



UNIVERSIDADE FEDERAL DO SUL E SUDESTE DO PARÁ
INSTITUTO DE ESTUDOS EM SAÚDE E BIOLÓGICAS
FACULDADE DE PSICOLOGIA

ELISSANDRA DA CONCEIÇÃO ARAÚJO

**EFEITOS DO ESTRESSE AGUDO DE CONTENÇÃO SOBRE PARÂMETROS
COMPORTAMENTAIS TIPO ANSIEDADE EM ZEBRAFISH (*Danio rerio*)**

MARABÁ

2023

ELISSANDRA DA CONCEIÇÃO ARAÚJO

**EFEITOS DO ESTRESSE AGUDO DE CONTENÇÃO SOBRE PARÂMETROS
COMPORTAMENTAIS TIPO ANSIEDADE EM ZEBRAFISH (*Danio rerio*)**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à Faculdade de Psicologia, do Instituto de Estudos em Saúde e Biológicas, da Universidade Federal do Sul e Sudeste do Pará, como requisito parcial para obtenção do grau de Bacharel em Psicologia.

Orientador: Prof. Dr. Caio Maximino de Oliveira

MARABÁ

2023

ELISSANDRA DA CONCEIÇÃO ARAÚJO

**EFEITOS DO ESTRESSE AGUDO DE CONTENÇÃO SOBRE PARÂMETROS
COMPORTAMENTAIS TIPO ANSIEDADE EM ZEBRAFISH (*Danio rerio*)**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à Faculdade de Psicologia, do Instituto de Estudos em Saúde e Biológicas, da Universidade Federal do Sul e Sudeste do Pará, como requisito parcial para obtenção do grau de Bacharel em Psicologia.

Data de aprovação: Marabá (PA), _____ de _____ de 2023.

Banca Examinadora:

Prof. Dr. Caio Maximino de Oliveira
Orientador

Prof. Dr. Diógenes Henrique de Siqueira Silva
Examinador Interno

Profa. Dra. Monica Gomes Lima Maximino
Examinador Externo

Dedico mais esta conquista aos meus pais, Abdias e Fortunata, que, mesmo em suas simplicidades, sempre me incentivaram a estudar e me ensinaram que posso alcançar todos os meus sonhos através da Educação.

AGRADECIMENTOS

Conseguir realizar esta pesquisa não foi uma tarefa fácil. No caminho, tive muitas mãos que me ajudaram e muitos que me proporcionaram a possibilidade de chegar até aqui. Com isso, através do direito à minha fé, não poderia iniciar estes agradecimentos sem demonstrar minha gratidão ao meu Deus, que esteve ao meu lado em cada passo desta pesquisa e em cada momento de minha vida.

Aos meus pais, dona Fortunata e seu Abdias, por cada apoio e cada conselho para que tudo isso fosse possível. Por todas as vezes que precisei abdicar de momentos em família para estar construindo este percurso, mas que se fizeram presente me dando forças para seguir em frente, mesmo a mais de 400 km de distância.

Ao Julielton Campos, com quem tenho o prazer de dividir minha vida nos últimos anos, que me acompanha desde o início desta graduação e muito me apoiou durante a execução desta pesquisa. A vida com você tem sido “como finalmente respirar ar puro”.

Aos meus amigos que tanto me acolheram, ajudaram e apoiaram durante esta trajetória. Agradeço ao Orivam Lalor por ser meu suporte em tantos momentos; à Nayane Paes por todo o incentivo e apoio; ao meu ‘grupinho’, Gizele, Milenna e Paula, e às minhas amigas e colegas de turma, Adriana, Fia, Iloyane, Janete e Laena, pelas mãos unidas neste propósito e por tornarem essa caminhada mais leve.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Caio Maximino, com quem tenho a honra de aprender sobre ciência e sobre ser humano desde meu primeiro ano de graduação. Obrigada por ter compartilhado comigo seus ensinamentos e orientações e por ter aceito o desafio e a paciência de construirmos juntos esta pesquisa.

Aos meus colegas de experimento, Milenna Almeida, Evagno Junior, Aurora Rubria, Maria Clara, Sara Pedrosa, Loanne Xavier, Larissa Oliveira e Bruna Costa, por terem contribuído para que este estudo se tornasse real, bem como a todos os integrantes do LaNeC, Gerpa e LaNeF pela contribuição direta e indiretamente nesta etapa.

À Universidade Federal do Sul e Sudeste do Pará (Unifesspa), não só pelo espaço de pesquisa, mas pelo acolhimento durante todos estes anos. Em especial, à Faculdade de Psicologia (Fapsi), com professores de determinação e excelência que contribuíram significativamente para que eu chegasse até aqui.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo apoio financeiro durante a realização desta pesquisa.

*E hoje eu sou quem eu sou, pois Sua mão me acompanhava.
Mas eu sei, não é o fim, é só o começo da jornada.*
– Vocal Livre

RESUMO

O estresse agudo de contenção (EAC) tem sido utilizado como um importante indutor de respostas comportamentais em estudos de cunho farmacológico, patológico e fisiológico em animais. Em vertebrados, respostas de estresse estão relacionadas às respostas de ansiedade, mas a neurobiologia destes mecanismos complexos ainda não é clara. Por conseguinte, modelos animais têm sido utilizados experimentalmente para investigar a fisiopatologia desses mecanismos. O zebrafish (*Danio rerio*) tem emergido como um organismo-modelo essencial para essas investigações, devido às suas características genéticas homólogas e ao seu potencial em testes comportamentais. Assim, o objetivo deste estudo foi avaliar os efeitos do EAC em parâmetros comportamentais tipo ansiedade no zebrafish. Para tal, 12 animais foram expostos a 90 min de contenção em microtubos de 1,5 ml, posicionados em uma estante de plástico dentro de um aquário, e um grupo controle com 12 animais foi mantido nas mesmas circunstâncias, mas sem a restrição nos microtubos. Após os 90 min, todos os animais foram submetidos ao teste de distribuição vertical eliciada pela novidade e ao teste de preferência claro/escuro. Os dados obtidos foram analisados estatisticamente através do teste *t* de Student, com nível de significância em $p < 0,05$. Os resultados indicam que não houve diferenças estatisticamente significativas entre os grupos controle e expostos ao EAC nas variáveis observadas em ambos os testes, com exceção do aumento de congelamento do animal na parte clara do teste de preferência ($t(22) = -1,82$; $p = 0,041$). Quando comparados com pesquisas anteriores, esses achados são, ao mesmo tempo, concordantes e discordantes em relação às variáveis estudadas. Na literatura analisada, há uma inconsistência entre os protocolos adotados nas pesquisas com EAC, com diferenças importantes nos procedimentos de execução do estressor e dos testes comportamentais, que poderiam explicar as divergências entre os achados desta pesquisa e de outros estudos envolvendo exposição ao EAC. Além do mais, a literatura apresenta algumas diferenças entre os testes comportamentais utilizados neste estudo que podem ter influenciado no aumento de congelamento do animal apenas no teste de preferência claro/escuro. Por fim, observamos a necessidade de uma melhor padronização dos procedimentos de execução do EAC e dos referidos testes comportamentais. Também, mais pesquisas na área se mostram cruciais para compreender os fenômenos observados neste trabalho e na complexidade do estresse, ansiedade e comportamento animal.

Palavras-chave: estresse; ansiedade; EAC; zebrafish; comportamento.

ABSTRACT

Acute restraint stress (ARS) has been used as an important inducer of behavioural responses in pharmacological, pathological and physiological studies in animals. In vertebrates, stress responses are related to anxiety responses, but the neurobiology of these complex mechanisms is still unclear. Therefore, animal models have been used experimentally to investigate the pathophysiology of these mechanisms. The zebrafish (*Danio rerio*) has emerged as an essential model organism for these investigations, due to its homologous genetic characteristics and its potential in behavioural tests. Thus, the aim of this study was to evaluate the effects of ARS on anxiety-like behavioural parameters in zebrafish. To this end, 12 animals were exposed to 90 min of restraint in 1.5 ml microtubes, positioned on a plastic shelf inside an aquarium, and a control group with 12 animals was maintained under the same circumstances, but without the restraint in the microtubes. After 90 min, all the animals were subjected to the novelty elicited vertical distribution test and the light/dark preference test. The data obtained was statistically analysed using Student's t-test, with a significance level of $p < 0.05$. The results indicate that there were no statistically significant differences between the control and ARS-exposed groups in the variables observed in both tests, with the exception of the animal's increased freezing in the clear part of the preference test ($t(22) = -1.82$; $p = 0.041$). When compared with previous research, these findings are both concordant and discordant in relation to the variables studied. In the literature analysed, there is inconsistency between the protocols adopted in research with ARS, with important differences in the procedures for carrying out the stressor and the behavioural tests, which could explain the differences between the findings of this research and those of other studies involving exposure to ARS. Furthermore, the literature shows some differences between the behavioural tests used in this study which may have influenced the increase in the animal's freezing only in the light/dark preference test. Finally, we note the need for better standardisation of the procedures for carrying out the ARS and the behavioural tests mentioned above. Further research in this area is also crucial to understanding the phenomena observed in this study and the complexity of stress, anxiety and animal behaviour.

