

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

Fernando dos Santos Mendonça

**INTERAÇÃO DO COMPORTAMENTO REPRODUTIVO COM O COMPORTAMENTO DE  
ALARME EM PEIXE-ZEBRA (*Danio rerio*) - PAPEL DO SISTEMA SEROTONINÉRGICO**

Porto Alegre

2024

Fernando dos Santos Mendonça

**INTERAÇÃO DO COMPORTAMENTO REPRODUTIVO COM O COMPORTAMENTO DE  
ALARME EM PEIXE-ZEBRA (*Danio rerio*) - PAPEL DO SISTEMA SEROTONINÉRGICO**

Dissertação de Mestrado 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 para obtenção do título de mestre em Neurociências

Orientadora: Prof<sup>a</sup> Denise Maria Zancan

Coorientador: Prof. Angelo Luis Stapassoli Piato

Porto Alegre

2024

## AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer à CAPES e à UFRGS pelo financiamento do presente trabalho e à bolsa de mestrado, ao laboratório de Neurobiologia Comparada da UFRGS, ao Laboratório de Psicofarmacologia e Comportamento da UFRGS, pelo apoio e auxílio oferecidos e pelos colegas que contribuíram direta ou indiretamente com a realização das etapas do estudo realizado. Gostaria de estender, também, o agradecimento a todos os professores do Programa de Pós-Graduação em Neurociências que trabalham em prol do desenvolvimento de seus alunos e suas pesquisas, em especial à professora e orientadora Dr<sup>a</sup> Denise Zancan, que com competência, paciência e inteligência enfrentou muitos obstáculos comigo para a realização deste trabalho, especialmente durante a pandemia e cujo trabalho inspirador, permite e incentiva a mim e a todos seus alunos e orientandos. Gostaria de agradecer também ao professor e coorientador Dr. Angelo Piato que solícito, deu suporte e direcionamento para o delineamento farmacológico deste trabalho e à equipe de servidores ligados ao Programa, pelo empenho e dedicação. Meus agradecimentos também se dirigem aos meus pais, irmãos e tia que sempre me incentivaram e à família que formei durante a execução deste trabalho, minha esposa e minha filha que são o horizonte de meus esforços e uma fonte luminosa de significado e beleza nos meus dias.

Para Maria Augusta e Maria Joana

## RESUMO

O presente trabalho investigou a relação entre dois comportamentos inatos dos peixes-zebra (*Danio rerio*), a saber, o comportamento de alarme e o comportamento de acasalamento e a influência de um inibidor seletivo de recaptção de serotonina. Em estudo anterior, a interação do comportamento de alarme com o comportamento de acasalamento foi analisada em resposta aos estímulos olfatórios com o extrato de pele, que provoca reação de medo e o feromônio liberado pela fêmea na fase ovulatória. No presente estudo foi analisada esta interação com estímulos olfatórios quantificáveis. O sulfato de condroitina (1 mg/L) foi utilizado em um aquário-teste como feromônio de alarme para pares de peixes machos ou de fêmeas, e a prostaglandina F2 alfa (PGF<sub>2α</sub>; 3,5 µl/L) foi administrada como feromônio sexual para cada par de peixes machos. A administração da condroitina na água do aquário provocou a resposta de descida para o fundo do tanque (geotaxia). O tratamento prévio com fluoxetina (50 µg/L) por uma semana inibiu a resposta ansiolítica dos peixes machos e fêmeas quando introduzidos no aquário-teste (teste do tanque novo), bloqueando também a geotaxia em resposta à condroitina. A administração de PGF<sub>2α</sub> em um lado do aquário atraiu os peixe-zebras machos para este lado do aquário. O tempo de atração foi maior naqueles sem exposição prévia à fluoxetina. O tempo de atração à PGF<sub>2α</sub> foi diminuído quando os peixes foram submetidos, também, à presença de condroitina, contudo estes animais que estavam respondendo à PGF<sub>2α</sub> não mostraram geotaxia em resposta à condroitina. Na interação dos dois comportamentos (resposta à PGF<sub>2α</sub> seguido de administração de condroitina), o tratamento prévio com fluoxetina inibiu mais a resposta à condroitina do que a resposta sexual, pois, neste teste, o tempo de interação com o feromônio de atração sexual foi similar ao dos peixes expostos à PGF<sub>2α</sub> com tratamento prévio de fluoxetina e sem condroitina. Os resultados apoiam a viabilidade de estudos do comportamento de alarme com o uso de um estímulo mais quantificável como o sulfato de condroitina em vez do extrato de pele. A condição de, supostamente, maior atividade do sistema serotoninérgico provocado pela administração de fluoxetina reduz ambas as respostas inatas aos feromônios analisados, mas com efeito inibitório maior sobre a resposta de alarme. A possível maior ativação do sistema serotoninérgico não alterou a esperada prioridade da resposta reprodutiva em relação ao comportamento de fuga. A prioridade para a resposta de acasalamento em relação à resposta à estímulos aversivos deve ser levada em conta em situações experimentais em que são mantidos peixe-zebras adultos machos juntamente com fêmeas em fase ovulatória.

Palavras-chave: acasalamento, comportamento de alarme, feromônio sexual, PGF<sub>2α</sub>, condroitina, serotonina, fluoxetina.

## ABSTRACT

The present study investigated the relationship between two innate behaviors of zebrafish (*Danio rerio*), alarm behavior and mating behavior, and the influence of a selective serotonin reuptake inhibitor on the expression of these behaviors. The interaction between alarm and courtship behavior has already been analyzed in response to pheromone from skin extract and to pheromone released by the female during the ovulatory phase. The present study analyzed this interaction with olfactory stimuli in a more quantifiable and easily repeatable way that allows better comparison with other studies. As an alarm pheromone, chondroitin sulfate (1 mg/L) was used in the tank test containing a pair of male or female fishes, while prostaglandin F<sub>2α</sub> (PGF<sub>2α</sub>, 3.5 μl/L) was used as sexual pheromone for each pair of male fish. The administration of chondroitin in the tank water caused geotaxis behavior (dive to the bottom). Pretreatment with 50 μg/L fluoxetine for one week inhibited the anxiolytic response of male and female zebrafish to the novel tank test, and blocking the geotaxis response to chondroitin. Administration of PGF<sub>2α</sub> to one side of the test tank attracted male zebrafish to that side. The sexual attraction response time is greater in those animals without previous exposure to fluoxetine. When male zebrafish were exposed to chondroitin shortly after initiating the attraction response to PGF<sub>2α</sub>, the time the zebrafish spent on the sex pheromone side of the tank decreased, but they did not show the geotaxis response. When analyzing the interaction of the two behaviors (response to PGF<sub>2α</sub> followed by administration of chondroitin), it was observed that prior treatment with fluoxetine inhibited the response to chondroitin more than the courtship behavior, as in this context the attraction time to the PGF<sub>2α</sub> was similar to response of zebrafish exposed to PGF<sub>2α</sub> with prior fluoxetine treatment and without chondroitin. The results indicate the feasibility of studies of aversive behavior using a more quantifiable stimulus such as chondroitin sulfate, instead of skin extract. The condition of supposedly greater activity of the serotonergic system caused by the administration of fluoxetine reduces both innate responses to the pheromones analyzed, but with a greater inhibitory effect on the alarm response. The possible greater activation of the serotonergic system did not change the expected priority of the reproductive response in relation to aversive behavior. The priority for the mating response in relation to the response to aversive stimuli must be considered in experimental approaches, in which adult male zebrafish are kept together in the same tank with females in the ovulatory phase.

Key words: courtship, alarm behavior, sexual pheromone, PGF<sub>2α</sub>, chondroitin, fluoxetine, serotonin.

## SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS .....	08
LISTA DE TABELAS.....	09
ABREVIATURAS E SIGLAS .....	10
INTRODUÇÃO .....	11
OBJETIVOS.....	21
MATERIAL E MÉTODOS .....	22
1. Animais.....	22
2. Grupos experimentais e tamanho da amostra .....	23
3. Tratamento com fluoxetina .....	24
4. Testes comportamentais.....	24
5. Coleta das gônadas.....	28
6. Análise estatística.....	28
RESULTADOS .....	29
Tanque novo.....	29
Feromônio de alarme.....	30
Feromônio de atração sexual.....	34
Interação entre resposta de alarme e de atração sexual.....	35
DISCUSSÃO.....	40
CONCLUSÃO.....	51
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	52

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Esquema da distribuição dos aquários onde foram mantidos os peixes utilizados no experimento.....	23
Figura 2. Esquema do delineamento experimental A.....	25
Figura 3. Foto da estrutura e organização do aquário de testes.....	26
Figura 4. Esquema do delineamento experimental B.....	27
Figura 5. Esquema do delineamento experimental C.....	28
Figura 6. Comparação do tempo de interação com a $PGF_{2\alpha}$ entre o grupo $PGF_{2\alpha}$ e o grupo $PGF_{2\alpha}$ com condroitina.....	37
Figura 7. Comparação do tempo de interação com a $PGF_{2\alpha}$ entre o grupo $PGF_{2\alpha}$ com tratamento prévio com fluoxetina e o grupo $PGF_{2\alpha}$ com condroitina e tratamento prévio com fluoxetina.....	38
Figura 8. Comparação entre todos os grupos que possuem tratamento com $PGF_{2\alpha}$ .....	39



## LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Resposta dos peixes zebra machos ao tanque novo sob o efeito prévio de fluoxetina ou DMSO.....	30
Tabela 2. Respostas dos peixes-zebra machos ao sulfato de condroitina comparado aos controles.....	31
Tabela 3. Respostas dos peixes-zebra machos ao sulfato de condroitina com e sem fluoxetina.....	32
Tabela 4. Respostas dos peixes-zebra fêmeas ao sulfato de condroitina com e sem fluoxetina.....	33
Tabela 5. Respostas do peixes-zebra ao sulfato de condroitina com tratamento prévio de fluoxetina comparada entre os sexos.....	34
Tabela 6. Resposta dos peixes-zebra machos a aplicação de PGF <sub>2α</sub> ou DMSO.....	35
Tabela 7. Respostas dos peixes-zebra machos à PGF <sub>2α</sub> com e sem tratamento prévio com fluoxetina.....	35
Tabela 8. Respostas dos peixes-zebra machos à PGF <sub>2α</sub> com e sem condroitina.....	36
Tabela 9. Respostas dos peixes-zebra machos à PGF <sub>2α</sub> e condroitina com e sem tratamento prévio com fluoxetin.....	37
Tabela 10. Respostas dos peixes-zebra machos à PGF <sub>2α</sub> e tratamento prévio com fluoxetina com e sem condroitina.....	38
Tabela 11. Comparação das respostas dos peixes-zebra machos entre os grupos PGF <sub>2α</sub> , PGF <sub>2α</sub> e condroitina, PGF <sub>2α</sub> com tratamento prévio de fluoxetina e PGF <sub>2α</sub> condroitina mais tratamento prévio com fluoxetina.....	39

## ABREVIATURAS

PGF<sub>2α</sub>: Prostaglandina F2alfa

ISRS: Inibidores seletivos de recaptção de serotonina

SERT: Transportador de serotonina

5-HT: Serotonina

H<sub>3</sub>NO: Oxonioazanida

GnRH: Hormônio liberador das gonadotrofinas

FSH: hormônio folículo estimulante

LH: hormônio luteinizante

## INTRODUÇÃO

O repertório comportamental dos animais abrange uma vasta gama de comportamentos que desempenham papéis cruciais em sua sobrevivência e reprodução. No entanto, em meio a essa diversidade, as pesquisas ao longo do tempo têm demonstrado que os sistemas e circuitos neurais subjacentes aos processos motivacionais e emocionais básicos são evolutivamente conservados (Darwin 1872; Anderson & Adolphs 2014). Essa conservação sugere uma base neurobiológica subjacente a muitos comportamentos animais, independentemente de sua complexidade aparente.

A modulação da expressão emocional em resposta a diferentes contextos ainda permanece uma área de pesquisa desafiadora. A capacidade de escolher uma resposta comportamental dentre uma série de comportamentos possíveis, com base em estímulos ambientais específicos ou estados internos motivacionais, é uma habilidade comum aos animais (Tang & Guo 2001; Briggman et al 2005; Zhang et al 2005; Burgess et al 2010; Lau et al 2011). No entanto, as demandas conflitantes que surgem colocam os animais em situações desafiadoras, onde devem tomar decisões complexas sobre como alocar seus recursos e energia limitados (Lima & Dill 1990; Brown & Smith 1996; Kavaliers et al 2001). Essa interseção entre a conservação evolutiva dos sistemas neurais básicos e a complexidade das escolhas comportamentais em resposta a contextos variáveis oferece um campo fértil para a investigação científica. O modelo teórico conhecido como "relação entre risco de predação e obtenção de energia" (Lima & Dill 1990) propõe uma compreensão dessa interação complexa. Esse modelo postula que os animais precisam fazer escolhas em relação à alocação de recursos limitados, como tempo e energia, entre atividades relacionadas à alimentação, reprodução e evitar a predação. As decisões comportamentais dos animais são influenciadas por diversos fatores. Um dos principais é a probabilidade de encontro com predadores, que pode variar de acordo com a disponibilidade de abrigo, o tipo de habitat e a presença de outros predadores ou presas. Os animais devem avaliar constantemente o risco de predação e ajustar seus comportamentos de acordo com essa avaliação. Por exemplo, um animal pode optar por reduzir a atividade alimentar em locais com maior presença de predadores ou durante períodos do dia em que o risco é mais elevado. Além da

tomada de decisões em relação à alimentação, as decisões sobre comportamentos reprodutivos também são decisivas sobre valores adaptativos básicos para as espécies. Por exemplo, em situações em que o risco de predação é alto, os animais podem optar por investir mais em estratégias reprodutivas, como o cuidado parental, em detrimento da busca por alimento. Essa alocação de recursos visa aumentar as chances de sobrevivência da prole e, conseqüentemente, o sucesso reprodutivo. A pressão seletiva exercida pelos predadores na modelagem dos comportamentos alimentares e reprodutivos dos animais pode levar à evolução de estratégias específicas de busca por alimento, seleção de parceiros e uso de habitat (Lastein et al 2008), levando a decisões, por exemplo, de desenvolver estratégias de forrageio mais cautelosas, como a escolha de presas de menor tamanho ou o uso de áreas com maior cobertura vegetal para refúgio.

