

1

BIOTECNOLOGIA APLICADA À SAÚDE

FUNDAMENTOS E APLICAÇÕES



organizador

RODRIGO RIBEIRO RESENDE

colaborador

CARLOS RICARDO SOCCOL

Blucher



BIOTECNOLOGIA APLICADA À SAÚDE

Blucher



BIOTECNOLOGIA APLICADA À SAÚDE
FUNDAMENTOS E APLICAÇÕES
VOLUME 1

RODRIGO RIBEIRO RESENDE

ORGANIZADOR

CARLOS RICARDO SOCCOL

COLABORADOR

Biotecnologia aplicada à saúde: fundamentos e aplicações, vol. 1
Coleção Biotecnologia Aplicada à Saúde, vol. 1

© 2015 Rodrigo Ribeiro Resende
Editora Edgard Blücher Ltda.

Blucher

Rua Pedroso Alvarenga, 1245, 4º andar
04531-934, São Paulo – SP – Brasil
Tel.: 55 11 3078-5366
contato@blucher.com.br
www.blucher.com.br

Segundo o Novo Acordo Ortográfico, conforme 5ª ed.
do *Vocabulário Ortográfico da Língua Portuguesa*,
Academia Brasileira de Letras, março de 2009.

É proibida a reprodução total ou parcial por quaisquer
meios, sem autorização escrita da Editora.

Todos os direitos reservados pela Editora Edgard Blücher Ltda.

FICHA CATALOGRÁFICA

Biotechnology applied to health: fundamentals and applications,
volume 1 / organized by Rodrigo Ribeiro Resende e
Carlos Ricardo Soccol. -- São Paulo: Blucher, 2015.

ISBN 978-85-212-0896-9

1. Biotecnologia I. Resende, Rodrigo Ribeiro II. Soccol,
Carlos Ricardo

15-0174

CDD 620.8

Índices para catálogo sistemático:

1. Biotecnologia

AGRADECIMENTOS

Esta obra não poderia ter iniciado sem a dedicação de cada um que participou em sua elaboração, desde os professores, alunos, editores, corretores, diagramadores, financiadores, amigos, esposa, irmão, pais, leitores até o desejo de tornar o conhecimento acessível para todos. Obrigado!

Prof. Rodrigo R. Resende

APOIO



**NANOCELL
NEWS**

O jornal eletrônico do Instituto

NANOCELL

ISSN 2318-5880

DOI 10.15729

www.institutonanocell.org.br

www.facebook.com/institutoNanocell



FAPEMIG

Agradecemos ao apoio financeiro pelos projetos científicos da Fapemig, CNPq, Capes, Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia em Nanomateriais de Carbono, Rede Mineira de Toxinas com Ação Terapêutica, Instituto Nanocell.

CARTA AO LEITOR

A corrupção é o verdadeiro genocídio de uma sociedade, e o único meio de combatê-la é pelo conhecimento. O conhecimento, adquirido pelo povo por meio da educação, transformado, multiplicado e compartilhado constrói uma verdadeira nação. Nação cujos cidadãos honram, reconhecem e proclamam sua pátria e seu povo, para todos, em todo lugar, para todo o sempre.

Podemos ser pressionados de todos os lados, mas não desanimados; podemos ficar perplexos, mas não desesperados; somos perseguidos, mas não abandonados; abatidos, mas não destruídos.

Embora exteriormente estejamos nos desgastando, interiormente somos renovados dia após dia, pois nossos sofrimentos leves e momentâneos produzem para nós uma glória eterna que pesa mais do que todos eles. Assim, fixamos os olhos não naquilo que se vê, mas na glória eterna que se há de ter.

Mesmo que esta carta tenha lhe causado tristeza ou estranheza, não me arrependo. É possível que o tenha entristecido, ainda que por pouco tempo. Agora, porém, me alegre, não porque você foi entristecido, mas porque a tristeza o levou ao arrependimento.

A tristeza segundo o amor produz um arrependimento que leva à salvação e não ao remorso, mas a tristeza segundo a mentira produz morte. A tristeza segundo o perdão produz dedicação, desculpas, indignação, temor, saudade, preocupação, desejo de ver a justiça feita! Assim, se lhe escrevi, não foi por causa daquele que cometeu o erro nem daquele que foi prejudicado, mas para que diante do Supremo você pudesse ver por si próprio como é a formação da natureza humana.

Prof. Rodrigo R. Resende

Presidente da Sociedade Brasileira de Sinalização Celular

Presidente Fundador do Instituto Nanocell

CONTEÚDO

Prefácio — Jorge Almeida Guimarães — Capes	9
Apresentação — Mario Neto Borges — Fapemig	11
Modelos Utilizados	
1. <i>Zebrafish</i> como Modelo para Estudos Comportamentais	15
2. Conceitos Básicos de Meio de Cultura	57
3. Embriogênese Vegetal: Abordagens Básicas e Biotecnológicas	89
4. Lesão Mecânica na Retina: Um Modelo Simples para o Estudo da Neurodegeneração Aguda	113
5. Matrizes Multieletrodo: Aplicações em Biotecnologia	153
6. Métodos em Isolamento e Cultura de Cardiomiócitos e a Transferência de siRNA Utilizando Nanotubos de Carbono	179
7. Matrizes Descelularizadas: Fundamentos, Métodos e Aplicações	199
Microscopia Confocal	
8. Microscopia Confocal por Varredura a Laser: Fundamentos e Métodos	225
9. Microscopia Confocal a Laser: Fundamentos e Métodos em Odontologia Restauradora e Estética	253
10. Microscopia Confocal Intravital	283
11. FRET (<i>Fluorescence Resonance Energy Transfer</i>) e BRET (<i>Bioluminescent Resonance Energy Transfer</i>) como Ferramentas para Estudo da Biologia de GPCRs (<i>G-Protein Coupled Receptors</i>)	313
12. O Uso de Proteínas Fluorescentes na Ciência Contemporânea	341
Citogenética	
13. Citogenética Humana: Fundamentos e Aplicações	363
14. Citogenética Molecular: Fundamentos Básicos, Métodos e Aplicações Cross-Species/Zoo-FISH, Reverse-FISH, Reciprocal-FISH	395
15. DNA <i>Microarrays</i> : Tipos e Aplicações	427
Toxinas e Purificações	
16. Purificação de Produtos Biotecnológicos	477
17. Uso de Ressonância Magnética Nuclear de Alta Resolução para Estudos de Interações Receptores-Ligantes: Fundamentos, Métodos e Aplicações	507
18. Perspectivas Inovadoras para o Uso Terapêutico de Toxinas da Aranha “Armadeira” <i>Phoneutria nigriventer</i> (Keyserling, 1891) na Dor e na Disfunção Erétil	541
19. Uso de Toxinas Animais para o Tratamento da Dor: Fundamentos e Aplicações	575
Autores	611

PREFÁCIO

A coleção *Biotecnologia Aplicada à Saúde e Biotecnologia Aplicada à Agro&Indústria*, elaborada sob a laboriosa e obstinada coordenação do Prof. Rodrigo Resende, vem cobrir, em momento oportuno e de forma ampla, aprofundada e atualizada, toda a temática multi e interdisciplinar da biotecnologia. Reunindo centenas de autores, a obra produzida em uma série de quatro volumes cobre os temas mais atuais da literatura sobre as técnicas e o conhecimento dessa importante área técnico-científica em língua portuguesa. A obra publicada representa, sobretudo, o esforço de uma larga comunidade de ativos pesquisadores de diferentes instituições que atuam nos diversos ramos da biotecnologia no Brasil.

Tendo como alvo a comunidade de estudantes de pós-graduação e também de graduação dos cursos de biotecnologia, biociências e áreas afins, a coleção também propicia a oportunidade de obtenção desses conhecimentos de forma sucinta e objetiva por interessados em geral nos assuntos da biotecnologia, como profissionais do jornalismo, agricultores, empresários do setor e pesquisadores de outras áreas do conhecimento, mesmo as mais distantes dessa temática científica.

Os autores tiveram o cuidado de abordar aspectos históricos e básicos de elaboradas técnicas originárias da biologia, química, física, informática e de outras disciplinas que findaram por desenhar as refinadas técnicas da biologia molecular e da engenharia genética que são os fundamentos da biotecnologia moderna. Essa preocupação torna-se densamente interessante para bem situar os leitores e, sobretudo, os estudantes sobre as perspectivas que a biotecnologia aplicada pode oferecer no desenvolvimento de novos produtos e insumos destinados à saúde e à agricultura.

O detalhamento de experimentos de bancada, mais simples ou mais complexos, com os diversos tipos de modelos celulares isolados ou mesmo multicelulares em plantas e animais com técnicas do DNA recombinante, tem especial interesse para a expansão do alcance da biotecnologia na produção de proteínas terapêuticas, cada vez mais requeridas para o tratamento de muitas doenças humanas e animais. Na abordagem dos múltiplos aspectos dessas técnicas modernas, os autores exploram as inúmeras possibilidades de aplicações biotecnológicas, indo da citogenética à produção de animais transgênicos e à terapia gênica. Em conjunto, essas tecnologias propiciam alcançar avanços extraordinários na saúde e na agricultura, componentes socioeconômicos de capital importância no desenvolvimento do Brasil.

Em nome da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes) saudamos a iniciativa do Prof. Resende, perseverante na coordenação da obra, e de todos os autores que se debruçaram sobre o respeitável desafio de produzir, nesta extraordinária empreitada, os quatro livros que compõem a coleção *Biotecnologia Aplicada à Saúde e Biotecnologia Aplicada à Agro&Indústria*, a qual vem oferecer aos nossos estudantes de graduação e de pós-graduação das áreas biomédicas e de tantas outras afins acesso aos temas mais atualizados da biotecnologia moderna e suas aplicações acadêmicas e práticas.

Jorge Almeida Guimarães
Presidente da Coordenação de
Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes)

APRESENTAÇÃO

Século do conhecimento

A Biotecnologia é uma das áreas de conhecimento consideradas “portadoras de futuro”. Isso significa que, além de sua relevância e impacto para o avanço da ciência como um todo, o campo também tem potencial para impulsionar a economia brasileira e para promover maior competitividade e inserção internacionais. Suas aplicações são variadas: produtos, processos e serviços para setores como saúde e agronegócios estão entre as principais contribuições da Biotecnologia e todas elas têm impacto na qualidade de vida da população.

Como consequência, observamos, especialmente nos últimos anos, o investimento crescente e a indução de pesquisas na área. Em Minas Gerais, por exemplo, o esforço conjunto e a parceria entre governo, academia e empresas resultaram na instalação de um dos mais importantes polos de Biotecnologia do país. De todas as empresas brasileiras de biotecnologia, 30% estão concentradas na região metropolitana da capital mineira. É sabido que ainda existem limitações para o total desenvolvimento da área. O marco legal que regula a coleta e o acesso a recursos genéticos ainda é alvo de discussões, assim como os limites éticos das investigações.

Por tudo isso, a coleção Biotecnologia Aplicada à Saúde e Biotecnologia Aplicada à Agro&Indústria surge como uma iniciativa pertinente e atual. Os artigos presentes nos quatro volumes da coleção traçam um panorama dos fundamentos, aplicações possíveis de técnicas e diferentes linhas de estudo. Sua riqueza encontra-se também na variedade de autores: os 100 capítulos são assinados por 369 autores, entre pesquisadores de referência nacional e internacional de 78 laboratórios de pesquisa diferentes. Praticamente todos os programas de pós-graduação em Biotecnologia estão presentes na obra, tornando-se assim uma fonte de consulta valiosa para estudantes de graduação, pós-graduação e demais profissionais que desejam conhecer a área.

Mais que apresentar o campo do conhecimento, esta coletânea mostra também resultados, o que é fundamental para demonstrar que os frutos dos investimentos em ciência, tecnologia e inovação, apesar de não serem imediatos, são robustos e sustentáveis. Temos afirmado, de forma insistente, que qualquer país desenvolvido, econômica e socialmente falando, só o é quando tem uma sólida e robusta plataforma não só científica, mas também tecnológica. Exemplos não faltam na Europa, América do Norte e Ásia, com

destaque mais recente para a Coreia do Sul – país de pequenas dimensões e poucos recursos naturais –, que soube investir na educação e em ciência e tecnologia, mudando o patamar de qualidade de vida de sua sociedade.

O Brasil ainda busca seu caminho para se tornar um *player* no cenário científico internacional. Indicadores positivos no que se refere à produção de conhecimento contrastam com indicadores ruins no campo da inovação. O que é certo, porém, é a necessidade de aumentar os investimentos e manter a regularidade dos mesmos nas áreas de educação, ciência, tecnologia e inovação. Afinal, se o século XXI é o século do conhecimento, este insumo será o diferencial na competição entre os países.

Mario Neto Borges
Presidente da Fundação de Amparo à
Pesquisa do Estado de Minas Gerais (Fapemig)

MODELOS UTILIZADOS

ZEBRAFISH COMO MODELO PARA ESTUDOS COMPORTAMENTAIS

Anna Maria Siebel
Carla Denise Bonan
Rosane Souza da Silva

1.1 INTRODUÇÃO

O *zebrafish* é um pequeno peixe teleósteo de água doce originário do sul da Ásia que exhibe grande adaptabilidade para a criação em cativeiro. No Brasil, é comumente utilizado em atividades de aquarismo, tendo como nome comum “paulistinha” ou peixe-zebra. O indivíduo adulto mede de 3 a 4 cm, exhibe dimorfismo sexual marcante, expectativa de vida entre 2 e 4 anos e alta produção de ovos por fêmea (aproximadamente 200 ovos/postura). A fecundação se dá externamente e o embrião se desenvolve de forma rápida em um ovo translúcido. Tais características foram de grande importância para a popularização inicial do *zebrafish* como modelo para estudos científicos, em especial estudos sobre genética, toxicologia e biologia do desenvolvimento. Pode-se classificar em três as grandes vantagens do uso do *zebrafish* na pesquisa, o baixo custo, o rápido desenvolvimento e o repertório de ferramentas desenvolvidas que descrevem atributos importantes da biologia desta espécie.

A embriogênese do *zebrafish* já é bem descrita e definida em sete estágios bem claros: a fase de zigoto, clivagem, blástula, gástrula, segmentação,

farínghula (fase filotípica em que o tubo neural já está formado com as vesículas cefálicas e as respectivas estruturas sensoriais, a musculatura segmentar e as extremidades, tais como nadadeiras estão presentes, o coração está na região ventral do corpo, e os arcos branqueais na região bucal) e eclosão da larva, sendo estas fases compreendidas entre as primeiras 72 horas pós-fertilização (hpf)¹. Ao final da embriogênese, temos uma larva com morfogênese praticamente completa, livre natante e que exibe visíveis movimentos oculares, da mandíbula e nadadeiras (Figura 1.1)¹. A descrição dos estágios pós-embriônicos, ou seja, os estágios larvais e de indivíduo juvenil e adulto, também foi realizada detalhadamente com base em aspectos anatômicos visíveis².