Key words: stress; anxiety; ARS; zebrafish; behavior.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Esquema representativo de sistemas de adaptação ao estresse em mamíferos e teleósteos.....	15
Figura 2 – Zebrafish (<i>Danio rerio</i>) adulto.....	19
Figura 3 – Aparato utilizado para o experimento de EAC com aquários para estressados e controle.....	24
Figura 4 – Esquema de aparato utilizado na realização do teste de distribuição vertical eliciada pela novidade.....	25
Figura 5 – Esquema de aquário de realização do teste de preferência claro/escuro.....	26
Figura 6 – Aparato utilizado durante experimento de exposição ao EAC e testagem comportamental.....	27
Figura 7 – Análise dos parâmetros comportamentais observados no teste de distribuição vertical eliciada pela novidade para os grupos controle e expostos ao EAC.....	28
Figura 8 – Análise dos parâmetros comportamentais observados no teste de preferência claro/escuro para os grupos controle e expostos ao EAC.....	29

LISTA DE SIGLAS

5HT	5-hidroxitriptamina (serotonina)
ACTH	Adrenocorticotropic hormone (hormônio adrenocorticotrófico)
ARS	Acute Restraint Stress
BZDs	Benzodiazepínicos
CONCEA	Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal
CRF	Corticotropin-releasing factor (fator liberador de corticotropina)
DVEN	Teste de distribuição vertical eliciada pela novidade
EAC	Estresse Agudo de Contenção
GABA	Ácido γ -aminobutírico
GC	Glicocorticoides
HHA	Eixo hipotálamo-hipófise-adrenal
HHI	Eixo hipotálamo-hipófise-inter-renal
LANEC	Laboratório de Neurociências e Comportamento
PVN	Núcleo paraventricular
SAG	Síndrome da Adaptação Geral
SNC	Sistema Nervoso Central
TCE	Teste de preferência claro/escuro
UNIFESSPA	Universidade Federal do Sul e Sudeste do Pará

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	11
1.1 Neurofisiologia do estresse	11
1.2 Estresse e ansiedade	13
1.3 Testes em animais para o estudo do comportamento	14
1.4 O uso do zebrafish como organismo-modelo	16
1.5 Estresse Agudo de Contenção	18
2 OBJETIVOS	20
2.1 Objetivo geral	20
2.2 Objetivos específicos	20
3 JUSTIFICATIVA	21
4 MATERIAIS E MÉTODOS	21
4.1 Animais e alojamento	21
4.2 Exposição ao estresse agudo de contenção	22
4.3 Testes comportamentais	23
4.3.1 Teste de distribuição vertical eliciada pela novidade.....	23
4.3.1 Teste de preferência claro/escuro.....	24
4.4 Delineamento experimental	24
4.5 Análise estatística	25
5 RESULTADOS	26
6 DISCUSSÃO	27
7 CONSIDERAÇÕES FINAIS	31
8 REFERÊNCIAS	32

1 INTRODUÇÃO

Os estudos sobre estresse têm sido cada vez mais ampliados em relação às décadas passadas, principalmente sobre os componentes neurobiológicos de sua resposta e da sua associação a doenças físicas. No senso comum, o estresse também aparece vinculado à ideia de esforço e de tensão. O termo, derivado do latim “*stringere*” (apertar, comprimir), que era usado na engenharia, foi empregado pela primeira vez em biologia por Hans Selye (1907-1982), em 1936, quando estudou experimentalmente respostas de animais a situações agressivas em diferentes ambientes (SOUSA; SILVA; GALVÃO-COELHO, 2015). Selye (1936), então, delineou estresse como respostas do organismo a quaisquer estímulos ou demandas, sem especificidade adaptativa, resultantes ou causadas por condições favoráveis ou não. Para essas respostas, Hans Selye deu o nome de Síndrome da Adaptação Geral (SAG), ou Síndrome do Estresse, na qual o corpo realiza tentativas de evitação ou redução dos efeitos causados pelos estressores (SELYE, 1936).

Após os estudos de Selye, houve um crescente interesse entre pesquisadores voltado às dinâmicas e efeitos do estresse em seres vivos. Viu-se, desde então, que nem todos os detalhes da teoria de Selye estavam corretos, mas continua-se a estudar a concepção de que a exposição ao estresse contínuo pode causar danos ao organismo e resultar no aparecimento de doenças físicas (GRAEFF; ZANGROSSI JUNIOR, 2010; SAPOLSKY; ROMERO; MUNCK, 2000). A partir disso, o conceito de estresse vem sendo elaborado por diversos autores como um conjunto de alterações fisiológicas e comportamentais que ocorrem no organismo na presença de agentes estressores, sejam eles de caráter físico ou psicossocial, que atuam modificando a homeostase – ou equilíbrio interno – e fazendo com que o corpo entre em um processo de adaptação. O estresse também aparece vinculado à manifestação de inúmeras doenças, às quais são descritas desde transtornos mentais até úlceras gástricas, cânceres e doenças cardiovasculares (BOFF; OLIVEIRA, 2021; ENCARNAÇÃO, 1986; SANTOS; SANTOS, 2005; SILVA; TORRES, 2020).

1.1 Neurofisiologia do estresse

As respostas fisiológicas de estresse demandam a atividade de alguns sistemas para o restabelecimento da homeostase, através da estimulação e modulação de neurotransmissores e sistemas neuroendócrinos, que atuam nas funções comportamentais, cognitivas e emocionais do organismo. Sob condições normais, as mudanças fisiológicas que ocorrem nesse processo são adaptativas e, de forma primitiva, objetivam a sobrevivência, bem como se desenvolvem

através de um ciclo circadiano, produzindo e secretando neuro-hormônios de forma rítmica ao longo do dia (BOOF; OLIVEIRA, 2021; CHROUSOS, 1998; SANTOS; SANTOS, 2005). Em vertebrados, um dos principais sistemas de adaptação ativado por estressores é o eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (HHA), que se destaca pelo desencadeamento de respostas hormonais, culminando na liberação de glicocorticoides, presente em mamíferos, aves, répteis e alguns anfíbios. (BOUYOUCOS *et al.*, 2021; TSIGOS *et al.*, 2020).

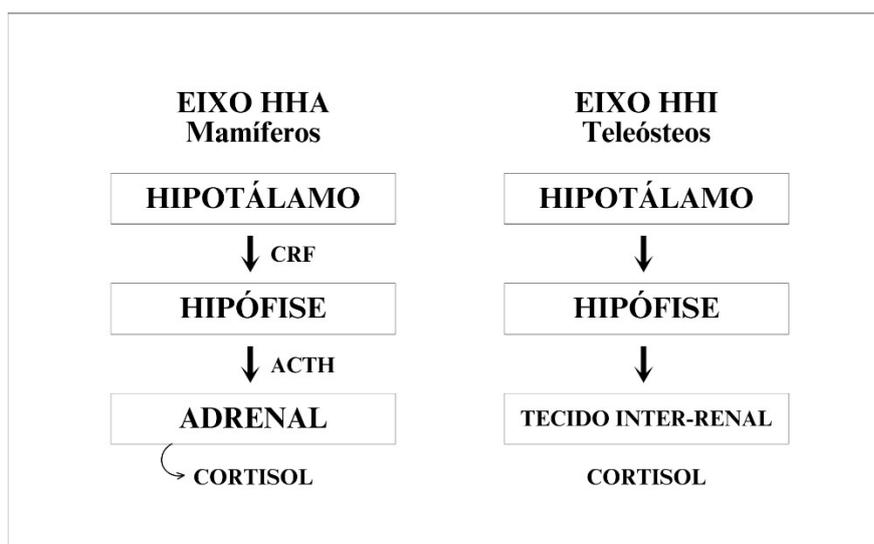
Quando em exposição a estressores, o hipotálamo inicia uma sequência de respostas através do núcleo paraventricular (PVN), que aumenta a secreção do fator liberador de corticotropina (*corticotropin-releasing factor* - CRF), um peptídeo de 41 aminoácidos, sobretudo produzido por neurônios parvocelulares, considerado o principal regulador hipotalâmico do eixo HHA. Após a secreção, o CRF, por sua vez, é levado ao lobo anterior da glândula pituitária/hipófise (adeno-hipófise), através do sistema porta-hipofisário, e estimula o aumento de liberação do hormônio adrenocorticotrófico (*adrenocorticotropic hormone* – ACTH), regulador basilar da secreção de glicocorticoides e androgênios adrenais. Também conhecido como corticotropina, o ACTH é um peptídeo de 39 aminoácidos gerado por células corticotróficas da adeno-hipófise. (BOUYOUCOS *et al.*, 2021; CHROUSOS, 1998; TSIGOS; CHROUSOS, 2002; TSIGOS *et al.*, 2020)

O ACTH é transportado pela corrente sanguínea e segue até o córtex da glândula adrenal (suprarrenal), promovendo a secreção de glicocorticoides (GC), com destaque ao cortisol, um dos principais ‘hormônios do estresse’ em mamíferos. Dentre os diversos papéis dos glicocorticoides nos sistemas corporais está a intensa concentração de lipídeos e aminoácidos, como reserva de energia para uso frente a estressores (BOOF; OLIVEIRA, 2021; LEVINE *et al.*, 2007). O cortisol é um hormônio sintetizado a partir do colesterol e sua secreção ocorre por meio de um sistema de retroalimentação negativa através do eixo HHA, exercendo atividades relevantes no organismo. Em níveis basais, a liberação de cortisol ocorre através de um ritmo de variação circadiana, interagindo com outros padrões biológicos importantes (GRAEFF, 2007; MARINHO SARAIVA; SOARES FORTUNATO; GAVINA, 2005).

Em peixes teleósteos, o sistema análogo ao HHA é o eixo hipotálamo-hipófise-interrenal (HHI), sendo o tecido inter-renal homólogo à glândula adrenal em mamíferos. Quando esse eixo é acionado em resposta a um estressor, o CRF é liberado pelo hipotálamo e estimula a pituitária a sintetizar ACTH e liberá-lo na corrente sanguínea, que chega até o rim cefálico, promovendo a secreção de cortisol. Dentre as mais diversas funções do cortisol estudadas em teleósteos na resposta de estresse, destacam-se o aumento do metabolismo e de energia para a

restauração da homeostase. O eixo HHI é semelhante ao eixo HHA em mamíferos, principalmente na participação de cortisol durante o processo neuroendócrino, ao invés da corticosterona em roedores, tornando os teleósteos animais relevantes na pesquisa de estresse em seres humanos. (BOUYOUCOS *et al.*, 2021; GNEIDING *et al.*, 2019; NESAN; VIJAYAN, 2016; PIATO *et al.*, 2011; TSALAFOUTA *et al.*, 2014; ZHANG *et al.*, 2015)

Figura 1 – Esquema representativo de sistemas de adaptação ao estresse em mamíferos e teleósteos



Fonte: Elaborado pela autora (2023)

1.2 Estresse e ansiedade

Em vertebrados, as respostas fisiológicas e comportamentais a estressores estão relacionadas às respostas de ansiedade. Geralmente, a ansiedade também é associada ao medo – uma resposta a um perigo iminente real – e ambos constituem reações naturais quando sob uma ameaça em potencial, por isso, são considerados respostas adaptativas do organismo. Em seres humanos, a ansiedade refere-se a uma emoção negativa, acompanhada de tensão muscular e preocupação em relação ao futuro. É uma reação adaptativa do corpo e, em quantidade apropriada, permite essencial desempenho e preparação para lidar com distintas situações. No entanto, quando esse mecanismo da ansiedade perde sua eficiência em se autorregular, tornando-a em excesso continuamente, essa sobrecarga acaba se transformando em uma série de transtornos, conhecidos como transtornos de ansiedade. (ARBORELIUS *et al.*, 1999; CHROUSOS, 1998; MAXIMINO *et al.*, 2012)

