

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM NEUROCIÊNCIAS**

**NÁTHALI ÁVILA NEVES**

**AVALIAÇÃO DO COMPORTAMENTO SOCIAL EM PEIXES-ZEBRA  
SUBMETIDOS AO ESTRESSE CRÔNICO IMPREVISÍVEL**

**Porto Alegre, 2023**

**NÁTHALI ÁVILA NEVES**

**AVALIAÇÃO DO COMPORTAMENTO SOCIAL EM PEIXES-ZEBRA  
SUBMETIDOS AO ESTRESSE CRÔNICO IMPREVISÍVEL**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Neurociências do Instituto de Ciências Básicas da Saúde da Universidade Federal do Rio Grande do Sul como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Neurociências.

Orientador: Prof. Dr. Angelo Piato

## **DEDICATÓRIA**

Dedico este trabalho a todos os profissionais da área da saúde que tanto trabalham em favor da vida.

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço primeiramente a Deus e a minha família. Agradeço também ao meu orientador professor doutor Angelo Piato e a toda equipe do Laboratório de Psicofarmacologia e Comportamento.

## RESUMO

O peixe-zebra (*Danio rerio*) é um organismo modelo especialmente útil na pesquisa em neurociências. Essa espécie é frequentemente empregada em pesquisas que abordam o comportamento social, uma vez que tem a tendência de formar cardumes. Um cardume consiste em qualquer grupo de peixes que se congregam por razões sociais. Os peixes-zebra estabelecem cardumes devido aos diversos benefícios que esses grupos sociais proporcionam, tais como a defesa contra predadores, o aumento do êxito na busca por alimentos e o aumento de sucesso na reprodução. Sabe-se que quando submetido ao estresse crônico imprevisível os peixes-zebra apresentam alterações comportamentais, fisiológicas e moleculares que se assemelham a pacientes com transtornos mentais como ansiedade/depressão. Entretanto, a literatura sobre os efeitos do estresse crônico imprevisível sobre o comportamento social é ambígua. Por essa razão, esse trabalho se propôs a avaliar o efeito do estresse crônico imprevisível sobre comportamentos sociais nos testes de preferência e interação social em peixes-zebra adultos. Em ambos os testes não houve diferença significativa entre os diferentes desfechos de comportamento social entre os grupos controle e estressados. Apenas observou-se que a interação social diminuiu com o passar do tempo para todos os animais. Dessa forma, nas condições experimentais estudadas aqui, o estresse crônico imprevisível não foi capaz de alterar o comportamento social em peixes-zebra. Mais estudos são necessários para avaliar se parâmetros como composição de machos e fêmeas no cardume e/ou tipo/duração de estressor aplicado podem influenciar no comportamento social.

## ABSTRACT

The zebrafish (*Danio rerio*) is a particularly useful model organism in neuroscience. This species is often employed in studies that address social behavior, as it tends to readily form shoals. A shoal comprises any group of fish congregating for social reasons. Zebrafish form shoals due to the various benefits these social groups provide, such as defense against predators, increased foraging success, and enhanced reproductive success. It is known that when subjected to unpredictable chronic stress, zebrafish display behavioral, physiological, and molecular alterations resembling those seen in individuals with mental disorders like anxiety and depression. However, the literature on the effects of unpredictable chronic stress on social behavior is unclear. For this reason, this study aimed to assess the impact of unpredictable chronic stress on social behaviors in adult zebrafish using preference and social interaction tests. In both tests, there was no significant difference between the various outcomes of social behavior between the control and stressed groups. It was only observed that social interaction decreased over time for all animals. Therefore, under the experimental conditions studied here, unpredictable chronic stress did not alter social behavior in zebrafish. Further studies are needed to evaluate whether parameters such as the composition of males and females in the shoal and/or the type/duration of the stressor applied may influence social behavior.

## **LISTA DE ABREVIATURAS**

5-HT: serotonina

ACTH: hormônio adrenocorticotrófico

ALC: acetil-L-carnitina

BDNF: fator neurotrófico derivado do cérebro

CEUA: Comissão de Ética no Uso de Animais

CRF: fator liberador de corticotropina

ECl: estresse crônico imprevisível

HPA: eixo hipotálamo-pituitária-adrenal

HPI: eixo hipotálamo-hipófise-inter-renal

ISRS: inibidores seletivos da recaptação da serotonina

MC2R: receptor de melanocortina 2

NAC: N-acetilcisteína

Pomc: gene pró-opiomelanocortina

## Sumário

1. INTRODUÇÃO	9
1.1 O peixe-zebra	9
1.2 O modelo de estresse crônico imprevisível (ECI)	12
1.3 Comportamento social	13
2. OBJETIVOS	16
2.1 Objetivo geral	16
2.2 Objetivos específicos	16
3. MATERIAIS E MÉTODOS	17
3.1 Animais	17
3.2 Protocolo de estresse crônico imprevisível (ECI)	18
3.3 Análises comportamentais	19
3.3.1 Teste de preferência social	19
3.3.2 Teste de interação social	20
3.4 Análise estatística	21
4. Resultados	22
4.1 Preferência social	22
4.2 Interação social	22
5. DISCUSSÃO	24
6. CONCLUSÃO	26
7. PERSPECTIVAS	27
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	28
9. ANEXOS	37
9.1 Carta de aprovação da CEUA da UFRGS	37
9.2. Carta de autorização para utilização de figura da literatura	38



## 1. INTRODUÇÃO

O estresse pode ser um processo adaptativo que permite aos organismos lidarem com ameaças que podem afetar a homeostase (Herman, 2013; McEwen, 2017). Quando exposto a um agente estressor, o organismo, através de alterações fisiológicas e comportamentais, busca se adaptar a essa demanda e retornar ao equilíbrio, num processo chamado alostase. Esse processo é adaptativo e não implica necessariamente em algum dano ao indivíduo. Entretanto, quando esse estresse ultrapassa as capacidades adaptativas, gerando efeitos deletérios ao indivíduo, temos um estado chamado carga alostática (McEwen, 2007). Esse estado de esgotamento das capacidades adaptativas pode predispor o indivíduo a diversas condições como hipertensão, diabetes, ansiedade, depressão entre outras (McEwen and Gianaros, 2011) Além disso, transtornos mentais relacionados ao estresse como os citados anteriormente podem estar relacionados a alterações no comportamento social (Derntl and Habel, 2011; Hoertnagl and Hofer, 2014; Kennedy and Adolphs, 2012).

### 1.1 O peixe-zebra

O peixe-zebra também conhecido como *zebrafish* ou paulistinha (*Danio rerio*, Cyprinidae) é um peixe tropical, ornamental, de água doce, de hábito diurno, teleósteo, cipriniforme, ovíparo, canibalista parental, com longevidade média entre três e cinco anos (Kishi et al., 2009; Cavallino, Rincón, and Scaia, 2023). Essa espécie apresenta dimorfismo sexual, sendo os machos menores, mais longilíneos e com cores mais marcantes que as fêmeas. Outra forma de discernir o sexo dos peixes é pelo seu comportamento reprodutivo, no qual os machos perseguem as fêmeas e elas, por sua vez, toleram a corte quando já estão sexualmente maduras (Creaser, 1934). Essa espécie é nativa dos córregos da região sudeste do Himalaia, Bangladesh, Índia, Paquistão, Nepal e Mianmar (Engeszer et al., 2007).

Embora peixes teleósteos e mamíferos sejam separados por pelo menos 300 milhões de anos de evolução biológica (Ohno, Wolf, and Atkin, 2009), o peixe-zebra é um excelente organismo modelo para a modelagem e a análise

dos mecanismos envolvidos em um amplo espectro de doenças humanas, como autismo e esquizofrenia (Morris, 2009), doenças oculares (Maurer, Huang, and Neuhauss, 2011) e cardiovasculares (Bakkers, 2011). Os trabalhos com peixe-zebra como organismo modelo têm início em 1934 principalmente em estudos sobre a biologia do desenvolvimento (Creaser, 1934). Na década de 1980, emergiram na literatura trabalhos com peixes-zebra na área da genética (Streisinger et al., 1981; Walker and Streisinger, 1983) e, em meados do segundo semestre de 2023 já foram publicados aproximadamente 690 artigos de acordo com o levantamento preliminar da base de dados PubMed.

Esse organismo modelo tem sido utilizado em diversas áreas de pesquisa além de estudos sobre a biologia do desenvolvimento, como neurociência, biologia molecular, farmacologia, fisiologia e bioquímica (Talise E. Müller et al., 2020). Isso se deve ao fato desse organismo possuir eixos e respostas neuroendócrinos conservados, além de possuir os mesmos sistemas de neurotransmissores presentes em mamíferos. (Rico et al., 2011; Stewart et al., 2014). Apesar dessas semelhanças, é importante destacar que há diferenças em estruturas encefálicas entre peixes e mamíferos ainda que haja semelhanças funcionais.

