



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

DANILO BRANDÃO ARAÚJO

IMPACTOS DO ESTRESSE CRÔNICO IMPREVISIVEL NO COMPORTAMENTO
TIPO ANSIEDADE DO ZEBRAFISH (*DANIO RERIO*) NOS TESTES
CLARO/ESCURO E DESTRIÇÃO VERTICAL

MARABA-PA

2023

DANILO BRANDÃO ARAÚJO

**IMPACTOS DO ESTRESSE CRÔNICO IMPREVISIVEL NO COMPORTAMENTO
TIPO ANSIEDADE DO ZEBRAFISH (*DANIO RERIO*) NOS TESTES
CLARO/ESCURO E DESTRIÇÃO VERTICAL**

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

MARABA-PA

2023

Eu não devo ter medo. Medo é o assassino da mente. Medo é a pequena morte que leva à obliteração total. Eu enfrentarei meu medo. Permitirei que passe por cima e me atravesse. E, quando tiver passado, voltarei o olho interior para ver seu rastro. Onde o medo não estiver mais, nada haverá. Somente eu permanecerei.

Frank Herbert - Duna.

AGRADECIMENTOS

Muitas pessoas fizeram parte da construção desse trabalho, seja diretamente ou indiretamente. E em primeiro lugar gostaria de agradecer aqueles que ajudaram com apoio emocional, que em momentos como esse é imprescindível na vida. Agradeço a minha mãe e minha namorada, minhas companheiras e meu apoio: Edina Maria da Silva Brandão e Kellyta Gomes Bandeira. Agradeço também aos meus amigos de longa data: Alisson; Carlos; David; Gustavo e Welligton. Meus amigos de graduação: Jhenify; Carol; Ângela e Yandra.

Agradeço diretamente aos que colaboraram para execução desse trabalho, que me acompanharam durante dias para realização dos experimentos e que fizeram questionamentos que nem mesmo eu tinha pensado. Aos meus colegas de experimento: Bruna; Marissol; Jeane; Otavio e Aurora.

Agradeço também ao meu orientador Prof. Dr. Caio Maximino, que para mim é uma referência de ser humano e de profissional. Tenho muito prazer de aprender e refletir com ele sobre neurociências e tantas outras coisas.

Por fim agradeço a Universidade Federal do Sul e Sudeste do Pará (UNIFESSPA) por proporcionar um espaço adequado para realização desta pesquisa.



Projeto realizado com recursos provenientes do projeto “Bases fisiológicas do estresse em peixes teleósteos: Foco em respostas integrativas” – Chamada nº001/2021 – FAPESPA/CNPq Programa de Apoio a Núcleos Emergentes – PRONEM – Termo de Outorga nº 050/2021

Núcleo Emergente de
FISIOLOGIA &
FARMACOLOGIA DE
PEIXES TELEÓSTEOS
do Sudeste do Pará



RESUMO

A resposta fisiológica aos estressores é um importante mecanismo de defesa e sobrevivências que os organismos possuem. Em virtude da complexidade desse sistema se faz necessário estudos acerca do estresse, visando entender como o estresse (agudo ou crônico) pode impactar os organismos. Nesse sentido, modelos animais tem sido experimentalmente utilizados para essas investigações. O zebrafish (*Danio rerio*) emergiu como importante modelo para investigações em psicopatologia experimental devido ao seu baixo custo e características genéticas homologas aos seres humanos. O presente trabalho objetivou investigar como o modelo de estresse crônico imprevisível (ECI) afeta o comportamento tipo ansiedade no zebrafish. Assim, foi utilizado nesse trabalho um protocolo ECI de 14 dias com 10 estressores diferentes, que eram aplicados duas vezes ao dia de maneira parcialmente aleatória visando atingir maior imprevisibilidade. Após 24 horas do final do protocolo ECI esses animais foram submetidos ao teste de distribuição vertical eliciada pela novidade (DVEN) e o teste de preferência claro/escuro (TCE). Ao analisar os resultados, foi observado que os animais ECI passaram mais tempo no fundo e menos tempo no topo no teste DVEN, esses resultados estão de acordo com os achados na literatura. Já os resultados no TCE não sugerem diferença entre os animais ECI e controle, a literatura carece de dados acerca do uso de TCE para avaliar animais submetidos ao ECI, os únicos que foram encontrados entregam resultados ambíguos. Assim é possível concluir que o ECI é um modelo adequado para se fazer investigações acerca do estresse, entretanto, se faz necessário mais pesquisas acerca da interação entre o TCE e animais cronicamente estressados.

Palavras-chave: Estresse; Estresse crônico imprevisível; ECI; Zebrafish; Comportamento.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Esquema representando o eixo hipotálamo-hipófise-adrenal/inter-renal.....	13
Figura 2 - Registro fotográfico de zebrafish adulto.....	16
Figura 3 - Esquema representando o aparato para o teste de distribuição vertical eliciada pela novidade.....	21
Figura 4 - Esquema representando o aparato do teste de preferência claro/escuro.....	22

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 01 - Analise da variável "tempo no topo" do teste de distribuição vertical eliciada pela novidade.....	23
Gráfico 02 - Analise da variável "tempo no fundo" do teste de distribuição vertical eliciada pela novidade.....	23
Gráfico 03 - Analise da variável "nado errático" do teste de distribuição vertical eliciada pela novidade.....	24
Gráfico 04 - Analise da variável "velocidade média" do teste de distribuição vertical eliciada pela novidade.....	24
Gráfico 05 - Analise da variável "congelamento" do teste de distribuição vertical eliciada pela novidade.....	24
Gráfico 06 - Analise da variável "tempo no compartimento branco" do teste de preferência claro/escuro.....	25
Gráfico 07 - Analise da variável "congelamento" do teste de preferência claro/escuro.....	25
Gráfico 08 - Analise da variável "velocidade média" do teste de preferência claro/escuro.....	25
Gráfico 09 - Analise da variável "nado errático" do teste de preferência claro/escuro.....	25
Gráfico 10 - Analise da chance de sobrevivência de Kaplan-Meier.....	26

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Cronograma de estresse crônico imprevisível utilizado nesse trabalho.....	20
---	----

LISTA DE ABREVIATURA E SIGLAS

SAG	Síndrome da adaptação geral
HHA	Eixo hipotálamo-hipófise-adrenal
HHI	Hipotálamo-hipófise-inter-renal
PVN	Núcleo paraventricular
CRF	Fator liberador de corticotropina (<i>corticotropin-releasing factor</i>)
ACTH	Hormônio adrenocorticotrófico (<i>adrenocorticotropic hormone</i>)
GC	Glicocorticoides
TEPT	Transtorno do estresse pós-traumático
DVEN	Teste de distribuição vertical eliciada pela novidade
TCE	Teste de preferência claro/escuro
ECI	Estresse crônico imprevisível
CONCEA	Conselho Nacional de Controle e Experimentação Animal
CR	Animais controle

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	11
1.1 Eixo hipotálamo-hipófise-adrenal/inter-renal	11
1.2 Impactos do HHA/I no organismo	13
1.3 Modelos animais e Zebrafish	14
1.3.1 Modelo animal.....	14
1.3.2 Zebrafish.....	14
1.3.3 Testes comportamentais para estresse e ansiedade.....	16
1.4 Estresse crônico imprevisível	16
2 OBJETIVOS	17
2.1 Objetivos gerais	17
2.2 Objetivos específicos	18
3 MATERIAS E MÉTODOS	18
3.1 Animais e alojamento	18
3.2 Aspectos éticos	18
3.3 Protocolo de estresse crônico imprevisível	18
3.4 Testes Comportamentais	19
3.4.1 Distribuição vertical eliciada pela novidade.....	19
3.4.2 Teste de preferência claro/escuro.....	20
3.5 Análise estatística	21
4 RESULTADOS	21
5 DISCUÇÃO	25
6 CONSIDERAÇÕES FINAIS	27
REFERÊNCIAS	27

1 INTRODUÇÃO

Na contemporaneidade temas como ansiedade, depressão e estresse estão cada vez mais em evidência nos meios tanto da mídia quanto nos temas de pesquisa. Um dos campos que cada vez mais se interessa por essa temática é o da psicobiologia e neurociências, se avançando sobre temáticas como o estresse e ansiedade. Um dos precursores nos estudos de estresse e principal responsável por popularizar o termo (originalmente da engenharia) foi Hans Selye (1936), que colocou animais em situações adversas (frio, calor, infecção, trauma, hemorragia) e percebeu que o organismo tinha respostas fisiológicas padronizadas independente da demanda que ele enfrentava. A partir daí ele descreveu o estresse como uma resposta não específica do corpo a qualquer demanda, posteriormente chamando o estresse de síndrome da adaptação geral (SAG). Selye também pontuou em seus trabalhos posteriores que o estresse era na realidade um evento de resposta e não uma causa, além também de perceber que essa resposta fisiológica chamada de estresse acontecia até mesmo em contexto positivos para o organismo (Selye 1950, 1956). Atualmente chamamos de estresse a resposta fisiológica e de estressor os fatores causais do estresse.

