

*FACULDADE DE BIOCÊNCIAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA  
CELULAR E MOLECULAR*

*DAIANE LEONICE PAUWELS GEBAUER*

**AVALIAÇÃO DE PADRÕES COMPORTAMENTAIS INDUZIDOS POR  
ANSIOLÍTICOS EM ZEBRAFISH (*Danio rerio*)**

*Orientador: Prof. Dr. Diogo Rizzato Lara  
Co-orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Carla Denise Bonan*

*Porto Alegre,  
Março de 2010*

PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO RIO GRANDE DO SUL  
FACULDADE DE BIOCÊNCIAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR

DAIANE LEONICE PAUWELS GEBAUER

**AVALIAÇÃO DE PADRÕES COMPORTAMENTAIS INDUZIDOS POR  
ANSIOLÍTICOS EM *ZEBRAFISH* (*Danio rerio*)**

Porto Alegre

2010

DAIANE LEONICE PAUWELS GEBAUER  
(Farmacêutica-Bioquímica)

**AVALIAÇÃO DE PADRÕES COMPORTAMENTAIS INDUZIDOS POR  
ANSIOLÍTICOS EM *ZEBRAFISH* (*Danio rerio*)**

Dissertação apresentada como requisito para obtenção do grau de Mestre pelo Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular da Faculdade de Biociências da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul.

Orientador: Prof. Dr. Diogo Rizzato Lara

Co-orientadora: Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Carla Denise Bonan

Porto Alegre

2010

Ao meu pai (*in memoriam*) por sempre ter incentivado a busca pelo conhecimento. E por acreditar que este, assim como o amor, é essencial à vida.

## AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Diogo R. Lara, pesquisador inteligente e criativo, agradeço pela orientação e oportunidade que me proporcionou em conhecer mais os fenômenos comportamentais (em modelos animais, extensivo a humanos) vivenciados por nós todos os dias. Pela compreensão, principalmente no que se refere a minha, até então, pouca experiência com experimentos envolvendo modelos animais. Pelos ensinamentos, pelo carinho e amizade construídos no decorrer desses dois anos de pós-graduação. Muito obrigada!

À Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Carla D. Bonan pela atenção dispensada em relação aos trabalhos executados (artigo e dissertação). Obrigada pelos ensinamentos, pela amizade e carinho. Grande mestre e uma grande mulher!

Ao Prof. Dr. Renato Dutra Dias, excelente exemplo de profissional, grande mestre, pelos ensinamentos, pelo carinho e amizade. E por sempre ter me contagiado com o entusiasmo com que conduzia os seminários da bioquímica. Muito obrigada!

A todos os professores docentes das disciplinas do programa do PGBCM da PUCRS que de alguma forma contribuíram para minha formação profissional e pessoal.

À relatora Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Nadja Schroeder (PUCRS) e à banca examinadora, Dr<sup>a</sup>(s) Elaine Elisabetsky (UFRGS) e Rosa Maria Martins de Almeida (UNISINOS), obrigada pela atenção dispensada na leitura deste trabalho.

Ao CNPq pelo apoio financeiro.

À colega Natália, às ICs Isabel e Andrezza, ao Ângelo e a Kelly, por todas as horas de experimentos juntos, pela cooperação no desenvolvimento deste trabalho, pela amizade e carinho: Obrigada!

Aos meus amigos (as), pela compreensão e apoio durante todo o tempo. Obrigada por tudo!

Às minhas queridas cunhadas Luciana e Juliana, pelos incentivos.

À minha mãe Iraci, aos meus irmãos Magnos e Levinton que sempre me apoiaram e incentivaram. Muito obrigada pelo amor e por sempre acreditarem em mim. Eu Amo Vocês!

## RESUMO

Estudos etológicos abordam o repertório de padrões de comportamento de animais, ou seja, as características inatas peculiares de cada espécie. De acordo com esta abordagem, não-condicionada, utilizou-se o *zebrafish* (*Danio rerio*) como organismo modelo neste trabalho comportamental. O *zebrafish* possui grande homologia com mamíferos (70-80%), apresenta um vasto repertório comportamental, e ainda, é sensível a diferentes compostos farmacológicos. Devido ao seu grande número de descendentes (200-300 ovos) gerados a cada 2-3 vezes por semana e ao seu rápido desenvolvimento, tornou-se um organismo adequado para *screening* de drogas de forma rápida e de baixo custo. Embora já existam na literatura científica estudos avaliando perfis comportamentais como medo/ansiedade em *zebrafish*, são poucos os estudos associados à farmacologia, validados e documentados, como ocorre com roedores. Desta forma, nesse trabalho, empregamos tratamento agudo com drogas ansiolíticas conhecidas para avaliar tais perfis comportamentais em *zebrafish* a fim de validá-lo como um organismo modelo na pesquisa de diferentes drogas ansiolíticas. Foram realizados dois experimentos, um com duração de 50 e outro de 10 minutos nomeados *Group Behavior Task*. Em ambos utilizou-se um aquário no qual eram colocados três peixes e analisados quatro parâmetros comportamentais: altura de permanência no aquário, locomoção, cor e coesão social. Após a exposição dos peixes a quatro concentrações diferentes de drogas, com 50 minutos de tratamento, os benzodiazepínicos e, doses moderadas de etanol apresentaram diminuição na coesão social dos peixes de forma dose dependente. Peixes tratados com bupiriona, agonista do receptor pré-sináptico 5-HT<sub>1A</sub>, preferencialmente permaneceram na porção superior do aquário. Propranolol, antagonista β-adrenérgico, não apresentou nenhum efeito nos parâmetros comportamentais analisados. No segundo experimento, avaliamos o efeito da dose efetiva (ansiolítica) de cada fármaco do primeiro experimento durante 10 minutos, nos minutos 1, 2, 3, 4, 5 e 10. Foi avaliado simultaneamente tratamento contínuo (com droga no aquário teste) e sem droga no aquário teste. Neste, os benzodiazepínicos reproduziram os efeitos observados no primeiro experimento quanto à coesão social com 10 minutos de tratamento. Bupiriona replicou o efeito na altura em que os peixes permaneceram no aquário. Com exceção ao etanol, que apresentou melhores resultados no parâmetro altura no aquário com tratamento contínuo. Um terceiro experimento, denominado Teste de Preferência por Claro-Escuro, foi realizado com as doses ansiolíticas dos benzodiazepínicos, etanol e bupiriona. Os peixes tratados apresentaram alteração no tempo de permanência no ambiente claro, diferente de peixes não tratados, que tem preferência pelo lado escuro. Não houve alteração significativa na latência para o primeiro cruzamento nem no número total de cruzamentos. Os modelos desenvolvidos nesse trabalho, *Group Behavior Task* (10 e 50 minutos) e Teste de Preferência por Claro-Escuro em *zebrafish* apresentam validade preditiva e podem ser utilizados para *screening* inicial de novos candidatos a drogas ansiolíticas ou para identificar a potencial ação de fármacos ainda não estudados em comportamento. O Teste de Preferência por Claro-Escuro é particularmente útil para o *screening* de drogas de caráter ansiolítico, enquanto que, o *Group Behavior Task*, que analisa os demais parâmetros comportamentais como altura no aquário e coesão social, pode ser útil para se discriminar diferentes classes de drogas.

Palavras chaves: Zebrafish; ansiolíticos; ansiedade; benzodiazepínicos; coesão social; claro/escuro.

## ABSTRACT

Ethological studies address the repertoire of behavioral patterns of animals, ie, the innate characteristics of each species. According to this approach, unconditioned, we used the zebrafish (*Danio rerio*) as a model organism in this behavior research. The zebrafish has great homology with mammals (70-80%), presents a wide behavioral repertoire, and also is sensitive to different pharmacological compounds. Because of its many offspring (200-300 eggs) generated every 2-3 times a week and its rapid development, it has become an appropriate model system to screen drugs quickly and at low cost. Although there are studies in the scientific literature that evaluate behavioral profiles as fear/anxiety in zebrafish, there is a small amount of studies on pharmacology, validated and documented as occurs with rodents. Thus, in this study, we used acute treatment with antianxiety drugs to assess such behavioral profiles in zebrafish in order to validate it as a model organism in research of different anxiolytic drugs. Two experiments were conducted, 50 and 10 minutes of drug exposure, called Group Behavior Task. In both we used an aquarium in which three fish were placed and four behavioral parameters analyzed: height in the aquarium, locomotion, color and shoal cohesion. After the exposure of fish to different concentrations of anxiolytic doses, with 50 minutes of treatment, the benzodiazepines and moderate doses of ethanol showed a decrease in the shoal cohesion of the fish in a dose-dependent manner. Fish treated with buspirone, 5-HT<sub>1A</sub> receptor agonist, preferentially remained in the upper portion of the tank. Propranolol,  $\beta$ -adrenergic antagonist, has no effect on behavioral parameters analyzed. In the second experiment, we evaluated the effect of the effective dose (anxiolytic) of each drug in the first experiment for 10 minutes in the 1, 2, 3, 4, 5 and 10 minutes. The effects of continuous treatment (with drug in the test aquarium), and no drug in the tank were evaluated. In this case, benzodiazepines reproduced the effects observed in the first experiment on the shoal cohesion with 10 minutes of treatment. Buspirone replied the effect on height in the aquarium. Ethanol showed better results in the height parameter in the test tank with continuous treatment. A third experiment, called Test of Preference for Light-Dark Compartment was performed with anxiolytic doses of benzodiazepines, ethanol and buspirone. Treated fish showed a strong preference for a light environment, different from untreated fish, which has a preference for the dark side. There was no significant change in latency to the first enter or the total number of crossings in de compartments. The models developed in this work, the Group Behavior Task (50 and 10 minutes) and Test Preference for Light-Dark Compartment with zebrafish have predictive validity and can be used for initial screening of new anxiolytic drug or to identify the potential effects of not studied drugs in behavior. The Test of Preference for Light-Dark Compartment is particularly useful for screening anxiolytic drugs, whereas the Group Behavior Task, which analyzes other behavioral parameters such as height in the tank and shoal cohesion, may be useful to discriminate between different classes drugs.

**Keywords:** Zebrafish; anxiolytic; anxiety; benzodiazepines; shoal cohesion; light/dark.

## LISTA DE ABREVIATURAS

BIS – Sistema de Inibição comportamental, do inglês, *behavioral inhibition system*

BAS – Sistema de Ativação Comportamental, do inglês, *behavioral approach system*

BZDs – Benzodiazepínicos

Cl<sup>-</sup> – Cloreto

D<sub>2</sub> – Receptor de dopamina

GABA – Ácido gama-aminobutírico

H<sub>3</sub>NO – Hipoxantina 3 (N) - oxido

MAO – Monoamino-oxidase

MCPD – Matéria cinzenta periaqueductal

NA – Noradrenalina

SERT – Transportador de serotonina, do inglês, *serotonin transporter*

SNC – Sistema nervoso central

5-HT – 5-hidroxitriptamina



## LISTA DE FIGURAS

Figura 1: <i>Zebrafish</i> ( <i>Danio rerio</i> ).....	1
Figura 2: ISI Web of Knowledge: Web of Science®: Topic = (Zebrafish Behaviour).....	5
Figura 3: Representação esquemática do receptor GABAérgico .....	15

## SUMÁRIO

<b>RESUMO.....</b>	<b>I</b>
<b>ABSTRACT .....</b>	<b>II</b>
<b>LISTA DE ABREVIATURAS.....</b>	<b>III</b>
<b>LISTA DE FIGURAS.....</b>	<b>IV</b>
<b>CAPÍTULO 1 - INTRODUÇÃO E OBJETIVOS .....</b>	<b>1</b>
1 INTRODUÇÃO.....	1
1.1 Características etológicas do Zebrafish (Danio rerio).....	1
1.2 O uso do zebrafish na pesquisa em neurociência .....	3
1.3 Modelos animais de ansiedade .....	6
1.4 Bases neurais da ansiedade.....	11
1.5 Modulação da transmissão gabaérgica por ansiolíticos benzodiazepínicos e suas implicações na ansiedade.....	14
1.6 Neurotransmissão serotoninérgica e implicações na ansiedade .....	16
1.7 Avaliação do medo/ansiedade no Zebrafish.....	18
2 OBJETIVOS.....	22
2.2 Objetivos específicos.....	22
<b>CAPÍTULO 2 - ARTIGO .....</b>	<b>23</b>
<b>3 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....</b>	<b>43</b>
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>45</b>
<b>ANEXOS .....</b>	<b>51</b>

# CAPÍTULO 1 - INTRODUÇÃO E OBJETIVOS

## 1 INTRODUÇÃO

### 1.1 Características etológicas do Zebrafish (*Danio rerio*)

O *zebrafish* é um pequeno teleósteo (3-5 cm) de água doce, membro da família Cyprinidae (Figura 1) (SPENCE *et al.*, 2008). Seu habitat natural é o norte da Índia, Bangladesh, e partes do sul do Nepal. O nome *Danio* deriva de ‘*dhani*’ (Bengali), que significa “do campo de arroz”, por ser encontrado em abundância nestas plantações (KEY; DEVINE 2003; ENGESZER *et al.*, 2007; SPENCE *et al.*, 2008).

Possui um específico padrão de listras horizontais, e a coloração destas podem alterar de mais claras a mais escuras dependendo das circunstâncias e do ambiente em que se encontram. Quando agressivo mostra, simultaneamente, nadadeiras abertas e coradas e as listras horizontais rutilantes (GERLAI, 2003; SPENCE *et al.*, 2008). Como em muitos teleósteos, os melanóforos (células de pigmentação) podem se concentrar mais ou dispersar em resposta a estímulos, como a intensidade de luz (PARICHY, 2006; LARSON; O’MALLEY; MELLONI, 2006).



**Figura 1: Zebrafish (*Danio rerio*)**

O *zebrafish* é uma espécie que forma cardume (‘*shoaling*’ em inglês), ou seja, forma um grupo que permanece unido por razões sociais para buscar alimento, se proteger do predador e acasalar (MILLER; GERLAI, 2007; PITCHER; PARRISH,

1993). Apresenta uma atividade natatória intermitente (McHENRY; LAUDER, 2005). Nadam juntos em uma mesma direção de forma coordenada (*'schooling'*), comportamento este inato (SPENCE *et al.*, 2008) e visível logo após a eclosão dos ovos (ENGESZER *et al.*, 2007). Mesmo quando criados em isolamento, rapidamente formam cardumes quando são postos juntos (KERR, 1963).