No que diz respeito à base neural da ansiedade, há uma grande complexidade no entendimento dos transtornos (GERLAI, 2010). Sabe-se que o eixo HHA tem sido implicado na neurofisiologia da ansiedade a partir da atuação do CRF no mecanismo de expressão das

respostas ansiosas. O eixo HHA relaciona-se com importantes áreas cerebrais envolvidas na ansiedade, como o sistema límbico, o *locus coeruleus* e o córtex pré-frontal (ARBORELIUS *et al.*, 1999; GRAEFF; ZANGROSSI JUNIOR, 2010). Descobertas sobre o funcionamento de alguns sistemas de neurotransmissores também tiveram impacto importante na compreensão do medo e da preocupação, desencadeando estudos da neurobiologia da ansiedade, bem como no seu tratamento. Monoaminas (noradrenalina, serotonina e dopamina) e aminoácidos (GABA e glutamato) são apresentados como os tipos mais relevantes de neurotransmissores envolvidos na modulação do comportamento ansioso. (GERLAI, 2010; GRAEFF; ZANGROSSI JUNIOR, 2010; KALUEFF; NUTT, 2007)

Entre as monoaminas, os níveis de serotonina (5-hidroxitriptamina ou 5HT) – neurotransmissor que age na regulação do comportamento, além das regulações de humor e processos de pensamento – têm sido relacionados à fisiopatologia dos transtornos de ansiedade, os quais apresentam grande sobreposição com os sintomas do transtorno depressivo maior, e antidepressivos têm demonstrado eficácia no tratamento de transtornos ansiosos (GRAEFF, 2002; MAXIMINO *et al.*, 2013). Já o ácido γ -aminobutírico (GABA), principal neurotransmissor inibitório do sistema nervoso central, tem sido associado à ansiedade através da atuação ansiolítica de benzodiazepínicos (BZDs), que interagem com receptores GABA_A (KALUEFF; NUTT, 2007; LYDIARD, 2003). O glutamato, neurotransmissor excitatório predominante do Sistema Nervoso Central (SNC), também está implicado na neurobiologia da ansiedade, por meio de estudos com agonistas e antagonistas dos receptores glutamatérgicos como alvo de diversos fármacos (POZZER; OLIVEIRA, 2007; STEWART *et al.*, 2012).

1.3 Testes em animais para o estudo do comportamento

Mesmo com as intensas investigações em relação à farmacologia do estresse e ansiedade, ainda não está clara a neurobiologia desses mecanismos tão complexos, tornando-se necessárias mais pesquisas na área. Os modelos animais experimentais têm sido amplamente utilizados como ferramenta essencial na pesquisa de diversas neuropatologias, incluindo transtornos relacionados ao estresse e transtornos de ansiedade, e contribuído tanto nas buscas de novos tratamentos psicofarmacológicos quanto em pesquisas clínicas que buscam melhor compreensão da fisiopatologia dos transtornos mentais. No entanto, são encontradas diversas limitações na utilização desses modelos, o que torna necessária a sua validação para que possam ser úteis, seguindo critérios de validade preditiva, de construto e

de face. (ASSAD *et al.*, 2020; GERLAI, 2010; MAXIMINO; ARDNT; VAN DER STAAAY, 2019; YANG *et al.*, 2020)

Pesquisas experimentais que utilizam modelos animais abrangem desde estudos pré-clínicos com drogas psicoativas até estudos dos sistemas neurais que atuam na modulação das reações comportamentais desses animais frente aos diversos estímulos. Mais especificamente, a modelagem de transtornos mentais envolve simulações baseadas em estudos comparativos dos fatores nos quais os transtornos se encontram. Para a investigação de atividades farmacológicas, são usados testes de triagem, no intuito de prever possíveis atividades comportamentais úteis para avaliação de novos candidatos (CRUZ *et al.*, 1997). Os modelos mais presentes na literatura para o estudo da ansiedade, por exemplo, envolvem testes de comportamento condicionado (como o condicionamento pavloviano e o condicionamento de luta/fuga) e testes de comportamento não condicionado (como o labirinto em cruz elevado, o campo aberto, a caixa claro/escuro ou preferência claro/escuro para peixes), os quais possuem diferenças, inclusive em termos de base neurais (MAXIMINO; ARDNT; VAN DER STAAAY, 2019).

Entre esses modelos, o teste de preferência claro/escuro (TCE) tem sido amplamente utilizado em pesquisas que avaliam o comportamento tipo ansiedade com peixes, tendo como base a preferência inata do animal por ambientes escuros – ou escototaxia (MAXIMINO *et al.*, 2007; MAXIMINO *et al.*, 2010b; SERRA; MEDALHA; MATTIOLI, 1999). Os animais são colocados em um aquário que possui uma metade na cor branca e a outra metade na cor preta, no qual é possível observar o comportamento do animal durante a avaliação de preferência (SERRA; MEDALHA; MATTIOLI, 1999). A preferência do animal pelo compartimento escuro não parece ser impulsionada pela fuga do compartimento branco, mas parece ter como base um conflito entre aproximação-evitação (KYSIL *et al.*, 2017; MAXIMINO *et al.*, 2012).

De acordo com protocolo estabelecido por Maximino *et al.* (2010b), a execução do teste consiste em introduzir o animal em um compartimento de cruzamento entre a parte clara e a parte escura do aquário, separado por portinholas removíveis, para um tempo de habituação. Após alguns minutos de aclimação e a remoção das portas deslizantes do compartimento central, é observado o comportamento do animal no conflito entre as áreas claras e escuras, e o número e duração de entradas nos compartimentos preto ou branco, bem como a velocidade e o ângulo de natação, por um período de 15 minutos.

O comportamento tipo ansioso no teste claro/escuro pode ser averiguado pelo tempo que passam no compartimento branco; manipulações que aumentam a ansiedade diminuem o

tempo no compartimento branco, enquanto manipulações que diminuem a ansiedade aumentam o tempo no compartimento branco. Além disso, podem ser observadas no teste de preferência claro/escuro a atividade exploratória do animal (avaliando as entradas no compartimento branco), padrões de nado errático, tigmotaxia (tendência em permanecer próximo às paredes do aquário), avaliação de risco e congelamento do animal (MAXIMINO *et al.*, 2010b). Um estudo envolvendo substância de alarme aguda demonstrou aumentar a escototaxia, o nado errático e o congelamento, em comparação, drogas ansiolíticas diminuíram a escototaxia e a avaliação de risco (MAXIMINO *et al.*, 2014).

Outro modelo frequentemente utilizado para avaliar comportamento tipo ansiedade diz respeito ao *teste de distribuição vertical eliciada pela novidade (DVEN)*, onde o animal apresenta tendência a passar mais tempo na parte inferior quando colocado em um aquário novo. O peixe em um ambiente de novidade busca proteção de forma primitiva mergulhando até o inferior do aquário, com momentos de congelamento e redução da exploração nos minutos iniciais. Após um período de aclimação, tende a ocorrer um aumento da exploração do animal pelo aquário (BLASER; GERLAI, 2006; BLASER; CHADWICK; MCGINNIS, 2010; CACHAT *et al.*, 2010). Dessa forma, a partir de protocolo estabelecido por Cachat *et al.* (2010), o procedimento do teste constitui-se em transferir rapidamente o animal para o aquário novo com o auxílio de uma rede, e observa-se o comportamento por um período de seis minutos.

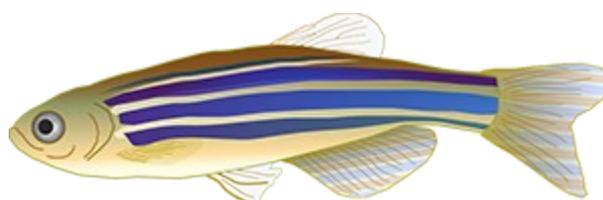
Através do teste de distribuição vertical eliciada pela novidade pode-se analisar comportamentos tipo ansiedade essenciais para pesquisas na área, como a geotaxia, que consiste na preferência do animal pelo inferior do novo aquário, o tempo gasto no topo, a média de entradas no topo, além de variáveis de distâncias, latência, velocidade, padrões de nado errático e congelamento (BLASER; CHADWICK; MCGINNIS, 2010; CACHAT *et al.*, 2010). Pesquisas envolvendo substância de alarme e predadores demonstraram que a preferência de animais pela parte inferior do aquário parece se dever a uma fuga do topo, possivelmente associada à ecologia predatória de seu ambiente natural. Ainda assim, drogas ansiolíticas parecem diminuir essa preferência (AHMED; FERNANDES; GERLAI, 2012; SPEEDIE; GERLAI, 2008; STEWART *et al.*, 2011).

1.4 O uso do zebrafish como organismo-modelo

Com características genéticas e práticas fundamentais, o zebrafish (*Danio rerio*) vem sendo cada vez mais utilizado como organismo-modelo em diversas áreas das ciências – tais como a fisiologia, genética, farmacologia, biologia e toxicologia – e apresenta grande

potencial em testes comportamentais para o estudo das neuropatologias e neuropsicofarmacologia. (MAXIMINO *et al.*, 2010a). Originário do sul da Ásia, o zebrafish pertence à subclasse de peixes teleósteos acessíveis a criações em cativeiro e, quando adulto, mede cerca de 3 a 4 cm (Figura 2). Esses animais possuem sistemas neuroquímicos que se assemelham com vertebrados terrestres, como seres humanos, tais como a presença do eixo HHI, análogo ao eixo HHA. Estudos demonstraram que o zebrafish apresenta aumento da secreção de cortisol em resposta a uma vasta gama de estressores, tornando-o um animal relevante nas pesquisas de estresse (CHAMPAGNE *et al.*, 2010).

Figura 2 – Zebrafish (*Danio rerio*) adulto



Fonte: National Eye Institute¹

O zebrafish tem sido um dos principais organismos-modelo em pesquisas comportamentais, principalmente após as pesquisas de George Streisinger, na década de 1980, envolvendo a investigação de técnicas genéticas capazes de identificar mutações no desenvolvimento embrionário desses animais (RESENDE; SOCCOL, 2015), mas as pesquisas com zebrafish datam desde 1930 em trabalhos com desenvolvimento embriológico (LIESCHKE; CURRIE, 2007). Os estudos envolvendo esse animal em áreas como a neurobiologia e neurociência são mais recentes. Como organismo-modelo para pesquisas, o zebrafish apresenta vantagens em relação a outros animais, como o tamanho pequeno, sugerindo espaços menores para manutenção, o baixo custo e a alta sensibilidade a substâncias químicas. Além disso, possui grande similaridade genética com o ser humano e, aproximadamente, 70% dos seus genes são homólogos aos genes de doenças humanas (LIESCHKE; CURRIE, 2007; RESENDE; SOCCOL, 2015).

