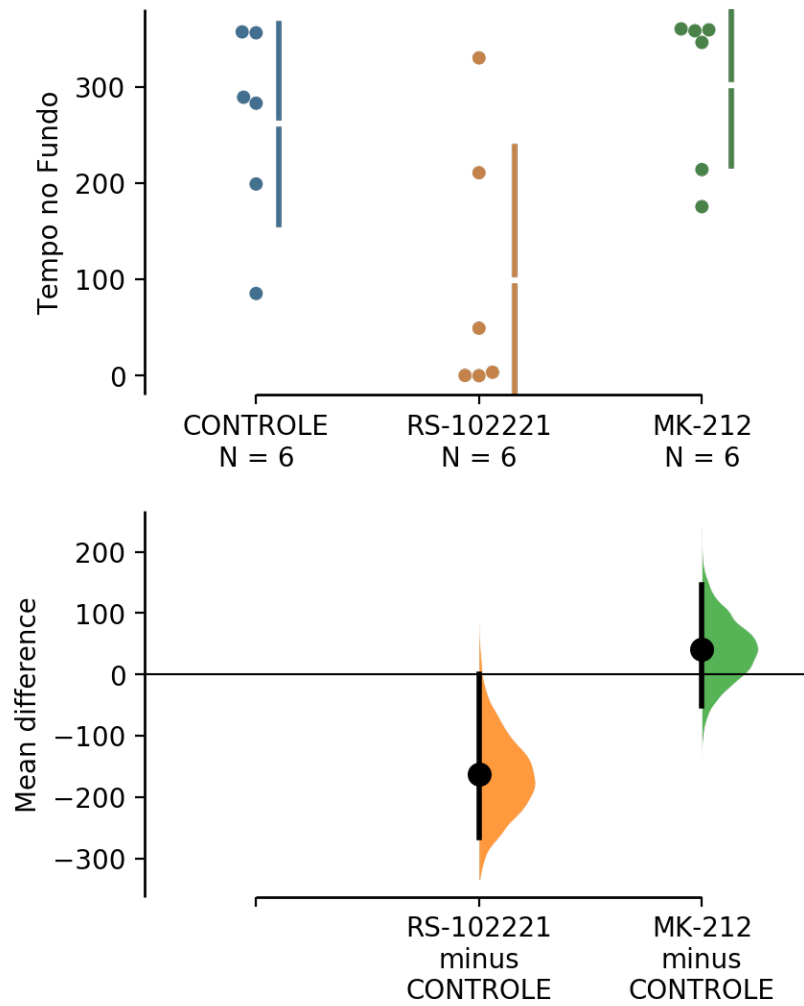
Os resultados obtidos pelos testes comportamentais foram analisados através de análise de variância (ANOVA) de uma via, seguida do teste *post hoc* de Tukey. Os dados foram apresentados sobre média  $\pm$  intervalo de confiança de 95% (paramétricos) ou sobre mediana  $\pm$  intervalo interquartil (não paramétricos). Valores de  $P \leq 0,05$  foram considerados estatisticamente significativos. Para a análise dos resultados, utilizou-se o programa JAMOVI.

#### Resultados

Teste de Distribuição Vertical Elicida pela Novidade

**Figura 5A**

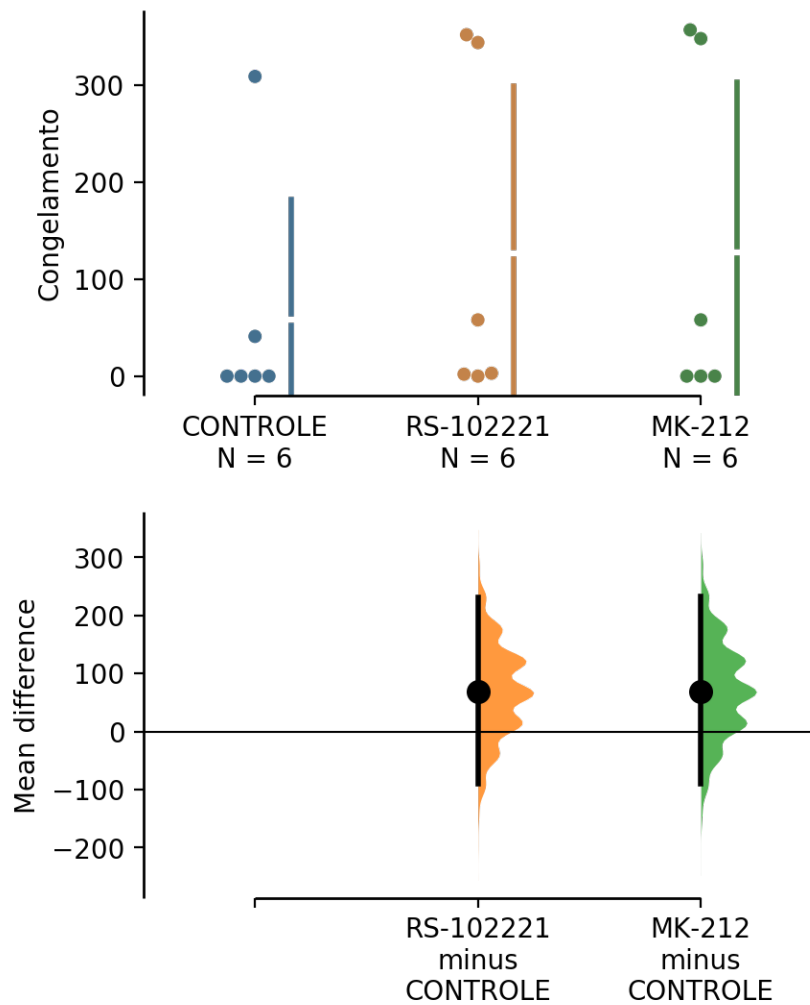
*Efeitos do uso dos fármacos RS-102221 e MK-212 no Tempo no Fundo*



*Nota:* Efeitos do tratamento com veículo, MK-212, ou RS-102221 sobre Tempo no Fundo durante o teste comportamental de Distribuição Elicida Pela Novidade. A diferença média entre os grupos MK-212 e RS-102221 com o CONTROLE compartilhado é mostrada no gráfico de estimativa de Cumming acima. Os dados brutos são plotados nos eixos superiores. Nos eixos inferiores, as diferenças médias são representadas graficamente como distribuições de amostragem bootstrap. Cada diferença média é representada como um ponto. Cada intervalo de confiança de 95% é indicado pelas extremidades das barras de erro verticais.