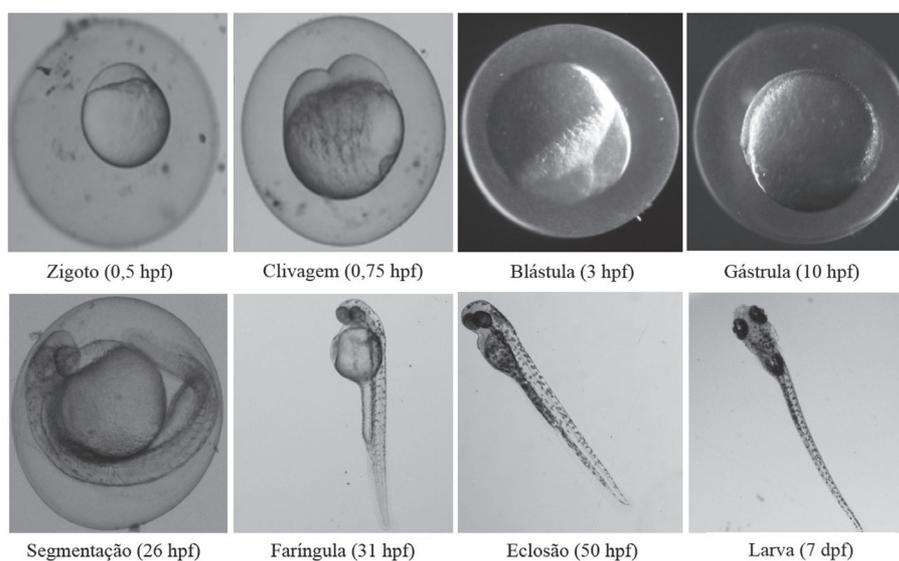


Figura 1.1 Demonstração dos principais estágios do desenvolvimento do *zebrafish* ao longo das primeiras 72 horas pós-fertilização (desenvolvimento embrionário) e ao sétimo dia (larva).

O conhecimento detalhado das fases de desenvolvimento do *zebrafish* é uma ferramenta necessária para diversos estudos que o assumem como um modelo animal complementar ao uso de roedores. Diferenças importantes do desenvolvimento e organização corporal do *zebrafish* em relação aos mamíferos devem ser levadas em consideração, tais como, o fato destes serem ectodérmicos e não exibirem septo cardíaco, pulmões, entre outras estruturas³.

Vantagens emergem do uso do *zebrafish* ao se investigar fases iniciais do desenvolvimento, visto que o conjunto de alterações desenvolvimentais

pode ser visto através do córion e manipulado por estratégias farmacológicas ou de bloqueio gênico⁴ (Figuras 1.1 e 1.17). Um número considerável de ferramentas tem sido desenvolvido para embasar pesquisas relacionadas a processos específicos do desenvolvimento e de patologias nos vertebrados. Ferramentas, tais como mutagênese química e insercional, bloqueio gênico transitório, mutações permanentes e transgêneses têm sido parte do conjunto de ferramentas disponíveis para o uso do *zebrafish* na pesquisa⁴. O estudo do genoma do *zebrafish*, concluído em 2013, instituiu uma das mais importantes ferramentas. Tal estudo demonstrou que 71% dos genes que codificam proteínas no genoma humano são relacionados a genes encontrados no genoma do *zebrafish*, e que destes, 84% dos genes conhecidos por serem associados a doenças humanas possuem um gene relacionado em *zebrafish*⁵ (Figura 1.2) (Tabela 1.1).

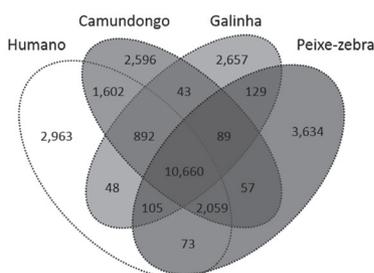


Figura 1.2 Número de genes ortólogos compartilhados entre diferentes espécies. Esquema baseado em Howe et al., 2013.

Tabela 1.1 Comparação das principais características de diferentes modelos animais.

	DROSÓFILA	CAMUNDONGO	ZEBRAFISH
FECUNDAÇÃO	Interna	Interna	Externa
DESENVOLVIMENTO DO EMBRIÃO	Externo	Interno	Externo
EMBRIÃO	Não transparente	Não transparente	Transparente
PRODUÇÃO DE FILHOTES	100 ovos/dia	10 filhotes/2 meses	200 ovos/dia
TEMPO ATÉ IDADE REPRODUTIVA	20 dias	85 dias	60 a 90 dias
MANUTENÇÃO DIÁRIA	-	R\$ 8,00	R\$ 0,60
INVERTEBRADO OU VERTEBRADO	Invertebrado	Vertebrado	Vertebrado

Um repertório de comportamentos é exibido desde fases iniciais do desenvolvimento de larvas até a fase adulta do *zebrafish*, fazendo desta espécie um atrativo para o estudo da função cerebral através da análise comportamental. O *zebrafish* é capaz de apresentar comportamento de escape logo após a eclosão¹, além da atividade locomotora da larva também servir como indício válido de alterações comportamentais. O indivíduo adulto exibe comportamento mais complexo, sendo descritas respostas relacionadas a comportamentos de ansiedade, agressividade, interação social, bem como aprendizado e memória⁶⁻⁹.

Todas estas características desenvolvimentais e ferramentas de pesquisas elaboradas, associadas ao fato de diversos animais poderem ser simultaneamente expostos a drogas a partir da simples solubilização destas na água de moradia dos animais, contribuem para a ascensão do *zebrafish* no cenário da pesquisa científica básica. No decorrer deste capítulo, enfatizaremos o uso do repertório comportamental do *zebrafish* para estudos toxicológicos e farmacológicos.

1.2 USO DO ZEBRAFISH COMO MODELO: ORIGENS E AVANÇOS EM ESTUDOS COMPORTAMENTAIS

O *zebrafish* tornou-se um importante organismo modelo em pesquisas biomédicas graças, principalmente, ao trabalho desenvolvido por George Streisinger no início da década de 1980³. Ele foi um dos principais cientistas a estudar a neurobiologia com uma abordagem genética utilizando organismos-modelo, tais como Sydney Brenner, que conduziu estudos com *Caenorhabditis elegans* e Seymour Benzer com *Drosophila melanogaster*. Na Universidade de Oregon, Streisinger desenvolveu uma série de técnicas que permitiram a identificação de mutações que afetavam o desenvolvimento embrionário em *zebrafish*^{11, 12}.

O potencial do *zebrafish* como modelo genético não passou despercebido por outros pesquisadores que já tinham realizado análises mutacionais em grande escala em *Drosophila*¹³. Em 1993, Christiane Nüsslein-Volhard, que recebeu o prêmio Nobel por seu trabalho em *Drosophila*, iniciou uma triagem de mutações embrionárias padrão em *zebrafish*¹⁴. Da mesma forma, Marc Fishman e Wolfgang Driever começaram a desenvolver esta triagem também nos Estados Unidos¹⁵. Em 2001, houve o início dos estudos de sequenciamento do genoma de *zebrafish* pelo Instituto Sanger. Este estudo foi concluído em 2013, demonstrando que o *zebrafish* possui 26.206 genes,

um número superior ao de qualquer vertebrado já sequenciado, provavelmente resultado do processo de duplicação genômica específica dos teleostes⁵ (Figura 1.2).

Apesar do avançado conhecimento sobre esta espécie como um modelo para estudos nas áreas de genética e biologia do desenvolvimento, a utilização do *zebrafish* para estudos na área de neurociências e neurobiologia do comportamento é mais recente. A caracterização de modelos animais alternativos, que permitam análises moleculares e embriológicas, contribui para um melhor conhecimento dos mecanismos neuroquímicos relacionados a doenças, bem como no desenvolvimento e triagem de novos medicamentos. Atualmente, muitos estudos são realizados nesta espécie para estudar as bases moleculares da neurobiologia, identificando genes envolvidos na formação de circuitos neuronais¹⁶, no comportamento e nos mecanismos envolvidos na neuropatogênese¹⁷ e em doenças neurodegenerativas, como Doença de Parkinson e Doença de Alzheimer¹⁸.

Tal conhecimento tem permitido o desenvolvimento de estudos sobre os diversos parâmetros comportamentais em *zebrafish*. Dentre eles destacam-se os estudos avaliando a memória e o aprendizado, sendo que diferentes tipos de memória e tarefas têm sido estudados nesta espécie, tais como o condicionamento de esquiva ativa^{19,20}, a tarefa de alternância espacial²¹, aprendizado não associativo²², aprendizado associativo²³, discriminação visual²⁴, esquiva inibitória⁸, aprendizado latente²⁵, aprendizado social²⁶ e labirinto em Y⁹.

Ao estabelecer protocolos comportamentais para um novo modelo animal, é fundamental levar em conta a sua dinâmica social natural. Estudos têm demonstrado que a preferência do *zebrafish* em se associar com outros peixes da mesma espécie é inata, mas somente é observado a partir do 30º dia pós-fertilização^{27,28}. Robert Gerlai e colaboradores têm realizado diversos estudos avaliando o comportamento de formação de grupo, conhecido por *shoaling*²⁹. O *zebrafish* apresenta distribuições de polarização de grupos de *zebrafish* diferenciadas, nas quais grupos de peixes podem se organizar como “cardumes” (*shoaling*), que são simplesmente agregados de indivíduos, ou “escolas” (*schooling*), em que os agregados de indivíduos possuem um movimento sincronizado e altamente polarizado²⁹. Além disso, foi demonstrado que os animais ficam mais estressados e apresentam um comportamento variável, quando testados individualmente, uma vez que rompe com as estratégias naturais de formação de grupo nesta espécie³⁰.

Várias medidas de medo e ansiedade têm sido propostas no *zebrafish*. O medo pode ser definido como uma resposta à ameaça iminente, que, no *zebrafish*, tem sido estudada como reações aos predadores e ao feromônio

de alarme. Estas reações se caracterizam como fuga, movimentos erráticos, comportamento de congelamento, permanência na parte inferior do aquário e formação de cardume³¹. Gerlai e colaboradores³² estabeleceram medidas automatizadas de fuga a partir de imagens animadas de predadores. Além disso, a preferência por ambientes claros ou escuros é uma medida de ansiedade, uma vez que os animais adultos preferem um ambiente escuro e evitam a porção clara do aquário³².

Por sua vez, a ansiedade representa uma resposta a futuras ou possíveis ameaças, geralmente se manifestando como comportamento de esquiva³¹. Em *zebrafish*, a altura no aquário pode ser um indicador útil de ansiedade, uma vez que a permanência na parte inferior pode ser considerada um comportamento do tipo ansioso, enquanto uma permanência na parte superior do aquário pode representar um comportamento mais exploratório e de menos ansiedade³³. Outro parâmetro importante para os estudos comportamentais em larvas e animais adultos é a análise da atividade locomotora por exploração de um campo aberto³⁴. Nesta tarefa, é possível avaliar diversos parâmetros como hiperatividade e movimentos erráticos que podem ser indicadores de ansiedade ou alterações no padrão natatório do animal, como será detalhado a seguir.

Portanto, a caracterização do repertório comportamental do *zebrafish* é uma ferramenta importante para a geração de triagens comportamentais em grande escala e para a análise de como compostos químicos e fármacos podem afetar o comportamento desta espécie. Estes testes podem aumentar a compreensão sobre a neurobiologia e o mecanismo de ação de drogas, bem como acelerar o ritmo de descoberta de drogas psiquiátricas.

1.3 PARÂMETROS COMPORTAMENTAIS EM LARVAS

Muitas das alterações fisiológicas do sistema nervoso central (SNC), oriundas de privações sensoriais de origem olfatória e visual, alterações na neurogênese e na concentração de neurotransmissores são correlacionáveis a alterações comportamentais. Desta forma, um bom modelo animal deve ter seu repertório comportamental basal bem detalhado. Para tanto, estudos comportamentais com *zebrafish* devem levar em consideração a ecologia desta espécie, bem como, as características de cada fase do desenvolvimento. Imediatamente após uma larva de *zebrafish* eclodir, ou seja, quatro dias pós-fertilização (dpf), ela exhibe atividade locomotora vigorosa e comportamento predatório¹. Esta pressão evolutiva tem como consequência o rápido

desenvolvimento dos sistemas sensoriais e motores. Este comportamento predatório simples envolve vários processos neurais, incluindo percepção visual, reconhecimento, tomada de decisão e controle motor³⁵. Tais características têm sido amplamente exploradas para o estabelecimento de modelos para o estudo de funções cognitivas subjacentes ao comportamento natural dos vertebrados, bem como, para a avaliação de fármacos e agentes tóxicos com ação neural e caracterização de modelos de patologias.

Parâmetros simples de locomoção de larvas de *zebrafish* são um dos mais comuns indicadores utilizados na literatura científica para contribuir para o estudo do efeito de agentes tóxicos e estabelecimento de modelos^{36,37}. A distância total percorrida, a velocidade média, o ângulo de giro, a frequência de movimento e a duração total de movimento são bons exemplos de parâmetros locomotores comuns que podem ser avaliados em placas de 96 poços, permitindo a avaliação de diferentes drogas em um número amostral considerável por experimento³⁸. Ao se avaliar estes parâmetros, duas características das larvas de *zebrafish* devem ser consideradas, uma é a locomoção intermitente exibida por larvas de peixe, que consiste em movimentos discretos em sequência, os quais são interrompidos por curtos períodos de repouso, caracterizando um nado predatório³⁹. A outra questão a ser considerada é a preferência das larvas de *zebrafish* por ambientes escuros⁴⁰ (Figura 1.3). Tais características inatas foram utilizadas para o aperfeiçoamento de modelos comportamentais em larvas de *zebrafish*, onde a locomoção (distância percorrida e velocidade média) é medida em momentos de alternância de exposição ao ambiente escuro e claro, sendo esperado que ocorra um decréscimo na locomoção na entrada do período claro⁴¹⁻⁴³. A alteração deste padrão normal de resposta à alternância escuro/claro tem sido utilizada para a avaliação de toxicidade e alteração comportamental em respostas a diferentes compostos^{40,41}. Em situações específicas como em crises convulsivas, o aumento da atividade locomotora e de comportamentos estereotipados tipo-convulsão foram acompanhados por registros eletroencefalográficos em larvas de 6 dpf⁴⁴ (Figura 1.4). Neste estudo, as alterações em respostas locomotoras ao pentilenotetrazol (PTZ) assemelharam-se àquelas vistas em roedores. Entretanto, a locomoção parece ser menos discriminativa do que os registros eletroencefalográficos, visto que as respostas a diversos antiepiléticos geraram respostas falso-positivas⁴⁴. Adicionalmente, uma importante informação a ser considerada é relativa ao comportamento de locomoção basal o qual tem sido demonstrado ser diferenciado entre várias linhagens de *zebrafish* (por exemplo, AB, TU, Mik, entre outras)^{41,43}.