O uso do zebrafish em pesquisas que envolvem ansiedade, estresse e medo tem crescido nos últimos anos, demonstrando o grande potencial da espécie como ferramenta em estudos farmacológicos (LIESCHKE; CURRIE, 2007; MAXIMINO *et al.*, 2010a). Foram observados efeitos de várias drogas no comportamento desse animal – como etanol,

¹ Disponível em: <<https://www.nei.nih.gov/sites/default/files/styles/small/public/2020-09/Zebrafish%2C%20adult%20300%20pixels.png?itok=qQIrH2Ru>>. Acesso em: 06 ago. 2023.

fluoxetina, cafeína, nicotina e cocaína – apresentando alterações importantes no estudo da ansiedade em zebrafish (BLASER; CHADWICK; MCGINNIS, 2010; BLASER; PEÑALOSA, 2011; MAXIMINO *et al.*, 2014; STEWART *et al.*, 2011). Além disso, pesquisadores têm utilizado o zebrafish como organismo-modelo para estudar diversos outros distúrbios cerebrais, até então complexos, e condições induzidas por abuso de drogas, além de pesquisas voltadas a diversos estressores e comportamento social (AHMED; FERNANDES; GERLAI, 2012; KALUEFF; STEWART; GERLAI, 2014; MOURA *et al.*, 2023; PAVLIDIS; THEODORIDI; TSALAFOUTA, 2015; SPEEDIE; GERLAI, 2008).

1.5 Estresse Agudo de Contenção

Um importante indutor experimental de respostas ao estresse e comportamento tipo ansiedade é o Estresse Agudo de Contenção – EAC (*Acute Restraint Stress – ARS*), utilizado de forma expressiva em investigações de fenômenos fisiológicos, patológicos e farmacológicos em animais, contribuindo para avanços nessas áreas. Nos últimos anos, estudos propõem-se a pesquisar os efeitos da contenção em animais, visto que ainda não se esclareceu se a contenção está associada mais ao cansaço físico ou comportamentos defensivos dos animais, como se avaliou nos estudos de Hiroyuki Arakawa (2020) com ratos machos, com base nas condições de isolamento e idades dos animais à data de testagem. A pesquisa com o EAC em ratos machos apresentou resultados que sugeriram que a contenção tanto inibe o comportamento animal quanto ativa sistemas defensivos.

Quando pesquisadores, em um estudo com peixes, investigaram as respostas de cortisol ao estresse e a regulação molecular em zebrafishes adultos expostos tanto a estressores agudos quanto de longo prazo, os resultados para esses estressores mostraram que os peixes tiveram elevação significativa e rápida de cortisol (PAVLIDIS; THEODORIDI; TSALAFOUTA, 2015). Concentrações prolongadas de cortisol iniciaram com cerca de 15 minutos após serem expostos aos estressores agudos, com retorno aos níveis basais cerca de duas horas após a exposição. Os pesquisadores observaram, ainda no estudo, que o estresse agudo compromete de maneira significativa as expressões mRNA cerebrais de vários genes (PAVLIDIS; THEODORIDI; TSALAFOUTA, 2015).

Também em zebrafish, o estudo de Ghilslene *et al.* (2012) relatou o teor elevado de cortisol nos animais submetidos a EAC em diferentes períodos de tempo – 15, 60 e 90 minutos – onde os resultados demonstraram alterações nos padrões de natação e atividade locomotora, e todos os grupos testados apresentaram indícios de ansiedade nos testes comportamentais (conforme Tabela 1). Piato *et al.* (2011) relatam que, em uma pesquisa

envolvendo parâmetros comportamentais e sinalização purinérgica, através da análise de encéfalos de zebrafish, os animais induzidos por EAC de 90 minutos, que passaram por testes, tiveram alterações no comportamento (Tabela 1), assim como nos parâmetros a nível bioquímico e molecular do sistema purinérgico.

Na pesquisa do grupo de Piato *et al.* (2011), um protocolo para Estresse de Contenção Aguda (EAC) foi estabelecido para zebrafish, que serviu para pesquisas posteriores utilizando o mesmo estressor (GHISLENI *et al.*, 2012; DAL SANTO *et al.*, 2014; REIS *et al.*, 2020; LUCAS LUZ *et al.*, 2021). O protocolo consiste em transferir os animais para microtubos plásticos de 2 mL, os quais possuem pequenas aberturas nas duas extremidades (medindo cerca de 5 mm de diâmetro), sendo uma na tampa e outra na parte inferior. As aberturas permitiram a circulação da água dentro do tubo, após serem colocados de volta a um tanque maior, mas de forma a evitar a locomoção dos peixes no microtubo. O intervalo de tempo para a aplicação do EAC foi de 90 minutos, enquanto controlavam os níveis de oxigênio e de temperatura da água. Após o EAC, os animais são submetidos aos testes comportamentais, assim como os animais não estressados pertencentes ao grupo controle.

Tabela 1 – Principais resultados observados em estudos que utilizam EAC como indutor de respostas ao estresse de acordo com metodologia e testes adotados

Estudos com EAC	Protocolo adotado	Teste comportamental e variáveis observadas	Resultados obtidos após EAC
Piato <i>et al.</i> (2011)	Uso de microtubos de 2 ml; tempo de 90 min de contenção; testes comportamentais realizados logo após EAC com grupos diferentes de animais para cada tipo de teste (n = 12 por grupo)	Tarefa de Comportamento de Grupo (GBT) (10 ³): altura do tanque, locomoção, cor e coesão do cardume Esquiva Inibitória: latência para entrar no compartimento escuro e extinção	GBT: aumento no tempo no fundo do aquário e cores mais escuras em relação ao grupo controle; locomoção e coesão de cardume não apresentaram diferenças entre grupos Evitação Inibitória: não houve diferenças significativas entre grupos controle e EAC
Ghisleni <i>et al.</i> (2012)	Uso de microtubos de 2 ml; tempos de 15', 60' ou 90' de contenção para um grupo de 12 animais; teste comportamental realizado logo após EAC	Teste de distribuição vertical eliciada pela novidade (5 ³): tempo gasto no fundo, número de cruzamentos de linha no aparelho, distância percorrida, velocidade média, velocidade máxima, nado errático/velocidade angular e sinuosidade	Não houve diferença entre grupos no tempo gasto no fundo; aumento na atividade locomotora após 60' e 90'; aumento na distância percorrida após 90'; aumento na velocidade média após 90'; aumento na velocidade máxima após 60' e 90'; aumento no nado errático e velocidade angular após 60' e 90'; diminuição da sinuosidade em 60' e 90'
Assad <i>et al.</i> (2020)	Uso de microtubos de 2 ml; tempo de 90 min de contenção; teste comportamental realizado logo após EAC	Teste de distribuição vertical eliciada pela novidade (5 ³): tempo gasto no topo, latência para entrar no topo, número de travessias,	Diminuição no tempo gasto no topo; aumento na latência para entrar no topo; número de travessias, congelamento e nado errático não apresentaram

	(n = 6-8 por grupo)	congelamento e nado errático	diferenças entre grupos
Lucas Luz <i>et al.</i> (2021)	Uso de microtubos de 1,5 ml; tempo de 90 min de contenção; teste comportamental realizado logo após EAC	Teste de distribuição vertical eliciada pela novidade (5'): tempo gasto no topo, quadrados cruzados, nado errático e congelamento	Diminuição no tempo gasto no topo; aumento de nado errático; número de quadrados cruzados e distância percorrida não apresentaram diferenças entre grupos
Champanh e <i>et al.</i> (2010)	Uso de rede para restrição parcial do animal; tempo de contenção de 15'; testes comportamentais realizados logo após EAC com grupos diferentes de animais para cada tipo de teste (n = 30 por grupo)	Teste de preferência claro/escuro (5'): número de travessias entre os compartimentos e tempo gasto em cada compartimento Teste de campo aberto (5'): número de quadrados cruzados, distância total percorrida, velocidade média, % de tempo gasto em cada zona, % de congelamento	Teste de preferência claro/escuro: após EAC, os animais tiveram o mesmo tempo gasto para os dois lados do aquário; o número de entradas para o compartimento preto não diferiu do grupo controle Teste de campo aberto: aumento no número de quadrados cruzados; aumento na distância percorrida; aumento na velocidade média; aumento na % de tempo gasto na zona externa; não houve diferenças entre grupos na % de congelamento do animal nas zonas

Fonte: Elaboração da autora (2023)

O presente estudo teve como objetivo avaliar os efeitos do estresse agudo de contenção sobre parâmetros comportamentais tipo ansiedade no zebrafish (*Danio rerio*). Após exposição a estressor padronizado, não observou-se alteração em comportamento tipo-ansiedade nos testes de preferência claro/escuro e distribuição vertical eliciada pela novidade, mas observou-se aumento do congelamento no segundo teste.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Avaliar os efeitos do estresse agudo de contenção sobre parâmetros comportamentais tipo ansiedade no zebrafish (*Danio rerio*).

2.2 Objetivos específicos

- Utilizar o estresse de contenção aguda como indutor de respostas ao estresse para avaliação de parâmetros comportamentais em zebrafish;
- Aplicar os testes de preferência claro/escuro e distribuição vertical eliciada pela novidade para avaliação dos parâmetros comportamentais tipo ansiedade em zebrafish;

- Avaliar através de análise estatística possíveis diferenças comportamentais entre grupos estressados com EAC e controle.

3 JUSTIFICATIVA

O uso do estresse agudo de contenção para indução de respostas ao estresse em animais tem sido importante em diversas pesquisas envolvendo estresse e ansiedade, principalmente pela relevância em investigações de cunho farmacológico, patológico e de parâmetros comportamentais. Apesar de muitos estudos demonstrarem a relevância do estresse agudo de contenção em experimentos com animais, ainda são escassas as pesquisas na literatura utilizando o zebrafish como organismo modelo para a investigação de fenômenos comportamentais tipo ansiedade induzidos por estresse, bem como a utilização dos testes comportamentais de preferência claro/escuro e de distribuição vertical eliciada pela novidade para a observação de tais fenômenos.