1.1 Eixo hipotálamo-hipófise-adrenal/inter-renal

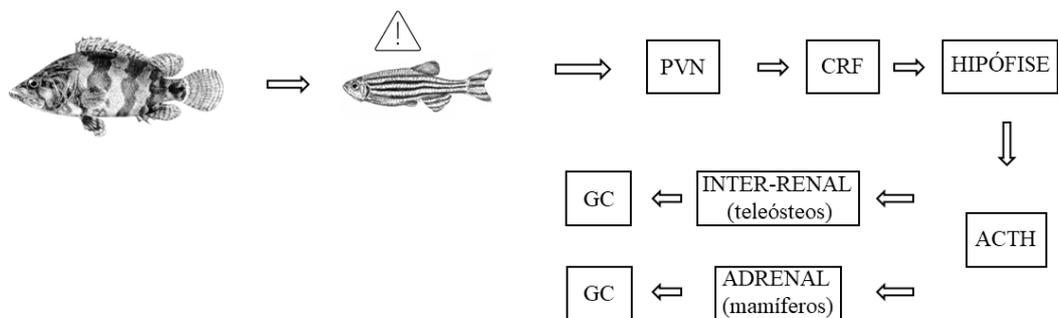
Após as pesquisas seminais de Selye (1936; 1950; 1956), muito foi descoberto no campo do estresse, atualmente se entende como funciona a resposta fisiológica aos estressores. Sabe-se atualmente que o principal eixo que atua como regulador das repostas do organismo aos estressores é o Eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (HHA), que está principalmente ligado a mobilização de energia para o enfretamento do estressor percebido pelo organismo. Esse movimento se chama alostase, que é uma regulação fisiológica que tenta preparar o organismo para eventuais adversidades, ou seja, manter o equilíbrio homeostático em momentos de adversidade (Sterling; Eyer, 1988). Discutiremos mais sobre alostase adiante.

A ativação do eixo HHA se dá inicialmente após um estressor ser percebido, então a partir daí neurônios parvocelulares neurosecretores que estão situados dentro do núcleo paraventricular (PVN) do hipotálamo vão liberar o “Fator liberador de corticotropina” (*corticotropin-releasing factor* - CRF). CRF é um neuropeptídeo de 41 aminoácidos que é fortemente expresso no PVN (Cummings *et al.*, 1983) e está intimamente ligado a regulação hipotalâmico do eixo HHA (Antoni, 1986; Herman *et al.*, 2016), após se projetarem para fora do PVN através do sistema portal pituitário (Sower, 2015) e irem parar na adeno-hipófise, o CRF vai impulsionar a síntese do hormônio adrenocorticotrófico (*adrenocorticotropic hormone*

- ACTH), que é um hormônio peptídico de 39 resíduos de aminoácidos. O ACTH é secretado pelos corticotropos na circulação sanguínea que por sua vez irá parar nas glândulas Adrenais, por fim realizando a síntese e liberação de glicocorticoides (GC, em humanos o glicocorticoide é o cortisol). É importante frisar que o eixo HHA também conta com um recurso de ajuste baseado em feedback negativo, o que pode culminar no bloqueio da liberação hipofisária de ACTH e com isso limitar os efeitos do GC no organismo (Herman *et al.*, 2016; Keller-Wood, Dallman, 1984; Gjerstad; Lightman; Spiga, 2018). Tal feedback pode vir de uma variedade de órgãos que são afetados pelos glicocorticoides, como o próprio sistema nervoso central, outros órgãos periféricos como fígado, músculo e até mesmo os tecidos adiposos podem fazer parte do mecanismo (De Kloet; Herman, 2018).

Devido ao ancestral comum que todas as espécies compartilham, o eixo sensível aos estressores está presente em uma diversidade de vertebrados sendo evolutivamente conservado, podendo ter apenas algumas diferenças anatômicas e/ou funcionais (Bouyoucos *et al.*, 2021; Trudeau; Somoza, 2020). A título de exemplo, nos peixes teleósteos o eixo é constituído pela mesma interação “hipotálamo-hipófise” como nos mamíferos, porém os teleósteos não possuem um órgão separado como nos mamíferos (A glândula adrenal), eles possuem uma parte do rim dedicada a esse propósito chamada de inter-renal, assim o eixo nos teleósteos é hipotálamo-hipófise-inter-renal (HHI, Bouyoucos *et al.*, 2021). A figura 1 representa um pouco dessa interação entre o estressor percebido e a ativação do eixo HHA/I. O organismo (Peixe a esquerda: *Danio rerio*) ao perceber um predador (Peixe a direita: *Nandus nandus*) entra em estado de alerta (mecanismo da ansiedade) e esse estado vai culminar em uma cascata de eventos para mobilizar a síntese de GC para o organismo enfrentar o desafio iminente, no geral essas respostas de enfrentamento são classificadas como luta, fuga e congelamento.

Figura 1: Representação do eixo HHI/HHA



Fonte: elaborado pelo autor no programa PowerPoint.

Importante ressaltar que na resposta a estressores do eixo HHA/I o GC não consegue ser sintetizado rápido o suficiente para agir nas respostas a estressores agudos, GC leva em

torno de 15 minutos a 1 hora para de fato ter seus primeiros impactos no organismo (Sapolsky; Romero; Munck, 2000). Então a primeira resposta fisiológica do organismo é um súbito aumento da secreção de catecolaminas, epinefrina (conhecida como adrenalina), norepinefrina e dopamina, no sistema nervoso simpático, que vão fazer ajustes no organismo, como: redistribuir o fluxo sanguíneo dos órgãos para os músculos; dilatação das pupilas (midríase); dilatação pulmonar para melhorar o fornecimento de oxigênio ao sangue (efeito broncodilatador); retenção de sódio e etc. (Goldstein, 2003; Tank; Lee Wong, 2011). É através desses ajustes fisiológicos proporcionados pelas catecolaminas que o organismo vai conseguir enfrentar o desafio imposto a ele nos primeiros segundos/minutos.

1.2 Impactos do HHA/I no organismo

Outro ponto importante da resposta fisiológica de estresse está ligado à sua interação com uma diversidade de órgãos e regiões do sistema nervoso central, sendo assim ativações pouco adaptativas e recorrentes do eixo HHA/I podem facilitar o desenvolvimento de uma gama de doenças e síndromes, bem como no surgimento de transtornos do humor. Para se entender como a resposta de estresse deixa de ser adaptativa é necessário entender os conceitos de alostase e carga alostatica.

A alostase é entendida como uma adaptação para o organismo se preparar a esses momentos de desafio (Sterling; Eyer, 1988; Mcewen, 1998) ou seja, todas as adaptações que o eixo HHA/I geram no organismo é uma adaptação alostatica visando alcançar um ponto de equilíbrio frente a um desafio real ou percebido, o problema acontece quando esse sistema é muito requisitado, o que pode acontecer devido ao organismo está exposto a uma diversidade muito grande de estressores, causando a hiperativação desse mecanismo e com isso uma hiperativação do eixo HHA/I. Os efeitos adversos dessa hiperativação são chamados de “carga alostatica” (Mcewen, 1998; Mcewen, 2013). Essa hiperativação e alta expressão de GC e catecolaminas está intimamente ligada ao desenvolvimento de doenças, como: doenças cardiovasculares; diabetes; hipertensão; gastrite e formação de úlceras gástricas (Mcewen, 2013; Sapolsky; Romero; Munck, 2000; Tank; Lee Wong, 2011; Oray et al., 2016).

Existe também outro aspecto dos GCs que podem ensejar no desenvolvimento de condições patológicas, a ampla gama de medicamentos corticosteroides (medicamentos à base de GCs) que está à venda e são indicados para tratamento de condições medicas podem ser utilizados em condições de abuso, o que pode acarretar em doenças mais severas como: catarata; glaucoma; fragilidade crônica da pele (dermatoporose); sangramento gastrointestinal;

esteatose hepática; supressão do desenvolvimento infantil e etc. (Oray et al., 2016; Gabriel; Jaakkimainen; Bombardier, 1991; Fel; Aslangul; Le Jeunne, 2012).