O genoma dessa espécie já foi sequenciado (Howe et al., 2013). Essa espécie apresenta alta homologia fisiológica e genética com os mamíferos, sendo aproximadamente 70% de similaridade genética com o ser humano (Cheng et al., 2007), sendo útil para estudo do desenvolvimento de vertebrados, da genética, da neurofisiologia e do comportamento (Grunwald and Eisen, 2002). Do ponto de vista técnico, o fato das populações de peixes-zebra serem numerosas permite uma investigação eficaz do genoma, transcriptoma, proteoma e suas manipulações. A produção regular de até duzentos ovos viáveis por desova durante todo o ano faz do peixe-zebra um dos organismos modelo mais populares em genética (Wafer et al., 2016), diferente dos roedores que têm ciclos reprodutivos mais longos e geram ninhadas bem menos numerosas.

O eixo neuroendócrino do estresse do peixe-zebra, hipotálamo-pituitária-inter-renal (HPI), é semelhante ao eixo hipotálamo-pituitária-adrenal (HPA) dos humanos e dos roedores, e libera, tal qual os humanos, cortisol após a exposição ao estresse. O hipotálamo reconhece o estímulo estressor,

que o leva a liberar o fator liberador de corticotropina (CRF) (Machluf, Gutnick, and Levkowitz, 2011; Mommsen, Vijayan, and Moon, 1999) que atua na glândula pituitária anterior para sintetizar e liberar o hormônio adrenocorticotrófico (ACTH) na circulação. O ACTH é produzido pela modificação pós-tradução da proteína codificada pelo gene pró-opiomelanocortina (pomc) (Wendelaar Bonga 1997; Mommsen, Vijayan, and Moon 1999). O ACTH liga-se ao receptor de melanocortina 2 (MC2R) nas células esteroidogênicas do tecido inter-renal e ativa a biossíntese e secreção de cortisol (Mommsen, Vijayan, and Moon, 1999; Nesan and Vijayan, 2013). O tecido inter-renal é análogo à glândula adrenal nos vertebrados superiores (Yi-Wen, 2007) e o cortisol é o principal glicocorticoide circulante nos peixes (Nesan and Vijayan, 2016). A elevação dos níveis de cortisol circulante propicia adaptações fisiológicas ao estresse, tais como recrutamento de glicose e modulações comportamentais, que permitem aos organismos reagir adequadamente em uma situação de “luta ou fuga” (Telemeco and Gangloff, 2020). Na presença de estressores agudos, essas reações geralmente representam um papel adaptativo, que são reversíveis aos níveis homeostáticos, embora 15 minutos de isolamento social seja um estressor agudo que pode produzir um aumento de até 15 vezes nos níveis basais de cortisol e um comportamento semelhante a ansiedade (A. Kalueff, 2014). No entanto, no estresse crônico a exposição duradoura a elevados níveis de cortisol circulante pode ser prejudicial e levar o indivíduo à exaustão, um estado denominado sobrecarga alostática (Karatsoreos and McEwen, 2011).

Dessa forma, esse organismo modelo se mostra adequado para estudos em diferentes áreas de pesquisa. Especificamente, diversos trabalhos mostram similaridades entre os efeitos do estresse em desfechos comportamentais, neuroquímicos e moleculares quando se compara essa espécie com roedores e humanos, abrindo inúmeras possibilidades para o uso de peixes-zebra nos estudos sobre estresse e transtornos psiquiátricos associados.

## 1.2 O modelo de estresse crônico imprevisível (ECI)

O modelo de estresse crônico imprevisível consiste na exposição aleatória, intermitente e imprevisível a uma variedade de estressores. No início da década de 1980 surgiram os primeiros modelos de estresse crônico imprevisível para estudo da depressão em roedores (R. J. Katz, Roth, and Carroll, 1981; R. J. Katz and Hersh, 1981; Richard J. Katz, 1982; Willner et al., 1987). Esse modelo cumpre os critérios de validade de preditibilidade, analogia e homologia. O primeiro denota a capacidade do teste de prever efeitos de drogas na clínica. Já o segundo refere-se à semelhança entre o comportamento do animal no teste com manifestações clínicas da condição estudada. E o terceiro considera a correspondência entre processos psicobiológicos mobilizados na patogenia da condição e no comportamento do animal avaliado no teste, sendo conhecido como validade de constructo de fundamentação teórica (Graeff and Guimarães, 2001).

Roedores submetidos ao ECI apresentam alterações comportamentais, neuroquímicas e moleculares semelhantes a pacientes com diagnóstico de depressão e/ou ansiedade (Jiménez-Sánchez et al., 2016). Por exemplo, roedores submetidos ao ECI apresentam anedonia, déficits cognitivos, desequilíbrios hormonais e neuroquímicos, alteração de peso/apetite, comportamento tipo-ansiedade e alteração de comportamento sexual, por exemplo (Willner, 1997). Além das alterações comportamentais, neuroinflamação, alteração nos níveis de fatores neurotróficos e desequilíbrios do status oxidativo parecem estar presentes e são normalizados pela exposição a antidepressivos e/ou ansiolíticos (Sánchez and Meier, 1997; A. H. Miller and Raison, 2016; Muscat, Papp, and Willner, 1992).

Em 2011, um estudo mostrou que a exposição de peixes-zebra a diferentes estressores de maneira crônica e imprevisível, por 7 ou 14 dias, induziu alterações comportamentais (aumento da ansiedade e prejuízo cognitivo), bioquímicas (aumento do cortisol) e moleculares (aumento da expressão do fator liberador de corticotrofina e diminuição da expressão de receptores de glicocorticoides) que podem ser correlacionadas às observadas em pacientes com diagnóstico de transtornos relacionados ao estresse como ansiedade e depressão. Nesse mesmo estudo, o comportamento social foi

distintamente afetado, sendo aumentado e diminuído, respectivamente, em animais expostos ao estresse por 7 e 14 dias (Piato et al., 2011). Posteriormente, outros estudos mostram que o ECI altera a expressão de marcadores pró-inflamatórias como a ciclooxigenase 2 (COX-2) e a interleucina do tipo 6 (IL-6) (Marcon et al., 2016). As alterações comportamentais, o aumento dos níveis de cortisol e da expressão de COX-2 e IL-6 induzidos pelo ECI foram bloqueados pela exposição à fluoxetina, nortriptilina e bromazepam (Marcon et al., 2016). Outros estudos ampliaram a caracterização comportamental, neuroquímica e molecular do ECI em peixes-zebra (Demin et al., 2020; 2021). Outras moléculas como N-acetilcisteína (NAC), acetil-L-carnitina (ALC), curcumina e liraglutida também apresentaram efeitos no ECI, mostrando que esse modelo pode ser utilizado para o screening de candidatos a fármacos para o tratamento de transtornos relacionados ao estresse como ansiedade e depressão.

Apesar da ampla caracterização do ECI em peixes-zebra, os efeitos sobre o comportamento social são divergentes na literatura. Alguns estudos mostram que a exposição ao ECI aumenta (Benneh et al., 2017; Chakravarty et al., 2013), diminui (Biney et al., 2021; Pavlidis, Theodoridi, and Tsalafouta, 2015; Piato et al., 2011) ou não altera (Fontana et al., 2021; Fulcher et al., 2017) o comportamento social. Isso justifica o estudo nessa área para melhor entendimento do impacto do ECI sobre comportamentos sociais.

### **1.3 Comportamento social**

O comportamento social é uma convivência mutuamente conveniente entre indivíduos da mesma espécie que é crucial para a sobrevivência e reprodução de espécies sociais, incluindo humanos e muitos outros vertebrados (Geng and Peterson, 2019). Os peixes-zebra selvagens presentes na natureza vivem em cardumes de tamanhos variados. Quanto maior o fluxo de água do local, maior o número de indivíduos no cardume, variando de 7 a 10 peixes em águas paradas até 300 peixes em águas turbulentas (Ogi et al., 2021). Um cardume numeroso pode ter maiores recursos anti-predatórios, pois aumentam a probabilidade de detectar um predador mais cedo do que peixes isolados. A informação do risco iminente é rapidamente disseminada dentro do

cardume, aumentando a probabilidade de fuga bem-sucedida. (N. Y. Miller and Gerlai, 2011). Essa dinâmica favorece a busca por alimentos, em função de diluir a responsabilidade pela vigilância em diversas espécies de teleósteos (Magurran and Pitcher, 1983). A homogeneidade fenotípica do cardume também causa confusão no predador, que tem dificuldade de focar em um alvo (Landeau and Terborgh, 1986). Já quando os peixes-zebra são os predadores, o ataque em cardume faz com que eles consigam consumir presas perigosas ou rápidas demais para uma investida individual (N. Y. Miller and Gerlai, 2011).

