

PUCRS

ESCOLA DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA E CIÊNCIAS DA SAÚDE
MESTRADO EM MEDICINA E CIÊNCIAS DA SAÚDE: FARMACOLOGIA BIOQUÍMICA E
MOLECULAR

GABRIELA MADALENA DE MELO MARTINS

**EFEITOS COMPORTAMENTAIS DO EXERCÍCIO FÍSICO EM MODELO DE DEPRESSÃO
INDUZIDO PELA RESERPINA EM PEIXES-ZEBRA (*Danio rerio*)**

Porto Alegre
2022

PÓS-GRADUAÇÃO - STRICTO SENSU



Pontifícia Universidade Católica
do Rio Grande do Sul

GABRIELA MADALENA DE MELO MARTINS

**EFEITOS COMPORTAMENTAIS DO EXERCÍCIO FÍSICO EM MODELO DE
DEPRESSÃO INDUZIDO PELA RESERPINA EM PEIXES-ZEBRA (*Danio rerio*)**

Dissertação apresentada como requisito para a obtenção do grau de Mestre pelo Programa de Pós-Graduação em Medicina e Ciências da Saúde da Escola de Medicina da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul. Área de concentração: Farmacologia Bioquímica e Molecular

Orientadora: Carla Denise Bonan

Coorientadora: Stefani Altenhofen

Porto Alegre

2022

Ficha Catalográfica

M386e Martins, Gabriela Madalena de Melo

Efeitos comportamentais do exercício físico em modelo de depressão induzido pela reserpina em peixes-zebra (*Danio rerio*) / Gabriela Madalena de Melo Martins. – 2022.

87 f.

Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Medicina e Ciências da Saúde, PUCRS.

Orientadora: Profa. Dra. Carla Denise Bonan.

Coorientadora: Profa. Dra. Stefani Altenhofen.

1. Exercício físico. 2. Peixe-zebra. 3. Reserpina. 4. Sistema purinérgico. 5. Transtorno depressivo maior. I. Bonan, Carla Denise. II. Altenhofen, Stefani. III. , . IV. Título.

Elaborada pelo Sistema de Geração Automática de Ficha Catalográfica da PUCRS
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

Bibliotecária responsável: Loiva Duarte Novak CRB-10/2079

GABRIELA MADALENA DE MELO MARTINS

**EFEITOS COMPORTAMENTAIS DO EXERCÍCIO FÍSICO EM MODELO DE
DEPRESSÃO INDUZIDO PELA RESERPINA EM PEIXES-ZEBRA (*Danio rerio*)**

Dissertação apresentada como requisito para a obtenção do grau de Mestre pelo Programa de Pós-Graduação em Medicina e Ciências da Saúde da Escola de Medicina da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul. Área de concentração: Farmacologia Bioquímica e Molecular

Aprovada em: ____ de _____ de _____.

BANCA EXAMINADORA

Prof: Josiane Woutheres Bortolotto

Prof: Fernanda Bueno Morrone

Porto Alegre

2022

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer a todos que fizeram parte desta jornada, sendo através de carinho, motivação, conhecimento, parcerias ou até mesmo como simples ouvinte.

Primeiramente à minha orientadora Carla Bonan por aceitar e abraçar este projeto, sempre com um olhar gentil sobre as dúvidas e anseios, além de possuir uma didática incrível e à Stefani Altenhofen que me ajudou e me guiou mesmo antes de ser minha coorientadora.

Aos meus colegas de laboratório, tanto os pesquisadores Bárbara Dutra, Melissa Wiprich, Darlan Gusso e Júlia Kuhl, quanto à equipe técnica, que me acolheram, deram suporte e compartilharam de grande conhecimento para auxiliar no meu crescimento como pesquisadora e fazer este projeto “sair do papel”, em especial à Karina Gasparly e Daiani Moraes, que além de colegas também são grandes amigas, fazendo este desafio ser vivido com enorme aprendizado sem deixar de ser leve.

À minha família, primeiramente meu marido, Vinícius Martins por me ajudar desde a fase de “pré-projeto”, auxiliando na parte técnica, estando ao meu lado, dando apoio, motivação e força a cada dia, além de meu pai Nilton Melo, minha madrastra Ana Maria Pocol, e minhas irmãs Marcela Maciel, Juliana Madalena e Rafaela Madalena, minha avó Heronita Madalena, estes dois anos foram muito difíceis, não só pela complexidade do mestrado, mas também por toda a carga que o mundo está ainda vivendo devido à pandemia, e sem eles, sem toda a confiança que eles depositaram em mim, eu não teria conseguido!

Não poderia deixar de agradecer à minha mãe, que mesmo não estando mais aqui em vida, segue sendo minha guia, quando lembro tudo que ela me ensinou, o quanto ela acreditou em mim e toda a paixão que ela tinha em dar aula, sendo o exemplo de como quero ser.

Por fim, agradeço à CAPES e a PUCRS, pelo investimento, estrutura e suporte.

RESUMO

O transtorno depressivo maior (TDM) tem atingido de forma crescente a população mundial, sendo observado um aumento ainda mais expressivo nos últimos anos devido à pandemia de COVID-19. Esta condição clínica, que é fortemente incapacitante, também está associada à alta mortalidade, em grande parte devido ao suicídio. Devido a esse crescimento e aos danos causados por esta patologia, estudos que identifiquem novas alternativas para prevenir TDM são necessários. Neste estudo, utilizamos o peixe-zebra (*Danio rerio*) no estágio adulto como modelo para avaliar os efeitos da reserpina no comportamento, nos níveis de neurotransmissores e no catabolismo de nucleotídeos e nucleosídeos. A fim de validar o modelo de depressão em peixe-zebra, utilizamos a fluoxetina para avaliar o seu possível papel na reversão dos sintomas locomotores depressivos causados pela reserpina. Além disso, avaliamos a influência do exercício físico e seu papel preventivo no comportamento de animais expostos a reserpina. Primeiramente, os animais foram expostos à reserpina na dose de 40 µg/mL durante 20 minutos e após 7 dias foram realizadas as análises neuroquímicas, comportamentais e de memória. Observamos aumento do tempo imóvel, maior permanência na zona inferior do aquário, além de diminuição da distância percorrida e velocidade, não havendo alteração na memória e interação social destes animais. Após, foi feita a análise dos níveis dos neurotransmissores serotonina e dopamina, além de seu metabólito DOPAC, onde vimos uma redução significativa desses neurotransmissores e aumento do metabólito. Foi também avaliada as atividades das nucleosídeo trifosfato difosfohidrolase, ecto-5'-nucleotidase e adenosine desaminase (ADA), enzimas envolvidas no controle dos níveis de nucleotídeos e nucleosídeos, em membranas encefálicas de peixe-zebra expostos a reserpina. Os resultados demonstraram um aumento significativo na hidrólise de ADP e uma diminuição na hidrólise de AMP e na atividade da ecto-ADA. Para avaliar se as alterações comportamentais promovidas pela reserpina poderiam ser moduladas por fármacos antidepressivos e assim validar o modelo de depressão em peixe-zebra induzido por reserpina, os animais foram expostos de forma crônica à fluoxetina (7 dias), um fármaco que possui sua ação amplamente conhecida para o tratamento de TDM, onde foi observada a reversão das mudanças comportamentais causadas pela reserpina, estabelecendo este modelo de depressão. Para investigar o efeito do exercício físico, os animais foram submetidos a exercício físico como forma

de prevenção aos efeitos da reserpina durante 6 semanas. Os resultados demonstraram a proteção do exercício físico contra os efeitos comportamentais ocasionados pela reserpina em peixes-zebra. Nossos resultados mostram que a reserpina é eficaz para a indução dos sintomas do TDM neste modelo animal, sendo que o exercício físico pode ser uma alternativa para a prevenção dos efeitos induzidos pela reserpina.

Palavras-chave: exercício físico; peixe-zebra; reserpina; sistema purinérgico; transtorno depressivo maior.

ABSTRACT

Major depressive disorder (MDD) has increasingly reached the world population, with an even more expressive increase in recent years due to the COVID-19 pandemic. This clinical condition, which is strongly disabling, is also associated with high mortality, largely due to suicide. Due to this growth and the damage caused by this pathology, studies are needed to identify new alternatives to prevent MDD. In this study, we used adult zebrafish (*Danio rerio*) as a model to evaluate the effects of reserpine on behavior, neurotransmitter levels, and nucleotide and nucleoside catabolism. To validate the zebrafish model of depression, we used fluoxetine to evaluate its possible reversal role in the locomotor depressive symptoms caused by reserpine. In addition, we evaluated the influence of physical exercise and its preventive role on the behavior of animals exposed to reserpine. Firstly, the animals were exposed to reserpine at a dose of 40 µg/mL for 20 minutes and, after 7 days, neurochemical, behavioral, and memory analyzes were performed. We observed an increase in immobile time and in the time spent in the bottom zone of the tank. In addition, a decrease in the distance traveled and velocity was observed. However, the data showed no changes in the memory and social interaction of these animals. Afterward, serotonin, dopamine and the metabolite DOPAC levels were analyzed. We observed a significant reduction of these neurotransmitters and an increase in the metabolite levels. The activities of nucleoside triphosphate diphosphohydrolase, ecto-5'-nucleotidase and adenosine deaminase (ADA), enzymes involved in the control of nucleotide and nucleoside levels, were also evaluated in brain membranes of zebrafish exposed to reserpine. The results demonstrated a significant increase in the ADP hydrolysis and a reduction in AMP hydrolysis and ecto-ADA activity. To assess if the behavioral changes promoted by reserpine could be modulated by antidepressant drugs and thus validate the zebrafish-depression model induced by this drug, the animals were chronically exposed to fluoxetine (7 days), a drug whose action is widely known for the treatment of MDD, where the reversal of the behavioral changes caused by reserpine was observed, establishing this model of depression. To investigate the effect of physical exercise, the animals were submitted to physical exercise for 6 weeks as a way of preventing the effects of reserpine. The results demonstrated the protection of physical exercise against the behavioral effects caused by reserpine in zebrafish. Our results showed

that reserpine was effective for the induction of MDD symptoms in this animal model, and physical exercise may be an alternative to prevent the effects induced by reserpine.

Keywords: major depressive disorder; physical exercise; purinergic system; reserpine; zebrafish.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Imagem simplificada do mecanismo de ação da reserpina, agindo no transportador de monoaminas (VMAT)	22
Figura 2: Linha do tempo da realização dos procedimentos experimentais do tratamento com reserpina.....	30
Figura 3: Linha do tempo da realização dos procedimentos experimentais do tratamento com fluoxetina em animais expostos a reserpina.....	31
Figura 4: Linha do tempo da realização dos procedimentos experimentais dos animais submetidos ao exercício físico e expostos ao tratamento com reserpina.	32
Figura 5: Fotografia do aparato de exercício físico confeccionado pelo IDEIA da PUCRS, utilizado no presente estudo	33
Figura 6: Protocolo de interação social	35
Figura 7: Aparato de esquiva inibitória.	36
Figura 8: Parâmetros exploratórios e locomotores de peixes-zebra dos grupos controle e expostos à reserpina após 7 dias da exposição	40
Figura 9: Parâmetros de interação social de peixes-zebra dos grupos controle e expostos à reserpina após 7 dias da exposição.....	41
Figura 10: Parâmetros de memória de peixes-zebra avaliados através da esquiva inibitória nos grupos controle e expostos à reserpina após 7 dias da exposição	41
Figura 11: Análise dos níveis de serotonina, dopamina e DOPAC em encéfalos de peixes-zebra expostos à reserpina, comparados com o grupo controle	42
Figura 12: Análise da atividade enzimática das ectonucleotidases de encéfalos de peixes-zebra expostos à reserpina comparados com o grupo controle	42
Figura 13: Análise da atividade enzimática da ADA em fração de membrana e fração solúvel de encéfalos de peixes-zebra expostos à reserpina comparado com o grupo controle	43
Figura 14: Parâmetros exploratórios e locomotores de peixes-zebra dos grupos controle, tratados com fluoxetina e/ou expostos à reserpina, após 7 dias da exposição	44
Figura 15: Parâmetros exploratórios e locomotores de peixes-zebra dos grupos controle, submetidos ao exercício físico e/ou expostos à reserpina.....	46

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

5-HIAA – 5-hidroxiindolacético

5-HT – Serotonina

ADA – Adenosina desaminase

ADO – Adenosina

ADP – Adenosina 5'-difosfato

AMP – Adenosina 5'-monofosfato

ATP – Adenosina 5'-trifosfato

CEUA – Comissão de ética no uso de animais

DA – Dopamina

HPLC – Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (do inglês *High Performance Liquid Chromatography*)

LC-MS – Espectrômetro de massas

L-Dopa – L-diidroxifenilalanina

MAO – Monoaminaoxidase

NTPDases - Nucleosídeo trifosfato difosfoidrolases

SNC – Sistema nervoso central

TDM – Transtorno depressivo maior

LISTA DE SÍMBOLOS

μg – Micrograma

μL – Microlitro

cm – Centímetros

L – Litro

M – Molar

m – Metro

mg – Miligrama

ml – Mililitro

s – Segundo

g – Grama

x g – Aceleração da gravidade

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	15
1.1. TRANSTORNO DEPRESSIVO MAIOR	15
1.2. VIAS DE SINALIZAÇÃO NEUROQUÍMICAS	16
1.2.1. Sistema Purinérgico	16
1.2.2 Sistema Dopaminérgico	18
1.2.3. Sistema Serotoninérgico	19
1.3. FLUOXETINA	21
1.4. RESERPINA.....	21
1.5. EXERCÍCIO FÍSICO.....	22
1.6. PEIXE-ZEBRA (<i>Danio rerio</i>).....	23
2. HIPÓTESE	26
2.1. HIPÓTESE PRIMÁRIA.....	26
2.2. HIPÓTESES SECUNDÁRIAS	26
3. JUSTIFICATIVA	27
4. OBJETIVOS	28
4.1. OBJETIVO GERAL	28
4.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	28
5. MATERIAIS E MÉTODOS.....	29
5.1. LOCAL DE EXECUÇÃO.....	29
5.2. ANIMAIS.....	29
5.3. EXPOSIÇÃO À RESERPINA	30
5.4. TRATAMENTO COM FLUOXETINA.....	30
5.6. ANÁLISES COMPORTAMENTAIS	33
5.6.1. Locomoção.....	33
5.6.2. Interação social	34
5.6.3. Esquiva inibitória	35

5.6.4. Análise dos níveis de neurotransmissores serotonina e dopamina e do metabólito DOPAC	36
5.7. ANÁLISE DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA.....	37
5.7.1 Preparação das Membranas Encefálicas de Peixe-zebra	37
5.7.2. Atividades da Ectonucleotidases	37
5.7.3. Adenosina Desaminase.....	38
5.8. ANÁLISE ESTATÍSTICA	38
6. RESULTADOS	40
6.1. ESTABELECIMENTO DO MODELO DE TDM.....	40
6.1.1. Análise comportamental e de memória de animais expostos à reserpina.....	40
6.1.2 Análise neuroquímica de animais expostos à reserpina	42
6.1.2.1. <i>A reserpina altera os níveis de serotonina, dopamina e DOPAC</i>	42
6.1.2.2. <i>Reserpina altera a hidrólise de ADP e AMP, sem alterar a hidrólise de ATP</i> 42	
6.1.2.3. <i>Reserpina altera a atividade da ADA em membranas cerebrais</i>	43
6.2. VALIDAÇÃO DO MODELO TDM - ANÁLISE COMPORTAMENTAL DE ANIMAIS EXPOSTOS À RESERPINA E TRATADOS COM FLUOXETINA	43
6.3. EFEITO COMPORTAMENTAL DO EXERCÍCIO FÍSICO EM MODELO DE TDM UTILIZANDO RESERPINA	45
7. DISCUSSÃO	47
8. CONCLUSÃO.....	50
9. PERSPECTIVAS.....	51
REFERÊNCIAS.....	52
ANEXOS	64

1. INTRODUÇÃO

1.1. TRANSTORNO DEPRESSIVO MAIOR

O transtorno depressivo maior (TDM) ou simplesmente depressão é uma condição incapacitante que apresenta um conjunto de sintomas, sendo eles: perda ou ganho de peso, desinteresse em atividades diárias, alteração do sono, redução da concentração, dificuldade em pensar e tomar decisões, alteração na atividade psicomotora, pensamentos recorrentes de morte, entre outras. Estas manifestações clínicas afetam a saúde física, as relações humanas e a função cognitiva, podendo ter como desfecho o suicídio (BRIGITTA et al., 2002; HASLER et al., 2004; DSM-5, 2013; JESULOLA et al., 2018).

O TDM é uma patologia comum, que em 2018 atingia aproximadamente 264 milhões de pessoas no mundo (Disease, Injury Incidence and Prevalence Collaborators, 2018), havendo o risco de 15% a 18% de uma pessoa ser acometida por esta condição clínica ao longo da vida (BROMET et al., 2011). No entanto, este número atualmente é ainda mais expressivo. Segundo a meta-análise de BUENO-NOTIVOL e colaboradores (2021), as taxas de depressão na população em geral podem ser até 7 vezes maiores durante o surto de COVID-19 e espera-se que esse número duplique até 2030 (BUENO-ANTEQUERA et al., 2020). Este distúrbio mental está presente na população independentemente da idade, etnia ou sexo, sendo a maior incidência no sexo feminino, aproximadamente atingindo 20-25% das mulheres e aproximadamente 7-12% dos homens (BRIGITTA et al., 2002; WOHLEB et al., 2016). Entretanto, não há diferenças claras por gênero na fenomenologia, no curso da doença ou na resposta ao tratamento (WOHLEB et al., 2016).

Inúmeros estudos vêm trazendo hipóteses para a causa do surgimento do TDM, sendo que a mais estudada tem sido a hipótese monoaminérgica, em que a depressão é causada por uma alteração nos níveis de uma ou mais monoaminas, tais como a serotonina (5-HT) e dopamina (DA) (DEAN et al., 2017). Dessa forma, o uso de inibidores seletivos da recaptção de serotonina (ISRS) tem sido o tratamento de primeira escolha (BROMET et al., 2011). Apesar da via farmacológica ser o tratamento mais comumente adotado no TDM (BOMET et al., 2011), estudos demonstram que abandono deste tratamento farmacológico é consideravelmente alto, dependendo do fármaco de escolha (CIPRIANI et al., 2018) Os principais fatores para este abandono no tratamento farmacológico estão relacionados a ocorrência de efeitos adversos,

entre eles: ganho de peso, aumento do risco de diabetes, disfunção sexual, entre outros (SCHUCH et al., 2019).

Estudos mostram que o exercício físico, por ter influência nos níveis de monoaminas (BASSO & SUZUKI et al., 2017), também é uma alternativa viável para o tratamento da depressão. No entanto, a revisão sistemática de SCHUCH e colaboradores (2016) conclui que devido ao pequeno número de estudos e as limitações metodológicas, ainda se faz necessário um maior número de estudos antes de conclusões definitivas sobre a ação do exercício físico sobre o TDM.

1.2. VIAS DE SINALIZAÇÃO NEUROQUÍMICAS

No TDM, diversas vias de sinalização neuroquímica estão envolvidas, tais como os sistemas serotoninérgico, dopaminérgico (HASLER, 2010; DEAN et al., 2017; SHEFFLER et al., 2020) e purinérgico (LUCAE et al., 2006; BOISON, 2008; KRÜGEL, 2016; BARTOLI et al., 2020). Estes sistemas são responsáveis pela modulação do comportamento, especialmente relacionado ao humor, vigilância, motivação, fadiga, agitação e bem-estar (BRIGITTA et al., 2002; BURNSTOCK, 2008; HASLER, 2010).

As ações dos neurotransmissores 5-HT e DA estão inter-relacionadas. A DA é capaz de aumentar a liberação de 5-HT do núcleo dorsal da rafe através do receptor D2 (DEAN et al., 2017). Além disso, a 5-HT pode afetar a sinalização dopaminérgica em vários outros níveis, inclusive influenciando as atividades dos neurônios desse sistema no mesencéfalo e no núcleo accumbens (KAPUR & REMINGTON, 1996; DAW et al., 2002).

Estudos realizados por BURNSTOCK (2004, 2008) demonstraram que o sistema purinérgico também influencia a sinalização dopaminérgica e serotoninérgica. A adenosina 5'-trifosfato (ATP) e a adenosina (ADO) regulam a liberação de dopamina (BURNSTOCK, 2008). Além disso, o nucleotídeo ATP pode estar colocalizado ou ser coliberado com os neurotransmissores 5-HT e DA (BURNSTOCK, 2004).

1.2.1. Sistema Purinérgico

Purinas, como o ATP e a ADO, atuam como substâncias neurotransmissoras e neuromoduladoras do sistema nervoso central (SNC) (LINDEN, 1999; BURNSTOCK, 2004; BURNSTOCK, 2008). O sistema purinérgico possui vários subtipos de receptores amplamente distribuídos (BOISON, 2008), sendo seus principais ligantes, a adenosina e o ATP (LINDEN, 1999).

O ATP e outros nucleotídeos são armazenados em vesículas secretórias sinápticas (ABBRACCHIO et al., 2009). A sinalização purinérgica é iniciada pela liberação de nucleotídeos no espaço extracelular por meio de canais iônicos e, após sua liberação no espaço extracelular, os nucleotídeos e nucleosídeos se ligam a receptores específicos localizados na superfície da membrana celular (ANTONIOLI et al., 2019). Estes sinais celulares desencadeados pelo ATP são mediados por subtipos de receptores P2 que são classificados em P2X (P2X 1–7), os quais são receptores ionotrópicos, e P2Y (P2Y 1,2,4,6,11-14), os quais são receptores metabotrópicos (LINDEN, 1999; BURNSTOCK, 2008; ABBRACCHIO et al., 2009; ANTONIOLI et al., 2019).

Os nucleosídeos extracelulares mais importantes são a ADO e a inosina (ABBRACCHIO et al., 2009). A ADO é um nucleosídeo convertido a partir do ATP por meio da ação de ectoenzimas, denominadas ectonucleotidasas (DUNWIDDIE e MASINO, 2001; ZIMMERMANN, 2006), sendo que as E-NTPDases (ectonucleosídeo trifosfato difosfohidrolases) e a ecto-5'-nucleotidase são as enzimas responsáveis pela hidrólise de nucleotídeos a nucleosídeos no meio extracelular. A família de enzimas E-NTPDases está localizada na superfície celular e é altamente relevante para a modulação da sinalização intercelular mediada por nucleotídeos (ZIMMERMANN, 2006), uma vez que convertem o ATP em adenosina 5'-difosfato (ADP), que também é metabolizado em adenosina 5'-monofosfato (AMP) pela mesma família (ZIMMERMANN, 2006; BARTOLI et al., 2020).

A ecto-5'-nucleotidase desempenha um papel importante na formação de adenosina a partir do AMP extracelular e na subsequente ativação dos receptores P1 da adenosina (ZIMMERMANN, 2006; MINOR et al., 2019). Estudos em modelos celulares e animais revelaram as principais funções da ecto-5'-nucleotidase na homeostase e patologia em vários tecidos (MINOR et al., 2019).

A adenosina é desaminada em inosina pela adenosina desaminase (ADA) (BAGHERI et al., 2019), é expressa em todos os tecidos humanos, mas em concentrações mais elevadas nas células linfóides, onde desempenha um papel importante na maturação e diferenciação celular (BAGHERI et al., 2019). A adenosina exerce suas ações pela ativação dos receptores P1 acoplados à proteína G, que são classificados em A₁, A_{2A}, A_{2B} e A₃ (ABBRACCHIO et al., 2009; ANTONIOLI et al., 2019). Os receptores A₁ pré-sinápticos inibem a liberação de neurotransmissores, incluindo dopamina e serotonina, enquanto os receptores pós-sinápticos reduzem a

sinalização neuronal por hiperpolarização e excitabilidade via regulação dos canais de potássio (BARTOLI et al., 2020).

O desequilíbrio do sistema purinérgico, em nível genético, bioquímico ou funcional, pode estar envolvido em patologias que variam da epilepsia a distúrbios neurodegenerativos e condições psiquiátricas, como o TDM (LUCAE et al., 2006; BOISON, 2008). A sinalização purinérgica pode desempenhar um papel na fisiopatologia da depressão, envolvendo os receptores A_1 e o receptor A_{2A} , além dos receptores P2 (BARTOLI et al., 2020). Estudos mostram que antagonistas seletivos do receptor A_{2A} , como o SCH 58261, ZM241385, KW6002 e um derivado de imidazol pirimidina[2,1-f]purinadiona, o KD66, podem ter efeitos antidepressivos (EL YACOUBI et al., 2003, YAMADA et al., 2014, DZIUBINA et al., 2016). Além disso, o estudo de POLESZAK e colaboradores (2019) demonstrou que este receptor pode potencializar respostas ao tratamento antidepressivo, através do DMPX, um antagonista deste receptor. O efeito antidepressivo observado pelo antagonista seletivo do receptor A_{2A} pode ser explicado pela modulação de outros neurotransmissores, como a dopamina (EL YACOUBI et al., 2003). Os antagonistas dos receptores de adenosina podem ser capazes de reverter sintomas como anergia, fadiga e lentidão psicomotora, induzida pelo antagonismo ou depleção da dopamina (LÓPEZ-CRUZ et al., 2018).