O *zebrafish* é encontrado normalmente nadando na superfície da água onde busca alimento, mas quando ameaçado por seus predadores naturais simpátricos (estímulo aversivo), dentre eles aves ou peixes maiores, muda seu comportamento e desenvolve uma resposta antipredatória. Reações de alarme (resposta endócrina) ocorrem a partir do primeiro contato com o estímulo aversivo ou a um ambiente novo e evocam características comportamentais que podem ser observadas e quantificadas em laboratório, como: fuga do predador/locomoção aumentada; ficam imóveis ou congelam (*freezing*) por vários minutos; apresentam movimentos erráticos; ficam no fundo do aquário; se agrupam formando um denso cardume; ficam pálidos e algumas vezes pulam para fora dos aquários (PFEIFFER, 1977; REHNBERG; SMITH; 1988; GERLAI, *et al.*, 2000; GERLAI, 2003; GERLAI; LEE; BLASER, 2006; SPEEDIE; GERLAI, 2008; PARRA; ADRIAN; GERLAI, 2009; GERLAI, 2009). Estas reações apresentam grande valor adaptativo à medida que leva o animal a se proteger de situações prejudiciais ou danosas (GRAEFF, 2004).

Conhecendo sua etologia, ou seja, seu repertório peculiar de padrões de comportamento (ou repertório de defesa), tem crescido muito a utilização do *zebrafish* em pesquisas comportamentais e em *screening* de drogas, além do seu uso clássico, proposto por George Streisinger há mais de 30 anos atrás, como modelo de estudo da biologia do desenvolvimento (SCHIER, 1997; GUO, 2004; KARI; RODECK; DICKER, 2007; EGAN *et al.*, 2009).

## 1.2 O uso do *Zebrafish* na pesquisa em neurociência

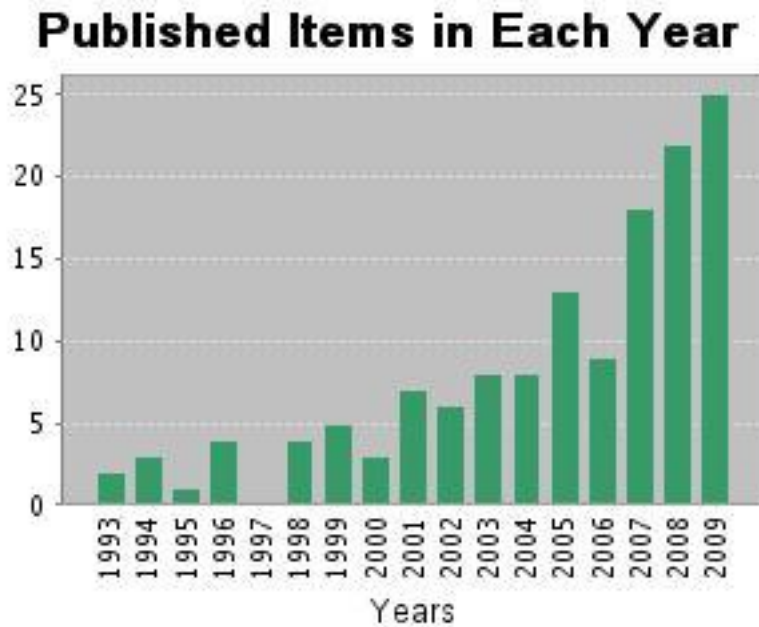
Do ponto de vista genético o *zebrafish* tornou-se atrativo por ser útil como intermediário entre os invertebrados (*Drosophila melanogaster* e *Caenorhabditis elegans*) e os roedores (GUO, 2004; NINKOVIC; BALLY-CUIF, 2006). A grande maioria dos genes descobertos nesta espécie são evolutivamente conservados e tem homólogos em mamíferos (CERDA *et al.*, 1998; PARNG *et al.*, 2002). O grau de homologia é de 70-80% (BARBAZUK *et al.*, 2000), permitindo a extrapolação dos resultados encontrados nesta espécie em relação a humanos de maneira mais direta do que aqueles obtidos em invertebrados (PARNG *et al.*, 2002; NINKOVIC; BALLY-CUIF, 2006) e de forma mais econômica em relação a roedores. Em 2001, o Instituto Sanger em Cambridge iniciou o sequenciamento do genoma desta espécie ([http://www.sanger.ac.uk/projects/D\\_rerio](http://www.sanger.ac.uk/projects/D_rerio)) (SPENCE *et al.*, 2008). Há também uma rede de informações, o ZFIN (<http://zfin.org>), na qual laboratórios do mundo inteiro podem depositar diferentes informações a respeito dessa espécie (POSTLETHWAIT *et al.*, 2000; SPRAGUE *et al.*, 2001). A utilização do *zebrafish* para pesquisa em neurociências tem crescido muito na última década, sobretudo na biologia do comportamento. As pesquisas que abordam comportamento tratam de: vício (GERLAI *et al.*, 2000, NINKOVIC; BALLY-CUIF *et al.*, 2006); agressividade (GERLAI *et al.*, 2000); memória (DARLAND; DOWLING, 2001; LEVIN; CHEN, 2004; BLANK *et al.*, 2009); atividade locomotora/comportamento exploratório (GERLAI *et al.*, 2000; SWAIN; SIGSTAD; SCALZO, 2004; LEVIN; BENCAN; CERUTTI, 2007); preferência social (GERLAI *et al.*, 2000); ‘freezing’ (congelamento) como medida de medo/ansiedade (GERLAI *et al.*, 2000; GERLAI; LEE; BLASER, 2006; MIKLÓSI; ANDREW, 2006; LEVIN; BENCAN; CERUTTI, 2007; SPEEDIE; GERLAI, 2008; BLASER; CHADWICK; MCGINNIS, 2009; BECAN *et al.*, 2009; EGAN *et al.*, 2009)

movimentos erráticos (GERLAI; LEE; BLASER, 2006; EGAN *et al.*, 2009) e preferência por claro/escuro (SERRA; MEDALHA; MATTIOLI, 1999; BLANK *et al.*, 2009; BLASER; CHADWICK; MCGINNIS, 2009). Outras razões práticas fazem deste um útil organismo complementar e com algumas vantagens em relação aos demais, como baixo custo em relação à aquisição e manutenção (aproximadamente 50 peixes podem ser mantidos em um aquário de 50L), fácil manipulação e rápida absorção pelo Sistema Nervoso Central (SNC) das drogas que são adicionadas à água (GOLDSMITH, 2004). Pelo grande número de ovos (200-300) postos a cada 2-3 dias e por terem um ciclo de desenvolvimento rápido (48h), são ótimos organismos para pesquisas em larga escala (*screening*), possibilitando o aceleração no processo de descoberta de novas drogas (GOLDSMITH, 2004; ZON; PETERSON, 2005; RIHEL *et al.*, 2010).

Seu repertório comportamental é grande e permite o desenvolvimento de uma ampla gama de parâmetros que podem ser facilmente observados e quantificados em um ambiente controlado (SLOMAN, *et al.*, 2003). No entanto, tais parâmetros e as ferramentas necessárias que permitem avaliar características comportamentais ainda não estão devidamente validadas, sobretudo para acessar ansiedade e torná-lo um organismo eficaz com validade preditiva para estas pesquisas (GERLAI *et al.*, 2000; LEVIN; CHEN, 2004; ZON; PETERSON, 2005; BEIS; STAINIER, 2006; LEVIN; BENCAN; CERUTTI, 2007; EGAN *et al.*, 2009).

Além da praticidade e do componente genético já bem estudado, muitos sistemas de neurotransmissão já foram identificados nesta espécie, tais como: glutamatérgico (EDWARDS; MICHEL, 2002), colinérgico (BEHRA *et al.*, 2002), dopaminérgico (BOEHMLER *et al.*, 2004), serotoninérgico (RINK; GUO, 2004), purinérgico (KUCENAS *et al.*, 2003; RICO *et al.*, 2003) e gabaérgico (KIM *et al.*, 2004).

Apesar do crescente número de pesquisas que utilizam o *zebrafish* em comportamento a cada ano, citações de artigos indexados na fonte *Web of Science* (Figura 2), são poucos os dados disponíveis sobre a validade preditiva de modelos comportamentais para ansiolíticos neste animal.



**Figura 2: ISI Web of Knowledge: Web of Science®: Topic = (Zebrafish Behaviour)**

Fonte:

[http://apps.isiknowledge.com/CitationReport.do?product=WOS&search\\_mode=CitationReport&SID=3BOg6hFjEnC8B2iG7Ce&page=1&cr\\_pqid=1](http://apps.isiknowledge.com/CitationReport.do?product=WOS&search_mode=CitationReport&SID=3BOg6hFjEnC8B2iG7Ce&page=1&cr_pqid=1)

### 1.3 Modelos animais de ansiedade

No início das pesquisas em psicofarmacologia foram utilizados modelos baseados na metodologia desenvolvida nos laboratórios de Psicologia Experimental por Lashey e Pavlov nas décadas de 1930 e 1940, com ênfase no aprendizado (conhecido como condicionamento clássico) e os reflexos condicionados. Em 1950 teve início a chamada Análise Experimental do Comportamento (*behaviorism*) pelo psicólogo Frederick B. Skinner e o enfoque no condicionamento operante (resposta espontânea de animais). Tais abordagens surgiram com a necessidade de se entender questões específicas da psiquiatria como os sintomas de transtornos clínicos, e do efeito de drogas psicoativas que se manifestam na esfera psicológica bem como o desenvolvimento de novos medicamentos. Assim, várias pesquisas foram realizadas ao longo dos anos utilizando-se diferentes modelagens para acessar ansiedade, como o *Teste de Conflito ou Punição*, proposto por Geller e Seifter em meados de 1930. No entanto, esse teste foi bastante criticado na década de 80 devido à inconsistência de resultados quando utilizados ansiolíticos não-benzodiazepínicos. A partir de então, foram introduzidos modelos como o do *Labirinto em Cruz Elevado* e a *Aversão a Lugares* que utilizam padrões etológicos de comportamento (TREIT; PINEL; FIBIGER, 1981; GREEN; HODGES, 1991; GRAEFF; GUIMARÃES, 1999; BOURIN *et al.*, 2007).

Os modelos são classificados de acordo com as respostas, se condicionadas ou não: nas condicionadas há o envolvimento da resposta a um estressante que muitas vezes envolve punição, e no modelo não-condicionado as reações são espontâneas, ou seja, ocorrem naturalmente, e são mais similares às condições do homem. Nestas, são



analisadas as respostas de defesa do animal diante de situações naturalmente nocivas ou aversivas (MENARD; TREIT, 1999; BOURIN *et al.*, 2007).

No modelo de ansiedade *Teste de Conflito* (condicionamento operante), uma resposta instrumental do animal, como a de pressionar uma barra, é mantida pela apresentação contínua de um reforço positivo ou recompensa (água ou alimento) que, ao mesmo tempo, é suprimida pela aplicação de um estímulo nocivo, como um choque elétrico. Portanto, estabelece-se uma situação de conflito entre motivações opostas: de conseguir alimento e evitar choque. Como resultado, a frequência com que o animal pressiona a alavanca diminui. Nesta situação, os ansiolíticos (e isto não se estende aos não-benzodiazepínicos) reduzem a supressão comportamental. O efeito antipunição dos ansiolíticos é devido à diminuição do medo de receber o choque elétrico, enquanto que, outros compostos psicotrópicos, como os antidepressivos, analgésicos opióides, antipsicóticos ou psicoestimulantes não afetam o comportamento punido (GRAEFF; GUIMARÃES, 1999). No Teste de Conflito, a buspirona (não-benzodiazepínicos) apresentou resultados inconsistente como ansiolítico (BOURIN *et al.*, 2007).

O teste de *Campo Aberto* possibilita avaliar o medo através da atividade exploratória do animal em um ambiente não familiar, como uma caixa vazia. Neste teste observa-se um grande número de comportamentos indicativos de ansiedade, incluindo altas contagens de bolos fecais, sucessivas micções e baixa atividade motora. A tendência do animal em ficar na periferia da caixa sem entrar no centro (chamado comportamento tigmotáxico) também reflete medo/ansiedade. Este comportamento de medo tende a diminuir à medida que o animal se familiariza com o ambiente (GRAEFF; GUIMARÃES, 1999). Tratamentos ansiolíticos com benzodiazepínicos (BZDs) e agonistas serotoninérgicos (5-HT<sub>1A</sub>) por si só não aumentam a exploração no Campo

Aberto, mas eles diminuem o estresse induzido por inibição do comportamento de exploração (PRUT; BELZUNG, 2003).

O teste da *Placa Perfurada* geralmente é usado para medir o comportamento exploratório de roedores. O aparato consiste em uma placa de madeira com furos e elevada do chão. Os animais são colocados no centro da placa e é contado o número de vezes que ocorre espreitamento do animal em relação aos furos da placa e o tempo de permanência nos mesmos como um parâmetro para avaliar a ansiedade do animal. Baseia-se na observação de que a atividade exploratória, espreitamento ou *head dips*, é inversamente proporcional ao estado de ansiedade dos animais (FILE; WARDILL, 1976). Ou seja, a redução no comportamento de espreitamento representaria um estado ansiogênico do animal (TSUJI; TAKEDA; MATSUMIYA, 2000).

Estudos realizados por TAKEDA *et al.* (1998) demonstraram que ansiolíticos BZDs, como diazepam e clordiazepóxido, apresentam efeitos no comportamento de espreitamento no teste da placa perfurada, ou seja, ambos aumentam o número de espreitamento em doses que não causam sedação. Já seus antagonistas reduzem. Tsuji *et al.* (2000) em seus estudos observaram que a buspirona diminui o comportamento de espreitamento enquanto que, animais tratados com diazepam (1mg/kg), manifestam um aumento neste comportamento.

O teste *Labirinto em Cruz Elevado* aplicado a roedores é amplamente utilizado para o estudo da ansiedade. Este teste é uma modificação do instrumento validado por Lister (1987) para camundongos e consiste de uma estrutura de quatro braços: dois abertos e dois fechados elevados 50 m do chão. Esta ferramenta é baseada na aversão natural do roedor e usa o conflito entre exploração e aversão a locais abertos e elevados. Quando nele confinados, mostram sinais de medo (congelam, defecam e tem micção aumentada) e o aumento do nível plasmático do hormônio do estresse cortisol (GREEN;

HODGES, 1991; GRAEFF; GUIMARÃES, 1999). Este comportamento pode ser medido através da observação direta ou quantificado através de programas computacionais. Tais programas determinam o tempo e a frequência em que os animais permanecem em cada braço. O perfil de preferência do rato é na ordem: braço fechado > centro > aberto (LISTER, 1987). Esta preferência pode ser suprimida por ansiolíticos e potencializada por ansiogênicos. Drogas ansiolíticas, dentre eles os BZDs, barbitúricos e etanol, aumentam o número de entradas e permanência nos braços abertos, enquanto que agentes ansiogênicos potencializam (produzem um efeito oposto) (BERTOGLIO; CAROBREZ, 2002). Este efeito antipunição dos ansiolíticos faz com que os roedores diminuam a preferência pelo local mais fechado passando a explorar mais os braços abertos (GREEN; HODGES, 1991; MORATO; BRANDÃO, 1997). Assim como no Teste de Conflito, a buspirona apresenta resultados contraditórios no Labirinto em Cruz Elevado (GRAEFF; NETTO; ZANGROSSI, 1998).