O sistema mesolímbico que consiste na área tegmentar ventral, no núcleo accumbens, na amígdala basolateral, no corpo estriado, no pallidum ventral e no hipocampo é muito importante para o comportamento social (O'Connell and Hofmann, 2011). Esse sistema é amplamente conservado entre peixes-zebra e mamíferos (O'Connell and Hofmann, 2012). Estruturas como núcleo da rafe dorsal, habênula ventral (homóloga da habênula lateral dos mamíferos) e cerebelo (presentes em mamíferos e em peixes-zebra) parecem estar envolvidas com comportamento social em ambos (Amo et al., 2010; Carta et al., 2019).

Peixes-zebra podem apresentar distintos comportamentos sociais. O *schooling* é um comportamento inato que se manifesta em caso de perigo, tratando-se de movimentos organizados, sincronizados e polarizados que visam a segurança do grupo por meio de evasão coletiva na presença de um predador (Zheng et al., 2005). Já o *shoaling* representa a agregação de indivíduos que objetiva a obtenção de alimentos e a vigilância (N. Miller and Gerlai, 2012) que tem um forte componente genético (Robison and Rowland, 2005; Whiteley et al., 2011). Estudos mostraram que esses comportamentos sociais podem ser manipulados farmacologicamente. Por exemplo, alguns estudos mostram que o álcool interrompe fortemente a polarização no *schooling* e reduz apenas modestamente a coesão dos cardumes, aumentando a distância inter-individual entre os peixes (Gerlai, Ahmad, and Prajapati, 2008), enquanto a nicotina tem efeito modesto na polarização, mas diminuiu fortemente a coesão dos cardumes. Ambas as substâncias reduzem a velocidade de natação (N. Miller et al., 2013; Levin, Bencan, and Cerutti, 2007; Echevarria et al., 2011).

Estudos mostram que os sistemas dopaminérgicos e serotoninérgicos parecem ser relevantes para os comportamentos sociais nessa espécie. O ECI reduz os níveis de dopamina e do metabólito da serotonina 5-HIAA em peixes-zebra isolados durante o desenvolvimento, mas não nos criados socialmente (Fulcher et al., 2017). Os roedores expostos a ECI aumentam as respostas comportamentais do tipo ansiedade e depressão (Zhu et al., 2014), bem como alteram a dopamina (DA) e níveis de serotonina (5-HT) em áreas específicas do cérebro (Patterson et al., 2010) como córtex pré-frontal, núcleo accumbens, hipocampo e mesencéfalo; o que remete à ligação entre esses sistemas de neurotransmissores e a regulação das primeiras experiências sociais (Miura, Qiao, and Ohta, 2002b; 2002a).

O comportamento social pode ser afetado pela exposição a diferentes substâncias, como Glifosato, Paraquat®, Carbendazim, Imazalil, Endosulfan, entre outros que causam no peixe-zebra alterações na atividade locomotora e alteram a morfologia e o comportamento exploratório. Alguns deles causam prejuízo à memória e redução no comportamento agressivo e até indução de sintomas de Parkinson (Bridi et al., 2017; Bortolotto et al., 2014; Andrade et al., 2016; Pereira et al., 2012).

Sabe-se que o estresse crônico imprevisível pode afetar o comportamento social em roedores mimetizando diversos sintomas presentes em condições psiquiátricas, incluindo alterações em endofenótipos relacionados ao comportamento social e agressividade (Cordero et al., 2012; Craig and Halton, 2009; De Kloet, Joëls, and Holsboer, 2005; Lupien et al., 2009; Neumann, Veenema, and Beiderbeck, 2010). Em peixes-zebra, ainda não é claro qual o efeito do estresse crônico imprevisível sobre parâmetros de comportamento social. Isto posto, ainda há muito a se investigar sobre a dinâmica do comportamento social em peixes-zebra e, a partir desse entendimento, estabelecer correlações translacionais com comportamentos sociais observados em diferentes condições que afetam os seres humanos. Considerando que os efeitos do ECI sobre comportamentos sociais ainda não foram satisfatoriamente determinados, a proposta desse trabalho foi avaliar o efeito de um protocolo de ECI sobre diferentes desfechos de comportamento social em peixe-zebra.

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1 Objetivo geral**

Avaliar o efeito do estresse crônico imprevisível (ECI) sobre os comportamentos sociais em peixes-zebra.

### **2.2 Objetivos específicos**

- a. Avaliar o efeito do ECI no teste de preferência social em peixes-zebra;
- b. Avaliar o efeito do ECI sobre a interação social em peixes-zebra.



### 3. MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1 Animais

Peixes-zebra (*Danio rerio*) tipo selvagem adultos (mais de 3 meses de vida) foram obtidos da agroloja Delphis pesando aproximadamente 300-400 mg. O sexo dos indivíduos foi confirmado por análise histológica das gônadas, após a eutanásia, por meio de dissecação e observação. Para todas as experiências, não foram observados efeitos de tanque e sexo, pelo que os dados foram agrupados. Na primeira leva de experimentos de preferência social a proporção foi 55% machos e 45% fêmeas. Na segunda leva de experimentos de preferência social a proporção foi 62,5% machos e 37,5% fêmeas. Na primeira leva de experimentos de interação social a proporção foi 46,9% machos e 53,1% fêmeas. Na segunda leva de experimentos de interação social a proporção foi de 81,3% machos e 18,7% fêmeas. Os animais tiveram duas semanas de aclimação ao biotério após serem colocados nos aquários moradia. Os peixes eram mantidos em ciclo claro/escuro de 14/10 h. Os peixes foram transferidos para tanques moradia de 16 L (40 x 20 x 24 cm) com água não clorada, mantidos sob constante filtração mecânica, biológica e química, na densidade máxima de dois animais por litro. A água dos tanques satisfaz as condições controladas exigidas para a espécie ( $26 \pm 2$  °C; pH  $7,0 \pm 0,3$ ; oxigênio dissolvido a  $7,0 \pm 0,4$  mg/L; amônia total a  $<0,01$  mg/L; dureza total a 5,8 mg/L; alcalinidade a 22 mg/L CaCO<sub>3</sub> e condutividade de 1500–1600  $\mu$ S/cm). A alimentação foi fornecida duas vezes ao dia (ração comercial em flocos (Poytara®, Brasil) com suplemento de artêmia salina. As condições físico-químicas da água foram avaliadas diariamente. A água dos aquários foi parcialmente renovada (em torno de 50%) semanalmente.

Todos os procedimentos foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (#42179). Os experimentos com animais são relatados em conformidade com as diretrizes ARRIVE 2.0 (Atkinson, 2022), visando garantir o melhor aproveitamento e uso de menor número de animais. Os experimentos foram realizados utilizando 20 animais por grupo (controle e ECI) para o desfecho tempo na zona de interação (teste de preferência social) e 8 cardumes de 4

indivíduos por grupo para o desfecho área ocupada pelo cardume (teste de interação social). Os peixes eram adultos e de tipo selvagem.

Os animais foram alocados nos grupos experimentais seguindo procedimentos de randomização. Havia 2 aquários com peixes controle e 2 com peixes estressados. Cada grupo experimental foi originado de dois tanques moradia idênticos. Os animais foram designados aleatoriamente para os grupos experimentais seguindo procedimentos de randomização simples sem estratificação utilizando o software random.org (números aleatórios computadorizados). Todos os pesquisadores que analisaram as imagens e vídeos foram cegados para o tratamento/intervenção - cada grupo experimental recebeu um código que foi revelado somente após as análises serem realizadas (a codificação foi realizada por um pesquisador que não participou das análises).

O comportamento animal foi gravado em vídeo e analisado com o software de rastreamento ANY-Maze (Stoelting Co., Wood Dale, IL, EUA) para os dados do experimento de preferência social e pelo software ImageJ para os dados de interação social. Todas as análises foram realizadas por pesquisadores cegos para os grupos experimentais. Todos os testes foram realizados entre 8h e 12h.

Após os testes, os animais foram eutanasiados por choque hipotérmico de acordo com as Diretrizes da AVMA para a Eutanásia de Animais (Leary et al., 2020). Resumidamente, os animais foram expostos a água gelada a uma temperatura entre 2 e 4 °C por pelo menos 2 minutos após a perda de orientação e cessação dos movimentos operculares, seguido de decapitação como segundo passo para garantir a morte.

### **3.2 Protocolo de estresse crônico imprevisível (ECI)**

Após duas semanas de habituação, os peixes foram submetidos ao protocolo de ECI (Piato et al., 2011; Mocelin et al., 2019; Marcon et al., 2019). Duas vezes ao dia, durante 14 dias os animais foram submetidos a um dos seguintes agentes estressores: aquecer a água do aquário (30 minutos, aquecer a água a 33°C), isolamento social (45 minutos, isolar o animal do cardume), esfriar a água do aquário (30 minutos, esfriar a água a 23°C),

estresse por aglomeração (50 minutos, colocar 12 peixes em um béquer de 400 mL), diminuir o nível de água (2 minutos, expor o dorso do animal), trocar a água do aquário (trocar 3 vezes a água do aquário), trocar o aquário (trocar 3 vezes os animais de aquário) e perseguição (8 minutos, perseguir os animais com uma rede). Para prevenir uma possível habituação aos agentes estressores, os mesmos foram apresentados de forma aleatória, inclusive em relação aos horários. Um grupo de animais controle não estressados permaneceu na mesma sala (sem contato visual com o grupo ECI), entretanto não foi submetido a nenhum agente estressor.

