

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA**

**INSTITUTO DE BIOLOGIA – INBIO**

**FERNANDA FERREIRA LOPES**

**O ZEBRAFISH (*Danio rerio*) COMO MODELO TRANSLACIONAL PARA ESTUDOS  
COMPORTAMENTAIS: UMA REVISÃO SISTEMÁTICA INTEGRATIVA**

Uberlândia – MG

2021

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA**  
**INSTITUTO DE BIOLOGIA – INBIO**

**FERNANDA FERREIRA LOPES**

**O ZEBRAFISH (*Danio rerio*) COMO MODELO TRANSLACIONAL PARA ESTUDOS  
COMPORTAMENTAIS: UMA REVISÃO SISTEMÁTICA INTEGRATIVA**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à coordenação do curso de Ciências Biológicas, da Universidade Federal de Uberlândia, como exigência para obtenção do grau de Licenciatura em Ciências Biológicas.

Orientador: Prof. Dr. Joaquim Carlos Rossini.

Uberlândia, 2021.

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA**

**INSTITUTO DE BIOLOGIA – INBIO**

**FERNANDA FERREIRA LOPES**

**O ZEBRAFISH (*Danio rerio*) COMO MODELO TRANSLACIONAL PARA ESTUDOS  
COMPORTAMENTAIS: UMA REVISÃO SISTEMÁTICA INTEGRATIVA**

Trabalho de conclusão de curso aprovado para a obtenção do grau de  
Licenciatura em Ciências Biológicas da Universidade Federal de  
Uberlândia (MG) pela banca examinadora formada por:

Uberlândia, 22 de outubro de 2021.

---

Prof. Dr. Joaquim Carlos Rossini  
IPUFU/UFU

---

Prof. Dr. Kleber Del Claro  
INBIO/UFU

---

Prof. Dr. Leonardo Gomes Bernardino  
IPUFU/UFU

Uberlândia, 2021.

## Sumário

AGRADECIMENTOS.....	4
RESUMO.....	5
ABSTRACT.....	5
INTRODUÇÃO.....	6
Sistema visual .....	8
Modelos comportamentais .....	9
Teste de Preferência claro/escuro .....	10
Teste de Introdução ao Tanque Novo.....	11
Replicabilidade .....	12
ESTUDOS COMPORTAMENTAIS COM O MODELO ZEBRAFISH.....	14
Percepção, Atenção e Memória .....	14
Comportamento Social .....	15
Comportamentos anormais.....	16
Substâncias Psicoativas .....	16
REVISÃO SISTEMÁTICA.....	18
CRITÉRIOS DE INCLUSÃO E EXCLUSÃO .....	18
DISCUSSÃO.....	21
PERCEPÇÃO, ATENÇÃO E MEMÓRIA .....	22
MEMÓRIA .....	22
PREFERÊNCIA ENTRE CORES E ESPECTRO .....	23
COMPORTAMENTOS ANORMAIS .....	24
TRANSTORNO DE ANSIEDADE.....	24
TRANSTORNO DO ESPECTRO AUTISTA (TEA).....	25
TRANSTORNO DE DÉFICIT DE ATENÇÃO E HIPERATIVIDADE (TDAH).....	26
SUBSTÂNCIAS PSICOATIVAS .....	27
NICOTINA E A MEMÓRIA.....	27
COCAÍNA .....	28
FÁRMACOS E TOXINAS .....	29
CAFEÍNA.....	30
COMPORTAMENTO SOCIAL.....	31
CONCLUSÃO.....	33
REFERÊNCIAS.....	35

## AGRADECIMENTOS

Considero esse trabalho o início de um caminho que sempre quis trilhar e, preciso agradecer a Deus acima de tudo, por me guiar e me confortar em todos os momentos. Agradeço a minha mãe por me amar e cuidar durante todo esse processo, ao meu pai por sempre me motivar e me fazer rir, obrigada por me proporcionarem a oportunidade de seguir meus sonhos sempre, eu não seria nada sem vocês. Ao meu Pedro por todo amor e apoio, nos meus melhores e piores momentos, obrigada por me encorajar e sempre acreditar em mim. A minha segunda mãe, Zilá, por me acolher com palavras de apoio e incentivo. Obrigada a minha melhor amiga do mundo todo Rosi, muitas das coisas maravilhosas que me aconteceram nos últimos 7 anos, foram graças a você.

Gostaria de mencionar meu irmão, que se foi tão cedo, gostaria que estivesse aqui. E ao meu avô que nos deixou devido a pandemia, como tantos, sinto sua falta todos os dias.

Considero importante agradecer a Michelle Reed-Gauthier por me proporcionar momentos de tranquilidade mesmo sem conhecimento e ser uma ponte entre mim e Deus e a Ashley Taylor por me encorajar a colocar minha saúde mental sempre em primeiro lugar. E claro, a música de Taylor Swift que me acompanha há 10 anos.

Agradeço imensamente ao meu orientador Joaquim, que me aceitou e acolheu nesse processo mesmo sendo de outro Instituto, e esteve sempre disposto a me ajudar e amparar, especialmente durante esse período tão atípico.

E a todos os cientistas, que vieram antes de mim, em especial as mulheres, que abriram o caminho para que eu pudesse considerar essa alternativa como profissão, o meu muito obrigada. Aos pesquisadores atuais por doarem seu tempo e energia, em especial durante a pandemia para que a vida pudesse voltar ao normal. Também aos animais que dão suas vidas para o desenvolvimento de pesquisas e o avanço da ciência, em especial aos animais citados nessa revisão, a minha eterna gratidão.

“... to all the young girls out there who dream about science as a profession: Go for it! It’s the greatest job in the world. And if anybody tells you you can’t, don’t listen.”

The big bang theory, 2019.

## RESUMO

Nas últimas décadas, o pequeno peixe teleósteo *Danio rerio* (zebrafish) vem se consolidando como um importante modelo para o estudo comportamental e translacional. O presente estudo teve como objetivo realizar uma revisão sistemática e integrativa sobre a utilização do modelo zebrafish em quatro áreas da neurociência comportamental: 1) percepção, atenção e memória; 2) comportamento social; 3) comportamentos anormais; 4) substâncias psicoativas. Os resultados evidenciaram que o modelo zebrafish tem sido utilizado com sucesso nas áreas investigadas apresentando uma consolidação metodológica consistente com grande potencial de uso na neurociência comportamental. Sob o ponto de vista translacional, este modelo tem contribuído para o estudo da circuitaria neuronal envolvida em diversos transtornos comportamentais humanos, bem como para a avaliação preliminar de diversas intervenções farmacológicas.