Outro modelo que avalia ansiedade é a *Transição Claro-Escuro*. Este teste avalia o comportamento de animais colocados individualmente em uma caixa experimental contendo dois compartimentos, um claro e um escuro, e as transições feitas entre os compartimentos são quantificadas. O animal tem uma aversão natural pelo ambiente iluminado, gerando um conflito entre esta aversão e a tendência por explorar os dois compartimentos (BOURIN; HASCOËT, 2003). Após administração de ansiolíticos como BZDs, a aparente apreensão do animal em ficar na área clara ou de se mover para a escura é abolida (COSTALL *et al.*, 1989). Ansiolíticos serotoninérgicos como a buspirona também diminuem a aversão pelo compartimento claro (PICH; SAMANIN, 1986).

Ao longo dos anos, vários perfis comportamentais como estes que testam o comportamento exploratório de animais (campo aberto, labirinto e transição

claro/escuro) como roedores tem sido desenvolvidos e aperfeiçoados sabendo-se que tendem a explorar menos quando em um estado de medo ou ansiedade (LISTER, 1990).

Podemos constatar desta forma, que existem diferentes ferramentas bem estabelecidas e documentadas para avaliar ansiedade em roedores e para se estudar as propriedades ansiolíticas de uma grande variedade de compostos.

## 1.4 Bases neurais da ansiedade

O substrato neural da ansiedade está relacionado aos sistemas responsáveis pela geração e elaboração do comportamento de defesa e emoções associadas: o Sistema de Inibição Comportamental (*BIS - behavioral inhibition system*) e o Sistema de Ativação Comportamental (*BAS - behavioral approach system*), dois sistemas neurais motivacionais que respondem a estímulos ambientais aversivos e apetitivos, respectivamente (GRAY, 1982; McNAUGHTON; GRAY 2000).

A natureza das respostas emocionais de ansiedade/medo/raiva/pânico em animais expostos a situações ameaçadoras depende da intensidade e da distância do estímulo aversivo. Esses estímulos podem ser potencialmente perigosos (ameaça potencial), distais ou proximais ao animal (Tabela 1) (GRAEFF; GUIMARÃES, 1999).

<b>Principais Estruturas Cerebrais que Regulam o Comportamento de Defesa e Emoções Associadas</b>			
<b>Tipo de ameaça</b>	<i>Potencial</i>	<i>Distante</i>	<i>Vizinha/Próxima</i>
<b>Estratégia comportamental</b>	Avaliação de risco	Congelamento ( <i>freezing</i> )	Ameaça/luta/fuga
<b>Estruturas neurais críticas</b>	Amígdala/sistema septo-hipocampal	Amígdala/matéria cinzenta pariaquedutal ventral	Amígdala/hipotálamo/periaquedutal dorsal
<b>Emoção</b>	Ansiedade	Medo	Raiva/pânico

**Tabela 1: Principais Estruturas Cerebrais que Regulam o Comportamento de Defesa e Emoções Associadas.**

Fonte: Graeff, F.G. & Guimarães, F.S. 1999. p. 130.

O *BIS*, como definido por Gray, se correlaciona com o sistema de avaliação de risco onde o tipo de ameaça é potencial (BLANCHARD; BLANCHARD, 1987). Estas são características do primeiro nível de defesa antipredatória que ocorre diante de estímulos aversivos ou situações novas ou imprevistas (GRAEFF; GUIMARÃES; 1999).

Gray (1982) propôs que o *BIS*, uma vez ativado geraria ansiedade. A ativação deste sistema seria causada por alguns estímulos ambientais específicos como:

1. eventos punitivos;
2. frustração condicionada;
3. estímulos ou situações às quais o animal não conhecia (novidades), e
4. sinais de perigo espécie-específicos ou estímulos aversivos inatos.

Tais eventos aumentam o estado de alerta e atenção (GRAY, 1982; 1987). Segundo Gray (1987), uma vez que ocorre um estímulo necessário ou um somatório de estímulos subliminares, o sistema límbico é acionado e um nível de ansiedade se estabelece.

Situações em que a ameaça é distante acionam o *BIS*:

1. inibição do comportamento motor (congelamento);
2. exacerbação da análise sensorial do ambiente, e
3. preparo para ação física vigorosa.

Segundo Gray (1987), as drogas ansiolíticas agiriam sobre o *BIS* ou de avaliação de risco, reduzindo sua atividade.

Situações de perigo iminente acionam o Sistema Cerebral Aversivo, constituído pela matéria cinzenta periaqueductal (MCPD) e hipotálamo. Este sistema responde a estímulos incondicionados de medo com respostas de luta ou fuga, reações que se assemelham ao pânico e respostas neurovegetativas, tais como aumento da pressão

arterial, taquicardia, piloereção, micção e defecação (GRAY, 1982; GRAEFF; GUIMARÃES, 1999; McNAUGHTON; GRAY, 2000).

Proposto por Robert e Carolina Blanchard (1987), o estudo das bases neurais das Estratégias de Defesa de animais em resposta a estímulos ameaçadores levaria a um conhecimento mais aprofundado da neurobiologia do medo/ansiedade que ocorrem em resposta a perigos que determinada espécie animal encontra invariavelmente em seu nicho ecológico.

Blanchard e Blanchard (1987) desenvolveram o conceito dos Níveis de Defesa:

O primeiro nível é determinado por situações potencialmente perigosas, por serem novas ou porque o animal já tenha se defrontado anteriormente com um perigo real no mesmo ambiente. Nestas circunstâncias, o rato exibe um comportamento exploratório cauteloso, denominado comportamento de avaliação de risco. A novidade gera conflito entre a motivação de explorar o ambiente e o receio de possível perigo. Parece haver uma considerável superposição do conceito de BIS com a noção de comportamento de avaliação de risco (GRAEFF; GUIMARÃES, 1999).

Quando os sinais de perigo tornam-se explícitos, mas ainda estão distantes, a reação típica é de imobilidade ("congelamento", ou freezing). O segundo nível de defesa ocorre quando o animal não tem como escapar da situação e é amplamente utilizado como índice de medo em situações experimentais. O terceiro nível está ligado às reações de defesa do tipo luta ou fuga quando a ameaça é proximal.

Os níveis de defesa observados em animais teriam relação com algumas emoções humanas, ou seja, o comportamento de avaliação de risco estaria associado com ansiedade; a reação de congelamento, com medo e o comportamento de fuga ou agressão defensiva com pânico, como pode ser observado na tabela 1.

### **1.5 Modulação da transmissão gabaérgica por ansiolíticos benzodiazepínicos e suas implicações na ansiedade.**

O termo ansiolítico passou a vigorar a partir da década de 70. Antes, compostos com tal característica eram chamados de sedativos, calmantes ou tranquilizantes menores e eram representados pelos barbitúricos (fenobarbital), precursores dos atuais ansiolíticos pertencentes à classe dos benzodiazepínicos (GRAEFF; GUIMARÃES, 1999; MENARD; TREIT, 1999; BIANCHI *et al.*, 2009).

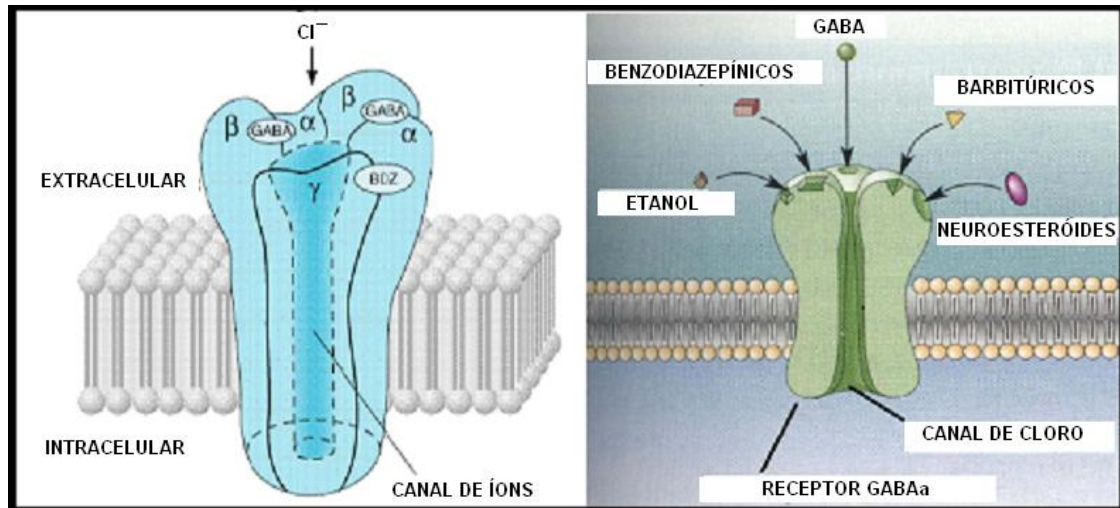
Diferentes medicamentos são comumente utilizados no estudo da ansiedade em laboratório e incluem os que atuam e/ou modulam a atividade do ácido gama-aminobutírico (GABA), da serotonina (5-HT) e da noradrenalina (NA) (GUIMARÃES; GRAEFF, 1999; MENARD; TREIT, 1999; BIANCHI *et al.*, 2009).

O GABA é um importante neurotransmissor nos processos de ansiedade. Apresenta ação inibitória e atua em todo sistema nervoso central (SNC). Os receptores do GABA são proteínas ligadas a membranas e subdividem-se em GABA<sub>A</sub> e GABA<sub>B</sub>. O receptor GABA<sub>A</sub> é formado por cinco subunidades e dispõem-se de modo a formar um canal iônico, mais especificamente, um canal de cloreto (Cl<sup>-</sup>) (BIANCHI *et al.*, 2009; KUMAR *et al.*, 2009) (Figura 3).

A ação ansiolítica dos BZDs (e também de barbitúricos, etanol e neuroesteróides), também chamados agonistas Gabaérgicos, é decorrente de sua ligação a sítios de ligação BZDs localizados no receptor GABA<sub>A</sub>, potencializando a ação inibitória desse transmissor por aumentar a frequência de abertura dos canais de cloreto. Conseqüentemente, ocorre a hiperpolarização celular pelo aumento do influxo de Cl<sup>-</sup>, diminuindo a condução neuronal e provocando a inibição do SNC (KHOUZAM, 1997; RODGERS *et al.*, 1997; BIANCHI *et al.*, 2009). Doses moderadas de BDZs causam efeito ansiolítico por atuar particularmente no subtipo  $\alpha 1$  (LÖW *et al.*, 2000). Efeitos



hipnóticos (doses elevadas) são mediados pelos subtipos alfa 2 ( $\alpha 2$ ) e alfa 3 ( $\alpha 3$ ) (McKERNAN *et al.*, 2000). O sítio dos barbitúricos está localizado no interior do canal e age aumentando a duração de abertura dos canais. Suas atividades ansiolíticas estão muito ligadas à sedação que eles causam (BIANCHI *et al.*, 2009).



**Figura 3: Representação esquemática do receptor GABAérgico**

Fonte: <http://images.google.com/imgres?imgurl=http://4.bp.blogspot.com/>

## 1.6 Neurotransmissão serotoninérgica e implicações na ansiedade

Além do GABA, outros neurotransmissores, como a serotonina (5-hidroxitriptamina - 5-HT), estão implicados na ansiedade. As primeiras evidências de que o sistema de neurotransmissão serotoninérgico estaria relacionado às emoções de medo/ansiedade foram obtidas ainda na década de 60 em modelos animais de conflito (GELLER, 1967).

Neurônios serotoninérgicos são encontrados em muitas regiões diferentes do cérebro e da medula, e tem importante papel na regulação da coordenação motora, motivação e recompensa, equilíbrio emocional, humor, atenção, planejamento e comportamento social (BOURIN *et al.*, 2007). As alterações deste sistema em humanos estão envolvidas em diversos distúrbios mentais como depressão, ansiedade, esquizofrenia e adição a álcool e drogas (GUIMARÃES; GRAEFF, 1999).

Sintetizada a partir do aminoácido triptofano (aminoácido aromático essencial) no interior dos neurônios, a serotonina é estocada em grânulos secretórios e, através de um transportador vesicular conhecido como SERT (*serotonin transporter*) é regulada a quantidade de serotonina liberada na fenda sináptica, conseqüentemente influenciando a transmissão sináptica (SABDERS-BUSH; MAYER, 2006). A serotonina liberada na fenda é recaptada pelos neurônios serotoninérgicos e degradada pela enzima monoamino-oxidase, preferencialmente do subtipo A (MAO-A), que é encontrada em células neurais e não neurais (astrócitos e células endoteliais) (FRAZER; HENSLER, 1999). A serotonina exerce um duplo papel na regulação da ansiedade: ansiogênico na amígdala e ansiolítico na matéria cinzenta periaquedutal dorsal (MCPD) (GUIMARÃES; GRAEFF, 1999).

Tanto o bloqueio de receptores de serotonina quanto o bloqueio da sua síntese produzem efeito ansiolítico (BOURIN *et al.*, 2007).

Ao longo dos anos o efeito ansiolítico de fármacos que atuam em receptores serotoninérgicos 5-HT<sub>1A</sub>, 5-HT<sub>2A</sub> e 5-HT<sub>2C</sub> tem sido revelado tanto em modelos comportamentais condicionados quanto em modelos etológicos (BOURIN *et al.*, 2007)

A buspirona, pertencente à classe de compostos azaspirodecanodiona, interfere diretamente na neurotransmissão serotoninérgica. Possui alta afinidade pelos receptores serotoninérgicos do subtipo 5-HT<sub>1A</sub>, nos quais atua como agonista parcial. Duas hipóteses são propostas como mecanismo de ação: (1) atuação nos receptores pré-sinápticos somato-dendríticos como agonista pleno (ativação dos auto-receptores inibitórios 5-HT<sub>1A</sub> na rafe), diminuindo a frequência de disparos do neurônio serotoninérgico pré-sináptico; e (2) atuação como agonista parcial nos receptores pós-sinápticos (hipocampo), competindo com a serotonina por esses receptores e, conseqüentemente, reduzindo sua ação (GARRATTINI; CACCIA; MENNINI, 1982; GRAEFF, GUIMARÃES, 1999). A buspirona também se liga aos receptores dopaminérgicos D2, embora bem menos avidamente do que aos receptores 5-HT<sub>1A</sub> (RIBLET *et al.*, 1982).

A eficácia da buspirona em modelos animais de ansiedade tem sido variável, como já descrito, apresentando resultados contraditórios em um mesmo tipo de modelo (testes de conflito e labirinto em cruz elevado).