### **3.3 Análises comportamentais**

Após o protocolo de ECI, diferentes levas de animais foram avaliados em dois protocolos comportamentais: teste de preferência social (Zimmermann et al., 2016) e teste de interação social (Fontana et al., 2018).

#### **3.3.1 Teste de preferência social**

Após a exposição ao ECI, os animais foram colocados por 7 minutos em um tanque (30 × 10 x 15 cm) flanqueado por dois tanques idênticos (15 × 10 x 13 cm), sendo um vazio (estímulo neutro) e um contendo 10 peixes-zebra (estímulo social) (Benvenuti et al., 2021) Todos os três tanques foram preenchidos com água a um nível de 10 cm. A posição do estímulo social (direita ou esquerda) foi contrabalançada ao longo dos testes. A água no tanque experimental foi trocada a cada animal analisado. Para avaliar o comportamento social, o aparato de teste foi virtualmente dividido em três zonas verticais (interação, meio e neutro). Os vídeos foram gravados frontalmente. Os animais foram habituados ao aparato por 2 minutos e depois analisados por 5 minutos. Quantificou-se: distância total percorrida, tempo gasto na zona de interação, velocidade média, velocidade máxima, tempo de imobilidade, tempo no topo, tempo no fundo e número de cruzamentos entre as zonas.

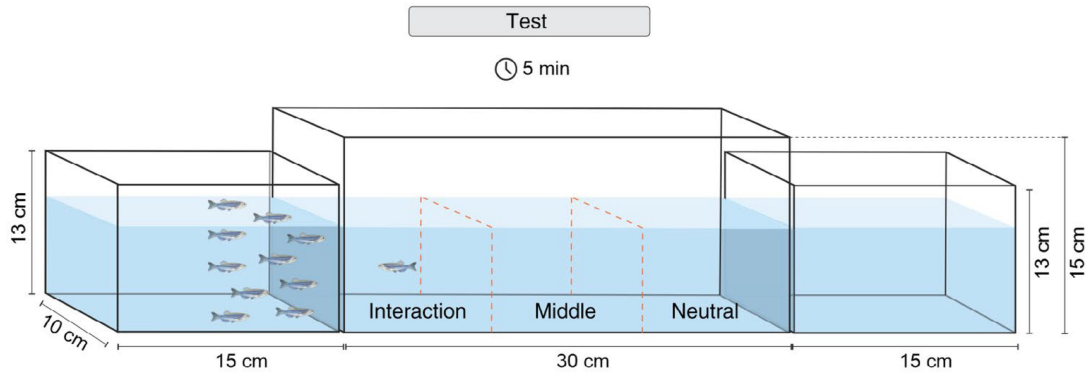


Figura 1 – Teste de preferência social: reprodução autorizada de Benvenuti et al. (2021).

### 3.3.2 Teste de interação social

Quatro peixes foram colocados simultaneamente no tanque de teste (dimensões do tanque: 25×15×10 cm comprimento x altura x largura) e o comportamento do grupo foi analisado durante o período de exposição de 1 hora (Fontana et al., 2018). Peixes-zebra formam cardumes maiores em seu ambiente natural, porém dados anteriores mostram que o comportamento social é reproduzível utilizando quatro peixes por cardume (composto por 4 peixes; n= 8 cardumes). Observamos o comportamento dos peixes em diferentes intervalos de tempo (T1: 0-5 min; T2: 30-35 min; T3: 55-60 min). Após a gravação, o aparato foi limpo e um novo grupo foi testado. Os vídeos foram exportados para o software ImageJ que foi utilizado para quantificar o comportamento de cardume usando capturas de tela tiradas a cada 15 segundos durante os três intervalos de 5 minutos (T1, T2 e T3). Foram mensuradas: a área ocupada pelo cardume, a distância média entre os coespecíficos, a distância média do vizinho mais próximo e a distância média do vizinho mais distante, ao longo do tempo nos diferentes grupos experimentais (controle e ECI).

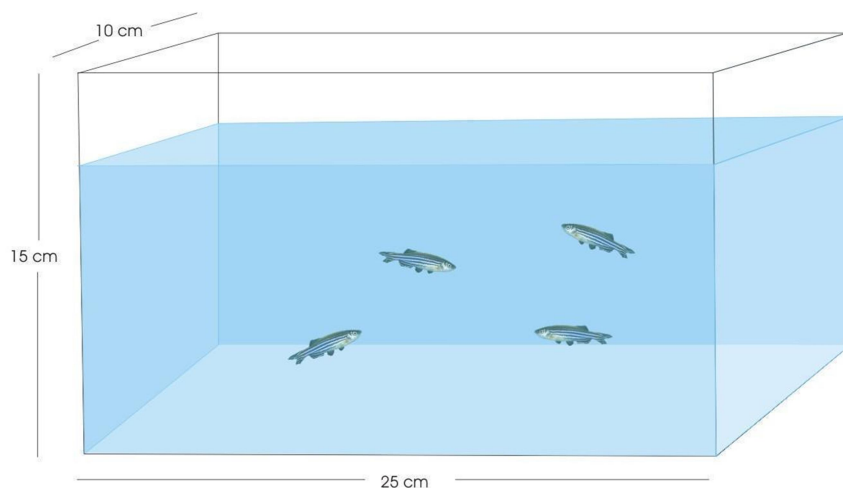


Figura 2 – Teste de interação social.

### 3.4 Análise estatística

A normalidade e homogeneidade das variâncias foram confirmadas para todos os conjuntos de dados utilizando os testes D'Agostino-Pearson e Levene, respectivamente. Os resultados são apresentados como média  $\pm$  desvio padrão da média. Os dados foram analisados por teste *t* de *Student* ou por ANOVA de duas vias, sendo um fator o tempo e o outro fator a intervenção (controle ou estresse). O nível de significância utilizado foi  $p < 0,05$ . Os dados foram analisados e os gráficos foram construídos no *GraphPad Prism* versão 8.0.1 para Windows.

## 8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Amo, Ryunosuke, Hidenori Aizawa, Mikako Takahoko, Megumi Kobayashi, Rieko Takahashi, Tazu Aoki, and Hitoshi Okamoto. 2010. "Identification of the Zebrafish Ventral Habenula As a Homolog of the Mammalian Lateral Habenula." *Journal of Neuroscience* 30 (4): 1566–74. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3690-09.2010>.
- Andrade, Thayres S., Jorge F. Henriques, Ana Rita Almeida, Ana Luísa Machado, Olga Koba, Pham Thai Giang, Amadeu M. V. M. Soares, and Inês Domingues. 2016. "Carbendazim Exposure Induces Developmental, Biochemical and Behavioural Disturbance in Zebrafish Embryos." *Aquatic Toxicology* 170 (January): 390–99. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2015.11.017>.
- Ansai, Satoshi, Hiroshi Hosokawa, Shingo Maegawa, and Masato Kinoshita. 2016. "Chronic Fluoxetine Treatment Induces Anxiolytic Responses and Altered Social Behaviors in Medaka, *Oryzias Latipes*." *Behavioural Brain Research* 303 (April): 126–36. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2016.01.050>.
- Atkinson, Patricia. 2022. "Percie Du Sert N, Hurst V, Ahluwalia A, Alam S, Avey MT, Baker M, Browne WJ, Clark A, Cuthill IC, Dirnagl U, Emerson M, Garner P, Holgate ST, Howells DW, Karp NA, Lazic SE, Lidster K, MacCallum CJ, Macleod M, Pearl EJ, Petersen OH, Rawle F, Reynolds P, Rooney K, Sena ES, Silberberg SD, Steckler T, Würbel H (2020)." The James Lind Library. May 22, 2022. <https://www.jameslindlibrary.org/percie-du-sert-n-hurst-v-ahluwalia-a-alam-s-avey-mt-baker-m-browne-wj-clark-a-cuthill-ic-dirnagl-u-emerson-m-garner-p-holgate-st-howells-dw-karp-na-lazic-se-lidster-k-maccallum-cj-ma/>.
- Baker, David, Katie Lidster, Ana Sottomayor, and Sandra Amor. 2014. "Two Years Later: Journals Are Not Yet Enforcing the ARRIVE Guidelines on Reporting Standards for Pre-Clinical Animal Studies." *PLoS Biology* 12 (1): e1001756. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1001756>.
- Bakkers, J. 2011. "Zebrafish as a Model to Study Cardiac Development and Human Cardiac Disease." *Cardiovascular Research* 91 (2): 279–88. <https://doi.org/10.1093/cvr/cvr098>.
- Benneh, Charles Kwaku, Robert Peter Biney, Priscilla Kolibea Mante, Augustine Tandoh, Donatus Wewura Adongo, and Eric Woode. 2017. "Maerua Angolensis Stem Bark Extract Reverses Anxiety and Related Behaviours in Zebrafish—Involvement of GABAergic and 5-HT Systems." *Journal of Ethnopharmacology* 207 (July): 129–45. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2017.06.012>.
- Benvenuti, Radharani, Matheus Gallas-Lopes, Adrieli Sachett, Matheus Marcon, Nathan Ryzewski Strogulski, Carlos Guilherme Reis, Rafael Chitolina, Angelo Piato, and Ana Paula Herrmann. 2021. "How Do Zebrafish (*Danio Rerio*) Respond to MK-801 and Amphetamine? Relevance for Assessing Schizophrenia-Related Endophenotypes in Alternative Model Organisms." *Journal of Neuroscience Research* 99 (11): 2844–59. <https://doi.org/10.1002/jnr.24948>.
- Biney, Robert Peter, Charles Kwaku Benneh, Donatus Wewura Adongo, Elvis Ofori Ameyaw, and Eric Woode. 2021. "Evidence of an Antidepressant-like Effect of Xylopic Acid Mediated by Serotonergic Mechanisms." *Psychopharmacology* 238 (8): 2105–20. <https://doi.org/10.1007/s00213->