A combinação de antagonistas inespecíficos do receptor P2 com antidepressivos tem sido associada a efeitos significativos do tipo antidepressivo em modelos animais (DINIZ et al., 2017). IWATA e colaboradores (2016) demonstraram que o estresse psicológico pode influenciar o sistema imunológico no SNC, através do receptor P2X7. A deleção genética e modulação farmacológica de receptores P2X7 têm sido associada a efeitos antidepressivos, onde a estimulação dos núcleos medianos da rafe diminuiu a liberação de 5-HT no hipocampo de camundongos geneticamente deficientes em P2X7R e após perfusão com antagonistas seletivos (JNJ-47965567 ou AZ-10606120) (RIBEIRO et al., 2019).

Sendo assim, este sistema se torna alvo importante para novos estudos sobre suas ações em transtornos psiquiátricos.

1.2.2 Sistema Dopaminérgico

O sistema dopaminérgico está envolvido no circuito de recompensa do cérebro, e motivação por incentivo (FIBIGER e PHILLIPS, 1987; WISE, 1989; BLACKBURN et al., 1992), sendo a anedonia uma característica central do TDM (D'AQUILA et al.,

2000; DSM-5, 2013). Os neurônios dopaminérgicos envolvidos na recompensa e na motivação estão entre muitas populações neurais relevantes, e alguns tratamentos antidepressivos, incluindo medicamentos e terapias de estimulação cerebral, podem influenciar neste sistema (TYE et al., 2013).

A síntese de DA começa com a conversão do aminoácido tirosina pela tirosina hidroxilase em L-diidroxifenilalanina (L-Dopa), que é subsequentemente modificada pela dopacarboxilase em DA (LAMBERT e KINSLEY, 2006; FEHER, 2012). A DA pode então ser metabolizada pela monoamina oxidase (MAO) em DOPAC (WINNER et al., 2017). Após a sua síntese, a DA é armazenada em vesículas nos botões terminais e, após o sinal despolarizante, ocorre a atracção e a liberação de moléculas transmissoras na sinapse (LAMBERT e KINSLEY, 2006). A liberação desta catecolamina também pode ser causada por uma reversão do transportador de monoamina vesicular (VMAT) (LAMBERT e KINSLEY, 2006). A DA controla várias funções fisiológicas no cérebro e na periferia, agindo sobre seus receptores do tipo D1, D2, D3, D4 e D5 (BEAULIEU et al., 2015; MISHRA et al., 2018; BHATIA e SAADABADI, 2020). Os receptores de dopamina são receptores acoplados à proteína G, que são divididos em dois grupos de receptores: tipo D1 (D1 e D5), que resulta na despolarização do neurônio, e receptor tipo D2 (D2, D3 e D4), que inibe o disparo neuronal (DAVID et al., 1993; SONNE et al., 2020).

1.2.3. Sistema Serotoninérgico

O sistema serotoninérgico possui uma variedade de ações que podem modular diferentes funções essenciais do cérebro (ANDRADE et al., 2010; OLIVER et al., 2015), tais como: regular o humor, o sono, a atividade sexual, o apetite, o ritmo circadiano, as funções neuroendócrinas, temperatura corporal, sensibilidade à dor, atividade motora e funções cognitivas (ANDRADE et al., 2010; OLIVER et al., 2015; ŠVOB ŠTRAC et al., 2016). Uma variedade de déficits funcionais da neurotransmissão de 5-HT em circuitos cerebrais conhecidos por regular emoções, primárias ou secundárias, tem sido consistentemente associado a aspectos da fisiopatologia do TDM, como observado em estudos genéticos, neuroquímicos e farmacológicos (ALBERT et al., 2012).

A 5-HT é uma indolamina neurotransmissora e neuromoduladora do sistema nervoso central (SNC), produto de duas etapas a partir do aminoácido essencial L-triptofano. Primeiramente, a triptofano-hidroxilase transforma o L-triptofano em 5-

hidroxitriptofano (5-HTP) e, no segundo passo, a aminoácido aromático descarboxilase metaboliza o 5-HTP, transformando-o em serotonina (LAMBERT e KINSLEY, 2006). Qualquer interrupção nessas reações enzimáticas altera os níveis de serotonina do cérebro (LAMBERT e KINSLEY, 2006; NICHOLS D.E. & NICHOLS C. D et al., 2008). Depois de ser sintetizada, a 5-HT é armazenada em vesículas, e após o sinal despolarizante, ocorre a atracção e exocitose da 5-HT armazenada. A sua libertação também está sob o controle de auto-receptores que, respondendo ao *feedback*, modulam sua produção e libertação (ANDRADE et al., 2010).

Foram identificados neste sistema ao menos 14 receptores de 5-HT (5-HTR) divididos em 7 famílias (5-HTR1 à 5-HTR7) e com subtipos A-F. O receptor 5-HT_{1A} atua como receptor pós-sináptico e como auto-receptor pré-sináptico, regulando a libertação de serotonina (LAMBERT e KINSLEY, 2006). O 5-HTR₃ é ionotrópico, já os demais 5-HTR são metabotrópicos e todos os receptores são acoplados à proteína G que influenciam diferentes vias de transdução (ŠVOB ŠTRAC et al., 2016). Após sua descarga e sua ligação com o receptor, ocorrem dois mecanismos principais que desativam qualquer excesso de 5-HT, sendo eles a recaptação e a degradação enzimática (LAMBERT e KINSLEY, 2006). A 5-HT em excesso é removida da sinapse por um transportador específico chamado transportador de serotonina (SERT), o qual carrega a 5-HT de volta para o neurônio pré-sináptico (LAMBERT e KINSLEY, 2006). Ao chegar lá, a 5-HT passa por uma degradação enzimática por intermédio da enzima monoaminoxidase (MAO), e esta reação catabólica produz o ácido 5-hidroxiindolacético (5-HIAA), que costuma ser usado como um marcador para a atividade da 5-HT (LAMBERT e KINSLEY, 2006).

Modelos animais mostram que a modificação de qualquer um dos componentes do sistema serotoninérgico (ALBERT, 2012; GASPAR et al., 2012; LATAPY et al., 2012; LESCH et al., 2012), incluindo a enzima triptofano hidroxilase, o VMAT, os receptores específicos para serotonina (5-HT_{1A}) ou sua regulação podem levar a alterações que mimetizam o estado de depressão. Em alguns casos, alterações no início da vida dos níveis de 5-HT também podem levar a mudanças comportamentais ao longo da vida relacionadas a depressão ou a ansiedade (ALBERT et al., 2012). Há uma ampla variedade de compostos com ação agonista e antagonista no sistema serotoninérgico, sendo que um dos compostos mais comumente utilizados para o tratamento do TDM é o antidepressivo cloridrato de fluoxetina (LAMBERT e KINSLEY, 2006).

1.3. FLUOXETINA

A fluoxetina, 3- [p- (trifluorometil) -fenoxi] -N-metil-3-fenilpropilamina (7.3.6), é sintetizada por reação de p-trifluorometilfenol com 3-(cloro)-N-metil-3-fenilpropilamina na presença de carbonato de potássio (VARDANYAN et al., 2006). Ela é um fármaco que tem por finalidade aliviar os sintomas da depressão através da via serotoninérgica, inibindo de forma seletiva a recaptação de 5-HT, permitindo que ela permaneça por mais tempo na sinapse (BETTINGER et al., 2004; LAMBERT e KINSLEY, 2006). Seu metabólito (norfluoxetina) possui ação prolongada e é farmacologicamente ativo (MORENO et al., 1999). A fluoxetina apresenta poucos problemas de tolerabilidade e de segurança (MORENO et al., 1999), pois não se liga aos receptores colinérgicos, histaminérgicos ou α - adrenérgicos, que estão envolvidos nos efeitos colaterais dos antidepressivos tricíclicos (VARDANYAN et al., 2006). Além disso, é capaz de elevar o humor e minimizar sentimentos de medo e estresse e não tem efeito sedativo (VARDANYAN et al., 2006). A ação e eficácia deste fármaco, em peixe-zebra, além de outros modelos experimentais, já está bem estabelecida, modulando os sintomas compatíveis com aqueles característicos do TDM (EGAN et al., 2009; WONG et al., 2013; SONG et al., 2017).

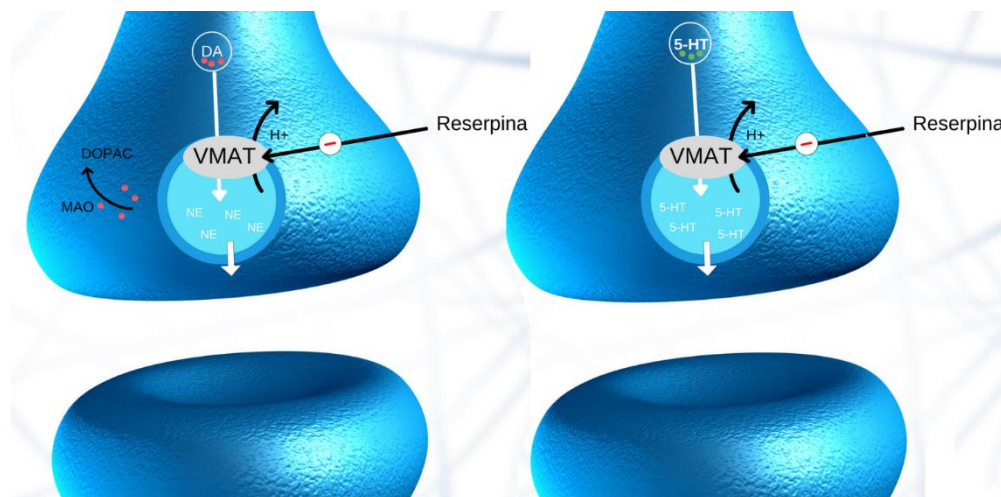
1.4. RESERPINA

A reserpina é um éster metílico do ácido 2 α ,11-dimethoxy-3-(3,4,5-trimetoxibenzoiloxi)-yohimban-1-carboxílico(12.3.1), derivado das raízes da planta tropical Rauwolfia (VARDANYAN et al., 2006), sendo um bloqueador neuronal adrenérgico e considerado um dos primeiros anti-hipertensivos potentes de primeira linha do século XX (CHEUNG et al., 2021). Contudo, atualmente este fármaco é considerado de segunda linha devido aos efeitos colaterais apresentados, como o aumento no risco de induzir sintomas de humor deprimido (ROMEIRO et al., 2003; VARDANYAN et al., 2006).

O mecanismo de ação deste fármaco se dá através do bloqueio irreversível do VMAT (Figura 1) (CHEUNG et al., 2022). Além disso, ele se liga às vesículas de armazenamento, inibindo a captação de noradrenalina (NE), DA e 5-HT pelas vesículas, enfraquecendo a captação intracelular das monoaminas e reduzindo a capacidade de armazenamento em vesículas (VARDANYAN et al., 2006). Dessa forma, ocorre a degradação das monoaminas pela MAO mitocondrial, que leva ao

acúmulo dessas substâncias no citoplasma, (CHEUNG et al., 2022), se tornando um modelo neuroquímico para estudos da depressão em roedores (PARK et al., 2018) e peixe-zebra (ZHANG et al., 2018; TANG et al., 2019). No peixe-zebra, a exposição à reserpina induz efeitos depressivos a longo prazo, incluindo retardo motor comumente associado a fenótipos semelhantes à depressão (KYZAR et al., 2013; NGUYEN et al., 2014). Segundo o estudo de revisão de NGUYEN e colaboradores (2014), a reserpina é a única manipulação farmacológica relatada para induzir fenótipos semelhantes à depressão no peixe-zebra.

Figura 1: Imagem simplificada do mecanismo de ação da reserpina, agindo no transportador de monoaminas (VMAT). DA – Dopamina; 5-HT – Serotonina; NE – Noradrenalina; MAO – monoamina oxidase; DOPAC - Ácido 3,4-diidroxifenilacético.



Fonte: A autora (2022), criado com Canva.

1.5. EXERCÍCIO FÍSICO

O exercício físico tem sido preconizado como um complemento ao tratamento usual para TDM (MEAD et al., 2008). Esta associação ocorre porque o exercício físico está relacionado com a inflamação, sistemas neuroendócrinos e vias neuroquímicas das monoaminas (LIN e KUO, 2013; PAOLUCCI et al., 2018), que estão intimamente relacionados ao TDM.

Os primeiros estudos que avaliaram a interação entre exercício físico e monoaminas surgem da “hipótese da fadiga central” (ACWORTH et al., 1986; NEWSHOLME et al., 1987; LIN e KUO, 2013), que mostra que a fadiga está diretamente relacionada com o aumento da liberação de 5-HT no encéfalo. Modelos em roedores demonstraram que o exercício físico pode causar alteração no sistema serotoninérgico (CHENNAOUI et al., 2000; RENOIR et al., 2011; MIZUTANI et al.,

2013), podendo ocasionar um aumento significativo nos níveis de 5-HT no hipocampo, ou aumento dos níveis estriatais de 5-HT e seu metabólito 5-HIAA. Além disso, MANIAM e colaboradores (2010) demonstraram que comportamentos parecidos com a depressão induzidos pela separação materna e a elevação dos níveis do receptor 5HT1A do hipocampo podem ser recuperados através do exercício físico.

Estudos com roedores demonstraram que o sistema dopaminérgico é modulado pelo exercício físico (LIN e KUO, 2013), através da elevação nos níveis de cálcio sérico, que são induzidos pelo exercício, sendo transportados para o cérebro, afetando positivamente a síntese de DA dependente de cálcio, ativando a enzima tirosina hidroxilase (LIN e KUO, 2013). Estudos também demonstraram que o exercício físico pode proteger os neurônios dopaminérgicos contra a perda de neurônios induzida farmacologicamente em camundongos (LIN e KUO, 2013; WU et al., 2011). Para obter resultados significativos na modulação das monoaminas e no comportamento através do exercício físico, é necessário que parâmetros como intensidade, duração e o tipo de exercício físico (aeróbico ou anaeróbico) sejam controlados (WU et al., 2011; DEPASQUALE e LERI, 2018; PAOLUCCI et al., 2018). Estudo com roedores em termos de corrida voluntária, frequência, duração e intensidade das sessões de exercício podem variar entre os indivíduos e gera dificuldades na interpretação dos resultados (OTSUKA et al., 2016). Em peixes-zebra, é possível minimizar os riscos de resultados conflitantes através de maior controle sobre a intensidade e a frequência do exercício (DEPASQUALE e LERI, 2018). Isto ocorre porque o exercício é realizado através de um fluxo intenso de água, e os peixes mantêm a posição constante contra este fluxo (KIEFFER, 2010), onde as variáveis (velocidade e tempo) são controladas pelo pesquisador, não alterando o comportamento de forma negativa, visto que o nado é inerente ao peixe.

1.6. PEIXE-ZEBRA (*Danio rerio*)

O *Danio rerio*, mais conhecido como peixe-zebra é um teleósteo de água doce pertencente à família Cyprinidae e amplamente utilizado como modelo experimental. Sua utilização se dá devido às diversas características favoráveis que possui: baixo custo, pouco espaço para manutenção, fácil manipulação, rápido desenvolvimento e ciclo biológico, grande sensibilidade a fármacos e um rápido metabolismo (GERLAI et al., 2000; LIESCHKE e CURRIE, 2000; GUO, 2004). Áreas como bioquímica, neurociências, toxicologia e neurobiologia do comportamento (GERLAI, 2003) utilizam

o peixe-zebra como animal modelo e suas características também permitem sua utilização para estudos de doenças humanas (BEST e ALDERTON, 2008).

Muitos sistemas de neurotransmissão já foram identificados no peixe-zebra, tais como: dopaminérgico, serotoninérgico e purinérgico (RICO et al., 2003; BOEHLER et al., 2004; RINK e GUO, 2004; HORZMANN e FREEMAN, 2016).

O sistema dopaminérgico no peixe-zebra é bem caracterizado e está completamente desenvolvido 96 h após a fertilização (RINK e WULLIMANN, 2002; WASEL e FREEMAN, 2020). No peixe-zebra, os neurônios dopaminérgicos se localizam no bulbo olfatório, subpálio, tubérculo posterior, hipotálamo e área pré-tectal, sendo que o peixe-zebra não possui substância negra e área tegmental ventral. No entanto, o tubérculo posterior possui populações de células dopaminérgicas com projeções que se estendem até o subpálio e medula espinhal (HORZMANN e FREEMAN, 2016).

As células 5-HT em peixe-zebra adulto estão localizadas no complexo pré-tectal, nos núcleos dos órgãos paraventriculares anterior, intermediário e posterior, na rafe dorsal, mediana e ventrolateral, na rafe inferior e na rafe caudal (HORZMANN e FREEMAN, 2016). Em peixe-zebra, vários dos genes que codificam proteínas relacionadas à 5-HT existem como parálogos, por exemplo, existem três genes da triptofano hidroxilase (tph), sendo eles tph1a, tph1b e tph2 e dois genes do SERT, SERTa e SERTb (LILLESAAR, 2011).

A sinalização purinérgica foi identificada em peixe-zebra (NORTON et al., 2000; KUCENAS et al., 2003, KUCENAS et al., 2009; RICO et al., 2003; APPELBAUM et al., 2007, NABINGER et al., 2020) e as atividades enzimáticas de NTPDases, ecto-5'-nucleotidase e ADA foram demonstradas em membranas cerebrais de peixe-zebra, juntamente com os padrões de expressão gênica dessas enzimas (RICO et al., 2003; SENGER et al., 2004; ROSEMBERG et al., 2007, ROSEMBERG et al., 2008, ROSEMBERG et al., 2010). Com relação aos receptores de adenosina do tipo P1, os receptores A₁, A_{2A} e A_{2B} já foram caracterizados, sendo que apenas o receptor A₃ não foi identificado neste organismo modelo (NABINGER et al., 2020).

O peixe-zebra é considerado um animal modelo para realização de estudos relacionados a doenças psiquiátricas, como ansiedade e depressão (NGUYEN et al., 2014; DEPASQUALE e LERI, 2018; SILVEIRA et al., 2018), pois nele podem ser observados sintomas comportamentais dos estados semelhantes ao depressivo, tais como: anedonia (comportamento de recompensa reduzido como a preferência de

local condicionado, hipofagia), perda ou excesso de apetite, retardo motor (atividade basal reduzida, cauda caída por hipolocomoção), fadiga/perda de energia (hipolocomoção), irritabilidade/raiva/inquietação (hiperatividade e agressividade), letargia (sinais de comportamento letárgico), retraimento social (déficits sociais, redução de cardumes), e déficits cognitivos (NGUYEN et al., 2014). Para mimetizar sintomas do TDM em peixe-zebra, podem-se utilizar métodos como o do estresse crônico imprevisível, isolamento social, modelos genéticos ou farmacológicos, como a indução por meio da exposição a reserpina (NGUYEN et al., 2014).

O peixe-zebra também se tornou um modelo estabelecido para analisar os efeitos do exercício no cérebro e no comportamento (LUCHIARI e CHACON, 2013; GILBERT et al., 2014; DEPASQUALE e LERI, 2018; SILVEIRA et al., 2018). Entre alguns dos efeitos benéficos do exercício físico, a redução da ansiedade e a melhora do aprendizado já foram descritos na literatura em peixe-zebra (LUCHIARI e CHACON, 2013; GILBERT et al., 2014; DEPASQUALE e LERI, 2018; SILVEIRA et al., 2018). Estudos que avaliam características comportamentais servem de base para essas descobertas, envolvendo a análise da atividade locomotora, agressividade, interação social, memória e aprendizado (GUO, 2004; BLANK et al., 2009).

2. HIPÓTESE

2.1. HIPÓTESE PRIMÁRIA

O exercício físico previne e a exposição crônica à fluoxetina revertem sintomas compatíveis com depressão em um modelo de depleção de monoaminas causado pela reserpina, sendo demonstrado pela análise do desempenho comportamental.

2.2. HIPÓTESES SECUNDÁRIAS

- Alteração na locomoção, interação social e memória de peixes tratados com reserpina;
- Alteração dos níveis de neurotransmissores de animais expostos à reserpina;
- Alteração das enzimas responsáveis pelo controle dos níveis de nucleotídeos e nucleosídeos em animais expostos à reserpina;
- Melhora da locomoção, interação social e memória de animais expostos a reserpina que foram submetidos ao exercício físico ou à fluoxetina.

3. JUSTIFICATIVA

O TDM é um transtorno psiquiátrico que acomete de forma crescente a população mundial, com sintomas que variam desde a apatia até a ideação de morte, podendo ter como resultado o suicídio (BRIGITTA et al., 2002; HASLER et al., 2004; DSM-5, 2013; JESULOLA et al., 2018). Nos últimos anos, foi relatado um aumento ainda mais expressivo no número de casos de TDM devido a pandemia da COVID-19 (BUENO-NOTIVOL et al., 2021). Portanto, torna-se cada vez maior a necessidade de explorar novas vias de tratamento e prevenção para o TDM.

Estudos demonstraram que o exercício físico tem efeito significativo na redução de sintomas de doenças psiquiátricas como ansiedade e depressão (MEAD et al., 2008; LIN e KUO, 2013; DEPASQUALE e LERI, 2018). No entanto, outros estudos demonstraram aumentar os níveis de ansiedade em roedores submetidos ao exercício (FUSS et al., 2010; LALANZA et al., 2015), havendo necessidade de um estudo que tenha maior controle sobre a intensidade, duração e o tipo de exercício físico utilizado. Devido a isso, o peixe-zebra torna-se um modelo apropriado para avaliar os efeitos do exercício físico em doenças psiquiátricas, visto que é um modelo animal que facilmente se controla estas variáveis (DEPASQUALE e LERI, 2018), uma vez que é inerente ao peixe-zebra o nado contra um fluxo de água, que pode ser ajustado e controlado pelo pesquisador. Além disso, esta pesquisa pretende corroborar com demais estudos que demonstram que o peixe-zebra é um modelo animal apropriado para o tratamento de patologias através do uso de exercício físico (LUCHIARI e CHACON, 2013; GILBERT et al., 2014; DEPASQUALE e LERI, 2018).

4. OBJETIVOS

4.1. OBJETIVO GERAL

Este estudo visa avaliar parâmetros comportamentais e neuroquímicos e influência do exercício físico em animais expostos à reserpina.

4.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar a locomoção, memória, interação social em animais expostos a reserpina;
- Avaliar os níveis de 5-HT, DA e DOPAC em animais expostos à reserpina;
- Avaliar as atividades das NTPDases, ecto-5'-nucleotidase e ADA em animais expostos à reserpina;
- Validar o modelo de TDM avaliando o efeito da fluoxetina sobre parâmetros locomotores de animais expostos a reserpina;
- Avaliar o efeito do exercício físico sobre parâmetros locomotores de animais expostos à reserpina;

5. MATERIAIS E MÉTODOS

5.1. LOCAL DE EXECUÇÃO

O estudo foi realizado na Escola de Ciências da Saúde e da Vida da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (PUCRS). Os experimentos foram realizados no Laboratório de Neuroquímica e Psicofarmacologia (sala 301, prédio 12D), no Centro de Modelos Biológicos Experimentais (CeMBE, prédio 14), e no Centro de Pesquisa em Toxicologia e Farmacologia (INTOX, sala 101, prédio 12D).

5.2. ANIMAIS

Neste estudo, foram utilizados animais machos adultos (6-8 meses) da variedade AB da espécie *Danio rerio*. Os animais são produzidos em biotério local a partir de cruzamentos de peixes adultos com mais de sete meses de vida e mantidos em nosso laboratório em sistema de aquários em série (Zebtec, Tecniplast, Itália).

Os aquários foram preenchidos com água filtrada por osmose reversa (enriquecida com sal – Instant Ocean), prevenindo o aparecimento de bactérias e fungos. Os animais foram mantidos em condições ideais de temperatura ($27 \pm 2^\circ\text{C}$), pH (7,0-7,5), condutividade (300-700 μS), dureza da água (80-300 mg/L), e níveis de amônia (< 0.02 mg/L), nitritos (< 1 mg/L), nitratos (< 50 mg/L) e cloro (0 mg/L). Os animais foram submetidos a um ciclo claro/escuro de 14/10 horas, respectivamente, e receberam uma dieta balanceada com ração flocada comercial três vezes ao dia e suplementação com artêmia salina uma vez ao dia (WESTERFIELD, 2000).