O zebrafish mostra-se cada vez mais vantajoso como alternativa de modelo animal em estudos comportamentais no que diz respeito ao custo/benefício quando comparado a outros animais, haja vista as suas condições de manutenção e as diferentes possibilidades de uso experimental. Como ainda são poucas as pesquisas que avaliam os efeitos sobre parâmetros comportamentais do estresse agudo de contenção em zebrafish, torna-se relevante a presente pesquisa para a investigação desses fenômenos a partir da indução de respostas ao estresse e uma melhor compreensão de parâmetros observados a partir do comportamento tipo ansiedade em zebrafish. Propicia-se, também, um espaço para que mais estudos sejam realizados para experimentação das temáticas abordadas nesta pesquisa.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Animais e alojamento

Para a realização dos experimentos, foram utilizados zebrafishes adultos de ambos os sexos ($n = 24$), da linhagem *shortfin*, adquiridos por fornecedor comercial (Piscicultura PowerFish, Itaguaí/RJ), com um período de aclimação de pelo menos 14 dias antes do início dos experimentos, no Laboratório de Neurociências e Comportamento “Frederico Guilherme Graeff” (LaNeC), da Universidade Federal do Sul e Sudeste do Pará (Unifesspa), na cidade de Marabá-PA. Os animais foram alojados em tanques de 40 litros, com densidade máxima de 40 peixes por tanque (um animal por litro), alimentados duas vezes ao dia com ração comercial e

mantidos sob condições-padrão de alojamento (conforme o Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal – CONCEA, por meio da Resolução Normativa nº 34, de 27 de julho de 2017), com temperatura média de 28 °C e pH de 7,0-8,0, fotoperíodo de 14h de claro por 10h de escuro, além de constante filtração e oxigenação da água. Os experimentos para esta pesquisa foram submetidos à Comissão de Ética no Uso de Animais – CEUA/Unifesspa (23479.020944/2022-04).

4.2 Exposição ao estresse agudo de contenção

Conforme protocolo adaptado de Piato *et al.* (2011), os animais (n = 12/grupo) foram submetidos à contenção por 90 min em microtubos plásticos de 1,5 ml, com aberturas nas duas extremidades de cerca de 5 mm para circulação de água/oxigênio, limitando a locomoção do peixe. Após fechadas as tampas, os microtubos com os animais foram inseridos em uma estante para microtubos localizada dentro de um aquário com dimensões de 23 cm x 22,5 cm x 28,5 cm (altura x largura x comprimento; Figura 3), preenchido com 11 l de água e com oxigenação. As condições experimentais tiveram médias de temperatura 23 °C ± 2, pH de 7,0 ± 1, iluminação de 549 ± 60 lux, com a utilização de ruído branco Gaussiano constante (62 dB).

O grupo controle esteve sob as mesmas condições experimentais de temperatura, pH, iluminação e som descritas anteriormente (Figura 3), onde os animais (n = 12) foram colocados em aquário semelhante ao grupo de estressados, mas sem a contenção e a galeria, nadando livremente pelo aquário pelo mesmo período de 90 min.

Figura 3 – Aparato utilizado para o experimento de EAC com aquários para estressados e controle



Fonte: Compilado elaborado pela autora (2023)

4.3 Testes comportamentais

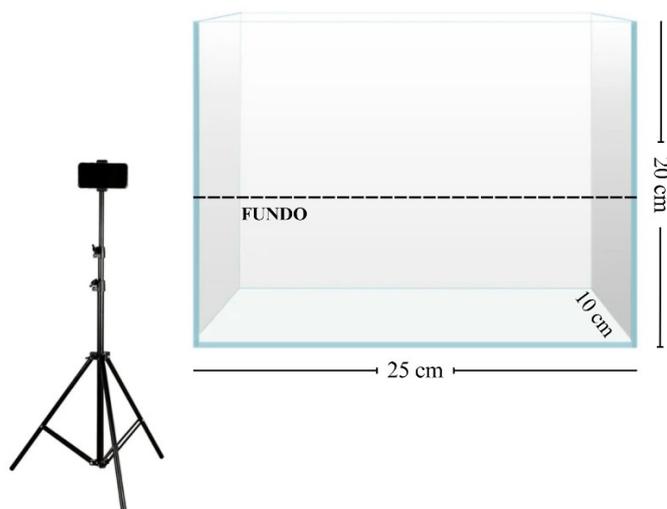
Todos os animais desta pesquisa foram expostos de forma individual aos dois testes comportamentais de preferência claro/escuro e de distribuição vertical eliciada pela novidade, após exposição ao estresse agudo de contenção ou não (controle), da seguinte forma:

4.3.1 Teste de distribuição vertical eliciada pela novidade

A aplicação do teste de distribuição vertical eliciada pela novidade (DVEN)) foi realizada a partir do protocolo adaptado de Cachat *et al.* (2010). Os animais foram transferidos, de forma individual, para um aquário transparente, com dimensões de 20 cm x 25 cm x 15 cm (altura x largura x comprimento), preenchido com 5 l de água. Ao serem transferidos, os animais puderam explorar o novo aquário de forma livre por um período de 6 minutos e o registro dessa atividade foi realizado em vídeo de celular iPhone (12 MP; resolução 1080p a 30qps), posicionado na frente do aquário. As condições de iluminação e som se mantiveram durante o experimento, respectivamente, com médias de 452 ± 40 lux e 66 ± 2 dB, sob ruído branco Gaussiano constante.

Na fase de análise dos vídeos, através do software TheRealFishTracker², foram analisadas as seguintes variáveis do teste de distribuição vertical eliciada pela novidade para cada animal: *a.* tempo gasto pelo animal no fundo do aquário; *b.* velocidade média de natação do animal; *c.* a natação errática do animal; e *d.* o tempo de congelamento do peixe no aquário. (CACHAT *et al.*, 2010)

Figura 4 – Esquema de aparato utilizado na realização do teste de distribuição vertical eliciada pela novidade



Fonte: Elaborado pela autora (2023)

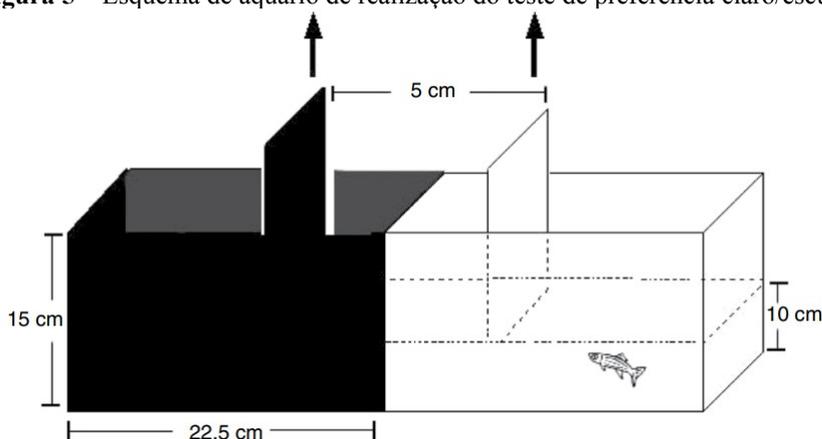
² Programa de rastreamento de objeto em movimento através de quadros de vídeo, disponível para download gratuito em: <<https://www.dgp.toronto.edu/~mccrae/projects/FishTracker/>>.

4.3.1 Teste de preferência claro/escuro

No teste de preferência claro/escuro (TCE) foi utilizado protocolo adaptado de Maximino *et al.* (2010b). Primeiramente, os animais foram transferidos, individualmente, para o compartimento central do aquário de teste com dimensões de 15 cm x 10 cm x 45 cm (altura x largura x comprimento), o qual possuía uma metade clara e outra metade escura, e ficaram no compartimento central por 3 minutos para aclimatação (Figura 5). Em seguida, a divisória que separava o compartimento central dos demais compartimentos foi removida, dando ao animal a liberdade para explorar livremente as outras partes do aquário por um período de 15 minutos. A atividade do animal no aquário durante esse período foi registrada em vídeo por câmera de celular iPhone (12 MP; resolução 1080p a 30qps). Durante o experimento, as condições de iluminação tiveram média de 472 ± 40 lux e de som média de 67 ± 2 dB, com a utilização do ruído branco Gaussiano de forma constante.

Posteriormente, durante o processo de análise dos vídeos, com o auxílio do software TheRealFishTracker, avaliou-se o comportamento do animal no compartimento branco e foram analisadas as seguintes variáveis do teste de preferência claro/escuro para cada animal: *a.* tempo gasto pelo animal no compartimento branco do aquário; *b.* velocidade média de natação do animal; *c.* a natação errática do animal; e *d.* o tempo de congelamento do peixe no compartimento branco do aquário (MAXIMINO *et al.*, 2010b).

Figura 5 – Esquema de aquário de realização do teste de preferência claro/escuro



Fonte: Maximino *et al.* (2010b)

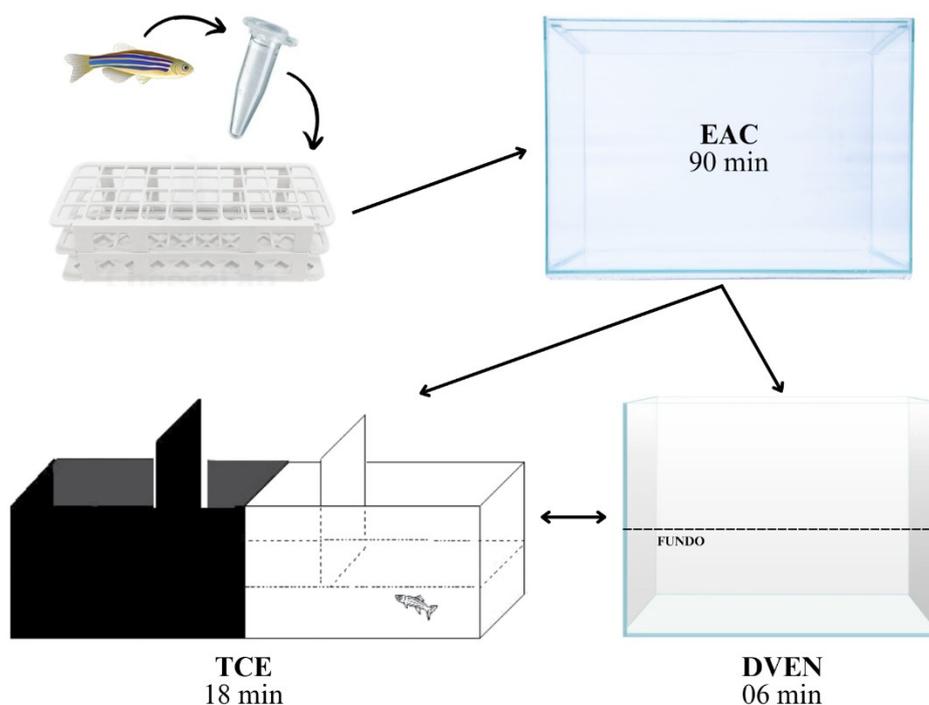
4.4 Delineamento experimental

Foram selecionados aleatoriamente 24 animais para a realização do experimento. Os animais foram divididos em dois grupos de 12 peixes, entre grupo controle e grupo exposto ao estresse agudo de contenção. Cada grupo foi dividido em grupos menores de 3 animais, esses grupos passavam pelos aquários de experimento alternando entre grupo controle (livres no

aquário) e o grupo de expostos ao EAC (contidos). Após os 90 min, todos os animais eram submetidos tanto ao teste de preferência claro/escuro quanto ao teste de distribuição vertical eliciada pela novidade, em ordem aleatória feita através de sorteio, e tiveram o comportamento registrado em vídeo por 15 e 6 minutos em cada teste, respectivamente.