Neste estudo, procuramos compreender uma dessas complexas interações, explorando como os animais respondem a conflitos comportamentais induzidos por diferentes estímulos ambientais, particularmente no que diz respeito à tomada de decisões em cenários que envolvem acasalamento e predadores. Um exemplo dessas interações pode ser encontrado em experimentos envolvendo a carpa comum (*Carassius carassius*), cuja resposta de alarme, uma reação fundamental para a sobrevivência, foi suprimida durante o contexto comportamental reprodutivo, dada a sua importância como processo biológico vital para a espécie (Lastein et al 2008).

A interação entre o risco de predação e o acasalamento cria um dilema comportamental, uma vez que maximizar a probabilidade de sucesso no ritual de acasalamento exige amplos movimentos e atividades, tornando os animais mais visíveis e vulneráveis à detecção por predadores (Burk 1982, Magnhagen 1991). Portanto, a tomada de decisões em tais contextos envolve uma avaliação dos benefícios de evitar a predação ou ameaças em comparação com os custos associados a essa decisão em termos de eficácia nas respostas de acasalamento ou alimentação (Abrams 1986; Kavaliers et al 2001; Brown et al 2006).

Há amplo conhecimento já acumulado sobre a resposta de alarme em peixes (Døving & Lastein 2009). Um dos modelos amplamente adotados para estudar essa resposta envolve a exposição dos peixes a extratos de pele coespecíficos ou a substâncias isoladas desses extratos. O efeito aversivo do extrato de pele coespecífico,

inicialmente descrito por von Frisch (1938), tem servido como um ponto de partida fundamental para a investigação nesse campo. A quantificação das concentrações dessas substâncias, uma contribuição significativa para a compreensão da resposta de medo em peixes-zebra, foi proposta por Waldman (1982) e com contribuições posteriores de Speedie e Gerlai (2008). Esses métodos têm demonstrado eficácia e reprodutibilidade em uma variedade de protocolos farmacológicos (Maximino et al 2014a; Quadros et al 2016; Lima et al 2015, 2016; Ziani et al 2018) e estudos fisiológicos (Egan et al 2009; Canzian et al 2017; Faustino et al 2017) envolvendo peixes-zebra.

A substância sintetizada na epiderme e liberada para o meio externo é uma mistura complexa de diferentes compostos, cuja análise tem sido objeto de investigação ao longo de décadas (Pfeiffer 1963; Peiffer et al 1985; Lebedeva et al 1975; Jesuthasan & Mathuru 2008) e têm lançado luz sobre a composição e as propriedades desses compostos. Entre as substâncias contidas no extrato bruto de pele, o glicosaminoglicano condroitina (identificado por Van de Winkel et al 1986), possui a capacidade de desencadear as respostas de medo em peixes-zebra, além de ativar a mesma região no bulbo olfatório que o extrato bruto de pele (Mathuru et al 2012). No entanto, é importante observar que, embora a condroitina seja capaz de induzir respostas de medo, sua eficácia é menor à amplitude das respostas provocadas pelo extrato bruto de pele. Essa diferença substancial sugere a possível presença de outras substâncias ativas no extrato, ainda não totalmente identificadas, que contribuem para a completa resposta de medo observada (Mathuru et al 2012). O desenvolvimento de um modelo que envolve a exposição a um estímulo específico, quantificável e com uma reprodutibilidade mais precisa pode auxiliar na compreensão das bases neurobiológicas das respostas de medo e servir de ferramenta para pesquisas que envolvem, por exemplo, estratégias terapêuticas e a avaliação de potenciais tratamentos para distúrbios relacionados ao estresse em peixe-zebra.

A compreensão das respostas de medo em peixes-zebra é um campo dinâmico, repleto de fatores epigenéticos que podem influenciar e alterar essas respostas. Dentre os diversos elementos que têm sido identificados, destacam-se fatores ambientais, sociais e hormonais que demonstraram a capacidade de modificar as reações de medo em peixes, contribuindo para a complexidade desse fenômeno comportamental. Os fatores ambientais desempenham um papel significativo, com estudos evidenciando

que fatores antropogênicos, como a presença de poluentes, podem impactar as respostas de medo em peixes-zebra (Hintz & Relyea 2017, Leme et al 2018, Attaran et al 2019). Além disso, as interações sociais desempenham um papel crucial, uma vez que indivíduos isolados tendem a apresentar respostas de medo mais pronunciadas (Faustino et al 2017). No domínio hormonal, estudos destacaram a influência de substâncias como o neuropeptídeo kisspeptina, associada ao controle do eixo hipotálamo-hipófise-gonadal (Nathan et al 2015; Ogawa et al 2014; Comninou & Dhillon 2018; Ogawa & Parhar 2018), na modulação da resposta de medo. Além disso, em outra espécie de peixe ciprinídeo (*Pimephalespromelas*) a testosterona foi identificada como tendo um efeito inibitório sobre a resposta de alarme (Smith 1973).

Em um esforço para compreender melhor a influência do contexto sexual na resposta de medo em peixes-zebra, investigações recentes foram conduzidas, inspiradas por descobertas semelhantes em carpas (Lastein et al 2008). Os resultados iniciais desses estudos sugerem uma correlação inversa entre o comportamento de corte e a resposta ao extrato de pele, indicando que a resposta de alarme é atenuada em concentrações baixas e médias da substância de alarme em animais envolvidos em contextos de acasalamento (Rocha 2019). Resultado semelhante também foi descrito em outro estudo, corroborando a influência do contexto sexual na resposta de medo em peixe-zebra (Diaz-Verdugo et al 2019). Esses estudos destacam a complexidade da interação das respostas comportamentais básicas, como medo e reprodução em peixes-zebra.

O comportamento de acasalamento nos machos de peixes-zebra é um processo altamente regulado, desencadeado na presença de fêmeas em fase ovulatória que ocorre aproximadamente a cada 10 dias (Laale 1977). A atração instintiva dos machos em direção às fêmeas é mediada pelo feromônio prostaglandina F<sub>2</sub>alfa (PGF<sub>2α</sub>), que é liberado na urina das fêmeas durante o período de ovulação. As prostaglandinas do tipo F, como a PGF<sub>2α</sub>, pertencem a um grupo de mediadores lipídicos bioativos que desempenham diversas funções, atuando tanto de forma parácrina quanto como hormônios, através da ativação de receptores específicos acoplados a proteínas G.

A PGF<sub>2α</sub> é mais conhecida em mamíferos por seu papel em processos reprodutivos, como a luteólise e o parto (Challis et al 2000; Stouffer et al 2013). Nos peixes fêmeas a PGF<sub>2α</sub> atua como um hormônio sexual no estágio final do ciclo estral,

induzindo a ovulação e a desova (Stacey & Goetz 1982; Kobayashi et al 2002). Quando inalada pelos peixes-zebra machos, a sinalização da  $PGF_{2\alpha}$  é transmitida dos neurônios receptores olfatórios para glomérulos específicos localizados na parte ventromedial do bulbo olfatório. Em seguida, essa sinalização é transmitida para neurônios de áreas centrais olfatórias, incluindo a área telencefálica ventral e a parte anterior do núcleo hipotalâmico pré-óptico parvocelular, o núcleo hipotalâmico lateral e a zona caudal do hipotálamo periventricular (Yabuki et al 2016). A exposição à  $PGF_{2\alpha}$  libera o peptídeo isotocina no *Carasius auratus*, que é responsável pelo comportamento sexual dos machos (Mennigen et al 2010).

Além de buscar compreender a interação do controle dos comportamentos básicos, o aversivo e o acasalamento, utilizando estímulos desencadeadores destes comportamentos que possam ser quantificáveis, o presente estudo busca compreender a participação do sistema serotoninérgico nesta interação. O sistema serotoninérgico desempenha um papel significativo na regulação de uma ampla variedade de processos comportamentais e emocionais.

Em *Danio rerio*, o sistema serotoninérgico tem sido descrito a partir da identificação de três grupos distintos de neurônios serotoninérgicos, cada um com funções e projeções específicas. Esses grupos incluem os núcleos da rafe, cujas projeções chegam a diferentes regiões telencefálicas e no bulbo olfatório, as populações tubérculo-hipotalâmicas posteriores e a área pré-tectal (Kaslin & Panula 2001; Lillesaar 2011; Lillesaar et al 2009). Há diferenças entre o sistema serotoninérgico de mamíferos e o de peixes entre a localização e número de núcleos de neurônios serotoninérgicos, diferenças de genes para as proteínas transportadores receptoras (SERT) e para os receptores serotoninérgicos, devido à duplicação gênica dos peixes teleostes (Herculano & Maximino 2014). Apesar destas diferenças existentes, os efeitos comportamentais de drogas sobre o sistema serotoninérgico no peixe-zebra são análogos às ações descritas em mamíferos (Maximino & Herculano 2010; Herculano & Maximino 2014; Maximino et al 2015).

A fluoxetina é um fármaco pertencente à classe dos inibidores seletivos da recaptação de serotonina (ISRS) que se caracterizam por sua ação direta no aumento das concentrações de serotonina mediada pelo bloqueio de SERT, e conseqüentemente, inibição da recaptação do neurotransmissor na fenda sináptica (Stahl 1998). Os níveis

de serotonina encefálicos variam durante e após tratamentos com ISRS em peixes, dependendo da concentração e do período de exposição (Stoczynski & van den Hurk 2020). Os níveis de serotonina periférica aumentam em peixes (*Rainbow trout*) decorrente da administração de ISRS (Cañmano-Tubío et al 2007). A administração de ISRS em peixes-zebra tem revelado efeito ansiolítico, seja em adultos (Egan et al 2009; Sackerman et al 2010; Maximino et al 2014b, Wong et al 2013) ou em larvas de peixe-zebra (Airhart et al 2007), diminuindo respostas de geotaxia e as respostas ao feromônio de alarme (em adultos e juvenis a partir de 42 dias), e diminuição da resposta ao estresse (Giacomini et al 2016). As respostas ansiolíticas à fluoxetina variam, dependendo da forma de tratamento e tempo de exposição. Quando administrado por duas semanas, a fluoxetina tem ações ansiolíticas em peixes-zebra, diminuindo a escototaxia e o congelamento (Egan et al 2009). Sob tratamento agudo, a fluoxetina não mostra efeito sobre alguns comportamentos, não altera movimentos erráticos, nem congelamento (Maximino et al 2014b). Para mamíferos, sugere-se que para o organismo como todo o sistema serotoninérgico facilita integrações de funções necessárias para uma resposta comportamental, podendo até inibir alguma atividade do sistema sensorial que seja irrelevante para o comportamento em curso (Jacobs & Fornal 1993).

O interesse nos efeitos do sistema serotoninérgico sobre o comportamento dos peixes também tem recebido atenção pelos possíveis impactos dos ISRS nos efluentes aquáticos (Johnson et al 2005; McDonald 2017), que poderiam afetar a reprodução dos peixes. Nos teleósteos, evidências sustentam o envolvimento da serotonina nas funções reprodutivas, estimulando a liberação de gonadotrofina em corvina (*Micropogonia undulatus*, Khan & Thomas 1992) e no *Carassius auratus* (Somoza et al 1988). A serotonina exerce influência tanto de forma central, atuando sobre o eixo de controle reprodutivo, como de maneira direta nas gônadas. Genes de 3 subtipos de receptores de serotonina foram identificados no testículo de peixe-zebra (Prasad et al 2015). A presença de receptores de serotonina foi confirmada nas regiões encefálicas do peixe-zebra que abrigam neurônios produtores do hormônio liberador das gonadotrofinas (GnRH) (Norton et al 2008). Isso se assemelha à forma de controle já observada em mamíferos (Li & Pelletier 1995; Kim et al 2006). A regulação da liberação de GnRH pela serotonina pode ocorrer também de maneira indireta, possivelmente por meio do neuropeptídeo kisspeptina (Gopurappilly et al 2013). Um achado intrigante em peixes-



zebra é a relação entre a kisspeptina, a serotonina e o comportamento de alarme. Foi observado que a kisspeptina é capaz de suprimir a resposta de medo induzida pelo feromônio de alarme, e esse efeito foi anulado pela administração de um antagonista do receptor 5HT<sub>1A</sub> (Nathan et al 2015). Outra ligação entre o sistema serotoninérgico e a reprodução foi evidenciada pelos efeitos inibidores da fluoxetina na maturação sexual do peixe-mosquito *Gambusia* (Henry & Black 2008) e na inibição da liberação de estradiol em fêmeas de *Melanotaeniafluviatilis* (Bain et al 2016) e de *Carassiusauratus* (Mennigen et al 2017). Mas sob tempos de exposição maiores de fluoxetina a liberação de estradiol foi aumentada no peixe-arroz *Oryzias* (Foran et al 2004). Em peixe-zebra, foi verificado que a fluoxetina (32 µg/L) administrada por uma semana provocou diminuição na produção de ovos/fêmea e diminuição na expressão ovariana de aromatase e de receptores de FSH e de LH, comprometendo a esteroidogênese e diminuição de estradiol gonadal (Lister et al 2009). E sob tratamentos mais longos com ISRS, como sertralina, fluoxetina e paroxetina, foi observada uma redução na produção de ovos e no número de ovos fertilizados (Venkatachalam et al 2023).