Nenhum procedimento experimental foi realizado no espaço destinado à manutenção dos peixes, a fim de evitar a produção de qualquer tipo de estresse comportamental. Devido ao fato deste projeto envolver a avaliação de mecanismos de sinalização neuroquímica, a eutanásia dos animais não pode ser realizada por overdose de anestésicos, uma vez que estes poderiam comprometer os parâmetros avaliados. Assim os animais foram crioetanasiados, utilizando imersão em gelo flocado com água com parâmetros físico-químicos controlados e temperatura $\leq 4^\circ\text{C}$. Esta forma de eutanásia já foi demonstrada como sendo efetiva, além de produzir menos estresse em peixe-zebra, e é aceita como método para eutanásia para esta espécie (WILSON et al., 2009).

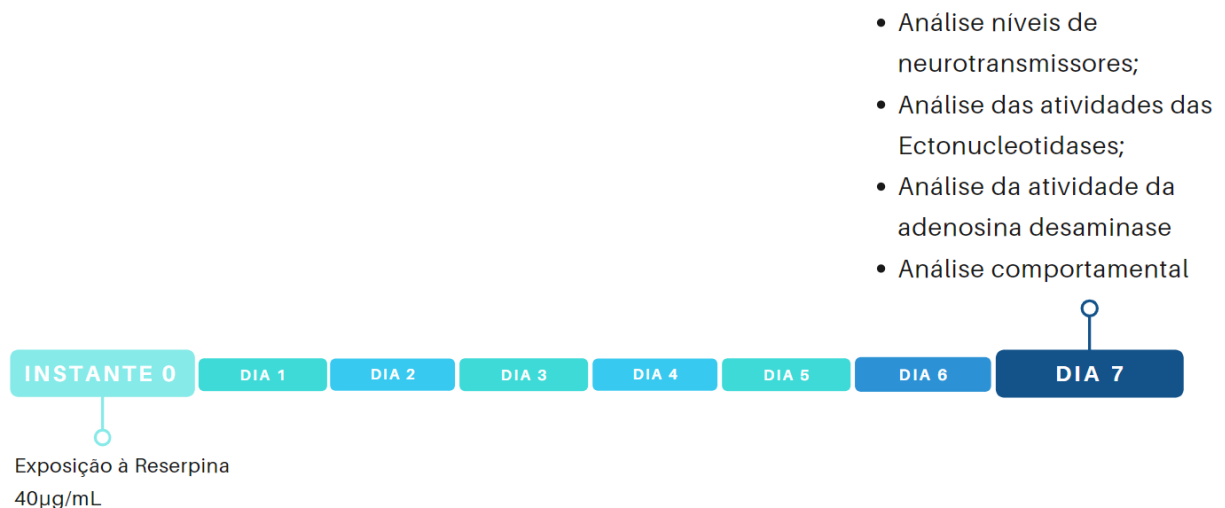
Os animais foram manipulados de acordo com procedimentos indicados pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) e a legislação brasileira (11.794/08) em relação ao uso de peixes em pesquisa, testes toxicológicos

e ensino e pelas diretrizes do Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (2013). Todos os protocolos foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (9922 -CEUA-PUCRS). Este estudo foi registrado no Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e Conhecimento Tradicional Associado – SISGEN (Protocolo nº A3B073D).

5.3. EXPOSIÇÃO À RESERPINA

Os animais foram expostos a reserpina na dose de 40 µg/mL por 20 minutos (KYZAR et al., 2013, ZHANG et al., 2018) dissolvida na água dos aquários. O grupo controle (CTRL) foi mantido sob as mesmas condições na ausência de reserpina. Após este período, foram realizadas análises neuroquímicas e comportamentais, conforme consta na Figura 2. Nas fases seguintes do estudo, grupos tratados com reserpina (RES) e controle foram expostos a duas diferentes condições: 1) tratados com fluoxetina (FLU); ou 2) submetidos preventivamente ao exercício físico (EXER), conforme detalhado abaixo e demonstrado na Figura 3 e Figura 4, respectivamente.

Figura 2: Linha do tempo da realização dos procedimentos experimentais do tratamento com reserpina.



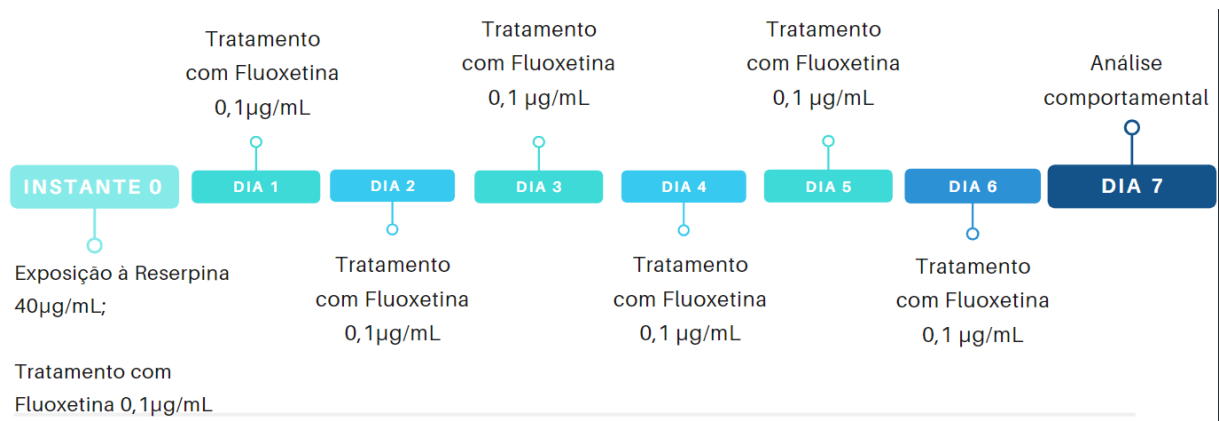
Fonte: A autora (2022).

5.4. TRATAMENTO COM FLUOXETINA

Para validação do modelo de depressão induzida por reserpina, quatro grupos de animais foram testados, sendo eles: 1) grupo controle (CTRL), animais expostos apenas a água do sistema; 2) grupo RES, animais expostos a reserpina; 3) grupo FLU, animais expostos cronicamente a fluoxetina; e 4) grupo FLU/RES, animais expostos

a fluoxetina após exposição a reserpina. A concentração de fluoxetina utilizada foi de 0,1 µg/mL, conforme já descrito na literatura (EGAN et al., 2009; WONG et al., 2013; MARCON et al., 2016; SONG et al., 2017). Os grupos FLU e FLU/RES foram expostos cronicamente, ao longo de 7 dias, à fluoxetina dissolvida no aquário moradia, sendo esta solução trocada diariamente. O grupo FLU/RES foi exposto a fluoxetina imediatamente após o tratamento com reserpina, conforme Figura 3. Já o grupo RES foi exposto à reserpina e mantido na água do sistema pelos 7 dias subsequentes para posterior análise. O grupo controle permaneceu apenas em água do sistema. Uma vez que a solução contendo fluoxetina foi trocada diariamente, os animais dos grupos RES e CTRL também tiveram suas águas de sistema trocadas, a fim de mimetizar as mesmas manipulações em todos os grupos analisados. Após os 7 dias de exposição, os animais foram submetidos às análises comportamentais.

Figura 3: Linha do tempo da realização dos procedimentos experimentais do tratamento com fluoxetina em animais expostos a reserpina.



Fonte: A autora (2022).

5.5. PROTOCOLO DE EXERCÍCIO FÍSICO

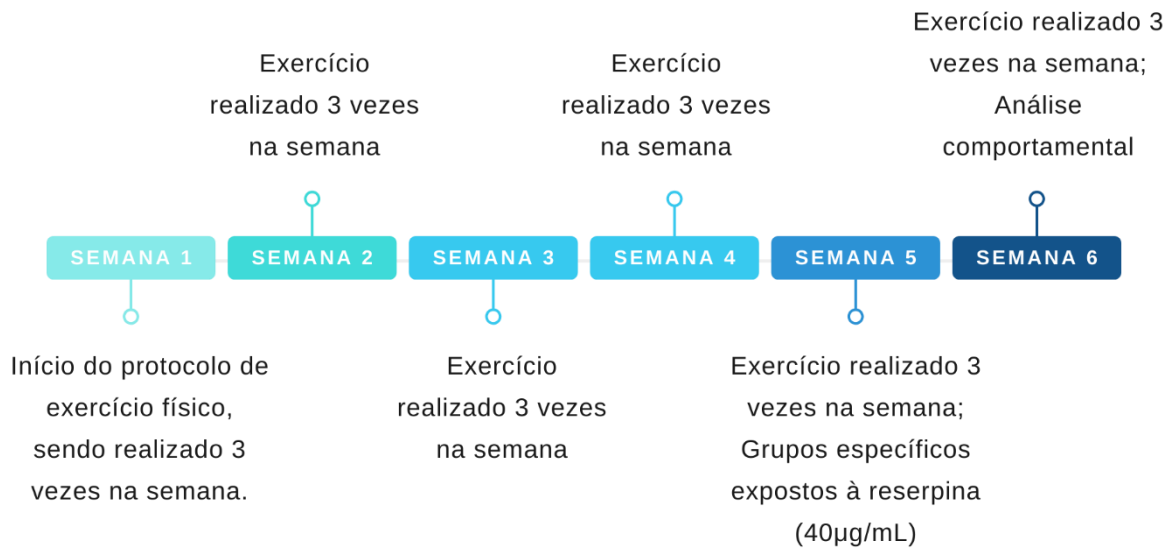
Os peixes foram submetidos ao treinamento aeróbico, com velocidade da água mínima de 0,2 m/s não ultrapassando 0,5 m/s, realizado com filtro d'água (Ocean tech, 12000 L/h, com controlador de fluxo). O parâmetro de velocidade foi medido todos os dias antes de cada experimento em três partes da vazão (proximal, medial e distal), através de um medidor de vazão construído pelo Laboratório de Mecânica (LabMec) e pelo Laboratório de Computação (LabCOM) do Centro de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico da PUCRS (IDEIA).

Para a realização do exercício físico, usamos um aparato específico, como pode ser visto na Figura 5 deste estudo. O aparelho é constituído por uma estrutura composta por dois tanques. O primeiro é um reservatório contendo um aquecedor e um filtro de vazão que controla e regula a velocidade da água. O segundo é o tanque de exercício, no qual os animais foram colocados para realizar a tarefa; este tanque possui uma barreira de padronização de fluxo, com a função de garantir que a velocidade do fluxo de água seja distribuída uniformemente. Além disso, o tanque possui uma barreira de proteção para evitar que os animais sejam movidos para dentro do tanque reservatório. Essa estrutura foi fixada em suporte de alumínio.

Assim como o aparato, o protocolo de exercício foi baseado no estudo de DEPASQUALE e LERI (2018), com modificações, sendo realizado da seguinte forma: duração total de 30 minutos por dia, 3 vezes na semana, durante 6 semanas, totalizando 18 dias de exercício.

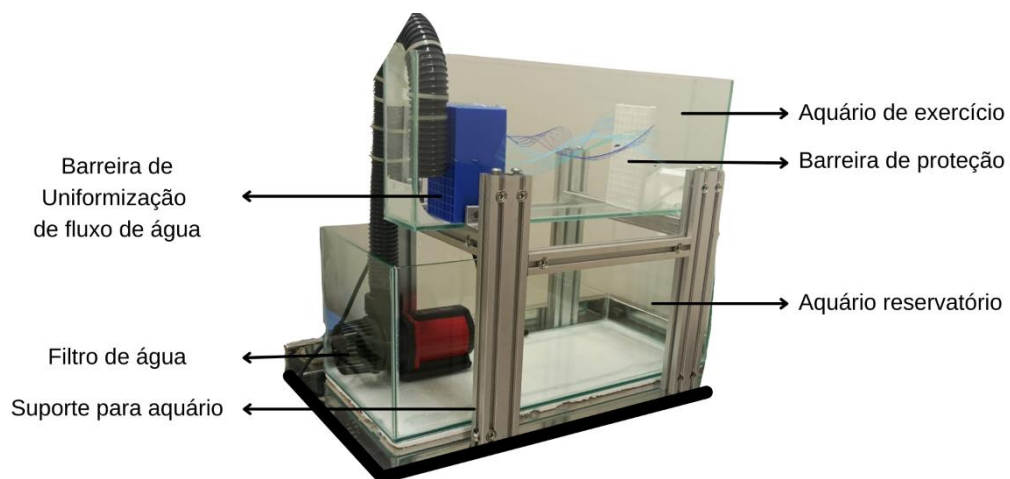
Para a análise do efeito do exercício físico em modelo de depressão induzida por reserpina, quatro grupos de animais foram testados, sendo eles: 1) grupo controle (CTRL), animais expostos apenas a água do sistema; 2) grupo RES, animais expostos a reserpina; 3) grupo EXER, animais submetidos ao exercício físico; e 4) grupo EXER/RES, animais expostos ao exercício físico e a reserpina. No grupo EXER, os animais foram alocados em grupos de 5 animais no aparato de exercício e foram submetidos ao protocolo de exercício físico já descrito, por 6 semanas; o grupo EXER/RES foi submetido a exercício físico sob as mesmas condições do grupo EXER, no entanto foi exposto agudamente à reserpina 7 dias antes dos testes comportamentais, na concentração de 40 µg/mL por 20 minutos (Figura 4). Após este período de 6 semanas, foram realizados os testes comportamentais.

Figura 4: Linha do tempo da realização dos procedimentos experimentais dos animais submetidos ao exercício físico e expostos ao tratamento com reserpina.



Fonte: A autora (2022).

Figura 5: Fotografia do aparato de exercício físico confeccionado pelo IDEIA da PUCRS, utilizado no presente estudo.



Fonte: A autora (2022).

5.6. ANÁLISES COMPORTAMENTAIS

5.6.1. Locomoção

Neste teste, o comportamento locomotor de cada animal foi mensurado ($n = 20$). Os animais foram colocados individualmente em tanques experimentais (30 cm de comprimento x 15 cm de altura x 10 cm de largura) e após 60 segundos de habituação, a locomoção e padrões exploratórios foram registrados em vídeo por 5 minutos para posterior análise. Os parâmetros comportamentais analisados foram: distância percorrida (cm), velocidade média (cm/s, calculada pela razão entre a distância percorrida e o tempo em movimento), tempo imóvel (s) e tempo gasto na

zona inferior do aquário (s). Os vídeos foram analisados com o software EthoVision XT (versão 11.5, Noldus), como descrito na literatura (ZANANDREA et al., 2018). O experimento foi conduzido em uma sala com temperatura controlada ($27^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$) entre 9h30 e 12h. Este estudo teve por objetivo analisar manifestações comportamentais de depressão, ansiedade e estresse. Atividade exploratória diminuída, aumento da permanência no fundo do aquário e ocorrência de movimentos erráticos com maior frequência são indicadores de ansiedade ou estresse, induzidos por diferentes fatores (LEVIN et al., 2007; SAVERINO e GERLAI, 2008; CACHAT et al., 2011; SIEBEL e BONAN, 2015).

5.6.2. Interação social

Na natureza, os peixes-zebra se agregam e formam grupos sociais, chamados de cardumes que é uma característica fenotípica robusta do peixe-zebra (FACCIOL e GERLAI, 2020). Um método eficaz para avaliar se esse comportamento está alterado é através da interação social onde um único indivíduo (o animal a ser analisado) é alocado em um tanque e em um aquário ao lado apresentar coespecíficos ou estímulos semelhantes aos coespecíficos desse sujeito (SAVERINO E GERLAI, 2008; QIN et al., 2014). A interação social foi avaliada entre 9h30 e 12h ($n = 20$). Para analisar este parâmetro, foi utilizado o protocolo descrito na literatura (ZANANDREA et al., 2018)(Figura 6). O aparato consiste em três aquários (30 cm comprimento x 15 cm altura x 10 cm largura) dispostos lado a lado. O aquário central é considerado o aquário experimental, onde o peixe foi colocado sozinho para análise. Em uma das extremidades temos o aquário estímulo, que contou com 15 peixes de tamanho semelhante ao peixe teste. Na outra extremidade, temos um aquário vazio, considerado como não-estímulo. Após o período de habituação (1 minuto), as barreiras visuais entre os aquários são retiradas e é realizado registro em vídeo durante 5 minutos, para posterior análise com o software EthoVision XT (versão 11.5, Noldus), conforme descrito por NABINGER e colaboradores (2018). O tempo que o peixe experimental permanece próximo ao aquário estímulo durante o período de teste foi quantificado.

Figura 6: Protocolo de interação social



Fonte: A autora (2022), criado com BioRender.

5.6.3. Esquiva inibitória

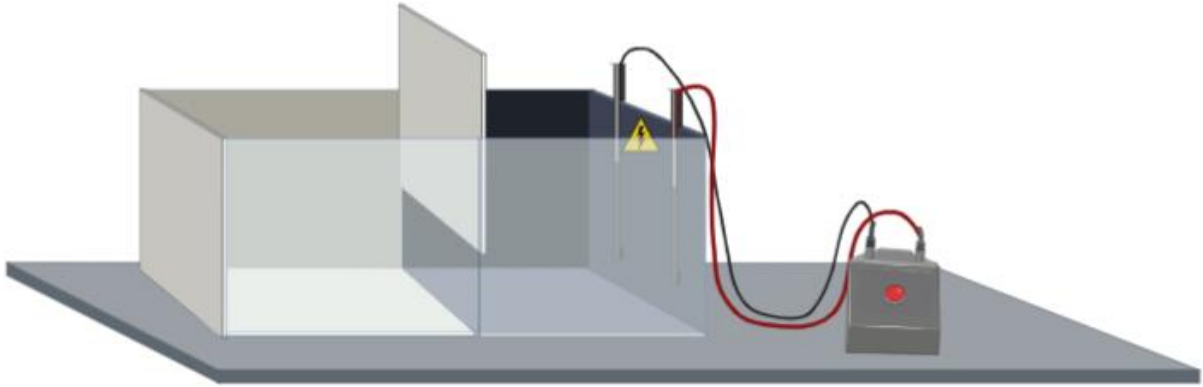
Para avaliar se a reserpina poderia prejudicar a memória em animais adultos, realizamos um teste de esquiva inibitória ($n = 12$) (BLANK et al., 2009). O aparato de esquiva inibitória para peixe-zebra, conforme demonstrado na Figura 7, consiste em um pequeno tanque dividido ao meio em dois compartimentos, claro (revestimento por adesivos da cor branca) e escuro (revestimento com adesivos da cor preta), por meio de uma barreira física e visual do tipo guilhotina. O nível da água no aparato é mantido em 3 cm para permitir que os peixes explorem o ambiente. O compartimento escuro contém dois eletrodos ligados a uma fonte de 8 V, que geram um choque de corrente alternada de $3 \pm 0,2$ V (BLANK et al., 2009; SIEBEL e BONAN, 2015).

Este protocolo consiste em sessões de treino e teste, onde os animais são submetidos individualmente. Nas duas sessões, o animal é colocado no compartimento claro enquanto a barreira divisória está fechada. Após 1 minuto de familiarização ao ambiente, a divisória é elevada em 1 centímetro, permitindo que o animal nade até o compartimento escuro (pelo qual tem preferência). Na sessão de treino, assim que o animal passa completamente para o lado escuro do aparato, ele recebe um choque durante 5 segundos. Após este treino, o animal é removido do aparato e colocado em seu aquário de moradia. A sessão de teste ocorre 24 horas após o treino, quando são realizados os mesmos procedimentos, porém sem a indução de choque. O animal é novamente colocado no compartimento claro onde permanece em um período de familiarização de 1 minuto. Então, a barreira divisória é aberta e o tempo em que o animal demora a passar para o lado escuro é contabilizado.

O tempo que o animal demora a passar do lado claro, onde foi colocado, para o lado escuro, após a abertura da barreira, é cronometrado nas sessões de treino e teste. A latência para passagem do animal para o lado escuro na sessão de teste é

utilizada como índice de retenção de memória (BLANK et al., 2009; SIEBEL e BONAN, 2015).

Figura 7: Aparato de esquiva inibitória.



Fonte: A autora (2022), criado com BioRender.

5.6.4. Análise dos níveis de neurotransmissores serotonina e dopamina e do metabólito DOPAC

Para a análise dos níveis de neurotransmissores ($n = 6$, *pool* 6 encéfalos), foi utilizada a cromatografia líquida com espectrômetro de massa (LC-MS). A amostra foi preparada conforme descrito na literatura (ALTENHOFEN et al., 2017; ZANANDREA et al., 2018). Os encéfalos foram separados e homogeneizados em 300 μL de ácido fórmico 0,1 M (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) e centrifugados a 20.000 x g por 20 min a 4°C. O sobrenadante foi transferido para um frasco de vidro de 250 μL e injetado no UHPLC modelo 1290 *Infinity*, acoplado a um espectrômetro de massa Agilent, modelo 6460 TQQQ (todos os componentes do HPLC e o software *MassHunter* são provenientes da Agilent Technologies®, Santa Clara, CA, EUA). As separações cromatográficas foram realizadas em uma coluna Zorbax Eclipse Plus C18 RRHD, 5 x 2,1 mm, 1,8 micra (Agilent, Paolo Alto, EUA), utilizando uma fase móvel composta por (A) ácido fórmico a 0,1% e (B) acetonitrila com 0,1% ácido fórmico, no modo gradiente. O espectrômetro foi operado no modo MRM e os analitos foram quantificados com as seguintes transições (m/z): 5-HT (177 > 160), DA (154 > 119.1) e DOPAC (169 > 123 e 169 > 77). As quantificações foram realizadas por padronização externa e as curvas de calibração foram obtidas com as seguintes concentrações: DA: 1,0, 5,0, 10,0, 15,0 e 20,0 ng/mL; 5-HT: 1,0, 5,0, 10,0, 15,0 e 20,0

ng/mL. Os padrões foram preparados individualmente na concentração de 0,5 mg/mL. Antes das análises, eles foram misturados e diluídos com a fase móvel A e adicionados por β -mercaptoetanol em uma concentração equivalente das amostras. Os resultados foram corrigidos pela concentração de proteínas das amostras.

5.7. ANÁLISE DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA

5.7.1 Preparação das Membranas Encefálicas de Peixe-zebra

Uma amostra contendo seis encéfalos de peixe-zebra foi homogeneizada de acordo com o protocolo de cada ensaio enzimático ($n = 6$, *pool* 6 encéfalos). Para o ensaio das ectonucleotidases, o *pool* de encéfalos de peixe-zebra será homogeneizado em 60 volumes (v/w) de um tampão Tris-Citrato (Tris 50 mM, EDTA 2 mM e EGTA 2 mM, pH: 7,4), já para o ensaio da adenosina desaminase serão utilizados 20 volumes (v/w) de um tampão PBS (EDTA 2 mM e EGTA 2 mM, pH: 7,4) (BARNES et al, 1993). O homogeneizado foi centrifugado a 1000 x g por minuto a 4° C. Após descarte do *pellet*, o sobrenadante foi centrifugado a 40.000 x g por 25 minutos à 4 °C, resultando no sobrenadante e *pellet*, correspondentes às frações solúveis e de membrana, respectivamente. Para os experimentos da atividade enzimática da fração solúvel da ADA, o sobrenadante foi coletado nesta fase. O *pellet* será utilizado para os ensaios das ectonucleotidases e fração de membrana da ADA e será ressuspenso em tampão Tris-citrato e PBS, respectivamente. Após este procedimento, ele foi exposto ao nitrogênio líquido por 10 segundos para lisar as membranas. O material foi centrifugado a 40.000 x g por 20 minutos à 4°C. O precipitado final foi ressuspenso em tampão Tris-citrato para ectonucleotidases e PBS para ADA de membrana, e então utilizado nos ensaios enzimáticos. Todos os testes enzimáticos foram realizados em triplicata. A proteína foi medida pelo método do Comassie blue (BRADFORD, 1976), usando albumina bovina sérica como padrão.

5.7.2. Atividades da Ectonucleotidases

Após a preparação da membrana, é realizado o ensaio enzimático. A atividade das NTPDases e ecto-5'-nucleotidase foi determinada de acordo com RICO e colaboradores (2003) e SENGGER e colaboradores (2004). Membranas encefálicas de peixes-zebra (3-5 μ g de proteína) foram adicionadas à reação que contém 50 mM Tris-HCl (pH 8) e 5 mM CaCl_2 (para a atividade da NTPDase) ou 50 mM Tris-HCl (pH 7,2) e 5 mM MgCl_2 (para a atividade da ecto-5'-nucleotidase) em um volume final de 200

μL . As amostras foram pré-incubadas por 10 minutos em 37°C . A reação é iniciada com a adição do substrato (ATP, ADP ou AMP) durante 30 minutos. A reação é interrompida pela adição de $200 \mu\text{L}$ de ácido tricloroacético (TCA) 10%. Após o término da reação, uma amostra de enzima é adicionada nos controles para corrigir a hidrólise não enzimática do substrato. As amostras são mantidas no gelo por 10 minutos e após é adicionado 1 mL de um reagente usado para a determinação do fosfato inorgânico (Pi), composto de molibdato de amônio, álcool polivinílico, verde de Malaquita e água (1:1:2:2), como descrito por CHAN *et al.* (1986). As amostras foram incubadas em temperatura ambiente durante 20 minutos e a leitura do ensaio colorimétrico foi realizada a 630 nm . O tempo da incubação e as concentrações das proteínas foram escolhidos a fim de assegurar a linearidade da reação. A atividade específica é expressa por nmol de Pi liberado por minuto por miligrama de proteína.