Dessa forma, para o grupo de expostos ao EAC: cada animal ficou no aquário de contenção por 90 min e, após esse tempo, foi submetido, de forma individual, aos dois testes comportamentais (a depender da ordem sorteada), conforme a Figura 6. Para os animais do grupo controle: cada animal ficou no aquário com exploração livre por 90 min e, da mesma forma que os animais do EAC, depois do tempo proposto, individualmente foram submetidos aos dois testes comportamentais (na ordem definida em sorteio).

Figura 6 – Aparato utilizado durante experimento de exposição ao EAC e testagem comportamental



Fonte: Compilado elaborado pela autora (2023)

4.5 Análise estatística

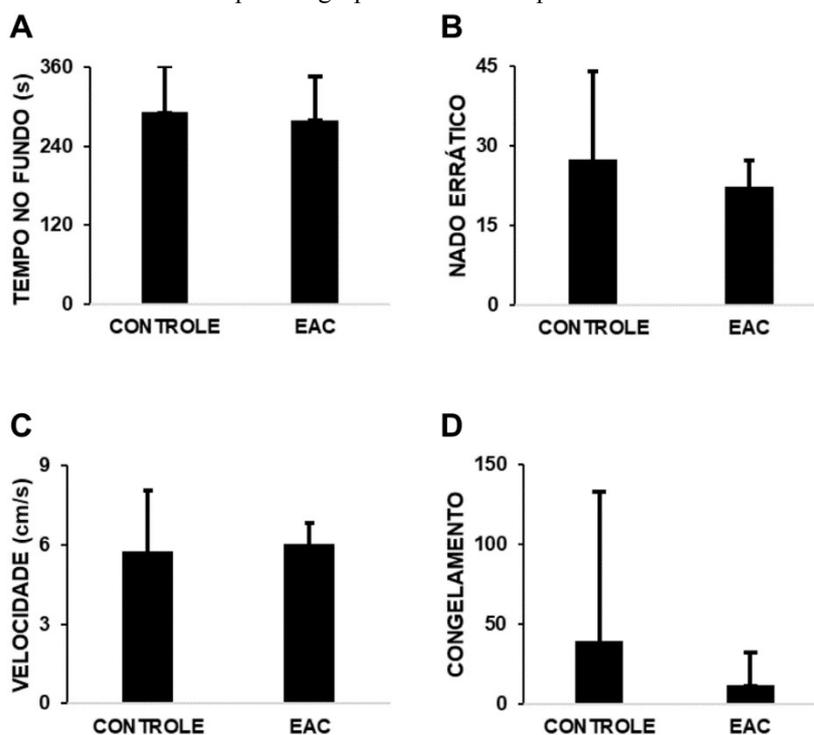
Após transcrição dos parâmetros comportamentais no software TheRealFishTracker, os dados obtidos foram analisados por comparação entre dois grupos através do *teste t* de Student para amostras independentes, realizado com auxílio do software JAMOVI 2.4.1³. Foi considerado o nível de significância em $p < 0,05$ em todas as análises e os dados são expressos como média \pm desvio padrão nas imagens de resultados.

³ Programa de análise de dados e de testes estatísticos disponível de forma gratuita para download em: <<https://www.jamovi.org/download.html>>.

5 RESULTADOS

Após a exposição dos animais ao estresse agudo de contenção, os resultados deste estudo para o teste de distribuição vertical eliciada pela novidade não demonstraram diferenças estatisticamente significativas nas variáveis de tempo gasto pelo animal no fundo do aquário ($t(22) = 0,442$; $p = 0,669$; Figura 7A), nado errático ($t(22) = 1,02$; $p = 0,841$; Figura 7B), velocidade média de natação ($t(22) = -0,371$; $p = 0,357$; Figura 7C) e congelamento do animal ($t(22) = 0,989$; $p = 0,833$; Figura 7D). Ou seja, nenhuma das variáveis analisadas do grupo EAC demonstraram alterações quando comparadas ao grupo controle, conforme observado na Figura 7.

Figura 7 – Análise dos parâmetros comportamentais observados no teste de distribuição vertical eliciada pela novidade para os grupos controle e expostos ao EAC

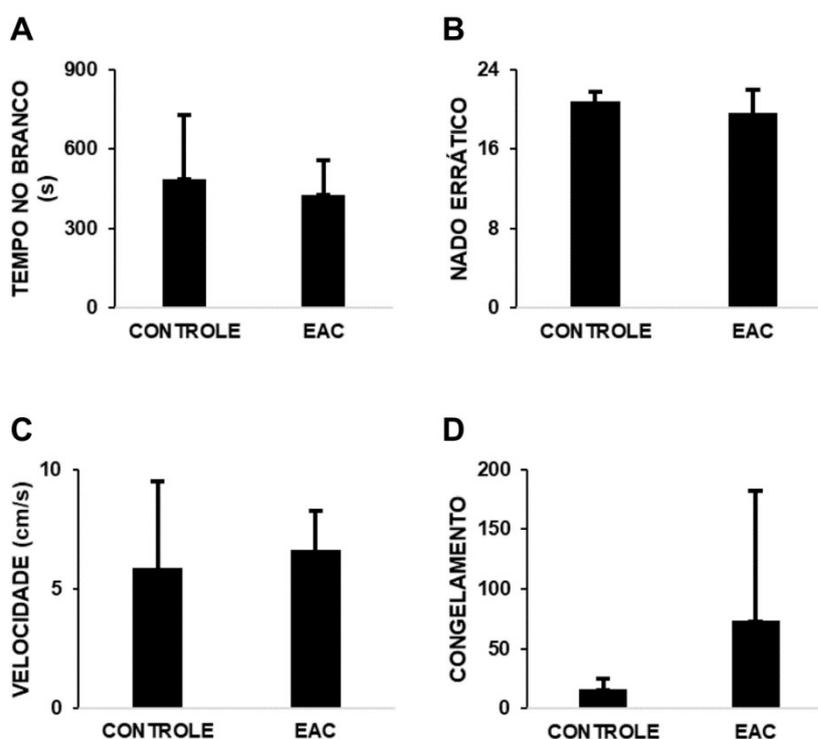


Fonte: Elaboração da autora (2023)

No teste de preferência claro/escuro, os resultados após exposição ao EAC apontam um aumento significativo no congelamento do animal na parte clara do aquário ($t(22) = -1,82$; $p = 0,041$; Figura 8D) quando comparado ao grupo controle. Para a variável tempo no compartimento branco, embora os resultados apontem que os animais passaram menos tempo

nessa parte do aquário quando comparados ao grupo controle (Figura 8A), essas diferenças não alcançaram significância estatística ($t(22) = 0,766$; $p = 0,226$; Figura 8A). Também não houve diferenças estatisticamente significativas nas variáveis de nado errático ($t(22) = 1,60$; $p = 0,938$; Figura 8B) e velocidade média de natação do animal ($t(22) = 0,639$; $p = 0,261$; Figura 8C) entre os grupos controle e EAC.

Figura 8 – Análise dos parâmetros comportamentais observados no teste de preferência claro/escuro para os grupos controle e expostos ao EAC



Fonte: Elaboração da autora (2023)

6 DISCUSSÃO

No presente estudo, foram avaliados os efeitos do estresse agudo de contenção em comportamentos tipo ansiedade do zebrafish. Durante os experimentos, os animais foram expostos a 90 min de contenção e os efeitos foram analisados imediatamente após a restrição tanto no teste de preferência claro/escuro quanto no teste de distribuição vertical eliciada pela novidade. Os parâmetros comportamentais observados nos testes foram analisados conforme estatística e os resultados obtidos foram descritos na seção anterior. Após exposição ao EAC, foi demonstrado alteração no tempo de congelamento do zebrafish no compartimento branco no teste de preferência claro/escuro, mas os resultados não indicam alterações em outras

variáveis estudadas neste mesmo teste, assim como não foram observadas alterações nas variáveis analisadas no teste de distribuição vertical eliciada pela novidade.

Através da aplicação do teste de distribuição vertical eliciada pela novidade posterior ao protocolo de EAC, outros estudos observaram as variáveis de tempo gasto no fundo, velocidade média, nado errático e congelamento. Neste estudo, não houve alterações na variável *tempo gasto no fundo*, concordante com o estudo de Ghislene *et al.* (2012), onde os animais expostos ao EAC por 90 min não apresentaram diferenças estatisticamente significativas em relação ao grupo utilizado como controle. No entanto, os resultados para essa variável discordam com o estudo de Piato *et al.* (2011), no qual os animais submetidos a EAC apresentaram um aumento de tempo no fundo do aquário. Todavia, o estudo de Piato *et al.* (2011) avaliou o comportamento dos animais em cardume no aquário após a exposição de EAC, diferente do presente estudo que observou o comportamento dos animais de forma individual durante a testagem.