## ABSTRACT

In recent decades, a small fish *Danio rerio* (zebrafish), has been consolidating itself as an important model for behavioral and translational studies. The present study aimed to conduct a systematic review on the use of the model in four areas of behavioral neuroscience: 1) perception, attention, and memory; 2) social behavior; 3) abnormal behavior; 4) psychoactive substances. The results pointed that the zebrafish model has been used with success in the explored areas presenting a consistent methodological consolidation with great potential for use in behavior neuroscience. From a translation point, this model has contributed to the study of neuronal circuitry involved in many human behavioral disorders, as well to a preliminary evaluation of several pharmacological interventions.

## INTRODUÇÃO

É conhecida a importância de modelos animais para a pesquisa acadêmica. Em diversas áreas, modelos vivos são frequentemente utilizados para o entendimento e desenvolvimento de inúmeros ramos da biologia e da neurociência. Esses animais são selecionados principalmente por sua similaridade comportamental e fisiológica com o objeto de estudo. O interesse crescente pelo desenvolvimento de modelos animais alternativos que representem uma boa relação custo-benefício em estudos comportamentais e neurofisiológicos suscitou, ao longo dos últimos 40 anos, uma expressiva ampliação da utilização do modelo animal que utiliza o peixe *Danio rerio* (Zebrafish), que tem se mostrado uma alternativa viável, e muitas vezes ideal, para a pesquisa em diversas áreas da neurologia, embriologia, psicologia, farmacologia, biologia molecular e genética.

As semelhanças do sistema visual do zebrafish com o de outros vertebrados também fazem desse animal um modelo valioso para a neurociência visual. Os componentes anatômicos, fisiológicos, genéticos e comportamentais do processamento visual do zebrafish foram estudados em adultos e em indivíduos de zebrafish em desenvolvimento. (Billota & Saszik, 2001).

A larva do zebrafish está rapidamente se tornando um modelo bem estabelecido na neurociência. Seus atributos únicos como vertebrado, pequeno, translúcido e geneticamente maleável nos fornecem uma rica arena na qual podemos estudar os circuitos neurais subjacentes ao comportamento. (Portugues & Engert, 2009)

O Zebrafish (*Danio rerio*) é um peixe tropical teleósteo, nativo da região sudeste do Himalaia, que produz centenas de ovos em cada ciclo reprodutivo, sendo considerado sexualmente maduro ao atingir o tamanho de aproximadamente 23mm, e apresenta um rápido desenvolvimento em condições ambientais ideais. O interesse científico neste modelo em particular tem início na década de 1980, onde ainda se sabia muito pouco sobre essa espécie, na época denominada *Brachidanio rerio* (Hamilton-Buchanan, 1822, 1823). Nesse período, o zebrafish já se mostrava promissor para a sua utilização em diversas áreas, embora essas pesquisas iniciais tenham se concentrado na área da embriologia. Alguns anos após a sua introdução no meio acadêmico, diversas áreas de estudos, com destaque especial na área da toxicologia, passaram a utilizar este modelo. Nessa época, diversos estudos neuroanatômicos e neurofisiológicos mostraram que várias estruturas homólogas a estruturas presentes em mamíferos estão presentes em espécies teleósteas, sugerindo, assim, que o zebrafish pode

representar um modelo comportamental consistente para a neurociência translacional (Mueller & Wullimann, 2009; Orger & Polavieja, 2017; Portavella, Torres, & Salas, 2004; Stewart, Nguyen, Wong, Poudel & Kalueff, 2014). Uma característica positiva e muito atrativa na utilização do modelo zebrafish é que, em fase larval, essa espécie apresenta uma coloração translúcida, o que torna possível o estudo de circuitos neurais por meio de diversas técnicas como observações e descrições anatômicas, registros eletrofisiológicos, ablações direcionadas e o mapeamento por imagem de cálcio (uma técnica utilizada para a mensuração da quantidade e distribuição de cálcio com marcadores fluorescentes nas células ou estruturas celulares) (Grienberger & Konnerth, 2012; Portugues & Engert 2009).

Sob o ponto de vista comportamental, o zebrafish apresenta diversas características favoráveis para o estudo do sistema visual e das respostas motoras a ele associadas, como as respostas optocinéticas (OKR - Optokinetic Reflex), que caracterizam um comportamento inato de rastreamento visual no qual o animal investiga ativamente um estímulo no seu campo visual (Portugues & Engert 2009). Esse comportamento pode ser observado cerca de 80 horas após a fertilização (hpf) e permanece por todo o seu ciclo de vida. A resposta optocinética é um dos comportamentos mais estudados, uma vez que se apresenta até com o animal imobilizado, proporcionando uma gama de opções experimentais. Por exemplo, em um estudo de 2007, Emran e colaboradores demonstraram que as respostas optocinéticas podem ser moduladas, ou até mesmo extinguidas, por meio da manipulação das células ganglionares ON – OFF da retina. Uma segunda resposta comportamental importante, e que está presente no zebrafish, é a resposta optomotora (OMR- Optomotor response) mediada pelos cones vermelhos e verdes da retina. Essa resposta, também inata, consiste em um movimento completo de nado em direção a um estímulo visual. Esse comportamento é frequentemente utilizado em estudos comportamentais e pode ser manipulado para a compreensão de estruturas específicas do sistema visual, assim como a preferência de cor e comprimento de onda e no que isso influencia na busca visual e memória desses animais. Essa resposta também é fundamental para o comportamento de captura de presa, mediado pelo tectum óptico (estrutura homóloga ao colículo superior em mamíferos) (Gahtan, Tanger & Baier, 2005). Todavia, embora exista um número expressivo de estudos mostrando a versatilidade da utilização do zebrafish como modelo experimental, ainda são muitas as questões sobre a sua replicabilidade e reprodutibilidade (Gerlai, 2019), justificando, assim, um aprofundamento na compreensão dos limites e vantagens da utilização deste modelo.