5.7.3. Adenosina Desaminase

A atividade da adenosina desaminase (ADA) em peixe-zebra é determinada pela quantificação de NH_3 liberada a partir da reação de Berthelot como previamente relatado (WEISMAN *et al.*, 1988). As frações encefálicas (5-10 μg de proteína) foram adicionadas ao meio de reação, contendo tampão acetato (pH 5,0) em um volume final de $200 \mu\text{L}$. As amostras foram pré-incubadas por 10 minutos à 37°C e a reação é iniciada pela adição de substrato (adenosina) a uma concentração final de 1,5 mM. Após a incubação por 120 minutos, a reação é interrompida pela adição de $500 \mu\text{L}$ do reagente fenol-nitroprussiato (50,4 g de fenol e 0,4 mg de nitroprussiato de sódio/mL). Controles com a adição da preparação enzimática após mistura com o reagente fenol-nitroprussiato foram utilizadas para corrigir a hidrólise não-enzimática dos substratos. As amostras foram misturadas com $500 \mu\text{L}$ de reagente hipoclorito alcalino (hipoclorito de sódio 0,125% em NaOH 0,6 M) e em seguida incubadas à 37°C por 15 minutos. A leitura do ensaio colorimétrico foi realizada utilizando o comprimento de onda de 635 nm . Tempos de incubação e concentrações de proteína foram escolhidos com o objetivo de assegurar a linearidade das reações. A atividade da ADA foi expressa como $\text{nmol NH}_3 \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$ de proteína (ROSEMBERG *et al.*, 2008).

5.8. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados comportamentais foram expressos em média \pm erro padrão da média

(E.P.M), média \pm desvio padrão (D.P.) ou mediana \pm intervalo interquartil. *Outliers* foram removidos usando a função “Identificar outliers” do software Graphpad Prism 8.4.2, utilizando o método ROUT com Q = 1%. A distribuição dos dados foi avaliada para normalidade pelo teste de Shapiro-Wilk e Kolmogorov-Smirnov. A depender da distribuição e número de grupos, foi utilizado um dos seguintes testes estatísticos: Mann Whitney, teste t de Student, ANOVA de uma via ou o teste de Kruskal-Wallis. As análises post-hoc foram feitas pelos testes Tukey ou Dunn, dependendo da necessidade de comparar os grupos de tratamento com o controle ou entre zonas.

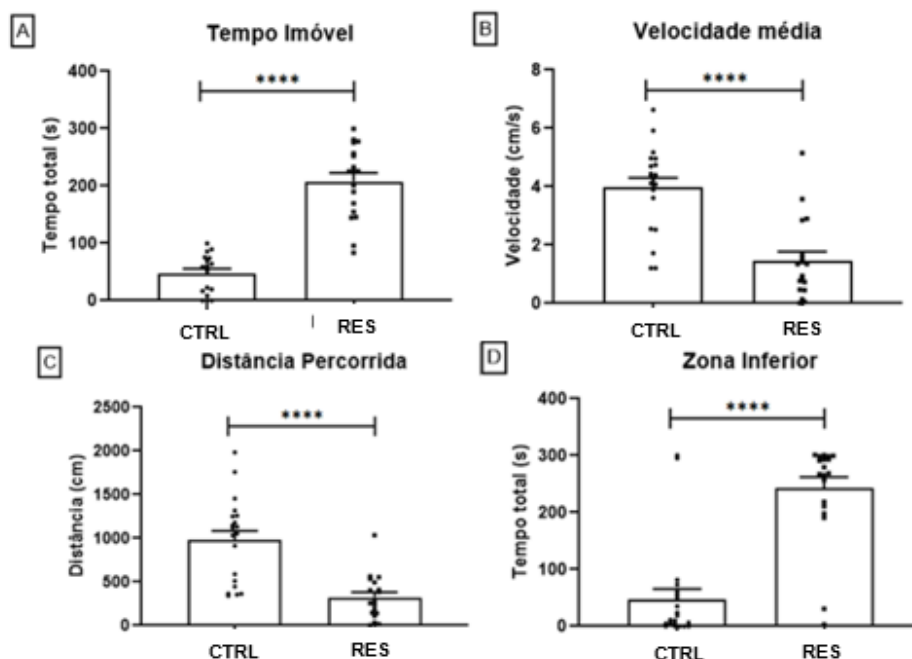
6. RESULTADOS

6.1. ESTABELECIMENTO DO MODELO DE TDM

6.1.1. Análise comportamental e de memória de animais expostos à reserpina

O padrão comportamental dos animais foi analisado 7 dias após uma única exposição à reserpina (40 µg/mL) por 20 minutos. Observamos alterações locomotoras após a exposição à reserpina (Figura 8) em todos os parâmetros analisados. Em comparação ao grupo controle, os animais expostos à reserpina apresentaram aumento no parâmetro de tempo imóvel ($p < 0,0001$, Figura 8A) e tempo gasto na zona inferior do aquário ($p < 0,0001$, Figura 8D). Além disso, esses animais apresentam redução nos parâmetros de velocidade ($p < 0,0001$, Figura 8B) e distância percorrida ($p < 0,0001$, Figura 8C). Não houve diferença no comportamento de interação social, uma vez que não houve mudança significativa no tempo de permanência na zona de estímulo ($p = 0,6830$, Figura 9) quando os animais expostos a reserpina foram comparados ao grupo controle. Em relação à memória analisada através da esQUIVA inibitória, houve diferença na latência dos dias de treino entre os animais expostos à reserpina em comparação com o grupo controle ($p = 0,0257$). Entretanto, os dados demonstram que não há prejuízo da memória no grupo tratado com reserpina (Figura 10).

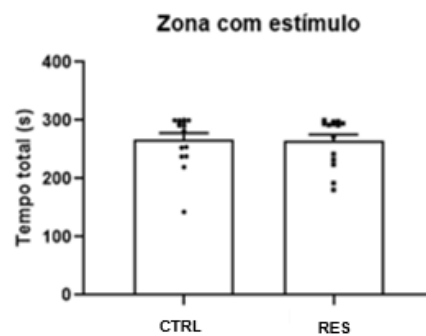
Figura 8: Parâmetros exploratórios e locomotores de peixes-zebra dos grupos controle e expostos à reserpina após 7 dias da exposição. A – Tempo imóvel (s); B – Velocidade média (cm/s); C – Distância percorrida (cm); D – Tempo na zona inferior (s); $n = 18 - 20$. Os dados estão expressos em média \pm



E.P.M. Os dados do tempo imóvel e distância foram analisados pelo Teste t de Student e os dados da velocidade média e tempo na zona inferior foram analisados pelo teste Mann Whitney. $p \leq 0.0001$ (****) quando comparado com o grupo controle.

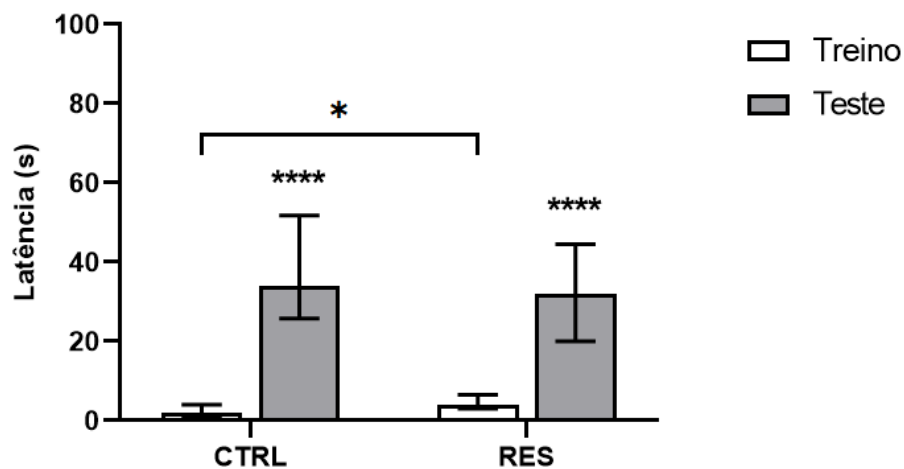
Fonte: A autora (2022).

Figura 9: Parâmetros de interação social de peixes-zebra dos grupos controle e expostos à reserpina após 7 dias da exposição. O tempo total na zona estímulo (s) foi quantificado; $n = 18 - 20$. Os dados estão expressos em média \pm E.P.M. Foram avaliados pelo teste Mann Whitney, sendo considerada diferença estatística quando $p \leq 0.05$.



Fonte: A autora (2022).

Figura 10: Parâmetros de memória de peixes-zebra avaliados através da esQUIVA inibitória nos grupos controle e expostos à reserpina após 7 dias da exposição; $n = 12 - 13$. Os dados estão expressos em mediana \pm intervalo interquartil e foram analisados individualmente para cada grupo; $p \leq 0.0001$ (****) indicam as diferenças entre as sessões de treino e teste para cada grupo usando pares combinados U de Mann-Whitney; $p \leq 0,05$ (*) indica diferença na sessão de treino entre os grupos, avaliados pelo teste t de Student.



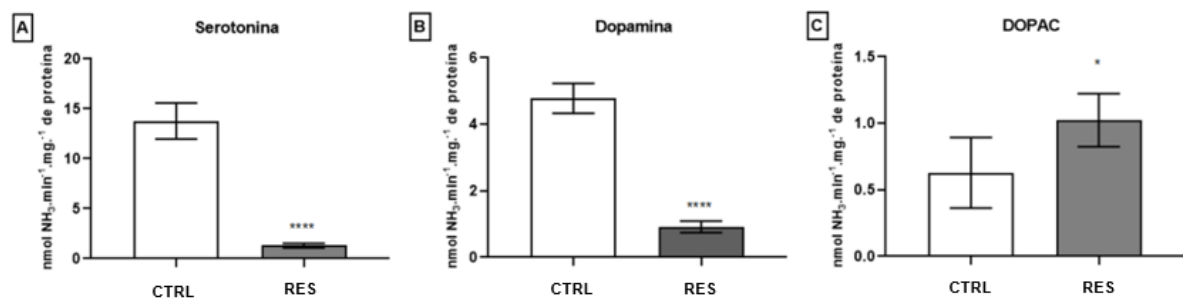
Fonte: A autora (2022).

6.1.2 Análise neuroquímica de animais expostos à reserpina

6.1.2.1. A reserpina altera os níveis de serotonina, dopamina e DOPAC

As análises neuroquímicas dos animais expostos à reserpina (40 $\mu\text{g/mL}$) foram realizadas 7 dias após única exposição com duração de 20 minutos. Os níveis de monoaminas foram quantificados (Figura 11), observando uma diminuição significativa nos níveis de 5-HT ($p < 0.0001$, Figura 11A) e DA ($p < 0.0001$, Figura 11B), nos encéfalos de animais expostos à reserpina quando comparado com o grupo CTRL. Os resultados também demonstraram um aumento nos níveis do metabólito DOPAC ($p = 0.0285$), conforme observado na Figura 11C.

Figura 11: Análise dos níveis de serotonina, dopamina e DOPAC em encéfalos de peixes-zebra expostos à reserpina, comparados com o grupo controle; $n = 4 - 6$. Os dados foram expressos em média \pm D.P. Os dados foram analisados pelo teste t de Student. $p \leq 0.05$ (*) e $p \leq 0.0001$ (****).

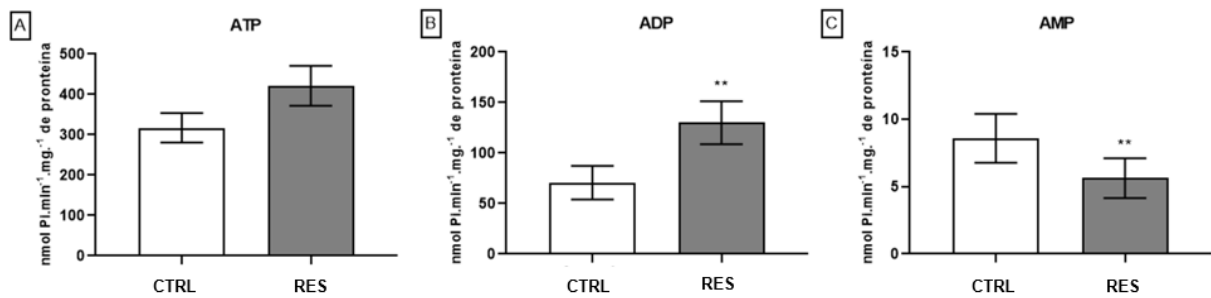


Fonte: A autora (2022)

6.1.2.2. Reserpina altera a hidrólise de ADP e AMP, sem alterar a hidrólise de ATP

As atividades enzimáticas das ectonucleotidases foram analisadas 7 dias após exposição aguda à reserpina (40 $\mu\text{g/mL}$). Os resultados encontram-se na Figura 12, onde observamos que os animais tratados com reserpina quando comparados ao grupo controle tiveram alteração significativa na atividade das NTPDases com o substrato ADP, aumentando a hidrólise deste nucleotídeo em aproximadamente 84% ($p = 0.0012$, Figura 12B). Os resultados também demonstraram uma diminuição sobre a atividade da ecto-5'-nucleotidase, reduzindo a hidrólise do AMP em aproximadamente 34% ($p = 0.0226$, Figura 12C). No entanto, não houve mudanças na hidrólise de ATP ($p = 0.1282$, Figura 12A).

Figura 12: Análise da atividade enzimática das ectonucleotidases de encéfalos de peixes-zebra expostos à reserpina comparados com o grupo controle; $n = 4 - 6$. Os dados foram expressos em média \pm D.P. Os dados foram analisados pelo teste t de Student. $p \leq 0.01$ (**).

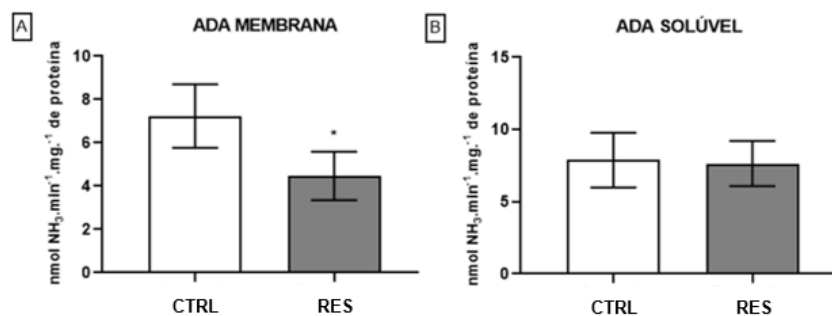


Fonte: A autora, (2022).

6.1.2.3. Reserpina altera a atividade da ADA em membranas cerebrais

Além da análise da atividade enzimática das ectonucleotidases, realizamos a análise da ADA (Figura 13) que é responsável pela desaminação da ADO em inosina, 7 dias após a exposição à reserpina. Comparado com o grupo controle, observamos que houve diminuição de aproximadamente 38% na atividade da ADA nas membranas cerebrais ($p = 0.0146$, Figura 13A), não alterando a atividade da ADA solúvel ($p = 0.8135$, Figura 13B).

Figura 13: Análise da atividade enzimática da ADA em fração de membrana e fração solúvel de encéfalos de peixes-zebra expostos à reserpina comparado com o grupo controle; $n = 4 - 6$. Os dados foram expressos em média \pm D.P. e analisados pelo teste t de Student. $p \leq 0.05$ (*).



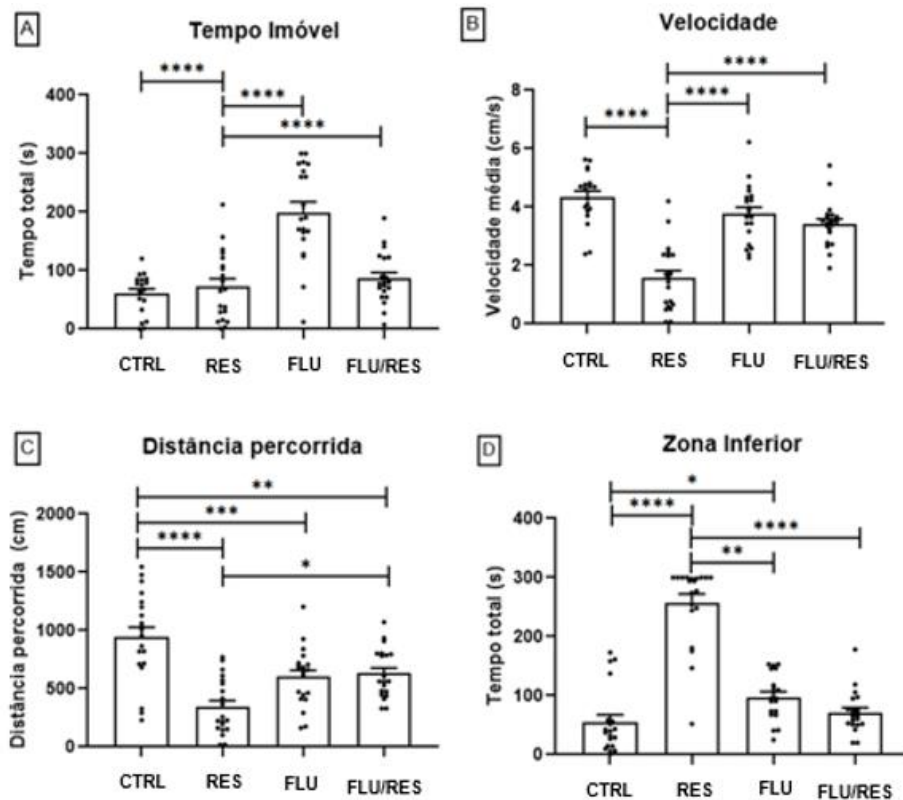
Fonte: A autora (2022).

6.2. VALIDAÇÃO DO MODELO TDM - ANÁLISE COMPORTAMENTAL DE ANIMAIS EXPOSTOS À RESERPINA E TRATADOS COM FLUOXETINA

Foram observados os efeitos da fluoxetina, fármaco amplamente utilizada no tratamento de doenças psiquiátricas, como o TDM, em animais expostos à reserpina (40 $\mu\text{g/mL}$). Os animais foram tratados com fluoxetina (0,1 $\mu\text{g/mL}$) cronicamente por 7 dias. Como os achados mostraram alterações apenas nos parâmetros locomotores, realizamos apenas essa tarefa após a exposição à fluoxetina ($n = 18 - 20$). Os

resultados demonstram uma reversão dos efeitos comportamentais causados pela reserpina, conforme mostrado na Figura 14. Em relação ao tempo imóvel, nossos resultados demonstram que a fluoxetina reverte a alteração comportamental causada pela reserpina ($p < 0,0001$, Figura 14A). Os efeitos na velocidade média também foram revertidos no grupo FLU/RES ($p < 0,0001$, Figura 14B), mostrando uma velocidade média menor no grupo RES quando comparado aos demais grupos ($p < 0,0001$). Na distância percorrida, também observamos diferença entre os grupos CTRL e FLU/RES ($p = 0,0222$, Figura 14C) e a redução causada pela reserpina foi revertida, como observado no grupo FLU/RES ($p = 0,0094$). Além disso, quando comparado ao grupo RES, vimos que houve diferença estatística entre os grupos FLU ($p = 0,0253$) e CTRL ($p < 0,0001$). Em relação à permanência no fundo do tanque (Figura 14 D), nossos resultados mostram maior permanência do grupo RES nesta zona quando comparado ao grupo CTRL ($p < 0,001$), grupo FLU ($p = 0,0011$) e grupo FLU/RES ($p < 0,0001$). Além disso, também observamos maior permanência do grupo FLU em relação ao grupo CTRL nessa zona ($p = 0,0477$).

Figura 14: Parâmetros exploratórios e locomotores de peixes-zebra dos grupos controle, tratados com fluoxetina e/ou expostos à reserpina, após 7 dias da exposição. A – Tempo imóvel (s); B – Velocidade média (cm/s); C – Distância percorrida (cm); D – Tempo na zona inferior (s). Os dados estão expressos em média \pm E.P.M. Os dados foram analisados Kruskal-Wallis, seguido de teste post hoc Dunn. $p \leq 0.05$ (*), $p \leq 0.01$ (**), $p \leq 0.001$ (***) e $p \leq 0.0001$ (****).



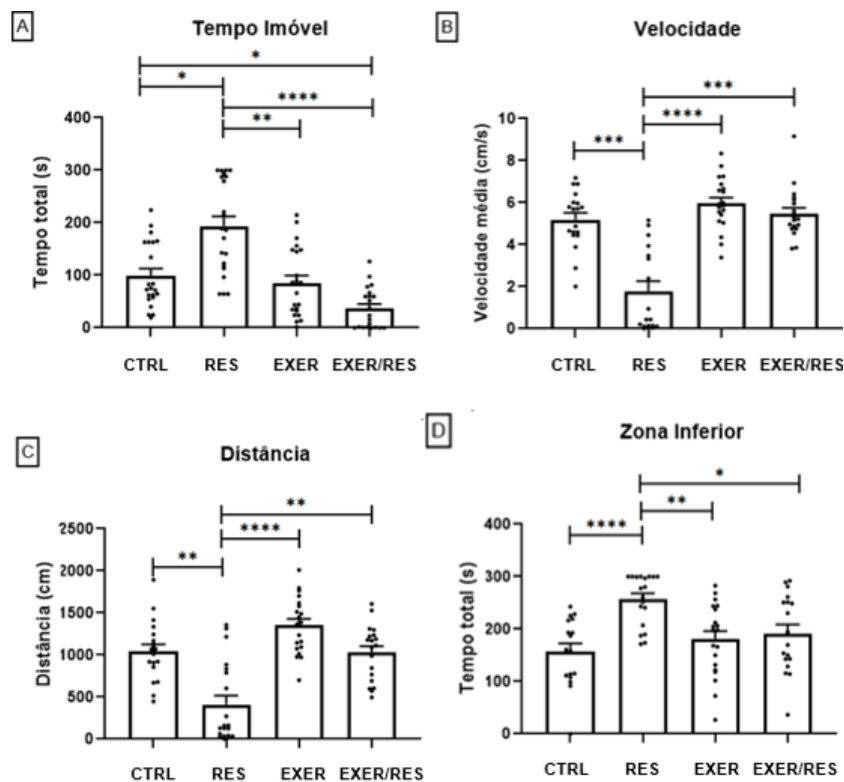
Fonte: A autora (2022).

6.3. EFEITO COMPORTAMENTAL DO EXERCÍCIO FÍSICO EM MODELO DE TDM UTILIZANDO RESERPINA

Os animais foram submetidos ao exercício físico por 18 dias ao longo de 06 semanas. Na última semana, os animais foram expostos agudamente à reserpina (40 µg/mL) e, 7 dias após a exposição, foi realizada a análise comportamental da locomoção (n = 18 – 22), uma vez que apenas esta tarefa se mostrou alterada após a exposição à reserpina. Observamos que o exercício físico previne o aparecimento de sintomas compatíveis com estresse, ansiedade e depressão em peixes-zebra que foram expostos à reserpina quando comparados ao grupo que foi tratado apenas com reserpina (Figura 15). Mais uma vez, observamos diferença significativa entre os grupos RES e CTRL em todos os parâmetros analisados. Em relação ao tempo imóvel (Figura 15A), observamos que o exercício físico previne esse efeito causado pela reserpina ($p < 0,0001$), além de demonstrar uma diferença significativa entre os grupos RES - EXER e CTRL - EXER/RES (respectivamente: $p = 0,0025$, $p = 0,0113$). Em relação aos parâmetros velocidade média e distância percorrida (Figura 15B e Figura 15C), vimos que o exercício físico previne a redução de ambos os parâmetros,

causada pela reserpina ($p = 0,0002$, $p = 0,0081$, respectivamente), além de demonstrar diferença entre o grupo RES quando comparado com o grupo EXER ($p < 0,0001$, em ambos os parâmetros analisados). No último parâmetro analisado no teste de locomoção, no tempo na zona inferior (Figura 15D), nossos resultados mostram que os animais tratados com reserpina permanecem mais tempo nesta zona quando comparados aos grupos CTRL ($p < 0,0001$), grupo EXER ($p = 0,0049$) e do grupo EXER/RES ($p = 0,0238$), demonstrando que o exercício físico previne os efeitos comportamentais causados pela reserpina.

Figura 15: Parâmetros exploratórios e locomotores de peixes-zebra dos grupos controle, submetidos ao exercício físico e/ou expostos à reserpina. A – Tempo imóvel (s); B – Velocidade média (cm/s); C – Distância percorrida (cm); D Tempo na zona inferior (s); $n = 18 - 22$. Os dados estão expressos em média \pm E.P.M. Os dados foram analisados Kruskal-Wallis, seguido de teste post hoc Dunn. $p \leq 0.05$ (*), $p \leq 0.01$ (**), $p \leq 0.001$ (***) e $p \leq 0.0001$ (****), quando comparado com o grupo controle.