Em relação à *velocidade média de natação do animal*, *nado errático* e *congelamento*, este estudo não produziu alterações nos parâmetros comparados ao grupo controle no teste em questão. Essas variáveis também não apresentam consistência na literatura em relação ao comportamento tipo ansiedade do zebrafish. Ghislene *et al.* (2012) relataram aumento na velocidade e nado errático do animal após 90 min; Lucas Luz *et al.* (2021) também demonstraram aumento no nado errático; enquanto que no estudo de Assad *et al.* (2020), não foram apresentadas diferenças significativas entre grupos controle e contidos para as variáveis de nado errático e congelamento.

Os resultados referentes ao teste de preferência claro/escuro, conforme as variáveis observadas, demonstram conformidade com os resultados do teste de distribuição vertical eliciada pela novidade após EAC, exceto para a variável de congelamento. Na literatura ainda são escassas as pesquisas que utilizam o teste comportamental de preferência claro/escuro para análise de comportamentos tipo ansiedade em pesquisas com estresse agudo de contenção. Entre os estudos realizados utilizando EAC, o estudo de Champagne *et al.* (2010) demonstrou que não houve diferenças entre os efeitos do estresse agudo de restrição em relação ao grupo controle, mas que os dois grupos tiveram o mesmo tempo gasto pelo zebrafish para ambos os compartimentos do aquário de teste, que continha uma parte escura e uma parte transparente iluminada.

De acordo com Maximino *et al.* (2010b), o zebrafish apresenta uma motivação inata a explorar novos ambientes, no entanto, o animal tende a evitar ambientes claros e a passar mais tempo no compartimento escuro de um aquário, assim como nado errático e congelamento

tendem a ocorrer mais no compartimento branco do que na parte preta. Essa preferência preditiva pelo lado branco pode explicar porque não houve diferenças significativas na variável *tempo gasto no compartimento branco* entre os achados deste estudo em relação à exposição ao estresse agudo de contenção, pois mesmo que o tempo no branco do grupo EAC tenha sido inferior, não foi o suficiente para demonstrar significância comparado ao grupo controle. Essa ausência de diferença estatisticamente significativa também foi percebida no estudo de Aponte e Petrunich-Rutherford (2019) envolvendo outro estressor agudo, que utilizou o teste claro/escuro como modelo para avaliar o comportamento tipo ansiedade de zebrafishs juvenis.

Os autores perceberam que a suspensão do animal no ar por 30 segundos, acima da água, através de uma rede não produziu alterações significativas entre os animais estressados e grupo controle, ainda que os animais estressados tenham passado menos tempo na parte clara do aquário. Sobre as variáveis de *velocidade média* e *congelamento*, o estudo de Aponte e Petrunich-Rutherford (2019) também não obteve diferenças significativas entre os grupos controle e estressados no teste de preferência claro/escuro. Neste estudo, os resultados demonstraram concordância com a variável de velocidade média, mas discordam na variável congelamento, onde houve uma diferença estatisticamente significativa no tempo de imobilidade do animal.

Com exceção da variável de congelamento no teste de preferência claro/escuro, todas as outras sete variáveis observadas no presente estudo entre os dois testes utilizados não diferiram significativamente entre os grupos de expostos ao EAC e controle. Na literatura, observa-se que não há uma consistência sobre os resultados do comportamento de zebrafish analisados a partir dessas variáveis, o que pode ser explicado devido às diferenças de procedimentos experimentais adotados em cada uma das pesquisas supracitadas ao invés de se estabelecer que não houve comportamento tipo ansiedade de forma mais intensa após exposição de EAC.

Um exemplo é a diferença já mencionada do estudo Piato *et al.* (2011) no teste de distribuição vertical eliciada pela novidade para o presente estudo, onde o número de animais inseridos no aquário difere durante a testagem. Além disso, nesse mesmo estudo, o tempo de testagem é de 10 min, diferente do protocolo adotado nesta pesquisa que é de 6 min. Em alguns estudos também se nota a diferença entre o tipo de microtubos utilizados na exposição ao EAC. Por exemplo, as pesquisas de Piato *et al.* (2011), Ghisleni *et al.* (2012) e Assad *et al.* (2020) apresentam a utilização de microtubos de 2 ml, enquanto que neste estudo foi utilizado microtubo de 1,5 ml para a contenção do animal.

Outra diferença diz respeito ao estudo de Champagne *et al.* (2010), que ao invés de microtubos, os animais ficaram presos de uma forma menos restrita em uma rede por um tempo de 15 min. Os pesquisadores também utilizaram um número maior de animais para a testagem, com 30 animais para o grupo controle e 30 animais para o grupo exposto ao EAC. Nesse estudo também foi adotado um tempo de testagem de 5 min no aquário claro/escuro, que não continha o compartimento central de portinholas deslizantes, logo, sem o tempo para aclimatação. Todas essas características diferem do presente estudo, onde o número de animais era de 12 zebrafishs para cada grupo experimental e o tempo de testagem no aquário claro/escuro foi de 15 min de observação, posterior a 3 min de aclimatação em compartimento central. Essas inconsistências metodológicas podem explicar os diferentes resultados obtidos em cada pesquisa de exposição do zebrafish ao EAC.

Apesar da maioria das variáveis não diferirem estatisticamente do grupo controle, a variável de *congelamento* no teste de preferência claro/escuro evidencia entre os achados deste estudo uma diferença estatisticamente significativa que não ocorreu no teste de distribuição vertical eliciada pela novidade. Conforme a literatura, os dois testes são amplamente usados em pesquisas comportamentais com animais para analisar parâmetros tipo ansiedade, bem como altamente sensíveis na triagem de drogas, através de análises farmacológicas (KYSIL *et al.*, 2017; MAXIMINO *et al.*, 2012). No entanto, mesmo com as similaridades entre eles, ocorrem diferenças quando analisados os resultados de pesquisas envolvendo os dois testes em relação a estressores.

Kysil *et al.* (2017) relatam que o teste de distribuição vertical eliciada pela novidade parece representar melhor pesquisas com estressores desafiadores e/ou com mais intensidade, e o teste de preferência claro/escuro consegue obter melhores resultados para estressores menos aversivos. Isso pode elucidar o fato de que uma variável neste estudo teve diferença significativa em um teste, mas não em outro, como ocorreu com o congelamento do animal, tendo o teste de preferência claro/escuro uma sensibilidade maior para o comportamento do zebrafish durante a testagem. Mesmo assim, os autores afirmam que o comportamento do animal e as variáveis observadas durante esses testes ainda são muito complexos, necessitando de cada vez mais pesquisas na área.

Maximino *et al.* (2012) afirmam que os achados de pesquisas que envolvem o teste de distribuição vertical eliciada pela novidade e o teste de preferência claro/escuro são limitados no que diz respeito a uma convergência entre esses dois testes. Segundo os autores, uma possível estratégia para essa convergência seria a construção de um aparato de teste comportamental que pudesse contemplar os vários estímulos vistos até aqui nos outros dois

testes. Para eles, um único aquário que pudesse medir os múltiplos parâmetros observados em comportamento tipo ansiedade de zebrafish poderia expandir o nível de confiabilidade, de produtividade e de proporção de testagens para análises farmacológicas, por exemplo.

7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O presente estudo observou os efeitos de protocolo adaptado de estresse agudo de contenção sobre parâmetros comportamentais tipo ansiedade de zebrafish, um animal que apresenta notável importância em pesquisas comportamentais e farmacológicas. No teste de distribuição vertical eliciada pela novidade, não houve alterações comportamentais significativas nas variáveis analisadas. Também no teste de preferência claro/escuro, as variáveis não diferiram significativamente entre os animais expostos ao EAC e grupo controle, exceto no congelamento, onde os animais contidos apresentaram aumento nessa variável.

Esses achados sinalizam uma vasta inconsistência na literatura sobre as diferentes metodologias utilizadas na execução do EAC e testagem comportamental do zebrafish. Além disso, há uma limitação de estudos sobre efeitos do EAC em modelos utilizando o teste de preferência claro/escuro, bem como uma complexidade ainda pouco estudada das diferenças e semelhanças desse teste para o teste de distribuição vertical eliciada pela novidade. Os resultados deste estudo evocam a necessidade de mais pesquisas para compreensão desses fenômenos e temas discutidos ao longo deste trabalho.

8 REFERÊNCIAS

- AHMED, T. S.; FERNANDES, Y.; GERLAI, R. Effects of animated images of sympatric predators and abstract shapes on fear responses in zebrafish. **Behaviour**, v. 149, n. p. 1125-1153, 2012.
- APONTE, Amy; PETRUNICH-RUTHERFORD, Maureen L. Acute net stress of young adult zebrafish (*Danio rerio*) is not sufficient to increase anxiety-like behavior and whole-body cortisol. **PeerJ**, v. 7, n. e7469, ago. 2019.
- ARAKAWA, Hiroyuki. Restraint stress activates defensive behaviors in male rats depending on age and housing condition. **Physiol Behav**, v. 224, out. 2020.
- ARBORELIUS, L. *et al.* The role of corticotropin-releasing factor in depression and anxiety disorders. **J Endocrinol**, v. 160, n. 1, p. 1-12, jan. 1999.
- ASSAD, Nadimé. *et al.* Acute Restraint Stress Evokes Anxiety-Like Behavior Mediated by Telencephalic Inactivation and GabAergic Dysfunction in Zebrafish Brains. **Sci Rep**, v. 10, n. 5551, 2020.
- BLASER, R. E.; PEÑALOSA, Y. M. Stimuli affecting zebrafish (*Danio rerio*) behavior in the light/dark preference test. **Physiology & Behavior**, v. 104, n. 5, p. 831-837, oct. 2011.
- BLASER, R.; CHADWICK, L.; MCGINNIS, G.C. Behavioral measures of anxiety in zebrafish (*Danio rerio*). **Behavioural Brain Research**, v. 208, n. 1, p. 56-62, 2010.
- BLASER, R; GERLAI, R. Behavioral phenotyping in zebrafish: Comparison of three behavioral quantification methods. **Behavior Research Methods**, v. 38, n. 3, p. 456–469, ago. 2006.
- BOOF, Sérgio Ricardo; OLIVEIRA, Alexandre Gabarra. Aspectos fisiológicos do estresse: uma revisão narrativa. **Research, Society and Development**, v. 10, n. 17, p. 1-12, 2021.
- BOUYOUCOS, Ian A. *et al.* Ancient fishes and the functional evolution of the corticosteroid stress response in vertebrates. **Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology**, v. 250, p. 1-16, 2021.
- CACHAT, Jonathan. *et al.* Measuring behavioral and endocrine responses to novelty stress in adult zebrafish. **Nature Protocols**, v. 5, n. 11, p. 1786–1799, 14 nov. 2010.
- CHAMPAGNE, Danielle L. *et al.* Translating rodent behavioral repertoire to zebrafish (*Danio rerio*): Relevance for stress research. **Behavioural Brain Research**, v. 214, n 2, p. 332-342, 2010.
- CHROUSOS, George P. Stressors, stress, and neuroendocrine integration of the adaptive response. The 1997 Hans Selye Memorial Lecture. **Ann N Y Acad Sci**, v. 851, p. 311-335, jun. 1998.