Além do eixo HHA participar no desenvolvimento de doenças medicas, também pode participar no surgimento de transtornos psiquiátricos, esse fato se deve em grande parte as mudanças fisiológicas que o eixo HHA causa, elas acabam por impactar muitas áreas do sistema nervoso central e periférico. As áreas que mais correlacionam o eixo HHA a transtornos do humor (como a ansiedade) é o sistema límbico, o *locus coeruleus* e o córtex pré-frontal (Arborelius et al., 1999; Graeff; Zangrossi JR, 2010). A partir dessa interação é possível correlacionar o GC e o eixo HHA a uma diversidade de transtornos de humor, como: ansiedade generalizada; depressão; transtorno do estresse pós-traumático (TEPT); esquizofrenia; transtorno do pânico (Sapolsky, 1996; Graeff, 2007; Oray et al., 2016).

1.3 Modelos animais e Zebrafish

1.3.1 Modelo animal

Modelos animais são amplamente utilizados em investigação científica desde o início do século passado, em especial após as descobertas de Pavlov sobre condicionamento em cães. De lá para cá os modelos animais se tornaram uma ferramenta imprescindível nas pesquisas, sendo essencial em trabalhos nos campos de estudos da genética, psicobiologia, comportamento, neurologia, transtornos relacionados ao estresse e transtornos de ansiedade, desenvolvimento de novos tratamentos psicofarmacológicos, como também no estudo do funcionamento basal de estruturas do sistema nervoso (podendo ser através de animais *knock-out*), quanto em pesquisas clínicas que visam compreender os mecanismos fisiopatológicos dos transtornos mentais (Graeff; Zangrossi JR, 2002; Finn; Rutledge-Gorman; Crabbe, 2003; Maximino et al., 2013).

Com tamanha amplitude de modelos animais, acaba por ser necessário sempre revisar se tais modelos são de fato coerentes no que se propõem, já que inevitavelmente possuem suas limitações de constructo (Maximino; Van Der Staay, 2019; Haller; Alicki, 2012). Nesse sentido, existe um interesse sempre latente em desenvolver modelos mais coesos e assertivos para o que se deseja investigar.

1.3.2 Zebrafish

Um animal que está conquistando um espaço cada vez maior como organismo modelo é o *zebrafish* (*Danio rerio*). Esse animal é um peixe teleósteo natural do sul da Ásia e característico da água doce, quando adulto mede em torno de 2 a 4 centímetros. É bastante difundido como animal de aquarismo (conhecido no meio também por paulistinha e peixe

zebra), o zebrafish possui diversas características interessantes para tal finalidade, como uma alta capacidade de se adaptar a criação em cativeiro, expectativa de vida de 2 a 4 anos, alta produção de ovos (cerca de 200) e um rápido desenvolvimento embrionário. Quando se pensa no uso em pesquisa ele possui mais duas vantagens, o zebrafish exibe um baixo custo para se manter, além de possuir um amplo acervo de conhecimentos acerca da biologia deste animal (Siebel; Bonan; Silva, 2015).

Figura 2: registro fotográfico de zebrafish



Fonte: jornal USP ¹

O potencial do zebrafish tornou-se evidente a partir do trabalho desenvolvido por George Streisinger (1981) que desenvolveu uma série de técnicas que permitiram a identificação de mutações que afetavam o desenvolvimento embrionário em zebrafish, assim o potencial como organismo modelo do zebrafish começou a ser explorado por outros pesquisadores (Siebel; Bonan; Silva, 2015). Como foi descrito anteriormente, hoje se sabe que esses animais possuem um eixo de resposta a estressores análogo ao dos mamíferos (HHI), e que também possuem 71% dos genes homólogos aos genes de doenças humanas (Lieschke; Currie, 2007).

Um dos campos mais recentes a explorar a versatilidade do zebrafish é o campo da psicobiologia e neurociências. É possível encontrar nessa área trabalhos que exploram vários aspectos da biologia do animal, como por exemplo as funções de neurotransmissores em diversas demandas fisiológicas do organismo. Um neurotransmissor bastante analisado é a serotonina (5-hidroxitriptamina ou 5HT), que é um neurotransmissor altamente imbricado em respostas de ansiedade e pânico (Graeff, 2004; Carmo Silva *et al.*, 2021; Griffiths *et al.*, 2012), modelos que tentam entender a genética por trás da ansiedade (Finn; Rutledge-Gorman; Crabbe,

¹ Disponível em: <https://jornal.usp.br/>. Acesso em: nov. 2023

2003), modelos que avaliam o comportamento e os mecanismos de defesa do próprio zebrafish (Maximino *et al.*, 2018; Carmo Silva; Lima-Maximino; Maximino, 2018).

1.3.3 Testes comportamentais para estresse e ansiedade

Dentro do acervo de ferramentas comportamentais para análise de ansiedade e estresse no zebrafish é possível encontrar alguns testes que são bastante confiáveis em evidenciar os comportamentos tipo ansiedade do animal. Um teste bastante comum é o teste de exposição a predador, que consiste em colocar 2 aquários com suas faces encostadas, em um desses aquários vai estar o zebrafish e no outro vai estar um predador, podendo ser um predador simpátrico (que habita a mesma região geográfica), peixe conhecido como *Asian leaf fish* (*Nandus nandus*), ou um predador alopátrico (predador de outra região geográfica), assim podendo analisar as respostas aversivas e de medo do animal (Bass; Gerlai, 2008). É possível também fazer adaptações nesse tipo de teste, utilizando de animais robóticos ou mesmo um vídeo do predador em movimento (Spinello *et al.*, 2019; Gerlai; Fernandes; Pereira, 2009).

Outro teste amplamente utilizado em psicopatologia experimental é o teste de distribuição vertical eliciada pela novidade (DVEN), que consiste em colocar o animal em um aquário livre de qualquer estímulo, nisso ele fica livre para explorar este novo ambiente e sua atividade exploratória é registrada em vídeo por 6 minutos, para analisar posteriores. Existe uma variedade de parâmetros que se pode avaliar, como: distância percorrida, velocidade média, permanência no fundo ou topo do aquário, movimentos erráticos e congelamento (*freezing*; corpo completamente imóvel), entre outras (Cachat *et al.*, 2010).

Existe também o teste de preferência claro/escuro (TCE), que consiste em utilizar um aquário de 45 centímetros de comprimento que tem metade do seu corpo na cor branca e outra metade na cor preta, na divisa entre as cores branca e preta existe um compartimento central com duas portinholas que separam ambas as partes. O teste consiste em colocar o zebrafish nesse compartimento central por 3 minutos e depois abrir as portinholas, assim o animal fica livre para explorar o aquário, essa segunda fase dura 15 minutos e durante esse tempo a atividade exploratória é registrada para análises posteriores (Maximino *et al.*, 2010b).

1.4 Estresse crônico imprevisível

Atualmente um modelo em psicopatologia experimental que vem ganhando muita visibilidade, por pesquisadores que estudam o estresse crônico e suas implicações no organismo, é o modelo de estresse crônico imprevisível (ECI), tal modelo é utilizado em pesquisas com ratos a muito tempo (Bondi *et al.*, 2008; Piatto *et al.*, 2010; Willner, 2005),

contudo em zebrafish (e peixes teleósteos) só começou a ser utilizado após a pesquisa de Piato *et al.* (2011), que concebeu um modelo viável para utilização nesse modelo.

O trabalho que Piato *et al.* (2011) desenvolveu, fez adaptações no protocolo de estresse crônico que é utilizado em camundongos e ratos, afinal os organismos aquáticos e terrestres têm um ambiente notavelmente diferente, além disso ele também analisou as diferenças entre um protocolo de 7 e de 14 dias, tentando identificar qual desses surtiria resultados mais desejáveis para pesquisas experimentais. A conclusão preliminar que ele obteve foi que o protocolo de 7 dias era mais indicado para pesquisas em ansiedade e que um protocolo de 14 dias era mais indicado para pesquisas em depressão, contudo, uma meta-análise que foi publicada recentemente percebeu que resultados de trabalhos que utilizavam 7 dias de ECI eram menos consistentes do que trabalhos que utilizavam 14 dias de ECI (Gallas-Lopes *et al.*, 2023) sugerindo que 14 dias seriam suficientes para perceber mudanças mais significativas nos níveis de cortisol e comportamento tipo ansiedade dos animais (Gallas-Lopes *et al.*, 2023).