Fonte: A autora (2022)

7. DISCUSSÃO

O TDM é uma doença psiquiátrica que possui uma série de sintomas específicos debilitantes. Em comparação com a população geral, pessoas com depressão têm uma expectativa de vida reduzida, pior qualidade de vida e aptidão cardiorrespiratória, e risco aumentado de diabetes tipo 2 (BUENO-ANTEQUERA et al., 2020). Além disso, essa patologia teve um crescimento expressivo na última década, sendo este crescimento ainda mais acentuado nos últimos dois anos, podendo estar relacionado com a pandemia da COVID-19 (ETTMAN et al., 2020; VARMA et al., 2020; DALY et al., 2022). Assim, trata-se de uma condição clínica que necessita cada vez mais de estudos que visem não só o tratamento, mas também a prevenção.

Uma forma segura e confiável para explorar e/ou consolidar métodos de prevenção e tratamento do TDM é através da experimentação animal. Neste estudo, utilizamos o peixe-zebra como organismo modelo. Para isso, um dos principais focos deste estudo foi estabelecer o modelo de depressão através da administração do fármaco reserpina em animais adultos, visto que possui rápida resposta quando comparado a outras metodologias para indução de sintomas compatíveis com depressão em peixe-zebra, seguindo protocolo já estabelecido (KYZAR et al., 2013). Na sequência, usamos fluoxetina, um antidepressivo, para validar o modelo de depressão induzido pela reserpina. Além disso, exploramos também o envolvimento da reserpina na atividade enzimática das ectonucleotidases e da adenosina desaminase, uma vez que o sistema purinérgico pode ser uma via farmacológica em potencial no tratamento do TDM (DINIZ et al., 2017; BARTOLI et al., 2020). Os efeitos do exercício físico como um potencial mecanismo preventivo contra os sintomas característicos de depressão foram avaliados em peixe-zebra, uma vez que o exercício físico pode causar alterações positivas nos níveis de neurotransmissores envolvidos no TDM (BASSO & SUZUKI et al., 2017).

Inicialmente, utilizamos o protocolo de KYZAR e colaboradores (2013), para a indução de um modelo de depressão em peixes-zebra, onde 7 dias após a exposição à reserpina, avaliamos o comportamento e memória destes animais. Como resultado, vimos que não houve alteração na interação social. Em relação a memória aversiva, observamos diferença na latência da passagem do compartimento claro para o escuro no dia de treino entre os grupos CTRL e EXER, o que pode ser relacionado com os

resultados observados acerca da atividade locomotora e do comportamento exploratório no teste de locomoção, apesar desta diferença, não foi demonstrada alteração na memória dos animais expostos a reserpina. SAMAD e colaboradores (2021) obtiveram resultado divergente ao nosso em relação a memória, pois relataram em seu estudo que a reserpina em roedores provoca déficit de memória. Este resultado pode ser devido a diferença na metodologia utilizada, visto que neste estudo os animais foram expostos de forma crônica a reserpina durante 28 dias, e não com apenas uma exposição, como realizamos no nosso estudo. Nossos resultados mostraram que houve alteração na locomoção destes animais quando comparados com o grupo controle, reduzindo a velocidade média, distância percorrida, além de um aumento do tempo imóvel e no tempo gasto na zona inferior. Esta atividade locomotora significativamente diminuída, juntamente com comportamento exploratório hipoativo, provou que este fármaco é capaz de mimetizar sintomas do tipo depressivo em peixes-zebra. Nossos resultados na análise comportamental vão ao encontro de outros estudos que também observaram alterações na locomoção dos animais que foram expostos à reserpina, em relação ao maior tempo imóvel destes animais (KYZAR et al., 2013; ZHANG et al., 2018; TANG et al., 2019), alteração na distância total percorrida e tempo na zona superior (TANG et al., 2019), e alteração na velocidade destes animais (ZHANG et al., 2018).

Além da análise comportamental, realizamos análises neuroquímicas para avaliar os níveis de 5-HT, DA e seu metabólito DOPAC em cérebros de peixe-zebra expostos à reserpina, para verificar se a reserpina afeta os neurotransmissores envolvidos no TDM. Os resultados mostraram uma diminuição significativa nos níveis de 5-HT e DA, e um aumento no DOPAC. Esses resultados eram esperados uma vez que a reserpina atua no VMAT de forma irreversível, impedindo o armazenamento desses neurotransmissores nas vesículas causando a depleção de 5HT, NE e DA nos neurônios pré-sinápticos. Desta forma, as monoaminas são acumuladas no citoplasma, há um aumento da disponibilidade de DA extravesicular no citoplasma, sendo este o substrato metabolizado pela MAO em DOPAC, conseqüentemente aumentando os níveis de DOPAC (TREJO et al., 2001). Por outro lado, TANG et al. (2019), utilizando o peixe-zebra, mostraram uma diminuição nos níveis de 5-HT, sem alterar os níveis de DA quando comparados ao controle. No entanto, outros estudos publicados anteriormente, com roedores, mostraram resultados semelhantes aos

nossos achados, com redução nos níveis de 5-HT e DA e aumento nos níveis de DOPAC (ROFFLER-TARLOV et al., 1971; BUNNEY et al., 1973; OE et al., 2010).

Após estas confirmações dos efeitos da reserpina no comportamento e nas monoaminas, investigamos os efeitos deste fármaco na atividade enzimática das ectonucleotidases, que são responsáveis pela hidrólise de ATP até ADO, e a atividade enzimática da ADA que é responsável pela desaminação da ADO em inosina. Nossos resultados mostraram que houve alteração na atividade das NTPDases com o substrato ADP, aumentando a hidrólise deste nucleotídeo. Além disso, houve alteração também na atividade da ecto-5'-nucleotidase, reduzindo a hidrólise do AMP, e uma redução na atividade da ADA em membranas cerebrais, demonstrando um provável mecanismo compensatório e o envolvimento deste sistema no TDM. Estudos prévios demonstraram o envolvimento do sistema purinérgico na depressão, onde foi observada uma reversão das alterações neurocomportamentais causadas por estresse agudo de contenção em roedores, utilizando um inibidor específico da ecto-5'-nucleotidase, a adenosina5'-(α,β -metileno)difosfato (AMPCP) (LIU et al., 2020). MINOR e colaboradores (2015) utilizaram o mesmo modelo farmacológico que nosso estudo para indução da depressão, no entanto em roedores, e apresentou como resultado a reversão dos sintomas comportamentais causados pela reserpina através da cafeína, um inibidor não seletivo dos receptores de adenosina. SILVA et al. (2015), em seu estudo com peixes-zebra, mostraram que a cafeína e o DPCPX (antagonista seletivo do receptor A1) foram capazes de prevenir as alterações comportamentais induzidas pelo tratamento com MK-801, mostrando a pertinência de explorar ainda mais a sinalização adenosinérgica.

Devido aos resultados encontrados, para validar o modelo de depressão em peixe-zebra, utilizamos a fluoxetina, um ISRS, uma vez que este fármaco tem sua ação já bem caracterizada na literatura, sendo amplamente utilizado como tratamento para depressão. Nossos resultados mostraram que a fluoxetina (0,1 $\mu\text{g/mL}$) reverteu os efeitos locomotores e exploratórios causados pela reserpina, confirmando que os sintomas comportamentais encontrados sugerem um modelo de depressão. Esse resultado pode ser correlacionado com o encontrado no estudo de ZHANG *et al.* (2018) que demonstraram que a sertralina, um antidepressivo da classe dos ISRS, reverte os efeitos comportamentais gerados pela reserpina em peixe-zebra, analisados no teste de locomoção, após 7 dias de tratamento com sertralina. Devido

aos resultados encontrados, podemos dizer que o modelo de depressão utilizando este fármaco foi estabelecido.

Além disso, a última fase do presente estudo avaliou o exercício físico como forma de prevenção aos sintomas depressivos através da análise do comportamento locomotor dos animais expostos à reserpina. Já se sabe que o exercício físico tem efeitos neuroquímicos, aumentando os níveis periféricos de DA e 5-HT em humanos (BASSO e SUZUKY, 2017) e no encéfalo de roedores (CHENNAOUI et al., 2000; RENOIR et al., 2011; MIZUTANI et al., 2013). Nossos resultados demonstraram que houve uma diferença expressiva no tempo imóvel ($p < 0.0001$), bem como em todos os outros parâmetros analisados da locomoção. Da mesma forma, AGUIAR e colaboradores (2009) demonstraram que alterações comportamentais causadas pela reserpina em roedores são prevenidas através do exercício físico, corroborando com nossos achados.

O peixe-zebra é um modelo animal que vem ganhando cada vez mais espaço para estudos de fisiologia do exercício e pesquisa comportamental, pois oferece muitas vantagens em relação a outros modelos animais, uma vez que os túneis de natação são utilizados para garantir a intensidade do exercício, através do controle rígido da vazão d'água, o que permite que os protocolos sejam padronizados entre os estudos (DEPASQUALE e LERI, 2018). Além disso, os peixes-zebra têm uma tendência natural ao cardume, facilitando assim a utilização de protocolos de exercícios em grupo e simulando uma condição natural da espécie. Outro fator importante a ser levado em consideração está relacionado ao fato de que “nadar contra a correnteza” é um fator intrínseco ao peixe-zebra, tornando o exercício físico uma atividade não estressora. Até o presente momento, não foram publicadas evidências consistentes do potencial do exercício para prevenir os sintomas depressivos no peixe-zebra, o que mostra a relevância deste estudo para a pesquisa científica, auxiliando na construção de novos estudos acerca do tema.

8. CONCLUSÃO

O modelo de depressão causado pela reserpina em peixe-zebra é de fato viável, sendo que nosso estudo demonstra resultados consistentes, tanto comportamentais quanto neuroquímicos. Além disso, validamos este modelo de depressão, através de um fármaco comprovadamente eficaz no tratamento da depressão, e demonstramos que o exercício físico previne os sintomas de

comportamento do tipo deprimido induzidos pela reserpina. Com estes resultados, abrem-se novas possibilidades para estudos de outras vias farmacológicas ou fisiológicas para reverter ou prevenir o TDM, bem como incentivar outros estudos com a finalidade de explorar os efeitos do exercício físico no peixe-zebra.

9. PERSPECTIVAS

Devido a algumas limitações na condução deste estudo, especialmente devido à pandemia da COVID-19, temos as seguintes análises como perspectivas deste estudo:

- Análise do metabolismo do ATP, ectonucleotidases e adenosina desaminase em animais expostos à reserpina e exercício físico;
- Análise dos níveis de neurotransmissores DA e 5-HT, e do metabólito DOPAC em animais expostos à reserpina e exercício físico.

REFERÊNCIAS

- ABBRACCHIO, M.P., BURNSTOCK, G., VERKHRATSKY, A., ZIMMERMANN, H. Purinergic signalling in the nervous system: an overview. **Trends in Neurosciences**. 32(1): 19-29, 2009.
- ACWORTH, I., NICHOLASS, J., MORGAN, B., NEWSHOLME, E.A. Effect of sustained exercise on concentrations of plasma aromatic and branched-chain amino acids and brain amines. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** 137: 149–153, 1986.
- AGUIAR A.S., ARAÚJO A.L., DA-CUNHA T.R., et al. Physical exercise improves motor and short-term social memory deficits in reserpinized rats. **Brain Res Bull.** 14;79(6):452-7, 2009.
- ALTENHOFEN, S., WIPRICH, M.T., NERY, L.R., et al. Manganese(II) chloride alters behavioral and neurochemical parameters in larvae and adult zebrafish. **Aquat Toxicol.** 182, 172–183, 2017.
- ALBERT, P.R., BENKELFAT, C., DESCARRIES, L. The neurobiology of depression-- revisiting the serotonin hypothesis I. Cellular and molecular mechanisms. **Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.** 367(1601):2378-2381, 2012.
- ALBERT, P.R. Transcriptional regulation of the 5-HT_{1A} receptor: implications for mental illness. **Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.** 367(1601):2402-2415, 2012.
- AMERICAN PSYCHIATRIC ASSOCIATION DIAGNOSTIC AND STATISTICAL MANUAL OF MENTAL DISORDERS (5th edition (DSM-5)). **American Psychiatric Publishing.** 2013.
- ANDRADE, R., BECK, S.G. Cellular Effects of Serotonin in the CNS. **Handbook of Behavioral Neuroscience.** 21(2.5): 219-231, 2010.
- ANTONIOLI, L., BLANDIZZI, C., PACHER, P., HASKÓ, G. The Purinergic System as a Pharmacological Target for the Treatment of Immune-Mediated Inflammatory Diseases. **Pharmacol Rev.** 71(3): 345–382, 2019.
- APPELBAUM, L., SKARIAH G., MOURRAIN, P., MIGNOT, E. Comparative expression of P2X receptors and ecto-nucleoside triphosphate diphosphohydrolase 3 in hypocretin and sensory neurons in zebrafish. **Brain Res.** 1174: 66-75, 2007.
- BAGHERI, S., SABOURY, A.A., HAERTLÉ, T. Adenosine deaminase inhibition. **Int J Biol Macromol.** 141:1246-1257, 2019.

- BASSO, J.C., SUZUKI, W.A. The Effects of Acute Exercise on Mood, Cognition, Neurophysiology, and Neurochemical Pathways: A Review. **Brain Plast.** 2(2):127-152, 2017.
- BARTOLI F, BURNSTOCK G, CROCAMO C, CARRÀ G. Purinergic Signaling and Related Biomarkers in Depression. **Brain Sci.** 10(3), 2020.
- BEAULIEU, J.M., ESPINOZA, S., GAINETDINOV, R.R. Dopamine receptors - IUPHAR Review 13. **Br J Pharmacol.** 172(1):1–23, 2015.
- BEST, J.D., ALDERTON, W.K. Zebrafish: An in vivo model for the study of neurological diseases. **Neuropsychiatr Dis Treat.** 4(3):567-76, 2008.
- BETTINGER, J.C, CARNELL, L., DAVIES, A.G., MCINTIRE, S.L. The use of *Caenorhabditis elegans* in Molecular Neuropharmacology, International Review of Neurobiology, **Academic Press.** 62:195-212, 2004.
- BHATIA, A., SAADABADI, A. Biochemistry, Dopamine Receptors. **StatPearls.** 2020. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK538242/>>
- BLACKBURN, J.R., PFAUS, J.G., PHILLIPS, A.G. Dopamine functions in appetitive and defensive behaviors. **Prog. Neurobiol.** 39:247-279, 1992.
- BLANK, M., GUERIM, L.D., CORDEIRO, R.F., VIANNA, M.R.M. A one-trial inhibitory avoidance task to zebrafish: Rapid acquisition of an NMDA-dependent long-term memory. **Neurobiol Learn Mem.** 92, 529–534, 2009.
- BOEHMLER, W., OBRECHT-PFLUMIO, S., CANFIELD, V., et al. Evolution and expression of D2 and D3 dopamine receptor genes in zebrafish. **DevDyn.** 230:481-493, 2004.
- BOISON, D. Adenosine as a neuromodulator in neurological diseases. **Curr Opin Pharmacol.** 8(1): 2-7, 2008.
- BRIGITTA, B. Pathophysiology of depression and mechanisms of treatment. **Dialogues Clin Neurosci.** 4(1):7-20, 2002.
- BROMET E., ANDRADE L.H., HWANG I., et al. Cross-national epidemiology of DSM-IV major depressive episode. **BMC Med.** p. 90, 2011.
- BUENO-ANTEQUERA, J., MUNGUÍA-IZQUIERDO, D. Exercise and Depressive Disorder. **Adv Exp Med Biol.** 1228:271-287, 2020.
- BUENO-NOTIVOL, J., GRACIA-GARCÍA, P., OLAYA, B., et al. Prevalence of depression during the COVID-19 outbreak: A meta-analysis of community-based studies. **Int J Clin Health Psychol.** 21(1):100-196, 2021.

- BUNNEY, B.S., J.R. WALTERS, R.H., ROTH, G.K. Aghajanian Dopaminergic neurons: effect of antipsychotic drugs and amphetamine on single cell activity. **J Pharmacol Exp Ther.** 185:560-571, 1973.
- BURNSTOCK, G. Cotransmission. **Current Opinion in Pharmacology.** 4(1): 47-52, 2004.
- BURNSTOCK, G. Purinergic signalling and disorders of the central nervous system. **Nat Rev Drug Discov.** 7: 575-590, 2008.
- CACHAT, J., STEWART, A., UTTERBACK, E., et al. Three-dimensional neurophenotyping of adult zebrafish behavior. **PLoS One.** 6(3):175-197, 2011.
- CHEFFER A., CASTILLO A.R.G., CORRÊA-VELLOSO J., et al. Purinergic system in psychiatric diseases. **Mol. Psychiatry.** 23:94–106, 2018.
- CHENNAOUI, M., GRIMALDI, B., FILLION, M.P., et al. Effects of physical training on functional activity of 5-HT_{1B} receptors in rat central nervous system: role of 5-HT_{1B} moduline. **Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.** 361(6):600-604, 2000.
- CHEUNG, M., PARMAR, M. Reserpine. [Atualizado em 6 de janeiro de 2022]. **StatPearls.** 2022. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK557767/>>
- CIPRIANI, A., FURUKAWA, T.A., SALANTI, G., et al. Comparative efficacy and acceptability of 21 antidepressant drugs for the acute treatment of adults with major depressive disorder: a systematic review and network meta-analysis. **Lancet.** 391(10128):1357-1366, 2018.
- CONSELHO NACIONAL DE CONTROLE DE EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL. Portaria nº 1.332, de 3 de dezembro de 2014a. Dispõe sobre o licenciamento das atividades destinadas à produção, à manutenção ou à utilização de animais para ensino ou pesquisa científica, de que trata o art. 11 da Lei nº 11.794, de 08 de outubro de 2008, realizadas em 150 instalações de instituições públicas ou privadas previamente credenciadas no Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal – CONCEA. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 4 dez. 2014a.
- DALY, M., ROBINSON, E. Depression and anxiety during COVID-19. **The Lancet.** 399(10324):518, 2022.
- D'AQUILA, P.S., COLLU, M., GESSA, G.L., SERRA, G. The role of dopamine in the mechanism of action of antidepressant drugs. **European Journal of Pharmacology.** 405(1): 365-373, 2000.

- DAVID, C., FISHBURN, C.S., MONSMA, F.J. JR, et al. Synthesis and processing of D2 dopamine receptors. **Biochemistry**. 32(32):8179-8183, 1993.
- DAW, N.D., KAKADE, S., DAYAN, P. Opponent interactions between serotonin and dopamine. **Neural Netw**. 15(4-6):603-16, 2002.
- DEAN, J., KESHAVAN, M. The neurobiology of depression: An integrated view. **Asian J Psychiatr**. 27:101-111, 2017.
- DEPASQUALE, C., LERI, J. The influence of exercise on anxiety-like behavior in zebrafish (*Danio rerio*). **Behav Processes**. 157:638-644, 2018.
- DINIZ C., RODRIGUES M., CASAROTTO P.C., et al. Monoamine involvement in the antidepressant-like effect induced by P2 blockade. **Brain Res**. 1676:19–27, 2017.
- DISEASE AND INJURY INCIDENCE AND PREVALENCE COLLABORATORS. Global, regional, and national incidence, prevalence, and years lived with disability for 354 diseases and injuries for 195 countries and territories, 1990–2017: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2017. **The Lancet**. 2018.
- DUNWIDDIE, T. V., MASINO S. A. The Role and Regulation of Adenosine in the Central Nervous System. **Annual Review of Neuroscience**. 24(1):31–55, 2001.
- DZIUBINA, A., SZMYD, K., ZYGMUNT, M., et al. Evaluation of antidepressant-like and anxiolytic-like activity of purinedione-derivatives with affinity for adenosine A(2A) receptors in mice. **Pharmacol. Rep**. 68:1285–1292, 2016.
- EGAN, R.J., BERGNER, C.L., HART, P.C., et al. Understanding behavioral and physiological phenotypes of stress and anxiety in zebrafish. **Behav Brain Res**. 205 (1): 38–44, 2009.
- EL YACOUBI, M., COSTENTIN, J., VAUGEOIS, J.M. Adenosine A2A receptors and depression. **Neurology**. 61:82–87, 2003.
- ETTMAN C.K., ABDALLA S.M., COHEN G.H., et al. Prevalence of Depression Symptoms in US Adults Before and During the COVID-19 Pandemic. **JAMA Netw Open**. 2020.
- FACCIOL, A., & GERLAI, R. Zebrafish Shoaling, Its Behavioral and Neurobiological Mechanisms, and Its Alteration by Embryonic Alcohol Exposure: A Review. **Frontiers in behavioral neuroscience**. 1: 572175, 2020.
- FEHER, J. Cells, Synapses, and Neurotransmitters. **Quantitative Human Physiology**. 4: 307-320, 2012.

- FIBIGER, H.C., PHILLIPS, A.G. Role of catecholamine transmitters in reward systems: implications for the neurobiology of affect E. **Brain Reward Systems and Abuse**. New York Press. 61-74, 1987.
- FUSS, J., BEN ABDALLAH, N.M., VOGT, M.A., et al. Voluntary exercise induces anxiety-like behavior in adult C57BL/6J mice correlating with hippocampal neurogenesis. **Hippocampus**. 20(3):364-76, 2010.
- GASPAR, P., LILLESAAAR, C. Probing the diversity of serotonin neurons. **Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci**. 367(1601):2382-2394, 2012.
- GERLAI, R. Zebrafish: An uncharted behavior genetic model. **Behav Genet**. 33:461-468, 2003.
- GERLAI, R., LAHAV, M., GUO, S., ROSENTHAL, A. Drinks like a fish: zebrafish (*Danio rerio*) as a behavior genetic model to study alcohol effects. **Pharmacol Biochem Behav**. 67(4):773-782, 2000.
- GILBERT, M.J.H., ZERULLA, T.C., TIERNEY, K.B. Zebrafish (*Danio rerio*) as a model for the study of aging and exercise: physical ability and trainability decrease with age. **Exp. Gerontol**. 50:106-113, 2014.
- GUO, S. Linking genes to brain, behavior and neurological diseases: what can we learn from zebrafish? **Genes Brain Behav**. 3:63–74, 2004.
- HASLER, G., DREVETS, W.C., MANJI, H.K. Discovering endophenotypes for major depression. **Neuropsychopharmacology**. 29:1765–1781, 2004.
- HASLER, G. Pathophysiology of depression: do we have any solid evidence of interest to clinicians? **World Psychiatry**. 9(3):155–161, 2010.
- HORZMANN, K.A., FREEMAN J.L. Zebrafish Get Connected: Investigating Neurotransmission Targets and Alterations in Chemical Toxicity. **Toxics**. 4(3):19, 2016.
- IWATA, M., OTA, K.T., LI, X.Y., et al. Psychological Stress Activates the Inflammasome via Release of Adenosine Triphosphate and Stimulation of the Purinergic Type 2X7 Receptor. **Biol. Psychiatry**. 80:12–22, 2016.
- JAMES, T.A., STARR, M.S. Rotational behaviour elicited by 5-HT in the rat: evidence for an inhibitory role of S-HT in the substantia nigra and corpus striatum. **J Pharm Pharmacol**. 32:196-200, 1980.
- JESULOLA, E., MICALOS, P., BAGULEY, I.J. Understanding the pathophysiology of depression: From monoamines to the neurogenesis hypothesis model - are we there yet? **Behavioural Brain Research**. 341: 79-90, 2018.

- KUCENAS, S., LI, Z., COX, J.A., EGAN, T.M., VOIGT, M.M. Molecular characterization of the zebrafish P2X receptor subunit gene family. **Neuroscience**. 121: 935-945, 2003.
- KUCENAS, S., COX, J.A., SOTO, F., LAMORA, A., VOIGT, M.M. Ectodermal P2X receptor function plays a pivotal role in craniofacial development of the zebrafish. **Purinergic Signal**. 5:395-407, 2009.
- KRÜGEL, U. Purinergic receptors in psychiatric disorders. **Neuropharmacology**. 104: 212-225, 2016.
- KYZAR, E., STEWART, A.M., LANDSMAN, S., et al. Behavioral effects of bidirectional modulators of brain monoamines reserpine and d-amphetamine in zebrafish. **Brain Res**. 1527:108-116, 2013.
- LALANZA, J., SANCHEZ-ROIGE, S., CIGARROA, I. et al. Long-term moderate treadmill exercise promotes stress-coping strategies in male and female rats. **Sci Rep**. 5: 161-166, 2015.
- LAMBERT, K. & KINSLEY, C.H. Neurociência clínica: as bases neurobiológicas da saúde mental. Porto Alegre: Artmed, 2006.
- LATAPY, C., RIOUX, V., GUITTON, M.J., BEAULIEU, J.M. Selective deletion of forebrain glycogen synthase kinase 3 β reveals a central role in serotonin-sensitive anxiety and social behaviour. **Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci**. 367(1601):2460-2474, 2012.
- LESCH, K.P., ARARAGI, N., WAIDER, J., et al. Targeting brain serotonin synthesis: insights into neurodevelopmental disorders with long-term outcomes related to negative emotionality, aggression and antisocial behaviour. **Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci**. 367(1601):2426-2443, 2012.
- LEVIN, E.D., BENCAN, Z., CERUTTI, D.T. Anxiolytic effects of nicotine in zebrafish. **Physiol Behav**. 90, 54–58, 2007.
- LIESCHKE, G.J., CURRIE, P.D. Animal models of human disease: zebrafish swim into view. **Nat Rev Genet**. 8:353-367, 2000.
- LILLESAAAR, Christina. The serotonergic system in fish. **J Chem Neuroanatom**. 41 (4): 294-308, 2011.
- LIN, T.W., KUO, Y.M. Exercise Benefits Brain Function: The Monoamine Connection. **Brain Sci**. 3(1), 39-53, 2013.