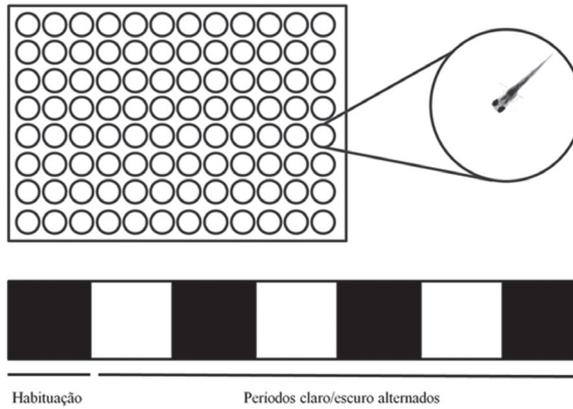


Figura 1.3 Teste de sensibilidade a estímulo visual em larvas de *zebrafish*. As larvas são dispostas de maneira individual em placas de poliestireno transparentes de até 96 poços, que são preenchidos com meio para embriões. Inicialmente, as larvas permanecem em um período de habituação, durante 5 minutos, em ambiente escuro. Após, induz-se o estímulo através da iluminação da placa, seguindo-se com a alternância de períodos claros e escuros. As larvas têm seu comportamento registrado em vídeo durante um período determinado. O vídeo é analisado em *software* contendo ferramentas de rastreamento de locomoção.

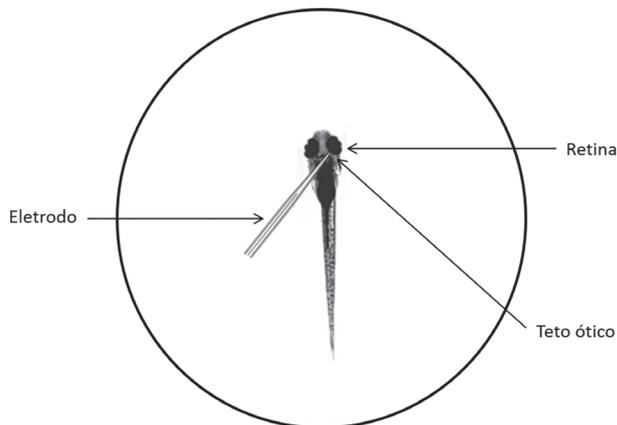


Figura 1.4 Eletroencefalograma em larva de *zebrafish*. A larva é imobilizada em agarose *low melting point*. O eletrodo é posicionado no Teto ótico e então é feito o registro eletroencefalográfico.

A localização das larvas nos poços das placas plásticas também tem sido um parâmetro sugerido por alguns autores como semelhante ao visto em roedores no aparato de campo aberto. Desta forma, larvas de *zebrafish* preferem os cantos (tigmotaxia) dos poços das placas plásticas e esta tem sido

utilizada como uma medida de ansiedade⁴⁵. Considerando as habilidades visuais aguçadas das larvas de *zebrafish*, estudos têm-se utilizado de projeções na tela de computador, sendo possível analisar os parâmetros de velocidade do nado, comportamento de descanso, distância entre larvas e tigmotaxia (tendência dos pequenos organismos a agarrar-se aos objetos com que se põem em contato) tanto no comportamento espontâneo quanto em resposta ao estímulo aversivo projetado⁴⁶. Apesar de o *zebrafish* ser um animal de comportamento de cardume e a medida de aproximação entre animais ser utilizada como um indicador de interação social, este comportamento de cardume surge em animais juvenis, não sendo um parâmetro confiável em larvas⁷.

1.4 PROTOCOLOS COMPORTAMENTAIS EM LARVAS

1.4.1 Locomoção em larvas

Para avaliar a locomoção de larvas de *zebrafish*, estas podem ser colocadas individualmente em placas de poliestireno transparentes de até 96 poços de fundo chato preenchidos com meio para embriões (Figura 1.5). O registro da atividade locomotora deve ser precedido de uma habituação ao poço de, pelo menos, 5 minutos. Para a seleção dos parâmetros adequados devem-se considerar os aspectos abordados anteriormente sobre as características da locomoção larval. A atividade locomotora pode ser registrada de forma basal ou seguida de estímulo, em geral tátil ou visual. O uso de **estímulo visual** pode ser realizado através de mudanças na iluminação, utilizando um sistema de *tracking* (rastreamento) com infravermelho⁴⁷ (Figura 1.3). É possível se utilizar de uma câmara de registro automatizado com controle de temperatura e iluminação. Nesta abordagem, as larvas são habituadas 5 minutos em ambiente escuro seguido de registro da locomoção em, por exemplo, 30 minutos em ambiente iluminado seguidos de quatro períodos de 20 minutos intercalando escuro e iluminação⁴⁴. É interessante definir um limite de pixels ou segundos para considerar um animal imóvel. A atividade pode ser registrada como velocidade (m/s) ou como “movimentos totais”, onde todas as mudanças de pixels de um quadro para outro são somadas. O resultado deve ser *plotado* como, por exemplo, a média das respostas de movimentos totais das larvas dos 100 segundos aos 300 segundos após as luzes serem ligadas e apagadas, a média total do período experimental

e a média da máxima atividade da larva nos primeiros 5 segundos após a luz ser ligada⁴⁴. Para o estímulo tátil podem ser utilizadas ferramentas tais como pincéis, ponteiras e agulhas^{44,48,49}. A resposta pode ser registrada como número de escapes a partir de círculos concêntricos com circunferência de, por exemplo, 2,5 mm e 6,35 mm (os quais podem ser desenhados em papel sob placas de vidro como aparato) seguido de uma sequência de trinta estímulos com intervalos de 5 segundos. Outra forma pode ser por categorização em relação ao controle, como por exemplo, atividade normal, reduzida ou resposta ausente, a qual pode ser realizada em placas de doze poços, as quais tem tamanho suficiente para permitir que as larvas escapem ao estímulo^{44,48,49} (Figura 1.6).

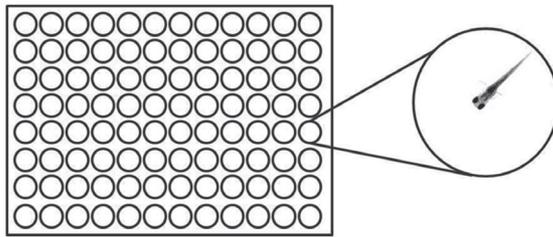


Figura 1.5 Teste de atividade locomotora em larvas de *zebrafish*. As larvas são dispostas de maneira individual em placas de poliestireno transparentes de até 96 poços, que são preenchidos com meio para embriões. As larvas têm seu comportamento registrado em vídeo durante período determinado. O vídeo é analisado em *software* contendo ferramentas de rastreamento de locomoção.

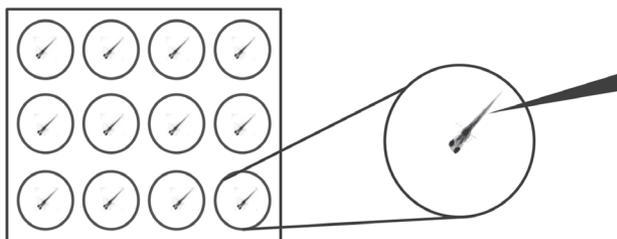


Figura 1.6 Teste de sensibilidade e estímulo tátil em larvas de *zebrafish*. As larvas são dispostas de maneira individual em placas de poliestireno transparentes de 12 poços, que são preenchidos com meio para embriões. As larvas recebem estímulo tátil e tem seu comportamento registrado em vídeo. O parâmetro comportamental analisado é o número de escapes após o estímulo, sendo a resposta classificada como normal, reduzida ou ausente.

1.5 PARÂMETROS COMPORTAMENTAIS EM ADULTOS

Recentemente, o *zebrafish* adulto emergiu como um importante modelo comportamental para estudos toxicológicos, farmacológicos e de diferentes patologias⁵⁰⁻⁵². O SNC do *zebrafish* adulto apresenta menor complexidade em relação aos mamíferos, porém sua organização geral e circuitos neuronais são muito semelhantes⁵³. Além disso, o *zebrafish* apresenta os sistemas motor, sensitivo e endócrino bem desenvolvidos, alta sensibilidade a alterações ambientais e manipulações farmacológicas e um amplo espectro de fenótipos comportamentais conhecidos^{50,53-55}. Diferentes estudos evidenciam a sensibilidade comportamental do *zebrafish* adulto a manipulações farmacológicas, toxicológicas e ambientais^{27,52}. Agentes farmacológicos que interferem na transmissão sináptica e na estabilidade da membrana neuronal mostraram, em *zebrafish*, efeitos semelhantes aos constatados em humanos, indicando a existência de mecanismos de controle neurológicos semelhantes⁵⁶.

O *zebrafish* adulto vem sendo empregado como modelo experimental em estudos de agressividade, comportamento social, medo, aprendizado e memória, entre outros^{8,9,57}. Acompanhando este avanço, diversos protocolos, como esquiva inibitória e labirinto em Y têm sido aprimorados e otimizados para o uso em *zebrafish*^{8,9,25,54} (Figuras 1.7 a 1.14). A agressividade é avaliada quantificando o número de manifestações combativas do animal contra a sua própria imagem refletida em um espelho^{58,59}. A sociabilidade do *zebrafish* é avaliada, entre outros, através de protocolos de *shoaling*, nos quais se avalia o nível de coesão dos animais em cardume⁶⁰. As manifestações de medo podem ser estudadas através da exposição do animal ao seu predador natural²⁵. Parâmetros de aprendizado e memória vêm sendo estudados em aparatos de esquiva inibitória e labirinto em Y desenvolvidos para *zebrafish*^{8,9}.

1.6 PROTOCOLOS COMPORTAMENTAIS EM ADULTOS

1.6.1 Exposição ao predador

Respostas comportamentais associadas ao medo são reações naturais, de adaptação evolutiva e que garantem a sobrevivência do animal³². A resposta apropriada a um estímulo que representa ameaça ou dor permite que animais evitem predadores e outras formas de perigo na natureza³². Respostas

exageradas ou desorientadas a estímulos de medo podem ser derivadas de disfunções em mecanismos neurobiológicos envolvidos em respostas comportamentais que buscam evitar o perigo^{32,61}. Em humanos, condições neuropsiquiátricas associadas ao medo exagerado (distúrbios de ansiedade e fobias) ainda são patologias sem tratamento ideal, uma vez que os mecanismos biológicos envolvidos nestas condições não estão completamente esclarecidos⁶². Sendo assim, a análise experimental deste comportamento natural do *zebrafish* pode fornecer importantes informações e nos ajudar a entender os mecanismos envolvidos em patologias humanas e no efeito de fármacos⁶³. Os parâmetros avaliados em protocolos de exposição de *zebrafish* ao predador são: distância do *zebrafish* em relação ao seu predador, posição do animal no aquário (fundo ou superfície) e atividade natatória. As respostas comportamentais consideradas indicadores de medo são: afastamento do predador, permanência no fundo do aquário, *freezing* e movimentos erráticos²⁵ (Figura 1.7).

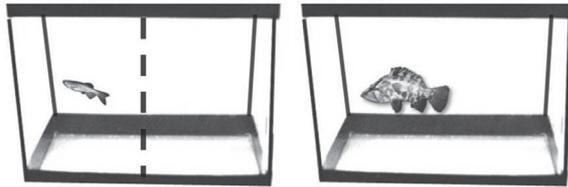


Figura 1.7 Teste de exposição do *zebrafish* adulto ao seu predador natural. O *zebrafish* é colocado individualmente em um aquário, em contato visual com o seu predador (colocado no aquário ao lado), e tem seu comportamento registrado em vídeo durante período determinado. O vídeo é analisado em *software* contendo ferramentas de rastreamento de locomoção. São avaliadas a posição do peixe no seu aquário (fundo ou superfície), distância do *zebrafish* em relação ao seu predador e atividade natatória do *zebrafish*.

O método inicialmente utilizado para induzir respostas associadas ao medo em *zebrafish* envolvia o uso de feromônio de alarme⁶⁴. Na natureza, os peixes liberam feromônios de alarme através da pele quando estão feridos, indicando a presença de perigo aos outros animais do cardume⁶⁵. A maior dificuldade para o uso de feromônios naturais em protocolos de pesquisa é que essa substância é obtida através de sua extração da pele do animal, não sendo possível determinar sua concentração²⁵. Parra e colaboradores estabeleceram o uso de uma substância sintética, a 3 (N)-óxido de hipoxantina, que tem estrutura química semelhante aos feromônios de alarme naturais⁶⁶. Os animais mostraram resposta aversiva quando expostos à substância,

porém, neste caso, não foi possível a ativação e desativação repentina do estímulo aversivo⁶⁶.

Verificou-se então a possibilidade do uso de estímulos visuais. Diferentes experimentos mostraram que a presença de um predador, mesmo sem contato direto através da água, provocava respostas comportamentais características de medo em *zebrafish*⁶⁷. O uso da exposição visual ao predador apresenta vantagens em relação ao uso de substâncias de alarme adicionadas à água, principalmente o maior controle de início, término e duração da exposição²⁵. Bass e colaboradores avaliaram a resposta comportamental do *zebrafish* a diferentes fontes visuais: predador simpátrico (que habitam a mesma região geográfica), predador alopátrico (predador de origem geográfica diferente da espécie em estudo) e peixe de espécie inofensiva. O predador simpátrico do *zebrafish*, *Nandus nandus*, também induziu respostas comportamentais características de medo⁶⁷.

O uso do predador natural de *zebrafish* em protocolos de indução de medo apresenta uma dificuldade importante: o animal predador pode variar seu comportamento entre os diferentes experimentos. O fato de o predador poder estar nadando constantemente em um experimento e completamente parado em outro pode gerar variações de resultado²⁵. Por isso, buscou-se o uso de uma fonte visual constante. Assim, alguns estudos têm utilizado imagens animadas do predador refletidas no aquário para simular sua presença^{32,63}. Imagens animadas do predador *Nandus nandus* induziram as mesmas respostas comportamentais verificadas quando os animais foram expostos às substâncias de alarme ou ao predador⁶³. Assim, concluiu-se que o estímulo aversivo visual, ou seja, apenas a visão do predador é suficiente para induzir resposta comportamental característica de medo^{63,67}.

1.6.2 Shoaling

A preferência por viver em grupos é um comportamento inato do *zebrafish*⁶⁰. Esse comportamento aumenta as chances de sobrevivência dos animais, aumentando a detecção de predadores e diminuindo as chances de captura, facilitando a obtenção de alimento e aumentando as chances de reprodução⁶⁸. O termo “*shoal*” refere-se a cardume: grupo de peixes que permanecem juntos para interação social. Alguns autores diferenciam “*shoal*” de “*school*”, que se refere a cardumes nos quais os peixes se movimentam em uma mesma direção e de maneira coordenada²⁹.