**Figura 5B**

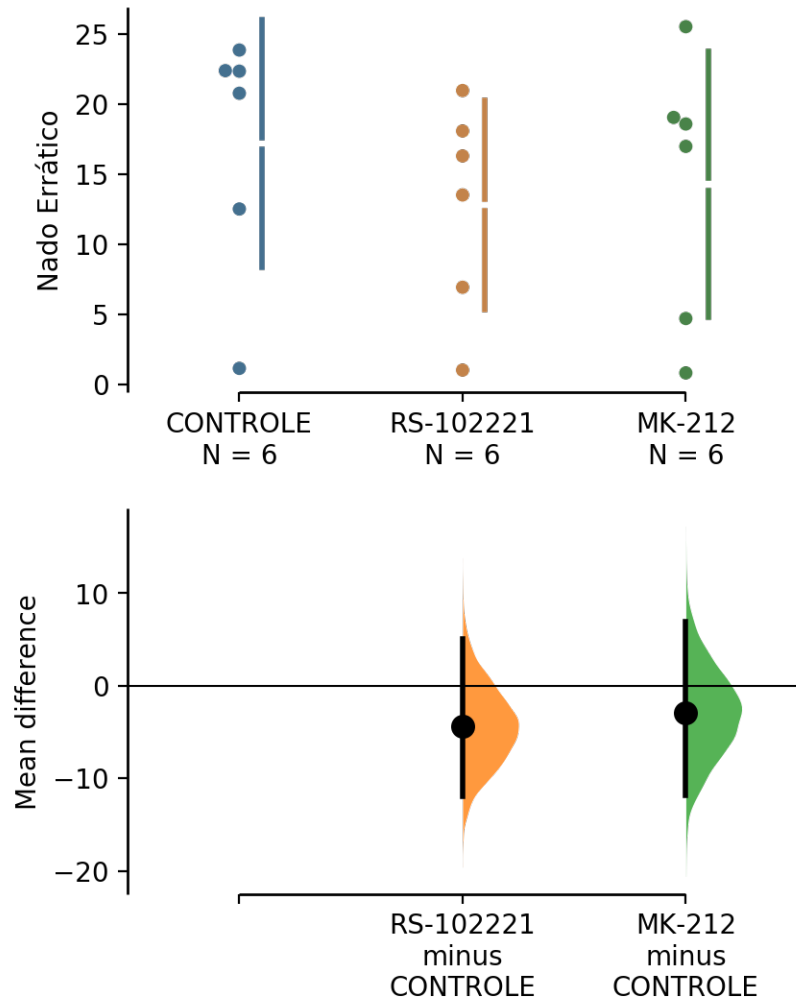
*Efeitos do uso dos fármacos RS-102221 e MK-212 no Congelamento*



*Nota:* Efeitos do tratamento com veículo, MK-212, ou RS-102221 sobre Congelamento durante o teste comportamental de Distribuição Elicida Pela Novidade. A diferença média entre os grupos MK-212 e RS-102221 com o CONTROLE compartilhado é mostrada no gráfico de estimativa de Cumming acima. Os dados brutos são plotados nos eixos superiores. Nos eixos inferiores, as diferenças médias são representadas graficamente como distribuições de amostragem bootstrap. Cada diferença média é representada como um ponto. Cada intervalo de confiança de 95% é indicado pelas extremidades das barras de erro verticais.