- LINDEN, J.M. Purinergic Systems. In: Siegel GJ, Agranoff BW, Albers RW, et al., editors. **Basic Neurochemistry: Molecular, Cellular and Medical Aspects**. 17 (6), 1999. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK20389/>>.
- LIU, P., ZHU, L., ZHOU, L., BAI, X. e5NT inhibitor protects acute restraint stress-induced depression by regulating nucleoside release in mice. **J Pharm Pharmacol**. 72:11, 2020.
- LÓPEZ-CRUZ, L., SALAMONE, J.D., CORREA, M. Caffeine and Selective Adenosine Receptor Antagonists as New Therapeutic Tools for the Motivational Symptoms of Depression. **Front. Pharmacol**. 9:526, 2018.
- LUCAE S., SALYAKINA D., BARDEN N., et al. P2RX7, a gene coding for a purinergic ligand-gated ion channel, is associated with major depressive disorder. **Human Molecular Genetics**. 15(16):2438–2445, 2006.
- LUCHIARI, A.C., CHACON, D.M.M. Physical exercise improves learning in zebrafish, *Danio rerio*. **Behav. Processes**. 100: 44-47, 2013.
- MANIAM, J., MORRIS, M.J. Voluntary exercise and palatable high-fat diet both improve behavioural profile and stress responses in male rats exposed to early life stress: role of hippocampus. **Psychoneuroendocrinology**. 35(10):1553-1564, 2010.
- MARCON, M., HERRMANN, A.P., MOCELIN, R., et al. Prevention of unpredictable chronic stress-related phenomena in zebrafish exposed to bromazepam, fluoxetine and nortriptyline. **Psychopharmacology**. 233: 3815–3824, 2016.
- MEAD, G.E., MORLEY, W., CAMPBELL, P. et al. Exercise for depression. **Cochrane Database of Systematic Reviews**. 4, 2008.
- MINISTÉRIO DA CIÊNCIA, TECNOLOGIA E INOVAÇÃO. Diretrizes da Prática de Eutanásia do Conselho de Experimentação Animal - CONCEA. Brasil. Publicado no **DOU**. 1;5, 2013.
- MINOR, T.R., HANFF, T.C. Adenosine signaling in reserpine-induced depression in rats. **Behav Brain Res**. 1;286:184-91, 2015.
- MISHRA, A., SINGH, S., SHUKLA, S. Physiological and Functional Basis of Dopamine Receptors and Their Role in Neurogenesis: Possible Implication for Parkinson's disease. **J Exp Neurosci**. 2018.
- MIZUTANI, K., SONODA, S., KARASAWA, N., et al. Effects of exercise after focal cerebral cortex infarction on basal ganglion. **Neurol Sci**. 34(6):861-867, 2013.

- MORENO, R.A., MORENO, D.H., SOARES, M.B.M. Psicofarmacologia de antidepressivos. **Rev Bras Psiquiatr.** 1, 1999;
- NABINGER, D.D., ALTENHOFEN, S., BITENCOURT, P.E.R., et al. Nickel exposure alters behavioral parameters in larval and adult zebrafish. **Sci Total Environ.** 624, 1623–1633, 2018.
- NABINGER, D.D., ALTENHOFEN, S., BONAN, C.D. Zebrafish models: Gaining insight into purinergic signaling and neurological disorders. **Prog Neuro-Psychopharmacol Biol Psych.** epub, 98:1 - 6, 2020.
- NEWSHOLME, E.A.; ACWORTH, I.N.; BLOMSTRAND, E. Amino Acid, Brain Neurotransmitters and a Functional Link between Muscle and Brain That Is Important in Sustained Exercise. John Libbey Eurotext Ltd.: London, UK, 1987.
- NGUYEN, M., STEWART, A.M.A., KALUEFF, A.V. Aquatic blues: Modeling depression and antidepressant action in zebrafish. **Prog Neuro-Psychopharmacol Biol Psych.** 55: 26-39, 2014.
- NICHOLS, D.E. & NICHOLS, C. D. Serotonin Receptors. **Chem. Rev.** 108(5): 1614-1641, 2008.
- NORTON, W.H., ROHR, K.B., BURNSTOCK, G. Embryonic expression of a P2X(3) receptor encoding gene in zebrafish. **Mech. Dev.** 99:149-152, 2000.
- OLIVIER, B. Serotonin: a never-ending story. **Eur J Pharmacol.** 15:2-18, 2015.
- PAOLUCCI, E.M., LOUKOV, D., BOWDISH, D.M.E., HEISZ, J.J. Exercise reduces depression and inflammation but intensity matters. **Biol Psychol.** 133:79-84, 2018.
- POLESZAK, E., SZOPA, A., BOGATKO, K. et al. Antidepressant-Like Activity of Typical Antidepressant Drugs in the Forced Swim Test and Tail Suspension Test in Mice Is Augmented by DMPX, an Adenosine A2A Receptor Antagonist. **Neurotox Res** 35: 344–352, 2019.
- QIN, M., WONG, A., SEGUIN, D., GERLAI, R. Induction of social behavior in zebrafish: live versus computer animated fish as stimuli. **Zebrafish.** 11:185–197, 2014.
- REICHERT, K.P., CASTRO, M.F.V., ASSMANN, C.E. Diabetes and hypertension: Pivotal involvement of purinergic signaling. **Biomed Pharmacother.** 137:111273, 2021.
- RIBEIRO, Deidiane Elisa et al. P2X7 receptor signaling in stress and depression. **Int J Mol Sci.** 20(11): 2778, 2019.

- RICO, E.P., SENGER, M.R., FAUTH, M.G., et al. ATP and ADP hydrolysis in brain membranes of zebrafish (*Danio rerio*). **Life Sci.** 73(16):2071-2082, 2003.
- RINK, E., GUO, S. The too few mutant selectively affects subgroups of monoaminergic neurons in the zebrafish forebrain. **Neuroscience.** 127(1):147-54, 2004.
- RINK E, WULLIMANN, MF. Development of the catecholaminergic system in the early zebrafish brain: an immunohistochemical study. **Brain Res Dev.** 137(1):89-100 2002.
- RENOIR, T., CHEVARIN, C., LANFUMEY, L., HANNAN, A.J. Effect of enhanced voluntary physical exercise on brain levels of monoamines in Huntington disease mice. **PLoS Curr.** 3:1281, 2011.
- ROFFLER-TARLOV, S., SHARMAN D.F., TEGERDINE P. 3,4-dihydroxyphenylacetic acid and 4-hydroxy-3-methoxyphenylacetic acid in the mouse striatum: a reflection of intra- and extra-neuronal metabolism of dopamine? **Br J Pharmacol.** 42:343-351, 1971.
- ROMEIRO, L.A.S., FRAGA, C.A.M., BARREIRO, E.J. New therapeutic strategies for the treatment of depression: a view of medicinal chemistry. **Química Nova.** 26(3): 347-358, 2003.
- ROSEMBERG, D.B., RICO, E.P., GUIDOTI, M.R., DIAS, R.D., SOUZA, D.O., BONAN, C.D., et al. Adenosine deaminase-related genes: molecular identification, tissue expression pattern and truncated alternative splice isoform in adult zebrafish (*Danio rerio*). **Life Sci.**, 81:1526-1534, 2007.
- ROSEMBERG, D.B., RICO, E.P., SENGER, M.R., DIAS, R.D., BOGO, M.R., BONAN, C.D., et al. Kinetic characterization of adenosine deaminase activity in zebrafish (*Danio rerio*) brain. **Comp. Biochem. Physiol. B Biochem. Mol. Biol.** 151: 96-101, 2008.
- ROSEMBERG, D.B., RICO, E.P., LANGONI, A.S., SPINELLI, J.T., PEREIRA, T.C., DIAS, R.D., et al. NTPDase family in zebrafish: Nucleotide hydrolysis, molecular identification and gene expression profiles in brain, liver and heart. **Comp. Biochem. Physiol. B Biochem. Mol. Biol.** 155:230-240, 2010.
- SAMAD, N., MANZOOR, N., MUNEER, Z., et al. Reserpine-induced altered neuro-behavioral, biochemical and histopathological assessments prevent by enhanced antioxidant defence system of thymoquinone in mice. **Metab Brain Dis.** 36(8):2535-2552, 2021.

- SAVERINO, C., GERLAI, R. The social zebrafish: Behavioral responses to conspecific, heterospecific, and computer animated fish. **Behav Brain Res.** 191:77-87, 2008.
- SCHUCH, F.B., DUNN, A.L., KANITZ, A.C., et al. Moderators of response in exercise treatment for depression: A systematic review. **J Affect Disord.** 195:40-9, 2016.
- SCHUCH, F.B., STUBBS, B. The Role of Exercise in Preventing and Treating Depression. **Current Sports Medicine Reports.** 18(8):299-304, 2019.
- SENGER, M.R., RICO, E.P., DIAS R.D. et al. Ecto-51-nucleotidase activity in brain membranes of zebrafish (*Danio rerio*). **Comp Biochem Physiol.** 139:203-207, 2004.
- SHEFFLER, Z.M., PILLARISSETTY, L.S. Physiology, Neurotransmitters. In: **StatPearls.** 2020. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK539894/>>
- SILVEIRA, M., SILVEIRA, J., AGUES-BARBOSA, T. Zebra Fitness: Learning and Anxiety After Physical Exercise in Zebrafish. **Recent Advances in Zebrafish Researches, Yusuf Bozkurt.** 2018.
- SONG, C., LIU, B.P., ZHANG, Y.P., et al. Modeling consequences of prolonged strong unpredictable stress in zebrafish: Complex effects on behavior and physiology. **Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry.** 2(81):384-394, 2017.
- SONNE, J., GOYAL, A., BANSAL, P., et al. Dopamine. **StatPearls.** 2020. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK535451/>>
- SIEBEL, A., BONAN, C.D. Zebrafish como Modelo para Estudos Comportamentais. *Biotecnologia aplicada à saúde: fundamentos e aplicações.* 1(1): 25-31, 2015.
- ŠVOB ŠTRAC D, PIVAC N, MÜCK-ŠELER D. The serotonergic system and cognitive function. **Transl Neurosci.** 7(1):35–49, 2016.
- TANG, Y.Q., LI, Z.R., ZHANG, S.Z., MI, P., CHEN, D.Y., FENG, X.Z. Venlafaxine plus melatonin ameliorate reserpine-induced depression-like behavior in zebrafish. **Neurotoxicol Teratol.** 76:106835, 2019.
- TYE, K., MIRZABEKOV, J., WARDEN, M. et al. Dopamine neurons modulate neural encoding and expression of depression-related behaviour. **Nature.** 493: 537–541, 2013.
- UGEDO, L., GRENHOFF, J., SVENSSON, T.H. Ritanserin, a 5-HT₂ receptor antagonist, activates midbrain dopaminergic neurons by blocking serotonergic inhibition. **Psychopharmacology (Berl).** 98:45-50, 1989.

- VARDANYAN, R.S., HRUBY, V.J. Synthesis of Essential Drugs. **Elsevier Science**.1: 634, 2006.
- VARMA, P., JUNGE, M., MEAKLIM, H., JACKSON, M.L. Younger people are more vulnerable to stress, anxiety and depression during COVID-19 pandemic: A global cross-sectional survey. **Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry**. 13;109:110236, 2021.
- WASEL, O., FREEMAN, J.L. Chemical and Genetic Zebrafish Models to Define Mechanisms of and Treatments for Dopaminergic Neurodegeneration. **Int J Mol Sci**. 21(17):5981, 2020
- WESTERFIELD, M. The zebrafish book. A guide for the laboratory use of zebrafish (Danio rerio), 4th Edition. University of Oregon Press. 2000.
- WILSON, J. M., BUNTE, R. M., CARTY, A. J. Evaluation of rapid cooling and tricaine methanesulfonate (MS222) as methods of euthanasia in zebrafish (Danio rerio). **Journal of the American Association for Laboratory Animal Science: JAALAS**. 48(6): 785–789, 2009.
- WINNER, B.M., ZHANG, H., FARTHING, M.M., et al. Metabolism of Dopamine in Nucleus Accumbens Astrocytes Is Preserved in Aged Mice Exposed to MPTP. **Front Aging Neurosci**. 12;9:410, 2017.
- WISE, R.A. The brain and reward J. Liebman, J. Cooper. **The Neuropharmacological Basis of Reward**, Oxford Univ. Press, Oxford. 55-78, 1989.
- WOHLEB, E.S., FRANKLIN, T., IWATA, H., DUMAN, R.S. Integrating neuroimmune systems in the neurobiology of depression. **Nat Rev Neurosci**. 17(8):497-511, 2016.
- WONG, R.Y., OXENDINE, S.E., GODWIN, J. Behavioral and neurogenomic transcriptome changes in wild-derived zebrafish with fluoxetine treatment. **BMC Genomics**. 14:348, 2013.
- WU, S.Y., WANG, T.F., YU, L., et al. Running exercise protects the substantia nigra dopaminergic neurons against inflammation-induced degeneration via the activation of BDNF signaling pathway. **Brain Behav Immun**. 25(1):135-146, 2011.
- YAMADA, K., KOBAYASHI, M., KANDA, T. Involvement of Adenosine A2A Receptors in Depression and Anxiety. **Int. Rev. Neurobiol**. 119 : 373–393, 2014.

ZHANG, S., LIU, X., SUN, M., et al. Reversal of reserpine-induced depression and cognitive disorder in zebrafish by sertraline and Traditional Chinese Medicine (TCM). **Behav Brain Funct.** 14(1):13, 2018.

ZIMMERMANN, H. Ectonucleotidases in the nervous system. **Novartis Foundation symposium.** 276:113–28; discussion 128-30, 233–7, 275–81, 2006.

ANEXOS


SIPESQ
 Sistema de Pesquisas da PUCRS

Código SIPESQ: 9922

Porto Alegre, 6 de julho de 2020

Prezado(a) Pesquisador(a),

A Comissão de Ética no Uso de Animais da PUCRS apreciou e aprovou o Projeto de Pesquisa "A influência do exercício físico e da modulação da sinalização adenosinérgica no transtorno depressivo maior em zebrafish (Danio rerio)" coordenado por CARLA DENISE B O N A N .

Sua Investigação, respeitando com detalhe as descrições contidas no projeto e formulários avaliados pela CEUA, está autorizada a partir da presente data.

Informamos que é necessário o encaminhamento de relatório final quando finalizar esta investigação. Adicionalmente, ressaltamos que conforme previsto na Lei no. 11.794, de 08 de outubro de 2008 (Lei Arouca), que regulamenta os procedimentos para o uso científico de animais, é função da CEUA zelar pelo cumprimento dos procedimentos informados, realizando inspeções periódicas nos locais de pesquisa.

Duração do Projeto: 06/07/2020 - 06/04/2022

Nº de Animais	Espécie
3016	Danio rerio
Total de Animais: 3016	

Atenciosamente,

Comissão de Ética no Uso de Animais(CEUA)

Confirmação de submissão do artigo científico



Gabriela Madalena de Melo Martins <gmadalenamelo@gmail.com>

Confirm co-authorship of submission to Pharmacology, Biochemistry and Behavior

1 mensagem

Pharmacology, Biochemistry and Behavior <em@editorialmanager.com> 6 de março de 2022 21:23
 Responder a: "Pharmacology, Biochemistry and Behavior" <support@elsevier.com>
 Para: Gabriela Madalena Melo Martins <gmadalenamelo@gmail.com>

"This is an automated message."

Journal: Pharmacology, Biochemistry and Behavior
 Title: Physical exercise prevents behavioral effects caused by a reserpine-induced depression model in zebrafish
 Corresponding Author: Professor Carla Denise Bonan
 Co-Authors: Gabriela Madalena Melo Martins; Bárbara Pettersen; Gabriel Rübensam; Júlia Maria Kuhl da Silva; Karina Vidante Gaspar; Melissa Talita Wiprich; Stefani Altenhofen
 Manuscript Number:

Dear Gabriela Madalena Melo Martins,

The corresponding author Professor Carla Denise Bonan has listed you as a contributing author of the following submission via Elsevier's online submission system for Pharmacology, Biochemistry and Behavior.

Submission Title: Physical exercise prevents behavioral effects caused by a reserpine-induced depression model in zebrafish

Elsevier asks all authors to verify their co-authorship by confirming agreement to publish this article if it is accepted for publication.

Please read the following statement and confirm your agreement by clicking on this link:
<https://www.editorialmanager.com/pbb/l.asp?i=41099&l=KCXOQOYP>

I irrevocably authorize and grant my full consent to the corresponding author of the manuscript to: (1) enter into an exclusive publishing agreement with Elsevier on my behalf (or, if the article is to be published under a CC BY license, a non-exclusive publishing agreement), in the relevant form set out at www.elsevier.com/copyright; and (2) unless I am a US government employee, to transfer my copyright or grant an exclusive license of rights (or for CC BY articles a non-exclusive license of rights) to Elsevier as part of that publishing agreement, effective on acceptance of the article for publication. If the article is a work made for hire, I am authorized to confirm this on behalf of my employer. I agree that the copyright status selected by the corresponding author for the article if it is accepted for publication shall apply and that this agreement is subject to the governing law of the country in which the journal owner is located.

If you did not co-author this submission, please contact the corresponding author directly at cbonan@puors.br.

Thank you,
 Pharmacology, Biochemistry and Behavior

More information and support
 FAQ: What is copyright co-author verification?
https://service.elsevier.com/app/answers/detail/a_id/28460/supporthub/publishing/

You will find information relevant for you as an author on Elsevier's Author Hub: <https://www.elsevier.com/authors>
 FAQ: How can I reset a forgotten password?
https://service.elsevier.com/app/answers/detail/a_id/28452/supporthub/publishing/tw/editorial+manager/

For further assistance, please visit our customer service site: <https://service.elsevier.com/app/home/supporthub/publishing/>. Here you can search for solutions on a range of topics, find answers to frequently asked questions, and learn more about Editorial Manager via interactive tutorials. You can also talk 24/7 to our customer support team by phone and 24/7 by live chat and email.

In compliance with data protection regulations, you may request that we remove your personal registration details at any time. (Use the following URL: <https://www.editorialmanager.com/pbb/login.asp?a=r>). Please contact the publication office if you have any questions.

<https://mail.google.com/mail/u/0/?ik=b3095ce319&view=pt&search=all&permthid=thread-f%3A1726598513522172734&siml=msg-f%3A1726598...> 1/

Artigo científico submetido

Physical exercise prevents behavioral effects caused by a reserpine-induced depression model in zebrafish

Gabriela Madalena de Melo Martins^{1,2}, Bárbara Pettersen^{1,2}, Gabriel Rübensam³, Júlia Maria Kuhl da Silva², Karina Vidarte Gaspar^{1,2}, Melissa Talita Wiprich^{1,2}, Stefani Altenhofen^{1,2,4}, Carla Denise Bonan^{1,2,4} *

1 Programa de Pós-Graduação em Medicina e Ciências da Saúde, Escola de Medicina, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil.

2 Laboratório de Neuroquímica e Psicofarmacologia, Escola de Ciências da Saúde e da Vida, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil.

3 Centro de Pesquisa em Toxicologia e Farmacologia – INTOX, Escola de Ciências da Saúde e da Vida, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil.

4 Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia em Doenças Cerebrais, Excitotoxicidade e Neuroproteção, Porto Alegre, RS, Brazil.

*Corresponding author:

Carla Denise Bonan - Laboratório de Neuroquímica e Psicofarmacologia, Escola de Ciências da Saúde e da Vida, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Avenida Ipiranga, 6681 – Prédio 12D, sala 301, Porto Alegre, RS, Brazil. Phone: +55 51 33534158 Email: cbonan@pucrs.br; carladbonan@gmail.com

Abstract

Major depressive disorder (MDD) has increasingly reached the world population, with an even more expressive increase in recent years due to the COVID-19 pandemic. In this study, we used adult zebrafish (*Danio rerio*) as a model to verify the effects of reserpine on behavior and neurotransmitter levels. We observed an increase in the parameters of immobile time and time spent in the bottom zone of the tank in reserpine-exposed animals. On the other hand, the results demonstrated a decrease in distance traveled and velocity. Reserpine exposure did not induce changes in memory and social interaction when compared to the control group. However, we observed a significant reduction of dopamine and serotonin levels and an increase in the 3,4-Dihydroxyphenylacetic acid (DOPAC) levels. In addition, we also evaluated the influence of chronic exposure to fluoxetine, a well-known antidepressant, on the behavior of reserpine-exposed animals. The results showed a reversal of behavioral alterations caused by reserpine. To verify possible preventive effects of physical exercise on reserpine-induced depression, the animals were subjected to physical exercise for 6 weeks. Results demonstrated the protection of physical exercise against the behavioral effects caused by reserpine in zebrafish. Our results showed that reserpine was effective in the induction of MDD symptoms in this animal model, and physical exercise may be an alternative to prevent the effects induced by reserpine.

Keywords: major depressive disorder; physical exercise; reserpine; zebrafish.

1. Introduction

Major depressive disorder (MDD) or simply depression is a disabling condition that presents a set of symptoms, such as changes in body weight, lack of interest in daily activities, sleep disturbance, reduced concentration, difficulty thinking and making decisions, alteration in psychomotor activity, recurrent thoughts of death, among other clinical manifestations. These symptoms affect physical health, human relationships, and cognitive function and may lead to suicide (Brigitta et al., 2002; Hasler et al., 2004; DSM-5, 2013; Jesulola et al., 2018). According to Disease and Injury Incidence and Prevalence Collaborators (2018), MDD affects approximately 264 million people worldwide and may present an individual risk of 15% to 18% in the occurrence of this clinical condition throughout life (Bromet et al., 2011). However, this number is currently more expressive, according to the meta-analysis by Bueno-Notivol et al (2021), which demonstrates that depression rates in the general population could be seven times higher during the COVID-19 pandemic and should be more than double by 2030 (Bueno-Antequera et al., 2020).

For decades, many studies have hypothesized the causes of MDD. The most studied is the monoaminergic hypothesis, in which depression is caused by an alteration in the levels of one or more monoamines, such as serotonin (5-HT) and dopamine (DA) (Dean et al., 2017). The pharmacological route most adopted for MDD treatment is the use of 5-HT reuptake inhibitors (Bromet et al., 2011). However, studies show that treatment interruption ranges from 15% to 132% depending on the drug used (Cipriani et al., 2018), which is mainly related to the occurrence of side effects, like weight gain, increased diabetes risk, sexual dysfunction, among others (Schuch et al., 2019). Studies have reported that beyond pharmacological modulation, physical exercise could also influence monoamine levels (Basso & Suzuki et al., 2017), becoming an alternative for depression treatment. However, the systematic review developed by Schuch et al. (2016) demonstrated there were few studies and some methodological limitations, concluding that further studies are needed to better understand the effects of physical exercise on MDD.

The zebrafish is an animal model used in studies related to psychiatric diseases, such as anxiety and depression (Nguyen et al., 2014; DePasquale and Leri, 2018; Silveira et al., 2018). This species has already identified several neurotransmitter systems related to MDD, such as dopaminergic and serotonergic systems (Horzmann and Freeman, 2016). Moreover, behavioral symptoms of depressive-like states can also be observed, such as anhedonia (reduced reward behavior), loss or excess appetite, motor delay (hypolocomotion), fatigue, irritability, restlessness (hyperactivity), lethargy, and social, and cognitive deficits (Nguyen et al., 2014).

To mimic symptoms of MDD in zebrafish, some methods can be used, such as unpredictable chronic stress, social isolation, genetic or pharmacological models, as reserpine exposure-induction (Nguyen et al., 2014). Zebrafish have also been used as a model for analyzing the effects of exercise on behavior and neurotransmission (Luchiari and Chacon, 2013; Gilbert et al., 2014; DePasquale and Leri, 2018; Silveira et al., 2018). Among some of the beneficial effects of physical exercise, the reduction of anxiety and improvement in the learning process have already been described in the literature in zebrafish (Luchiari and Chacon, 2013; Gilbert et al., 2014; DePasquale and Leri, 2018; Silveira et al., 2018).