A avaliação da interação social em humanos e modelos animais é um protocolo importante para estudos de comportamento. A diminuição na interação social pode representar desordens comportamentais, como autismo⁶⁹ e esquizofrenia⁷⁰. O protocolo de *shoaling* é utilizado com frequência em estudos com *zebrafish* e envolve a avaliação da distância entre os animais, polarização do cardume (sincronismo de nado) e isolamento de animais (indivíduos que permanecem distantes do grupo)⁷¹ (Figura 1.8). Estas avaliações podem ser feitas de maneira manual, através do registro de imagens, análise das mesmas por observadores treinados e dimensionamento das distâncias entre os indivíduos do cardume ou pelo uso de *softwares* que reconhecem cada animal do cardume e acompanham e registram seu comportamento⁷¹.

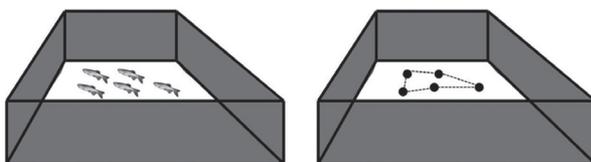


Figura 1.8 Teste de *shoaling* em *zebrafish* adulto. Cinco animais são colocados em um aquário e têm seu comportamento registrado. A distância entre os animais é analisada e considerada parâmetro de *shoaling*.

A análise destes parâmetros permite estudos complexos de doenças comportamentais, estresse e modulação farmacológica em *zebrafish*⁶⁰. Miller e colaboradores analisaram o efeito de drogas de abuso no comportamento social de *zebrafish*. A exposição ao álcool comprometeu drasticamente a polarização do cardume, ou seja, prejudicou a sincronia do nado em grupo, além de diminuir brevemente a sua coesão. Já a exposição dos animais à nicotina teve efeito leve na sincronia do nado em grupo, porém diminuiu bruscamente a coesão do cardume⁷¹.

1.6.3 Agressividade

Protocolos de agressividade em *zebrafish* visam avaliar a resposta comportamental do animal à sua própria imagem refletida em um espelho. A aproximação do *zebrafish* à imagem refletida, acompanhada de postura combativa, indica que o animal tem comportamento agressivo⁵⁸ (Figura 1.9).

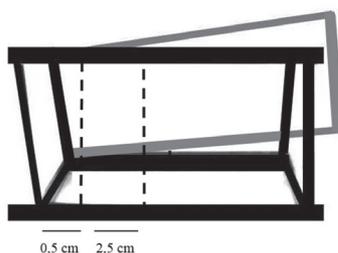


Figura 1.9 Teste de agressividade em *zebrafish* adulto. O *zebrafish* é colocado individualmente em um aquário. Um espelho é colocado ao fundo do aquário em um ângulo de $22,5^\circ$, de maneira que somente uma das bordas do espelho permaneça em contato com o aquário. A imagem do próprio animal é refletida no espelho, parecendo maior quando o animal se posiciona próximo à borda que toca o aquário. O posicionamento dos animais no aquário e sua postura corporal são avaliados como parâmetros de agressividade.

Neste protocolo, o *zebrafish* é colocado individualmente em um pequeno aquário (30 cm de comprimento, 15 cm de altura e 10 cm de largura). Um espelho é colocado em um dos lados do aquário, com inclinação de $22,5^\circ$ em relação à parede. O espelho é colocado de maneira que sua borda vertical esquerda encoste-se à lateral do aquário enquanto a borda vertical direita fique longe da lateral. Assim, quando o peixe nadar para o lado esquerdo do aquário, sua imagem vai parecer muito próxima a ele. Neste tipo de experimento, os animais têm seu comportamento registrado em vídeo durante 60 segundos (após 30 segundos de habituação) e novamente por 60 segundos, após 10 minutos de habituação⁵⁸. Durante a análise do vídeo, o aquário é dividido por linhas verticais em quadrante esquerdo (o quadrante do espelho, com 3 cm de comprimento) e quadrantes direito (o restante do aquário). O quadrante do espelho é subdividido em área de contato ao espelho (área de 0,5 cm junto ao espelho) e zona de aproximação (área de 2,5 cm após a área de contato). A entrada dos animais na porção esquerda do aquário indica busca por aproximação ao “oponente”, enquanto a entrada na porção direita do aquário indica que o animal está evitando a aproximação. O tempo que o animal despende em cada segmento é registrado e analisado. Além disso, é registrado o tempo em que o animal permanece com aparência agressiva, que é definida como postura corporal na qual o *zebrafish* mantém suas nadadeiras eretas. Esta postura frequentemente está associada como movimentação corporal ondulatória e pequenas batidas com a nadadeira caudal. O comportamento agressivo também é marcado por episódios de nado rápido e em direção ao “oponente”, além de tentativas de “morder” o espelho⁵⁸.

Gerlai e colaboradores avaliaram respostas de agressividade em *zebrafish* verificando sua modulação pela exposição ao álcool. Animais que foram

tratados com álcool a 0,25% demonstraram tendência à aproximação ao “oponente”, mostrando-se agressivos, já os animais que não receberam álcool evitaram a aproximação, e os animais que receberam álcool a 1% nadaram aleatoriamente, desconsiderando o “oponente”⁵⁸.

1.6.4 Interação social

Quando o *zebrafish* é exposto à imagem do seu predador, a resposta comportamental envolve manifestações de medo. Quando um único *zebrafish* é exposto a sua imagem refletida em um espelho, os parâmetros comportamentais refletem manifestações relacionadas à agressividade do animal⁵⁸. De maneira distinta aos protocolos anteriores, a exposição do *zebrafish* a um cardume de peixes de sua espécie reflete manifestações comportamentais relacionadas às preferências sociais do animal⁵⁸.

O protocolo de interação social proposto por Gerlai e colaboradores prevê a exposição concomitante do *zebrafish* a um aquário vazio e a um aquário estímulo (contendo um grupo de peixes), com o objetivo de avaliar a preferência dos animais, que têm a opção de aproximar-se ao aquário vazio ou ao aquário estímulo⁵⁸ (Figura 1.10). O aparato consiste em um pequeno aquário, de 30 cm de comprimento, 10 cm de largura e 15 cm de altura. O uso de aquários de medidas já padronizadas é importante para que não ocorra a influência do tamanho dos aquários na resposta apresentada pelo *zebrafish*. Aquários muito pequenos, por exemplo, poderiam induzir a aproximação dos animais ao aquário estímulo. Em um lado é colocado um aquário vazio e, ao outro lado, um aquário contendo quinze *zebrafish*. Um grupo de cinco *zebrafish* é colocado no aquário central e seu comportamento é registrado em vídeo. Espera-se 30 segundos para a aclimação do animal ao aparato e, então, realiza-se a análise durante 10 segundos⁵⁸.

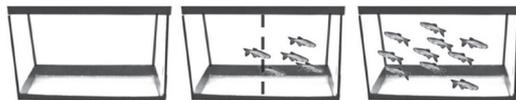


Figura 1.10 Teste de interação social em *zebrafish* adulto. Um grupo de 5 *zebrafish* é colocado em um aquário central (aquário-teste). Em um lado do aquário-teste é colocado um aquário contendo um grupo de 15 *zebrafish* (aquário-estímulo). No outro lado, é colocado um aquário vazio. O comportamento social do grupo de animais em teste é avaliado conforme sua proximidade com o aquário-estímulo.

Na análise do vídeo, o aquário central, que contém os animais que estão sendo testados, é dividido ao meio. O tempo de permanência dos animais em

cada quadrante é analisado. A maior permanência no quadrante ao lado do aquário estímulo indica maior interação social. Já a maior permanência ao lado do aquário vazio indica menor interação⁵⁸. A entrada ou permanência no quadrante próximo ao aquário estímulo é considerada somente quando ocorre a presença de dois ou mais animais. A presença de somente um animal é desconsiderada⁵⁸. Quanto maior a permanência dos animais na porção do aparato próxima ao aquário estímulo, maior é o índice de interação social⁵⁸.

Em teste de interação social em *zebrafish*, Seibt e colaboradores verificaram que animais tratados com MK-801 (utilizado para induzir sintomas de esquizofrenia em modelos animais) apresentaram uma diminuição na interação social, efeito que foi revertido pelo tratamento com antipsicóticos atípicos (sulpirida e olanzapina)⁷².

1.6.5 Labirinto em Y

O protocolo de labirinto em Y para *zebrafish* foi estabelecido por Cognato e colaboradores e é utilizado para estudos de aquisição e consolidação de memória em *zebrafish* adulto. Para o estabelecimento do protocolo, verificou-se primeiramente o comportamento exploratório do *zebrafish*, confirmando a tendência dos animais em explorar ambientes novos⁹.

O aparato labirinto em Y para *zebrafish* consiste em um aquário de vidro, com três braços de tamanhos iguais (25 cm de comprimento, 8 cm de largura e 15 cm de altura). Cognato e colaboradores estabeleceram as medidas do aparato baseadas no tamanho corporal do *zebrafish*, de maneira a não tornar muito longas as distâncias a serem percorridas e a não induzir a entrada do *zebrafish* em algum braço do aparato⁹. As paredes do aparato são pretas (para impedir influências visuais do ambiente externo), enquanto o fundo do mesmo é branco (para garantir o contraste entre o peixe e o aparato, permitindo a análise através do *software* Any-Maze). As pistas visuais consistem em figuras geométricas brancas (quadrado, triângulo e círculo) dispostas na parede de cada braço⁹.

Este protocolo consiste em sessões de treino e teste, as quais os animais são submetidos individualmente. Na sessão de treino, um dos braços do aparato permanece fechado, impedindo a entrada do animal nesta parte do aquário. Nesta sessão, o *zebrafish* é simplesmente colocado no aparato, onde permanece durante 5 minutos nadando livremente pelos dois braços abertos. Após um intervalo de 1 a 6 horas (conforme o objetivo do estudo), o animal é submetido ao teste. Nesta sessão, todos os braços do aparato estão abertos. O número de entradas e o tempo despendido em cada braço são registrados, assim como

parâmetros de atividade natatória (tempo imóvel, distância percorrida, entre outros). O número de entradas e o tempo despendido no braço novo indica o índice de exploração do ambiente novo, sendo o parâmetro indicador de resposta à novidade e à memória espacial⁹ (Figura 1.11).

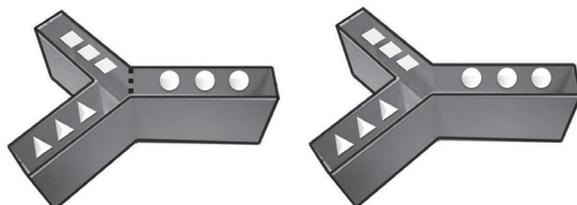


Figura 1.11 Teste de labirinto em Y para *zebrafish* adulto. O aparato consiste em um aquário com 3 braços de tamanhos iguais. Na sessão de treino, um dos braços permanece fechado, permitindo que o animal nade somente nos dois braços restantes. Na sessão de teste, a barreira que isola um dos braços é retirada, introduzindo um “novo” braço ao aparato.

Os experimentos com labirinto em Y em *zebrafish* mostraram que, durante os testes, os animais despenderam mais tempo no compartimento novo do aparato, mostrando aquisição e consolidação de memória. Além disso, os parâmetros de memória foram sensíveis à manipulação farmacológica. A aquisição da memória foi prejudicada pelos tratamentos com o antagonista NMDA, MK-801, e o antagonista colinérgico, escopolamina. Já a consolidação da memória foi prejudicada pelos antagonistas de receptores NMDA, MK-801⁹.

1.6.6 Esquiva inibitória

Para o estabelecimento do protocolo de esquiva inibitória, verificou-se primeiramente a capacidade do *zebrafish* adulto distinguir compartimentos claro e escuro. Após, confirmou-se a preferência do *zebrafish* pelo ambiente escuro, no qual o animal despende maior período durante seu comportamento natural. O protocolo de esquiva inibitória em *zebrafish* foi estabelecido por Blank e colaboradores e mostrou-se eficiente para estudos de memória em *zebrafish* adulto. A memória adquirida pelo *zebrafish* após a sessão de teste deste protocolo é evidente, duradoura e sensível ao antagonista de receptores NMDA, MK-801, mostrando que este protocolo pode ser eficiente em estudos farmacológicos, toxicológicos e que visam analisar mecanismos envolvidos em doenças neuronais⁸.

O aparato de esquiva inibitória para *zebrafish* consiste em um pequeno tanque dividido ao meio em dois compartimentos, claro e escuro, por uma

barreira divisória. O lado definido como claro tem as paredes laterais, fundo e seu lado da divisória revestido por adesivos brancos. O lado definido como escuro recebe o mesmo revestimento, porém na cor preta. O nível da água no aparato é mantido em 3 cm para permitir que os peixes explorem o ambiente. O compartimento escuro contém dois eletrodos ligados a uma fonte de 8 V, que geram um choque de $3 \pm 0,2$ V⁸ (Figura 1.12).

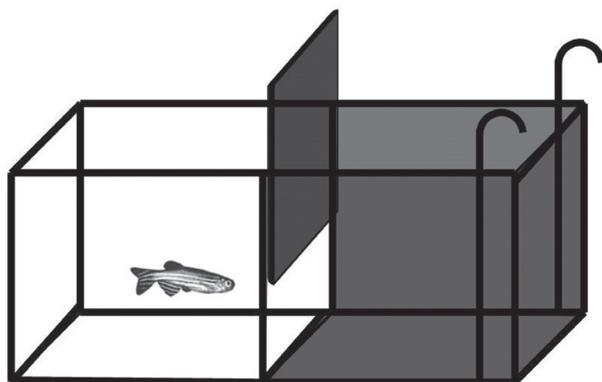


Figura 1.12 Aparato de esquiva inibitória para *zebrafish* adulto. O aquário é dividido em 2 compartimentos, claro e escuro, por uma barreira divisória. O compartimento escuro contém 2 eletrodos ligados a uma fonte de 8V, que geram um choque de $\pm 0,2$ V. A barreira divisória pode ser elevada, permitindo que o animal transite do compartimento claro para o escuro.

Este protocolo consiste em sessões de treino e teste, aos quais os animais são submetidos individualmente. Nas duas sessões, o *zebrafish* é colocado no compartimento claro enquanto a barreira divisória está fechada. Após 1 minuto de familiarização ao ambiente, a divisória é elevada em 1 centímetro, permitindo que o animal nade até o compartimento escuro (pelo qual tem preferência). Na sessão de treino, assim que o animal passa completamente para o lado escuro do aparato, ele recebe um choque durante 5 segundos. Após este treino, o *zebrafish* é removido do aparato e colocado em seu aquário de moradia. A sessão de teste ocorre 24 horas após o treino, quando são realizados os mesmos procedimentos, porém sem a indução de choque. O animal é novamente colocado no compartimento claro onde permanece em um período de familiarização de 1 minuto. Então a barreira divisória é aberta e o tempo em que o animal demora a passar para o lado escuro é contabilizado. O tempo que o animal demora a passar do lado claro, onde foi colocado, para o lado escuro, após a abertura da barreira, é cronometrado nas sessões de treino e teste. A latência para passagem do animal para o lado escuro na sessão de teste é utilizada como índice de retenção de memória⁸.