## Sistema visual

O sistema visual do zebrafish apresenta vários aspectos promissores para a sua consolidação em diversas áreas da neurociência comportamental. Sob os pontos vista genético, fisiológico e anatômico, esse modelo apresenta a vantagem de um desenvolvimento extracorpóreo bastante acelerado (Neuhauss, 2003). Os fotorreceptores presentes na retina desse animal contam com um desenvolvimento precoce notável e, em aproximadamente 60 hpf, já estão funcionais. O tectum óptico, uma estrutura fundamental para a percepção e programação motora, já está completo e funcional em aproximadamente 32 hpf, tornando possível que em 60 hpf o animal já conte com uma estrutura anatômica e funcional adequada para a percepção e resposta comportamental à estímulos visuais (Easter & Nicola, 1996).

Um dos primeiros comportamentos apresentado pela larva do zebrafish é o *startle* (nado rápido e errático) (Kimmel, Patterson & Kimell 1974), uma vez que essa larva já tende a responder a diminuição rápida de luminosidade, o que pode ser entendido como um comportamento adaptativo para escapar da aproximação de um potencial predador. Em 72 hpf as imagens são focadas na retina e os músculos extraoculares adquirem sua configuração adulta. Aproximadamente 82 hpf as células ganglionares da retina são enervadas e funcionais (Portugues & Engert 2009). Em 120 hpf, a retina já está plenamente funcional, apresentando todos os fotorreceptores, os cones e os pigmentos necessários para a discriminação de imagens eliciadoras de respostas optomotoras e optocinéticas. Para que um animal possua visão e distinção de cores, sua retina deve apresentar, pelo menos, dois tipos de cones, assim como um circuito neural capaz de distingui-los. A retina do zebrafish, quando adulto, possui bastonetes e quatro tipos de cones que cobrem uma ampla faixa do espectro óptico. Em animais adultos, os cones são classificados como: cones simples curtos, cones simples longos e um par de cones duplos (Meier, Nelson, & Connaughton, 2018). Os cones simples curtos são sensíveis a frequências espectrais de 360 nm, sensível ao ultravioleta (UV) (opsina SWS1). Os cones simples longos são cones sensíveis a comprimentos de onda por volta de 415 nm (SWS2 ou azul). Os cones duplos são caracterizados por um núcleo secundário sensível ao comprimento de onda médio (MWS ou verde), por volta de 480 nm e um núcleo principal, sensível ao comprimento de onda longo, por volta de 570 nm (LWS1 ou vermelha) (Meier et al., 2018).

Assim, em linhas gerais, todas essas características do sistema visual do zebrafish indicam o grande potencial para respostas comportamentais associadas à uma ampla variedade de estímulos visuais.

## Modelos comportamentais

O zebrafish vem sendo utilizado como um modelo promissor para estudos comportamentais. Uma variedade de estudos observou que esses animais são capazes de demonstrar diversos comportamentos associados a aprendizagem como evasão, condicionamento olfativo, diferenciação visual e habituação (Braidá, Ponzoni, Martucci & Sala, 2014). Em razão disso, foram conduzidos diversos experimentos cujo zebrafish potencialmente seria avaliado em tempo de reação e aprendizagem de tarefas relativamente complexas, e como esses parâmetros podem possivelmente ser alterados pela manipulação experimental (ex. fármacos, estímulos visuais, estressores ambientais). Muitos testes comportamentais foram adaptados para o zebrafish, como por exemplo o teste “*New Object Recognition*” (NOR), usado para reconhecimento e discriminação visual em humanos e primatas. A vantagem principal deste teste é a sua rapidez de execução e falta de necessidade de treinamento posterior após a primeira apresentação (Braidá et al., 2014). Outro teste comportamental adaptado e que pode contribuir para a utilização do zebrafish como modelo animal translacional na neurociência comportamental é o “*Visual Object Recognition Test*” (VORT) usando modelos imóveis ou móveis de objetos 2D (Braidá et al., 2014).

O peixe zebrafish é um animal diurno, sendo assim mais ativo durante a exposição a luz, como já abordado, possui sistema visual bem desenvolvido pois esse tem atuação determinante em sua sobrevivência. Sabe-se também que esse animal apresenta um desenvolvimento precoce e consegue reagir a mudanças de luminosidade no ambiente. Com isso, os testes que exploram o padrão de nado preferencial em claro/escuro, são amplamente utilizados, pois cada condição ambiental elicia um tipo natatório diferente. Como apontado por Campanari, Bourefis, Buee-Scherrer e Kabashi (2020), nos primeiros minutos no escuro, o zebrafish apresenta sinais de habituação, nadando aleatoriamente pelo tanque, o chamado comportamento espontâneo, quando a luz é ligada abruptamente ele apresenta uma resposta de *startle* (caracterizada por um nado errático e descontrolado), o que, com o passar do tempo dá lugar ao *freezing* (caracterizado pela paralização total do animal, com exceção das guelras). Em roedores, o *freezing* é mediado pelas estruturas da amígdala basolateral e pelo hipocampo e, esse comportamento é fortemente caracterizado pela ausência total de movimento, que posteriormente retorna com a habituação, no entanto, no zebrafish não se sabe ao certo as estruturas responsáveis pela expressão desse comportamento. O *freezing* é tipicamente um

comportamento defensivo empregado como uma maneira de não ser detectado por um predador (Maximino et al. 2010).

#### Teste de Preferência claro/escuro

Os testes de preferência entre claro e escuro são amplamente utilizados em diversos modelos animais com o intuito de estudar o comportamento e a funcionalidade de drogas ansiolíticas. Esse teste foi desenvolvido na década de 1980 e consiste em um aquário (arena) dividido em dois compartimentos, um escuro e outro iluminado. O teste se baseia no conflito do animal entre a tendência inata de explorar um ambiente novo e o impulso natural em evitar uma situação nova e potencialmente ameaçadora. Em um estudo conduzido por Facciol, Tran e Gerlai, (2017), as características comportamentais do zebrafish, neste teste, foram investigadas. Como o zebrafish é um animal diurno, há uma preferência desse animal em permanecer em ambiente iluminado, o que é justificável pelo fato desse animal ser mais ativo no período claro de seu ciclo circadiano (Gerlai, Lahav, Guo & Rosenthal 2000; Champagne, Hoefnagels, De Kloet & Richardson, 2010; Blaser & Penalosa, 2011). Porém, esse ambiente iluminado elicia comportamentos defensivos, naturais em ambientes novos. Este fato faz com que o zebrafish busque a parte escura da arena. Esse comportamento pode ser interpretado como uma resposta defensiva (permanência na área escura da arena) a um estímulo ameaçador (exposição na área clara da arena). Assim, o tempo de nado exploratório na área clara da arena pode ser considerado uma variável dependente importante na inferência comportamental frente a condições ansiogênicas. É interessante destacar que no delineamento desses testes, as variáveis cor de fundo e iluminação de fundo não devem ser usados de forma intercambiável. Nesta situação, a variável iluminação não é determinante para o comportamento, e sim, a variável cor do fundo, tendo sido observado uma preferência pelo fundo escuro em detrimento do claro, isso nos primeiros três minutos de teste (tempo médio estimado para habituação). Juntamente a preferência pela área escura da arena, foram observados outros comportamentos relacionados a ansiedade e medo, como freezing, e comportamento de nado de fundo (Facciol et al. 2017).