Quanto à interferência dos ISRS no acasalamento ou atração sexual, encontramos um estudo em peixes (*Pimephalespromelas*) em que a fluoxetina administrada por 4 semanas não provocou alteração no comportamento de perseguição do macho à fêmea (*chasing*), mas diminuiu o comportamento de cuidar e defender o ninho (Weinberger & Klaper 2014). E encontramos apenas mais um estudo que mostra a interferência da fluoxetina sobre o efeito da PGF<sub>2α</sub> em machos de *Carassiusauratus*, diminuindo seu efeito estimulador da liberação de isotocina pelo hipotálamo e o comportamento sexual dos machos (Mennigen et al 2010), o que poderia explicar o efeito inibidor da modulação serotoninérgica pelos ISRSs sobre a reprodução. Em mamíferos, entretanto, há mais estudos que relatam a diminuição da libido, como efeito dos tratamentos antidepressivos em humanos com ISRSs (Shen & Hsu 1995; Montejo et al 1999; Corona et al 2009). Em ratos machos também se observou um efeito da fluoxetina, com administração subcrônica, na redução da motivação sexual em ratos machos e na menor receptividade das fêmeas (Matuszczyk et al 1998).

O presente estudo foi proposto para preencher algumas lacunas na compreensão sobre a interação de dois comportamentos básicos do peixe-zebra e que possam contribuir para a neurofarmacologia e ecologia comportamental deste

importante modelo experimental. Uma das questões a serem abordadas é a validade da utilização de estímulos quantificáveis que desencadeiam o comportamento de acasalamento e a resposta de alarme, de maneira a estabelecer uma forma mais precisa e de fácil repetição dos testes de estimulação aversiva em comparação com os métodos convencionais, como o uso de extratos de pele (Barbosa et al 2012, Egan et al 2009, Maximino et al 2011, Ogawa et al 2014, Quadros et al 2016), e para a estimulação do acasalamento sem a presença da fêmea e sem precisar usar a água em que ocorreu o acasalamento como odorante de estimulação, as quais têm sido as abordagens utilizadas no estudo da interação destes dois comportamentos (Lastein et al 2008; Díaz-Verdugo et al 2019; Rocha 2019). O presente estudo testa a validade do uso do sulfato de condroitina, um componente do extrato de pele (Mathuru et al 2012), como uma alternativa para permitir a reprodutibilidade e um método mais controlável para analisar os comportamentos aversivos, e utiliza o feromônio  $PGF_{2\alpha}$  para analisar o comportamento de acasalamento, como já havia sido proposto anteriormente (Yabuki et al 2016).

Outra pergunta que este estudo busca responder é se um aumento na concentração geral de serotonina no encéfalo facilitaria ou inibiria a expressão do comportamento de acasalamento e, quando os dois estímulos – oferomônio de acasalamento e o feromônio de alarme – são apresentados conjuntamente, se o aumento geral de serotonina diminuiria ainda mais a resposta de alarme na presença do feromônio de acasalamento. A administração prévia de fluoxetina aos peixes-zebra é uma opção para investigar a interferência do sistema serotoninérgico nos dois comportamentos.

A utilização de *D. rerio* como modelo experimental translacional para estudos em humanos é respaldada por ampla gama de argumentos que abrangem desde aspectos genéticos até facilidades práticas de manutenção, tornando o peixe-zebra um sistema muito relevante para investigações científicas. Um dos argumentos fundamentais é a similaridade genética entre o peixe-zebra e *Homo sapiens*, aproximadamente 70% dos genes humanos possuem ao menos um ortólogo no genoma do peixe-zebra (Howe et al 2013). Ortólogos são genes de diferentes espécies que evoluíram a partir de um ancestral comum. De 18.968 genes humanos já analisados, foram encontrados ortólogos com 11 vertebrados, entre esses, o peixe-zebra (Matsuya et al 2008).

A utilidade do peixe-zebra em estudos farmacológicos vem sendo demonstrada pelas respostas comportamentais do peixe-zebra à administração de drogas de abuso ou a fármacos utilizados no tratamento de diversas doenças (Ridges et al 2012; Phillips & Westerfield 2014; Maximino et al 2015; Mocelin et al 2019; Marcon et al 2019). Isso o torna um modelo valioso para a pesquisa de novas terapias e compreensão dos mecanismos de ação de substâncias farmacológicas. O aspecto externo translúcido dos embriões desta espécie, a possibilidade de estudos genéticos por meio do knockdown ou superexpressão de genes, além da similaridade genética com os humanos, tem estabelecido o peixe-zebra como um modelo experimental alternativo aos mamíferos (Howe et al., 2013; Stewart et al., 2014). Contudo, é importante destacar que assim como há diferenças significativas entre o sistema serotoninérgico entre mamíferos, como entre ratos e humanos (Hodge et al, 2019), também é importante considerar as diferenças entre espécies mais distantes filogeneticamente. O que não invalida a realização de estudos com outros modelos animais, como o peixe-zebra, desde que as diferenças entre as espécies sejam levadas em conta para garantir a interpretação correta dos resultados.

Por último, mas não menos importante, é a vantagem da fácil manutenção do peixe-zebra em laboratório, além do seu custo relativamente baixo em comparação com outros modelos animais. Essa facilidade de criação e manuseio, acessível para uma ampla gama de estudos, contribui para a crescente popularidade do peixe-zebra como modelo experimental.

Em resumo, este estudo tem como objetivo principal investigar a interação entre o comportamento aversivo e a fase de atração sexual do comportamento de acasalamento, utilizando estímulos quantificáveis e que permitam a reprodutibilidade dos experimentos. Outro objetivo é comparar esta interação comportamental sob ação do ISRS fluoxetina, por meio da qual o sistema serotoninérgico dos animais esteja mais ativado.

Mesmo com a utilização de apenas um componente do feromônio de alarme – sulfato de condroitina – como estímulo olfatório para esta resposta e apenas com a  $PGF_{2\alpha}$  como estímulo olfatório para evocar o comportamento de atração sexual, propomos que será possível identificar uma preferência de resposta de acasalamento

em detrimento da diminuição da resposta de alarme. E, apesar do reconhecido papel da serotonina em comportamentos sociais, há apenas um estudo sobre o envolvimento da serotonina no comportamento de acasalamento no peixe *Pimephales promelas*. Um suposto nível de serotonina mais elevado, determinado pela administração de fluoxetina por alguns dias, provavelmente interferirá na interação sexual e de atração pela  $PGF_{2\alpha}$ , podendo ser inibitório se o efeito for similar ao relatado para mamíferos. E quanto à resposta de alarme, a fluoxetina poderia ser inibitória de forma mais acentuada nos animais sob o contexto sexual.

## OBJETIVOS

### Objetivo geral

Investigar a interação entre o comportamento aversivo e a fase de atração sexual do comportamento de acasalamento de *Danio rerio*, utilizando estímulos olfatórios quantificáveis e que permitam reprodutibilidade dos experimentos, e comparar esta interação comportamental sob ação do ISRS fluoxetina, por meio da qual o sistema serotoninérgico dos animais esteja mais ativado.

### Objetivos específicos

Analisar em *D.rerio* adultos machos e fêmeas o comportamento de alarme desencadeado pela detecção olfatória do sulfato de condroitina (componente do feromônio de alarme) isoladamente e após um tratamento prévio de fluoxetina (50 µg/L) por uma semana.

Analisar em *D.rerio* adultos machos o comportamento de acasalamento em resposta a administração de PGF<sub>2α</sub> (feromônio de acasalamento) isoladamente e após um tratamento prévio de fluoxetina.

Analisar em *D.rerio* adultos machos o comportamento de alarme desencadeado pela detecção olfatória do sulfato de condroitina imediatamente após a exposição de PGF<sub>2α</sub> e comparar a interação após um tratamento prévio de fluoxetina (.

## MATERIAL E MÉTODOS

### 1. Animais

Foram utilizados 208 peixes-zebra (*Danio rerio*) selvagens adultos jovens (acima de 90 dias de vida), 136 machos e 72 fêmeas, obtidos na loja Delphis Pet Atacado, Porto Alegre. Os peixes-zebra foram mantidos em aquários com água potável sem cloro e parâmetros físico-químicos adequados (temperatura  $26 \pm 1^\circ \text{C}$ ; pH  $7,0 \pm 0,3$ ; oxigênio dissolvido a  $7,0 \pm 0,4 \text{ mg/L}$ ; amônia total  $< 0,01 \text{ mg/L}$ ; dureza total a  $5,8 \text{ mg/L}$ ; e alcalinidade a  $22 \text{ mg/L CaCO}_3$ ).

Todos os procedimentos foram realizados em consonância com a resolução normativa nº 13, de 20 de setembro de 2013 e a resolução normativa nº 30, de 02 de fevereiro de 2016 do CONCEA e de acordo com a Lei 11.794 de 08 de outubro de 2008, que estabelece os procedimentos para o uso científico de animais, além dos princípios internacionais para a prática envolvendo animais, constantes do *Guide for the Care and Use of Laboratory Animals* (do *National Research Council of the National Academies*, 2011). Os experimentos foram iniciados após a aprovação do projeto (nº 38393) pela Comissão de Ética no Uso de Animais da UFRGS (CEUA/UFRGS)

Todos os peixes foram mantidos por uma semana de aclimação ao ambiente de laboratório, sendo mantidos em aquários de 4 L (1,5 peixes/litro; Fig. 1). O fotoperíodo (12 h/12 h claro/escuro) também foi controlado. As redes para captura dos peixes foram mantidas submersas nos respectivos aquários, para que os peixes se habituem a elas e tenham menor grau de estresse ao serem capturados. Os animais foram alimentados uma vez ao dia com ração industrializada (Supervit, Tropical®). O bem-estar de todos os animais foi guiado pelo preceito dos 3 Rs (*replace, refine and reduce*), visando garantir o melhor aproveitamento e uso de menor número de animais. Os animais foram anestesiados (descrição no item 5 do material e métodos) e eutanasiados de acordo com normas específicas (Westerfield 2000; Köhler et al 2017).



**Figura 1.** Esquema da distribuição dos aquários onde foram mantidos os peixes utilizados no experimento. Fonte: autor

## 2. Grupos experimentais e tamanho das amostras

Os animais foram distribuídos aleatoriamente em grupos experimentais. Todos os grupos foram submetidos a testes comportamentais em pares com os respectivos odorantes ou veículo. O uso de pares foi escolhido por diminuir o fator ansiogênico do isolamento (Faustino et al 2017) e, para fins de comparação, fica similar, em número, aos testes realizados em estudo comportamental anterior, também com pares (Rocha 2019).