**Figura 5C**

*Efeitos do uso dos fármacos RS-102221 e MK-212 no Nado Errático*

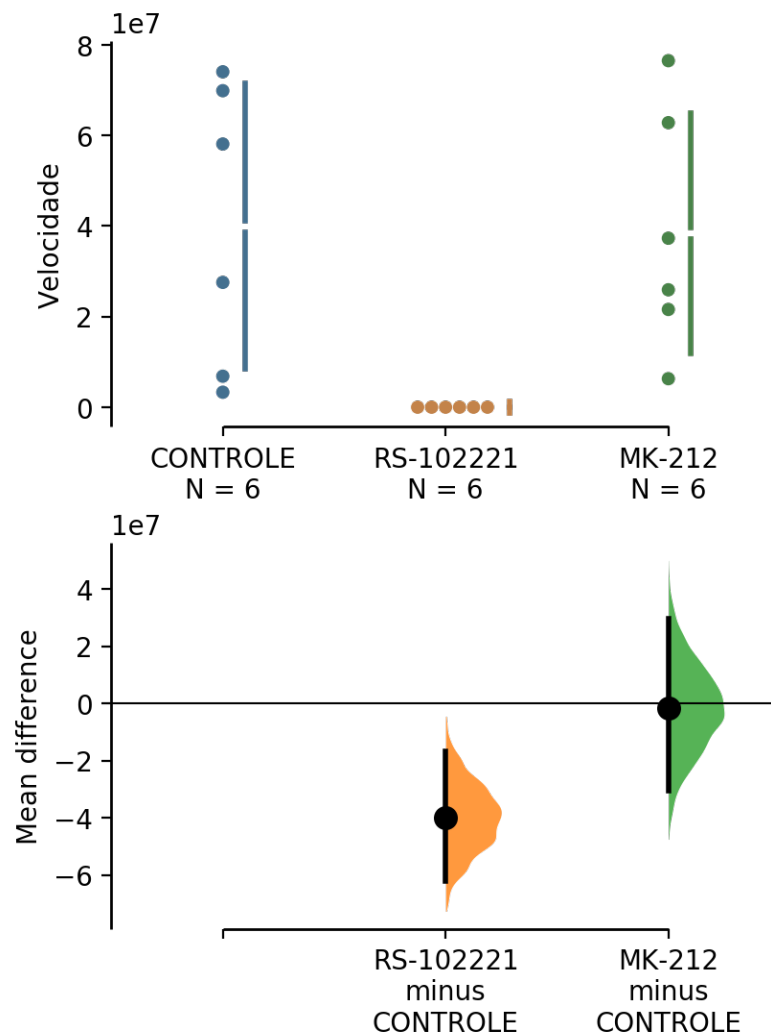


*Nota:* Efeitos do tratamento com veículo, MK-212, ou RS-102221 sobre Nado Errático durante o teste comportamental de Distribuição Eliciada Pela Novidade. A diferença média entre os grupos MK-212 e RS-102221 com o CONTROLE compartilhado é mostrada no gráfico de estimativa de Cumming acima. Os dados brutos são plotados nos eixos superiores. Nos eixos inferiores, as diferenças médias são representadas graficamente como distribuições de amostragem bootstrap. Cada diferença média é representada como um ponto. Cada intervalo de confiança de 95% é indicado pelas extremidades das barras de erro verticais.



**Figura 5D**

*Efeitos do uso dos fármacos RS-102221 e MK-212 na Velocidade em Ambiente de Novidade*



*Nota:* Efeitos do tratamento com veículo, MK-212, ou RS-102221 sobre Velocidade durante o teste comportamental de Distribuição Elicida Pela Novidade. A diferença média entre os grupos MK-212 e RS-102221 com o CONTROLE compartilhado é mostrada no gráfico de estimativa de Cumming acima. Os dados brutos são plotados nos eixos superiores. Nos eixos inferiores, as diferenças médias são representadas graficamente como distribuições de amostragem bootstrap. Cada diferença média é representada como um ponto. Cada intervalo de confiança de 95% é indicado pelas extremidades das barras de erro verticais.

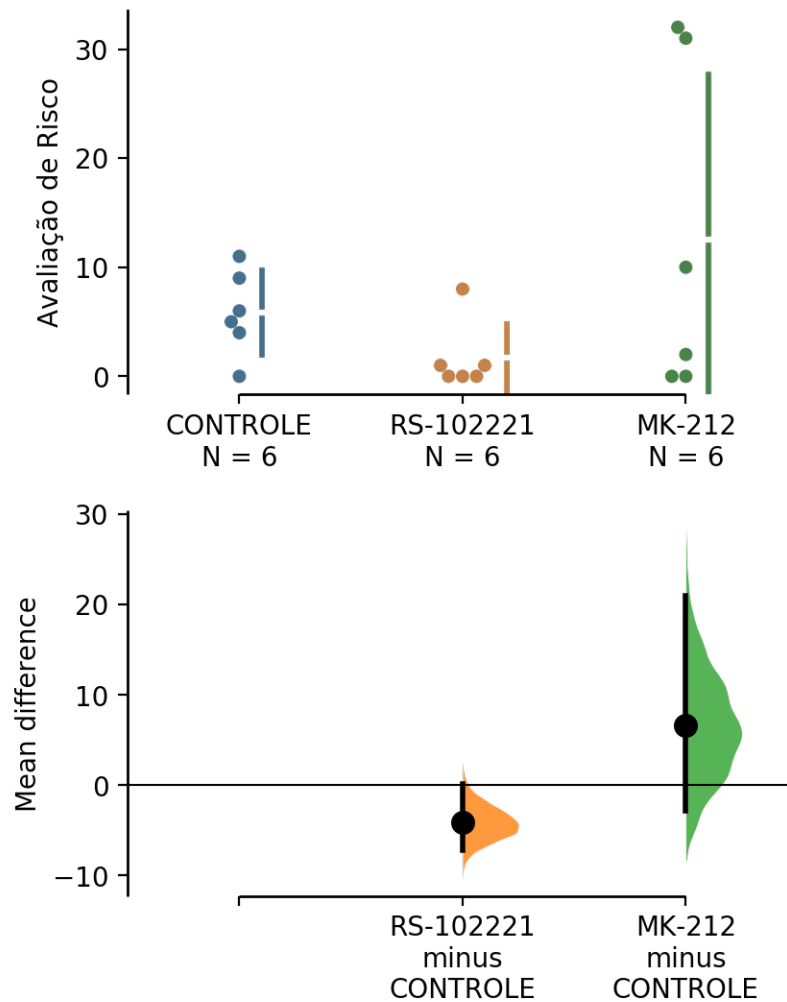
Observou-se efeito estatisticamente significativo no tempo no fundo ( $F[2, 15] = 5.58$ ,  $p = 0.015$ ,  $\omega^2 = 0.337$ ;  $p > 0,05$ , teste HSD de Tukey; Figura 5A) onde o grupo tratado com o antagonista RS-12221 ao receptor 5HT2C passou um tempo menor no fundo do aparato de

testes ao comparados ao grupo tratado com o agonista MK-212 ao receptor 5HT2C. Não foi observado significância nos efeitos dos fármacos aos parâmetros congelamento/freezing, ( $F[2,15] = 0.314$ ,  $p = 0.736$ ,  $w^2 = -0.088$ ; Figura 5B) velocidade ( $F[2,15] = 0.738$ ,  $p = 0.496$ ,  $w^2 = -0.032$ ; Figura 5C) e nado errático/ângulo absoluto ( $F[2,15] = 0.365$ ,  $p = 0.701$ ,  $w^2 = -0.081$ ; Figura 5D)