Atualmente é possível encontrar outros trabalhos que se utilizaram do protocolo desenvolvido por Piato *et al.* (2011), embora cada pesquisador faça suas alterações nos estressores que vão ser utilizados, podendo existir protocolos com 4 estressores somente, enquanto outros utiliza um número de estressores mais variável. As investigações utilizando o ECI podem ser bastante variadas, como o trabalho de Zimmermann *et al.* (2016) que investigou quais os impactos que o ECI pode exercer sobre o sistema purinérgico, com enfoque principal nas funções das enzimas ectonucleotidases, e percebeu que o ECI aumenta os níveis de adenosina fora das células. Outras pesquisas tentam avaliar como um estressor agudo ou ECI podem impactar o comportamento exploratório do zebrafish no teste de campo aberto (Borba *et al.*, 2022), é possível também analisar como um ambiente mais aproximado com o natural do animal (conhecido como enriquecimento ambiental) pode exercer fatores protetivos ao organismo que foi exposto ao ECI, como diminuir os níveis de cortisol, proteção contra estresse oxidativo que o estresse crônico pode causar e promover um efeito ansiolítico no comportamento (Marcon *et al.*, 2018a; Marcon *et al.*, 2018b). Existe até mesmo trabalhos que desenvolvem protocolos de ECI para entender quais as consequências do estresse crônico imprevisível em estágios mais iniciais da vida e como pode afetar as respostas de ansiedade na fase adulta do organismo (Fontana *et al.*, 2021).

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivos gerais

Avaliar os efeitos do estresse crônico imprevisível sobre parâmetros comportamentais tipo ansiedade no zebrafish (*Danio rerio*).

2.2 Objetivos específicos

- Utilizar o estresse crônico imprevisível 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 o grupo estressado com ECI e o grupo controle.

3 MATERIAIS E METODOS

3.1 Animais e alojamento

Foram utilizados 40 zebrafish (*Danio rerio*) adultos do fenótipo *shortfin*, sem distinção de sexo (embora a maioria fosse fêmea), esses animais foram obtidos por fornecedor comercial (Piscicultura PowerFish, Itaguaí/RJ) e alojados em aquários de vidro e acrílico durante um intervalo de 4 meses até a data do experimento, permanecendo em fotoperíodo de 12h de claro por 12h de escuro. Em relação a qualidade da água, a temperatura era mantida em 25 ± 3 °C, PH 7,0-7,5, nitrito a $<0,01-0,50$ ppm, Amônia a 0,25-1,00 ppm, água estava livre de cloro além de constante filtração e oxigenação.

3.2 Aspectos éticos

Todos os procedimentos feitos respeitaram os princípios éticos da legislação atual, segundo o Conselho Nacional de Controle e Experimentação Animal (CONCEA). Visando obter o bem-estar animal para que o mesmo não passe por estresse, dor ou sofrimentos desnecessários, todos os animais utilizados foram mantidos em condições adequadas de alojamento e manejos antes e durante o experimento.

3.3 Protocolo de estresse crônico imprevisível

O protocolo de estresse crônico imprevisível (ECI) utilizado nesse trabalho é uma versão adaptada dos protocolos utilizados nos trabalhos de Piatto *et al* (2011) e Manuel *et al*. (2014). O protocolo ECI consiste em utilizar uma diversidade de estressores por um tempo determinado (geralmente 7 ou 14 dias) duas vezes ao dia. Nesse trabalho foi utilizado um período de 14 dias com base no Gallas-Lopes *et al*. (2023) que demonstrou através de uma meta análise que períodos de 14 dias ou mais implicam em um efeito maior. Um total de 20 animais (n=20) foi submetido ao cronograma de estresse crônico imprevisível, mas ao decorrer do protocolo faleceu 5 animais (n=15 no final).

Os estressores utilizados foram: Aquecer rapidamente à água até 33 graus por 30 minutos; resfriar rapidamente a água até 20-21 graus por 30 minutos; aglomerar 20 peixes em um Becker de 500 ml de água por 60 minutos; trocar a água do tanque 3 vezes seguidas com os animais dentro; perseguir os animais no tanque com uma rede (10 cm x 13 cm x 40 cm) por um período de 5 minutos, uma pausa de 15 minutos e mais uma perseguição de 5 minutos; Exposição a uma tela com imagens de um predador simpátrico (*Asian leaf fish*) por 50 minutos; Jejum de 24 horas; contenção de 90 minutos em microtubos plásticos de 2 ml adaptado de Piatto *et al.* (2011); exposição a substância de alarme por 6 minutos (28 ml obtido de 4 animais doadores); reduzir o nível da água do tanque até expor a dorsal superior dos animais por 15 minutos. Visando obter um critério maior de imprevisibilidade foi utilizado um aplicativo de aparelho celular para sortear os estressores a cada dia, fazendo apenas um novo sorteio caso o estressor tivesse sido realizado duas vezes na semana, assim sendo um máximo de 2 repetições por semana.

Quadro 1 – Cronograma de estresse crônico utilizado.

Dias da Semana	Semana 1	Semana 2
Sábado	09:45 - Aglomeração	09:00 - Reduzir nível da água
	13:30 - Perseguição	14:00 - Resfriamento
Domingo	11:00 - Troca de água	11:00 - Reduzir nível da água
	14:30 - Resfriamento	15:00 - Aquecimento
Segunda	10:15 - Aquecimento	10:00 - Contenção
	16:30 - Aquecimento	13:00 - Perseguição
Terça	09:45 - Aglomeração	10:30 - Aglomeração
	15:10 - Exposição a predador	16:00 - Troca de água
Quarta	11:00 - Troca de água	08:50 - Exposição a predador
	14:50 - Contenção	16:00 - Jejum
Quinta	10:30 - Exposição a predador	12:00 - Resfriamento
	14:40 - Reduzir nível da água	15:25 - Perseguição
Sexta	09:30 - Perseguição	10:00 - Substância de alarme
	16:55 - Substância de alarme	14:00 - Aglomeração

Fonte: elaborado pelo autor.

3.4 Testes Comportamentais

Os testes comportamentais utilizados nesse trabalho foram os testes de preferência claro/escuro e de distribuição vertical eliciada pela novidade. Todos os 40 animais selecionados foram individualmente submetidos aos testes comportamentais, os animais que passaram pelo cronograma de estresse crônico foram submetidos aos testes 24 horas depois do encerramento

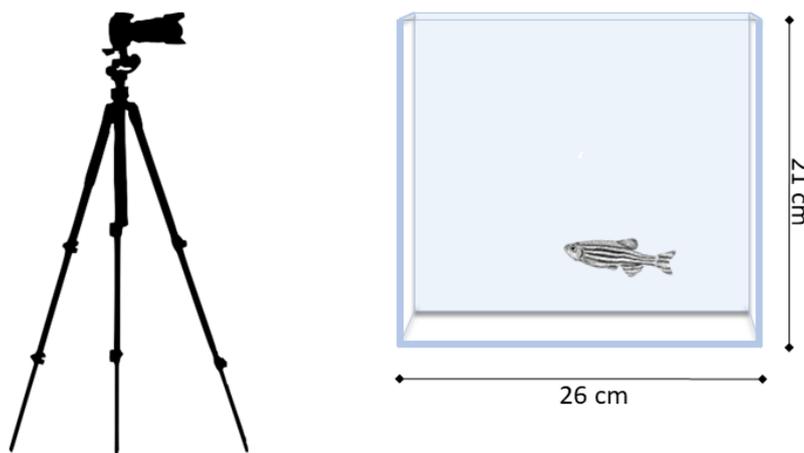
do protocolo. Já os animais controle (CR) foram retirados diretamente do seu tanque para os testes comportamentais.

3.4.1 Distribuição vertical eliciada pela novidade

O teste de distribuição vertical eliciada pela novidade (DVEN) utilizado neste trabalho é uma versão adaptada do Cachat *et al.* (2010). Os animais foram individualmente levados ao aparato, que consiste em um aquário transparente de 21 cm x 26 cm x 16 cm (altura, comprimento e largura) com suas 4 faces revestidas de Papel branco e isopor (apenas a face frontal e superior estavam livres) visando impedir que o animal seja submetido a estímulos externos indesejados. Esse aquário tinha uma coluna de água de 16 centímetros. Após os animais serem colocados no aquário eles podiam explorar livremente por um período de 6 minutos. A filmagem aconteceu com uma câmera fotográfica SONY (480p a 30 FPS) que estava previamente posicionada a frente do aquário. O ambiente de experimento se deu com uma média de lux 441 ± 50 , 68 ± 4 dB e constantemente sob ruído branco Gaussiano.