Para os testes comportamentais com as substâncias  $\text{PGF}_{2\alpha}$ , sulfato de condroitina e fluoxetina, foram constituídos os seguintes grupos experimentais:

- 1) Controles machos: adicionado DMSO à água do aquário; volume igual ao das substâncias a serem testadas
- 2) Machos sob fluoxetina (50  $\mu\text{g}/\text{L}$ )
- 3) Machos sob condroitina (1  $\mu\text{g}/\text{ml}$ )
- 4) Machos sob fluoxetina antes da exposição à condroitina
- 5) Machos sob  $\text{PGF}_{2\alpha}$  (3,5  $\mu\text{l}/\text{L}$  ou  $10^{-4}$  M)
- 6) Machos sob fluoxetina antes da exposição à  $\text{PGF}_{2\alpha}$
- 7) Machos sob  $\text{PGF}_{2\alpha}$  e condroitina
- 8) Machos sob fluoxetina antes da exposição à  $\text{PGF}_{2\alpha}$  e à condroitina
- 9) Controles fêmeas
- 10) Fêmeas sob fluoxetina
- 11) Fêmeas sob condroitina
- 12) Fêmeas sob fluoxetina e condroitina

### 3. Tratamento com fluoxetina

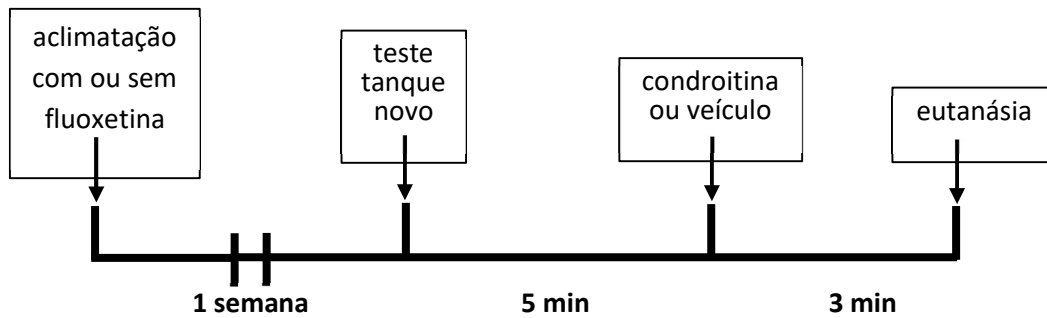
Para o tratamento com fluoxetina os peixes foram alojados em tanques de 4 L com água filtrada por filtro PP 5 micra 10" x 2.1/2" e cloro neutralizado por tiosulfato de sódio, com aeração constante e sem filtro de aquário. A água foi mantida com fluoxetina racêmica 50 µg/L (cloridato de fluoxetina Daforin®, EMS, Hortolândia, SP) durante uma ou duas semanas logo que são colocados no aquário do laboratório. A água foi trocada a cada 3 ou 4 dias, considerando a meia-vida descrita para fluoxetina em meio aquoso (Johnson et al 2005). Para a realização da troca de água foram montados outros aquários com condições idênticas às iniciais deste experimento e os peixes foram transferidos para eles com o auxílio de redes. Os peixes-zebra sem tratamento de fluoxetina foram submetidos a um procedimento idêntico de troca de água/aquário. Alguns animais dos grupos **1, 2, 9, e 10** (grupos previstos com um número um pouco maior para este teste inicial) foram testados antes dos demais, com o objetivo de esclarecer qual o período ideal de tratamento prévio com fluoxetina para resultar em efeito ansiolítico. Sendo ambos os tempos de pré-tratamento igualmente efetivos para diminuir a ansiedade dos animais quando colocados no aquário de teste, os demais grupos tratados previamente com fluoxetina foram de apenas uma semana.

A concentração de fluoxetina utilizada foi baseada nos estudos com efeito ansiolítico já demonstrado (Abreu et al 2014, 2017). Os animais que foram tratados com fluoxetina ou veículo, e sem os estímulos com os dois tipos de odorantes, foram observados assim que colocados no aquário teste (teste do tanque novo, *novel tank test*), com o objetivo de confirmar o efeito ansiolítico da fluoxetina.

### 4. Testes comportamentais

A) Teste de reação à substância de alarme - Sulfato de condroitina (Grupo 3, 4, 11, 12)



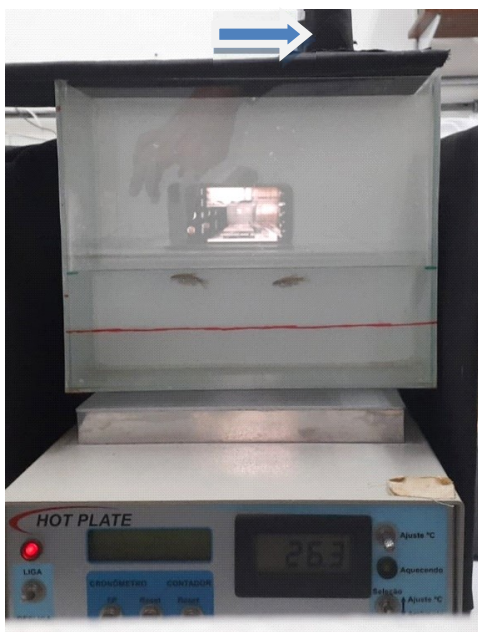


**Figura 2.** Esquema do delineamento experimental para testar o feromônio de alarme.

Fonte: autor

Neste experimento o objetivo foi observar resposta de medo ao sulfato de condroitina. Os seguintes parâmetros foram analisados: latência para a geotaxia, latência para o retorno à metade superior do aquário, número de subidas e descidas, presença ou não de congelamento e natação errática (Egan et al 2009; Speedie & Gerlai 2008; Mathuru et al 2012). Um par de animais, machos ou fêmeas, foram aclimatizados para o aquário teste (26 cm x 15 cm x 6 cm; C x A x L), contendo 2 litros de água, entre 5 e 10 minutos (com fluoxetina e sem fluoxetina), antes da administração do odor teste. Após este período, foi adicionado 1 mg/L de sulfato de condroitina (Sigma-Aldrich®, C4384) no aquário através de micropipeta introduzida por meio de uma abertura na tampa do aquário (Fig. 2), sobre a superfície da água, evitando algum movimento ou fluxo para não perturbar o animal. O tempo de análise do comportamento foi de 3 min. A concentração final de sulfato de condroitina correspondeu a 1 µg/ml nos tanques-teste (Mathuru et al 2012).

O aquário de testes possui uma tampa para que a incidência de luz seja indireta e proteções na parte de trás e laterais, de forma que o peixe não perceba o experimentador, conforme estudo similar (Egan et al 2009). O aquário teste é mantido sobre uma placa quente na temperatura de 26,3° C. A câmera foi posicionada a uma distância de 50 cm da frente do aquário, e a filmagem registrou desde a colocação dos peixes no aquário até o final destes experimentos.



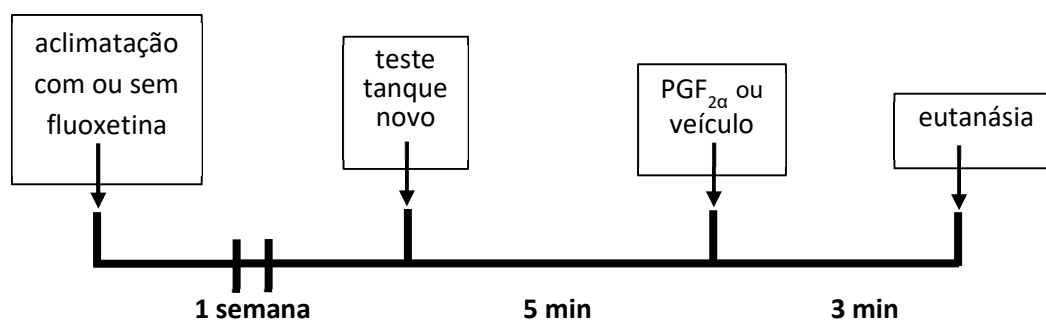
**Figura 3.** Estrutura e organização do aquário de testes. A linha vermelha divide as porções superior e inferior do aquário. Na seta azul está indicado o local onde a pipeta é inserida para administrar os diferentes compostos. Fonte: autor.

A resposta comportamental foi avaliada pelas seguintes medidas: latência para retornar à zona superior do aquário, número de entradas na zona superior e inferior do aquário, tempo de permanência na zona superior e inferior ao longo do tempo e número de episódios de imobilidade (“congelamento” ou ausência de movimento, exceto dos opérculos e dos olhos por mais de 2 segundos). Esta substância provoca reação de medo, análogo a exposição a um choque em teste de esquiva inibitória ou condicionamento de medo em ratos (Speedie & Gelai 2008; Ruhl et al 2017), ainda que as respostas de estresse fisiológicas, como glicose plasmática e o nível de cortisol, mostram leves aumentos e de curta duração (Silva et al 2015).

Grupos 1, 2, 9 e 10, também em pares, foram submetidos à mesma situação descrita acima, entretanto, não foi administrado o sulfato de condroitina, apenas volume igual de veículo. Estes animais também foram filmados durante o período todo no aquário teste, com o objetivo de avaliar a influência da fluoxetina nos seguintes indicadores de ansiedade (que se espera observar em animais *naive*, logo que são colocados em ambiente novo): latência para explorar a metade superior do aquário, tempo gasto na zona superior, número de entradas na porção superior, número e tempo de movimentos erráticos e número e tempo de respostas de imobilidade (ZBC 1.5).

A análise do comportamento dos animais foi feita a partir das filmagens obtidas durante os períodos experimentais utilizando o *Behavioral Observation Research Interactive Software* (BORIS, versão 8.22.6 Universidade de Torino, Italia). A análise foi feita por um observador, mas de forma cega (arquivos renomeados).

B) Teste de atração do peixe-zebra macho com o feromônio sexual -  $\text{PGF}_{2\alpha}$  (Grupos 5 e 6)



**Figura 4.** Esquema do delineamento experimental para o teste de atração sexual. Fonte: autor

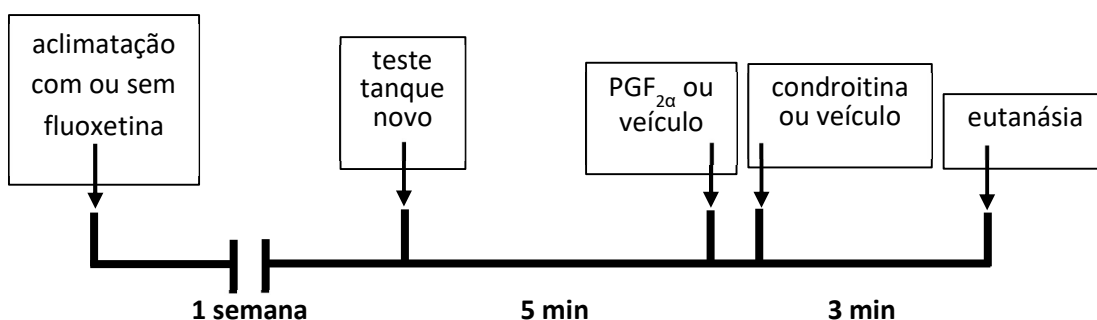
Neste teste buscamos comprovar o efeito atrativo do feromônio sexual. Em aquário e condições similares às descritas no item anterior, dois machos, após o período de aclimação, foram expostos à concentração final de  $10^{-4}$  M de  $\text{PGF}_{2\alpha}$  (Cayman®), dissolvido em DMSO (dimetilsulfóxido), aplicado em apenas um lado do aquário e seus movimentos foram caracterizados e monitorados por vídeo por 3 min, com uma câmera frontal, conforme descrito no item 4A. Foi avaliada a duração total de tempo na qual o peixe permanece no lado do odor aplicado em relação à resposta ao veículo (DMSO) (Yabuki et al 2016) e o tempo que o peixe leva para retornar à metade oposta ao estímulo. Os animais controles (parte do grupo 1) foram submetidos ao mesmo contexto que os anteriores, entretanto foi administrado veículo.

C) Teste da interferência da  $\text{PGF}_{2\alpha}$  sobre a resposta de alarme induzida por sulfato de condroitina (Grupos 7 e 8)

Os animais adultos machos, após o período de aclimação, descrito em (A), foram primeiramente expostos à  $\text{PGF}_{2\alpha}$  em uma concentração final de  $10^{-4}$  M, dissolvido em DMSO (1mg/10mL) sob as condições descritas no item 4B. Em seguida, os animais

foram expostos ao sulfato de condroitina (Sigma, 1 µg/mL) conforme descrito em 4A. As respostas dos animais foram monitoradas por um período de 3 minutos após a administração da substância de alarme. Para o grupo 8, os animais foram tratados por uma semana com fluoxetina antes de serem submetidos aos testes da exposição em sequência aos dois odorantes, descrito acima.

O esquema do delineamento experimental está exposto na Figura 5.



**Figura 5.** Esquema do delineamento experimental para o teste em sequência do feromônio sexual seguido do feromônio de alarme. Fonte: autor

## 5. Coleta das gônadas

Após os testes, os animais foram crioadestesiados por 15 minutos e decapitados para a obtenção de suas gônadas. As gônadas, situadas lateroventralmente à bexiga natatória e rostral ao ânus, foram removidas sob microscópio cirúrgico (D.F. Vasconcellos, RJ) para confirmação do sexo do peixe.

## 6. Análise estatística

Os dados obtidos dos testes comportamentais foram expressos em média, mediana e intervalos interquartílicos (percentis 25 – 75) ± erro padrão da média. Os resultados foram analisados pelo teste ANOVA de uma via ou duas vias (para os dados dos grupos submetidos a mais de um odorante), com o teste *post-hoc* de Tukey ou pelo teste de Kruskal-Wallis, com *post-hoc* de Dunn. Valores de  $p < 0,05$  foram considerados significativos. A análise estatística foi realizada com o auxílio do software Statistica® (10.0, Stat Soft, Estados Unidos da América).