### Teste de Preferência Claro/Escuro

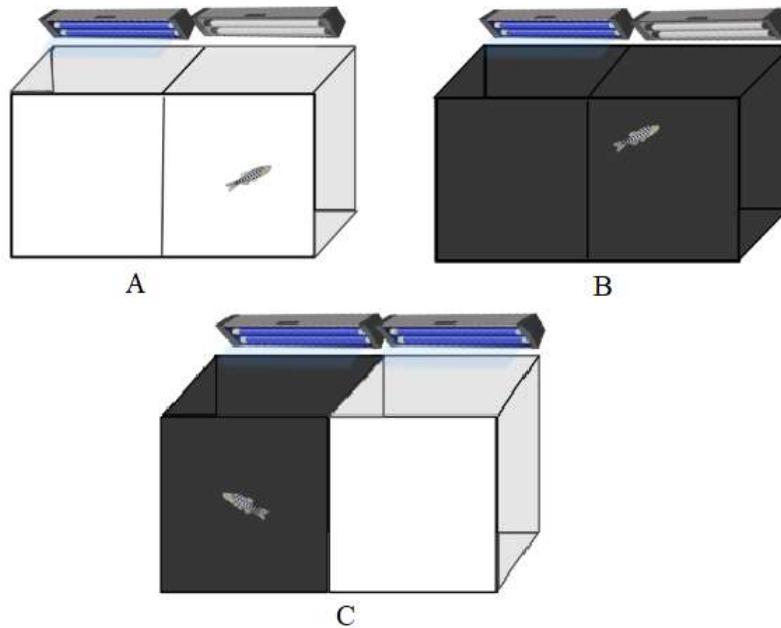


Imagem da autora. (Created with BioRender.com)

Os três formatos de teste. A) fundo consistente com escolha entre a iluminação. B) fundo consistente com escolha entre a iluminação C) iluminação consistente, escolha entre branco e preto.

### Teste de Introdução ao Tanque Novo

A ansiedade ocorre quando o animal, na expectativa de uma ameaça, ou até mesmo com a lembrança da mesma, apresenta respostas comportamentais e fisiológicas defensivas. Nesse sentido, um segundo teste comportamental consolidado para o modelo zebrafish é o teste de “Introdução ao Tanque Novo” (*Novel tank test*). Neste teste o animal é inserido em um tanque novo e assim são avaliados dois comportamentos inatos do zebrafish: a geotaxia (mergulho ao fundo do tanque) em busca de proteção, e o nado exploratório em um ambiente novo. Assim, o tempo de permanência no fundo do tanque e o número de episódios de freezing são bons marcadores comportamentais associados a situações ansiogênicas, o que torna esse teste bastante promissor para o estudo dos parâmetros comportamentais associados a ansiedade.

### Teste de introdução ao tanque novo

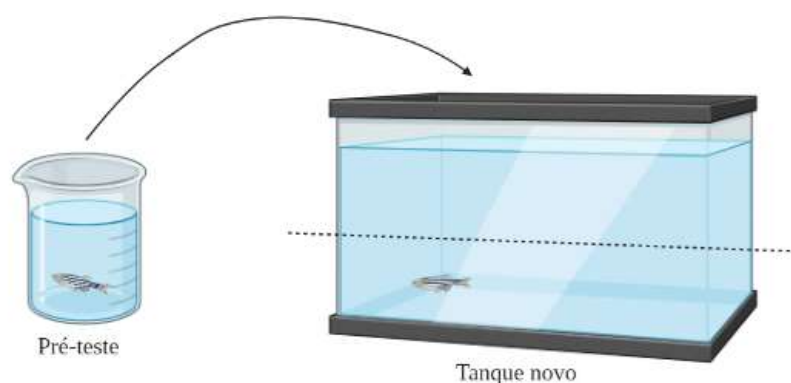


Imagem da autora. (Created with BioRender.com)

Formato de teste. Animal é mantido no Becker pré-teste até o início do experimento, após, é inserido no tanque novo.

### Replicabilidade

De acordo com Karl Popper (1934), ciência é tudo aquilo que está passível de teste e, de acordo com o princípio da refutabilidade, algo só pode ser considerado um fato científico quando pode ser testado, independentemente do resultado positivo ou negativo. Ou seja, o método científico deve consistir em hipóteses testáveis, e o mais importante, resultados replicáveis. Nos últimos anos, muitos cientistas de todos os campos do conhecimento têm vivenciado problemas em replicar os seus próprios resultados (50%) e resultados de outras pessoas (70%) (Baker, 2016). É importante mencionar que as questões que tangem a reprodutibilidade não estão relacionadas à competência do pesquisador ou da instituição. Robert Gerlai em um trabalho de 2017, abordou quatro possíveis razões para essa problemática da replicabilidade, (1) viés de publicação em resultados positivos, mesmo que os pesquisadores sejam imparciais, há uma tendência de não publicação de resultados negativos ou não satisfatórios, assim como muitos periódicos preferem publicar resultados positivos, onde os resultados negativos mostram falta de significância; (2) a forma como são feitas inferências estatísticas, ou seja, a qualidade dos resultados estatísticos se dá pela qualidade dos dados coletados assim como a forma de análise dos mesmos, a inferência estatística é feita de forma a detectar grandes diferenças entre fator e

outro, mas não prova falta de diferença; (3) controle inapropriado de fatores que podem influenciar resultados, ou seja, mesmo que os testes sejam supostamente feitos de mesma forma, existem fatores externos não explicitados nos trabalhos que podem influenciar nos resultados, qualidade do aparato, iluminação do laboratório, barulho, presença ou ausência do pesquisador durante o teste, linhagem de animais utilizados, manipulação humana, entre outros, e (4) problemas metodológicos decorrentes de entendimento insuficiente em relação a fatores que podem influenciar os resultados.