## Teste Claro e Escuro

### Figura 6A

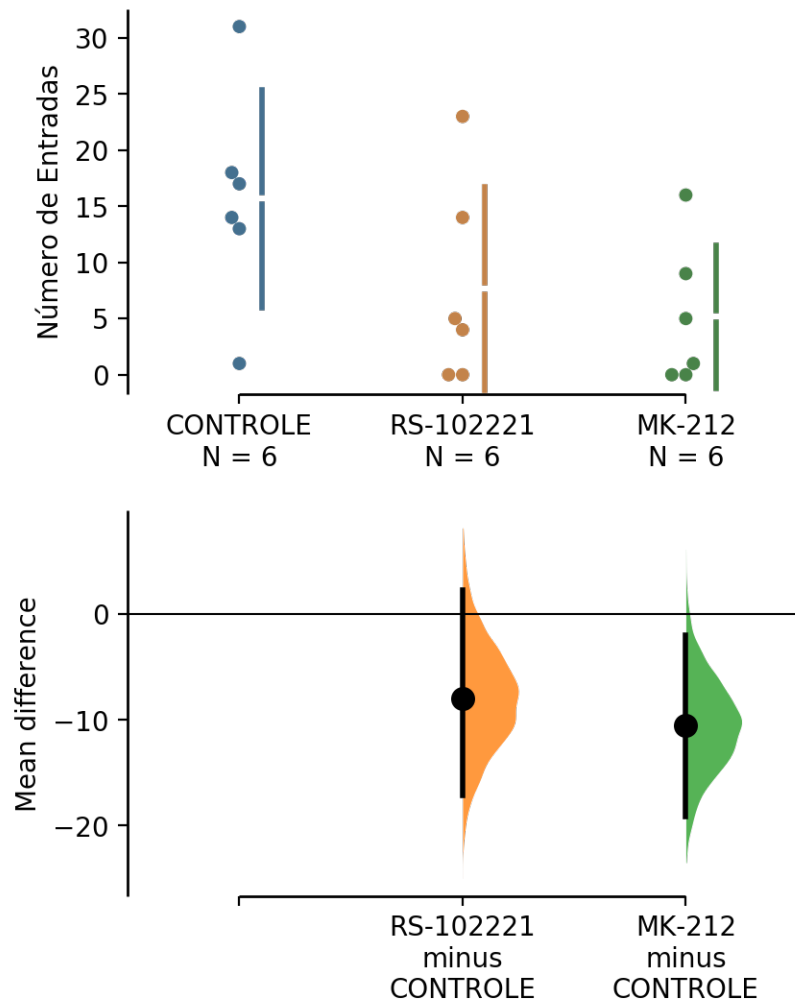
*Efeitos do uso dos fármacos RS-102221 e MK-212 na Avaliação De Risco*



*Nota:* Efeitos do tratamento com veículo, MK-212, ou RS-102221 sobre Avaliação de Risco durante o teste comportamental Claro e Escuro. A diferença média entre os grupos MK-212 e RS-102221 com o CONTROLE compartilhado é mostrada no gráfico de estimativa de Cumming acima. Os dados brutos são plotados nos eixos superiores. Nos eixos inferiores, as diferenças médias são representadas graficamente como distribuições de amostragem bootstrap. Cada diferença média é representada como um ponto. Cada intervalo de confiança de 95% é indicado pelas extremidades das barras de erro verticais.

**Figura 6B**

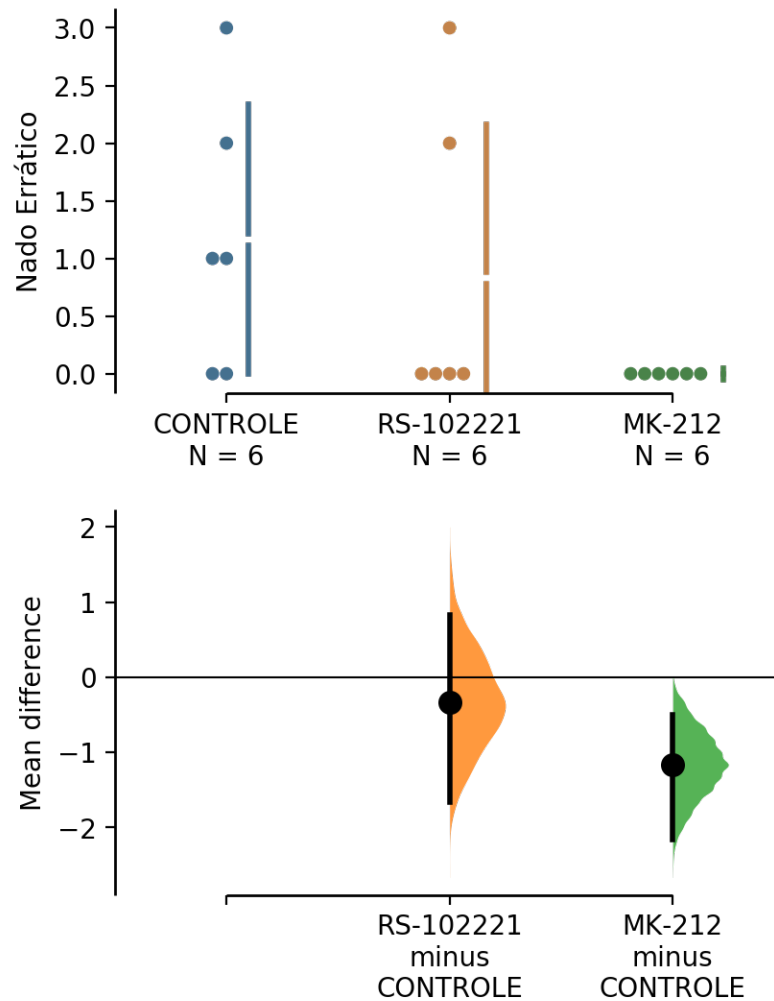
*Efeitos do uso dos fármacos RS-102221 e MK-212 no Número de Entradas*



*Nota:* Efeitos do tratamento com veículo, MK-212, ou RS-102221 sobre Número de Entradas durante o teste comportamental Claro e Escuro. A diferença média entre os grupos MK-212 e RS-102221 com o CONTROLE compartilhado é mostrada no gráfico de estimativa de Cumming acima. Os dados brutos são plotados nos eixos superiores. Nos eixos inferiores, as diferenças médias são representadas graficamente como distribuições de amostragem bootstrap. Cada diferença média é representada como um ponto. Cada intervalo de confiança de 95% é indicado pelas extremidades das barras de erro verticais.