## 1.7 Avaliação do medo/ ansiedade no *Zebrafish*

A avaliação do medo/ansiedade no organismo *zebrafish* é um tema relativamente novo e, embora algumas pesquisas já tenham abordado esta questão, sua interpretação é complexa. Uma melhor caracterização destes dois estados distintos, mas interligados, com o uso de abordagens farmacológicas se faz necessária para aumentar a confiabilidade e validade dos estudos que utilizam este animal (GUO, 2004; SISON *et al.*, 2006; BLASER; CHADWICK; McGINNIS, 2009; GERLAI, 2009).

Para se validar um modelo é preciso que ele apresente pelo menos uma das três seguintes validades (RODGERS *et al.*, 1997; EINAT; MANJI; BELMAKER, 2003; KARI; RODECK; DICKER, 2007; WEST *et al.*, 2000):

- *validade de face*: similaridade entre os traços comportamentais do modelo e da condição humana a ser modelada;
- *validade de construção*: mecanismo teórico comum para explicar o modelo e a patologia/condição humana a ser modelada;
- *validade preditiva*: grau e especificidade com que a droga que é efetiva em humanos também seja no modelo animal e vice-versa.

O uso de drogas ansiolíticas em concentrações compatíveis com as necessárias ao tratamento clínico humano torna possível a validação preditiva de modelos experimentais de ansiedade, foco principal desta dissertação.

Em *zebrafish* para se avaliar medo/ansiedade um dos parâmetros comportamentais mais utilizados é a altura em que os peixes permanecem no aquário, similar à escolha que os roedores fazem pelas paredes versus o centro de uma caixa (tigmotaxia) no aparato Campo Aberto amplamente utilizado para *screening* de drogas ansiolíticas (GERLAI *et al.*, 2000; LEVIN; BECAN; CERUTTI, 2007; BLASER;

CHADWICK; McGINNIS, 2009). Em trabalho realizado por Levin *et al.* (2007) descrevem que, quando o *zebrafish* é exposto a um ambiente novo, tende a ficar no fundo do aquário, o que denotaria maior medo/ansiedade. Após alguns minutos de habituação e assim que se sentem seguros, os peixes passam a explorar as partes mais altas do aquário. Em seus estudos quando os peixes foram expostos à nicotina (100 mg/L) o tempo gasto pelos peixes na parte inferior do aquário foi significativamente menor, o que denota uma diminuição da ansiedade passando a explorar as partes superiores do aquário.

Bencan *et al.* (2009) em seus experimentos constataram que a buspirona (6.25 mg/L; 25 mg/L e 50 mg/L) apresentou efeito ansiolítico nos peixes reduzindo a permanência dos mesmos na parte inferior do aquário. O diazepam (somente nas doses de 1.25 mg/L e 5 mg/L) também fez com que os peixes passassem a preferir as partes superiores do aquário, mas o efeito foi modesto. Já o clordiazepóxido, um outro ansiolítico benzodiazepínico (agonista eficaz dos receptores GABA<sub>A</sub>), não apresentou efeito ansiolítico no *zebrafish* numa ampla curva de doses até aquelas que causaram sedação.

A locomoção ou atividade natatória também é utilizada como índice de ansiedade e a supressão desta atividade é indicativa de ansiedade (BLASER; CHADWICK; McGINNIS, 2009). Gerlai *et al.* (2000) descrevem que o etanol leva a uma modificação dose dependente da atividade locomotora do *zebrafish*. Em doses baixas ou intermediárias (0.25% e 0.50%) o *zebrafish* apresenta hiperatividade, enquanto em altas doses (1.00%) apresenta atividade natatória diminuída. O álcool também modifica outras características comportamentais, torna o peixe mais agressivo, promove resposta antipredatória (pulos), e tem efeito no comportamento social (dispersão dos peixes do cardume, ou seja, diminuição na coesão social) também

observado em trabalho posterior, Gerlai (2003), com tratamentos 0.25%, 0.5% e 1.00% de etanol.

Como descrito por Pfeiffer (1963), uma série de reações comportamentais, medo/ansiedade/raiva/pânico também podem ser desencadeadas em peixes após exposição a substâncias de alarme e produzem respostas como: natação no fundo de aquário, congelamento, formação de grupos mais coesos e por vezes saltos para fora do aquário.

As reações de alarme são desencadeadas por exposição dos peixes a substâncias extraídas da própria pele do peixe, de forma similar ao que ocorre na natureza quando algum dano é causado à pele do peixe (JESUTHASAN; MATHURU, 2008; SPEEDIE; GERLAI, 2008; BLASER; CHADWICK; MCGINNIS, 2009). Reações de alarme também podem ser observadas quando os peixes são expostos à hipoxantina-3(N)-óxido ( $H_3NO$ ) (PARRA; ADRIAN; GERLAI, 2009), cafeína (EGAN *et al.*, 2009) ou quando lhes é apresentado um predador natural (simpátrico) (GERLAI, 2009). Desta forma, substâncias alarme fornecem um paradigma para se avaliar o medo inato e é utilizado como uma perspectiva etológica que pode ser modulada com o uso de BZDs (REHNBERG; SMITH, 1988; JESUTHASAN; MATHURU, 2008).

O medo é desencadeado pela percepção através do sistema olfatório de tais substâncias no meio como relatado por Jesuthasan & Mathuru (2008) e induz alterações comportamentais, sobretudo, na locomoção (*freezing*) do animal.

Waldman (1982) também descreve que substâncias alarme fazem com que os peixes formem um grupo mais coeso e prefiram as partes do fundo de aquários. Speedie e Gerlai (2008) observaram significativa diminuição na coesão entre os membros de um cardume e um aumento de movimentos erráticos quando expostos a estas substâncias.

As características comportamentais observadas no *zebrafish*, como movimentos erráticos, congelamento e fuga do predador são descritos por Gerlai *et al.* (2006) como respostas antipredatórias. Gerlai (2009) propõe que tais características comportamentais seriam indicativas de medo.

Outra ferramenta amplamente utilizada em roedores e atualmente adaptada para peixes para avaliar ansiedade é o teste de preferência por claro/escuro (BLASER; CHADWICK; McGINNIS, 2009; SERRA; MEDALHA; MATTIOLI, 1999; MAXIMINO *et al.*, 2010). O *zebrafish* apresenta preferência pelo lado escuro e aversão ao claro sendo que, quando confinados no ambiente claro apresentam mais *freezing*. Peixes quando tratados com ansiolíticos tendem a permanecer mais tempo do lado claro, o que revela uma diminuição da ansiedade (SERRA; MEDALHA; MATTIOLI, 1999).

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo geral

O objetivo geral deste estudo foi avaliar novas tarefas comportamentais voltadas para medo/ansiedade em *zebrafish*, com foco na validade preditiva desses testes para fármacos ansiolíticos. Desse modo, buscamos avaliar as características comportamentais induzidas pelos diferentes ansiolíticos (BZDs e não-BZDs) em *zebrafish*.

### 2.2 Objetivos específicos

Os objetivos específicos deste estudo foram:

1 - Desenvolver aparatos e parâmetros comportamentais (cor, altura no aquário, locomoção e coesão social, teste claro/escuro) para avaliar a ansiedade no *zebrafish*.

2 - avaliar o efeito dos BZDs (Clonazepam; Bromazepam; Diazepam) sobre o comportamento do *zebrafish* na tarefa do *Group behavior task*;

3 - avaliar o efeito da Buspirona (agonista de receptores 5HT<sub>1A</sub>) sobre o comportamento do *zebrafish* na tarefa do *Group behavior task*;

4 - avaliar o efeito de Etanol e Propranolol (bloqueador  $\beta$ -adrenérgico) sobre o comportamento do *zebrafish* na tarefa do *Group behavior task*;

5 – avaliar o efeito dos BZDs (clonazepam, bromazepam e diazepam), buspirona, buspirona + diazepam, etanol e propranolol no Teste de Preferência por claro/escuro.



**Assessment of anxiety in *Zebrafish* (*Danio rerio*):  
similarities and differences between  
benzodiazepines and buspirone**

Daiane L. Gebauer , Natália Pagnussat , Ângelo L. Piato, Carla D. Bonan, Diogo R.  
Lara.

Artigo submetido ao periódico Neuropsychopharmacology em 01 de fevereiro de 2010.

**Assessment of anxiety in zebrafish (*Danio rerio*): similarities and differences between benzodiazepines and buspirone**

Daiane L. Gebauer<sup>a</sup>, Natália Pagnussat<sup>a</sup>, Ângelo L. Piato<sup>a</sup>, Carla D. Bonan<sup>a,b</sup>, Diogo R. Lara<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup>Laboratório de Neuroquímica e Psicofarmacologia, Departamento de Biologia Celular e Molecular, Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular. Faculdade de Biociências, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul. Porto Alegre, Brazil.

<sup>b</sup> National Institute for Translational Medicine (INCT-TM), 90035-003, Porto Alegre, RS, Brazil

\* Corresponding author.  
Av Ipiranga, 6681 P12C. Porto Alegre, RS, Brazil  
90619-900. Fax: +55 51 3320 3568  
E-mail address: drlara@pucrs.br (D. R. Lara).

## **Abstract**

There is growing interest in zebrafish as a model organism in behavioral pharmacology research. Several anxiety behaviors have been characterized in zebrafish, but the effect of anxiolytic drugs on these parameters has been scarcely studied. Here we assessed the predictive validity of acute treatment with anxiolytic drugs on three behavioral parameters for fear and anxiety, namely shoal cohesion, height in the tank and light/dark preference. In the first task we simultaneously observed behavior of adult zebrafish on four parameters: height in the tank, locomotion, color, and shoal cohesion. The benzodiazepines clonazepam, bromazepam, and diazepam and a moderate dose of ethanol significantly reduced shoal cohesion at doses that did not consistently affect other behavioral parameters. Buspirone specifically increased height of zebrafish in the tank. The second task was the assessment of light/dark preference for 5 min. All benzodiazepines, buspirone, and ethanol increased time spent in the light compartment. After treatment with anxiolytics, fish typically spent more than 60 s and rarely less than 40 s in the light compartment whereas controls (n=45) spent  $33.3 \pm 14.4$  s and always less than 60 s in the light compartment. These results suggest that light/dark preference in zebrafish is a practical, low-cost, and sensitive screening task for anxiolytic drugs. Height and shoal cohesion are useful behavioral parameters in discriminating different classes of these drugs.

**Keywords:** zebrafish; anxiety; benzodiazepines; shoal cohesion; light/dark task.

## Introduction

Zebrafish have many inherent advantages as a model organism, such as low cost, easy handling and maintenance as compared with other vertebrate models, and 70-80% genetic homology to humans (Barbazuk *et al*, 2000; Goldsmith *et al*, 2004; Egan *et al*, 2009). Despite the increasing popularity of zebrafish (*Danio rerio*) in neurosciences, the assessment of anxiety in this model animal has been poorly characterized pharmacologically.

Zebrafish behavior can be easily observed and quantified in a controlled environment (Beis and Stainier, 2006; Miklósi and Andrew, 2006; Levin *et al*, 2007). The behavioral repertoire of zebrafish is complex and allows the development of a range of behavioral parameters (Gerlai *et al*, 2000; Zon and Peterson, 2005). Furthermore, the characterization of zebrafish behavior is important for the generation of large-scale behavioral screens and a systems-level analysis of how chemicals affect behavior. Such behavior-based chemical screens may improve our understanding of neurobiology and drug action, and accelerate the pace of psychiatric drug discovery (Berghmans *et al*, 2007; Kokel and Peterson, 2008; Rihel *et al*, 2010). Recently, Rihel *et al* (2010) evaluated the effect of 3968 compounds on locomotor activity and rest/wake regulation of larval zebrafish, finding specific behavioral fingerprints for many psychotropic classes. However, characterization of more behavioral tasks will be useful for the use of zebrafish in the study of brain function.

Measures of anxiety and fear in zebrafish include fleeing and erratic movements in response to predators and alarm pheromone, freezing behavior, bottom-dwelling and crowding to form a dense school (Pfeiffer, 1977). Gerlai (2009) has established automated measures of zebrafish escape from animated images of sympatric predators. Levin *et al* (2007) have proposed that height in the tank may be a useful measure of anxiety that resembles thymogtaxis observed in rodents. Indeed, acute nicotine (Levin *et al*, 2007), buspirone (Bencan *et al*, 2009) and chronic fluoxetine (Egan *et al*, 2009) treatment reduce bottom-dwelling, but the results of the benzodiazepines diazepam and chlordiazepoxide were inconsistent in this task (Bencan *et al*, 2009). Freezing behavior also increases under anxiogenic conditions, such as caffeine treatment, exposure to alarm substances (Egan *et al*, 2009) or to aversive environments (Blaser *et al*, 2009). Gerlai *et al* (2000, 2003) have shown that the preference of zebrafish for being in

groups is reduced by acute treatment with ethanol. Moreover, preference of zebrafish for dark and aversion to light environments has been put forward as a useful behavioral parameter (Serra *et al*, 1999; Maximino *et al*, 2010). However, these putative measures of anxiety have been poorly characterized pharmacologically. Interestingly, there is no reliable measure sensitive to prototype anxiolytics such as benzodiazepines in zebrafish.

Anxiolytics are generally divided into two groups of medications, benzodiazepines (BDZs) and non-benzodiazepines (barbiturates, propranolol, and buspirone) (Menard and Treit, 1999; Bianchia *et al*, 2009). Benzodiazepines potentiate GABA<sub>A</sub> receptor function by increasing channel opening frequency, producing their anxiolytic properties particularly by acting on  $\alpha 1$  subtype (Löw *et al*, 2000) and hypnotic effects on  $\alpha 2$  and  $\alpha 3$  subtypes (Mckernan *et al*, 2000). Buspirone exerts anxiolytic effects by acting as a partial agonist at serotonin 5-HT<sub>1A</sub> receptors (Ohlsen and Pilowsky, 2005). Ethanol also has acute anxiolytic effects, probably not mediated by GABA<sub>A</sub> receptors (Radcliffe *et al*, 1999; Kumar *et al*, 2009), with depressant effects on the central nervous system at higher doses. Propranolol is a non-selective  $\beta_1$ - and  $\beta_2$ -adrenergic antagonist with anxiolytic effects particularly for performance and somatic anxiety (Granville-Grossman and Turner, 1966; Tyrer and Lader, 1974).

Our objective was to assess the predictive validity of anxiolytic drugs on putative behavioral parameters of anxiety in zebrafish. With the goal to develop fast, simple, and valid anxiety tests, we investigated the behavioral responses of zebrafish acutely treated with different anxiolytics on a protocol (the Group Behavior Task) that assesses simultaneously height in the test tank, color, locomotion, and shoal cohesion. The usefulness of the light/dark task a screening method was also evaluated.