Embora o uso do modelo zebrafish seja relativamente recente, o mesmo já apresentou divergências entre um estudo e outro e, considerando os fatores mencionados, muitas podem ser as causas para essas discrepâncias. Gerlai e colaboradores apresentam a hipótese da manipulação do zebrafish como um dos principais problemas, visto que esse animal apresenta comportamentos associados a ansiedade. Outra hipótese é a da manipulação genética, onde é o peixe é adquirido de fontes distintas que, ao se cruzarem, apresentam características imprevistas (Gerlai, 2019). Nesse mesmo trabalho, a autor evidencia a necessidade do manejo desses fatores.

Como se sabe, o zebrafish já apresenta amplas modificações genéticas com o intuito de torná-lo mais bem adaptado às demandas científicas e ou mais barato para pesquisa. Embora isso represente um avanço significativo, pode também ser considerado como um fator de confusão (confounding variable) importante na elaboração de testes e na interpretação dos resultados, uma vez que esses peixes são criados de formas diferentes em ambientes diferentes, sendo geneticamente distintos. É válido mencionar os testes de claro/escuro citados acima, uma vez que, foram apresentados resultados divergentes em diferentes pesquisas, sendo assim, um bom exemplo das possíveis problemáticas metodológicas a cerca desse modelo. Outros exemplos seriam resultados diferentes no uso de substâncias, acerca da forma com que essas são administradas e, novamente, a linhagem genética desses animais. Outra questão são os fatores comportamentais que envolvem esse animal. Ainda não está claro quais desses fatores interferem na realização dos testes comportamentais e a magnitude dessa interferência. Alguns autores recomendam o uso da ecologia do zebrafish para que se possa replicar as condições em que ele é adaptado evolutivamente, já outros autores discordam, com o argumento de se manterem as condições ótimas e iguais em todas as pesquisas, não sendo relevante o habitat natural do animal.

## ESTUDOS COMPORTAMENTAIS COM O MODELO ZEBRAFISH

O presente estudo realizou uma revisão sistemática seguindo as diretrizes PRISMA (Principais Itens para Relatar Revisões sistemáticas e Meta-análises) (Moher, Tetzlaff, Tricco, Sampson & Altman, 2007), em quatro áreas de estudos que envolvem o sistema visual e motor que utilizam o modelo zebrafish: 1) Percepção, atenção e memória; 2) Comportamento social; 3) Comportamentos anormais; e 4) Substâncias psicoativas.

### Percepção, Atenção e Memória

O sistema visual do zebrafish é um dos aspectos que torna o estudo deste modelo interessante para a neurociência translacional. O zebrafish, assim como os humanos, são animais diurnos, ou seja, são mais ativos no período claro de seu ciclo circadiano, o que significa que seu sistema visual é refinado e essencial para a programação do comportamento apropriado para sua sobrevivência (Gerlai et al. 2000). A retina do zebrafish possui cones e bastonetes sensíveis ao mesmo espectro de luz de outros peixes diurnos. Morfologicamente, a retina do zebrafish apresenta quatro tipos de cones classificados como cones simples curtos, cones simples longos e cones duplos. Os cones simples curtos são sensíveis ao comprimento de onda situados na faixa de 360 nm, sensível ao ultravioleta (UV). Os cones simples longos são sensíveis a faixa de 415 nm, sensível ao azul. Os cones duplos são sensíveis a ondas na faixa de 480 nm (verde) e 570 nm (vermelho) (Krauss & Neumeyer, 2003; Meier, Nelson, & Connaughton, 2018; Morris & Fadool, 2005).

Outro aspecto importante da percepção em zebrafish é o processamento do tamanho do objeto. Estudos em larvas de zebrafish (Barker & Baier, 2015) apontam que as larvas respondem a um ponto em movimento de duas maneiras: um pequeno ponto em movimento, que pode representar uma presa em potencial, evoca uma resposta de aproximação. Em contrapartida, um ponto grande em movimento, que pode representar um predador em potencial, provoca uma resposta de afastamento vigorosa. Os autores também sugerem que a classificação do tamanho dos objetos é processada no tecum óptico, sendo essa estrutura fundamental para a tomada de decisão comportamental baseada na classificação visual do tamanho do estímulo.

No que tange a capacidade de selecionar um estímulo alvo em meio a estímulos distratores (capacidade atenta), Braida et al. (2014) propôs um modelo comportamental viável, rápido e robusto para avaliar a atenção sustentada em zebrafish capaz de prever adequadamente a eficácia de farmacoterápicos. Por sua vez, Proulx, Parker, Tahir e Brennan (2014) apresentaram evidências da capacidade do zebrafish em processar paralelamente estímulos na busca visual, mesmo que esses animais não apresentem uma estrutura homóloga ao telencéfalo– estrutura essa que participa na busca visual em mamíferos.

A capacidade de selecionar adequadamente os estímulos mais relevantes do ambiente está diretamente associada a capacidade de retenção da informação por longos períodos, ou em outras palavras, na capacidade de memória do organismo. Neste sentido, são relativamente novos os trabalhos que abordam a memória e o aprendizado no modelo zebrafish. Uma variedade de estudos observou que esses animais são capazes de demonstrar diversos comportamentos associados a memória, tais como: evasão, condicionamento olfativo, diferenciação visual e aprendizagem automatizada (Braida et al. 2014).

## Comportamento Social

Um aspecto bastante interessante estudado no modelo zebrafish é o seu comportamento social. Stednitz e colaboradores (2018) observaram interações sociais que podem refletir um comportamento de orientação ao grupo que reflete a atenção social. A partir de manipulações genéticas e lesões seletivas no prosencéfalo, os autores sugerem que uma população evolutivamente conservada de neurônios controla a orientação social no zebrafish e que esses neurônios estão em uma região homóloga ao prosencéfalo dos mamíferos, que implica no comportamento social. Ainda observando esse comportamento no zebrafish, a preferência para formação de grupos em peixes não é restrita ao tamanho do corpo, uma vez que é observado que tendem a formar grupos com peixes da mesma espécie, saudáveis e de cor semelhante. Essas preferências podem levar a grupos variados, em especial para aqueles peixes que são alvo de predadores primariamente visuais (Aivaz, Manica, Neuhaus & Ruckstuhl, 2020).