**Figura 6C**

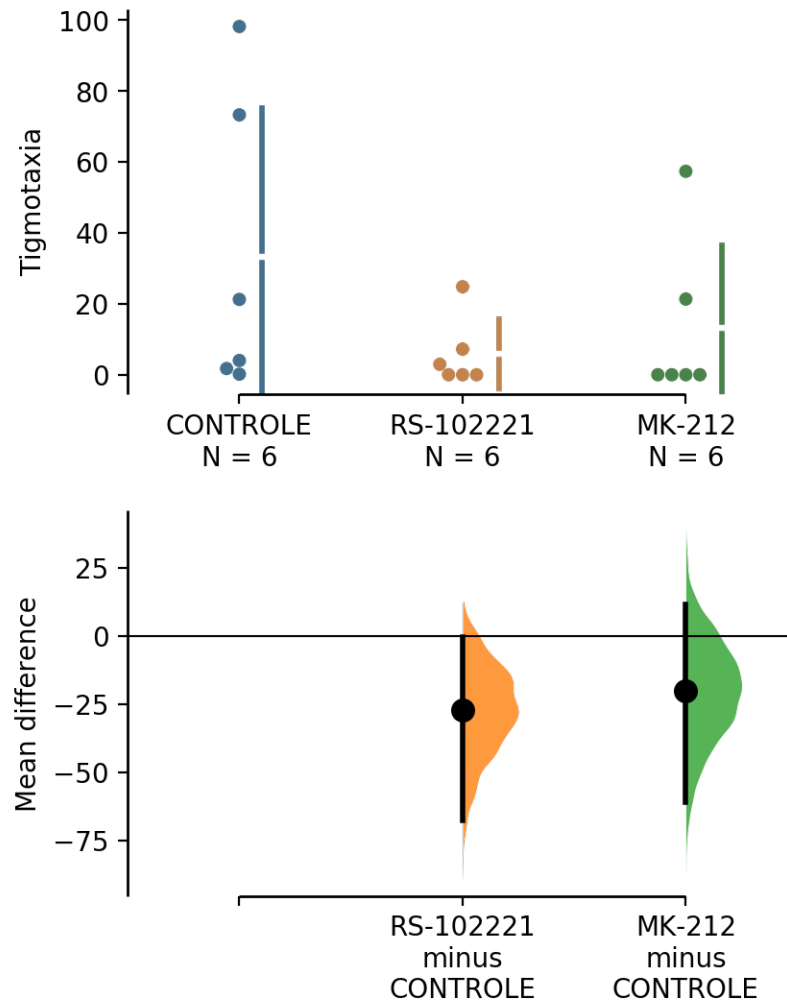
*Efeitos do uso dos fármacos RS-102221 e MK-212 no Nado Errático*



*Nota:* Efeitos do tratamento com veículo, MK-212, ou RS-102221 sobre Nado Errático durante o teste comportamental Claro e Escuro. A diferença média entre os grupos MK-212 e RS-102221 com o CONTROLE compartilhado é mostrada no gráfico de estimativa de Cumming acima. Os dados brutos são plotados nos eixos superiores. Nos eixos inferiores, as diferenças médias são representadas graficamente como distribuições de amostragem bootstrap. Cada diferença média é representada como um ponto. Cada intervalo de confiança de 95% é indicado pelas extremidades das barras de erro verticais.

**Figura 6D**

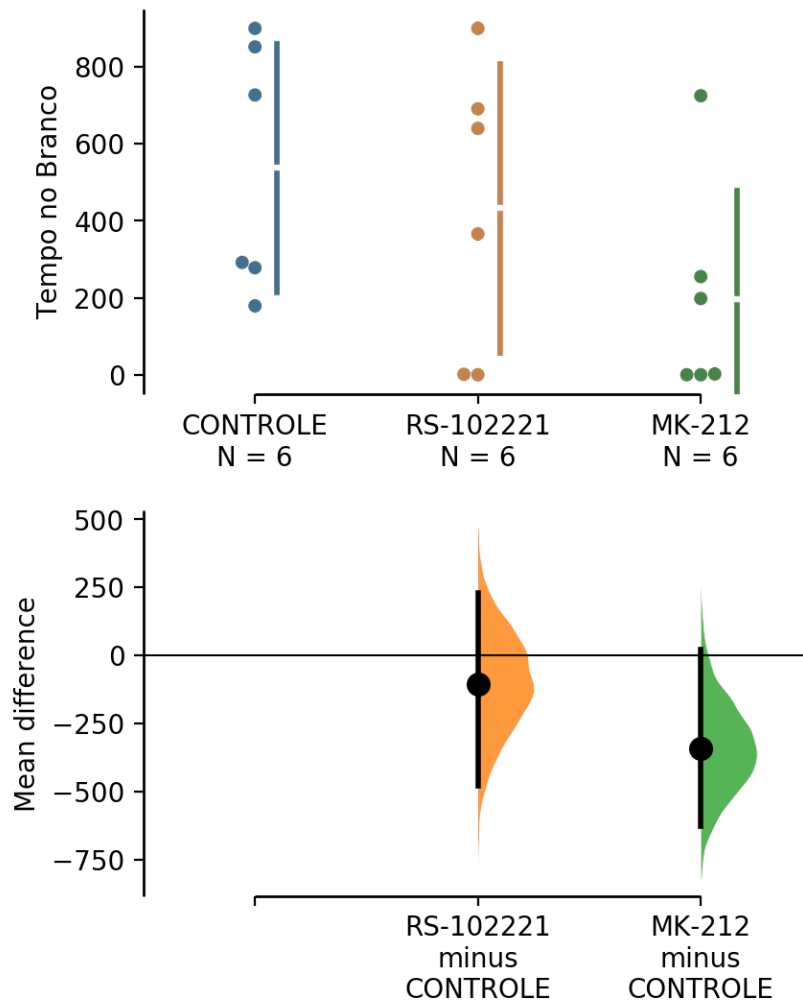
*Efeitos do uso dos fármacos RS-102221 e MK-212 na Tigmotaxia*



*Nota:* Efeitos do tratamento com veículo, MK-212, ou RS-102221 sobre Tigmtotaxia durante o teste comportamental Claro e Escuro. A diferença média entre os grupos MK-212 e RS-102221 com o CONTROLE compartilhado é mostrada no gráfico de estimativa de Cumming acima. Os dados brutos são plotados nos eixos superiores. Nos eixos inferiores, as diferenças médias são representadas graficamente como distribuições de amostragem bootstrap. Cada diferença média é representada como um ponto. Cada intervalo de confiança de 95% é indicado pelas extremidades das barras de erro verticais.