## CONCLUSÃO

Este estudo demonstrou, pela primeira vez, a interação entre os comportamentos de alarme e reprodutivo pelo peixe-zebra, desencadeados por estímulos olfatórios mais específicos e quantificáveis, ou seja pelo sulfato de condroitina e pela  $PGF_{2\alpha}$ , respectivamente. Até então, o estudo da interação destes comportamentos em peixe-zebra tinham utilizado extrato de pele, como estímulo aversivo, e a presença da fêmea ou da água onde houve acasalamento, como estímulo de atração sexual. No contexto de conflito da resposta reprodutiva, provocada por  $PGF_{2\alpha}$ , com a resposta de alarme, provocada pelo sulfato de condroitina, há sempre uma priorização da resposta de acasalamento, contudo o tempo de interação com a  $PGF_{2\alpha}$  é menor se comparado ao grupo exposto ao feromônio de acasalamento sem condroitina. A fluoxetina diminui tanto a resposta dos animais ao feromônio de acasalamento como ao de alarme, mas, em situação conflito entre o estímulo aversivo e o estímulo reprodutivo, a fluoxetina aumentou o tempo de interação dos peixe-zebra machos com a  $PGF_{2\alpha}$ . Isto sugere que o sistema serotoninérgico reforça a expressão comportamental reprodutiva do peixe-zebra em uma situação de conflito com estímulo aversivo.

Esses resultados levantam questões importantes sobre os mecanismos subjacentes a essa interação complexa e destacam a necessidade de investigar mais detalhadamente, utilizando marcação de neurônios serotoninérgicos, localização de circuitos neurais envolvidos nessa interação comportamental e utilização de bloqueadores dos receptores de serotonina, por exemplo, para entender melhor como a serotonina afeta esses circuitos de maneira específica.

Em resumo, este estudo não apenas contribui para uma melhor compreensão dos efeitos comportamentais em contextos de acasalamento em peixes-zebra, mas também propõe protocolos padronizados de estímulos mais quantificáveis e reproduzíveis para evocar respostas comportamentais reprodutivas e de alarme em peixes-zebra.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abrams, P.A. (1986). Is Predator-Prey Coevolution an Arms Race? *Trends in Ecology & Evolution*, 1(4), 108-110.

Abreu, M.S., Koakoski, G., Ferreira, D., Oliveira, T.A., Rosa, J.G., Gusso, D., Giacomini, A.C., Piato, A.L., Barcellos, L.J. (2014). Diazepam and fluoxetine decrease the stress response in zebrafish. *PLoS One*, 9(7), e103232.

Abreu, M.S., Giacomini, A.C.V.V., Koakoski, G., Piato, A.L.S., Barcellos, L.J.G. (2017). Divergent effect of fluoxetine on the response to physical or chemical stressors in zebrafish. *PeerJ*, 5, e3330.

Adams, C.F., Liley, N.R., Gorzalka, B.B. (1996). PCPA increases aggression in male Firemouth Cichlids. *Pharmacology*, 53, 328–330.

Airhart, M.J., Lee, D.H., Wilson, T.D., Miller, B.E., Miller, M.N., Skalko, R.G. (2007). Movement disorders and neurochemical changes in zebrafish larvae after bath exposure to fluoxetine (PROZAC). *Neurotoxicology and Teratology*, 29(6), 652-64.

Amo, R., Fredes, F., Kinoshita, M., Aoki R., Aizawa H., Agetsuma M., Aoki T., Shiraki T., Kakinuma H., Matsuda M., Yamazaki M., Takahoko M., Tsuboi T., Higashijima S., Miyasaka N., Koide T., Yabuki Y., Yoshihara Y., Fukai T., Okamoto H. (2014). The habenulo-raphé serotonergic circuit encodes an aversive expectation value essential for adaptive active avoidance of danger. *Neuron*, 84(5), 1034-48.

Anderson, D.J., Adolphs, R. (2014). A framework for studying emotions across species. *Cell*, 157(1), 187-200.

Anholt, R.R.H., O'Grady, P., Wolfner, M.F., Harbison, S.T. (2020). Evolution of Reproductive Behavior. *Genetics*, 214(1), 49-73.

Attaran, A., Salahinejad, A., Crane, A.L., Niyogi, S., Chivers, D.P. (2019). Chronic exposure to dietary selenomethionine dysregulates the genes involved in serotonergic neurotransmission and alters social and antipredator behaviours in zebrafish (*Danio rerio*). *Environmental Pollution*, 246, 837-844.

Bain, P.A., Basheer, V.S., Gregg, A., Jena, J.K., Kumar, A. (2016). In vitro nuclear receptor activity and in vivo gene expression analysis in Murray-Darling rainbow fish (*Melanotaenia fluviatilis*) after short-term exposure to fluoxetine. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, 188, 1-8.

Barbosa Jr., A., Alves, F.B., Pereira, A.S.F., Ide, L.M., Hoffmann, A. (2012). Behavioral characterization of the alarm reaction and anxiolytic-like effect of acute treatment with fluoxetine in piauçu fish. *Physiology & Behavior*, 105, 784-790.

- Bell, A.M., Backström, T., Huntingford, F.A., Pottinger, T.G., Winberg, S. (2007). Variable neuroendocrine responses to ecologically-relevant challenges in sticklebacks. *Physiology & Behavior*, 91(1), 15-25.
- Bencan, Z., Sledge, D., Levin, E.D. (2009). Buspirone, chlordiazepoxide and diazepam effects in a zebrafish model of anxiety. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 94, 75-80.
- Bhattarai, J.P., Roa, J., Herbison, A.E., Han, S.K. (2013). Serotonin acts through 5-HT1 and 5-HT2 receptors to exert biphasic actions on GnRH neuron excitability in the mouse. *Endocrinology*, 155, 513–524.
- Briggman, K.L., Abarbanel, H.D., Kristan, W.B.J., Jr. (2005). Optical imaging of neuronal populations during decision-making. *Science*, 307, 896–901.
- Brown, G.E., Smith, R.J.F. (1996). Foraging trade-offs in fathead minnows (*Pimephales promelas*, Osteichthyes, Cyprinidae): acquired predator recognition in the absence of an alarm response. *Ethology*, 102, 776-785.
- Brown, G.E., Paige, J.A., Godin, J.G. (2000). Chemically mediated predator inspection behaviour in the absence of predator visual cues by a characin fish. *Animal Behaviour*, 60(3), 315-321.
- Brown, G.E., Rive, A.C., Ferrari, M.C.O., Chivers, D.P. (2006). The dynamic nature of antipredator behavior: prey fish integrate threat-sensitive antipredator responses within background levels of predation risk. *Behavioral Ecology and Sociobiology*, 61, 9–16.
- Brustein, E., Saint-Amant, L., Buss, R.R., Chong, M., McDearmid, J.R., Drapeau, P. (2003). Steps during the development of the zebrafish locomotor network. *Journal of Physiology-Paris*, 97(1), 77-86.
- Burgess, H.A., Schoch, H., Granato, M. (2010). Distinct retinal pathways drive spatial orientation behaviors in zebrafish navigation. *Current Biology*, 20, 381–386.
- Burk, T. (1982). Evolutionary significance of predation on sexually signalling males. *Florida Entomologist*, 65, 90-104.
- Caamaño-Tubío, R.I., Pérez, J., Ferreira, S., Aldegunde, M. (2007). Peripheral serotonin dynamics in the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, 145(2), 245-55.
- Canavello, P.R. et al. (2011). Measuring Endocrine (Cortisol) Responses of Zebrafish to Stress. In: Kalueff, A., Cachat, J. (eds) *Zebrafish Neurobehavioral Protocols. Neuromethods*, vol 51
- Canzian, J., Fontana, B.D., Quadros, V.A., Rosemberg, D.B. (2017). Conspecific alarm substance differently alters group behavior of zebrafish populations: Putative involvement of cholinergic and purinergic signaling in anxiety- and fear-like responses. *Behavioural Brain Research*, 320, 255-263.

- Challis, J.R.G., Matthews, S.G., Gibb, W., Lye, S.J. (2000). Endocrine and paracrine regulation of birth at term and preterm. *Endocrine Reviews*, 21, 514–550.
- Chia, J.S.M., Wall, E.S., Wee, C.L., Rowland, T.A.J., Cheng, R.K., Cheow, K., Guillemin, K., Jesuthasan, S. (2019). Bacteria evoke alarm behaviour in zebrafish. *Nature Communications*, 10(1), 3831.
- Comninou, A., Dhillo, W. (2018). Emerging Roles of Kisspeptin in Sexual and Emotional Brain Processing. *Neuroendocrinology*, 106(2), 195-202.
- Corio, M., Peute, J., Steinbusch, H.W.M. (1991). Distribution of serotonin- and dopamine-immunoreactivity in the brain of the teleost. *Clarias gariepinus*. *Journal of Chemical Neuroanatomy*, 4, 79–95.
- Corona, G., Ricca, V., Bandini, E., Mannucci, E., Lotti, F., Boddi, V., Rastrelli, G., Sforza, A., Faravelli, C., Forti, G., Maggi, M. (2009). Selective serotonin reuptake inhibitor-induced sexual dysfunction. *Journal of Sexual Medicine*, 6(5), 1259-69.
- Correia, D., Domingues, I., Faria, M., Oliveira, M. (2023). Effects of fluoxetine on fish: What do we know and where should we focus our efforts in the future? *Science of The Total Environment*, 857(Pt 2), 159486.
- Cui, F., Zhu, Y., Di, S., Wang, X., Zhang, Y., Chai, T. (2021). Toxicological Study on Chiral Fluoxetine Exposure to Adult Zebrafish (*Danio rerio*): Enantioselective and Sexual Mechanism on Disruption of the Brain Serotonergic System. *Environmental Science & Technology*, 55(11), 7479-7490.
- Darwin, C. (1872). *The Expression of the Emotions in Man and Animals*. London: Murray.
- deCarvalho T.N., Akitake C.M., Thisse C., Thisse B., Halpern M.E. (2013). Aversive cues fail to activate fos expression in the asymmetric olfactory-habenula pathway of zebrafish. *Front Neural Circuits*, 21(7), 98.
- De Pedro, N., Pinillos, M.L., Valenciano, A.I., Alonso-Bedate, M., Delgado, M.J. (1998). Inhibitory effect of serotonin on feeding behavior in goldfish: involvement of CRF. *Peptides*, 19(3), 505-11.
- Diaz-Verdugo, C., Sun, G.J., Fawcett, C.H., Zhu, P., Fishman, M.C. (2019). Mating Suppresses Alarm Response in Zebrafish. *Current Biology*, 29, 2541–2546.
- Do Carmo Silva, R.X., Lima-Maximino, M.G., Maximino, C. (2018). The aversive brain system of teleosts: Implications for neuroscience and biological psychiatry. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 95, 123–135.
- Dorelle, L.S., Da Cuña, R.H., Rey Vázquez, G., Höcht, C., Shimizu, A., Genovese, G., Lo Nostro, F.L. (2017). The ISRS fluoxetine exhibits mild effects on the reproductive axis in the cichlid fish *Cichlasoma dimerus* (Teleostei, Cichliformes). *Chemosphere*, 171, 370-378.



- Døving, K.B., Lastein, S. (2009). The alarm reaction in fishes – odorants, modulations of responses, neural pathways. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1170, 413-23.
- Duarte, I.A., Pais, M.P., Reis-Santos, P., Cabral, H.N., Fonseca, V.F. (2019). Biomarker and behavioural responses of an estuarine fish following acute exposure to fluoxetine. *Marine Environmental Research*, 147, 24-31.
- Egan, R.J., Bergner, C.L., Hart, P.C., Cachat, J.M., Canavello, P.R., Elegante, M.F. (2009). Understanding behavioral and physiological phenotypes of stress and anxiety in zebrafish. *Behavioural Brain Research*, 205, 38–44.
- Eisenreich, B.R., Szalda-Petree, A. (2015). Behavioral effects of fluoxetine on aggression and associative learning in Siamese fighting fish (*Betta splendens*). *Behavioural Processes*, 121, 37-42.
- Eschmeyer, W.N. (2023). *Catalog of Fishes*. California Academy of Sciences. Electronic version accessed January 2023.
- Farias, N.O., Oliveira, R., Sousa-Moura, D., de Oliveira, R.C.S., Rodrigues, M.A.C., Andrade, T.S., Domingues, I., Camargo, N.S., Muehlmann, L.A., Grisolia, C.K. (2019). Exposure to low concentration of fluoxetine affects development, behaviour and acetylcholinesterase activity of zebrafish embryos. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, 215, 1-8.
- Farias, N.O., Oliveira, R., Moretti, P.N.S., E Pinto, J.M., Oliveira, A.C., Santos, V.L., Rocha, P.S., Andrade, T.S., Grisolia, C.K. (2020). Fluoxetine chronic exposure affects growth, behavior and tissue structure of zebrafish. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, 237, 108836.
- Faustino, A.I., Tacão-Monteiro, A., Oliveira, R.F. (2017). Mechanisms of social buffering of fear in zebrafish. *Scientific Reports*, 7, 44329.
- Fior, D., Dametto, F., Fagundes, M. (2018). Divergent action of fluoxetine in zebrafish according to responsivity to novelty. *Scientific Reports*, 8, 13908.
- Fontana, B.D., Alnassar, N., Parker, M.O. (2022). The zebrafish (*Danio rerio*) anxiety test battery: comparison of behavioral responses in the novel tank diving and light-dark tasks following exposure to anxiogenic and anxiolytic compounds. *Psychopharmacology (Berlin)*, 239(1), 287-296.
- Foran, C.M., Weston, J., Slattery, M., Brooks, B.W., Huggett, D.B. (2004). Reproductive assessment of Japanese medaka (*Oryzias latipes*) following a four-week fluoxetine (ISRS) exposure. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 46(4), 511-7.
- Friedrich, R.W., Korsching, S.I. (1998). Chemotopic, combinatorial, and noncombinatorial odorant representations in the olfactory bulb revealed using a voltage-sensitive axon tracer. *Journal of Neuroscience*, 18(23), 9977-88.