## Comportamentos anormais

O modelo zebrafish é utilizado no âmbito de uma abordagem translacional para o estudo de comportamentos anormais associado a diversas condições psiquiátricas, como o Transtorno de Ansiedade (Maximino et al., 2010; Stewart et al., 2012), o Transtorno de Déficit de Atenção e Hiperatividade (TDAH) (Fontana et al., 2019); e o Transtorno do Espectro do Autismo (TEA) (Stewart et al., 2014; Meshalkina et al., 2018). A presente revisão evidenciou que o modelo zebrafish é promissor e já conta com alguns testes comportamentais consolidados. Entre estes está o teste de preferência entre o tanque claro / escuro, assim como a apresentação de estímulos novos.

## Substâncias Psicoativas

O modelo zebrafish tem sido utilizado como uma alternativa para o estudo do comportamento sob o efeito de substâncias psicoativas. Essa é uma área de grande importância para estudos de possíveis tratamentos medicamentosos para diversas patologias e afecções. A presente revisão aborda o efeito da nicotina, um alcaloide psicoativo que constitui o principal componente do tabaco, largamente utilizada, e que pode ser obtida facilmente e de forma legalizada, tem o apelo de ser um estimulante que induz sensações de prazer e gratificação, sendo uma droga que causa dependência com poucas exposições. O sistema colinérgico, que é primariamente onde a nicotina atua, tem importante papel na obtenção e retenção da memória e aprendizado, em vertebrados e invertebrados (Luisa, Sala & Braida, 2016). O sistema colinérgico apresenta dois tipos de receptores colinérgicos distintos, os muscarínicos e os nicotínicos (Tinsley et al. 2004). Os receptores nicotínicos se localizam primariamente no sistema nervoso central e reconhecem tanto a nicotina quanto a acetilcolina, onde a nicotina se liga aos receptores colinérgicos do cérebro e libera dopamina, neurotransmissor esse que pode causar dependência em poucas exposições. Assim como a nicotina, a cocaína é uma droga psicoestimulante – ilegal – que atua no sistema colinérgico, prejudicando a retenção de memória e funcionamento do sistema visual. Neste aspecto, são estudadas diversas substâncias psicoativas que, alteram de uma forma ou outra o comportamento, estudos esses que proporcionam uma janela de possibilidade para o entendimento da ciência em temas como a dependência e abstinência química e suas consequências para os sistemas neurais.

Portanto, através de uma escolha sistemática de estudos, em diversas áreas, acerca dessa temática, publicados em diversos periódicos, buscou-se sumariar as características definidoras do modelo experimental zebrafish, a fim de contribuir para o avanço e consolidação do mesmo.

## REVISÃO SISTEMÁTICA

Foi realizada uma revisão sistemática da literatura em quatro áreas de utilização do modelo zebrafish no período compreendido entre os anos 2000 e 2020. A busca selecionou artigos publicados em periódicos na língua inglesa e indexados nas bases de dados Pubmed, PsycINFO, Scopus e Google Scholar. Os seguintes termos de busca foram utilizados de forma combinada: “zebrafish” AND “anxiety model”; “zebrafish” AND “ADHD model”; “zebrafish” AND “autism model”; “zebrafish visual perception”; “zebrafish memory” AND “behavior”; “zebrafish attention” AND “behavior”; “zebrafish social behavior” AND “assays”; “zebrafish nicotine” AND “assays”; “zebrafish cocaine” AND “assays”; “zebrafish caffeine” AND “assays”; “zebrafish toxicity model” AND “assays”.

Esta busca resultou em 428 produções. Destas, 145 foram excluídas (livros, capítulos, teses e dissertações, resumos e relatórios, duplicações). Foi realizada a leitura de títulos e resumos dos 283 artigos, resultando em 50 artigos com as temáticas de interesse (233 artigos excluídos). Destes, 40 artigos foram selecionados para leitura em sua totalidade, resultando na seleção final de 28 artigos incluídos na revisão de acordo com os critérios de inclusão e exclusão.

### CRITÉRIOS DE INCLUSÃO E EXCLUSÃO

- 1- Artigos que abordavam o sistema visual no modelo zebrafish;
- 2- Artigos que traziam o processamento visual e com isso o processo de tomada de decisão no zebrafish;
- 3- Trabalhos publicados na língua inglesa;
- 4- Estudos que traziam a influência do tectum óptico;
- 5- Artigos que, em sua conclusão, apresentavam o zebrafish como possível modelo translacional;
- 6- Artigos que, em suma, tratavam ou tentaram suplantar o problema da replicabilidade;
- 7- Artigos completos.
- 8- Foram excluídos da revisão, trabalhos que não cumpriram os critérios de inclusão.