A análise dos vídeos se deu através do software TheRealFishTracker², com análise das seguintes variáveis: Velocidade média; ângulo absoluto médio; tempo de permanência no topo; tempo de permanência no baixo e tempo de congelamento (Cachat *et al.*, 2010).

Figura 2: Representação do teste distribuição vertical eliciada pela novidade.



Autoria: elaborado pelo autor no programa Power Point.

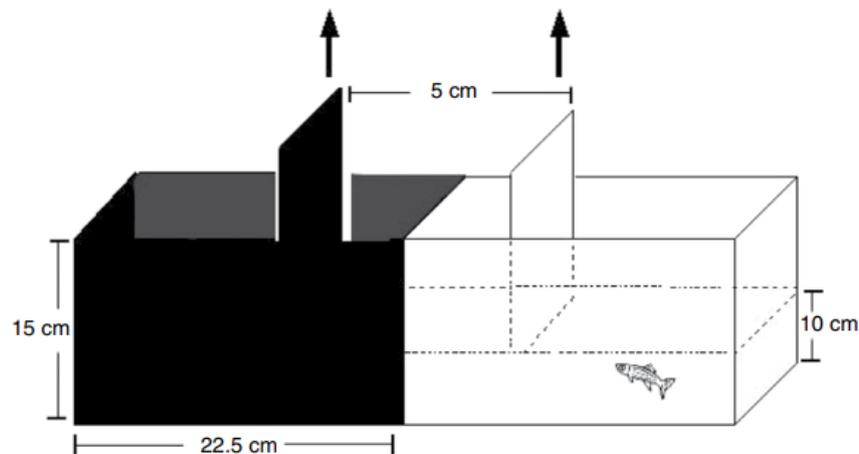
3.4.2 Teste de preferência claro/escuro

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/>>.

O teste de preferência claro/escuro (TCE) utilizado neste trabalho é uma versão adaptada de Maximino *et al.* (2010b). Os animais foram levados individualmente para o aquário TCE com dimensões de 15 cm x 10 cm x 45 cm (altura x largura x comprimento), onde permaneceram em um compartimento central (ficando assim na divisa branca e escura do aquário) por 3 minutos para aclimatarmos. Após esse período as portinholas do lado branco e escuro são retiradas simultaneamente deixando o animal livre para escolher explorar ambos os lados. Esse processo foi filmado por 15 minutos com um aparelho telefone celular (12 MP; resolução 720p a 30qps) posicionado na parte superior do compartimento escuro em um ângulo que também permitia ver a movimentação no compartimento branco. O ambiente de experimento se deu com uma média de lux 452 ± 50 , 65 ± 4 dB e constantemente sob ruído branco Gaussiano.

A análise dos vídeos também se deu através do software TheRealFishTrackr, sendo analisadas as seguintes variáveis: Velocidade média; ângulo absoluto médio; tempo no branco e tempo de congelamento (Maximino *et al.*, 2010b).

Figura 3: Representação do teste de preferência claro/escuro



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

3.5 Análise estatística

Os dados obtidos através do TheRealFishTrackr foram transcritos para uma tabela no software Excel, assim os dados brutos puderam ser tratados para que fosse possível realizar a análise estatística. O programa utilizado para esse fim foi o JAMOVI 2.4.1 no qual foi utilizado o teste *T* de Student para amostras independentes. O valor de significância utilizado foi de $p <$

0,05 em todas as análises desenvolvidas. Os gráficos foram criados utilizando a ferramenta *estimationstats*³.

4 RESULTADOS

Após análise estatística do teste DVEN foi observado diferenças estatisticamente significativas entre os grupos na variável “Tempo no fundo” ($T [gl= 33] = 5.94, p= 0,001$), com um efeito de tamanho grande ($d = 2, IC95\% [1,011, 3,012]$), na variável “Tempo no topo” ($T [gl=33] = -4.3, p= 0,001$) com um efeito de tamanho grande ($d = 1,46, IC95\% [-2,31, -0,59]$) indicando que os animais expostos ao protocolo ECI tem mais tempo no fundo e menor tempo no topo que os animais CR conforme gráfico 1 e gráfico 2.

Gráfico 1: Diferença media de tempo no topo

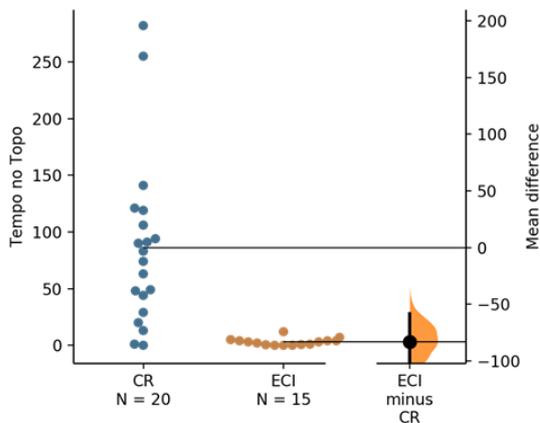
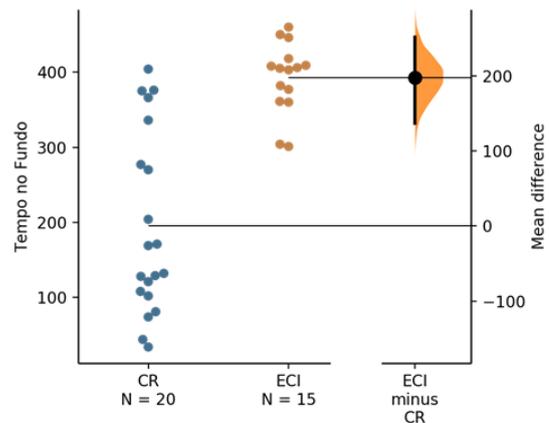


Gráfico 2: Diferença media de tempo no fundo



Autoria: elaborado pelo autor na plataforma *estimation stats*.

Já nas variáveis de “Velocidade média” ($T [gl=33] = -1.0, p= 0,32$), “Nado errático” ($T [gl=33] = -1.2, p= 0,24$) e de “Congelamento” ($T [gl=33] 1.8, p= 0,08$) não foi possível observar diferenças estatisticamente significativas entre os grupos controle e ECI conforme gráficos 3,4 e 5.

³ Plataforma gratuita e online para elaboração de gráficos estatísticos, disponível para acesso em: <https://www.estimationstats.com/#/analyze/two-independent-groups>.

Gráfico 3: Diferença média no nado errático

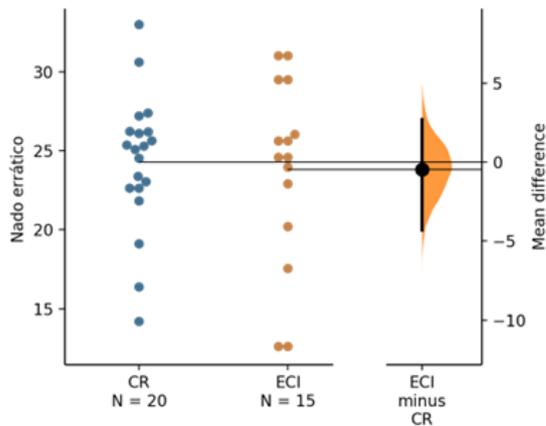


Gráfico 4: Diferença média na velocidade

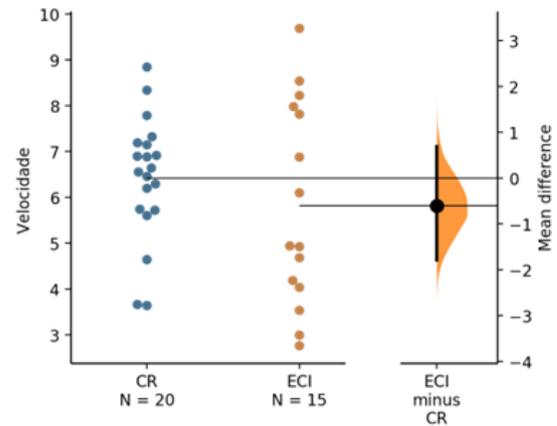
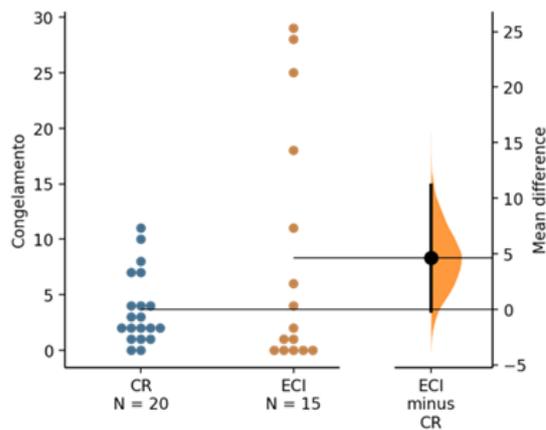


Gráfico 5: Diferença média no congelamento



Autoria: elaborado pelo autor na plataforma *estimation stats*.