Therefore, the present study aimed to establish a reserpine-depression model in adult zebrafish, through neurochemical and behavioral analysis. Moreover, we tested fluoxetine for validation of the reserpine-depression model since this drug is used in MDD treatment. Afterward, the present study evaluated the preventive effects of physical exercise in a reserpine-depression model in zebrafish.

2. Materials and Methods

2.1. Animals

In this study, a total of 336 adult male zebrafish (*Danio rerio*, strain AB, 6-8 months) from our breeding colony were used. The animals were maintained in recirculating systems (Zebtec, Tecniplast, Italy) with reverse osmosis filtered water equilibrated to reach the species standard temperature ($28\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$), pH (7.0 to 7.5), conductivity (300-700 μS), hardness (80-300 mg/L), ammonia ($< 0.02\text{ mg/L}$), nitrite ($< 1\text{ mg/L}$), nitrate ($< 50\text{ mg/L}$), and chloride levels (0 mg/L) (Zebtec, Tecniplast, Italy). The animals were submitted to a light/dark cycle of 14/10 hours respectively and received a balanced diet with commercial flakes (TetraMin Tropical Flake Fish®) three times a day that was supplemented with brine shrimp (Westerfield, 2000).

The animals were manipulated according to procedures indicated by the Brazilian Council of Animals Experimentation guidelines for Use of Fish in Research (CONCEA) and the Brazilian legislation (11.794/08). All protocols were approved by the Animal Care Committee of the Pontifical Catholic University of Rio Grande do Sul (CEUA-PUCRS, protocol number 9922). This study was registered in the Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e Conhecimento Tradicional Associado – SISGEN (Protocol No. A3B073D).

2.2. Treatments

2.2.1. Exposure to reserpine

Animals were exposed to 40 µg/mL reserpine (RES group) diluted in the water for 20 minutes (Kyzar et al., 2013, Zhang et al., 2018) The control (CTRL) group was maintained under the same conditions and exposed only to the water. After 7 days, neurochemical and behavioral analyzes were performed, as shown in Figure 1. In the following phases of the study, RES-treated and CTRL groups were exposed to two different conditions: 1) fluoxetine treatment (FLU); or 2) physical exercise (EXER), as detailed below and shown in Figure 2 and Figure 3, respectively.

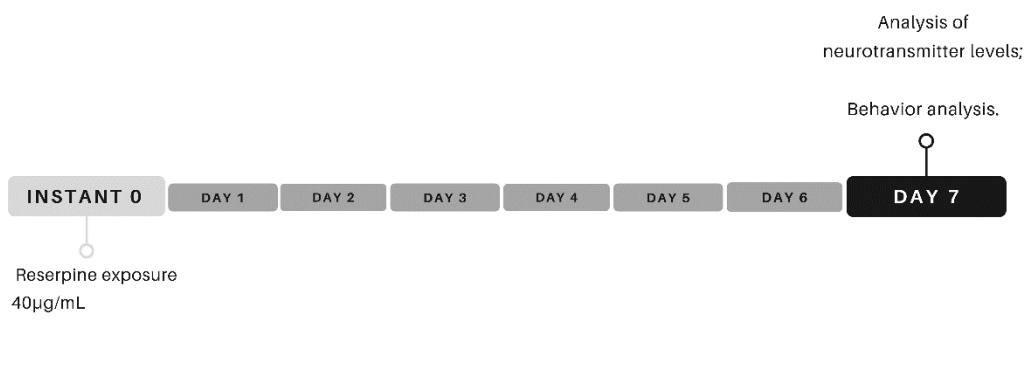


Figure 1: Timeline of performing experimental procedures for treatment with reserpine.

2.2.2. Fluoxetine Treatment

For validation of the reserpine-depression model, the animals were exposed to fluoxetine at a concentration of 0.1 µg/mL for 7 days (Egan et al., 2009; Wong et al., 2013; Marcon et al., 2016; Song et al., 2017). Four groups of animals were tested: 1) control group (CTRL), animals exposed only to water; 2) RES group, animals exposed to reserpine; 3) FLU group, animals chronically exposed to fluoxetine; and 4) FLU/RES group, animals exposed chronically to fluoxetine after reserpine treatment. FLU and FLU/RES groups were exposed for 7 days to fluoxetine dissolved in the home tank, and this solution was changed daily. The FLU/RES group was exposed to fluoxetine immediately after treatment with reserpine, as shown in Figure 2. The RES group was exposed to reserpine and kept in the water for the subsequent 7 days for further analysis. CTRL group remained only in water. Once the solution containing fluoxetine was changed daily, the animals of the RES and CTRL groups also had the water changed to mimic the same manipulations in all analyzed groups. After 7 days of exposure, the animals were submitted to behavioral analyses.

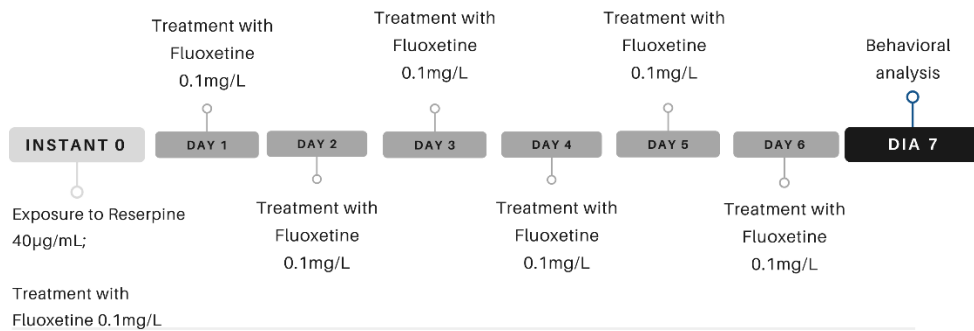


Figure 2:

Timeline of performing experimental procedures for treatment with fluoxetine in animals exposed to reserpine.

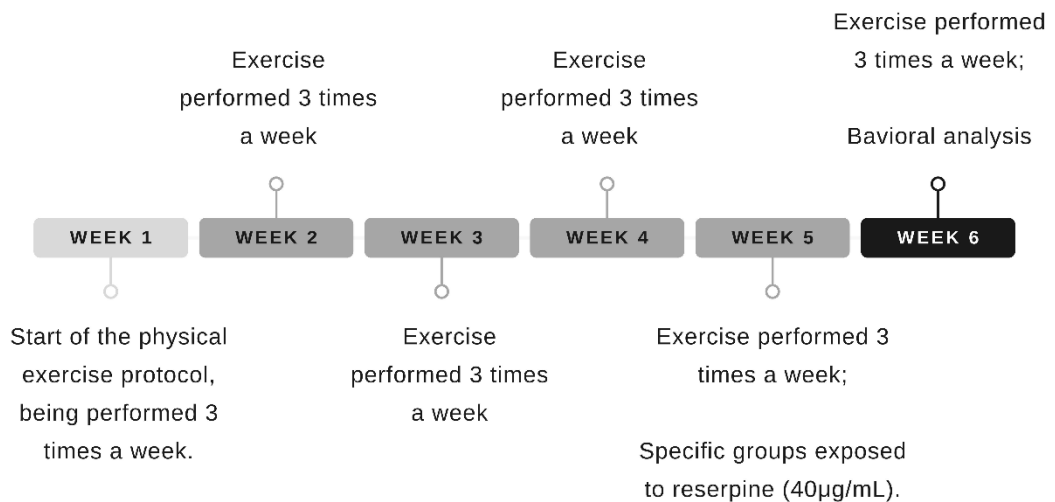


Figure 3: Timeline of experimental procedures performed in animals submitted to physical exercise and exposed to treatment with reserpine.

2.2.3. Physical Exercise Protocol

The adult zebrafish were submitted to aerobic training by increasing the swimming speed (0.2-0.5 m/s) performed using a water pump (Ocean tech, 12000 L/h, with flow controller). The velocity parameter was measured every day before each experiment in three parts of the flow rate (proximal, medial, and distal), using a flowmeter built by the *Laboratório*

*de Mecânica (LabMec) and Laboratório de Computação (LabCOM) of the Centro de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico da PUCRS (IDEIA). To carry out the physical exercise, a specific apparatus was used (Figure 4). The apparatus consists of a structure composed of two tanks. The first is a reservoir containing a heater and a flow filter that controls and regulates the speed of the water. The second is the exercise tank, in which the animals were placed to perform the task. This tank has a flow standardization barrier, responsible for ensuring that the water flow speed is evenly distributed. In addition, the tank has a protective barrier to prevent animals from being moved into the reservoir tank. This entire structure was fixed on aluminum support. This apparatus was based on the study by DePasquale and Leri (2018) and was made and tested by the *Laboratório de Mecânica (LabMec) and Laboratório de Computação (LabCOM) of the Centro de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico da PUCRS (IDEIA).**

The exercise protocol was based on the study performed by DePasquale and Leri (2018) with modifications. The protocol consisted of 30 minutes of exercise a day, 3 times a week, for 6 weeks, totaling 18 days of exercise. To analyze the effect of physical exercise in a reserpine-depression model, four groups of animals were tested, namely: 1) control group (CTRL), animals exposed only to water; 2) RES group, animals exposed to reserpine; 3) EXER group, animals submitted to physical exercise; and 4) EXER/RES group, animals exposed to physical exercise and reserpine treatment. In the EXER group, the animals were allocated in groups of 5 animals in the exercise apparatus and were submitted to the physical exercise protocol for 6 weeks; the EXER/RES group was submitted to physical exercise under the same conditions as the EXER group and it was acutely exposed to reserpine 7 days before the behavioral tests, at a concentration of 40 µg/mL for 20 minutes (Figure 3). After these 6 weeks, behavioral tests were performed.

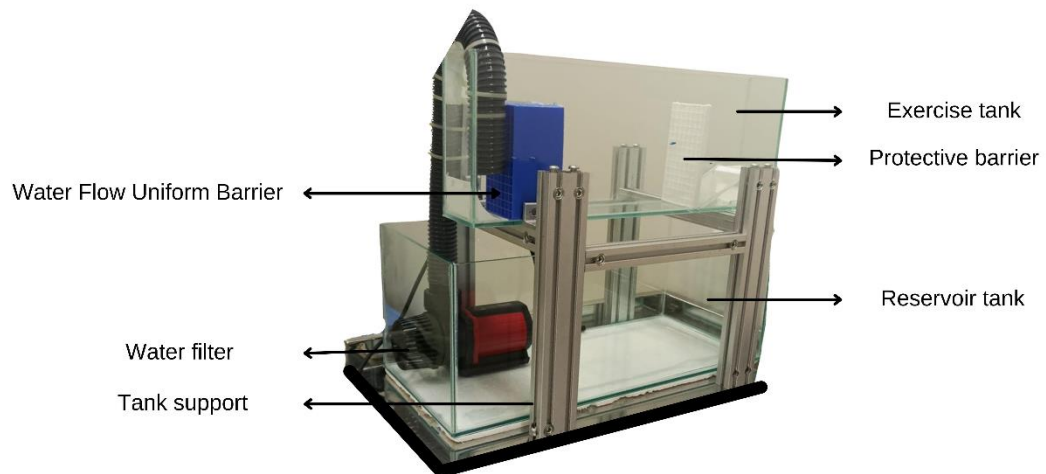


Figure 4: Photograph of the physical exercise apparatus used in the present study (Made by IDEIA-PUCRS).

2.3. Behavioral Analyzes

2.3.1. Novel Tank Test

The locomotor behavior of each animal was measured ($n = 20$). The experiments were performed in a temperature-controlled room ($28 \pm 2^\circ\text{C}$) between 8:30 am and 12:00 pm. The animals were placed individually in experimental tanks (30 cm long x 15 cm high x 10 cm wide). After 60 s habituation, their locomotor behavior was recorded for 5 min (Altenhofen et al., 2017; Nabinger et al., 2018) for subsequent analysis with EthoVision XT software. The analyzed behavioral parameters were immobile time (s), distance traveled (cm), velocity (cm/s, the ratio between distance traveled and movement), time spent in the bottom zone (s). The parameter movement was defined as the period during which the zebrafish exceeded the start velocity (0.6 cm/s) and remained moving until reaching the stop velocity (0.59 cm/s; Tran et al., 2016). The time spent in the upper zone is indicative of anxiolytic-like behavior, since zebrafish tend to spend more time at the bottom zone of the tank when introduced to a new environment and then move to the upper zone after a few minutes (Levin et al., 2007).

2.3.2. Social interaction

Zebrafish are schooling fish that may exhibit a preference for their conspecifics. Social interaction was evaluated ($n = 20$) between 8:30 am and 12:00 pm. Each fish was individually placed in an experimental tank (30 cm long x 15 cm high x 10 cm wide). An empty fish tank

was placed on one side of the experimental tank. The other side contained an identically sized tank that held 15 zebrafish, which were designated the “stimulus fish”. The fish undergoing evaluation was allowed to acclimatize to the experimental tank for 60 s, after which its behavior was video recorded over 5 min for subsequent analysis with EthoVision XT, according to Nabinger et al. (2018). To quantify fish preference between the “stimulus fish” side of their tank at the expense of the empty tank, the experimental tank was virtually divided into two equal sections. "Social Zone" corresponded to the segments closer to the conspecific school and "Non-social Zone" was considered as the segment closer to the empty tank. The amount of time the experimental fish spent in each zone was measured during the 5 min experiment.

2.3.3. Inhibitory avoidance task

To assess if reserpine could impair memory in adult animals, we performed an inhibitory avoidance test (n = 12) between 9:00 am and 12:00 pm (Blank et al., 2009; Nabinger et al., 2018). There were two sessions, training and test, with a 24-h interval between them. In each session, animals were placed individually in an experimental tank (18 cm long x 9 cm wide x 7 cm high) with water, divided by a guillotine door into two compartments of equal size: one black and one white. During the training session, the animal was placed in the white compartment (with the door closed) for 1-min habituation and environmental recognition. After this period, the divider was lifted. Once the animal crossed into the black side of the tank, the guillotine door was closed, and two electrodes attached to an 8.8 V stimulator delivered a 3 ± 0.2 V AC shock pulse (intensity measured between electrodes and the center of the dark compartment) for 5 s. The animal was gently removed from the apparatus and returned to its housing tank with only water for 24 h until the test session, which consisted of the same protocol as the training session, but without the electric shock. The latency to enter the black compartment during each session was measured, and the expected increase in the test session was used as an index of memory retention. A 180-s ceiling was imposed on test session latency measurements.

2.4. Analysis of serotonin and dopamine neurotransmitter and DOPAC levels

For analysis of neurotransmitter levels, liquid chromatography with a mass spectrometer (LC-MS) was used. The sample was prepared as described in other studies (Altenhofen et al., 2017; Zanandrea et al., 2020). The experiments were conducted using six samples containing a pool of six brains. Samples were separated and homogenized in 300 μ L of 0.1 M formic acid (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) and centrifuged at 20,000 x g for 20 min at 4°C. The

supernatant was transferred to a glass vial and injected into a Model 1290 Infinity UHPLC, an Agilent Model 6460 TQQQ Mass Spectrometer (all HPLC components and MassHunter software are from Agilent Technologies ®, Santa Clara, CA, USA). Chromatographic separations were performed on a Zorbax Eclipse Plus C18 RRHD, 5 x 2.1 mm, 1.8-micron column (Agilent, Paolo Alto, USA), using a mobile phase composed of (A) 0.1% formic acid and (B) acetonitrile with 0.1% formic acid, in gradient mode. The spectrometer was operated in MRM mode and the analytes were quantified with the following transitions, 5-HT (177 > 160), DA (154 > 119.1), and DOPAC (169 > 123 and 169 > 77). Quantifications were performed by external standardization and calibration curves were obtained with the following concentrations: DA 1.0, 5.0, 10.0, 15.0, and 20.0 ng/mL; SER 1.0, 5.0, 10.0, 15.0, and 20.0 ng/mL. Standards were prepared individually, at a concentration of 0,5 mg/mL. Before the deferred phases, they were mixed and proposed with mobile A and added by β -mercaptoethanol in an equivalent concentration of the samples. The results were corrected for the protein concentration of the samples.

2.5. Statistical Analysis

Data were expressed as mean \pm standard error of the mean (S.E.M), mean \pm standard deviation of the mean (S.D.M), or median with the interquartile range depending on the analysis. Outliers were removed using the “Identify outliers” function of the Graphpad Prism 8.4.2 software, using the ROUT method with $Q = 1\%$. Data distribution was assessed for normality using the Shapiro-Wilk and Kolmogorov-Smirnov tests. Depending on the distribution and number of groups, one of the following statistical tests was used: Mann-Whitney, Student's t-test, one-way ANOVA, or the Kruskal-Wallis test. Post-hoc analyzes were performed by Tukey or Dunn tests, according to the need to compare treated and control groups or between zones.

3. Results

3.1. Establishment of the MDD model

3.1.1. Behavioral and memory analysis of animals exposed to reserpine

The behavioral pattern of the animals was analyzed 7 days after a single exposure to reserpine (40 μ g/mL) for 20 minutes. We observed locomotor alterations after exposure to reserpine (Figure 5) in all parameters analyzed. Compared to the control group, animals exposed to reserpine showed an increase in the immobile time parameter ($F_{(17,17)} = 3.632$, $p < 0.0001$, Figure 5A) and time spent in the bottom zone ($p < 0.0001$, Figure 5E). On the other

hand, these animals show a reduction in the parameters of velocity ($p < 0.0001$, Figure 5B) and distance traveled ($F_{(19, 17)} = 3,500$, $p < 0.0001$, Figure 5C).

There was no significant difference in social interaction (Figure 6), analyzed by the time spent in the stimulus zone ($p = 0.6830$) and memory (Figure 7), when compared RES and CTRL groups.

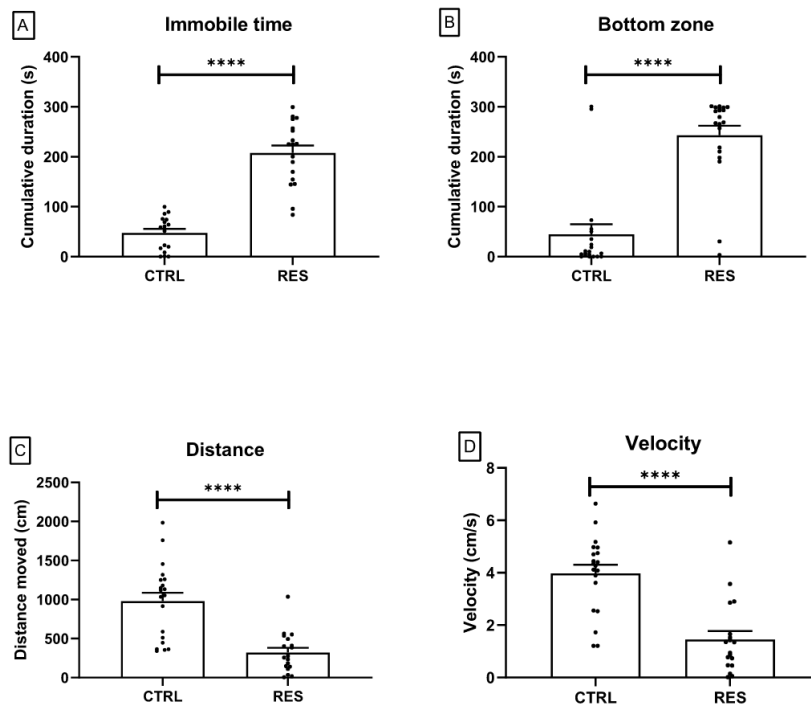


Figure 5: Locomotor parameters of zebrafish from control and reserpine groups, after 7 days of exposure. A – Immobile time (s); B – Time spent in the bottom zone (s); C - Distance traveled (cm); D – Velocity (cm/s) ($n = 18-20$). Data are expressed as mean \pm S.E.M. Immobile time and distance traveled were analyzed using Student's t-test and velocity, time in the upper and bottom zones was analyzed using the Mann-Whitney test. $p \leq 0.0001$ (****), when compared with the control group.

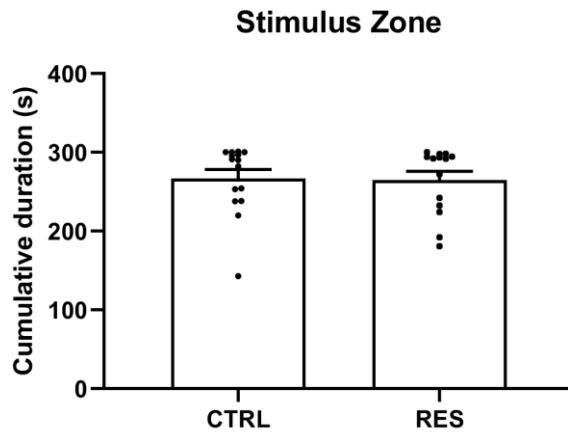


Figure 6: Social interaction parameters of zebrafish in the control and reserpine-exposed groups, after 7 days of exposure. Total time in the stimulus zone ($n = 18-20$). Data are expressed as mean \pm S.E.M. They were evaluated by the Mann-Whitney test. A statistical difference is considered when $p \leq 0.05$ (*).

3.1.2. Neurochemical analysis of animals exposed to reserpine

Monoamine levels were quantified 7 days after a single exposure (40 $\mu\text{g/mL}$) to reserpine for 20 minutes (Figure 8). The results shown a significant decrease in 5-TH ($F_{(5,5)} = 60.25$, $p < 0.0001$, Figure 8A) and DA levels ($F_{(5,4)} = 7.051$, $p < 0.0001$, Figure 8B) in the brains of RES group when compared to the CTRL group. On the other hand, an increase in the DOPAC levels was seen ($F_{(4,4)} = 1781$, $p = 0.0285$), as shown in Figure 8C.

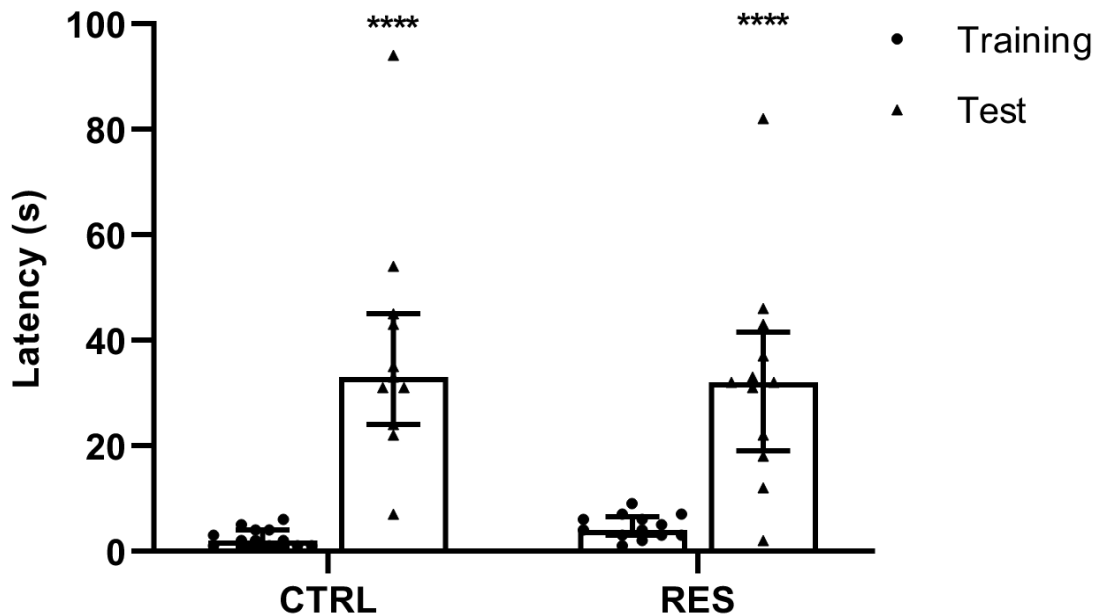


Figure 7: Aversive memory parameters of zebrafish, through inhibitory avoidance task, of the control and reserpine-exposed groups, after 7 days of exposure ($n = 12$). Data are expressed as the median \pm interquartile range and were analyzed individually for each group. **** $p < 0.0001$ indicate the differences between training and test sessions for each group compared by Mann-Whitney U matched pair test. There were no differences between training performances among all groups, as evaluated by the Kruskal-Wallis test.