- Fuller, R.W. (1996). Serotonin receptors involved in regulation of pituitary-adrenocortical function in rats. *Behavioural Brain Research*, 73(1-2), 215-9.
- Gabriel, J.P., Mahmood, R., Kyriakatos, A., Söll, I., Hauptmann, G., Calabrese, R.L., El Manira, A. (2009). Serotonergic Modulation of Locomotion in Zebrafish—Endogenous Release and Synaptic Mechanisms. *Journal of Neuroscience*, 29(33), 10387-10395.
- Gallo, R. (1980). Neuroendocrine regulation of pulsatile luteinizing hormone release in the rat. *Neuroendocrinology*, 30, 122–131.
- Gaworecki, K.M., Klaine, S.J. (2008). Behavioral and biochemical responses of hybrid striped bass during and after fluoxetine exposure. *Aquatic Toxicology*, 88(4), 207-13.
- Giacomini, A.C.V.V., Abreu, M.S., Giacomini, L.V., Siebel, A.M., Zimmerman, F.F., Rambo, C.L., Mocelin, R., Bonan, C.D., Piato, A.L., Barcellos, L.J.G. (2016). Fluoxetine and diazepam acutely modulate stress induced-behavior. *Behavioural Brain Research*, 296, 301-310.
- Gong, S., Miao, Y.L., Jiao, G.Z., Sun, M.J., Li, H., Lin, J., Luo, M.J., Tan, J.H. (2015). Dynamics and correlation of serum cortisol and corticosterone under different physiological or stressful conditions in mice. *PLoS One*, 10(2), e0117503
- Gopurappilly, R., Ogawa, S., Parhar, I.S. (2013). Functional significance of GnRH and kisspeptin, and their cognate receptors in teleost reproduction. *Frontiers in Endocrinology*, 4, 24.
- Greene, S.M., Szalda-Petree, A.D. (2022). Fins of Fury or Fainéant: Fluoxetine impacts the aggressive behavior of fighting fish (*Betta splendens*). *Behavioural Processes*, 194, 104544.
- Heisler, L.K., Pronchuk, N., Nonogaki, K., Zhou, L., Raber, J., Tung, L., Yeo, G.S., O’Rahilly, S., Colmers, W.F., Elmquist, J.K., Tecott, L.H. (2007). Serotonin activates the hypothalamic-pituitary-adrenal axis via serotonin 2C receptor stimulation. *Journal of Neuroscience*, 27, 6956.
- Henry, T.B., Black, M.C. (2008). Acute and chronic toxicity of fluoxetine (selective serotonin reuptake inhibitor) in western mosquitofish. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 54(2), 325-30.
- Herculano, A.M., Maximino, C. (2014). Serotonergic modulation of zebrafish behavior: towards a paradox. *Progress in Neuropsychopharmacology & Biological Psychiatry*, 55, 50–66.
- Hintz, W.D., Relyea, R.A. (2017). A salty landscape of fear: responses of fish and zooplankton to freshwater salinization and predatory stress. *Oecologia*, 185(1), 147-156.
- Hodge, R.D., Bakken, T.E., Miller, J.A., Smith, K.A., Barkan, E.R., Graybuck, L.T., Close, J.L., Long, B., Johansen, N., Penn, O., Yao, Z., Eggermont, J., Höllt, T., Levi, B.P., Shehata, S.I., Aevermann, B., Beller, A., Bertagnolli, D., Brouner, K., Casper, T., Cobbs, C., Dalley, R., Dee, N., Ding, S.L., Ellenbogen, R.G., Fong, O., Garren, E., Goldy, J., Gwinn, R.P.,

Hirschstein, D., Keene, C.D., Keshk, M., Ko, A.L., Lathia, K., Mahfouz, A., Maltzer, Z., McGraw, M., Nguyen, T.N., Nyhus, J., Ojemann, J.G., Oldre, A., Parry, S., Reynolds, S., Rimorin, C., Shapovalova, N.V., Somasundaram, S., Szafer, A., Thomsen, E.R., Tieu, M., Quon, G., Scheuermann, R.H., Yuste, R., Sunkin, S.M., Lelieveldt, B., Feng, D., Ng, L., Bernard, A., Hawrylycz, M., Phillips, J.W., Tasic, B., Zeng, H., Jones, A.R., Koch, C., Lein, E.S. (2019). Conserved cell types with divergent features in human versus mouse cortex. *Nature*, 573(7772), 61-68.

Hong, X., Chen, R., Zhang, L., Yan, L., Li, J., Zha, J. (2022). Low doses and lifecycle exposure of waterborne antidepressants in zebrafish model: A survey on sperm traits, reproductive behaviours, and transcriptome responses. *Science of The Total Environment*, 832, 155017.

Howe, K., Clark, M.D., Torroja, C.F., Torrance, J., Berthelot, C., Muffato, M., Collins, J.E., Humphray, S., McLaren, K., Matthews, L., McLaren, S., Sealy, I., Caccamo, M., Churcher, C., Scott, C., Barrett, J.C., Koch, R., Rauch, G.J., White, S., Chow, W., Kilian, B., Quintais, L.T., Guerra-Assunção, J.A., Zhou, Y., Gu, Y., Yen, J., Vogel, J.H., Eyre, T., Redmond, S., Banerjee, R., Chi, J., Fu, B., Langley, E., Maguire, S.F., Laird, G.K., Lloyd, D., Kenyon, E., Donaldson, S., Sehra, H., Almeida-King, J., Loveland, J., Trevanion, S., Jones, M., Quail, M., Willey, D., Hunt, A., Burton, J., Sims, S., McLay, K., Plumb, B., Davis, J., Clee, C., Oliver, K., Clark, R., Riddle, C., Elliot, D., Threadgold, G., Harden, G., Ware, D., Begum, S., Mortimore, B., Kerry, G., Heath, P., Phillimore, B., Tracey, A., Corby, N., Dunn, M., Johnson, C., Wood, J., Clark, S., Pelan, S., Griffiths, G., Smith, M., Glithero, R., Howden, P., Barker, N., Lloyd, C., Stevens, C., Harley, J., Holt, K., Panagiotidis, G., Lovell, J., Beasley, H., Henderson, C., Gordon, D., Auger, K., Wright, D., Collins, J., Raisen, C., Dyer, L., Leung, K., Robertson, L., Ambridge, K., Leongamornlert, D., McGuire, S., Gilderthorp, R., Griffiths, C., Manthavadi, D., Nichol, S., Barker, G., Whitehead, S., Kay, M., Brown, J., Murnane, C., Gray, E., Humphries, M., Sycamore, N., Barker, D., Saunders, D., Wallis, J., Babbage, A., Hammond, S., Mashreghi-Mohammadi, M., Barr, L., Martin, S., Wray, P., Ellington, A., Matthews, N., Ellwood, M., Woodmansey, R., Clark, G., Cooper, J., Tromans, A., Grafham, D., Skuce, C., Pandian, R., Andrews, R., Harrison, E., Kimberley, A., Garnett, J., Fosker, N., Hall, R., Garner, P., Kelly, D., Bird, C., Palmer, S., Gehring, I., Berger, A., Dooley, C.M., Ersan-Ürün, Z., Eser, C., Geiger, H., Geisler, M., Karotki, L., Kirn, A., Konantz, J., Konantz, M., Oberländer, M., Rudolph-Geiger, S., Teucke, M., Lanz, C., Raddatz, G., Osoegawa, K., Zhu, B., Rapp, A., Widaa, S., Langford, C., Yang, F., Schuster, S.C., Carter, N.P., Harrow, J., Ning, Z., Herrero, J., Searle, S.M., Enright, A., Geisler, R., Plasterk, R.H., Lee, C., Westerfield, M., de Jong, P.J., Zon, L.I., Postlethwait, J.H., Nüsslein-Volhard, C., Hubbard, T.J., Roest Crolius, H., Rogers, J., Stemple, D.L. (2013). The zebrafish reference genome sequence and its relationship to the human genome. *Nature*, 496(7446), 498-503.

Jacobs, B.L., Fornal, C.A. (1993). 5-HT and motor control: a hypothesis. *Trends in Neurosciences*, 16, 346–352.

Jesuthasan, S. (2012). Fear, anxiety, and control in the zebrafish. *Developmental Neurobiology*, 72(3), 395-403.

Jesuthasan, S.J., Mathuru, A.S. (2008). The alarm response in zebrafish: innate fear in a vertebrate genetic model. *Journal of Neurogenetics*, 22(3), 211-28.

Jesuthasan, S., Krishnan, S., Cheng, R.K., Mathuru, A. (2021). Neural correlates of state transitions elicited by a chemosensory danger cue. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*, 111, 110110.

Jetti, S.K., Vendrell-Llopis, N., Yaksi, E. (2014). Spontaneous activity governs olfactory representations in spatially organized habenular microcircuits. *Curr Biol.*, 24(4), 434-9.

Johnson, D., Sanderson, H., Brain, R., Wilson, C., Bestari, K., Solomon, K.R. (2005). Exposure assessment and microcosm fate of selected selective serotonin reuptake inhibitors. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 42, 313–323.

Kalueff, A.V. (2013). Towards a comprehensive catalog of zebrafish behavior 1.0 and beyond. *Zebrafish*, 10(1), 70-86.

Kah, O., Chambolle, P. (1983). Serotonin in the brain of the goldfish, *Carassius auratus*. *Cell and Tissue Research*, 234, 319–333.

Kaslin, J., Panula, P. (2001). Comparative anatomy of the histaminergic and other aminergic systems in zebrafish (*Danio rerio*). *Journal of Comparative Neurology*, 440, 342–77.

Kavaliers, M., Choleris, E., Colwell, D.D. (2001). Brief exposure to female odors “emboldens” male mice by reducing predator-induced behavioral and hormonal responses. *Hormones and Behavior*, 40(4), 497-509.

Khan, I.A., Thomas, P. (1992). Stimulatory Effects of Serotonin on Maturational Gonadotropin Release in the Atlantic Croaker, *Micropogonias undulatus*. *General and Comparative Endocrinology*, 88, 388-396.

Kellner, M., Porseryd, T., Porsch-Hällström, I., Borg, B., Roufidou, C., Olsén, K.H. (2018). Developmental exposure to the ISRS citalopram causes long-lasting behavioural effects in the three-spined stickleback (*Gasterosteus aculeatus*). *Ecotoxicology*, 27(1), 12-22.

Kermen, F., Darnet, L., Wiest, C., Palumbo, F., Bechert, J., Uslu, O., Yaksi, E. (2020). Stimulus-specific behavioral responses of zebrafish to a large range of odors exhibit individual variability. *BMC Biology*, 18(1), 66.

Kim H.S., Yumkham S., Choi J.H., Son G.H., Kim K., Ryu S.H., Suh P.G. (2006). Serotonin stimulates GnRH secretion through the c-Src-PLC gamma1 pathway in GT1-7 hypothalamic cells. *J Endocrinol.*, 190(3), 581-91.

Klee, E.W., Schneider, H., Clark, K.J., Cousin, M.A., Ebbert, J.O., Hooten, W.M., Karpyak, V.M., Warner, D.O., Ekker, S.C. (2012). Zebrafish: a model for the study of addiction genetics. *Human Genetics*, 131, 977–1008.

Kobayashi, M., Sorensen, P.W., Stacey, N.E. (2002). Hormonal and pheromonal control of spawning behavior in the goldfish. *Fish Physiology and Biochemistry*, 26, 71–84.