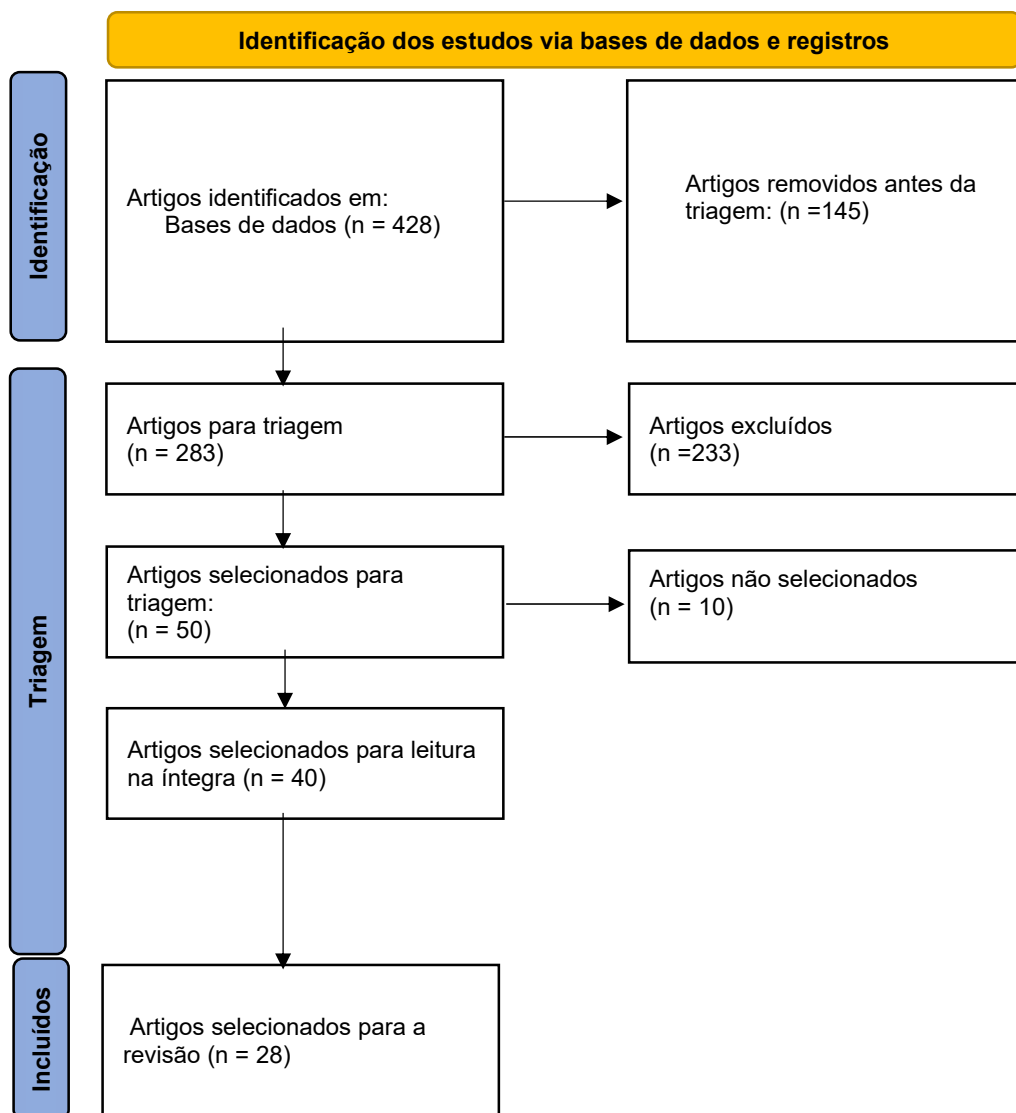


Figura 1. Fluxograma de seleção PRISMA.

Tabela 1. Avaliação qualitativa dos artigos

Artigos	Critérios						Total	Porcentagem %
	Os objetivos foram bem descritos?	O experimento foi bem planejado e executado?	Os grupos controle e teste foram de tamanho suficiente?	Os grupos foram comparados apropriadamente?	A análise foi feita de forma clara e imparcial?	As conclusões foram apoiadas nos resultados?		
do Nascimento et al. (2020)	2	2	2	2	1	1	10	83,3
Braida et al. (2014)	1	2	2	2	2	1	10	83,3
Risner et al. (2006)	2	2	NSA*	NSA*	1	2	7**	87,5
Facciol et al. (2017)	1	2	NSA*	NSA*	2	2	7**	87,5
Gerlai (2019)	2	NSA*	NSA*	NSA*	2	2	6**	100
Aoki et al. (2015)	1	1	1	1	2	2	8	66,6
Portugues et al. (2009)	2	NSA*	NSA*	NSA*	1	1	4**	66,6
Echevarria et al. (2011)	1	NSA*	NSA*	NSA*	2	2	5**	83,3
Barker et al. (2015)	2	2	2	2	2	2	12	100
Bilotta et al. (2001)	2	NSA*	NSA*	NSA*	2	2	6**	100
Avdesh et al. (2012)	2	2	NSA*	NSA*	2	2	8**	100
Bloch et al. (2019)	2	2	NSA*	2	2	2	10**	100
Orger et al. (2000)	0	1	NSA*	2	1	1	5**	50
Jia et al. (2014)	1	2	NSA*	2	2	2	9**	90
Blaser et al. (2012)	2	2	NSA*	2	2	2	10**	100
Blaser et al. (2010)	2	2	2	2	1	1	10	83,3
Stewart et al. (2014)	1	2	2	2	1	1	9	75
Maximino et al. (2010)	2	2	2	2	2	1	11	91,6
Fontana et al. (2019)	2	NSA*	NSA*	NSA*	2	2	6**	100
Ruiz-Oliveira et al. (2019)	2	2	2	2	2	2	12	100
Levin et al. (2011)	1	1	1	2	2	2	9	75
Riley et al. (2015)	1	2	2	2	1	2	10	83,3
Riley et al. (2018)	1	1	2	2	1	1	8	66,6
Faillace et al. (2017)	1	2	2	2	1	2	10	83,3
Zhang et al. (2020)	1	1	1	1	2	2	8	66,6
Luisa et al. (2016)	1	2	2	2	1	1	9	75
Stednitz et al. (2018)	2	2	NSA*	2	2	1	9**	90
Aivaz et al. (2020)	2	2	NSA*	2	2	2	10**	100

Nota. Sistema de avaliação: 0 = não; 1 = parcialmente; 2 = sim; \*NSA = não se aplica

\*\* Os valores foram adaptados pela quantidade de critérios existentes validos.

## DISCUSSÃO

Grande parte das pesquisas e descobertas científicas feitas no último século de investigação se deram graças a utilização de modelos animais. Com o enfoque na neurociência translacional, o zebrafish tem notoriedade nos estudos de expressão e modulação comportamental em diversas patologias, tais como, nos transtornos de ansiedade, compulsão e abstinência.

Para alguns, o uso de um peixe, um modelo considerado rudimentar para o estudo de sistemas cerebrais complexos e comportamentos intrincados pode causar certo estranhamento, porém, o zebrafish tem se mostrado um modelo vantajoso para o entendimento dos mecanismos cerebrais e comportamentais, visto que seu cérebro - de forma primitiva - compartilha diversas similaridades com o cérebro de mamíferos. Várias outras razões tornam o zebrafish cada vez mais atraente para a investigação científica, como o seu rápido ciclo de vida, a quantidade grande de indivíduos por ciclo e o fato de que suas larvas são transparentes e a facilidade de criação e manutenção aliada ao seu relativo baixo custo, tornam esse modelo promissor. Nessa perspectiva, a literatura sobre o zebrafish tem aumentado de forma substancial nas últimas décadas, e ele vem contribuindo para a compreensão de áreas como, a embriologia, a psicologia, a farmacologia, a biologia molecular, a genética e a neurologia. O genoma desse animal já foi completamente mapeado e dessa forma se reconheceu uma ampla similaridade entre o mesmo e modelos de vertebrados, incluindo humanos.