Após análise estatística do TCE foi possível observar que não houve diferença estatisticamente significativa nas variáveis de “Tempo no claro” ($T [gl = 32] = -0.39, p = 0,7$), de “Velocidade média” ($T [gl = 32] = -0.84, p = 0,4$), de “Congelamento” ($T [gl = 32] = 1.16, p = 0,25$) conforme gráficos 6,7 e 8. A variável de “Nado errático” foi a única variável que apresentou diferença estatisticamente significativa ($T [gl = 32] = -2.3, p = 0,026$), com um efeito de tamanho médio ($d = -0.8, IC95\% [-1,55, 0,04]$) indicando pouca uniformidade na atividade natatória conforme gráfico 9.

Gráfico 6: Diferença media de tempo no branco

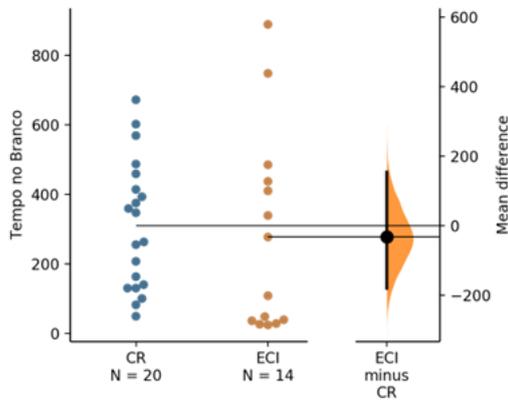


Gráfico 7: Diferença media no congelamento

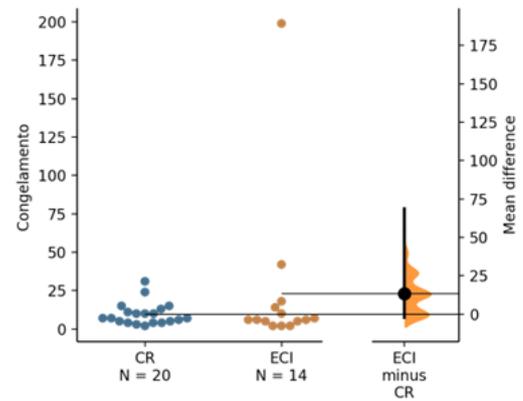


Gráfico 8: Diferença media na velocidade

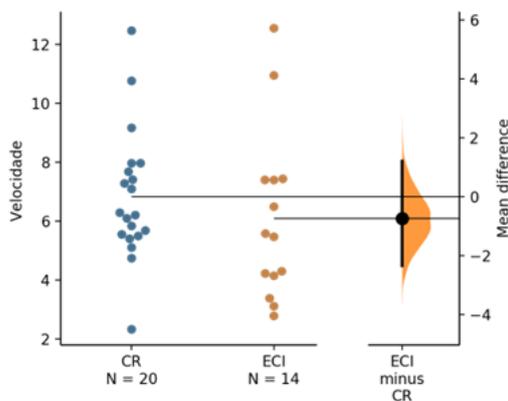
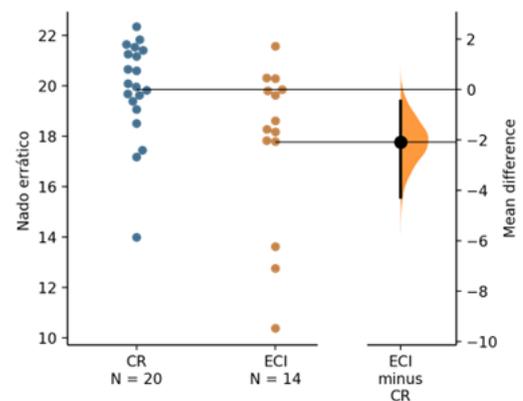


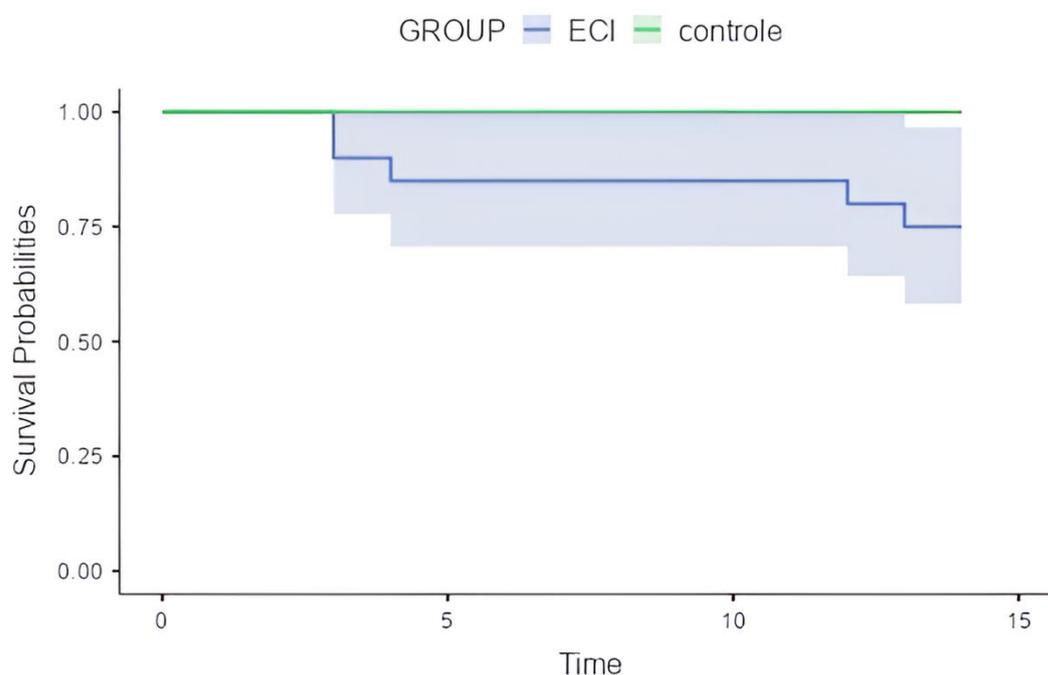
Gráfico 9: Diferença media no nado errático



Autoria: elaborado pelo autor na plataforma *estimation stats*.

Outra variável que foi analisada neste trabalho foi a curva de sobrevivência não-paramétrica de Kaplan-Meier. Conforme fora mencionado anteriormente o N amostral inicial deste trabalho era de 20 animais para o controle e 20 animais submetidos ao ECI, contudo ao longo da aplicação do protocolo os animais do ECI foram gradualmente falecendo, sendo os dois primeiros no terceiro dia, mais um animal no quarto dia, mais um no decimo segundo dia e um último no decimo terceiro dia, assim ao final do protocolo ECI tinha restado um N amostral de 15 animais. Entre os grupos controle e ECI houve uma diferença estatisticamente significativa (Log-rank, Gehan, Tarone-Ware: $p = 0,018$. Peto-Peto: $p = 0,019$) indicando menor chance de sobrevivência no grupo submetido ao ECI conforme gráfico 10.

Gráfico 10: Análise de Kaplan-Meier para chance de sobrevivência.



Autoria: elaborado pelo autor no software Jamovi.

5 DISCUSSÃO

O presente estudo avaliou como estresse crônico imprevisível altera comportamentos tipo ansiedade no zebrafish, utilizando dois aparatos sensíveis para captação de comportamentos do tipo ansiedade, o teste de preferência claro/escuro (TCE) e o teste de distribuição vertical eliciada pela novidade (DVEN).