## **Material and methods**

### **Animals and Housing**

Adult male and female “wild type” (short fin) zebrafish (*Danio rerio*) were obtained from a commercial supplier (Red Fish, Porto Alegre, Brazil). All fish were acclimated for at least two weeks in the laboratory environment and housed in groups of 30-50 fish in a 50 L thermostat tank ( $28 \pm 2$  °C) with constant aerated water. Fish were

kept on a 14-10 h day/night cycle and fed three times a day with commercial flakes and supplement with live brine shrimp.

All protocols were reviewed and approved by the Institutional Animal Care Committee (110/08–CEUA–PUCRS) and followed Brazilian legislation, the guidelines of the Brazilian Collegium of Animal Experimentation (COBEA), and the Canadian Council for Animal Care (CCAC) guide on the care and use of fish in research, teaching, and testing.

## **Chemicals**

Liquid formulations of clonazepam (Rivotril®), bromazepam (Lexotan®), diazepam (União Química, Brazil), and ethanol were purchased from common commercial suppliers. Buspirone and propranolol were from Sigma-Aldrich (USA).

## **Treatments**

Drug concentrations were determined based on pilot drug response curves and the relative potency of benzodiazepines. Ethanol concentrations were chosen based on previous data (Gerlai *et al*, 2000; Gerlai *et al*, 2006).

Raters (interrater reliability > 0.90) were blind to treatment groups and a control group was included in every experiment.

## **Behavioral apparatus**

All procedures were performed in an isolated room. One day (24 h) prior to the experiments, fish were moved to the experimental room with identical conditions to the fish housing apparatus to reduce environmental variance during behavioral assays.

For the Group Behavior Task, five test tanks (24 x 8 x 20 cm, length x width x height) with 2.7 L of water (15 cm high) were used for simultaneous evaluation of height, locomotion, color and shoal cohesion. Water temperature was maintained with heaters. The lateral and back sides were visually blocked with white opaque self-adhesive plastic film to reduce the influence of the surrounding area and to facilitate observation.

For the light/dark task, one glass tank (18 x 9 x 7 cm, length x width x height, adapted from Rawashdeh *et al*, 2007) was divided by a sliding guillotine-type partition (9 x 7 cm) in two equally sized dark and white compartments using black or white self-adhesive film externally covering walls, floor and the corresponding sides of the partition. The tank water level was 3 cm and the partition was raised 1 cm above the tank floor to allow zebrafish to swim freely from one side of the tank to the other.

## **Experiments**

For the observation of a small group of zebrafish in a novel task, we developed a protocol called the Group Behavior Task. This was conducted initially in 50 min session and later in a 10 min session. We also performed the light/dark task in zebrafish individually.

### **Experiment 1: 50 min observation in the Group Behavior Task**

Firstly, four different concentrations of each drug were prepared directly in the test tank (2.7 mL). Three fish were then placed into a beaker filled with 300 mL of the water from the respective test tanks (with the corresponding concentration) for a pretreatment of 10 min. A separate group underwent the same procedure in a test tank without drugs and was called ‘water control’. Raters were blind to these treatment groups. Another group of three fish without drug treatment was used as a reference of normal behavior (e.g., locomotion and color) to help the rater and was called ‘internal control’.

Behavioral characteristics of zebrafish were evaluated after exposure to a novel place (test tank) after the 10 min pretreatment period. The three fish and water were gently transferred from the beaker to the five test tanks in 2 min intervals. Fish were observed by a rater blinded to treatments and ‘water control’ for one minute at 5, 15, 25, 35 and 50 min after introduction in the test tank. This procedure was repeated four times (for four groups of three fish), totaling 12 fish for each drug concentration. The rationale for using a group of three fish is to allow observation of shoal cohesion (Gerlai, 2003).

## **Experiment 2: 10 min observation and evaluation with or without drug in the Group Behavior Task**

The same apparatus of experiment 1 was used. After 10 min of drug pretreatment, fish were transferred to the test tank and analyzed in minutes 1, 2, 3, 4, 5 and 10. The same procedure was also conducted in the presence (continuous treatment) or absence of drugs in the test tank during the experiment after 10 min pretreatments.

## **Experiment 3: Light/dark task**

After drug pretreatment of 10 min in a beaker, fish were individually placed at the white side of the tank and allowed to swim freely between compartments. The time spent on each compartment and the number of crossings were recorded during 5 min. The latency to first entry in the dark compartment was also measured.

## **Behavioral Scores in the Group Behavior Task**

### **Height in the tank**

The position (bottom x middle x upper levels) was considered an index of anxiety, similar to the position near the wall versus the center of an open field with rodents (Levin *et al*, 2007).

Fish position in the test tank experiment was noted according to the following scores during 1 min observations: 1 - only in the bottom third of the tank; 2 - preference for the lower two thirds of the tank; 3 - similar times exploring the 3 thirds; 4 - preference for the upper two thirds; 5 - only in the upper third.

### **Locomotion**

Locomotor activity was used as a general index of behavioral excitation/inhibition. Activity was evaluated by comparing to 'internal control' fish, using the following scores: 1 - virtually immobile; 2 - slower than normal; 3 - normal; 4 - increased locomotion; 5 - intense locomotion.



## **Color**

Zebrafish change their color in response to certain stimuli. Fish that exhibit signs of fear (e.g., freezing or erratic movement) quickly become pale, especially when the background is light (Levin *et al*, 2007). When fish are more excited or aggressive, they become more chatoyant (Gerlai, 2000).

Fish color was rated visually by comparing to ‘internal control’ fish and scored as follows: 1 - pale; 2 - lighter than normal but not pale; 3 - normal; 4 - darker than normal but not chatoyant with dark-blue stripes; 5 – chatoyant with dark-blue stripes.

## **Shoal cohesion**

Zebrafish prefer swimming in groups and group aggregation is termed shoal cohesion (Engeszer *et al*, 2007; Miller and Gerlai 2007; Saverino and Gerlai, 2008). This behavioral strategy is thought to be effective against predators in several fish species (Detrich *et al*, 1999; Gerlai *et al*, 2000). In contrast to other studies using only one fish during experiments, placing three in the test tank allows maintenance of their natural shoal behavior.

Shoal cohesion was measured by comparing to ‘internal control’ fish according to the following scores: 1 - complete lack of group cohesion or fish interaction; 2 - loose or partial shoaling behavior; 3 - normal distance and shoaling behavior; 4 - increased shoal cohesion.

## **Light/dark task measures**

Zebrafish show a marked preference for dark zones (Serra *et al*, 1999; Blank *et al*, 2009, Maximino *et al*, 2010). Based on a similar innate aversion of rodents to brightly illuminated areas (Bourin and Hascoët, 2003), the light/dark task is classically used to evaluate the effect of anxiolytics in rodents (Hascoët *et al*, 2001).

Fish were placed in the light zone of the apparatus with drug-free water and the following measures were recorded for 5 min: i) latency to the first entry in the dark compartment, ii) time spent in the light compartment, and iii) number of crossings between compartments.

## Statistical analysis

All data were expressed as mean  $\pm$  standard deviation (S.D.). Differences between control and treated groups were evaluated by one-way ANOVA followed by Duncan post hoc test. SPSS 16.0 for Windows was used, and a significance level of  $p < 0.05$  was adopted.

## Results

### Experiment 1: 50 min observation in the Group Behavior Task

Most behavioral effects were apparent across the experiment, but for simplicity results are shown only for min 35. Figure 1 A-C shows that the benzodiazepines clonazepam, bromazepam and diazepam significantly reduced shoal cohesion scores at all doses ( $p < 0.05$ ). These drugs also produced inconsistent or minimal effects reducing locomotion and height (except for reduced locomotion with diazepam), whereas color scores increased ( $p < 0.05$ ) only at the highest dose of each drug. Taken together, these results indicate a robust and potent effect of benzodiazepines in reducing shoal cohesion with minimal effects on other behavioral parameters. Increased color score was suggestive of stress or toxicity.

Buspirone increased height in the tank ( $p < 0.05$ ) at all time points and slightly but significantly ( $p < 0.05$ ) decreased locomotion at all doses after 35 min of observation, but failed to affect shoal cohesion (Fig. 1D). The highest dose of buspirone increased ( $p < 0.05$ ) color scores at all time points. Ethanol failed to consistently affect behavior at lower concentrations (0.125% and 0.25%). At 0.5% ethanol only reduced shoal cohesion ( $p < 0.05$ ) and, at the highest concentration (1%), ethanol reduced height, increased color scores and reduced shoaling behavior ( $p < 0.05$ , Fig. 1E). Propranolol reduced height at higher doses ( $p < 0.05$ , 30 and 100 mg/L), decreased locomotion ( $p < 0.05$ ) in all doses except 10 mg/L, had no or minimal effect on color and reduced shoal cohesion at 3 and 100 mg/L (Fig. 1F). At 100 mg/L propranolol, 3 fish died by the end of the experiment and 2 others died a few minutes after the experiment.

## **Experiment 2: 10 min observation and evaluation with and without drug in the Group Behavior Task**

To improve and simplify the protocol, we evaluated the same behavioral parameters every minute for 5 min and in the 10<sup>th</sup> minute using a selected effective dose of each drug. Indeed, benzodiazepines and ethanol specifically ( $p < 0.05$ ) reduced shoal cohesion and buspirone specifically increased height ( $p < 0.05$ , Figure 2). Propranolol had no effect. These results suggest that height and shoal cohesion are anxiety parameters that are modulated by different neurotransmitter systems and drugs. We also tested if drug pretreatment (10 min) without drug exposure during the task was sufficient to produce behavioral changes. Figure 2 shows that for most drugs the effect was detectable with and without treatment during the task, but the effect of ethanol may be more apparent with continuous treatment during the task.

## **Experiment 3: light/dark task**

In the light/dark task, controls spent  $33.3 \pm 14.4$  s of 300 s in the light compartment. All control fish spent less than 60 s in the light compartment (Fig. 3A).

After 10 min of drug pretreatment, all benzodiazepines, buspirone, the combination of diazepam and buspirone, and ethanol 0.5% (but not 0.25%) increased time spent in the light compartment ( $p < 0.0001$ , Fig. 3A). After treatment with effective anxiolytics, fish typically spent more than 60 s and very rarely less than 30 s in the light compartment.

The latency to the first entry in the dark compartment and the number of crossings was not altered by treatments (Fig. 3B and C). Propranolol (Fig. 3A-C) failed to affect behavior in this task.

## **Discussion**

The current study demonstrated that the anxiolytic properties of benzodiazepines and buspirone can be observed in the light/dark task, but benzodiazepines specifically decreased shoal cohesion whereas buspirone specifically increased height in the Group Behavior Task. These effects were present at doses that did not significantly affect other

behavioural parameters, such as locomotion and color. Propranolol failed to consistently and specifically affect anxiety-related behaviors. Thus, these parameters together provide a specific behavioral profile for these anxiolytic drugs.

Zebrafish have a natural tendency to initially remain at the bottom of a novel environment (e.g., a test tank) and then gradually, over a few minutes, explore the higher portions of the test tank (Levin *et al*, 2007; Egan *et al*, 2009). The fear response of zebrafish also includes forming stronger shoal cohesion, freezing and becoming pale (Rehnberg and Smith, 1988; Levin *et al*, 2007), but the exposure to the new environment of a tank is not sufficiently alarming to produce such behaviors. Bencan *et al*. (2009) first showed that buspirone had a pronounced effect in the height of zebrafish in a 5 min task at doses that did not have sedative effects. Our results of the Group Behavior Task also showed that chlordiazepoxide failed to affect this parameter and that diazepam slightly reduced bottom-dwelling but not in a dose-response fashion. Levin *et al* (2007) also showed that nicotine induced zebrafish to stay in the upper part of the tank in a 5 min task. Our study indicates that height and shoal cohesion are distinct anxiety or fear parameters. Of note, the effects of benzodiazepines and ethanol on shoal cohesion became apparent only after 3-4 min in the tank, whereas the effect of buspirone is readily observed in the first minute. These distinct time courses and sensitivities to different drugs suggest that the neurobiological systems underlying height in the tank and shoal cohesion are quite independent. Our proposal is that shoal cohesion relates to the defensive avoidance system, fear or the Behavioral Inhibitory System (BIS) (McNaughton and Gray, 2000), which has a protective role. In contrast, exploration of the upper part of the tank involves the approach system, and anxiety results from the conflict between appetitive tendency and avoidance. Thus, in Gray's terminology, benzodiazepines and ethanol may inhibit the BIS, whereas buspirone and nicotine may reduce defensive approach, which relates to the Behavioral Activation System (BAS) (Gray, 1982; McNaughton and Gray, 2000).

The light/dark task has been classically used as an anxiety test in rodents. Anxiolytics have been found to increase time spent in the light zone whereas anxiogenic drugs decrease it (Imaizumi *et al*, 1994). Zebrafish also prefer dark environments (Serra *et al*, 1999; Egan *et al*, 2009; Blank *et al*, 2009), which make this parameter potentially useful to assess the effects of anxiolytics. Our results confirmed this dark preference of zebrafish and showed that benzodiazepines, buspirone and ethanol were effective in

increasing time in the light zone, whereas propranolol was ineffective. The combination of diazepam and buspirone failed to produce an additive effect, suggesting that in the light/dark task these drugs may have a similar neural substrate. It should be noted that in the light/dark task the apparatus was quite different from the Group Behavior Task and that fish were tested alone. As previously suggested (Gerlai, 2009), and along with our results of predictive validity for anxiolytics, the light/dark task may be ideal for behavioral high-throughput screening of new anxiolytic compounds, since it is quick, easily performed and allows automated detection methods (e.g., videotracking). Besides predictive validity, Maximino *et al* (2010) also point out the face and construct validity of this task.

In general, the observed effects were dose-dependent. However, the results of ethanol showed a more complex pattern. For shoal cohesion, 0.25%, but not 0.5%, was effective in two separate experiments. In contrast, in the light/dark task only 0.5% was effective.

For most drugs and in both tasks, pretreatment for 10 min in a beaker and behavioral evaluation for 5-10 min without drug in the test tank was adequate. However, ethanol and buspirone showed a more pronounced effects in the Group Behavior Task with continuous treatment. These results suggest that pretreatment only is adequate in drug screenings, but there may be a small loss due to false negatives for pharmacokinetics reasons.

Rodents have been preferred for anxiety models due to its genetic and physiological similarities to the human system (West *et al*, 2000). On the other hand, cheaper and more easily handled organism models such as *Drosophila melanogaster* and *Caenorhabditis elegans* are invertebrates. The ease of observation of various parameters, genetic manipulation and low cost may be advantages of the zebrafish to cover this gap between model animals for neuroscience research (Guo, 2009). Moreover, the behavioral methods we employed here (the Group Behavior Task and the light/dark task) generate different types of data, in a practical, simple, inexpensive, safe, and reproducible manner. The simplicity of these behavioral parameters and their capacity to detect distinct and common behavioral changes with different anxiolytic drugs should make them useful for anxiety assessment in zebrafish. Further studies are necessary to evaluate the effect of other drug classes in these behavioral parameters in zebrafish.