**Figura 6E**

*Efeitos do uso dos fármacos RS-102221 e MK-212 no Tempo no Compartimento Branco*



*Nota:* Efeitos do tratamento com veículo, MK-212, ou RS-102221 sobre Tempo no Compartimento Branco durante o teste comportamental Claro e Escuro. A diferença média entre os grupos MK-212 e RS-102221 com o CONTROLE compartilhado é mostrada no gráfico de estimativa de Cumming acima. Os dados brutos são plotados nos eixos superiores. Nos eixos inferiores, as diferenças médias são representadas graficamente como distribuições de amostragem bootstrap. Cada diferença média é representada como um ponto. Cada intervalo de confiança de 95% é indicado pelas extremidades das barras de erro verticais.

Não foi observado significância nos efeitos dos fármacos aos parâmetros de avaliação de risco ( $F[2,15] = 2.11$ ,  $p = 0.156$ ,  $w^2 = 0.110$ ; Figura 6A), número de entradas ( $F[2,15] = 2.50$ ,  $p = 0.116$ ,  $w^2 = 0.143$ ; Figura 6B) nado errático ( $F[2,15] = 2.07$ ,  $p = 0.160$ ,  $w^2 = 0.107$ ; Figura 6C), tigmotaxia ( $F[2,15] = 1.48$ ,  $p = 0.258$ ,  $w^2 = 0.051$ ; Figura 6D) e tempo no branco ( $F[2,15]$

= 2.35,  $p = 0.130$ ,  $w^2 = 0.130$ ; Figura 6E)

## Discussão

No que diz respeito o teste de distribuição vertical eliciada pela novidade os fármacos agonista e antagonista ao receptor 5HT<sub>2C</sub> não apresentaram efeitos nos parâmetros de velocidade, nado errático e congelamento porém o fármaco RS-102221 apresentou influência na permanência no fundo do aparato de testes quando comparado ao fármaco MK-212, causando uma diminuição significativa neste tempo. Esses efeitos são consistentes com uma excitação tônica da ansiedade no teste de Distribuição Vertical Eliciada pela Novidade, podendo vir indicar um comportamento ansiolítico da inativação do receptor 5HT<sub>2C</sub>. Este efeito vai em acordo com dados encontrados em Do Carmo Silva et al. (2021) onde a mesma dosagem causou um bloqueio nos parâmetros Nado Errático e Permanência no Fundo após exposição à substância de alarme, indicando esse possível efeito ansiolítico do fármaco.

Em contrapartida, durante exposição ao teste claro e escuro, ambos os fármacos não produziram efeitos significativos nos parâmetros analisados: avaliação de risco, número de entradas, nado errático, tigmotaxia e tempo no compartimento branco.

Levando em consideração que ambos os testes são parâmetros para avaliação do comportamento tipo-ansiedade esse resultado poderia levantar diferença na sensibilidade dos testes para avaliação deste comportamento, porém a meta-análise de Kysil et al. (2017) nos demonstra que ambos os testes possuem sensibilidade semelhante aos estados análogos aos da ansiedade do *zebrafish*, enfatizando sua utilidade em desenvolvimento para pesquisas neurocomportamentais que para os estudem.

Porém, apesar de sensibilidades semelhantes e de ambos os testes serem parâmetros válidos quando avaliamos comportamento tipo ansiedade os testes possuem avaliações de diferentes padrões. Enquanto que o teste de Distribuição Vertical Eliciada pela Novidade tem um padrão maior de fuga ao topo, o de Teste de Preferência Claro e Escuro apresenta um padrão



maior de esquiva-evitação.

Evidências importantes sugerem um papel do sistema serotoninérgico nesses processos, com a 5-HT aumentando a ansiedade no teste de preferência claro/escuro e diminuindo no teste de distribuição vertical eliciada pela novidade, de maneira dependente de receptor (Maximino et al., 2013; Nowicki et al., 2014). Desta forma, uma das hipóteses trazidas para a diferença de resultados pode se dar considerando esse dupla modulação serotoninérgica.

### **Conclusão e Perspectivas Futuras**

Durante o teste de distribuição vertical eliciada pela novidade MK-212 não produziu efeitos enquanto o RS-102221 diminuiu a geotaxia nesse teste; esses efeitos são consistentes com uma excitação tônica da ansiedade no teste de Distribuição Vertical Eliciada pela Novidade. Por outro lado, ambos os fármacos não causaram efeitos nos parâmetros analisados.

Apesar de ambos os testes indicarem padrões de comportamento tipo ansiedade, os testes diferenciam-se ao estímulo empregado. Assim, faz-se necessário maiores pesquisas que envolvam o receptor 5HT<sub>2C</sub> e o comportamento tipo-ansiedade com suas fases de excitação, considerando ambos os testes.