Em modelo de esquizofrenia induzido por MK-801 em *zebrafish*, Zala e colaboradores mostraram através de protocolo de esquivas inibitória que o tratamento com MK-801 induziu déficit de memória em *zebrafish*, efeito que foi totalmente revertido pela administração aguda de antipsicóticos atípicos (sulpirida e olanzapina)⁷².

1.6.7 Spinning Task

O *Spinning Task* é um protocolo estabelecido por Blazina e colaboradores e tem o objetivo de analisar a coordenação motora e resistência em *zebrafish*. Este protocolo consiste na manutenção do *zebrafish* em um aparato circular contendo água em movimento. Blazina e colaboradores verificaram que o *zebrafish* adulto tem como comportamento natural o nado constante contra a corrente⁷³.

O aparato de *spinning task* consiste em um aquário redondo de 1 litro disposto sobre um agitador magnético que, quando ligado provoca a movimentação circular da água. Esse aparato é coberto por uma estrutura de revestimento preto, para impedir interferências visuais externas no comportamento do animal⁷³ (Figura 1.13).



Figura 1.13 Teste de *Spinning Task* para *zebrafish* adulto. Neste teste, o animal é mantido em um aparato circular contendo água em movimento. O movimento da água é produzido por agitador magnético. O aparato é coberto por uma estrutura de revestimento preto.

Para a realização do experimento, os animais são colocados individualmente no aparato e tem sua atividade natatória registrada em vídeo durante 3 minutos. Blazina e colaboradores avaliaram os efeitos de diferentes drogas que apresentam efeito na coordenação motora em humanos. Os animais tratados com

etanol, clonazepam, ácido valproico e haloperidol tiveram declínio no tempo de nado contra a corrente, mostrando menor coordenação e resistência⁷³.

1.7 TESTE DE CAMPO ABERTO

O campo aberto é um teste frequentemente utilizado em análises de comportamento animal em pesquisa básica. Em estudos com *zebrafish*, este teste consiste basicamente em colocar o animal em um aquário simples, de cor uniforme, sem divisórias ou estímulos e analisar o seu comportamento durante um intervalo de tempo⁵¹. Neste experimento, o *zebrafish* pode nadar livremente em um aquário enquanto tem sua atividade natatória registrada em um vídeo, para análise posterior. O vídeo registrado é analisado através de *softwares* contendo ferramentas de rastreamento de locomoção, como Any-Maze, ViewPoint, TopScan e Ethovision⁵⁴. O tempo de teste pode variar de poucos minutos a horas, conforme o objetivo do estudo^{51,54}.

Em análises de comportamento de *zebrafish* em campo aberto são considerados diferentes parâmetros: distância percorrida, velocidade média, permanência no fundo ou topo do aquário, movimentos erráticos e *freezing* (corpo completamente imóvel), entre outros. O comportamento natural do *zebrafish* em campo aberto é caracterizado por atividade natatória constante, de maneira a explorar o aquário como um todo (Figura 1.14). O comportamento tigmotáxico (exploração do ambiente através das vibrissas) é frequente, despendendo de 60% a 75% do tempo em testes de 10 minutos. No primeiro minuto, os animais costumam permanecer 70% a 85% do tempo no fundo do aquário, preferência que é reduzida com o passar do tempo e não mais identificada ao décimo minuto. Manifestações de *freezing*, saltos e movimentos erráticos são pouco observadas em condições naturais do *zebrafish*. Normalmente, observa-se *freezing* em 3 a 5% do tempo, poucos episódios de movimentos erráticos e nenhum salto⁷⁴.

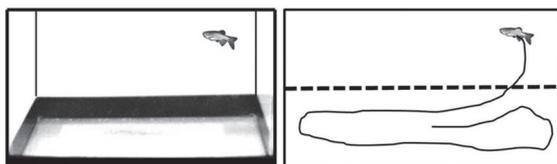


Figura 1.14 Teste de campo aberto para *zebrafish* adulto. O *zebrafish* é colocado em um aquário simples, de cor uniforme, sem divisória ou estímulos e tem seu comportamento registrado em vídeo. Durante a análise, o aquário é dividido ao meio em duas áreas, topo e fundo, para a análise da posição do animal na coluna de água.

O teste de campo aberto é utilizado principalmente quando se tem o objetivo de analisar manifestações comportamentais de ansiedade e estresse e também o efeito de fármacos⁷⁴. Atividade exploratória diminuída, aumento da permanência no fundo do aquário e ocorrência de movimentos erráticos com maior frequência são indicadores de ansiedade ou estresse, induzidos por diferentes fatores^{33,54,74}. Estas manifestações comportamentais são sensíveis a diferentes fármacos. O tratamento do zebrafish com fármacos ansiolíticos, como benzodiazepínicos, levou ao aumento da atividade exploratória⁵⁴. Além disso, animais tratados com tranilcipromina e fluoxetina despenderam mais tempo no topo do aquário e diminuíram sua atividade locomotora, efeito característico do aumento da sinalização serotoninérgica⁵².

1.8 POSSIBILIDADES TERAPÊUTICAS

As diversas vantagens do uso do *zebrafish* descritas neste capítulo o levam a ser uma ferramenta atrativa para a triagem de drogas e os ensaios pré-clínicos, em especial em tempos de limitação do uso animal para situações como estas, as quais o uso animal é absolutamente necessário. Um grande número de tecnologias é disponível para o uso do *zebrafish* em fases pré-clínicas, tais como a disponibilidade de bibliotecas de mutantes, *knockouts* temporários, mapa físico e genético e a sequência genômica^{4,5}. Triagens genéticas em *zebrafish* são muito atrativas, visto que conseguem de forma sistemática identificar o papel de determinado gene em determinadas patologias. Milhares de diferentes mutantes de *zebrafish* têm sido identificados, sendo centenas destes clonados e utilizados em sua maioria para o estudo durante as fases de desenvolvimento, permanecendo em muitos casos incipiente as informações sobre o papel de tais genes em situações patológicas⁷⁵. Para gerar mutantes, é frequente o uso de etilnitrosourea (ENU), o qual induz mutações pontuais em machos de *zebrafish*. Como o *zebrafish* é relativamente resistente à toxicidade da ENU, sua utilização leva a altas taxas de mutagênese *locus* específica quando comparada a outros vertebrados⁵⁶. Como exemplos de triagem genética relacionada a patologias utilizando *zebrafish*, pode-se citar a identificação de genes relacionados às doenças policísticas renais, doenças do metabolismo lipídico, doenças relacionadas à regeneração tecidual, doenças cardíacas, anemias, câncer, distrofia muscular, porfirias, entre outras^{4,56}.

Enquanto estratégias de descoberta de drogas baseadas no direcionamento específico ao alvo podem não necessariamente modificar o curso da

patologia, aquelas estratégias baseadas na descoberta de drogas que modificam o fenótipo da patologia sem se preocupar em um primeiro momento no alvo específico parecem bastante promissoras. Considerando a transparência dos embriões de *zebrafish*, a descrição fenotípica procedente das manipulações genéticas ou mediadas por drogas pode ser visualizada por simples observação sob microscópio, além de poder ser melhor caracterizada com o auxílio de tecnologias de marcação de proteínas por fluorescência de forma órgão/tecido-específica. Outras características deste modelo que são importantes para a abordagem fenotípica é a possibilidade de uma exposição do organismo completo utilizando uma quantidade total de drogas consideravelmente menor do que aquela que seria necessária para a mesma abordagem utilizando mamíferos.

A associação de *zebrafish* mutantes com a abordagem fenotípica para o descobrimento de drogas pode ser ilustrada pela descoberta de dois compostos, GS4012 e GS3999, os quais influenciam a vasculogênese ou angiogênese. Tais compostos recuperam defeitos aórticos em vez de promover vascularização colateral em um mutante de *zebrafish* que apresenta defeitos vasculares, chamado fenótipo *Gridlock*⁷⁶.

Os morfolinós (MO), os quais são derivados sintéticos do DNA, são as principais ferramentas de *knockdown* da função de genes utilizadas em *zebrafish*. Isso se deve ao fato de que MO possuem baixo risco de alvos errôneos, facilidade de utilização e estabilidade em sistemas biológicos⁷⁷. A eficiência dos MO é alta até 50 hpf (horas pós-fertilização) e, por este motivo, o papel individual de muitos genes no processo de desenvolvimento foram determinados por esta técnica utilizando *zebrafish* como modelo animal^{4,77}. A redução sistemática da função de genes de forma específica parece ser uma estratégia interessante ao se avaliar características fenotípicas de determinada patologia que podem ser retardadas ou prevenidas pela supressão temporária dos genes suprimidos⁴.

Em se tratando da análise toxicológica *per se*, existe a necessidade de validar o modelo do *zebrafish* para o uso de compostos cujos efeitos já são conhecidos em roedores. Para tanto, Ali e colaboradores⁷⁸ analisaram o feito de uma gama de sessenta compostos sobre a sobrevivência de embriões de *zebrafish* e determinaram as concentrações letais para tais compostos, além de compará-las àquelas encontradas em roedores. Tal estudo confirma o alto grau de predição dos ensaios toxicológicos utilizando embriões de *zebrafish* com relação àqueles efeitos conhecidos em roedores.

Considerando o ponto de vista terapêutico, o *zebrafish* não poderá substituir aquelas terapias dependentes de intervenções cirúrgicas ou remodelagens

teciduals. Entretanto, a possibilidade de se avaliar a toxicidade e o potencial terapêutico de determinadas drogas em larga escala é a vantagem mais promissora do uso do *zebrafish*.

1.9 MODELOS FARMACOLÓGICOS DE DOENÇAS QUE ALTERAM O COMPORTAMENTO

1.9.1 Doença de Parkinson

Regiões específicas do cérebro do *zebrafish* podem ser relacionadas e, muitas vezes, são bastante conservadas quando comparadas com regiões cerebrais de humanos. Por exemplo, sugere-se que o telencéfalo ventral de *zebrafish* pode ser uma região homóloga ao estriado em mamíferos. O sistema dopaminérgico foi caracterizado e neurônios dopaminérgicos são encontrados principalmente no bulbo olfatório, região pré-ótica, retina e diencéfalo ventral⁷⁹. Vários genes ortólogos associados à Doença de Parkinson foram encontrados no *zebrafish*, incluindo *Parkin*, *pink1*, *dj-1*, e *LRRK2*. A utilização de técnicas de MO e/ou superexpressão destes genes sugere que eles conservem funções importantes no desenvolvimento e sobrevivência de neurônios dopaminérgicos¹⁸.

A maioria dos casos de Doença de Parkinson são formas esporádicas, o que pode sugerir um papel para fatores ambientais ou interações gene-ambiente mais complexas. Estudos epidemiológicos sugerem que a exposição a agentes ambientais, como inseticidas, herbicidas, raticidas, fungicidas e fumigantes pode também aumentar o risco de desenvolvimento da Doença de Parkinson⁸⁰. Algumas destas toxinas, geralmente inseticidas, piscicidas e pesticidas, como 6-hidroxi-dopamina (6-OHDA), rotenona, paraquat ou 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina (MPTP) são conhecidas na área científica por induzirem a perda de neurônios dopaminérgicos^{81,82}, criando modelos animais que são capazes de mimetizar as manifestações clínicas da Doença de Parkinson, como bradicinesia (lentidão anormal dos movimentos), rigidez e tremor de repouso⁸³. O MPTP pode interromper o complexo I da cadeia transportadora de elétrons em mitocôndrias, o que acabará por resultar em morte celular. No adulto, o MPTP induziu uma passageira diminuição nos níveis de dopamina, assim como alterações comportamentais⁸². Estudos em larvas de *zebrafish* mostraram uma significativa redução dos neurônios dopaminérgicos no diencéfalo ventral após tratamento com MPTP⁸⁴.

Anichtchik e colaboradores testaram MPTP ou 6-OHDA em *zebrafish* adulto. Injeções sistêmicas destas toxinas não alteraram o número de neurônios dopaminérgicos, mas houve diminuição das concentrações cerebrais de dopamina e noradrenalina. Os autores também relataram diminuição da velocidade do nado e diminuição da distância percorrida após administração destas toxinas⁸². Bretaud e colaboradores⁸¹ observaram alterações no nado após administração de rotenona e paraquat em *zebrafish* em idade larval e adulta. Além disso, dois estudos demonstraram a diminuição dos neurônios dopaminérgicos em embriões de *zebrafish* tratados com MPTP e o efeito protetor de dois fármacos (L-deprenil e selegilina) usados no tratamento da Doença de Parkinson^{84,85}.

1.9.2 Epilepsia (crises convulsivas)

O *zebrafish* também tem se mostrado um eficiente modelo experimental para o estudo da epilepsia e fármacos antiepilépticos. Neste modelo, crises convulsivas, que caracterizam a epilepsia, são induzidas pela exposição do *zebrafish* a agentes convulsivantes e apresentam aspectos característicos de crises convulsivas em humanos: descargas neuronais excessivas e alterações comportamentais progressivas, tanto em larvas quanto em animais adultos⁸⁶⁻⁸⁸. Além disso, larvas e animais adultos apresentam resposta a fármacos antiepilépticos^{44,89,90}.

Devido a sua habilidade de provocar crises convulsivas generalizadas, comportamentalmente evidentes e bem caracterizadas em diferentes espécies, o antagonista gabaérgico PTZ (Pentilenetetrazol) tem sido o principal agente convulsivante utilizado para indução de crise convulsiva em *zebrafish*⁹¹. No modelo de indução de crise convulsiva através da absorção de PTZ adicionado à água, os níveis deste convulsivante no encéfalo do *zebrafish* dependem da concentração e tempo de exposição do animal à droga, perfil similar ao verificado em modelos de injeção de PTZ em roedores⁸⁸.

A avaliação de crises convulsivas em *zebrafish* é realizada através da análise de diferentes parâmetros, comportamentais e fisiológicos. Parâmetros comportamentais envolvem a análise da atividade locomotora dos animais e a observação da ocorrência, frequência, duração e latência para o início de diferentes manifestações comportamentais características de crises convulsivas^{86,88}. A análise por eletroencefalograma (EEG) confirma a ocorrência de crise convulsiva no modelo experimental, conforme a evidência de manifestação das fases interictal, ictal e pós-ictal^{44,86,87}. Além disso, as análises

podem ser complementadas pela avaliação da expressão gênica de *c-fos* (marcador de atividade neuronal) e teste de níveis de cortisol (marcador de resposta endócrina)^{86,92}.

Baraban e colaboradores estabeleceram o modelo de crise convulsiva em larvas de *zebrafish*, identificando parâmetros comportamentais, eletroencefalográficos e de expressão gênica. Larvas de *zebrafish* expostas ao agente convulsivante PTZ apresentaram alterações comportamentais progressivas caracterizadas pela ocorrência de três estágios claramente distintos: estágio 1 (aumento da atividade natatória), estágio 2 (nado rápido e em círculos) e estágio 3 (convulsão clônica, perda de postura e permanência imóvel durante 1 a 3 segundos). A análise por EEG mostrou padrões eletroencefalográficos correspondentes às fases interictal (descargas neuronais breves e de baixa amplitude), ictal (descargas neuronais de grande amplitude e longa duração) e pós-ictal (atividade neuronal reduzida) da crise convulsiva. Além disso, a exposição ao PTZ elevou a expressão do gene *c-fos* em larvas de *zebrafish*⁸⁶.