## Disclosure/Conflict of interest

The authors report no conflicts of interest.

## Acknowledgments

This work was supported by CNPq (Conselho Nacional de Pesquisa e Desenvolvimento – Brasil) and National Institute for Excitotoxicity and Neuroprotection.

## References

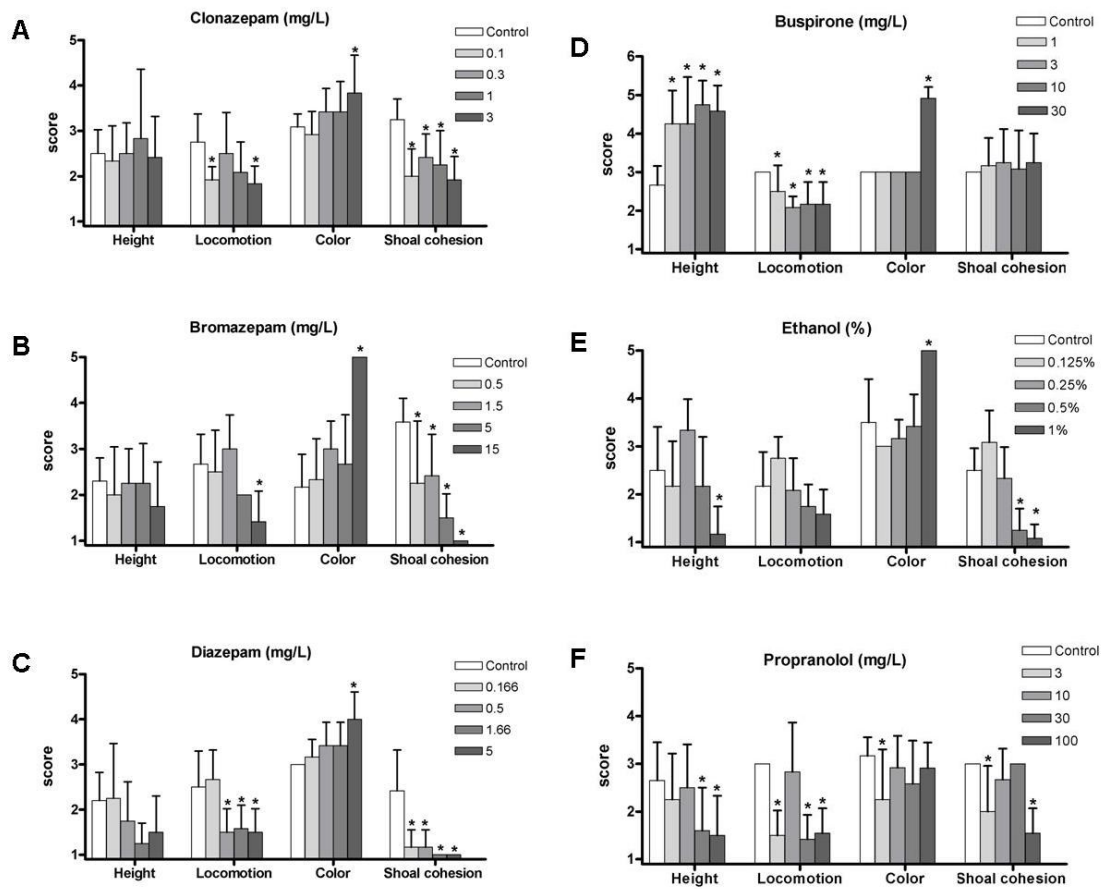
- Barbazuk WB, Korf I, Kadavi C, Heyen J, Tate S, Wun E, Bedell JA, McPherson JD, Johnson SL (2000). The syntenic relationship of the zebrafish and human genomes. *Genome Res* 10: 1351-1358.
- Beis D, Stainier DY (2006). In vivo cell biology: following the zebrafish trend. *Trends Cell Biol* 16(2): 105-112.
- Bencan Z, Sledge D, Levin ED (2009). Buspirone, chlordiazepoxide and diazepam effects in a zebrafish model of anxiety. *Pharmacol Biochem Behav* 94(1):75-80.
- Bencan Z, Levin ED (2008). The role of  $\alpha 7$  and  $\alpha 4\beta 2$  nicotinic receptors in the nicotine-induced anxiolytic effect in zebrafish. *Physiol Behav* 95(3): 408-412.
- Berghmans S, Hunt J, Roach A, Goldsmith P (2007). Zebrafish offer the potential for a primary screen to identify a wide variety of potential anticonvulsants. *Epilepsy Res* 75: 18-28.
- Bianchi MT, Botzolakis EJ, Lagrange AH, Macdonald RL (2009). Benzodiazepine modulation of GABA<sub>A</sub> receptor opening frequency depends on activation context: A patch clamp and simulation study. *Epilepsy Res* 85(2-3): 212-220.
- Blank M, Guerim LD, Cordeiro RF, Vianna MR (2009). A one-trial inhibitory avoidance task to zebrafish: Rapid acquisition of an NMDA-dependent long-term memory. *Neurobiol Learn Mem.* 92(4): 529-534.
- Blaser R, Gerlai R (2006). Behavioral phenotyping in Zebrafish: comparison of three behavioral quantification methods. *Behav Res Methods* 38(3): 456-469.
- Bourin M, Hascoët M (2003). The mouse light/dark box test. *Eur J Pharmacol* 463(1-3): 55- 65.
- Detrich HW, Westerfield M, Zon LI (1999). Overview of the zebrafish system. *Methods Cell Biol* 59: 3-10.

- Egan R, Bergner CL, Hart PC, Cachat JM, Canavello PR, Elegante MF, *et al* (2009). Understanding behavioral and physiological phenotypes of stress and anxiety in zebrafish. *Behav Brain Res.* 205(1): 38-44.
- Engeszer RE, Patterson LB, Rao AA, Parichy DM (2007). Zebrafish in the wild: A review of natural history and new notes from the field. *Zebrafish* 4(1): 21-40.
- Gerlai R, Lahav M, Guo S, Rosenthal A (2000). Drinks like a fish: zebrafish (*Danio rerio*) as a behavior genetic model to study alcohol effects. *Pharmacol Biochem Behav* 67(4): 773-782.
- Gerlai R (2003). Zebrafish: an uncharted behavior genetic model. *Behav Genet* 33(5): 461-468.
- Gerlai R, Lee V, Blaser R (2006). Effects of acute and chronic ethanol exposure on the behavior of adult zebrafish. *Pharmacol Biochem Behav* 85(4): 752-761.
- Gerlai R (2009). Zebrafish antipredatory responses: A future for translational research? *Behav Brain Res.* ARTICLE IN PRESS.
- Goldsmith P (2004). Zebrafish as a pharmacological tool: the how, why and when. *Curr Opin Pharmacol* 4(5): 504-512.
- Granville-Grossman KL, Turner P (1966). The effect of propranolol on anxiety. *Lancet*: 1(7441): 788-790.
- Gray JA. (1982). The neuropsychology of anxiety: An inquiry into the functions of the septohippocampal system. New York: Oxford University Press.
- Guo S (2009). Using zebrafish to assess the impact of drugs on neural development and function. *Expert Opin Drug Discov.* 4(7): 715-726.
- Hascoët M, Bourin M, Dhonnchadha BA (2001). The Mouse light-dark paradigm: a review. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 25(1): 141-166.
- Imaizumi M, Suzuki T, Machida H, Onodera K (1994). A fully automated apparatus for a light/dark test measuring anxiolytic or anxiogenic effects of drugs in mice. *Jpn J Psychopharmacol* 14(2): 83-91.
- Kokel D, Peterson RT (2008). Chemobehavioural phenomics and behaviour-based psychiatric drug discovery in the zebrafish. *Clin Pharmacol Ther* 7(6): 483-490.
- Kumar S, Porcu P, Werner DF, Matthews DB, Diaz-Granados JL, Helfand RS, *et al* (2009). The role of GABA<sub>A</sub> receptors in the acute and chronic effects of ethanol: a decade of progress. *Psychopharmacology (Berl)* 205(4): 529-564.
- Levin ED, Bencan Z, Cerutti DT (2007). Anxiolytic effects of nicotine in zebrafish. *Physiol Behav* 90(1): 54-58.
- Löw K, Crestani F, Keist R, Benke D, Brunig I, Benson JA, *et al* (2000). Molecular and neuronal substrate for the selective attenuation of anxiety. *Science* 290(5489): 131-134.
- Maximino C, de Brito TM, Dias CA, Gouvea Jr A, Morato S. (2010). Scototaxis as anxiety-like behavior in fish. *Nat Protocol* 5(2): 221-228.

- McKernan RM, Rosahl TW, Reynolds DS, Sur C, Wafford KA, Atack JR, *et al* (2000). Sedative but not anxiolytic properties of benzodiazepines are mediated by the GABA(A) receptor alpha1 subtype. *Nat Neurosci* 3(6): 587-592.
- McNaughton N, Gray JA (2000). Anxiolytic action on the behavioural inhibition system implies multiple types of arousal contribute to anxiety. *J Affect Disord* 61(3): 161-176.
- Menard J, Treit D (1999). Effects of centrally administered anxiolytic compounds in animal models of anxiety. *Neurosci Biobehav Rev* 23(4): 591-613.
- Miklósi A, Andrew R (2006). The zebrafish as a model for behavioral studies. *Zebrafish* 3(2): 227-234.
- Miller N, Gerlai R (2007). Quantification of shoaling behavior in zebrafish (*Danio rerio*). *Behav Brain Res* 184(2): 157-166.
- Ohlsen RI, Pilowsky LS (2005). The place of partial agonism in psychiatry: recent developments. *J Psychopharmacol* 19(4): 408-413.
- Pfeiffer W. (1977). The distribution of fright reaction and alarm substance cells in fishes. *Copeia* 7(4): 653-665.
- Radcliffe KA, Fisher JL, Gray R, Dani JA (1999). Nicotinic modulation of glutamate and GABA synaptic transmission of hippocampal neurons. *Ann N Y Acad Sci* 868: 591-610.
- Rawashdeh O, de Borsetti NH, Roman G, Cahill GM (2007). Melatonin suppresses nighttime memory formation in zebrafish. *Science* 318(5853): 1144-1146.
- Rehnberg BG, Smith RJF (1988). The influence of alarm substance and shoal size on the behaviour of zebra danios, *Brachydanio rerio* (Cyprinidae). *J Fish Biol* 33: 155-163.
- Rihel J, Prober DA, Arvanites A, Lam K, Zimmerman S, Jang S, *et al.* (2010). Zebrafish behavioral profiling links drugs to biological targets and rest/wake regulation. *Science*. 327(5963): 348-351.
- Saverino C, Gerlai R (2008). The social zebrafish: Behavioral responses to conspecific, heterospecific, and computer animated fish. *Behav Brain Res* 191(1): 77-87.
- Serra EL, Medalha CC, Mattioli R (1999). Natural preference of zebrafish (*Danio rerio*) for a dark environment. *Braz J Med Biol Res* 32: 1551-1553.
- Tyrer PJ, Lader, MH (1974). Response to propranolol and diazepam in somatic and psychic anxiety. *Br Med J* 2(5909): 14-16.
- West DB, Iakougova O, Olsson C, Ross D, Ohmen J, Chatterjee (2000). Mouse genetics/genomics: an effective approach for drug target discovery and validation. *Med Res Rev* 20(3): 216-230.
- Zon LI, Peterson RT (2005). In vivo drug discovery in the zebrafish. *Nat Rev Drug Discov* 4(1): 35-44.