## Referências

- Alves, N. F. P. (2022). The role of serotonin 5-HT<sub>2C</sub> receptors in anxiety and social status in the zebrafish *Danio rerio*. [Tese de Mestrado, Universidade do Porto]. Repositório Aberto. <https://repositorio-aberto.up.pt/bitstream/10216/147198/2/600811.pdf>
- Bécamel, C., Gavarini, S., Chanrion, B., Alonso, G., Galéotti, N., Dumuis, A., ... & Marin, P. (2004). The serotonin 5-HT<sub>2A</sub> and 5-HT<sub>2C</sub> receptors interact with specific sets of PDZ proteins. *Journal of Biological Chemistry*, 279(19), 20257-20266. <https://doi.org/10.1074/jbc.M312106200>
- 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>
- BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Saúde de Curitiba. **Ansiedade**. Curitiba, PR, 2011.
- Cachat, J., 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>
- Cachat, J., Stewart, A., Utterback, E., Hart, P., Gaikwad, S., Wong, K., ... & Kalueff, A. V. (2011). Three-dimensional neurophenotyping of adult zebrafish behavior. *PloS one*, 6(3), e17597. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0017597>
- do Carmo Silva, R. X., do Nascimento, B. G., Gomes, G. C. V., da Silva, N. A. H., Pinheiro, J. S., da Silva Chaves, S. N., ... & Maximino, C. (2021). 5-HT<sub>2C</sub> agonists and antagonists block different components of behavioral responses to potential, distal, and proximal threat in zebrafish. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 210, 173276. <https://doi.org/10.1016/j.pbb.2021.173276>
- CONSELHO NACIONAL DE CONTROLE DE EXPERIMENTACAO ANIMAL - CONCEA. Diretriz brasileira para o cuidado e a utilização de animais para fins científicos e didáticos - DBCA. Anexo I. Peixes mantidos em instalações de instituições de ensino ou pesquisa científica Brasil, 2017.
- Deakin, J. W., & Graeff, F. G. (1991). 5-HT and mechanisms of defence. *Journal of psychopharmacology*, 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, M. F., ... & 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>
- Facciol, A., Tran, S., & Gerlai, R. (2017). Re-examining the factors affecting choice in the light–dark preference test in zebrafish. *Behavioural brain research*, 327, 21-28. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2017.03.040>
- Gerlai, R. (2013). Antipredatory behavior of zebrafish: adaptive function and a tool for translational research. *Evolutionary Psychology*, 11(3), 147470491301100308. <https://doi.org/10.1177/14747049130110030>
- Golan, D., Tashjian Junior, A. H., Armstrong, E. J., & Armstrong, A. W. (2014). Princípios de farmacologia: a base fisiopatológica da farmacoterapia. In *Princípios de farmacologia: a base fisiopatológica da farmacoterapia* (pp. xxiv-972).
- Gomes, F., Greidinger, M., Salviano, M., Couto, K. C., Scaperlli, G. F., Alves, S. H. D. S., & Cruz, A. P. D. M. (2010). Antidepressant-and anxiogenic-like effects of acute 5-HT<sub>2C</sub> receptor activation in rats exposed to the forced swim test and elevated plus maze. *Psychology & Neuroscience*, 3, 245-249. <http://doi.apa.org/getdoi.cfm?doi=10.3922/j.psns.2010.2.014>
- Graeff, F. G. et al. Role of 5-HT in stress, anxiety, and depression. *Pharmacology, Biochemistry & Behavior*, v. 54, p. 129–141, 1996. [https://doi.org/10.1016/0091-3057\(95\)02135-3](https://doi.org/10.1016/0091-3057(95)02135-3)
- Graeff, F. G., Viana, M. B., & Mora, P. O. (1997). Dual role of 5-HT in defense and anxiety. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, 21(6), 791-799. [https://doi.org/10.1016/S0149-7634\(96\)00059-0](https://doi.org/10.1016/S0149-7634(96)00059-0)
- Graeff, F. G., Guimarães, F. S., & Zuardi, A. W. (1999). Medicamentos antipsicóticos. In F. G. Graeff & F.S. Guimarães (Eds.), *Fundamentos de psicofarmacologia* (pp. 69-91). São Paulo: Atheneu
- Guo, S., Wagle, M., & Mathur, P. (2012). Toward molecular genetic dissection of neural circuits for emotional and motivational behaviors. *Developmental neurobiology*, 72(3), 358-365. <https://doi.org/10.1002/dneu.20927>

- Herculano, A. M., & Maximino, C. (2014). Serotonergic modulation of zebrafish behavior: Towards a paradox. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*, 55, 50-66. <https://doi.org/10.1016/j.pnpbp.2014.03.008>
- Iturriaga-Vásquez, P., Osorio, F., Riquelme, S., Castro, S., & Herzog, R. (2012). Zebrafish: a model for behavioral pharmacology. *Farmacología de Chile*, 5, 27- 32
- Jesuthasan, S. J., & Mathuru, A. S. (2008). The alarm response in zebrafish: innate fear in a vertebrate genetic model. *Journal of neurogenetics*, 22(3), 211-228. <https://doi.org/10.1080/01677060802298475>
- Kalueff, A. V., Ren-Patterson, R. F., LaPorte, J. L., & Murphy, D. L. (2008). Domain interplay concept in animal models of neuropsychiatric disorders: a new strategy for high-throughput neurophenotyping research. *Behavioural Brain Research*, 188(2), 243-249. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2007.11.011>
- Kalueff, A V; Stewart, A M; Kyzar, E J; Cachat, J; Gebhardt, M; Landsman, S; Robinson,K; Maximino, C; Herculano, A M; Jesuthasan, S; Wisenden, B; Bally-Cuif, L; Lange, M; Vernier, P; Norton, W; Tierney, K; Tropepe, V; Neuhaus, S C F (2012). Time to recognize zebrafish ‘affective’ behavior. *Behaviour*, 149(10- 12):1019-1036. <https://doi.org/10.1163/1568539X-00003030>
- 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>
- Kimura, A., Stevenson, P. L., Carter, R. N., MacColl, G., French, K. L., Paul Simons, J... & Holmes, M. C. (2009). Overexpression of 5-HT<sub>2C</sub> receptors in forebrain leads to elevated anxiety and hypoactivity. *European Journal of Neuroscience*, 30(2), 299-306. <https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2009.06831.x>
- Kinkel, M. D., Eames, S. C., Philipson, L. H., & Prince, V. E. (2010). Intraperitoneal injection into adult zebrafish. *JoVE (Journal of Visualized Experiments)*, (42), e2126. <https://doi.org/10.3791/2126>