O estudo de fármacos antiepiléticos utilizando larvas de *zebrafish* tem se mostrado extremamente eficiente devido a sua capacidade de absorção de compostos adicionados à água dispensar o uso de tratamentos invasivos, além da possibilidade de serem mantidas em pequenos volumes de água, o que permite maior economia de drogas. Essas características nos permitem realizar estudos *in vivo* em um grande número de animais, bem como em diferentes linhagens de *zebrafish*, o que torna este teleósteo uma atraente ferramenta para o estudo em grande escala de fármacos antiepiléticos^{89,93}. Berghmans e colaboradores mostraram que durante a exposição de larvas de *zebrafish* ao PTZ há um aumento da atividade locomotora evidenciado pelo aumento da distância percorrida pelos animais. Porém, animais tratados com fármacos antiepiléticos clássicos, como carbamazepina, gabapentina e fenitoína, antes da exposição ao PTZ, não tiveram alterações em sua atividade natatória quando comparados aos animais controle⁸⁹. Baraban e colaboradores também evidenciaram a resposta do *zebrafish* aos fármacos antiepiléticos. A adição de fármacos antiepiléticos clássicos ao meio contendo PTZ apresentou efeito neuroprotetor. Animais que foram tratados com ácido valpróico, fenitoína e diazepam, por exemplo, tiveram menor incidência de descargas neuronais quando comparados aos animais que foram expostos ao PTZ sem tratamento farmacológico⁸⁶. Afrikanova e colaboradores realizaram protocolo semelhante com drogas antiepiléticas, porém avaliando a resposta eletroencefalográfica dos animais durante a exposição ao PTZ. Este estudo confirmou a menor atividade locomotora dos animais pré-tratados com fármacos e menor incidência de descargas neuronais, porém estas

respostas não foram correspondentes em todos os tratamentos. Estes resultados confirmam a resposta das larvas de *zebrafish* a fármacos antiepilépticos, porém alertam para o uso do parâmetro “distância percorrida” como medida de crise convulsiva em *zebrafish*⁴⁴.

O estudo de crises convulsivas em *zebrafish* adulto segue protocolos semelhantes aos utilizados em larvas. A análise de manifestações comportamentais características de crises convulsivas é comumente realizada conforme protocolo proposto por Baraban e colaboradores para larvas de *zebrafish*, uma vez que os estágios mais robustos da crise convulsiva são semelhantes em animais adultos e larvas⁸⁶. Um estudo recente propôs a caracterização das crises convulsivas conforme a ocorrência de 6 estágios distintos. Animais adultos expostos ao PTZ apresentaram aumento da atividade natatória e movimentos operculares acelerados (estágio 1), nado explosivo, com movimentos erráticos (estágio 2), movimentos circulares (estágio 3), manifestações clônicas (estágio 4), queda para o lado e rigidez corporal (estágio 5) e morte do animal (estágio 6)⁸⁸.

Exames de eletroencefalograma em *zebrafish* adultos expostos ao PTZ mostraram a ocorrência de atividade neuronal característica de crises convulsivas em humanos e semelhante ao verificado em larvas de *zebrafish*. Foi possível identificar a ocorrência das fases basal, pré-convulsiva, convulsiva e pós-convulsiva através do eletroencefalograma⁸⁷.

Quando expostos ao PTZ, animais pré-tratados com gabapentina, fenitoína e ácido valproico demoraram mais tempo para atingir cada um dos três estágios característicos de crises convulsivas (conforme protocolo proposto por Baraban e colaboradores) quando comparados aos animais que não receberam pré-tratamento, o que mostra que *zebrafish* adultos também apresentam resposta aos fármacos antiepilépticos. Este resultado mostra que o pré-tratamento com fármacos antiepilépticos atrasa o desenvolvimento de crises convulsivas⁹⁰. Em animais adultos, o pré-tratamento com ácido valproico teve efeito anticonvulsivante e preveniu déficits cognitivos causados pela exposição ao PTZ⁹⁴. Mussulini e colaboradores mostraram diminuição na severidade das crises convulsivas e também na mortalidade dos animais pré-tratados com diazepam em comparação a animais que foram diretamente expostos ao PTZ⁸⁸.

Além da exposição ao PTZ, outros modelos farmacológicos de indução de crise convulsiva têm sido utilizados em *zebrafish*, como exposição do animal ao ácido cáinico (agonista do receptor de cainato), cafeína e picrotoxina (bloqueador dos canais de cloro ativados pelo ácido gama-aminobutírico, GABA). Animais adultos tratados com ácido cáinico apresentaram crises

convulsivas evidentes, que foram inibidas pelo pré-tratamento com antagonistas glutamatérgicos⁹⁵. O tratamento de *zebrafish* adultos com cafeína e icrotoxina provocou episódios de hiperatividade, espasmos musculares e manifestações comportamentais características do estágio tônico-clônico de crises convulsivas⁹².

1.10 PSICOFÁRMACOS

Embora modelos animais como *zebrafish* não sejam capazes de mimetizar plenamente todos os aspectos de um distúrbio cerebral complexo, seus atributos tornam os paradigmas experimentais aquáticos uma ferramenta valiosa na pesquisa psicofarmacológica. Portanto, isto torna os modelos de *zebrafish* particularmente adequados para a descoberta de fármacos e triagem de psicofármacos.

Recentemente, Rihel e colaboradores⁹⁶ avaliaram o efeito de 3.968 compostos sobre a atividade locomotora em larvas de *zebrafish*, encontrando características comportamentais específicas para muitas classes de psicotrópicos.

Estudos avaliando as respostas comportamentais em *zebrafish* já foram realizados com um grande número de fármacos psicoativos. Os efeitos de vários compostos alucinógenos, incluindo LSD (ácido lisérgico), a mescalina, MDMA (3,4-metilenodioximetanfetamina), PCP (fenciclidina), MK-801, ketamina, a ibogaína, salvinatorina A, atropina e escopolamina já foram avaliados em *zebrafish* adulto⁹⁷⁻¹⁰⁰.

Ansiolíticos (são drogas, sintéticas ou não, usadas para diminuir a ansiedade e a tensão), como clonazepam, bromazepam e diazepam, são capazes de, significativamente, reduzir a coesão dos cardumes de *zebrafish*. Buspirona aumenta a exploração nas porções superiores do aquário e, assim como ocorre com os benzodiazepínicos (grupo de fármacos ansiolíticos utilizados como sedativos, hipnóticos, relaxantes musculares, para amnésia anterógrada e atividade anticonvulsivante), é capaz de aumentar o tempo no ambiente claro¹⁰¹. Diazepam, fluoxetina e cafeína também foram capazes de modular o comportamento relacionado à ansiedade em larvas de *zebrafish*⁴⁶. Entretanto, o clordiazepóxido, um fármaco benzodiazepínico ansiolítico, que atua como um agonista eficaz nos receptores GABA-A, não produziu efeitos ansiolíticos em *zebrafish*¹⁰². Antidepressivos, tais como citalopram, a reboxetina e bupropiona demonstraram efeito anticonvulsivante contra crises induzidas por PTZ¹⁰³.

Antipsicóticos, como flufenazina e haloperidol (ambos capazes de induzir graves efeitos extrapiramidais em seres humanos) induziram defeitos de movimento em larvas de *zebrafish*. Entretanto, a olanzapina, que produz poucos efeitos extrapiramidais em humanos, induziu poucos defeitos de movimento em *zebrafish*¹⁰⁴. Antipsicóticos atípicos, como sulpirida e olanzapina são capazes de melhorar o déficit cognitivo induzido por MK-801, um antagonista de receptores NMDA, que provoca uma síndrome comportamental similar à esquizofrenia, caracterizada por hiperlocomoção e movimentos estereotipados. O mesmo foi observado com relação à tarefa de interação social, onde antipsicóticos atípicos reverteram o déficit induzido por MK-801, ao passo que o haloperidol, um antipsicótico típico (9 μ M), foi ineficaz na reversão destes déficits⁷². Sulpirida, olanzapina e haloperidol também foram capazes de reverter a hiperlocomoção induzida por MK-801¹⁰⁰.

Anfetamina (5 e 10 mg/L) provoca um aumento das monoaminas cerebrais e evoca efeitos ansiogênicos em *zebrafish* de forma aguda, mas não após sete dias do tratamento. Entretanto, reserpina, que promove depleção de monoaminas por bloquear o transportador vesicular de monoaminas, não provocou efeitos comportamentais agudos evidentes, mas teve atividade motora marcadamente reduzida após sete dias, assemelhando-se ao prejuízo motor observado na depressão e/ou doença de Parkinson¹⁰⁵.

Portanto, a identificação dos efeitos comportamentais induzidos por diferentes classes de substâncias psicoativas em larvas de *zebrafish* e em animais adultos pode contribuir para o processo de desenvolvimento de novos fármacos, para a elucidação de mecanismos de ação e também como um modelo para avaliar neurotoxicidade.

1.11 VIAS DE ADMINISTRAÇÃO DE FÁRMACOS

Um passo determinante do uso do *zebrafish* na pesquisa científica básica é a ainda incipiente caracterização da absorção, distribuição, metabolismo e excreção de fármacos. Tal desafio é extremamente importante para respaldar as diferentes vias de administração de fármacos já estabelecidas para o modelo.

Para os fármacos solúveis em água, a simples dissolução ou diluição na água de moradia dos animais é largamente utilizada e, somente não deve ser utilizada caso interfira nas condições ideais para a sobrevivência sadia dos animais, tais como a possibilidade de interferir na oxigenação, no pH, na condutividade, no conteúdo de espécies nitrogenadas e na proliferação de microrganismos indesejáveis¹⁰⁶. A absorção de fármacos do meio aquoso por larvas de

zebrafish é altamente dependente do pH, gerando a necessidade de certificação se o fármaco em questão está adequadamente tamponado. Apesar de ser a forma mais prática de administração, a diluição/dissolução direta de fármacos implica na absorção branquial e oral, as quais podem reduzir drasticamente a concentração do fármaco em questão. Isto se torna ainda mais relevante quando consideramos a exposição na fase embrionária em virtude da presença do córion. Desta forma, estratégias de determinação da concentração nos líquidos corporais ou intraovo podem ser necessárias. A exposição de ovos de *zebrafish* de 24 hpf durante 2h ao etanol promoveu uma concentração dentro do ovo de cerca de 1/25 a 1/30 da concentração de etanol externa empregada. Em outro estudo, Hagedorn e colaboradores¹⁰⁷ registraram absorção de água semelhante na blastoderme e no vitelo de *zebrafish* exposto ao DMSO (dime-tilsulfóxido, 2M), mas diferenças significativas quanto a permeabilidade de solutos, demonstrando que a permeabilidade da membrana coriônica é mais seletiva que a de membranas celulares típicas.

As injeções intraperitoneais, intramusculares e intraencefálicas evitam os problemas acima citados, mas certamente exibem outros cuidados para assegurar o bem-estar animal. Dentre estes cuidados, está a esterilização e preparo dos equipamentos para imobilização, anestesia e injeção antes da retirada dos animais dos aquários, bem como a agilidade no procedimento a fim de manter o peixe o mínimo de tempo fora da água. Antes da injeção, os peixes devem ser anestesiados (por exemplo, com 0,15 mg/mL triclaína) e o tempo total fora da água deve ser de cerca de 10 segundos¹⁰⁸. Phelps e colaboradores¹⁰⁸ descreveram protocolos detalhados de injeções, os quais são descritos aqui. Injeções intraperitoneais podem ser realizadas com o auxílio de uma pinça hemostática com sua extremidade preensora envolvida por uma gaze umedecida com água esterilizada para imobilização do animal já anestesiado. O peixe deve ser imobilizado com a cabeça voltada para a dobradiça da pinça e o abdômen para cima. As barbatanas peitorais devem ser usadas como um ponto de referência do limite do abdômen. A agulha é mantida paralela à coluna vertebral e é inserida na linha média do abdômen posteriormente às barbatanas peitorais. A agulha deve ser inserida no abdômen um pouco além do bisel da agulha IP (Figura 1.15). Para as injeções intramusculares, os mesmos procedimentos são utilizados considerando, porém, que a ponta da agulha deve ser direcionada à cabeça, posicionada num ângulo de 45° em relação à parte traseira do peixe. A injeção deve ser na maior extensão do músculo dorsal, imediatamente anterior e lateral à barbatana dorsal. Muito frequentemente o volume utilizado para injeção para animais adultos é de 10 µL. Para injeções intraencefálicas, o crânio de *zebrafish* adulto é perfurado seguindo coordenadas as quais podem

ser encontradas em um atlas digital tridimensional do encéfalo de *zebrafish*¹⁰⁹. Após esta operação, o peixe deve passar por uma recuperação em água em condições padrão e a injeção realizada através da perfuração com um micro-manipulador e uma agulha capilar de vidro, ligado a um micro injetor. É indicado administrar quantidades tais como 0,5 μ L de solução contendo corante Evans Blue como marcador de localização¹⁰⁹. Apesar do tamanho diminuto a injeção intracerebroventricular tem sido empregada em encéfalo de larvas de *zebrafish* a partir de 18 hpf, como é possível consultar no *Journal of Visualized Experiments* (Figura 1.16)¹¹⁰.



Figura 1.15 Injeção intraperitoneal em *zebrafish* adulto. O peixe é immobilizado em esponja umedecida. As barbatanas peitorais são usadas como um ponto de referência do limite do abdômen. A agulha é mantida paralela à coluna vertebral e é inserida na linha média do abdômen posteriormente às barbatanas peitorais.

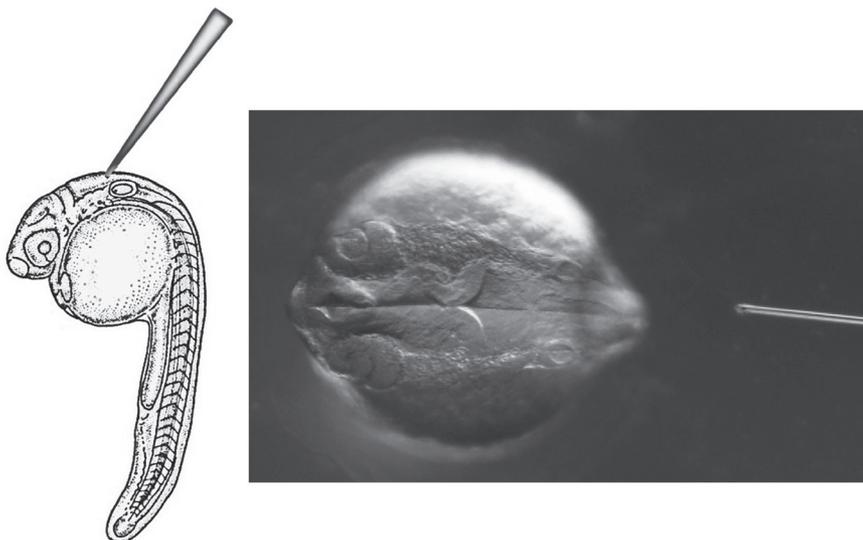


Figura 1.16 Injeção intracerebroventricular em larva *zebrafish*. A larva é immobilizada em agarose, de maneira a expor a estrutura ventricular. Sob estereomicroscópio, a microinjeção é feita no ventrículo da larva.