- Köhler, J.G., Mangan, B.P., Kodra, C., Drako, L., Long, E., Simpson, H. (2012). Decreased aggressive and locomotor behaviors in *Betta splendens* after exposure to fluoxetine. *Psychological Reports*, 110(1), 51-62.
- Köhler A., Collymore C., Finger-Baier K., Geisler R., Kaufmann L., Pounder K.C., Schulte-Merker S., Valentim A., Varga Z.M., Weiss J., Strähle U. (2017). Report of Workshop on Euthanasia for Zebrafish-A Matter of Welfare and Science. *Zebrafish.*, 14(6), 547-551.
- Laale, H. (1977). The biology and use of zebrafish *Brachydanio rerio* in fisheries research: a literature review. *Journal of Fish Biology*, 10, 121–173.
- Lastein, S., Höglund, E., Mayer, I., Øverli, Ø., Døving, K.B. (2008). Female crucian carp *Carassius carassius* lose predator avoidance when getting ready to mate. *Journal of Chemical Ecology*, 34, 1487–1491.
- Lau, B.Y.B., Mathur, P., Gould, G.G., Guo, S. (2011). Identification of a brain center whose activity discriminates a choice behavior in zebrafish. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108(6), 2581–2586.
- Lebedeva, N.Y., Malyukina, G.A., Kasumyan, A.O. (1975). The natural repellent in the skin of Cyprinids. *Journal of Ichthyology*, 15, 472–480.
- Leme, E., Silva, E.P., Rodrigues, P.S., Silva, I.R., Martins, M.F.M., Bondan, E.F., Bernardi, M.M., Kirsten, T.B. (2018). Billings reservoir water used for human consumption presents microbiological contaminants and induces both behavior impairments and astrogliosis in zebrafish. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 161, 364-373.
- Li, S., Pelletier, G. (1995). Involvement of serotonin in the regulation of gnRH gene expression in the male rat brain. *Neuropeptides*, 29(1), 21-25.
- Lillesaar, C., Stigloher, C., Tannhauser, B., Wullimann, M.F., Bally-Cuif, L. (2009). Axonal projections originating from raphe serotonergic neurons in the developing and adult zebrafish, *Danio rerio*, using transgenics to visualize raphe-specific pet1 expression. *Journal of Comparative Neurology*, 512, 158–82.
- Lillesaar, C. (2011). The serotonergic system in fish. *Journal of Chemical Neuroanatomy*, 41, 294–308.
- Lima, S.L., Dill, L.M. (1990). Behavioral decisions made under the risk of predation—a review and prospectus. *Canadian Journal of Zoology*, 68, 619–640.
- Lima, D., Castro, L.F., Coelho, I., Lacerda, R., Gesto, M., Soares, J., André, A., Capela, R., Torres, T., Carvalho, A.P., Santos, M.M. (2015). Effects of Tributyltin and Other Retinoid Receptor Agonists in Reproductive-Related Endpoints in the Zebrafish (*Danio rerio*). *Journal of Toxicology and Environmental Health*, 78(12), 747-60.
- Lima, M.G., Silva, R.X., Silva, S.N., Rodrigues, L.S., Oliveira, K.R., Batista, E.J., Maximino, C., Herculano, A.M. (2016). Time-dependent sensitization of stress responses in zebrafish: A putative model for post-traumatic stress disorder. *Behavioural Processes*, 128, 70-82.

- Lister, A., Regan, C., Van Zwol, J., Van Der Kraak, G. (2009). Inhibition of egg production in zebrafish by fluoxetine and municipal effluents: a mechanistic evaluation. *Aquatic Toxicology*, 95(4), 320-9.
- Lister, A.L., Van Der Kraak, G.J. (2009). Regulation of prostaglandin synthesis in ovaries of sexually-mature zebrafish (*Danio rerio*). *Molecular Reproduction and Development*, 76(11), 1064-75.
- Magnhagen, C. (1991). Predation risk as a cost of reproduction. *Trends in Ecology & Evolution*, 6, 183–185.
- Marcon, M., Mocelin, R., De Oliveira, D.L., Da Rosa Araujo, A.S., Herrmann, A.P., Piato, A. (2019). Acetyl-L-carnitine as a putative candidate for the treatment of stress-related psychiatric disorders: Novel evidence from a zebrafish model. *Neuropharmacology*, 150, 145-152.
- Margiotta-Casaluci, M.L., Owen, S.F., Cumming, R.I., de Polo, A., Winter, M.J., Panter, G.H., et al. (2014). Quantitative Cross-Species Extrapolation between Humans and Fish: The Case of the Anti-Depressant Fluoxetine. *PLoS ONE*, 9(10), e110467.
- Martin, J.M., Bertram, M.G., Saaristo, M., Fursdon, J.B., Hannington, S.L., Brooks, B.W., Burket, S.R., Mole, R.A., Deal, N.D.S., Wong, B.B.M. (2019). Antidepressants in Surface Waters: Fluoxetine Influences Mosquitofish Anxiety-Related Behavior at Environmentally Relevant Levels. *Environmental Science & Technology*, 53(10), 6035-6043.
- Mathuru, A.S., Kibat, C., Cheong, W.F., Shui, G., Wenk, M.R., Friedrich, R.W., Jesuthasan, S. (2012). Chondroitin fragments are odorants that trigger fear behavior in fish. *Current Biology*, 22(6), 538-44.
- Matsuya, A., Sakate, R., Kawahara, Y., Koyanagi, K.O., Sato, Y., Fujii, Y., Yamasaki, C., Habara, T., Nakaoka, H., Todokoro, F., Yamaguchi, K., Endo, T., Oota, S., Makalowski, W., Ikeo, K., Suzuki, Y., Hanada, K., Hashimoto, K., Hirai, M., Iwama, H., Saitou, N., Hiraki, A.T., Jin, L., Kaneko, Y., Kanno, M., Murakami, K., Noda, A.O., Saichi, N., Sanbonmatsu, R., Suzuki, M., Takeda, J., Tanaka, M., Gojobori, T., Imanishi, T., Itoh, T. (2008). Evola: Ortholog database of all human genes in H-InvDB with manual curation of phylogenetic trees. *Nucleic Acids Research*, 36, D787-92.
- Matuszczyk, J.V., Larsson, K., Eriksson, E. (1998). Subchronic administration of fluoxetine impairs estrous behavior in intact female rats. *Neuropsychopharmacology*, 19(6), 492-8.
- Maximino, C., Herculano, A.M. (2010). A review of monoaminergic neuropsychopharmacology in zebrafish. *Zebrafish*, 7(4), 359-78.
- Maximino, C., Silva, A.W.B., Gouveia Jr., A., Herculano, A.M. (2011). Pharmacological analysis of zebrafish (*Danio rerio*) scototaxis. *Progress in Neuropsychopharmacology & Biological Psychiatry*, 35, 624-631.

Maximino, C. (2012). Serotonin and anxiety. Neuroanatomical, pharmacological, and functional aspects. New York, NY: Springer.

Maximino, C., da Silva, A.W., Araújo, J., Lima, M.G., Miranda, V., Puty, B., Benzecry, R., Picanço-Diniz, D.L., Gouveia, A. Jr., Oliveira, K.R., Herculano, A.M. (2014a). Fingerprinting of psychoactive drugs in zebrafish anxiety-like behaviors. *PLoS One*, 9(7), e103943.

Maximino, C., Lima, M.G., Costa, C.C., Guedes, I.M.L., Herculano, A.M. (2014b). Fluoxetine and WAY 100,635 dissociate increases in scototaxis and analgesia induced by conspecific alarm substance in zebrafish (*Danio rerio* Hamilton 1822). *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*, 124C, 425–433.

Maximino, C., Silva, R.X., da Silva, S.N., Rodrigues, L.S., Barbosa, H., de Carvalho, T.S., Leao, L.K., Lima, M.G., Oliveira, K.R., Herculano, A.M. (2015). Non-mammalian models in behavioral neuroscience: consequences for biological psychiatry. *Frontiers in Behavioral Neuroscience*, 9, 233.

McDonald, M.D. (2017). An AOP analysis of selective serotonin reuptake inhibitors (ISRSs) for fish. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part C*, 197, 19–31.

Mennigen, J.A., Harris, E.A., Chang, J.P., Moon, T.W., Trudeau, V.L. (2009). Fluoxetine affects weight gain and expression of feeding peptides in the female goldfish brain. *Regulatory Peptides*, 155(1-3), 99-104.

Mennigen, J.A., Sassine, J., Trudeau, V.L., Moon, T.W. (2010). Waterborne fluoxetine disrupts feeding and energy metabolism in the goldfish *Carassius auratus*. *Aquatic Toxicology*, 100(1), 128-37.

Mennigen, J.A., Zamora, J.M., Chang, J.P., Trudeau, V.L. (2017). Endocrine disrupting effects of waterborne fluoxetine exposure on the reproductive axis of female goldfish, *Carassius auratus*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, 202, 70-78.

Meyer A., Schartl M. (1999). Gene and genome duplications in vertebrates: the one-to-four (-to-eight in fish) rule and the evolution of novel gene functions. *Curr Opin Cell Biol.*, 11(6), 699-704.

Miller, N.Y., Gerlai, R. (2011). Shoaling in zebrafish: what we don't know. *Reviews in the Neurosciences*, 22(1), 17-25.

Mocelin, R., Marcon, M., Da Rosa Araujo, A.S., Herrmann, A.P., Piato, A. (2019). Withdrawal effects following repeated ethanol exposure are prevented by N-acetylcysteine in zebrafish. *Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry*, 93, 161-170.

Montejo, A.L., Llorca, G., Izquierdo, J.A., Carrasco, J.L., Daniel, E., Pérez-Sola, V., Vicens, E., Bousoño, M., Sánchez-Iglesias, S., Franco, M., Cabezudo, A., Rubio, V., Ortega, M.A., Puigdemivol, M., Domenech, J.R., Allué, B., Sáez, C., Mezquita, B., Gálvez, I., Pacheco, L., de Miguel, E. (1999). Disfunción sexual conantidepressivos. Efecto del cambio a

amineptinoen pacientes condifunción sexual secundaria a ISRS. *Actas Españolas de Psiquiatría*, 27(1), 23-34.

Moore, A., Waring, C. (1996). Electrophysiological and endocrinological evidence that F-series prostaglandins function as priming pheromones in mature male Atlantic salmon (*Salmo salar*) parr. *Journal of Experimental Biology*, 199(Pt 10), 2307-16.

Munro, A.D. (1986). Effects of melatonin, serotonin, and naloxone on aggression in isolated cichlid fish (*Aequidens pulcher*). *Journal of Pineal Research*, 3, 257–262.

Nathan, F.M., Ogawa, S., Parhar, I.S. (2015). Kisspeptin1 modulates odorant-evoked fear response via two serotonin receptor subtypes (5-HT1A and 5-HT2) in zebrafish. *Journal of Neurochemistry*, 133, 870-878.

Nielsen, S.V., Kellner, M., Henriksen, P.G., Olsén, H., Hansen, S.H., Baatrup, E. (2018). The psychoactive drug Escitalopram affects swimming behaviour and increases boldness in zebrafish (*Danio rerio*). *Ecotoxicology (London, England)*, 27(4), 485-497.

Nock, B., Feder, H.H. (1982). Neurotransmitter modulation of steroid action in target cells that mediate reproduction and reproductive behavior. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, 5, 437–447.

Norton, W.H., Folchert, A., Bally-Cuif, L. (2008). Comparative analysis of serotonin receptor (HTR1A/HTR1B families) and transporter (slc6a4a/b) gene expression in the zebrafish brain. *The Journal of Comparative Neurology*, 511(4), 521-542.

Ogawa, S., Nathan, F.M., Parhar, I.S. (2014). Habenular kisspeptin modulates fear in the zebrafish. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 111, 3841-3846.

Ogawa, S., Parhar, I.S. (2018). Biological Significance of Kisspeptin–Kiss 1 Receptor Signaling in the Habenula of Teleost Species. *Frontiers in Endocrinology*, 9, 222.

Oikonomou, G., Altermatt, M., Zhang, R.W., Coughlin, G.M., Montz, C., Gradinaru, V., Prober, D.A. (2019). The Serotonergic Raphe Promote Sleep in Zebrafish and Mice. *Neuron*, 103(4), 686-701.

Orozco-Hernandez, J.M., Gómez-Oliván, L.M., Elizalde-Velázquez, G.A., Rosales-Pérez, K.E., Cardoso-Vera, J.D., Heredia-García, G., Islas-Flores, H., García-Medina, S., Galar-Martínez, M. (2022). Fluoxetine-induced neurotoxicity at environmentally relevant concentrations in adult zebrafish *Danio rerio*. *Neurotoxicology*, 90, 121-129.

Pagnussat, N., Piatto, A.L., Schaefer, I.C., Blank, M., Tamborski, A.R., Guerim, L.D., Bonan, C.D., Vianna, M.R., Lara, D.R. (2013). One for all and all for one: the importance of shoaling on behavioral and stress responses in zebrafish. *Zebrafish*, 10(3), 338-42.

Paula, J.R., Messias, J.P., Grutter, A.S., Bshary, R., Soares, M.C. (2015). The role of serotonin in the modulation of cooperative behavior. *Behavioral Ecology*, 26(4), 1005–1012.