- Kysil, E. V., Meshalkina, D. A., Frick, E. E., Echevarria, D. J., Rosenberg, D. B., Maximino, 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>
- Kokel, D., & Peterson, R. T. (2008). Chemobehavioural phenomics and behaviour-based psychiatric drug discovery in the zebrafish. *Briefings in Functional Genomics and Proteomics*, 7(6), 483-490. <https://doi.org/10.1093/bfgp/eln040>
- 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>
- Maximino, C., de Brito, T. M., da Silva Batista, A. W., Herculano, A. M., Morato, S., & Gouveia Jr, A. (2010a). Measuring anxiety in zebrafish: a critical review. *Behavioural brain research*, 214(2), 157-171. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2010.05.031>
- Maximino, C., De Brito, T. M., de Mattos Dias, C. A. G., Gouveia, A., & Morato, S. (2010b). Scototaxis as anxiety-like behavior in fish. *Nature protocols*, 5(2), 209- 216. <https://doi.org/10.1038/nprot.2009.225>
- Maximino, C., de Oliveira, D. L., Rosemberg, D. B., Batista, E. D. J. O., Herculano, A. M., Oliveira, K. R. M., ... & Blaser, R. (2012). A comparison of the light/dark and novel tank tests in zebrafish. *Behaviour*, 149(10-12), 1099-1123. <https://doi.org/10.1163/1568539X-00003029>
- Maximino, C., Puty, B., Benzecry, R., Araújo, J., Lima, M. G., Batista, E. D. J. O., ... & Herculano, A. M. (2013). Role of serotonin in zebrafish (*Danio rerio*) anxiety: relationship with serotonin levels and effect of buspirone, WAY 100635, SB224289, 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., da 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. (2015). 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., & van der Staay, F. J. (2019). Behavioral models in psychopathology: epistemic and semantic considerations. *Behavioral and Brain Functions*, 15(1), 1-11  
<https://doi.org/10.1186/s12993-019-0152-4>

de Moura, L. A., Pyterson, M. P., Pimentel, A. F. N., Araújo, F., de Souza, L. V. X. B., Mendes, C. H. M., ... & Maximino, C. (2023). Roles of the 5-HT<sub>2C</sub> receptor on zebrafish sociality. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*, 125, 110769. <https://doi.org/10.1016/j.pnpbp.2023.110769>

Nguyen, M., Stewart, A. M., & Kalueff, A. V. (2014). Aquatic blues: modeling depression and antidepressant action in zebrafish. *Progress in neuro- psychopharmacology and biological psychiatry*, 55, 26-39. <https://doi.org/10.1016/j.pnpbp.2014.03.003>

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>

Paul, E. D., Johnson, P. L., Shekhar, A., & Lowry, C. A. (2014). The Deakin/Graeff hypothesis: focus on serotonergic inhibition of panic. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, 46, 379-396. <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2014.03.010>

Perathoner, S., Cordero-Maldonado, M. L., & Crawford, A. D. (2016). Potential of zebrafish as a model for exploring the role of the amygdala in emotional memory and motivational behavior. *Journal of neuroscience research*, 94(6), 445-462. <https://doi.org/10.1002/jnr.23712>

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. [https://doi.org/10.1016/S1546-5098\(08\)60189-2](https://doi.org/10.1016/S1546-5098(08)60189-2)

Rinkwitz, S., Mourrain, P., & Becker, T. S. (2011). Zebrafish: an integrative system for neurogenomics and neurosciences. *Progress in neurobiology*, 93(2), 231-243. <https://doi.org/10.1016/j.pneurobio.2010.11.003>

- Román, S., & Savoia, M. G. (2003). Pensamentos automáticos e ansiedade num grupo de jogadores de futebol de campo. *Revista Psicologia: Teoria e Prática*, 5(2), 13-22. [http://pepsic.bvsalud.org/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1516-36872003000200002&lng=pt&tlng=pt](http://pepsic.bvsalud.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1516-36872003000200002&lng=pt&tlng=pt).
- Schneider, H., Fritzky, L., Williams, J., Heumann, C., Yochum, M., Pattar, K., ... & Hawley, E. (2012). Cloning and expression of a zebrafish 5-HT<sub>2C</sub> receptor gene. *Gene*, 502(2), 108-117. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2012.03.070>
- Shuhama, R., Del-Ben, C. M., Loureiro, S. R., & Graeff, F. G. (2007). Animal defense strategies and anxiety disorders. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, 79(1), 97– 109. <https://doi.org/10.1590/s0001-37652007000100012>
- Sourbron, J., Schneider, H., Kecskés, A., Liu, Y., Buening, E. M., Lagae, L., ... & de Witte, P. (2016). Serotonergic modulation as effective treatment for Dravet syndrome in a zebrafish mutant model. *ACS chemical neuroscience*, 7(5), 588-598. <https://doi.org/10.1021/acschemneuro.5b00342>
- Stewart, A., Maximino, C., Marques de Brito, T., Herculano, A. M., Gouveia, A., Morato, S., ... & Kalueff, A. V. (2011). Neurophenotyping of adult zebrafish using the light/dark box paradigm. In *Zebrafish neurobehavioral protocols* (pp. 157-167). Humana Press. [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>
- Van der Staay, F. J. (2006). Animal models of behavioral dysfunctions: basic concepts and classifications, and an evaluation strategy. *Brain research reviews*, 52(1), 131-159. <https://doi.org/10.1016/j.brainresrev.2006.01.006>
- World Health Organization. (2017). *Depression and other common mental disorders: global health estimates* (No. WHO/MSD/MER/2017.2). World Health Organization.
- World Health Organization. (2022). Mental health and COVID-19: early evidence of the pandemic's impact: scientific brief, 2 March 2022 (No. WHO/2019-

nCoV/Sci\_Brief/Mental\_health/2022.1). World Health Organization.

Zon, L. I., & Peterson, R. T. (2005). In vivo drug discovery in the zebrafish. *Nature reviews Drug discovery*, 4(1), 35-44. <https://doi.org/10.1038/nrd1606>