Injeções intraovo têm sido empregadas para a administração de MO. Sob estereomicroscópio, a microinjeção é feita nos estágios iniciais de desenvolvimento de uma célula a quatro células (até 1 hora pós fertilização) para garantir a distribuição do MO uniforme entre as células. O volume a ser injetado deve ser considerado com cuidado, como por exemplo, no caso do uso da microinjeção de MO, no qual o volume pode ser tão pequeno quanto 30 nL. Para que a pressão da microinjeção não desloque os ovos, deve-se apoiá-los em uma fileira na borda de uma lâmina de microscópio dentro de uma placa de Petri ou em trilhas feitas em solução de agarose a 1%. Deve-se evitar a desidratação dos ovos umedecendo-os com água de manutenção de embriões (Figura 1.17).

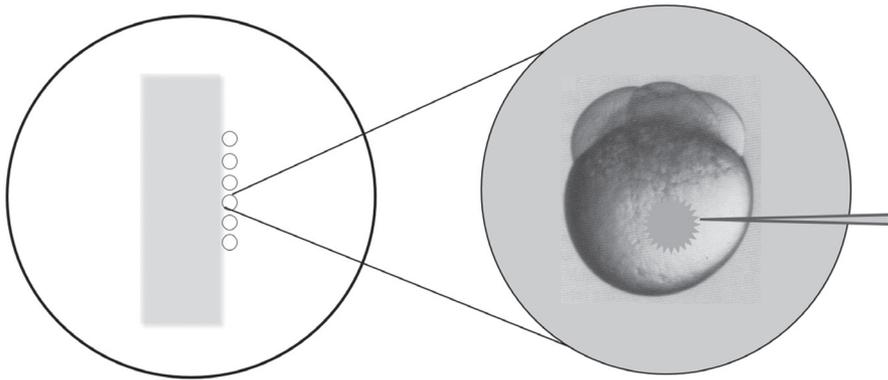


Figura 1.17 Injeção no vitelo de *zebrafish*. Os embriões são alinhados na lateral de uma lâmina histológica e permanecem umedecidos durante todo o experimento. A microinjeção é feita sob estereomicroscópio nos estágios iniciais do desenvolvimento (de uma célula a quatro células) para garantir a distribuição uniforme do Morfolino entre as células.

O uso de gavagem (método de introdução de alimentos líquidos no estômago através de um tubo de polivinil colocado pelo nariz ou boca) e microgavagem em *zebrafish* já foi descrito. Para *zebrafish* adulto (6 meses de vida) o processo de gavagem é realizado em animais anestesiados e o volume introduzido no trato gastrointestinal da droga em questão deve ser de 5 μ L através de um cateter de tubo flexível implantado em agulha. O tubo flexível deve ser introduzido na cavidade oral do animal até que a ponta do tubo flexível passe pelas brânquias (aproximadamente 1 cm), como demonstrado por Collymore e colaboradores¹¹¹. A microgavagem, utilizada para introduzir substâncias via trato gastrointestinal de larvas de *zebrafish*, é realizada com o auxílio de microinjetores e estereomicroscópio. As larvas devem ser imobilizadas, por exemplo, em nitrocelulose e o processo de

microgavagem realizado de forma rápida como demonstrado por Cocchiaro e colaboradores¹¹².

1.12 PERSPECTIVAS FUTURAS

O quebra-cabeça do entendimento das funções neurais que controlam os aspectos comportamentais em *zebrafish* tem recebido contribuições a partir de diversas abordagens. O término do projeto de sequenciamento do genoma do zebrafish tem acelerado aqueles projetos relativos à clonagem e produção de novos mutantes. Entretanto, muitos esforços ainda são necessários para a caracterização de algumas regiões, os quais estão sendo realizados e podem ser acompanhados pela página de internet do *Genome Reference Consortium* (<http://genomereference.org>). Desafios no campo específico da análise comportamental têm recebido atenção, como pode ser visto pelos recentes estudos sobre metodologias de identificação individual em *zebrafish*¹¹³. A marcação individual do *zebrafish*, através da injeção subcutânea de um corante permite a identificação do animal sem alterar as características sociais do cardume. A duração da identificação ultrapassa 30 dias, o que parece ser uma ótima ferramenta para estudos de longa duração sobre o comportamento.

Além disso, a utilização deste modelo para estudos pré-clínicos tem se constituído em uma importante alternativa para avaliação de efeitos tóxicos de fármacos em larga escala e em um curto período de tempo. Portanto, esta espécie cada vez mais desperta o interesse da comunidade científica pela ampla gama de abordagens celulares, moleculares e farmacológicas que podem ser usadas para identificar efeitos de fármacos e elucidar os mecanismos de doenças humanas.

1.13 CONCLUSÕES

O uso do *zebrafish* vem crescendo expressivamente devido às diversas vantagens deste modelo, tais como as elevadas taxas de reprodução, custo baixo, rápido desenvolvimento e ao repertório de abordagens e ferramentas disponíveis que caracterizam atributos importantes da biologia desta espécie. Além disso, os significativos avanços obtidos na área de neurociências reforçam os benefícios que o *zebrafish* oferece como modelo. A identificação de parâmetros comportamentais em diferentes fases do desenvolvimento e

das respostas a fármacos clássicos utilizados na terapia de doenças neurológicas reforçam a ideia de que o *zebrafish* é um modelo bastante útil para a realização de triagens de fármacos em larga escala antes da validação farmacológica em modelos de roedores. Além disso, a possibilidade de testar os compostos por diferentes vias de administração ou em fases iniciais do desenvolvimento do peixe permite a avaliação de parâmetros morfológicos, comportamentais e neuroquímicos, o que também pode ser promissor para ensaios toxicológicos.

REFERÊNCIAS

1. Kimmel CB, Ballard WW, Kimmel SR, Ullmann B, Schilling TF. Stages of embryonic development of the zebrafish. *Dev Dyn.* 1995;203(3):253-310.
2. Parichy DM, Elizondo MR, Mills MG, Gordon TN, Engeszer RE. Normal table of postembryonic zebrafish development: staging by externally visible anatomy of the living fish. *Dev Dyn.* 2009;238(12):2975-3015.
3. Grunwald DJ, Eisen JS. Headwaters of the zebrafish - emergence of a new model vertebrate. *Nat Rev Genet.* 2002;3(9):717-24.
4. Zon LI, Peterson RT. In vivo drug discovery in the zebrafish. *Nat Rev Drug Discov.* 2005;4(1):35-44.
5. Howe K, Clark MD, Torroja CF, Torrance J, Berthelot C, Muffato M, et al. The zebrafish reference genome sequence and its relationship to the human genome. *Nature.* 2013;496(7446):498-503.
6. Gerlai R. Zebrafish: an uncharted behavior genetic model. *Behav Genet.* 2003;33(5):461-8.
7. Buske C, Gerlai R. Maturation of shoaling behavior is accompanied by changes in the dopaminergic and serotonergic systems in zebrafish. *Dev Psychobiol.* 2012;54(1):28-35.
8. Blank M, Guerim LD, Cordeiro RF, Vianna MR. A one-trial inhibitory avoidance task to zebrafish: rapid acquisition of an NMDA-dependent long-term memory. *Neurobiol Learn Mem.* 2009;92(4):529-34.
9. Cognato GeP, Bortolotto JW, Blazina AR, Christoff RR, Lara DR, Vianna MR, et al. Y-Maze memory task in zebrafish the role of glutamatergic and cholinergic systems on the acquisition and consolidation periods. *Neurobiol Learn Mem.* 2012;98(4):321-8.
10. Streisinger G, Walker C, Dower N, Knauber D, Singer F. Production of clones of homozygous diploid zebra fish (*Brachydanio rerio*). *Nature.* 1981;291(5813):293-6.
11. Felsenfeld AL, Walker C, Westerfield M, Kimmel C, Streisinger G. Mutations affecting skeletal muscle myofibril structure in the zebrafish. *Development.* 1990;108(3):443-59.

12. Grunwald DJ, Kimmel CB, Westerfield M, Walker C, Streisinger G. A neural degeneration mutation that spares primary neurons in the zebrafish. *Dev Biol.* 1988;126(1):115-28.
13. Nüsslein Volhard C, Wieschaus E. Mutations affecting segment number and polarity in *Drosophila*. *Nature.* 1980;287(5785):795-801.
14. Mullins MC, Nüsslein-Volhard C. Mutational approaches to studying embryonic pattern formation in the zebrafish. *Curr Opin Genet Dev.* 1993;3(4):648-54.
15. Fishman MC, Stainier DY. Cardiovascular development. Prospects for a genetic approach. *Circ Res.* 1994;74(5):757-63.
16. Schier AF. Genetics of neural development in zebrafish. *Curr Opin Neurobiol.* 1997;7(1):119-26.
17. Guo S. Linking genes to brain, behavior and neurological diseases: what can we learn from zebrafish? *Genes Brain Behav.* 2004;3(2):63-74.
18. Xi Y, Noble S, Ekker M. Modeling neurodegeneration in zebrafish. *Curr Neurol Neurosci Rep.* 2011;11(3):274-82.
19. Pradel G, Schachner M, Schmidt R. Inhibition of memory consolidation by antibodies against cell adhesion molecules after active avoidance conditioning in zebrafish. *J Neurobiol.* 1999;39(2):197-206.
20. Pradel G, Schmidt R, Schachner M. Involvement of L1.1 in memory consolidation after active avoidance conditioning in zebrafish. *J Neurobiol.* 2000; 43(4):389-403.
21. Williams FE, White D, Messer WS. A simple spatial alternation task for assessing memory function in zebrafish. *Behav Processes.* 2002;58(3):125-32.
22. Best JD, Berghmans S, Hunt JJ, Clarke SC, Fleming A, Goldsmith P, et al. Non-associative learning in larval zebrafish. *Neuropsychopharmacology.* 2008;33(5):1206-15.
23. Gerlai R. Associative learning in zebrafish (*Danio rerio*). *Methods Cell Biol.* 2011;101:249-70.
24. Colwill RM, Raymond MP, Ferreira L, Escudero H. Visual discrimination learning in zebrafish (*Danio rerio*). *Behav Processes.* 2005;70(1):19-31.
25. Gómez-Laplaza LM, Gerlai R. Latent learning in zebrafish (*Danio rerio*). *Behav Brain Res.* 2010;208(2):509-15.
26. Zala SM, Määttänen I. Social learning of an associative foraging task in zebrafish. *Naturwissenschaften.* 2013;100(5):469-72.
27. Spence R, Gerlach G, Lawrence C, Smith C. The behaviour and ecology of the zebrafish, *Danio rerio*. *Biol Rev Camb Philos Soc.* 2008;83(1):13-34.
28. Mahabir S, Chatterjee D, Buske C, Gerlai R. Maturation of shoaling in two zebrafish strains: a behavioral and neurochemical analysis. *Behav Brain Res.* 2013;247:1-8.
29. Miller NY, Gerlai R. Shoaling in zebrafish: what we don't know. *Rev Neurosci.* 2011;22(1):17-25.

30. Pagnussat N, Piato AL, Schaefer IC, Blank M, Tamborski AR, Guerim LD, et al. One for all and all for one: the importance of shoaling on behavioral and stress responses in zebrafish. *Zebrafish*. 2013;10(3):338-42.
31. Craske MG, Rauch SL, Ursano R, Prenoveau J, Pine DS, Zinbarg RE. What is an anxiety disorder? *Depress Anxiety*. 2009;26(12):1066-85.
32. Gerlai R, Fernandes Y, Pereira T. Zebrafish responds to the animated image of a predator towards the development of an automated aversive task. *Behav Brain Res*. 2009;201(2):318-24.
33. Levin ED, Bencan Z, Cerutti DT. Anxiolytic effects of nicotine in zebrafish. *Physiol Behav*. 2007;90(1):54-8.
34. Saint-Amant L, Drapeau P. Time course of the development of motor behaviors in the zebrafish embryo. *J Neurobiol*. 1998;37(4):622-32.
35. Muto A, Kawakami K. Prey capture in zebrafish larvae serves as a model to study cognitive functions. *Front Neural Circuits*. 2013;7:110.
36. Bichara D, Calcaterra NB, Arranz S, Armas P, Simonetta SH. Set-up of an infrared fast behavioral assay using zebrafish (*Danio rerio*) larvae, and its application in compound biotoxicity screening. *J Appl Toxicol*. 2013.
37. Xue JY, Li X, Sun MZ, Wang YP, Wu M, Zhang CY, et al. An Assessment of the Impact of SiO₂ Nanoparticles of Different Sizes on the Rest/Wake Behavior and the Developmental Profile of Zebrafish Larvae. *Small*. 2013;9(18):3161-8.
38. Selderslaghs IW, Hooyberghs J, Blust R, Witters HE. Assessment of the developmental neurotoxicity of compounds by measuring locomotor activity in zebrafish embryos and larvae. *Neurotoxicol Teratol*. 2013;37:44-56.
39. Trivedi CA, Bollmann JH. Visually driven chaining of elementary swim patterns into a goal-directed motor sequence a virtual reality study of zebrafish prey capture. *Front Neural Circuits*. 2013;7:86.
40. Ramcharitar J, Ibrahim RM. Ethanol modifies zebrafish responses to abrupt changes in light intensity. *J Clin Neurosci*. 2013;20(3):476-7.
41. de Esch C, van der Linde H, Slieker R, Willemsen R, Wolterbeek A, Woutersen R, et al. Locomotor activity assay in zebrafish larvae: influence of age, strain and ethanol. *Neurotoxicol Teratol*. 2012;34(4):425-33.
42. Ellis LD, Soanes KH. A larval zebrafish model of bipolar disorder as a screening platform for neuro-therapeutics. *Behav Brain Res*. 2012;233(2):450-7.
43. Vignet C, Bégout ML, Péan S, Lyphout L, Leguay D, Cousin X. Systematic screening of behavioral responses in two zebrafish strains. *Zebrafish*. 2013;10(3):365-75.
44. Afrikanova T, Serruys AS, Buenafe OE, Clinckers R, Smolders I, de Witte PA, et al. Validation of the zebrafish pentylentetrazol seizure model: locomotor versus electrographic responses to antiepileptic drugs. *PLoS One*. 2013;8(1):e54166.