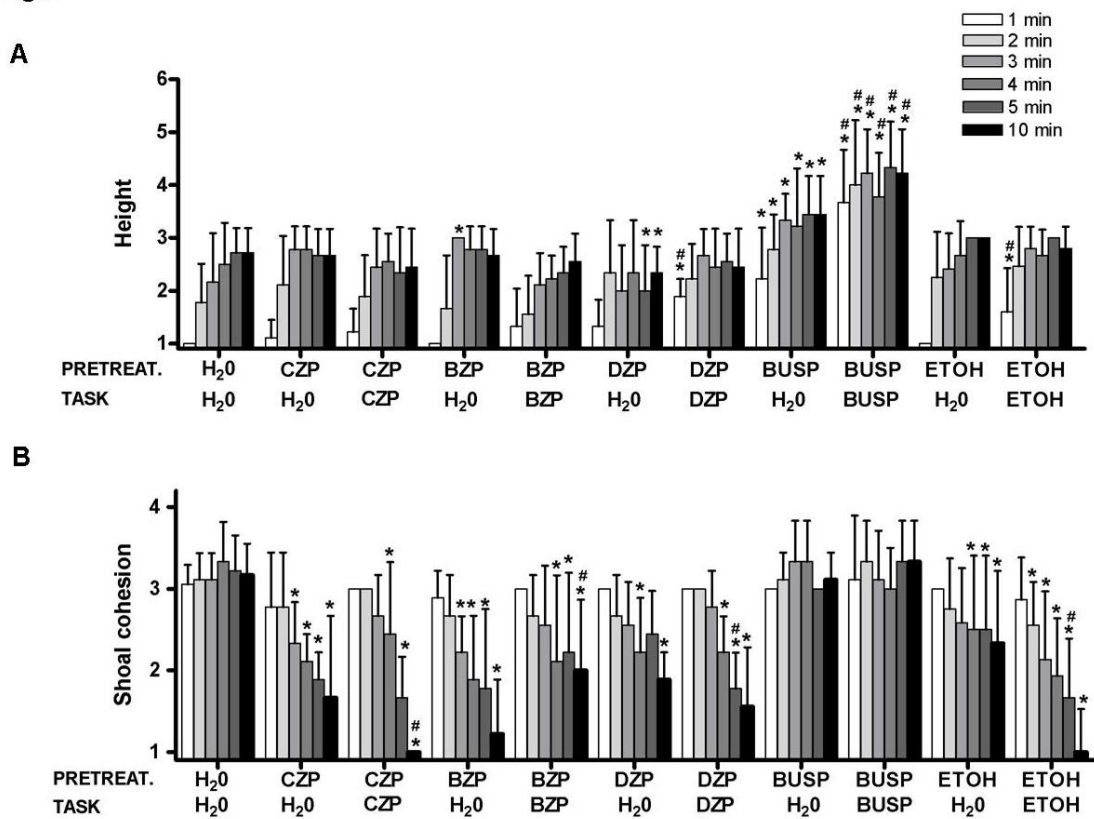


**Fig.1**



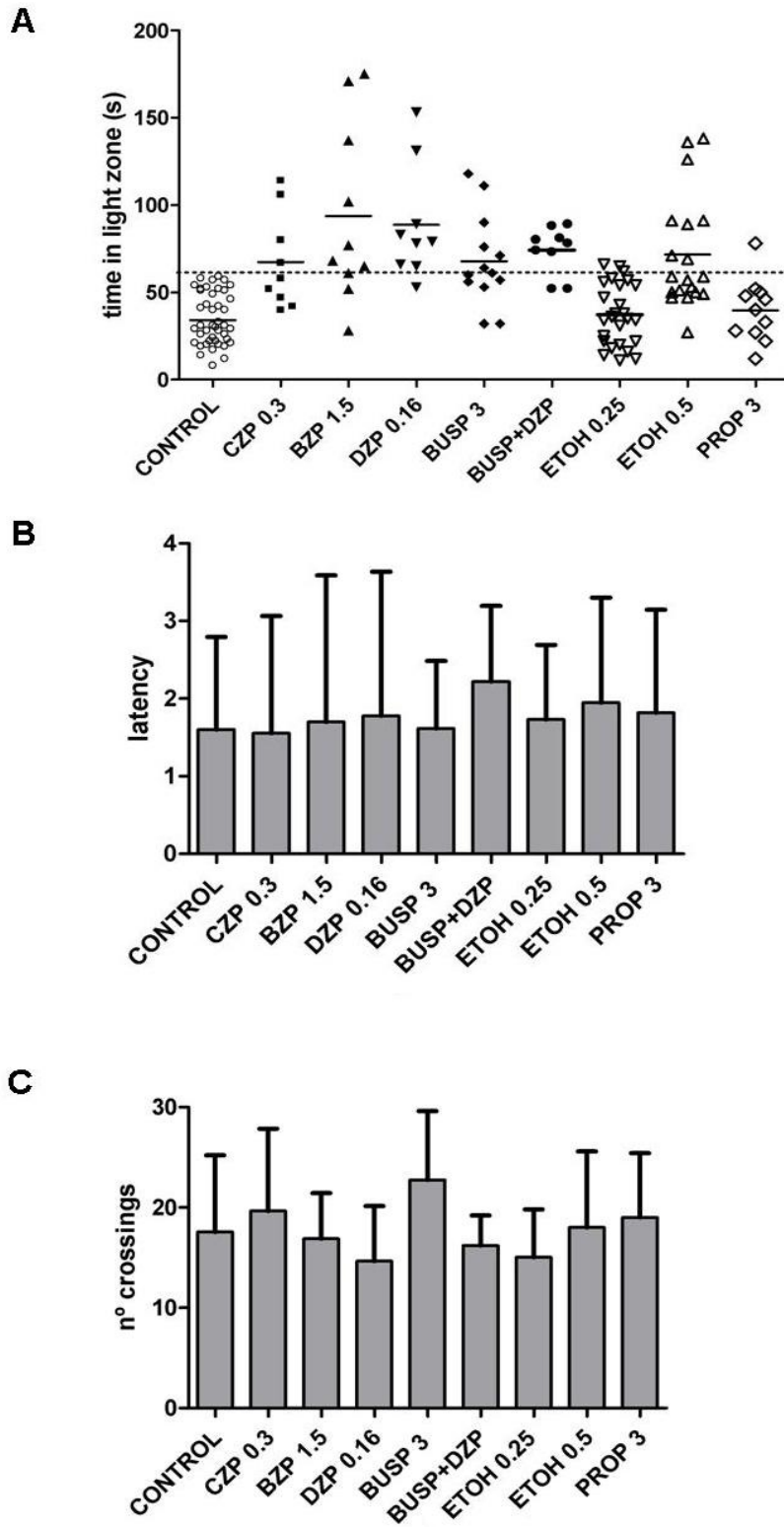
**Figure 1: Effect of anxiolytic drugs in the Group Behavior Task at 35 min of observation.** The effect of clonazepam (0.1-3 mg/L, Fig. 1A), bromazepam (0.5-15 mg/L, Fig. 1B), diazepam (0.16 mg/L, Fig. 1C), buspirone (1-3 mg/L, Fig. 1D), ethanol (0.125-1%, Fig. 1E), and propranolol (3-100 mg/L, Fig. 1F) were evaluated on height in the tank, locomotion, color, and shoal cohesion in zebrafish. Results of 1 min observation at min 35 after introduction in the test tank. Each column represents the mean  $\pm$  S.D. (n=12). \*= $p < 0.05$ . One-way ANOVA/Duncan.

Fig.2



**Figure 2: Effects of anxiolytic drugs in the Group Behavior Task for 10 min with and without treatment during the task.** The effects of clonazepam (CYP 0.3 mg/L), bromazepam (BZP 1.5 mg/L), diazepam (DZP 0.16 mg/L), buspirone (BUSP 3 mg/L) and ethanol (ETOH 0.25%) are shown on height in the test tank (Fig. 2A) and shoal cohesion (Fig. 2B) in zebrafish during 10 min observation with and without drug in the tank test. Each column represents the mean  $\pm$  S.D. (n=12). \*= $p < 0.05$  compared to control group (water control) and #= $p < 0.05$  compared to group without continuous treatment. One-way ANOVA/Duncan.

Fig.3



**Figure 3: Effect of anxiolytic drugs in the light/dark task.** The effects of clonazepam (CZP 0.3 mg/L), bromazepam (BZP 1.5 mg/L), diazepam (DZP 0.16 mg/L), buspirone (BUSP 3 mg/L), buspirone plus diazepam (BUSP+DZP, 3 mg/L and 0.16 mg/L, respectively), ethanol (ETOH 0.25% and 0.5%) and propranolol (PROP 3 mg/L) were evaluated on time spent in the light compartment (Fig. 3A), latency for first crossing (Fig. 3B), and number of crossings (Fig. 3C). Fig. A shows dot plot and means (–), where each dot represents one fish. Groups with filled dots were significantly different from the control group (one-way ANOVA/Duncan). n=9-19 for all groups, except for n=26 in 0.25% ethanol group n=45 in the control group.

### 3 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O desenvolvimento de ferramentas pra se avaliar medo/ansiedade no *zebrafish* é de grande relevância para a neurociência, visto que a validação de tais parâmetros pode ser útil na busca por novos compostos ou para identificar a potencial ação de fármacos ainda não estudados no comportamento de modo mais rápido e fácil e de menor custo em relação aos testes executados com roedores.

Nesta dissertação desenvolvemos ferramentas para avaliar parâmetros comportamentais no *zebrafish*. Utilizamos uma estratégia farmacológica com ansiolíticos clássicos e observamos quatro parâmetros para se avaliar medo/ansiedade em *zebrafish*: interação social; cor; locomoção e coesão social ao qual atribuímos diferentes *scores* comportamentais (Anexo 1). Constatamos que drogas benzodiazepínicas modificam o comportamento inato dos peixes de nadarem em cardume e a altura que permanecem no aquário. Diferente do proposto por Becan (2009), que não teve resultado significativo com o ansiolítico clordiazepóxido (no que se refere à altura e, portanto à ansiedade), podemos observar, em nossos experimentos, que parâmetro coesão social do *Group Behavior Task* assim como o Teste claro-escuro são parâmetros comportamentais mais confiáveis para o *screening* de ansiolíticos de diferentes classes.

Os ansiolíticos BZDs, bem como o etanol, apresentaram em comum a característica comportamental de diminuir a coesão social no grupo de três peixes testados nos aquários sem alterar os demais parâmetros: altura no aquário, cor e locomoção, apesar da janela de dose do etanol ser bem reduzida. Esse perfil difere do que ocorreu com buspirona, que especificamente fez com que os peixes preferissem a

parte superior do aquário, característica comportamental que parece ser indicativa para ansiolíticos serotoninérgicos.

Nesse estudo demonstramos também que benzodiazepínicos e buspirona compartilham efeitos ansiolíticos observados no teste claro-escuro adaptado para peixes. Os resultados sugerem que o claro-escuro é um teste adequado para o rastreamento de ansiolíticos. As drogas que tiverem efeito nesse teste podem ser mais bem estudadas posteriormente usando os parâmetros de altura no aquário e coesão social para distinção entre diferentes classes de ansiolíticos.

Os antagonistas dos receptores  $\beta$ -adrenérgicos, como o propranolol, testado neste trabalho e que apresenta efeito ansiolítico, mas, mais utilizados no tratamento de algumas formas de ansiedade de desempenho, particularmente quando os sintomas físicos são sudorese, tremor e taquicardia, não apresentou resultados nos parâmetros comportamentais observados neste trabalho. A eficácia do propranolol depende mais de bloqueio das respostas simpáticas periféricas do que qualquer efeito central (TYRER; LADER, 1974).

Os parâmetros comportamentais específicos observados nos testes desenvolvidos neste trabalho, utilizando-se o *zebrafish* como organismo para pesquisa, podem ser usados no *screening* de novas drogas ansiolíticas, de modo mais prático, simples, barato e com baixa tecnologia em relação aos modelos até então utilizados.

Estudos complementares quanto a validade preditiva (no que diz respeito à especificidade) deste modelo fazem-se necessários. Enquanto que a sensibilidade foi adequada e demonstrada com diferentes ansiolíticos, a especificidade deve ser testada utilizando-se classes diversas de drogas psicoativas para indicar o potencial valor preditivo destes testes.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Barbazuk WB, Korf I, Kadavi C, Heyen J, Tate S, Wun E, Bedell JA, Mcpherson JD, Johnson SL. The syntenic relationship of the zebrafish and human genomes. *Genome Res.* 2000; 10: 1351-1358.

Beis D, Stainier DY. In vivo cell biology: following the zebrafish trend. *Trends Cell Biol.* 2006; 16(2): 105-112.

Bencan Z, Sledge D, Levin ED. Buspirone, chlordiazepoxide and diazepam effects in a zebrafish model of anxiety. *Pharmacol Biochem Behav.* 2009; 94 (1): 75-80.

Behra M, Cousin X, Bertrand C, Vonesch JL, Biemann D, Chatonnet A, Strahle U. Acetylcholinesterase is required for neuronal and muscular development in the zebrafish embryo. *Nat Neurosci.* 2002; 5(2): 111-118.

Bertoglio LJ, Carobrez AP. Anxiolytic effects of ethanol and phenobarbital are abolished in test-experienced rats submitted to the elevated plus maze. *Pharmacol Biochem Behav.* 2002; 73(4): 963-969.

Bianchi MT, Botzolakis EJ, Lagrange AH, Macdonald RL. Benzodiazepine modulation of GABA<sub>A</sub> receptor opening frequency depends on activation context: A patch clamp and simulation study. *Epilepsy Res.* 2009; 85(2-3): 212-220.

Blaser RE, Chadwick L, McGinnis GC. Behavioral measures of anxiety in zebrafish (*Danio rerio*). *Behav Brain Res.* 2009. ARTICLE IN PRESS.

Blank M, Guerim LD, Cordeiro RF, Vianna MR. A one-trial inhibitory avoidance task to zebrafish: Rapid acquisition of an NMDA-dependent long-term memory. *Neurobiol Learn Mem.* 2009; 92(4): 529-534.

Blanchard RJ, Blanchard DC. An ethoexperimental approach to the study of fear. *Psychol Rec.* 1987; 37: 305-316.

Boehmler W, Obrecht-Pflumio S, Canfield V, Thisse C, Thisse B, Levenson R. Evolution and expression of D2 and D3 dopamine receptor genes in zebrafish. *Dev Dyn.* 2004; 230(3): 481-493.

Bourin M, Hascoët M. The mouse light/dark box test. *Eur J Pharmacol.* 2003; 463(1-3): 55– 65.

Bourin M, Petit-Demoulière B, Dhonnchadha BN, Hascöet M. Animal models of anxiety in mice. *Fundam Clin Pharmacol.* 2007; 21(6): 567-574.

Cerda J, Conrad M, Markl J, Brand M, Herrmann H. Zebrafish vimentin: molecular characterisation, assembly properties and developmental expression. *Anal Cell Pathol* 1998; 77(3): 175-187.

Costall B, Jones BJ, Kelly ME, Naylor RJ, Tomkins DM. Exploration of mice in a black and white test box: validation as a model of anxiety. *Pharmacol Biochem Behav* 1989; 32(3): 777-785.

Edwards JG, Michel WC. Odor-Stimulated glutamatergic neurotransmission in the zebrafish olfactory bulb. *J Comp Neurol*. 2002; 454 (3): 294-309.

Egan R, Bergner CL, Hart PC, Cachat JM, Canavello PR, Elegante MF, *et al.* Understanding behavioral and physiological phenotypes of stress and anxiety in zebrafish. *Behav Brain Res*. 2009; 205(1): 38-44.

Einat H, Manji HK, Belmaker, RH. New approaches to modeling bipolar disorder. *Psychopharmacol Bull*. 2003; 37(1): 47-63.

Engeszer RE, Patterson LB, Rao AA, Parichy DM. Zebrafish in the wild: a review of natural history and new notes from the field. *Zebrafish*. 2007; 4(1): 21-40.

File SE, Wardill AG. Validity of head-dipping as a measure of exploration in a modified hole board. *Psychopharmacology (Berl)*. 1976; 44(1): 53-59.

Frazer A, Hensler JG. Serotonin. In: *Basic Neurochemistry: Molecular cellular and medical aspects*. 6rd ed. Lippincott-Williams & Wilkins. Philadelphia; 1999. p. 235-292.

Garattini S, Caccia S, Mennini T. Notes on buspirone's mechanism of action. *J Clin Psychiatry*. 1982; 43 (12 Pt 2): 19-24.

Geller I. Effect of punishment on lever pressing maintained by food reward on brain stimulation. *Physiol Behav*. 1967; 5(2): 203-206.

Gerlai R, Lahav M, Guo S, Rosenthal A. Drinks like a fish: zebra fish (*Danio rerio*) as a behavior genetic model to study alcohol effects. *Pharmacol Biochem Behav*. 2000; 67(4): 773-782.

Gerlai R. Zebrafish: an uncharted behavior genetic model. *Behav Genet*. 2003; 33(5): 461-468.

Gerlai R, Lee L, Blaser R. Effects of acute and chronic ethanol exposure on the behavior of adult zebrafish. *Pharmacol Biochem Behav*. 2006; 85(4): 752-761.

Gerlai R. Zebrafish antipredatory responses: A future for translational research? *Behav Brain Res*. 2009. ARTICLE IN PRESS.

Goldsmith P. Zebrafish as a pharmacological tool: the how, why and when. *Curr Opin Pharmacol*. 2004; 4(5): 504-512.

Graeff FG, Netto CF, Zangrossi H. The elevated T-maze as an experimental model of anxiety. *Neurosci Biobehav Rev*. 1998; 23(2): 237-246.