021-05835-6.

- Bortolotto, Josiane W., Giana P. Cognato, Raissa R. Christoff, Laura N. Roesler, Carlos E. Leite, Luiza W. Kist, Mauricio R. Bogó, Monica R. Vianna, and Carla D. Bonan. 2014. "Long-Term Exposure to Paraquat Alters Behavioral Parameters and Dopamine Levels in Adult Zebrafish (*Danio Rerio*)." *Zebrafish* 11 (2): 142–53. <https://doi.org/10.1089/zeb.2013.0923>.
- Bridi, Daiane, Stefani Altenhofen, Jonas Brum Gonzalez, Gustavo Kellermann Reolon, and Carla Denise Bonan. 2017. "Glyphosate and Roundup® Alter Morphology and Behavior in Zebrafish." *Toxicology* 392 (December): 32–39. <https://doi.org/10.1016/j.tox.2017.10.007>.
- Carta, Ilaria, Christopher H. Chen, Amanda L. Schott, Schnaude Dorizan, and Kamran Khodakhah. 2019. "Cerebellar Modulation of the Reward Circuitry and Social Behavior." *Science* 363 (6424): eaav0581. <https://doi.org/10.1126/science.aav0581>.
- Cavallino, Luciano, Laura Rincón, and María Florencia Scaia. 2023. "Social Behaviors as Welfare Indicators in Teleost Fish." *Frontiers in Veterinary Science* 10. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fvets.2023.1050510>.
- Chakravarty, Sumana, Bommana R. Reddy, Sreesha R. Sudhakar, Sandeep Saxena, Tapatee Das, Vuppalapaty Meghah, Cherukuvada V. Brahmendra Swamy, Arvind Kumar, and Mohammed M. Idris. 2013. "Chronic Unpredictable Stress (CUS)-Induced Anxiety and Related Mood Disorders in a Zebrafish Model: Altered Brain Proteome Profile Implicates Mitochondrial Dysfunction." Edited by Allan V. Kalueff. *PLoS ONE* 8 (5): e63302. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0063302>.
- Cheng, Lu, Mei Chong, Weiwei Fan, Xiaofang Guo, Wenjuan Zhang, Xueyan Yang, Fan Liu, Yonghao Gui, and Daru Lu. 2007. "Molecular Cloning, Characterization, and Developmental Expression of Foxp1 in Zebrafish." *Development Genes and Evolution* 217 (10): 699–707. <https://doi.org/10.1007/s00427-007-0177-9>.
- Cordero, M. I., G. L. Poirier, C. Marquez, V. Veenit, X. Fontana, B. Salehi, F. Ansermet, and C. Sandi. 2012. "Evidence for Biological Roots in the Transgenerational Transmission of Intimate Partner Violence." *Translational Psychiatry* 2 (4): e106–e106. <https://doi.org/10.1038/tp.2012.32>.
- Craig, Ian W., and Kelly E. Halton. 2009. "Genetics of Human Aggressive Behaviour." *Human Genetics* 126 (1): 101–13. <https://doi.org/10.1007/s00439-009-0695-9>.
- Creaser, Charles. 1934. "The Technic of Handling the Zebra Fish (*Brachydanio Rerio*) for the Production of Eggs Which Are Favorable for Embryological Research and Are Available at Any Specified Time throughout the Year." *Copeia*, 159–61.
- De Abreu, Murilo S., Ana C.V.V. Giacomini, Rafael Genario, Nathália Rech, Júlia Carboni, Anton M. Lakstygál, Tamara G. Amstislavskaya, et al. 2020. "Non-Pharmacological and Pharmacological Approaches for Psychiatric Disorders: Re-Appraisal and Insights from Zebrafish Models." *Pharmacology Biochemistry and Behavior* 193 (June): 172928. <https://doi.org/10.1016/j.pbb.2020.172928>.
- De Kloet, E. Ron, Marian Joëls, and Florian Holsboer. 2005. "Stress and the

- Brain: From Adaptation to Disease.” *Nature Reviews Neuroscience* 6 (6): 463–75. <https://doi.org/10.1038/nrn1683>.
- Demin, Konstantin A., Tatiana O. Kolesnikova, David S. Galstyan, Nataliya A. Krotova, Nikita P. Ilyin, Ksenia A. Derzhavina, Nataliia A. Levchenko, et al. 2021. “Modulation of Behavioral and Neurochemical Responses of Adult Zebrafish by Fluoxetine, Eicosapentaenoic Acid and Lipopolysaccharide in the Prolonged Chronic Unpredictable Stress Model.” *Scientific Reports* 11 (1): 14289. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-92422-6>.
- Demin, Konstantin A., Anton M. Lakstygala, Nataliya A. Krotova, Alexey Masharsky, Natsuki Tagawa, Maria V. Chernysh, Nikita P. Ilyin, et al. 2020. “Understanding Complex Dynamics of Behavioral, Neurochemical and Transcriptomic Changes Induced by Prolonged Chronic Unpredictable Stress in Zebrafish.” *Scientific Reports* 10 (1): 19981. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-75855-3>.
- Derntl, Birgit, and Ute Habel. 2011. “Deficits in Social Cognition: A Marker for Psychiatric Disorders?” *European Archives of Psychiatry and Clinical Neuroscience* 261 (S2): 145–49. <https://doi.org/10.1007/s00406-011-0244-0>.
- Echevarria, David J., Christina N. Toms, and David J. Jouandot. 2011. “Alcohol-Induced Behavior Change in Zebrafish Models” 22 (1): 85–93. <https://doi.org/10.1515/rns.2011.010>.
- Engeszer, Raymond E., Larissa B. Patterson, Andrew A. Rao, and David M. Parichy. 2007. “Zebrafish in The Wild: A Review of Natural History And New Notes from The Field.” *Zebrafish* 4 (1): 21–40. <https://doi.org/10.1089/zeb.2006.9997>.
- Fontana, Barbara D., Alistair J. Gibbon, Madeleine Cleal, William H.J. Norton, and Matthew O. Parker. 2021. “Chronic Unpredictable Early-Life Stress (CUELS) Protocol: Early-Life Stress Changes Anxiety Levels of Adult Zebrafish.” *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry* 108 (June): 110087. <https://doi.org/10.1016/j.pnpbp.2020.110087>.
- Fontana, Barbara D., Flavia V. Stefanello, Nathana J. Mezzomo, Talise E. Müller, Vanessa A. Quadros, Matthew O. Parker, Eduardo P. Rico, and Denis B. Rosemberg. 2018. “Taurine Modulates Acute Ethanol-Induced Social Behavioral Deficits and Fear Responses in Adult Zebrafish.” *Journal of Psychiatric Research* 104 (September): 176–82. <https://doi.org/10.1016/j.jpsychires.2018.08.008>.
- Fulcher, Niveen, Steven Tran, Soaleha Shams, Diptendu Chatterjee, and Robert Gerlai. 2017. “Neurochemical and Behavioral Responses to Unpredictable Chronic Mild Stress Following Developmental Isolation: The Zebrafish as a Model for Major Depression.” *Zebrafish* 14 (1): 23–34. <https://doi.org/10.1089/zeb.2016.1295>.
- Gallas-Lopes M, Bastos LM, Benvenuti R, Panzenhagen AC, Piato A, Herrmann AP. Systematic review and meta-analysis of 10 years of unpredictable chronic stress in zebrafish. *Lab Anim (NY)*. 2023 Oct;52(10):229-246. doi: 10.1038/s41684-023-01239-5. Epub 2023 Sep 14. PMID: 37709998.
- Geng, Yijie, and Randall T. Peterson. 2019. “The Zebrafish Subcortical Social Brain as a Model for Studying Social Behavior Disorders.” *Disease Models & Mechanisms* 12 (8): dmm039446. <https://doi.org/10.1242/dmm.039446>.