Conforme anteriormente evidenciado, das variáveis analisadas no teste DVEN, apenas as variáveis de tempo de permanência no topo e tempo no fundo tiveram diferenças significativas entre o grupo controle (CR) e o grupo estressado com ECI, o que está de acordo com achados de Piato *et al.* (2011), que embora tenha analisado os animais em cardume (no presente trabalho foi por indivíduos), ele também encontrou um maior tempo no fundo para animais ECI. Os dados desse trabalho também estão de acordo com os achados de outros pesquisadores, que também perceberam um índice significativamente menor de entradas no topo e maior tempo de permanência no fundo em animais expostos ao protocolo ECI (Marcon *et al.*, 2018^a; Marcon *et al.*, 2016; Song *et al.*, 2018; Fontana *et al.*, 2021; Mocelin *et al.*, 2018).

Já as variáveis de locomoção, nado errático, velocidade e congelamento não tiveram diferenças expressivas, o que não condiz com o trabalho de Piato *et al.* (2011), aonde ele relatou uma latência maior na movimentação do peixe zebra (tanto no protocolo de 7 dias quanto no de 14 dias), como também relatou congelamento no teste de esQUIVA inibitória nos animais ECI de

14 dia, Song *et al.* (2018) também obteve resultados semelhantes. O trabalho de Marcon *et al.* (2018a) e Marcon *et al.* (2016) também não perceberam alteração significativa na locomoção dos animais expostos ao ECI.

Em relação as variáveis do teste de preferência claro/escuro (TCE), a variável de tempo no compartimento branco não expressou nenhuma diferença significativa entre o grupo CR e o grupo ECI, segundo Maximino *et al.* (2010b) esses animais tem preferência natural pelo compartimento escuro, assim animais que estão em estado de alerta tem a tendência a permanecer no compartimento escuro e explorar menos o compartimento branco. Embora o trabalho de Piatto *et al.* (2011) não tenha utilizado o TCE, ele utilizou um outro teste que tem um aquário semelhante, com dois compartimentos, um claro e um escuro (teste de esquivia inibitória), assim ele observou que a preferência pelo compartimento escuro foi prejudica nos animais ECI de 14 dias.

O trabalho de Fontana *et al.* (2021) expos larvas do zebrafish a um protocolo de estresse crônico imprevisível adaptado para larvas, eram 4 grupos com diferentes durações de exposição ao ECI, sendo: ECI de 1 dia, ECI de 3 dias, ECI de 7 dias, ECI de 14 dias. O objetivo era analisar como as diferentes exposições ao estresse crônico imprevisível na fase larval afetam o comportamento tipo ansiedade no zebrafish quando o mesmo estivesse adulto. Ao analisar esses animais no TCE, foi possível observar que as larvas que foram expostas ao ECI de 1, 3 e 7 dias quando adultas tiveram menor tempo no compartimento escuro, já as larvas que foram expostas ao ECI de 14 dias tiveram um tempo significativamente maior no compartimento escuro, isso em relação ao grupo controle e aos grupos ECI de 1,3 e 7 dias. Assim Fontana *et al.* (2021) sugere que determinada quantidade de estresse na fase larval aumenta a resiliência na fase adulta, embora se for por um período muito extenso pode gerar alterações que não são adaptativas, esses achados estão de acordo com achados em ratos (Ricon *et al.*, 2011).

Ao analisar atividade de locomoção no TCE, velocidade média e congelamento não tiveram diferenças significativas, Piatto *et al.* (2011) e Fontana *et al.* (2021) tiveram resultados semelhantes. A variável de nado errático foi a única variável do TCE nesse trabalho que deu diferença significativa. Com base em dados conflitantes entre este trabalho e os supracitados, é possível refletir que essas diferenças nos resultados se dê por formas de manipulação diferente, como por exemplo: Ao passar o animal primeiro no teste DVEN e depois no teste TCE esteja colocando os animais em um estado de alerta maior do que o esperado, o que pode resultar nesses dados conflitantes que. É possível também inferir que os animais expostos ao ECI não reagem muito bem as provocações eliciadas pelo teste de preferência claro/escuro, ou seja, o

TCE exerce alguma influência sobre os animais estressados com o protocolo ECI que ainda não está clara, o que se intensifica com a escassez de trabalhos utilizando essas ferramentas.

Como descrito anteriormente, devido a uma considerável taxa de mortalidade foi elaborada uma análise de sobrevivência (curva de Kaplan-Meier) aonde foi observada uma diferença significativa na chance de vir a obtido para os animais submetidos ao ECI. A maior parte dos trabalhos na literatura não relatam falecimentos durante o protocolo, quando essa informação pode ser encontrada no corpo do trabalho, mas uma grande parte simplesmente não expõe essa informação (Manuel *et al.*, 2014; Zimmermann *et al.*, 2015; Marcon *et al.*, 2016; Marcon *et al.*, 2018^a; Song *et al.*, 2018; Mocelin *et al.*, 2019). Os dados obtidos nesse trabalho apontam para falecimentos nos primeiros dias do protocolo (4 dias) e para os últimos dias (2 últimos), sendo possível concluir que mesmo com protocolos mais leves (1 semana) ou mais pesados (5 semanas) deveriam resultar em alguma taxa de falecimento.

Mesmo com resultados que parcialmente discordam entre si, é possível concluir que protocolos de estresse crônico imprevisível produzem de fato alterações comportamentais. Que o ECI pode ser um importante modelo para estudos de estresse, ansiedade e depressão. Faz se apenas necessário definir qual a melhor metodologia para tais estudos, afinal os resultados diferem entre si, tanto quanto as diferenças metodológicas do protocolo ECI que cada trabalho parece adotar.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A partir dos resultados desse trabalho, é possível concluir que os animais expostos ao protocolo de estresse crônico imprevisível (ECI) estão mais estressados que os animais controle. Apenas se faz mais necessário investigar nuances do comportamento desses animais em alguns testes, como também avaliar os sistemas neuroendócrino desses animais submetidos a tal condição adversa.

7 REFERÊNCIAS

ANTONI, Ferenc A. Hypothalamic control of adrenocorticotropin secretion: advances since the discovery of 41-residue corticotropin-releasing factor. **Endocrine reviews**, v. 7, n. 4, p. 351-378, 1986.

ARBORELIUS, Lotta *et al.* The role of corticotropin-releasing factor in depression and anxiety disorders. **The Journal of endocrinology**, v. 160, n. 1, p. 1-12, jan.1999.

BASS, Stephanie; GERLAI, Robert. Zebrafish (*Danio rerio*) responds differentially to stimulus fish: the effects of sympatric and allopatric predators and harmless fish. **Behavioural brain research**, v. 186, n. 1, p. 107-117, jan.2008.

BORBA, João V. *et al.* Influence of acute and unpredictable chronic stress on spatio-temporal dynamics of exploratory activity in zebrafish with emphasis on homebase-related behaviors. **Behavioural Brain Research**, v. 435, p. 114034, out.2022.

BOUYOUCOS, I. 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. 260, p. 111024, out. 2021.

BONDI, Corina O. *et al.* Chronic unpredictable stress induces a cognitive deficit and anxiety-like behavior in rats that is prevented by chronic antidepressant drug treatment. **Neuropsychopharmacology**, v. 33, n. 2, p. 320-331, jan.2008.

CACHAT, Jonathan *et al.* Measuring behavioral and endocrine responses to novelty stress in adult zebrafish. **Nature protocols**, v. 5, n. 11, p. 1786-1799, nov. 2010.

CARMO SILVA, Rhayra Xavier do; LIMA-MAXIMINO, Monica Gomes; MAXIMINO, Caio. The aversive brain system of teleosts: Implications for neuroscience and biological psychiatry. **Neuroscience & Biobehavioral Reviews**, v. 95, p. 123-135, dez. 2018.

CARMO SILVA, Rhayra Xavier do *et al.* 5-HT_{2C} agonists and antagonists block different components of behavioral responses to potential, distal, and proximal threat in zebrafish. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 210, p. 173276, nov. 2021.

CUMMINGS, S. *et al.* Corticotropin-releasing factor immunoreactivity is widely distributed within the central nervous system of the rat: an immunohistochemical study. **Journal of Neuroscience**, v. 3, n. 7, p. 1355-1368, 1983.

DE KLOET, Annette D.; HERMAN, James P. Fat-brain connections: Adipocyte glucocorticoid control of stress and metabolism. **Frontiers in neuroendocrinology**, v. 48, p. 50-57, jan.2018.

FEL, Audrey; ASLANGUL, Elisabeth; LE JEUNNE, Claire. Eye and corticosteroid's use. **Presse Medicale**, v. 41, n. 4, p. 414-421, fev.2012.

FINN, Deborah A.; RUTLEDGE-GORMAN, Mark T.; CRABBE, John C. Genetic animal models of anxiety. **Neurogenetics**, v. 4, p. 109-135, mar. 2003.