- Parra, K.V., Adrian, J.C. Jr., Gerlai, R. (2009). The synthetic substance hypoxanthine 3-N-oxide elicits alarm reactions in zebrafish (*Danio rerio*). *Behavioural Brain Research*, 205, 336-341.
- Parolini, M., Ghilardi, A., De Felice, B., Del Giacco, L. (2019). Environmental concentration of fluoxetine disturbs larvae behavior and increases the defense response at molecular level in zebrafish (*Danio rerio*). *Environmental Science and Pollution Research International*, 26(34), 34943-34952.
- Perreault, H.A., Semsar, K., Godwin, J. (2003). Fluoxetine treatment decreases territorial aggression in a coral reef fish. *Physiology & Behavior*, 79, 719–724.
- Pei, S., Liu, L., Zhong, Z., Wang, H., Lin, S., Shang, J. (2016). Risk of prenatal depression and stress treatment: alteration on serotonin system of offspring through exposure to Fluoxetine. *Scientific Reports*, 6, 33822.
- Pfeiffer, W. (1963). Alarm substances. *Experientia*, 19, 1–11.
- Pfeiffer, W., Riegelbauer, G., Meier, G., Scheibler, B. (1985). Effect of hypoxanthine-3 (N)-oxide and hypoxanthine-1 (N)-oxide on central nervous excitation of the black tetra *Gymnocorymbusternetzi* (Characidae, Ostariophysi, Pisces) indicated by dorsal light response. *Journal of Chemical Ecology*, 11, 507–523.
- Phillips, J.B., Westerfield, M. (2014). Zebrafish models in translational research: tipping the scales toward advancements in human health. *Disease Models & Mechanisms*, 7, 739-743.
- Porseryd, T., Kellner, M., Reyhanian Caspillo, N., Volkova, K., Elabbas, L., Ullah, S., Olsén, H., Dinnéty, P., Porsch Hällström, I. (2017). Combinatory effects of low concentrations of 17 $\alpha$ -etinylestradiol and citalopram on non-reproductive behavior in adult zebrafish (*Danio rerio*). *Aquatic Toxicology*, 193, 9-17.
- Prasad, P., Ogawa, S., Parhar, I.S. (2015). Role of serotonin in fish reproduction. *Frontiers in Neuroscience*, 9, 1-9.
- Quadros, V.A., Silveira, A., Giuliani, G.S., Didonet, F., Silveira, A.S., Nunes, M.E., Silva, T.O., Loro, V.L., Rosemberg, D.B. (2016). Strain- and context-dependent behavioural responses of acute alarm substance exposure in zebrafish. *Behavioural Processes*, 122, 1–11.
- Quadros, V.A., Costa, F.V., Canzian, J., Nogueira, C.W., Rosemberg, D.B. (2018). Modulatory role of conspecific alarm substance on aggression and brain monoamine oxidase activity in two zebrafish populations. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*, 86, 322–330.
- Ridges, S., Heaton, W.L., Joshi, D., Choi, H., Eiring, A., Batchelor, L., Choudhry, P., Manos, E.J., Sofla, H., Sanati, A., Welborn, S., Agarwal, A., Spangrude, G.J., Miles, R.R., Cox, J.E., Frazer, J.K., Deininger, M., Balan, K., Sigman, M., Muschen, M., Perova, T., Johnson, R.,

Montpellier, B., Guidos, C.J., Jones, D.A., Trede, N.S. (2012). Zebrafish screen identifies novel compound with selective toxicity against leukemia. *Blood*, 119, 5621–31.

Rocha, E.O.C. (2019). Análise da interação entre as respostas comportamentais de alarme e reprodutiva em peixe-zebra (*Danio rerio*). Dissertação de Mestrado. Programa de Pós-graduação em Neurociências, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, UFRGS.

Rodríguez-Gómez, F.J., Rendón-Unceta, M.C., Sarasquete, C., Muñoz-Cueto, J.A. (2000). Distribution of serotonin in the brain of the Senegalese sole, *Solea senegalensis*: an immunohistochemical study. *Journal of Chemical Neuroanatomy*, 18, 103–115.

Ruhl, T., Zeymer, M., von der Emde, G. (2017). Cannabinoid modulation of zebrafish fear learning, and its functional analysis investigated by c-Fos expression. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 153, 18–31.

Sackerman, J., Donegan, J.J., Cunningham, C.S., Nguyen, N.N., Lawless, K., Long, A., Benno, R.H., Gould, G.G. (2010). Zebrafish Behavior in Novel Environments: Effects of Acute Exposure to Anxiolytic Compounds and Choice of *Danio rerio* Line. *International Journal of Comparative Psychology*, 23(1), 43-61.

Schultz, M.M., Painter, M.M., Bartell, S.E., Logue, A., Furlong, E.T., Werner, S.L., Schoenfuss, H.L. (2011). Selective uptake and biological consequences of environmentally relevant antidepressant pharmaceutical exposures on male fathead minnows. *Aquatic Toxicology*, 104(1-2), 38-47.

Sharma, V.K., Loh, Y.P. (2023). The discovery, structure, and function of 5-HT<sub>1E</sub> serotonin receptor. *Cell Communication and Signaling*, 21, 235.

Shen, W.W., Hsu, J.H. (1995). Female sexual side effects associated with selective serotonin reuptake inhibitors: a descriptive clinical study of 33 patients. *International Journal of Psychiatry in Medicine*, 25(3), 239-48.

Shuraiqi, A., Al-Habsi, A., Barry, M.J. (2021). Time-dose- and transgenerational effects of fluoxetine on the behavioural responses of zebrafish to a conspecific alarm substance. *Environmental Pollution*, 270, 116164.

Silva P.I., Martins C.I., Khan U.W., GjØen H.M., Øverli Ø., Höglund E. (2015). Stress and fear responses in the teleost pallium. *Physiol Behav.*, 141, 17-22.

Smith, R.J.F. (1973). Testosterone eliminates alarm substance in male fathead minnows. *Canadian Journal of Zoology*, 51, 875-876.

Somoza, G.M., Yu, K.L., Peter, R.E. (1988). Serotonin Stimulates Gonadotropin Release in Female Goldfish, *Carassius auratus* L. *General and Comparative Endocrinology*, 72, 376-382.

Sorensen, P.W., Hara, T.J., Stacey, N.E., Goetz, F.W. (1988). F prostaglandins function as potent olfactory stimulants that comprise the postovulatory female sex pheromone in goldfish. *Biology of Reproduction*, 39(5), 1039-50.

- Sorensen, P.W., Appelt, C., Stacey, N.E., Goetz, F.W., Brash, A.R. (2018). High levels of circulating prostaglandin F<sub>2</sub> $\alpha$  associated with ovulation stimulate female sexual receptivity and spawning behavior in the goldfish (*Carassius auratus*). *General and Comparative Endocrinology*, 267, 128-136.
- Sourbron, J., Schneider, H., Kecskés, A., Liu, Y., Buening, E.M., Lagae, L., Smolders, I., de Witte, P. (2016). Serotonergic Modulation as Effective Treatment for Dravet Syndrome in a Zebrafish Mutant Model. *ACS Chemical Neuroscience*, 7(5), 588-98.
- Speedie, N., Gerlai, R. (2008). Alarm substance induced behavioral responses in zebrafish (*Danio rerio*). *Behavioural Brain Research*, 188(1), 168-77.
- Stacey, N.E., Goetz, F.W. (1982). Role of prostaglandins in fish reproduction. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 39, 92-98.
- Stahl, S.M. (1998). Mechanism of action of serotonin selective reuptake inhibitors. Serotonin receptors and pathways mediate therapeutic effects and side effects. *Journal of Affective Disorders*, 51(3), 215-35.
- Stewart A.M., Braubach O., Spitsbergen J., Gerlai R., Kalueff A.V. (2014) Zebrafish models for translational neuroscience research: from tank to bedside. *Trends Neurosci.*, 37(5), 264-78.
- Stoczynski, L., van den Hurk, P. (2020). Effects of selective serotonin reuptake inhibitor sertraline on hybrid striped bass predatory behavior and brain chemistry. *Aquatic Toxicology*, 226, 105564.
- Stouffer, R.L., Bishop, C.V., Bogan, R.L., Xu, F., Hennebold, J.D. (2013). Endocrine and local control of the primate *corpus luteum*. *Reproductive Biology*, 13(4), 259-71.
- Tang, S., Guo, A. (2001). Choice behavior of *Drosophila* facing contradictory visual cues. *Science*, 294, 1543–1547.
- Tang, H., Wang, L., Chen, Y., He, J., Qu, L., Guo, Y., Liu, Y., Liu, X., Lin, H. (2018). Ovulation is associated with the LH-dependent induction of pla2g4aa in zebrafish. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 473, 53-60.
- Theodoridi, A., Tsalafouta, A., Pavlidis, M. (2017). Acute Exposure to Fluoxetine Alters Aggressive Behavior of Zebrafish and Expression of Genes Involved in Serotonergic System Regulation. *Frontiers in Neuroscience*, 11, 223.
- Tran, S., Nowicki, M., Muraleetharan, A., Chatterjee, D., Gerlai, R. (2016). Neurochemical factors underlying individual differences in locomotor activity and anxiety-like behavioral responses in zebrafish. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*, 65, 25-33.
- Vaclavik, J., Sehonova, P., Blahova, J., Medkova, D., Postulkova, E., Maly, O., Charvatova, M., Stastny, K., Lenz, J., Mares, J., Franc, A., Svobodova, Z. (2022). Foodborne fluoxetine impacts the immune response in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 90, 103818.

- Van de Winkel, J.G.J., Van Kuppevelt, T.H.M.S.M., Janssen, H.M.J., Lock, R.A.C. (1986). Glycosaminoglycans in the skin mucus of rainbow trout (*Salmo gairdneri*). Comparative Biochemistry and Physiology Part B, 85, 473–475.
- Venkatachalam, A.B., Levesque, B., Achenbach, J.C., Pappas, J.J., Ellis, L.D. (2023). Long and Short Duration Exposures to the Selective Serotonin Reuptake Inhibitors (ISRSs) Fluoxetine, Paroxetine and Sertraline at Environmentally Relevant Concentrations Lead to Adverse Effects on Zebrafish Behaviour and Reproduction. Toxics, 11(2), 151.
- Vinterstare, J., Brönmark, C., Nilsson, P.A., Langerhans, R.B., Berglund, O., Örjes, J., Hulthén, K. (2021). Antipredator phenotype in crucian carp altered by a psychoactive drug. Ecology and Evolution, 11(14), 9435-9446.
- Von Frisch, K. (1938). Zur Psychologie des Fisch Schwarmes. Naturwissenschaften, 26, 601–606.
- Waldman, B. (1982). Quantitative and Developmental Analyses of the Alarm Reaction in the Zebra *Danio*, *Brachydanio rerio*. Copeia, 1, 1-9.
- Wallén, P., Christenson, J., Brodin, L., Hill, R., Lansner, A., Grillner, S. (1989). Mechanisms underlying the serotonergic modulation of the spinal circuitry for locomotion in lamprey. Progress in Brain Research, 80, 321 – 327.
- Wei, M.L., He, S.M., Chen, A.Q., Fan, Z.X., Liu, W., Zhang, L., Lv, S.J., Qiu, C.Z., Liu, H.R., Hao, M.X., Yin, Z.J., Ren, D.L. (2022). Fluoxetine modifies circadian rhythm by reducing melatonin content in zebrafish. Biomedicine & Pharmacotherapy, 153, 113268.
- Weinberger, J. 2nd, Klaper, R. (2014). Environmental concentrations of the selective serotonin reuptake inhibitor fluoxetine impact specific behaviors involved in reproduction, feeding and predator avoidance in the fish *Pimephalespromelas* (fathead minnow). Aquatic Toxicology, 151, 77-83.
- Westerfield, M. (2000). The zebrafish book. A guide for the laboratory use of zebrafish (*Danio rerio*). 4th ed., University of Oregon Press, Eugene.
- Winberg, S., Nilsson, G.E., Olsén, K.H. (1992). Changes in brain serotonergic activity during hierarchic behavior in Arctic charr (*Salvelinus alpinus L.*) are socially induced. Journal of Comparative Physiology A, 170 (1), 93 – 99.
- Winberg, S., Nilsson, A., Hylland, P., Söderstöm, V., Nilsson, G.E. (1997). Serotonin as a regulator of hypothalamic-pituitary-interrenal activity in teleost fish. Neuroscience Letters, 230(2), 113-6.
- Winberg, S., Olivier., Lepage, O. (2001). Suppression of aggression in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) by dietary l-tryptophan. Journal of Experimental Biology, 204, 3867–3876.
- Winberg, S., Thörnqvist, P.O. (2016). Role of brain serotonin in modulating fish behavior. Current Zoology, 62(3), 317-323.

Wong, K., Elegante, M., Bartels, B., Elkhayat, S., Tien, D., Roy, S., Goodspeed, J., Suci, C., Tan, J., Grimes, C., Chung, A., Rosenberg, M., Gaikwad, S., Denmark, A., Jackson, A., Kadri, F., Chung, K.M., Stewart, A., Gilder, T., Beeson, E., Zapolsky, I., Wu, N., Cachat, J., Kalueff, A.V. (2010). Analyzing habituation responses to novelty in zebrafish (*Danio rerio*). Behavioural Brain Research, 208, 450–457.

Wong R.Y., Oxendine S.E., Godwin J. (2013) Behavioral and neurogenomic transcriptome changes in wild-derived zebrafish with fluoxetine treatment. BMC Genomics., 14, 348.

Yabuki, Y., Koide, T., Miyasaka, N., Wakisaka, N., Masuda, M., Ohkura, M. (2016). Olfactory receptor for prostaglandin F2 $\alpha$  mediates male fish courtship behavior. Nature Neuroscience, 19 (7), 897-904.

Zhang, Y., Lu, H., Bargmann, C.I. (2005). Pathogenic bacteria induce aversive olfactory learning in *Caenorhabditis elegans*. Nature, 438, 179–184.

Ziani, P.R., Müller, T.E., Stefanello, F.V., Fontana, B.D., Duarte, T., Canzian, J., Rosemberg, D.B. (2018). Nicotine increases fear responses and brain acetylcholinesterase activity in a context-dependent manner in zebrafish. Pharmacology Biochemistry and Behavior, 170, 36-43.

Zindler, F., Stoll, S., Baumann, L., Knoll, S., Huhn, C., Braunbeck, T. (2020). Do environmentally relevant concentrations of fluoxetine and citalopram impair stress-related behavior in zebrafish (*Danio rerio*) embryos? Chemosphere, 261, 127753.