- Gerlai, Robert. 2019. "Reproducibility and Replicability in Zebrafish Behavioral Neuroscience Research." *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, Reproducibility of animal models for neuropsychiatric diseases, 178 (March): 30–38. <https://doi.org/10.1016/j.pbb.2018.02.005>.
- Gerlai, Robert, Fahad Ahmad, and Sonal Prajapati. 2008. "Differences in Acute Alcohol-Induced Behavioral Responses Among Zebrafish Populations." *Alcoholism, Clinical and Experimental Research* 32 (10): 1763–73. <https://doi.org/10.1111/j.1530-0277.2008.00761.x>.
- Grunwald, David Jonah, and Judith S. Eisen. 2002. "Headwaters of the Zebrafish — Emergence of a New Model Vertebrate." *Nature Reviews Genetics* 3 (9): 717–24. <https://doi.org/10.1038/nrg892>.
- Hemelrijk, Ck, Dap Reid, H Hildenbrandt, and Jt Padding. 2015. "The Increased Efficiency of Fish Swimming in a School." *Fish and Fisheries* 16 (3): 511–21. <https://doi.org/10.1111/faf.12072>.
- Herman, James P. 2013. "Neural Control of Chronic Stress Adaptation." *Frontiers in Behavioral Neuroscience* 7: 61. <https://doi.org/10.3389/fnbeh.2013.00061>.
- Hoare, D. J, I. D Couzin, J. -G. J Godin, and J Krause. 2004. "Context-Dependent Group Size Choice in Fish." *Animal Behaviour* 67 (1): 155–64. <https://doi.org/10.1016/j.anbehav.2003.04.004>.
- Hoertnagl, Christine M., and Alex Hofer. 2014. "Social Cognition in Serious Mental Illness." *Current Opinion in Psychiatry* 27 (3): 197–202. <https://doi.org/10.1097/YCO.0000000000000055>.
- Howe, Kerstin, Matthew D. Clark, Carlos F. Torroja, James Torrance, Camille Berthelot, Matthieu Muffato, John E. Collins, et al. 2013. "The Zebrafish Reference Genome Sequence and Its Relationship to the Human Genome." *Nature* 496 (7446): 498–503. <https://doi.org/10.1038/nature12111>.
- Jiménez-Sánchez, Laura, Raquel Linge, Leticia Campa, Elsa M. Valdizán, Ángel Pazos, Álvaro Díaz, and Albert Adell. 2016. "Behavioral, Neurochemical and Molecular Changes after Acute Deep Brain Stimulation of the Infralimbic Prefrontal Cortex." *Neuropharmacology* 108 (September): 91–102. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2016.04.020>.
- Kalueff, Allan. 2014. "Gaining Translational Momentum: More Zebrafish Models for Neuroscience Research." *Progress in Neurotherapeutics and Neuropsychopharmacology*, April.
- Kalueff, Allan V., Michael Gebhardt, Adam Michael Stewart, Jonathan M. Cachat, Mallorie Brimmer, Jonathan S. Chawla, Cassandra Craddock, et al. 2013. "Towards a Comprehensive Catalog of Zebrafish Behavior 1.0 and Beyond." *Zebrafish* 10 (1): 70–86. <https://doi.org/10.1089/zeb.2012.0861>.
- Karatsoreos, Ilia N., and Bruce S. McEwen. 2011. "Psychobiological Allostasis: Resistance, Resilience and Vulnerability." *Trends in Cognitive Sciences* 15 (12): 576–84. <https://doi.org/10.1016/j.tics.2011.10.005>.
- Katz, R. J., and S. Hersh. 1981. "Amitriptyline and Scopolamine in an Animal Model of Depression." *Neuroscience & Biobehavioral Reviews* 5 (2): 265–71. [https://doi.org/10.1016/0149-7634\(81\)90008-7](https://doi.org/10.1016/0149-7634(81)90008-7).
- Katz, R. J., K. A. Roth, and B. J. Carroll. 1981. "Acute and Chronic Stress Effects on Open Field Activity in the Rat: Implications for a Model of Depression." *Neuroscience & Biobehavioral Reviews* 5 (2): 247–51.

- [https://doi.org/10.1016/0149-7634\(81\)90005-1](https://doi.org/10.1016/0149-7634(81)90005-1).
- Katz, Richard J. 1982. "Animal Model of Depression: Pharmacological Sensitivity of a Hedonic Deficit." *Pharmacology Biochemistry and Behavior* 16 (6): 965–68. [https://doi.org/10.1016/0091-3057\(82\)90053-3](https://doi.org/10.1016/0091-3057(82)90053-3).
- Kennedy, Daniel P., and Ralph Adolphs. 2012. "The Social Brain in Psychiatric and Neurological Disorders." *Trends in Cognitive Sciences* 16 (11): 559–72. <https://doi.org/10.1016/j.tics.2012.09.006>.
- Kishi, Shuji, Barbara E. Slack, Junzo Uchiyama, and Irina V. Zhdanova. 2009. "Zebrafish as a Genetic Model in Biological and Behavioral Gerontology: Where Development Meets Aging in Vertebrates – A Mini-Review." *Gerontology* 55 (4): 430–41. <https://doi.org/10.1159/000228892>.
- Landeau, Laurie, and John Terborgh. 1986. "Oddity and the 'Confusion Effect' in Predation." *Animal Behaviour* 34 (5): 1372–80. [https://doi.org/10.1016/S0003-3472\(86\)80208-1](https://doi.org/10.1016/S0003-3472(86)80208-1).
- Levin, Edward D., Zachary Bencan, and Daniel T. Cerutti. 2007. "Anxiolytic Effects of Nicotine in Zebrafish." *Physiology & Behavior* 90 (1): 54–58. <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2006.08.026>.
- Lupien, Sonia J., Bruce S. McEwen, Megan R. Gunnar, and Christine Heim. 2009. "Effects of Stress throughout the Lifespan on the Brain, Behaviour and Cognition." *Nature Reviews Neuroscience* 10 (6): 434–45. <https://doi.org/10.1038/nrn2639>.
- Machluf, Yossy, Amos Gutnick, and Gil Levkowitz. 2011. "Development of the Zebrafish Hypothalamus." *Annals of the New York Academy of Sciences* 1220 (1): 93–105. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.2010.05945.x>.
- Macleod, Malcolm R., Aaron Lawson McLean, Aikaterini Kyriakopoulou, Stylianos Serghiou, Arno de Wilde, Nicki Sherratt, Theo Hirst, et al. 2015. "Risk of Bias in Reports of in Vivo Research: A Focus for Improvement." *PLOS Biology* 13 (10). <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1002273>.
- Magurran, A. E., and T. J. Pitcher. 1983. "Foraging, Timidity and Shoal Size in Minnows and Goldfish." *Behavioral Ecology and Sociobiology* 12 (2): 147–52.
- Marcon, Matheus, Ana P. Herrmann, Ricieri Mocelin, Cassiano L. Rambo, Gessi Koakoski, Murilo S. Abreu, Greicy M. M. Conterato, et al. 2016. "Prevention of Unpredictable Chronic Stress-Related Phenomena in Zebrafish Exposed to Bromazepam, Fluoxetine and Nortriptyline." *Psychopharmacology* 233 (21): 3815–24. <https://doi.org/10.1007/s00213-016-4408-5>.
- Marcon, Matheus, Ricieri Mocelin, Diogo L. de Oliveira, Alex Sander da Rosa Araujo, Ana P. Herrmann, and Angelo Piato. 2019. "Acetyl-L-Carnitine as a Putative Candidate for the Treatment of Stress-Related Psychiatric Disorders: Novel Evidence from a Zebrafish Model." *Neuropharmacology* 150 (May): 145–52. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2019.03.024>.
- Maurer, Colette M., Ying-Yu Huang, and Stephan C.F. Neuhaus. 2011. "Application of Zebrafish Oculomotor Behavior to Model Human Disorders." *Revneuro* 22 (1): 5–16. <https://doi.org/10.1515/rns.2011.003>.
- McEwen, Bruce S. 2007. "Physiology and Neurobiology of Stress and Adaptation: Central Role of the Brain." *Physiological Reviews* 87 (3): 873–904. <https://doi.org/10.1152/physrev.00041.2006>.
- McEwen, Bruce S. 2017. "Neurobiological and Systemic Effects of Chronic Stress." *Chronic Stress* 1 (February): 247054701769232.