FONTANA, Barbara D. *et al.* Chronic unpredictable early-life stress (CUELS) protocol: Early-life stress changes anxiety levels of adult zebrafish. **Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry**, v. 108, p. 110087, jun. 2021.

GJERSTAD, Julia K.; LIGHTMAN, Stafford L.; SPIGA, Francesca. Role of glucocorticoid negative feedback in the regulation of HPA axis pulsatility. **Stress**, v. 21, n. 5, p. 403-416, may. 2018.

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

GRAEFF, Frederico G.; ZANGROSSI JR, Hélio. Animal models of anxiety disorders. **Biological psychiatry**, p. 877-893, July. 2002.

GRAEFF, Frederico G. Serotonin, the periaqueductal gray and panic. **Neuroscience & Biobehavioral Reviews**, v. 28, n. 3, p. 239-259, mai.2004.

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

GERLAI, Robert; FERNANDES, Yohaán; PEREIRA, Terence. Zebrafish (*Danio rerio*) responds to the animated image of a predator: towards the development of an automated aversive task. **Behavioural brain research**, v. 201, n. 2, p. 318-324, ago. 2009.

GOLDSTEIN, D. S. Catecholamines and stress. **Endocrine regulations**, v. 37, n. 2, p. 69-80, jan.2003.

GABRIEL, S. E.; JAAKKIMAINEN, L.; BOMBARDIER, C. Risk for serious gastrointestinal complications related to use of nonsteroidal anti-inflammatory drugs: a meta-analysis. **Annals of internal medicine**, v. 115, n. 10, p. 787-796, nov. 1991.

GRIFFITHS, Brian B. *et al.* A zebrafish model of glucocorticoid resistance shows serotonergic modulation of the stress response. **Frontiers in behavioral neuroscience**, v. 6, p. 68, out. 2012.

GALLAS-LOPES, Matheus *et al.* Systematic review and meta-analysis of 10 years of unpredictable chronic stress in zebrafish. **Lab Animal**, p. 1-18, out. 2023.

HALLER, Jozsef; ALICKI, Mano. Current animal models of anxiety, anxiety disorders, and anxiolytic drugs. **Current opinion in psychiatry**, v. 25, n. 1, p. 59-64, Jan. 2012.

HERMAN, James P. *et al.* Regulation of the hypothalamic-pituitary-adrenocortical stress response. **Comprehensive physiology**, v. 6, n. 2, p. 603, mar. 2016.

KELLER-WOOD, Maureen E.; DALLMAN, Mary F. Corticosteroid inhibition of ACTH secretion. **Endocrine reviews**, v. 5, n. 1, p. 1-24, jan. 1984.

LIESCHKE, Graham; CURRIE, Peter D. Animal models of human disease: zebrafish swim into view. **Nature Reviews Genetics**, v. 8, n. 5, p. 353-367, mai. 2007.

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

MAXIMINO, Caio *et al.* “Limbic associative” and “autonomic” amygdala in teleosts: a review of the evidence. **Journal of chemical neuroanatomy**, v. 48, p. 1-13, mar. 2013.

MAXIMINO, Caio *et al.* Sensory ecology of ostariophysan alarm substances. **Journal of fish biology**, v. 95, n. 1, p. 274-286, out. 2018.

MAXIMINO, Caio; VAN DER STAAY, Franz Josef. Behavioral models in psychopathology: epistemic and semantic considerations. **Behavioral and Brain Functions**, v. 15, n. 1, p. 1-11, mar. 2019.

MARCON, Matheus et al. Prevention of unpredictable chronic stress-related phenomena in zebrafish exposed to bromazepam, fluoxetine and nortriptyline. **Psychopharmacology**, v. 233, p. 3815-3824, Aug. 2016.

MARCON, Matheus *et al.* Environmental enrichment modulates the response to chronic stress in zebrafish. **Journal of Experimental Biology**, v. 221, n. 4, p. jeb176735, fev. 2018a.

MARCON, Matheus *et al.* Enriched environment prevents oxidative stress in zebrafish submitted to unpredictable chronic stress. **PeerJ**, v. 6, p. e5136, jul. 2018b.

MANUEL, Remy *et al.* Unpredictable chronic stress decreases inhibitory avoidance learning in Tuebingen long-fin zebrafish: stronger effects in the resting phase than in the active phase. **Journal of Experimental Biology**, v. 217, n. 21, p. 3919-3928, nov. 2014.

MCEWEN, B. S. Stress, adaptation, and disease: Allostasis and allostatic load. **Annals of the New York academy of sciences**, v. 840, n. 1, p. 33-44, mai.1998.

MCEWEN, B. S. Allostasis and allostatic load: implications for neuropsychopharmacology. **Stress and the Brain**, p. 2-18, dez. 2013.

MOCELIN, Ricieri *et al.* N-Acetylcysteine reverses anxiety and oxidative damage induced by unpredictable chronic stress in zebrafish. **Molecular Neurobiology**, v. 56, p. 1188-1195, jun. 2018.

ORAY, Merih *et al.* Long-term side effects of glucocorticoids. **Expert opinion on drug safety**, v. 15, n. 4, p. 457-465, nov. 2016.

PIATO, A. L. *et al.* Unpredictable chronic stress model in zebrafish (*Danio rerio*): behavioral and physiological responses. **Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry**, v. 35, n. 2, p. 561-567, mar. 2011.

PIATO, A. L. *et al.* Anti-stress effects of the “tonic” *Ptychopetalum olacoides* (Marapuama) in mice. **Phytomedicine**, v. 17, n. 3-4, p. 248-253, mar. 2010.

PIATO, Angelo L. *et al.* Acute restraint stress in zebrafish: behavioral parameters and purinergic signaling. **Neurochemical research**, v. 36, p. 1876-1886, out. 2011.

RICON, T. *et al.* Unpredictable chronic stress in juvenile or adult rats has opposite effects, respectively, promoting and impairing resilience. **Stress**, v. 15, n. 1, p. 11-20, jun. 2011.

SAPOLSKY, R. M. Why stress is bad for your brain. **Science**, v. 273, n. 5276, p. 749-750, ago. 1996.

SAPOLSKY, R. M.; ROMERO, L. M.; MUNCK, A. U. How do glucocorticoids influence stress responses? Integrating permissive, suppressive, stimulatory, and preparative actions. **Endocrine reviews**, v. 21, n. 1, p. 55-89, fev. 2000.

SIEBEL, A. M.; BONAN, C. D.; SILVA, R. S. Zebrafish como modelo para estudos comportamentais. **Resende RR, organizador. Biotecnologia aplicada à saúde: fundamentos e aplicações**. São Paulo: Blucher, p. 15-56, 2015.

SPINELLO, Chiara *et al.* Zebrafish adjust their behavior in response to an interactive robotic predator. **Frontiers in Robotics and AI**, v. 6, p. 38, may. 2019.

SONG, Cai *et al.* Modeling consequences of prolonged strong unpredictable stress in zebrafish: Complex effects on behavior and physiology. **Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry**, v. 81, p. 384-394, fev. 2018.

SOWER, Stacia A. Breaking dogma on the hypothalamic-pituitary anatomical relations in vertebrates. **Endocrinology**, v. 156, p. 3882-3884, nov. 2015.

STERLING, Peter; EYER, Joseph. Alostasis: A new paradigm to explain arousal pathology. **Handbook of Life Stress, Cognition and Health, January** 1988, 1988.

STREISINGER, George et al. Production of clones of homozygous diploid zebra fish (*Brachydanio rerio*). **Nature**, v. 291, n. 5813, p. 293-296, may. 1981.

TRUDEAU, V. L.; SOMOZA, G. M. Multimodal hypothalamo-hypophysial communication in the vertebrates. **General and comparative endocrinology**, v. 293, p. 113475, jul. 2020.

WILLIAM TANK, A.; LEE WONG, Dona. Peripheral and central effects of circulating catecholamines. **Comprehensive Physiology**, v. 5, n. 1, p. 1-15, jan. 2011.

WILLNER, Paul. Chronic mild stress (CMS) revisited: consistency and behavioural-neurobiological concordance in the effects of CMS. **Neuropsychobiology**, v. 52, n. 2, p. 90-110, jul. 2005.

ZIMMERMANN, F. F. *et al.* Unpredictable chronic stress alters adenosine metabolism in zebrafish brain. **Molecular neurobiology**, v. 53, p. 2518-2528, jun. 2016.