CRUZ, Antonio Pedro de Melo. *et al.* Modelos animais de ansiedade: implicações para a seleção de drogas ansiolíticas. **Psicologia: Teoria e Pesquisa**, v. 13, n. 3, p. 269-278, set.-dez. 1997.

DAL SANTO, Gláucia. *et al.* Acute restraint stress induces an imbalance in the oxidative status of the zebrafish brain. **Neuroscience Letters**, v. 558, p. 103-108, jan. 2014.

ENCARNAÇÃO, Ronaldo de Oliveira. **Estresse e Produção Animal**. Campo Grande: EMBRAPA-CNPGC, 1986.

GERLAI, R. High-Throughput Behavioral Screens: the First Step towards Finding Genes Involved in Vertebrate Brain Function Using Zebrafish. **Molecules**, v. 15, n. 4, p. 2609-2622, 2010.

GHILSLENE, G. *et al.* The role of CRH in behavioral responses to acute restraint stress in zebrafish. **Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry**, v. 36, n. 1, p. 176-182, jan. 2012.

GNEIDING, Beatriz. *et al.* Bases neuroendócrinas do estresse e bem-estar em peixes teleósteos. **Revista Acadêmica Ciência Animal**, v. 17, n. 1, p. 1-8, mai. 2019.

GRAEFF, Frederico Guilherme. On serotonin and experimental anxiety. **Psychopharmacology**, v. 163, p. 467-476, 2002.

GRAEFF, Frederico Guilherme. Ansiedade, pânico e o eixo hipotálamo-pituitária-adrenal. **Brazilian Journal of Psychiatry**, v. 29, p. s3-s6, mai. 2007.

GRAEFF, Frederico Guilherme; ZANGROSSI JUNIOR, Hélio. The hypothalamic-pituitary-adrenal axis in anxiety and panic. **Psychology & Neuroscience**, v. 3, n. 1, p. 3-8, jan. 2010.

KALUEFF, A. V., NUTT, D. J. Role of GABA in anxiety and depression. **Depress Anxiety**, v. 24, n. 7, p. 495-517, 2007.

KALUEFF, A. V.; STEWART, A. M.; GERLAI, R. Zebrafish as an emerging model for studying complex brain disorders. **Trends Pharmacol Sci**, v. 35, n. 2, p. 63-75, 2014.

KYSIL, Elana V. *et al.* Comparative Analyses of Zebrafish Anxiety-Like Behavior Using Conflict-Based Novelty Tests. **Zebrafish**, v. 14, n. 3, p. 197-208, jun. 2017.

LEVINE; Ari. *et al.* Measuring cortisol in human psychobiological studies, **Physiology & Behavior**, v. 90, jan. 2007.

LIESCHKE, G. J.; CURRIE, P. D. Animal models of human disease: zebrafish swim into view. **Nat Rev Genet**, v. 8, n. 5, p. 353-367.

LYDIARD, R. B. The role of GABA in anxiety disorders. **J Clin Psychiatry**, v. 64, p. 21-27, 2003.

LUCAS LUZ, W. *et al.* Putative Activation of the CB1 Cannabinoid Receptors Prevents Anxiety-Like Behavior, Oxidative Stress, and GABA Decrease in the Brain of Zebrafish Submitted to Acute Restraint Stress. **Front. Behav. Neurosci**, v. 14, n. 598812, jan. 2020.

MARINHO SARAIVA, Eduardo; SOARES FORTUNATO, J. M.; GAVINA, Cristina. Oscilações do cortisol na depressão e sono/vigília. **Revista Portuguesa de Psicossomática**, v. 7, n. 1-2, p. 89-100, jan-dez. 2005.

MAXIMINO, Caio. *et al.* A comparative analysis of the preference for dark environments in five teleosts. **International Journal of Comparative Psychology**, v. 20, n. 4, p 351–367, 2007.

Maximino, Caio; *et al.* Measuring anxiety in zebrafish: a critical review. **Behavioural brain research**, v. 214, n. 2, p. 157–171, 2010a.

MAXIMINO, Caio. *et al.* Scototaxis as anxiety-like behavior in fish. **Nature Protocols**, v. 5, n. 2, p. 209-216, 2010b.

MAXIMINO, Caio. *et al.* A comparison of the light/dark and novel tank tests in zebrafish. **Behaviour**, v. 149, n. 10-12, 1099–1123, 2012.

MAXIMINO, Caio. *et al.* Role of serotonin in zebrafish (*Danio rerio*) anxiety: relationship with serotonin levels and effect of buspirone, WAY 100635, SB 224289, fluoxetine and parachlorophenylalanine (pCPA) in two behavioral models. **Neuropharmacology**, v. 71, p. 83-97, mar. 2013.

MAXIMINO, Caio. *et al.* Fluoxetine and WAY 100,635 dissociate increases in scototaxis and analgesia induced by conspecific alarm substance in zebrafish (*Danio rerio* Hamilton 1822). **Pharmacol Biochem Behav.**, v. 124, p. 425-433, set. 2014.

MAXIMINO, Caio; ARNDT, Saskia S.; VAN DER STAAAY, Franz Josef. Animal Models. In: Jennifer Vonk; Todd Shackelford. (Org.). **Encyclopedia of Animal Cognition and Behavior**. 1ed. Springer International Publishing, 2019, p. 1-17.

MOURA, L. A. *et al.* Roles of the 5-HT_{2C} receptor on zebrafish sociality. **Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry**, v. 125, jul. 2023.

NESAN, Dinushan; VIJAYAN, Mathilakath M. Maternal Cortisol Mediates Hypothalamus-Pituitary-Interrenal Axis Development in Zebrafish. **Scientific Reports**, v. 6, n. 22582, mar. 2016.

PAVLIDIS, M.; THEODORIDI, A.; TSALAFOUTA, A. Neuroendocrine regulation of the stress response in adult zebrafish, *Danio rerio*. **Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry**, v. 60, p. 121-131, jul. 2015.

PIATO, Angelo L. *et al.* Acute Restraint Stress in Zebrafish: Behavioral Parameters and Purinergic Signaling. **Neurochem Res**, v. 36, p. 1876-1886, mai. 2011.

POZZER, Camila Pinheiro; OLIVEIRA, Ivaldo Jesus Lima de. Envolvimento do glutamato na ansiedade de ratos no labirinto em cruz elevado. **Universitas: Ciências da Saúde**, v. 5, n. 1/2, p. 51-59, 2007.

REIS, C. G. *et al.* Effects of N-acetylcysteine amide on anxiety and stress behavior in zebrafish. **Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol**, v. 393, p. 591–601, nov. 2020.

RESENDE, Rodrigo Ribeiro; SOCCOL, Carlos Ricardo. **Biotecnologia aplicada à saúde: fundamentos e aplicações**. São Paulo: Blucher, 2015.

SANTOS, Juliana da Costa; SANTOS, Maria Luiza da Costa. Descrevendo o estresse. *Revista Principia - Divulgação Científica e Tecnológica do IFPB, João Pessoa*, n. 12, p. 51-57, set. 2005.

SAPOLSKY, Robert M.; ROMERO, L. Michael; MUNCK, Allan U. How Do Glucocorticoids Influence Stress Responses? Integrating Permissive, Suppressive, Stimulatory, and Preparative Actions. **Endocrine Reviews**, v. 21, n. 1, p. 55-89, 2000.

SELYE, Hans. A Syndrome produced by Diverse Nocuous Agents. **Nature**, v. 138, n. 32, 1936.

SERRA, E. L.; MEDALHA, C. C.; MATTIOLI, R. Natural preference of zebrafish (*Danio rerio*) for a dark environment. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 32, n. 12, p. 1551–1553, dez. 1999.

SILVA, M. S. T; TORRES, C. R. O. V. Alterações neuropsicológicas do estresse: contribuições da neuropsicologia. **Revista Científica Novas Configurações – Diálogos Plurais**, Luziânia, v. 1, n. 2, p. 67 - 80, 2020.

SOUSA, Maria Bernardete Cordeiro de; SILVA, Hélderes Peregrino A.; GALVÃO-COELHO, Nicole Leite. Resposta ao estresse: I. Homeostase e teoria da alostase. **Estudos de Psicologia (Natal)**, v. 20, n. 1, p. 2-11, jan. 2015.

SPEEDIE, N.; GERLAI, R. Alarm substance induced behavioral responses in zebrafish (*Danio rerio*). **Behav Brain Res**, v. 188, n. 1, p. 168-177, 2008.

STEWART, A. *et al.* Pharmacological modulation of anxiety-like phenotypes in adult zebrafish behavioral models. **Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry**, v. 35, n. 6, p. 1421-1431, ago. 2011.

STEWART, A. *et al.* Modeling anxiety using adult zebrafish: a conceptual review. **Neuropharmacology**, v. 62, n. 1, p. 135-143, 2012.

TSALAFOUTA, A. *et al.*, Ontogenesis of the HPI axis and molecular regulation of the cortisol stress response during early development in *Dicentrarchus labrax*. **Scientific Reports**, v. 4, n. 5525, p. 1-12, jul. 2014.

TSIGOS, Constantine. *et al.* **Stress: Endocrine Physiology and Pathophysiology**. In: FEINGOLD, K. R. *et al.* South Dartmouth (MA): MDTText.com, out. 2020.

TSIGOS, Constantine; CHROUSOS, George P. Hypothalamic-pituitary-adrenal axis, neuroendocrine factors and stress. *J Psychosom Res*, v. 53, n. 4, p. 865-871, 2002.

YANG, Hongbo. et al. A map of cis-regulatory elements and 3D genome structures in zebrafish. *Nature*, v. 588, p. 337–343, nov. 2020.

ZHANG, Xiaona. *et al.* Impairment of the cortisol stress response mediated by the hypothalamus–pituitary–interrenal (HPI) axis in zebrafish (*Danio rerio*) exposed to monocrotophos pesticide. **Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology**, v. 176-177, p. 10-16, out-nov. 2015.