- <https://doi.org/10.1177/2470547017692328>.
- McEwen, Bruce S., and Peter J. Gianaros. 2011. "Stress- and Allostasis-Induced Brain Plasticity." *Annual Review of Medicine* 62 (1): 431–45. <https://doi.org/10.1146/annurev-med-052209-100430>.
- Miller, Andrew H., and Charles L. Raison. 2016. "The Role of Inflammation in Depression: From Evolutionary Imperative to Modern Treatment Target." *Nature Reviews Immunology* 16 (1): 22–34. <https://doi.org/10.1038/nri.2015.5>.
- Miller, Noam, and Robert Gerlai. 2012. "From Schooling to Shoaling: Patterns of Collective Motion in Zebrafish (*Danio Rerio*)." *PLOS ONE* 7 (11): e48865. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0048865>.
- Miller, Noam, Keisha Greene, Amanda Dydinski, and Robert Gerlai. 2013. "Effects of Nicotine and Alcohol on Zebrafish (*Danio Rerio*) Shoaling." *Behavioural Brain Research* 240 (March): 192–96. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2012.11.033>.
- Miller, Noam Y., and Robert Gerlai. 2011. "Shoaling in Zebrafish: What We Don't Know." *Revneuro* 22 (1): 17–25. <https://doi.org/10.1515/rns.2011.004>.
- Miura, Hideki, Hong Qiao, and Tatsuro Ohta. 2002a. "Attenuating Effects of the Isolated Rearing Condition on Increased Brain Serotonin and Dopamine Turnover Elicited by Novelty Stress." *Brain Research* 926 (1–2): 10–17. [https://doi.org/10.1016/s0006-8993\(01\)03201-2](https://doi.org/10.1016/s0006-8993(01)03201-2).
- Miura, Hideki, Hong Qiao, and Tatsuro Ohta. 2002b. "Influence of Aging and Social Isolation on Changes in Brain Monoamine Turnover and Biosynthesis of Rats Elicited by Novelty Stress." *Synapse (New York, N.Y.)* 46 (2): 116–24. <https://doi.org/10.1002/syn.10133>.
- Mocelin, Ricieri, Matheus Marcon, Simone D'ambros, Juliane Mattos, Adrieli Sachett, Anna M. Siebel, Ana P. Herrmann, and Angelo Piato. 2019. "N-Acetylcysteine Reverses Anxiety and Oxidative Damage Induced by Unpredictable Chronic Stress in Zebrafish." *Molecular Neurobiology* 56 (2): 1188–95. <https://doi.org/10.1007/s12035-018-1165-y>.
- Mommsen, Thomas P., Mathilakath M. Vijayan, and Thomas W. Moon. 1999. "Cortisol in Teleosts: Dynamics, Mechanisms of Action, and Metabolic Regulation." *Reviews in Fish Biology and Fisheries* 9 (3): 211–68. <https://doi.org/10.1023/A:1008924418720>.
- Morris, Jill A. 2009. "Zebrafish: A Model System to Examine the Neurodevelopmental Basis of Schizophrenia." In *Progress in Brain Research*, 179:97–106. Elsevier. [https://doi.org/10.1016/S0079-6123\(09\)17911-6](https://doi.org/10.1016/S0079-6123(09)17911-6).
- Müller, Talise E., Barbara D. Fontana, Kanandra T. Bertencello, Francini Franscescon, Nathana J. Mezzomo, Julia Canzian, Flavia V. Stefanello, Matthew O. Parker, Robert Gerlai, and Denis B. Rosemberg. 2020. "Understanding the Neurobiological Effects of Drug Abuse: Lessons from Zebrafish Models." *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry* 100 (June): 109873. <https://doi.org/10.1016/j.pnpbp.2020.109873>.
- Müller, Talise Ellwanger, Stenio Zimermann Nunes, Ariane Silveira, Vania Lucia Loro, and Denis Broock Rosemberg. 2017. "Repeated Ethanol Exposure Alters Social Behavior and Oxidative Stress Parameters of Zebrafish." *Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry* 77 (June): 109873. <https://doi.org/10.1016/j.pnpbp.2017.06.001>.

- Psychiatry* 79 (Pt B): 105–11. <https://doi.org/10.1016/j.pnpbp.2017.05.026>.
- Muscat, Richard, Mariusz Papp, and Paul Willner. 1992. "Reversal of Stress-Induced Anhedonia by the Atypical Antidepressants, Fluoxetine and Maprotiline." *Psychopharmacology* 109 (4): 433–38. <https://doi.org/10.1007/BF02247719>.
- Nesan, Dinushan, and Mathilakath M. Vijayan. 2013. "Role of Glucocorticoid in Developmental Programming: Evidence from Zebrafish." *General and Comparative Endocrinology* 181 (January): 35–44. <https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2012.10.006>.
- Nesan, Dinushan, and Mathilakath M. Vijayan. 2016. "Maternal Cortisol Mediates Hypothalamus-Pituitary-Interrenal Axis Development in Zebrafish." *Scientific Reports* 6 (1): 22582. <https://doi.org/10.1038/srep22582>.
- Neumann, Inga, Alexa Veenema, and Daniela Beiderbeck. 2010. "Aggression and Anxiety: Social Context and Neurobiological Links." *Frontiers in Behavioral Neuroscience* 4. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fnbeh.2010.00012>.
- O'Connell, Lauren A., and Hans A. Hofmann. 2011. "The Vertebrate Mesolimbic Reward System and Social Behavior Network: A Comparative Synthesis." *The Journal of Comparative Neurology* 519 (18): 3599–3639. <https://doi.org/10.1002/cne.22735>.
- O'Connell, Lauren A., and Hans A. Hofmann. 2012. "Evolution of a Vertebrate Social Decision-Making Network." *Science (New York, N.Y.)* 336 (6085): 1154–57. <https://doi.org/10.1126/science.1218889>.
- Ogi, Asahi, Rosario Licitra, Valentina Naef, Maria Marchese, Baldassare Fronte, Angelo Gazzano, and Filippo M. Santorelli. 2021. "Social Preference Tests in Zebrafish: A Systematic Review." *Frontiers in Veterinary Science* 7 (January): 590057. <https://doi.org/10.3389/fvets.2020.590057>.
- Ohno, Susumu, Ulrich Wolf, and Niels B. Atkin. 2009. "EVOLUTION FROM FISH TO MAMMALS BY GENE DUPLICATION." *Hereditas* 59 (1): 169–87. <https://doi.org/10.1111/j.1601-5223.1968.tb02169.x>.
- Patterson, Z. R., R. Ducharme, H. Anisman, and A. Abizaid. 2010. "Altered Metabolic and Neurochemical Responses to Chronic Unpredictable Stressors in Ghrelin Receptor-Deficient Mice." *The European Journal of Neuroscience* 32 (4): 632–39. <https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2010.07310.x>.
- Pavlidis, Michail, Antonia Theodoridi, and Aleka Tsalafouta. 2015. "Neuroendocrine Regulation of the Stress Response in Adult Zebrafish, Danio Rerio." *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry* 60 (July): 121–31. <https://doi.org/10.1016/j.pnpbp.2015.02.014>.
- Pereira, Vanessa Maynard, Josiane Woutheres Bortolotto, Luiza Wilges Kist, Mariana Barbieri de Azevedo, Rachel Seemann Fritsch, Renata da Luz Oliveira, Talita Carneiro Brandão Pereira, Carla Denise Bonan, Monica Ryff Vianna, and Maurício Reis Bogo. 2012. "Endosulfan Exposure Inhibits Brain AChE Activity and Impairs Swimming Performance in Adult Zebrafish (Danio Rerio)." *NeuroToxicology, Special Review Section*, 33 (3): 469–75. <https://doi.org/10.1016/j.neuro.2012.03.005>.
- Piato, Ângelo L., Katiucia M. Capiotti, Angélica R. Tamborski, Jean P. Oses, Leonardo J.G. Barcellos, Maurício R. Bogo, Diogo R. Lara, Monica R.