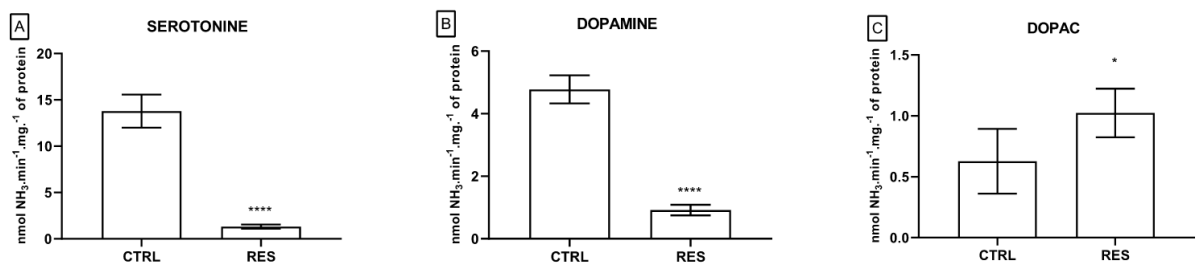


Figure 8: Analysis of serotonin, dopamine and DOPAC levels in zebrafish brains exposed to reserpine, compared with the control group ($n = 4-6$). Data were expressed as mean \pm S.D. Data were analyzed by Student's t-test. Considered statistical difference when $p \leq 0.05$ (*), $p \leq 0.0001$ (****).

3.1.3. Validation of the MDD model - Behavioral analysis of animals exposed to reserpine and treated with fluoxetine

Since the findings showed alterations only in locomotor parameters, we performed this task after fluoxetine treatment ($n = 18 - 20$). The results demonstrated a reversal of the behavioral effects caused by reserpine, as shown in Figure 9. Regarding immobile time and time spent in the bottom zone, the findings showed that FLU reversed the increase in these parameters caused by RES ($p < 0.0001$, Figure 9A and 9B). As a result, a reduction in the immobile time and time spent in the bottom zone of FLU ($p < 0.0001$ Figure 9A, $p = 0.0011$ Figure 9B) and FLU/RES ($p < 0.0001$ Figures 9A and 9B) can be seen, showing similar results to the CTRL group ($p < 0.0001$ Figures 9A and 9B). Likewise, fluoxetine treatment also altered the distance and velocity after reserpine exposure, since an increase was seen in FLU ($p = 0.0253$, Figure 9C; $p = 0.0222$, Figure 9D) and FLU/RES ($p = 0.0094$, Figure 9C; $p < 0.0001$ Figure 9D) groups.

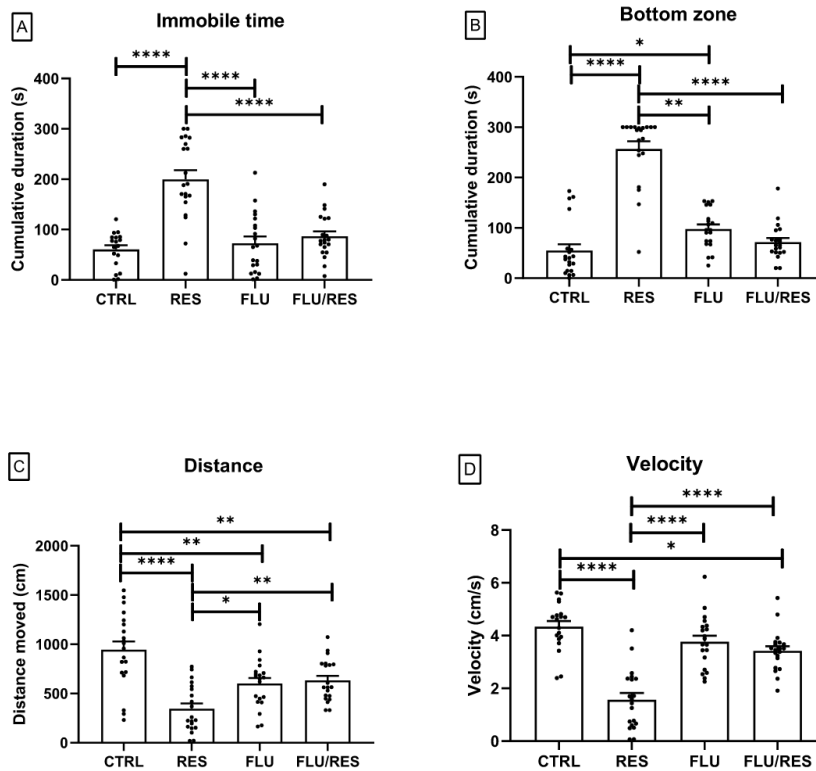


Figure 9: Exploratory and locomotor parameters of zebrafish from the control groups, treated with fluoxetine and/or exposed to reserpine, after 7 days of exposure. A – Immobile time (s); B – Time spent in the bottom zone (s); C - Distance traveled (cm); D – Velocity (cm/s) ($n = 18-20$). Data are expressed as mean \pm S.E.M. Data were analyzed by Kruskal-Wallis test, followed by post hoc Dunn test. Considered statistical difference when $p \leq 0.05$ (*), $p \leq 0.01$ (**), and $p \leq 0.0001$ (****).

3.2 Behavioral effect of physical exercise in reserpine-MDD model

The animals were subjected to physical exercise for 18 days over 06 weeks. In the last week, the animals were acutely exposed to reserpine (40 $\mu\text{g}/\text{mL}$), and 7 days after exposure, the behavioral analysis of locomotion was performed ($n = 18 - 22$), since only this task was shown to be altered after reserpine exposure. The results show that physical exercise prevents the alterations caused by reserpine exposure, reducing symptoms compatible with stress, anxiety, and depression in zebrafish (Figure 10). It was seen that physical exercise prevented the increase in immobile time and time spent in the bottom zone showed in RES group. The findings demonstrated a decrease in these parameters in EXER ($p = 0.0025$, Figure 10A; $p = 0.0049$, Figure 10B) and EXER/RES ($p < 0.0001$, Figure 10 A; $p = 0.0238$, Figure 10B) groups, showing similar results to the CTRL group ($p = 0.0272$, Figure 10A; $p < 0.0001$, Figure 10B). Likewise, when analyzing the parameters of velocity and distance, we observed that physical activity was also able to prevent the negative effects caused by reserpine. An increase in distance and velocity was observed in EXER ($p < 0.0001$, Figures 10C and 10D) and EXER/RES groups ($p = 0.0081$, Figure 10C; $p = 0.0002$, Figure 9D), showing similar values to the CTRL group ($p = 0.0087$, Figure 10C; $p = 0.0005$, Figure 10D), while a decrease in these parameters was observed in the RES group.

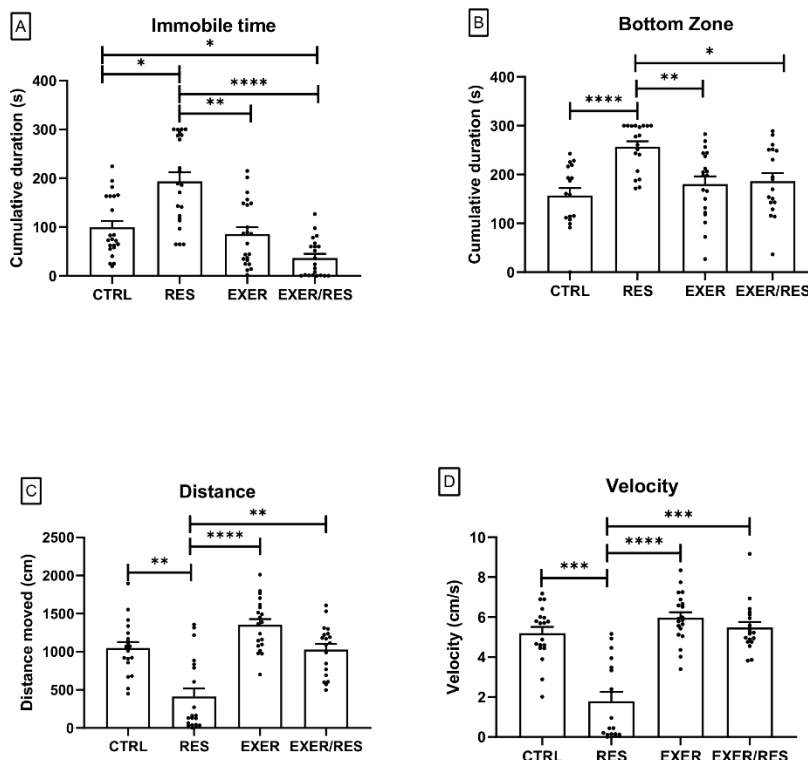


Figure 10: Exploratory and locomotor parameters of zebrafish from the control groups, submitted to physical exercise and/or exposed to reserpine, after 7 days of exposure. A – Immobile time (s); B – Time in the bottom zone (s); C - Distance traveled (cm); D – Velocity (cm/s) (n = 18-22). Data are expressed as mean \pm S.E.M. Data were analyzed by Kruskal-Wallis test, followed by post hoc Dunn test. Statistical difference when $p \leq 0.05$ (*), $p \leq 0.01$ (**), $p \leq 0.001$ (***) and $p \leq 0.0001$ (****).

4. Discussion

MDD is a psychiatric illness that exhibits specific debilitating symptoms. Depressive patients present a reduced life expectancy, worse life quality and cardiorespiratory capability, and an increased risk of developing Type 2 Diabetes compared to the general population (Bueno-Antequera et al., 2020). In addition, this pathology shows an increased incidence in the last decade, especially in the last two years, which may be related to the COVID-19 pandemic (Ettman et al., 2020; Varma et al., 2020; Daly et al., 2022). MDD is a clinical condition that requires studies aimed not only at treatment but also at prevention.

A safe and reliable way to explore and/or consolidate methods of preventing and treating MDD is animal experimentation. In this study, we used zebrafish as an organism model. For this, one of the aims of this study was to establish a depression model through reserpine administration in adult zebrafish. We choose this approach since it has a rapid response when compared to other methodologies for inducing depression symptoms in this species (Kyzar et al., 2013). Furthermore, we used the antidepressant fluoxetine to validate the reserpine-depression model. Afterward, we evaluated physical exercise as a potential preventive mechanism against the characteristic symptoms of depression in zebrafish, since physical exercise can cause positive alterations in the neurotransmitter levels involved in MDD (Basso and Suzuki et al., 2017).

Initially, we used the protocol established by Kyzar et al. (2013) for the induction of a depression model in zebrafish. In this protocol, after 7 days of reserpine exposure, we evaluated the behavior and memory of the animals. As a result, we observed no changes in social interaction and aversive memory. However, a study conducted by Samad et al. (2021) showed that reserpine was able to cause memory deficit in rodents. This divergent result may be due to the difference in the methodology used since in this study the animals were chronically exposed to reserpine for 28 days, while our study was an acute exposure. Moreover, our results showed alterations in locomotor activity of these animals when compared to the control group. The results showed a reduction in velocity and distance traveled as well as an increase in immobile

time and time spent in the bottom zone. This diminished locomotor activity, together with hypoactive exploratory behavior, indicates that reserpine mimics symptoms of depression in zebrafish. Furthermore, our results in the behavioral analysis are in line with other studies that also observed alterations in the locomotion for animals that were exposed to reserpine, such as the increase in immobile time (Kyzar et al., 2013; Zhang et al., 2018; Tang et al., 2019), variations in the distance traveled and velocity (Tang et al., 2019; Zhang et al., 2018).

We also performed neurochemical analysis to assess the levels of 5-HT, DA, and its metabolite DOPAC in reserpine-exposed zebrafish brains to check if that reserpine affects the neurotransmitters that are involved in MDD. The results showed a significant decrease in 5-HT and DA levels and an increase in DOPAC levels. These results were expected since reserpine acts on the vesicular monoamine transporter (VMAT) irreversibly, preventing the storage of these neurotransmitters in vesicles causing the depletion of 5HT, noradrenaline (NE), and DA in presynaptic neurons. Monoamines are accumulated in the cytoplasm, thus there is an increase in the availability of extravesicular DA, being metabolized by mitochondrial monoamine oxidase (MAO) to DOPAC, consequently increasing the levels of this metabolite (Trejo et al., 2001). On the other hand, Tang et al. (2019) showed a decrease in 5-HT levels in zebrafish and the same DA levels when compared to control. However, other studies in rodents showed results similar to those observed in our study with a reduction in both 5-HT and DA levels and an increase in DOPAC levels (Roffler-Tarlov et al., 1971; Bunney et al., 1973; Oe et al., 2010).

The findings showed in this study mimic the characteristics and symptoms presented in a depressive condition. For this reason, to validate the model in zebrafish, we used fluoxetine, a selective serotonin reuptake inhibitor (SSRI), which has its action already well characterized and is used as a treatment for depression. Our results showed that fluoxetine (0.1 $\mu\text{g/mL}$) reversed locomotor and exploratory effects caused by reserpine, confirming that behavioral symptoms found are related to a depression model. This result can be correlated with those found by Zhang et al. (2018), which demonstrated that sertraline, a SSRI antidepressant, reversed the behavioral effects promoted by reserpine in zebrafish, which were analyzed after 7 days of treatment with sertraline in the novel tank test. These findings confirm the establishment of a depression model in zebrafish using reserpine as an inducer.

In addition, the last phase of the present study evaluated how physical exercise, in a preventive way, influences the behavior of zebrafish exposed to reserpine. It is known that physical exercise has neurochemical effects, increasing peripheral levels of DA and 5-HT in humans (Basso and Suzuki, 2017) and the brain of rodents (Chennaoui et al., 2000; Renoir et al., 2011; Mizutani et al., 2013). Our results showed that physical exercise prevented the

behavioral changes induced by reserpine. These findings agree with previous studies showing that the behavioral change caused by reserpine in rodents is reversed by physical exercise (Aguiar et al., 2009).

The zebrafish is an animal model that has gained more space for studies on exercise physiology and behavioral neurobiology because it offers many advantages over other animal models since swimming tunnels are used to rigidly control the flow speeds, which allows protocols to be standardized across studies (DePasquale and Leri, 2018). In addition, zebrafish have a natural tendency to shoal, thus facilitating the use of group exercise protocols. Another factor to be considered is that “swimming against the current” is an intrinsic factor in zebrafish, making physical exercise a non-stressful activity.

In summary, our study demonstrated that the reserpine-depression model in zebrafish showed consistent results, with neurochemical and behavioral changes related to depression. In addition, fluoxetine and physical exercise prevented the behavioral changes induced by reserpine. Therefore, these findings can open possibilities for studies of new pharmacological or physiological pathways to revert MDD using the reserpine as a model, and to explore more effects of the physical exercise in the zebrafish.

Conflict of Interest

The authors declare that there are no conflicts of interest.

Acknowledgments

This study was financed in part by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Finance Code 001, Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq; 305035/2015-0), Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS; 17/2551-0000977-0), and Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia para Doenças Cerebrais, Excitotoxicidade e Neuroproteção. We thank the *Laboratório de Mecânica (LabMec)* and *Laboratório de Computação (LabCOM)* of the *Centro de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico da PUCRS (IDEIA)* for Building the exercise tank.

References

- Aguiar AS Jr, Araújo AL, da-Cunha TR, Speck AE, Ignácio ZM, De-Mello N, Prediger RD, 2019. Physical exercise improves motor and short-term social memory deficits in reserpinized rats. *Brain Res Bull.* 14;79(6):452-7.
- Altenhofen, S., Wiprich, M.T., Nery, L.R., Leite, C.E., Vianna, M.R.M.R., Bonan, C.D., 2017.

- Manganese(II) chloride alters behavioral and neurochemical parameters in larvae and adult zebrafish. *Aquat Toxicol.* 182, 172–183.
- American Psychiatric Association Diagnostic and statistical manual of mental disorders (5th edition (DSM-5)), American Psychiatric Publishing, 2013.
- Basso JC, Suzuki WA., 2017. The Effects of Acute Exercise on Mood, Cognition, Neurophysiology, and Neurochemical Pathways: A Review. *Brain Plast.* 2(2):127-152.
- Blank, M., Guerim, L.D., Cordeiro, R.F., Vianna, M.R.M., 2009. A one-trial inhibitory avoidance task to zebrafish: Rapid acquisition of an NMDA-dependent long-term memory. *Neurobiol Learn Mem.* 92, 529–534.
- Brigitta B, 2002. Pathophysiology of depression and mechanisms of treatment. *Dialogues Clin Neurosci.* 4(1):7-20.
- Bromet E, Andrade LH, Hwang I, et al., 2011. Cross-national epidemiology of DSM-IV major depressive episode *BMC Med.* P. 90.
- Bueno-Antequera J., Munguía-Izquierdo D., 2020. Exercise and Depressive Disorder. In: Xiao J. (eds) *Physical Exercise for Human Health. Advances in Experimental Medicine and Biology*, vol 1228. Springer, Singapore.
- Bueno-Notivol J, Gracia-García P, Olaya B, Lasheras I, López-Antón R, Santabárbara J., 2021. Prevalence of depression during the COVID-19 outbreak: A meta-analysis of community-based studies. *Int J Clin Health Psychol.* 21(1):100196.
- Bunney B.S., J.R. Walters, R.H. Roth, G.K., 1973. Aghajanian Dopaminergic neurons: effect of antipsychotic drugs and amphetamine on single cell activity. *J Pharmacol Exp Ther*, 185:560-571.
- CCAC guidelines on the care and use of fish in research, teaching and testing. Ottawa: Canadian Council on Animal Care. 2005: 94.
- Chennaoui M, Grimaldi B, Fillion MP, Bonnin A, Drogou C, Fillion G, Guezennec CY., 2000. Effects of physical training on functional activity of 5-HT_{1B} receptors in rat central nervous system: role of 5-HT-moduline. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.* 361(6):600-604.
- Cipriani A, Furukawa TA, Salanti G, Chaimani A, Atkinson LZ, Ogawa Y., et al., 2018. Comparative efficacy and acceptability of 21 antidepressant drugs for the acute treatment of adults with major depressive disorder: a systematic review and network meta-analysis. *The Lancet.* 7;391(10128):1357-1366.
- Daly, M., Robinson, E., 2022. Depression and anxiety during COVID-19. *The Lancet*, 399(10324): 518.

- Dean J, Keshavan M. The neurobiology of depression: An integrated view, 2017. *Asian J Psychiatr.* 27:101-111.
- DePasquale C, Leri J. The influence of exercise on anxiety-like behavior in zebrafish (*Danio rerio*), 2018. *Behav Processes.* 157:638-644.
- Disease and Injury Incidence and Prevalence Collaborators, 2018. Global, regional, and national incidence, prevalence, and years lived with disability for 354 diseases and injuries for 195 countries and territories, 1990–2017: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2017. *The Lancet.*
- Egan RJ, Bergner CL, Hart PC, et al., 2009. Understanding behavioral and physiological phenotypes of stress and anxiety in zebrafish. *Behav Brain Res.* 205 (1): 38–44.
- Ettman CK, Abdalla SM, Cohen GH, Sampson L, Vivier PM, Galea S., 2020. Prevalence of Depression Symptoms in US Adults Before and During the COVID-19 Pandemic. *JAMA Netw Open.*
- Gilbert M.J.H., Zerulla T.C., Tierney K.B., 2014. Zebrafish (*Danio rerio*) as a model for the study of aging and exercise: physical ability and trainability decrease with age. *Exp. Gerontol.* 50:106-113.
- Hasler G, Drevets WC, Manji HK., 2004. Discovering endophenotypes for major depression. *Neuropsychopharmacology.* 29:1765–1781.
- Horzmann KA, Freeman JL., 2016. Zebrafish Get Connected: Investigating Neurotransmission Targets and Alterations in Chemical Toxicity. *Toxics.* 4(3):19.
- Jesulola E, Micalos P, Baguley I.J., 2018. Understanding the pathophysiology of depression: From monoamines to the neurogenesis hypothesis model – are we there yet? *Behavioural Brain Research.* 341: 79-90.
- Kyza E, Stewart AM, Landsman S, Collins C, Gebhardt M, Robinson K, et al., 2013. Behavioral effects of bidirectional modulators of brain monoamines reserpine and d-amphetamine in zebrafish. *Brain Res.* 1527:108-116.
- Levin, E.D., Bencan, Z., Cerutti, D.T., 2007. Anxiolytic effects of nicotine in zebrafish. *Physiol Behav.* 90, 54–58.
- Luchiari A.C., Chacon D.M.M., 2013. Physical exercise improves learning in zebrafish, *Danio rerio*. *Behav. Processes.* 100: 44-47.
- Marcon, M., Herrmann, A.P., Mocelin, R. et al., 2016. Prevention of unpredictable chronic stress-related phenomena in zebrafish exposed to bromazepam, fluoxetine and nortriptyline. *Psychopharmacology.* 233: 3815–3824.

- Ministério da ciência, tecnologia e inovação, 2013. Diretrizes da Prática de Eutanásia do Conselho de Experimentação Animal – CONCEA. Brazil. Publish D.O.U. 1: 5.
- Mizutani K, Sonoda S, Karasawa N, Yamada K, Shimpo K, et al., 2013. Effects of exercise after focal cerebral cortex infarction on basal ganglion. *Neurol Sci.* 34(6):861-867.
- Nabinger, D.D., Altenhofen, S., Bitencourt, P.E.R., Nery, L.R., Leite, C.E., Vianna, M.R.M.R., Bonan, C.D., 2018. Nickel exposure alters behavioral parameters in larval and adult zebrafish. *Sci Total Environ.* 624, 1623–1633.
- Nguyen M, Stewart AMA, Kalueff AV., 2014. Aquatic blues: Modeling depression and antidepressant action in zebrafish. *Progress in Neuropsychopharmacology & Biological Psychiatry.* 55: 26-39.
- Oe, T.; Tsukamoto, M.; Nagakura, Y., 2010. Reserpine causes biphasic nociceptive sensitivity alteration in conjunction with brain biogenic amine tones in rats. *Neuroscience.* 69(4): 1860-1871.
- Renoir T, Chevarin C, Lanfumey L, Hannan AJ., 2011. Effect of enhanced voluntary physical exercise on brain levels of monoamines in Huntington disease mice. *PloS Curr.* 3:RRN1281.
- Roffler-Tarlov, S., Sharman, D.F., Tegerdine, P., 1971. 3,4-dihydroxyphenylacetic acid and 4-hydroxy-3-methoxyphenylacetic acid in the mouse striatum: a reflection of intra- and extra-neuronal metabolism of dopamine? *Br J Pharmacol*, 42:343-351.
- Samad N, Manzoor N, Muneer Z, Bhatti SA, Imran I., 2021. Reserpine-induced altered neuro-behavioral, biochemical, and histopathological assessments prevent by enhanced antioxidant defence system of thymoquinone in mice. *Metab Brain Dis.* 36(8):2535-2552.
- Schuch FB, Dunn AL, Kanitz AC, Delevatti RS, Fleck MP., 2016. Moderators of response in exercise treatment for depression: A systematic review. *J Affect Disord.* 195:40-9.
- Schuch, F.B., Stubbs, B., 2019. The Role of Exercise in Preventing and Treating Depression, *Current Sports Medicine Reports.* 18(8):299-304.
- Silveira M, Silveira J, Agues-Barbosa T, Carvalho M, Silva P and Luchiari A Zebra Fitness: Learning and Anxiety After Physical Exercise in Zebrafish, *Recent Advances in Zebrafish Research*, Yusuf Bozkurt. 2018. Intech Open. Doi: 10.5772/intechopen.74103.
- Tang YQ, Li ZR, Zhang SZ, Mi P, Chen DY, Feng XZ., 2019. Venlafaxine plus melatonin ameliorate reserpine-induced depression-like behavior in zebrafish. *Neurotoxicol Teratol.* 76:106835.

- Tran, S., Nowicki, M., Fulcher, N., Chatterjee, D., Gerlai, R., 2016. Interaction between handling induced stress and anxiolytic effects of ethanol in zebrafish: a behavioral and neurochemical analysis. *Behav Brain Res.* 298, 278–85.
- Trejo, F., Nekrassov, V., & Sitges, M. (2001). Characterization of vinpocetine effects on DA and DOPAC release in striatal isolated nerve endings. *Brain research*, 909(1-2), 59–67.
- Varma P, Junge M, Meaklim H, Jackson ML., 2021. Younger people are more vulnerable to stress, anxiety, and depression during COVID-19 pandemic: A global cross-sectional survey. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry.* 109:110236.
- Westerfield, M., 2000. *The zebrafish book. A guide for the laboratory use of zebrafish (Danio rerio)*, 4th Edition. University of Oregon Press, Eugene.
- Wilson, J. M.; Bunte, R. M.; Carty, A. J., 2009. Evaluation of rapid cooling and tricaine methanesulfonate (MS222) as methods of euthanasia in zebrafish (*Danio rerio*). *Journal of the American Association for Laboratory Animal Science: JAALAS.* 48(6): 785–789.
- Wong, R.Y., Oxendine, S.E. & Godwin, J., 2013. Behavioral and neurogenomic transcriptome changes in wild-derived zebrafish with fluoxetine treatment. *BMC Genomics.* 14:348.
- Zanandrea, R., Bonan, C. D., & Campos, M. M., 2020. Zebrafish as a model for inflammation and drug discovery. *Drug Discovery Today*, 25(12):2201-2211.
- Zhang S, Liu X, Sun M, et al., 2018. Reversal of reserpine-induced depression and cognitive disorder in zebrafish by sertraline and Traditional Chinese Medicine (TCM). *Behav Brain Funct.* 14(1):13.