45. Richendrfer H, Créton R. Automated high-throughput behavioral analyses in zebrafish larvae. *J Vis Exp*. 2013(77):e50622.
46. Richendrfer H, Pelkowski SD, Colwill RM, Creton R. On the edge: pharmacological evidence for anxiety-related behavior in zebrafish larvae. *Behav Brain Res*. 2012;228(1):99-106.
47. Emran F, Rihel J, Dowling JE. A behavioral assay to measure responsiveness of zebrafish to changes in light intensities. *J Vis Exp*. 2008(20).
48. Capiotti KM, Menezes FP, Nazario LR, Pohlmann JB, de Oliveira GM, Fazenda L, et al. Early exposure to caffeine affects gene expression of adenosine receptors, DARPP-32 and BDNF without affecting sensibility and morphology of developing zebrafish (*Danio rerio*). *Neurotoxicol Teratol*. 2011;33(6):680-5.
49. Chen YH, Huang YH, Wen CC, Wang YH, Chen WL, Chen LC, et al. Movement disorder and neuromuscular change in zebrafish embryos after exposure to caffeine. *Neurotoxicol Teratol*. 2008;30(5):440-7.
50. Egan RJ, Bergner CL, Hart PC, Cachat JM, Canavello PR, Elegante MF, et al. Understanding behavioral and physiological phenotypes of stress and anxiety in zebrafish. *Behav Brain Res*. 2009;205(1):38-44.
51. Rosemberg DB, Rico EP, Mussulini BH, Piato AL, Calcagnotto ME, Bonan CD, et al. Differences in spatio-temporal behavior of zebrafish in the open tank paradigm after a short-period confinement into dark and bright environments. *PLoS One*. 2011;6(5):e19397.
52. Stewart AM, Cachat J, Gaikwad S, Robinson KS, Gebhardt M, Kalueff AV. Perspectives on experimental models of serotonin syndrome in zebrafish. *Neurochem Int*. 2013;62(6):893-902.
53. Sager JJ, Bai Q, Burton EA. Transgenic zebrafish models of neurodegenerative diseases. *Brain Struct Funct*. 2010;214(2-3):285-302.
54. Cachat J, Stewart A, Grossman L, Gaikwad S, Kadri F, Chung KM, et al. Measuring behavioral and endocrine responses to novelty stress in adult zebrafish. *Nat Protoc*. 2010;5(11):1786-99.
55. Burne T, Scott E, van Swinderen B, Hilliard M, Reinhard J, Claudianos C, et al. Big ideas for small brains: what can psychiatry learn from worms, flies, bees and fish? *Mol Psychiatry*. 2011;16(1):7-16.
56. Lieschke GJ, Currie PD. Animal models of human disease: zebrafish swim into view. *Nat Rev Genet*. 2007;8(5):353-67.
57. Sison M, Gerlai R. Associative learning performance is impaired in zebrafish (*Danio rerio*) by the NMDA-R antagonist MK-801. *Neurobiol Learn Mem*. 2011;96(2):230-7.
58. Gerlai R, Lahav M, Guo S, Rosenthal A. Drinks like a fish: zebra fish (*Danio rerio*) as a behavior genetic model to study alcohol effects. *Pharmacol Biochem Behav*. 2000;67(4):773-82.

59. Ariyomo TO, Carter M, Watt PJ. Heritability of boldness and aggressiveness in the zebrafish. *Behav Genet.* 2013;43(2):161-7.
60. Buske C, Gerlai R. Shoaling develops with age in Zebrafish (*Danio rerio*). *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry.* 2011;35(6):1409-15.
61. Blanchard DC, Griebel G, Blanchard RJ. The Mouse Defense Test Battery: pharmacological and behavioral assays for anxiety and panic. *Eur J Pharmacol.* 2003;463(1-3):97-116.
62. Mathew SJ, Price RB, Charney DS. Recent advances in the neurobiology of anxiety disorders: implications for novel therapeutics. *Am J Med Genet C Semin Med Genet.* 2008;148C(2):89-98.
63. Ahmed O, Seguin D, Gerlai R. An automated predator avoidance task in zebrafish. *Behav Brain Res.* 2011;216(1):166-71.
64. Pfeiffer W. Alarm substances. *Experientia.* 1963;19:113-23.
65. Pfeiffer W. The distribution of fright reaction and alarm substance cells in fishes. *Copeia* 1977:653-65.
66. Parra KV, Adrian JC, Gerlai R. The synthetic substance hypoxanthine 3-N-oxide elicits alarm reactions in zebrafish (*Danio rerio*). *Behav Brain Res.* 2009;205(2):336-41.
67. Bass SL, Gerlai R. Zebrafish (*Danio rerio*) responds differentially to stimulus fish: the effects of sympatric and allopatric predators and harmless fish. *Behav Brain Res.* 2008;186(1):107-17.
68. Peichel CL. Social behavior: how do fish find their shoal mate? *Curr Biol.* 2004;14(13):R503-4.
69. Veness C, Prior M, Bavin E, Eadie P, Cini E, Reilly S. Early indicators of autism spectrum disorders at 12 and 24 months of age: a prospective, longitudinal comparative study. *Autism.* 2012;16(2):163-77.
70. Figueira ML, Brissos S. Measuring psychosocial outcomes in schizophrenia patients. *Curr Opin Psychiatry.* 2011;24(2):91-9.
71. Miller N, Greene K, Dydinski A, Gerlai R. Effects of nicotine and alcohol on zebrafish (*Danio rerio*) shoaling. *Behav Brain Res.* 2013;240:192-6.
72. Seibt KJ, Piato AL, da Luz Oliveira R, Capiotti KM, Vianna MR, Bonan CD. Antipsychotic drugs reverse MK-801-induced cognitive and social interaction deficits in zebrafish (*Danio rerio*). *Behav Brain Res.* 2011;224(1):135-9.
73. Blazina AR, Vianna MR, Lara DR. The Spinning Task: A New Protocol to Easily Assess Motor Coordination and Resistance in Zebrafish. *Zebrafish.* 2013.
74. Cachat J, Stewart A, Utterback E, Hart P, Gaikwad S, Wong K, et al. Three-dimensional neurophenotyping of adult zebrafish behavior. *PLoS One.* 2011;6(3):e17597.
75. Amsterdam A, Nissen RM, Sun Z, Swindell EC, Farrington S, Hopkins N. Identification of 315 genes essential for early zebrafish development. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2004;101(35):12792-7.

76. Peterson RT, Fishman MC. Discovery and use of small molecules for probing biological processes in zebrafish. *Methods Cell Biol.* 2004;76:569-91.
77. Summerton JE. Morpholino, siRNA, and S-DNA compared: impact of structure and mechanism of action on off-target effects and sequence specificity. *Curr Top Med Chem.* 2007;7(7):651-60.
78. Ali S, van Mil HG, Richardson MK. Large-scale assessment of the zebrafish embryo as a possible predictive model in toxicity testing. *PLoS One.* 2011;6(6):e21076.
79. Rink E, Wullimann MF. Connections of the ventral telencephalon and tyrosine hydroxylase distribution in the zebrafish brain (*Danio rerio*) lead to identification of an ascending dopaminergic system in a teleost. *Brain Res Bull.* 2002;57(3-4):385-7.
80. Hatcher JM, Pennell KD, Miller GW. Parkinson 's disease and pesticides: a toxicological perspective. *Trends Pharmacol Sci.* 2008;29(6):322-9.
81. Bretaud S, Lee S, Guo S. Sensitivity of zebrafish to environmental toxins implicated in Parkinson 's disease. *Neurotoxicol Teratol.* 2004;26(6):857-64.
82. Anichtchik OV, Kaslin J, Peitsaro N, Scheinin M, Panula P. Neurochemical and behavioural changes in zebrafish *Danio rerio* after systemic administration of 6-hydroxydopamine and 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine. *J Neurochem.* 2004;88(2):443-53.
83. Pienaar IS, Götz J, Feany MB. Parkinson 's disease: insights from non-traditional model organisms. *Prog Neurobiol.* 2010;92(4):558-71.
84. Lam CS, Korzh V, Strahle U. Zebrafish embryos are susceptible to the dopaminergic neurotoxin MPTP. *Eur J Neurosci.* 2005;21 (6):1758-62.
85. McKinley ET, Baranowski TC, Blavo DO, Cato C, Doan TN, Rubinstein AL. Neuroprotection of MPTP-induced toxicity in zebrafish dopaminergic neurons. *Brain Res Mol Brain Res.* 2005;141(2):128-37.
86. Baraban SC, Taylor MR, Castro PA, Baier H. Pentylentetrazole induced changes in zebrafish behavior, neural activity and c-fos expression. *Neuroscience.* 2005;131(3):759-68.
87. Pineda R, Beattie CE, Hall CW. Recording the adult zebrafish cerebral field potential during pentylentetrazole seizures. *J Neurosci Methods.* 2011;200(1):20-8.
88. Mussulini BH, Leite CE, Zenki KC, Moro L, Baggio S, Rico EP, et al. Seizures induced by pentylentetrazole in the adult zebrafish: a detailed behavioral characterization. *PLoS One.* 2013;8(1):e54515.
89. Berghmans S, Hunt J, Roach A, Goldsmith P. Zebrafish offer the potential for a primary screen to identify a wide variety of potential anticonvulsants. *Epilepsy Res.* 2007;75(1):18-28.
90. Siebel AM, Piato AL, Schaefer IC, Nery LR, Bogo MR, Bonan CD. Antiepileptic drugs prevent changes in adenosine deamination during acute seizure episodes in adult zebrafish. *Pharmacol Biochem Behav.* 2013;104:20-6.

91. Desmond D, Kyzar E, Gaikwad S, Green J, Riehl R, Roth A, et al. Assessing Epilepsy-Related Behavioral Phenotypes in Adult Zebrafish. *Zebrafish Protocols for Neurobehavioral Research Neuromethods* 66. 2012:313-322.
92. Wong K, Stewart A, Gilder T, Wu N, Frank K, Gaikwad S, et al. Modeling seizure-related behavioral and endocrine phenotypes in adult zebrafish. *Brain Res.* 2010;1348:209-15.
93. Goldsmith P, Golder Z, Hunt J, Berghmans S, Jones D, Stables JP, et al. GBR12909 possesses anticonvulsant activity in zebrafish and rodent models of generalized epilepsy but cardiac ion channel effects limit its clinical utility. *Pharmacology.* 2007;79(4):250-8.
94. Lee Y, Kim D, Kim YH, Lee H, Lee CJ. Improvement of pentylenetetrazol-induced learning deficits by valproic acid in the adult zebrafish. *Eur J Pharmacol.* 2010;643(2-3):225-31.
95. Alfaro JM, Ripoll-Gómez J, Burgos JS. Kainate administered to adult zebrafish causes seizures similar to those in rodent models. *Eur J Neurosci.* 2011;33(7):1252-5.
96. Rihel J, Prober DA, Arvanites A, Lam K, Zimmerman S, Jang S, et al. Zebrafish behavioral profiling links drugs to biological targets and rest/wake regulation. *Science.* 2010; 327(5963):348-51.
97. Zakhary SM, Ayubcha D, Ansari F, Kamran K, Karim M, Leheste JR, et al. A behavioral and molecular analysis of ketamine in zebrafish. *Synapse.* 2011;65(2):160-7.
98. Cachat J, Kyzar EJ, Collins C, Gaikwad S, Green J, Roth A, et al. Unique and potent effects of acute ibogaine on zebrafish: the developing utility of novel aquatic models for hallucinogenic drug research. *Behav Brain Res.* 2013;236(1):258-69.
99. Richetti SK, Blank M, Capiotti KM, Piato AL, Bogo MR, Vianna MR, et al. Quercetin and rutin prevent scopolamine-induced memory impairment in zebrafish. *Behav Brain Res.* 2011;217(1):10-5.
100. Seibt KJ, Oliveira RL, Zimmermann FF, Capiotti KM, Bogo MR, Ghisleni G, et al. Antipsychotic drugs prevent the motor hyperactivity induced by psychotomimetic MK-801 in zebrafish (*Danio rerio*). *Behav Brain Res.* 2010;214(2):417-22.
101. Gebauer DL, Pagnussat N, Piato AL, Schaefer IC, Bonan CD, Lara DR. Effects of anxiolytics in zebrafish: similarities and differences between benzodiazepines, buspirone and ethanol. *Pharmacol Biochem Behav.* 2011;99(3):480-6.
102. Bencan Z, Sledge D, Levin ED. Buspirone, chlordiazepoxide and diazepam effects in a zebrafish model of anxiety. *Pharmacol Biochem Behav.* 2009;94(1):75-80.
103. Vermoesen K, Serruys AS, Loyens E, Afrikanova T, Massie A, Schallier A, et al. Assessment of the convulsant liability of antidepressants using zebrafish and mouse seizure models. *Epilepsy Behav.* 2011;22(3):450-60.
104. Giacomini NJ, Rose B, Kobayashi K, Guo S. Antipsychotics produce locomotor impairment in larval zebrafish. *Neurotoxicol Teratol.* 2006;28(2):245-50.

105. Kyzar E, Stewart AM, Landsman S, Collins C, Gebhardt M, Robinson K, et al. Behavioral effects of bidirectional modulators of brain monoamines reserpine and d-amphetamine in zebrafish. *Brain Res.* 2013;1527:108-16.
106. Selderslaghs IW, Van Rompay AR, De Coen W, Witters HE. Development of a screening assay to identify teratogenic and embryotoxic chemicals using the zebrafish embryo. *Reprod Toxicol.* 2009;28(3):308-20.
107. Hagedorn M, Kleinhans FW, Artemov D, Pilatus U. Characterization of a major permeability barrier in the zebrafish embryo. *Biol Reprod.* 1998;59(5):1240-50.
108. Phelps HA, Runft DL, Neely MN. Adult zebrafish model of streptococcal infection. *Curr Protoc Microbiol.* 2009;9:Unit 9D.1.
109. Ullmann JF, Cowin G, Kurniawan ND, Collin SP. Magnetic resonance histology of the adult zebrafish brain: optimization of fixation and gadolinium contrast enhancement. *NMR Biomed.* 2010;23(4):341-6.
110. Gutzman JH, Sive H. Zebrafish brain ventricle injection. *J Vis Exp.* 2009(26).
111. Collymore C, Rasmussen S, Tolwani RJ. Gavaging adult zebrafish. *J Vis Exp.* 2013(78).
112. Cocchiari JL, Rawls JF. Microgavage of zebrafish larvae. *J Vis Exp.* 2013(72):e4434.
113. Cheung E, Chatterjee D, Gerlai R. Subcutaneous dye injection for marking and identification of individual adult zebrafish (*Danio rerio*) in behavioral studies. *Behav Res Methods.* 2013.

AGRADECIMENTOS

Gostaríamos de agradecer a Laura Roesler Nery e Fabiano Peres Menezes pelas fotografias de *zebrafish*. Agradecemos também ao Decit/SCTIE-MS por meio do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (Fapergs) (Proc. 10/0036-5, conv. n. 700545/2008 – Pronex) pelo apoio na consolidação das linhas de pesquisa com o uso de *zebrafish* como animal modelo.