- Vianna, and Carla D. Bonan. 2011. "Unpredictable Chronic Stress Model in Zebrafish (*Danio Rerio*): Behavioral and Physiological Responses." *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry* 35 (2): 561–67. <https://doi.org/10.1016/j.pnpbp.2010.12.018>.
- Rico, E. P., D. B. Rosemberg, K. J. Seibt, K. M. Capiotti, R. S. Da Silva, and C. D. Bonan. 2011. "Zebrafish Neurotransmitter Systems as Potential Pharmacological and Toxicological Targets." *Neurotoxicology and Teratology*, Special issue: Zebrafish: Current discoveries and emerging technologies for neurobehavioral toxicology and teratology, 33 (6): 608–17. <https://doi.org/10.1016/j.ntt.2011.07.007>.
- Robison, Barrie D, and William Rowland. 2005. "A Potential Model System for Studying the Genetics of Domestication: Behavioral Variation among Wild and Domesticated Strains of Zebra *Danio* (*Danio Rerio*)." *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 62 (9): 2046–54. <https://doi.org/10.1139/f05-118>.
- Samsa, Greg, and Leigh Samsa. 2019. "A Guide to Reproducibility in Preclinical Research." *Academic Medicine: Journal of the Association of American Medical Colleges* 94 (1): 47–52. <https://doi.org/10.1097/ACM.0000000000002351>.
- Sánchez, Connie, and Eddi Meier. 1997. "Behavioral Profiles of SSRIs in Animal Models of Depression, Anxiety and Aggression: Are They All Alike?" *Psychopharmacology* 129 (3): 197–205. <https://doi.org/10.1007/s002130050181>.
- Stewart, Adam Michael, Oliver Braubach, Jan Spitsbergen, Robert Gerlai, and Allan V. Kalueff. 2014. "Zebrafish Models for Translational Neuroscience Research: From Tank to Bedside." *Trends in Neurosciences* 37 (5): 264–78. <https://doi.org/10.1016/j.tins.2014.02.011>.
- Streisinger, G., C. Walker, N. Dower, D. Knauber, and F. Singer. 1981. "Production of Clones of Homozygous Diploid Zebra Fish (*Brachydanio Rerio*)." *Nature* 291 (5813): 293–96. <https://doi.org/10.1038/291293a0>.
- Telemeco, Rory S, and Eric J Gangloff. 2020. "Analyzing Stress as a Multivariate Phenotype." *Integrative and Comparative Biology* 60 (1): 70–78. <https://doi.org/10.1093/icb/icaa005>.
- Volgin, Andrey D., Oleg V. Yakovlev, Konstantin A. Demin, Murilo S. de Abreu, Denis B. Rosemberg, Darya A. Meshalkina, Polina A. Alekseeva, Ashton J. Friend, Tamara G. Amstislavskaya, and Allan V. Kalueff. 2018. "Understanding the Role of Environmental Enrichment in Zebrafish Neurobehavioral Models." *Zebrafish* 15 (5): 425–32. <https://doi.org/10.1089/zeb.2018.1592>.
- Wafer, Lemnique N., V. Behrana Jensen, Jesse C. Whitney, Thomas H. Gomez, Rene Flores, and Bradford S. Goodwin. 2016. "Effects of Environmental Enrichment on the Fertility and Fecundity of Zebrafish (*Danio Rerio*)." *Journal of the American Association for Laboratory Animal Science: JAALAS* 55 (3): 291–94.
- Walker, C., and G. Streisinger. 1983. "Induction of Mutations by Gamma-Rays in Pregonial Germ Cells of Zebrafish Embryos." *Genetics* 103 (1): 125–36. <https://doi.org/10.1093/genetics/103.1.125>.
- Wendelaar Bonga, S. E. 1997. "The Stress Response in Fish." *Physiological Reviews* 77 (3): 591–625. <https://doi.org/10.1152/physrev.1997.77.3.591>.
- Whiteley, Andrew R, Anuradha Bhat, Emilia P Martins, Richard L Mayden, M

- Arunachalam, Silva Uusi-Heikkilä, A T A Ahmed, et al. 2011. "Population Genomics of Wild and Laboratory Zebrafish (*Danio Rerio*)." *Molecular Ecology* 20 (20): 4259–76. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2011.05272.x>.
- Willner, P. 1997. "Validity, Reliability and Utility of the Chronic Mild Stress Model of Depression: A 10-Year Review and Evaluation." *Psychopharmacology* 134 (4): 319–29. <https://doi.org/10.1007/s002130050456>.
- Willner, P., A. Towell, D. Sampson, S. Sophokleous, and R. Muscat. 1987. "Reduction of Sucrose Preference by Chronic Unpredictable Mild Stress, and Its Restoration by a Tricyclic Antidepressant." *Psychopharmacology* 93 (3): 358–64. <https://doi.org/10.1007/BF00187257>.
- Yi-Wen, Liu. 2007. "Interrenal Organogenesis in the Zebrafish Model." *Organogenesis* 3 (1): 44–48. <https://doi.org/10.4161/org.3.1.3965>.
- Zheng, M., Y. Kashimori, O. Hoshino, K. Fujita, and T. Kambara. 2005. "Behavior Pattern (Innate Action) of Individuals in Fish Schools Generating Efficient Collective Evasion from Predation." *Journal of Theoretical Biology* 235 (2): 153–67. <https://doi.org/10.1016/j.jtbi.2004.12.025>.
- Zhu, Shenghua, Ruoyang Shi, Junhui Wang, Jun-Feng Wang, and Xin-Min Li. 2014. "Unpredictable Chronic Mild Stress Not Chronic Restraint Stress Induces Depressive Behaviours in Mice." *Neuroreport* 25 (14): 1151–55. <https://doi.org/10.1097/WNR.0000000000000243>.
- Zimmermann, Fernanda Francine, Karina Vidarte Gaspar, Anna Maria Siebel, and Carla Denise Bonan. 2016. "Oxytocin Reversed MK-801-Induced Social Interaction and Aggression Deficits in Zebrafish." *Behavioural Brain Research* 311 (September): 368–74. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2016.05.059>.

## 9. ANEXOS

### 9.1 Carta de aprovação da CEUA da UFRGS



**UFRGS**  
UNIVERSIDADE FEDERAL  
DO RIO GRANDE DO SUL

**PRÓ-REITORIA DE PESQUISA**

Comissão De Ética No Uso De Animais



#### **CARTA DE APROVAÇÃO**

Comissão De Ética No Uso De Animais analisou o projeto:

**Número:** 42179

**Título:** Avaliação do comportamento social e antipredatório em peixes-zebra submetidos a estresse crônico imprevisível

**Vigência:** 30/03/2022 à 30/08/2023

**Pesquisadores:**

**Equipe UFRGS:**

ÂNGELO LUIS STAPASSOLI PIATO - coordenador desde 30/03/2022

Ana Paula Herrmann - coordenador desde 30/03/2022

Náthali Ávila Neves - desde 30/03/2022

Carlos Guilherme Rosa Reis - desde 30/03/2022

Rafael Chitolina - desde 30/03/2022

***Comissão De Ética No Uso De Animais aprovou o projeto n. 42179- Avaliação do comportamento social e antipredatório em peixes-zebra submetidos a estresse crônico imprevisível, em reunião virtual realizada pelo Mconf UFRGS em 12/09/2022, em seus aspectos éticos e metodológicos, para a utilização de um total de 328 peixes-zebra (Danio nerio), 164 machos e 164 fêmeas, de 180 dias (300-400g), provenientes do biotério do departamento de Bioquímica da UFRGS, e de 1 acará do Congo (Amatitlania nigrofasciata), proveniente da Agroloja Delphis (CNPJ 00.187.830/0001-70), de acordo com os preceitos das Diretrizes e Normas Nacionais e Internacionais, especialmente a Lei 11.794 de 08 de novembro de 2008, o Decreto 6899 de 15 de julho de 2009, e as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), que disciplinam a produção, manutenção e/ou utilização de animais do filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem) em atividade de ensino ou pesquisa.***

Porto Alegre, Quarta-Feira, 21 de Setembro de 2022

MAITE DE MORAES VIEIRA  
Coordenador da comissão de ética

## 9.2. Carta de autorização para utilização de figura da literatura

### Order Completed

Thank you for your order.

This Agreement between Náthali Neves ("You") and John Wiley and Sons ("John Wiley and Sons") consists of your license details and the terms and conditions provided by John Wiley and Sons and Copyright Clearance Center.

Your confirmation email will contain your order number for future reference.

License Number 5621961017947

[Printable Details](#)

License date Sep 04, 2023

#### Licensed Content

Licensed Content Publisher John Wiley and Sons  
Licensed Content Publication Journal of Neuroscience Research  
Licensed Content Title How do zebrafish (Danio rerio) respond to MK-801 and amphetamine? Relevance for assessing schizophrenia-related endophenotypes in alternative model organisms  
Licensed Content Author Radharami Benvenutti, Matheus Gallas-Lopes, Adriele Sachetti, et al  
Licensed Content Date Sep 8, 2021  
Licensed Content Volume 99  
Licensed Content Issue 11  
Licensed Content Pages 16

#### Order Details

Type of use Dissertation/Thesis  
Requestor type University/Academic  
Format Print and electronic  
Portion Figure/table  
Number of figures/tables 1  
Will you be translating? No

#### About Your Work

Title EVALUATION OF SOCIAL BEHAVIOR IN ZEBRAFISH (Danio rerio) SUBJECT TO UNPREDICTABLE CHRONIC STRESS  
Institution name UFRGS  
Expected presentation date Sep 2023

#### Additional Data

Portions FIGURE 4

#### Requestor Location

Náthali Neves  
Avenida dos Industriários, 717/01

#### Tax Details

Publisher Tax ID EU826007151

Requestor Location  
Porto Alegre, 90520400  
Brazil  
Attn: Náthali Neves

#### Price

Total 0.00 USD

Would you like to purchase the full text of this article? If so, please continue on to the content ordering system located here: [Purchase PDF](#)  
If you click on the buttons below or close this window, you will not be able to return to the content ordering system.