- Graeff FG, Guimarães FS. Fundamentos da Psicofarmacologia. São Paulo: Atheneu. 1998.
- Graeff FG. Serotonin, the pariaqueductal gray and panic. *Neurosci Biobehav Rev.* 2004; 28(3): 239-259.
- Gray JA. The neuropsychology of anxiety: An inquiry into the functions of the septohippocampal system. New York: Oxford University Press. 1982.
- Gray JA. Perspectives on anxiety and impulsivity. A commentary. *J Res Pers.* 1987; 21: 493-509.
- Green S, Hodges H. Animal models of anxiety. In: Willner, P., ed. Behavioural models in psychopharmacology. Cambridge: Cambridge University Press; 1991: 21±49.
- Guo S. Linking genes to brain, behavior and neurological diseases: What can we learn from zebrafish? *Genes Brain Behav.* 2004; 3(2): 63-74.
- Jesuthasan SJ, Mathuru AS. The alarm response in zebrafish: innate fear in a vertebrate genetic model. *J Neurogenet.* 2008; 22(3): 211-228.
- Kari G, Rodeck U, Dicker AP. Zebrafish: An Emerging Model System for Human Disease and Drug Discovery. *Discovery.* 2007; 82(1): 70-82.
- Kerr JP. Grouping behaviour of the zebrafish as influenced by social isolation. *American Zoologist.* 1963; 2: 532-33.
- Khouzam HR. A review of clonazepam use in neurology. *The Neurologist.* 1997; 3 (2): 120-27.
- Kim YJ, Nam RH, Yoo YM, Lee CJ. Identification and functional evidence of GABAergic neurons in parts of the brain of adult zebrafish (*Danio rerio*). *Neurosci Lett.* 2004; 355(1-2): 29-32.
- Kumar S, Porcu P, Werner DF, Matthews DB, Diaz-Granados JL, Helfand RS, *et al.* The role of GABA<sub>A</sub> receptors in the acute and chronic effects of ethanol: a decade of progress. *Psychopharmacology (Berl).* 2009; 205(4): 529–564.
- Kucenas S, Li Z, Cox JA, Egan TM, Voigt MM. Molecular characterization of the zebrafish P2X receptor subunit gene family. *Neuroscience.* 2003; 121(4): 935–945.
- Larson ET, O'malley DM, Melloni Jr RH. Aggression and vasotocin are associated with dominant subordinate relationships in zebrafish. *Behav Brain Res.* 2006; 167(1): 94-102.
- Levin ED, Bencan Z, Cerutti DT. Anxiolytic effects of nicotine in zebrafish. *Physiol Behav.* 2007; 90(1): 54-58.
- Levin ED, Chen E. Nicotinic involvement in memory function in zebrafish. *Neurotoxicol Teratol.* 2004; 26(6): 731-735.

- Lister RG. The use of a plus-maze to measure anxiety in the mouse. *Psychopharmacology (Berl)*. 1987; 92(2): 180-185.
- Lister RG. Ethologically-based animal models of anxiety disorders. *Pharmacol Ther*. 1990; 46(3): 321–340.
- Löw K, Crestani F, Keist R, Benke D, Brunig I, Benson JA, *et al*. Molecular and neuronal substrate for the selective attenuation of anxiety. *Science*. 2000; 290 (5489): 131–134.
- Maximino C, de Brito TM, Dias CA, Gouvea Jr A, Morato S. Scototaxis as anxiety-like behavior in fish. *Nat Protocol*. 2010; 5(2): 221-228.
- McHenry MJ, Lauder GV. The mechanical scaling of coasting in zebrafish (*Danio rerio*). *J Exp Biol*. 2005; 208 (Pt 12): 2289-2301.
- Mckernan RM, Rosahl TW, Reynolds DS, Sur C, Wafford KA, Atack JR, *et al*. Sedative but not anxiolytic properties of benzodiazepines are mediated by the GABA(A) receptor alpha1 subtype. *Nat Neurosci*. 2000; 3(6): 587–592.
- Mcnaughton N, Gray JA. Anxiolytic action on the behavioural inhibition system implies multiple types of arousal contribute to anxiety. *J Affect Disord*. 2000; 61(3): 161–176.
- Menard J, Treit D. Effects of centrally administered anxiolytic compounds in animal models of anxiety. *Neurosci Biobehav Rev*. 1999; 23(4): 591-613.
- Miklósi A, Andrew R. The zebrafish as a model for behavioral studies. *Zebrafish*. 2006; 3(2): 227-234.
- Miller N, Gerlai R. Quantification of shoaling behavior in zebrafish (*Danio rerio*). *Behav Brain Res*. 2007; 184(2): 157-166.
- Morato S, Brandão ML. Paradoxical increase of exploratory behavior in the elevated plus-maze by rats exposed to two kinds of aversive stimuli. *Braz J Med Biol Res*. 1997; 30(9): 1113-1120.
- Ninkovic J, Bally-Cuif L. The zebrafish as a model system for assessing the reinforcing properties of drugs of abuse. *Methods*. 2006; 39 (3): 262-274.
- Parnig C, Seng WL, Semino C, McGrath P. Zebrafish: a preclinical model for drug screening. *Assay Drug Dev Technol*. 2002; 1(1 Pt 1): 41–48.
- Parichy DM. Evolution of *Danio* pigment pattern development. *Heredity*. 2006; 97(3): 200–210.
- Parra KV, Adrian JC, Gerlai R. The synthetic substance hypoxanthine 3-N-oxide elicits alarm reactions in zebrafish (*Danio rerio*). *Behav Brain Res*. 2009; 205(2): 336-341.
- Pfeiffer W. The distribution of fright reaction and alarm substance cells in fishes. *Copeia*. 1977; 4: 653–665.

- Pfeiffer W. Alarm substances. *Experientia*. 1963; 19: 113-123.
- Pich EM, Samanin R. Disinhibitory effects of buspirone and low doses of sulpiride and haloperidol in two experimental anxiety models in rats: possible role of dopamine. *Psychopharmacology*. 1986; 89(1): 125-130.
- Pitcher TJ, Parrish JK. Functions of shoaling behaviour in teleosts. In: T. J. Pitcher, Editor, *The Behaviour of Teleost Fishes*, Chapman & Hall., London (1993), pp. 363–439.
- Postlethwait JH, Woods IG, Ngo-Hazelett P, Yan YL, Kelly PD, Chu F, *et al.* Zebrafish comparative genomics and the origins of vertebrate chromosomes. *Genome Res*. 2000; 10(12): 1890-1902.
- Prut L, Belzung C. The open field as a paradigm to measure the effects of drugs on anxiety-like behaviors: a review. *Eur J Pharmacol*. 2003; 463(1-3): 3-33.
- Rehnberg BG, Smith RJF. The influence of alarm substance and shoal size on the behaviour of zebra danios, *Brachydanio rerio* (Cyprinidae). *J Fish Biol*. 1988; 33: 155–163.
- Riblet LA, Taylor DP, Eison MS, Stanton HC. Pharmacology and neurochemistry of buspirone. *J Clin Psychiatry*. 1982; 43(12 Pt 2): 11-18.
- Rico EP, Senger MR, Fauth Mda G, Dias RD, Bogo MR, Bonan CD. ATP and ADP hydrolysis in brain membranes of zebrafish (*Danio rerio*). *Life Sci*. 2003; 73(16): 2071–2082.
- Rihel J, Prober DA, Arvanites A, Lam K, Zimmerman S, Jang S, *et al.* Zebrafish behavioral profiling links drugs to biological targets and rest/wake regulation. *Science*. 2010; 327(5963): 348-351.
- Rodgers RJ, Cao BJ, Dalvi A, Holmes A. Animal models of anxiety: an ethological perspective. *Braz J Med Biol Res*. 1997; 30(3): 289-304.
- Sabders-Bush E, Mayer SE. Serotonin receptor agonists and antagonists. In: Goodman and Gilman's: *The pharmacological basis of therapeutics* 11rd ed. McGraw-Hill: New York; 2006, p. 297–315.
- Schier AF. Genetics of neural development in zebrafish. *Curr Opin Neurobiol* 1997; 7(1): 119-126.
- Serra EL, Medalha CC, Mattioli R. Natural preference of zebrafish (*Danio rerio*) for a dark environment. *Braz J Med Biol Res*. 1999; 32: 1551–1553.
- Sison M, Cawker J, Buske C, Gerlai R. Fishing for genes influencing vertebrate behavior: zebrafish making headway. *Lab Anim*. 2006; 35(5): 33–39.
- Sloman KA, Scott GR, Diao Z, Rouleau C, Wood CM, McDonald DG. Cadmium affects the social behaviour of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Aquat Toxicol*. 2003; 65(2): 171-185.

- Speedie N, Gerlai R. Alarm substance induced behavioral responses in zebrafish (*Danio rerio*). *Behav Brain Res*. 2008; 188(1): 168-177.
- Spence R, Gerlach G, Lawrence C, Smith C. The behaviour and ecology of the zebrafish, *Danio rerio*. *Biol Rev Camb Philos Soc*. 2008; 83(1): 13-34.
- Sprague J, Doerry E, Douglas S, Westerfield M. The zebrafish information network (ZFIN): a resource for genetic, genomic and developmental research. *Nucleic Acids Res*. 2001; 29(1): 87-90.
- Swain HA, Sigstad C, Scalzo, FM. Effects of dizocilpine (MK-801) on circling behavior, swimming activity, and place preference in zebrafish (*Danio rerio*). *Neurotoxicol Teratol*. 2004; 26(6): 275-279.
- Takeda H, Tsuji M, Matsumiya T. Changes in head-dipping behavior in the hole-board test reflect the anxiogenic and/or anxiolytic state in mice. *Eur J Pharmacol*. 1998; 350(1): 21-29.
- Tyrer PJ, Lader MH. Response to propranolol and diazepam in somatic and psychic anxiety. *Br Med J*. 1974; 2(5909): 14-16.
- Treit D, Pinel JP, Fibiger HC. Conditioned defensive burying: a new paradigm for the study of anxiolytic agents. *Pharmacol Biochem Behav*. 1981; 15(4): 619-626.
- Tsuji M, Takeda H, Matsumiya T. Different effects of 5-HT<sub>1A</sub> receptor agonists and benzodiazepine anxiolytics on the emotional state of naive and stressed mice: a study using the hole-board test. *Psychopharmacology (Berl)*. 2000; 152(2): 157-66.
- Waldman B. Quantitative and developmental analysis of the alarm reaction in the Zebra Danio, *Brachydanio rerio*. *Copeia*. 1982; 1: 1-9.
- West DB, Iakougova O, Olsson C, Ross D, Ohmen J, Chatterjee A. Mouse genetics/genomics: an effective approach for drug target discovery and validation. *Med Res Rev*. 2000; 20(3): 216-230.
- Zon LI, Peterson RT. In vivo drug discovery in the zebrafish. *Nat Rev Drug Discov*. 2005; 4(1): 35-44.

**ANEXOS**

**ANEXO 1:**

Planilha:

Dia:

		<u>Altura no aquário</u>						<u>Locomoção</u>						<u>Cor</u>						<u>Interação Social</u>					
		1-só terço inferior (terço 1-chão)						1- imóvel ou praticamente parado						1- pálido						1- ausência de coesão					
		2-preferência pelo terço inferior (terços 1 e 2)						2-mais lento que o normal						2- (-) que 3 mas (+) que 1						2-distância maior que a habitual					
		3- 3 terços - ou igualmente terço superior e inferior						3- normal						3- normal						3-distância normal e característica de cardume					
		4-preferência pelos terços superiores (terços 2 e 3)						4-locomoção aumentada						4- (+) que 3 e (-) que 5						4-distância menor que a habitual					
		5-só terço superior (terço 3)						5-locomoção intensa						5-rutilante											
droga	peixe	1	2	3	4	5	10	1	2	3	4	5	10	1	2	3	4	5	10	1	2	3	4	5	10
	1																								
	2																								
	3																								
	1																								
	2																								
	3																								
	1																								
	2																								
	3																								

## ANEXO 2:

Comprovante de submissão do artigo:

Neuropsychopharmacology

Page 1 of 1



manuscript tracking system

Neuropsychopharmacology

[tracking system home](#) | [author instructions](#) | [reviewer instructions](#) | [help](#) | [tips](#) | [logout](#) | [journal home](#)

### Detailed Status Information

<b>Manuscript #</b>	<a href="#">NPP-10-0079</a>
<b>Current Revision #</b>	0
<b>Submission Date</b>	1st Feb 10
<b>Current Stage</b>	Submission
<b>Title</b>	Assessment of anxiety in zebrafish ( <i>Danio rerio</i> ): similarities and differences between benzodiazepines and buspirone.
<b>Running Title</b>	Assessment of anxiety in zebrafish.
<b>Manuscript Type</b>	Original Article
<b>Category</b>	Behavioral Neuropsychopharmacology
<b>Corresponding Author</b>	Dr. Diogo Lara (Faculdade de Biociencias, PUC-RS)
<b>Contributing Authors</b>	Miss Daiane Gebauer , Miss Natalia Pagnussat , Dr. Angelo Plato , Dr. Carla Bonan
<b>Abstract</b>	<p>There is growing interest in zebrafish as a model organism in behavioral pharmacology research. Several anxiety behaviors have been characterized in zebrafish, but the effect of anxiolytic drugs on these parameters has been scarcely studied. Here we assessed the predictive validity of acute treatment with anxiolytic drugs on three behavioral parameters for fear and anxiety, namely shoal cohesion, height in the tank and light/dark preference. In the first task we simultaneously observed behavior of adult zebrafish on four parameters: height in the tank, locomotion, color, and shoal cohesion. The benzodiazepines clonazepam, bromazepam, and diazepam and a moderate dose of ethanol significantly reduced shoal cohesion at doses that did not consistently affect other behavioral parameters. Buspirone specifically increased height of zebrafish in the tank. The second task was the assessment of light/dark preference for 5 min. All benzodiazepines, buspirone, and ethanol increased time spent in the light compartment. After treatment with anxiolytics, fish typically spent more than 60 s and rarely less than 40 s in the light compartment whereas controls (n=45) spent 33.3±14.4 s and always less than 60 s in the light compartment. These results suggest that light/dark preference in zebrafish is a practical, low-cost, and sensitive screening task for anxiolytic drugs. Height and shoal cohesion are useful behavioral parameters in discriminating different classes of these drugs.</p>
<b>Monitoring Editor</b>	Not Assigned
<b>Keywords</b>	Animal models, Mood/Anxiety/Stress Disorders, Behavioral Science, Drug Discovery/Development, anxiety, animal model, zebrafish
<b>Conflict of Interest Statement</b>	There is <b>NO</b> conflict of interest to disclose.

Stage	Start Date
Submission	1st Feb 10

eJournalPress

[tracking system home](#) | [author instructions](#) | [reviewer instructions](#) | [help](#) | [tips](#) | [logout](#) | [journal home](#) | [terms of use](#)

[http://mts-npp.nature.com/cgi-bin/main.plex?form\\_type=status\\_details&ms\\_id=11755&ms\\_...](http://mts-npp.nature.com/cgi-bin/main.plex?form_type=status_details&ms_id=11755&ms_...) 1/2/2010