Sob o ponto de vista genético, o zebrafish já conta com um número expressivos de linhagens selecionadas, o que permite a expressão e ou a supressão de diversas características físicas e comportamentais, o que o torna ainda mais atrativo e específico para a abordagem de diversos tópicos. É um animal que oferece fácil manuseio e é passível de uma gama de testes de imagem, dessa forma sendo possível estudar de forma particular diversas circuitarias neurais, assim como associá-las à expressão de diversas patologias. Seu comportamento pode ser facilmente monitorado usando as ferramentas atuais de tracking, assim, fornecendo um conhecimento mais aprofundado de seus hábitos sociais e dessa forma, a associação desses comportamentos a distúrbios como autismo - TEA e transtorno de déficit de atenção e hiperatividade – TDAH, e a modulação desses por fármacos e fatores socioambientais. Com todas essas vantagens esse tem se tornado uma ferramenta importante para a neurociência translacional.

## PERCEPÇÃO, ATENÇÃO E MEMÓRIA

Evolutivamente, o cérebro dos vertebrados foi se tornando cada vez maior e mais complexo, agregando estruturas que possibilitaram diversas novas atividades de acordo com o tempo, isso não sendo uma característica restrita aos mamíferos. Com base nessa prerrogativa, técnicas de “operant conditioning” são largamente usados para o estudo da cognição animal, constituindo um método importante que utiliza o reforçamento positivo e negativo, assim como a punição, na modelagem do comportamento. Hoje é sabido que essas funções executivas são cruciais para diversos comportamentos inerentes de sobrevivência como tomada de decisões e inibição de comportamentos. Em mamíferos, a maioria dessas funções é comandada pelo córtex pré-frontal, que os habilita a diferenciar pensamentos conflitantes e a possível mediação entre ação e consequência (podendo ser exemplificado por se, então). Isso pode ser observado em grupos além de mamíferos, sendo mediado por estruturas análogas ainda não tão estudadas, aqui, com enfoque nos teleósteos.

Em Bloch, Froc, Pontiggia e Yamamoto (2019), foi avaliada a elasticidade de aprendizado e memória do zebrafish através de funções executivas primitivas. E, após a aplicação de testes “Matching to Sample” (MTS) o que, em suma é um teste de equivalência entre estímulo e respostas condicionais, foi observada notória capacidade de aprendizado e memória correlacionada a discriminação de cores, resultados esses comparados com dados prévios obtidos em mamíferos e aves.

## MEMÓRIA

A memória pode ser definida pela capacidade adquirir, armazenar e evocar informações apresentadas ou experiências. Em mamíferos, acredita-se que a estrutura hipocampal tenha um papel fundamental. A Memória de Trabalho ou “Working memory” pode ser definida como a capacidade de reter temporariamente informações importantes para a tomada de decisões e programação comportamental. Experimentos de memória de curto prazo e discriminação de estímulos negativos e positivos mostraram a capacidade do zebrafish em reter memórias de curto e médio prazo. Em Jia, Fernandes e Gerlai (2014), a memória desses animais foi avaliada pela apresentação de formas de coespecíficos em intervalos alternados (entre 1 e 16 minutos),

onde foi observado que o zebrafish, ao se habituar aos novos estímulos, tende a diminuir a busca e exploração e permanecer nos locais onde foram apresentadas as imagens, mesmo depois de passado um tempo de sua apresentação, mostrando assim, a capacidade de fixação e memória associativa de médio prazo.

## PREFERÊNCIA ENTRE CORES E ESPECTRO

Avdesh et al. (2011) conduziu uma serie de experimentos que tinham como objetivo principal, avaliar a capacidade do zebrafish em diferenciar cores e uma possível memorização dessa habilidade. O enfoque desse trabalho foi a capacidade de diferenciação e por consequência a preferência entre as cores vermelho, amarelo, verde e azul, assim como padrões de claro e escuro e iluminação, utilizando dados obtidos com estudos em roedores onde preferência de uma cor pode determinar o processo de tomada de decisão e o estabelecimento de memória associativa. É importante mencionar que os humanos podem não perceber cores da mesma forma que o zebrafish e vice e versa, ou seja, o que chamamos “verde”, “azul”, “vermelho” ... pode ser completamente diferente na nossa percepção para a percepção do animal (Faillace, Pisera-Fuster, Medrano, Bejarano & Bernabeu, 2017), observação essa a ser tratada com cuidado na interpretação de resultados desse tipo.

Os dados apresentados por Avdesh e colaboradores (2011) sugerem uma possível preferência do zebrafish por cores distintas na seguinte ordem: vermelho = verde > amarelo >> azul (Avdesh et al. 2011). Embora não se saiba o motivo dessa preferência, pode-se especular que se dê pela familiaridade do verde e vermelho no ambiente de forrageamento desses animais, assim como a procura de parceiros e formação de cardumes pois, sabe-se que esses peixes usam de cores e padrões para se agrupar e se proteger. Informação essa que se mostra útil para a elaboração de testes ecologicamente válidos, mais precisos e específicos e que pode ser, eventualmente, modulado pela ação de fármacos.



## COMPORTAMENTOS ANORMAIS

### TRANSTORNO DE ANSIEDADE

Os comportamentos defensivos que caracterizam as respostas de medo são apresentados na presença de uma ameaça física (por exemplo, a presença de um predador). Por sua vez, as respostas associadas à ansiedade podem ser caracterizadas como um conjunto de respostas a uma ameaça detectada, iminente, mas não presente (por exemplo, as respostas comportamentais do rato na presença do cheiro do gato) muitas pesquisas com roedores são feitas no âmbito desses comportamentos, porém em relação ao estudo com zebrafish, muitos trabalhos, embora apresentem ansiedade como resultado secundário, ainda divergem sobre a precisão desse fator. Atualmente é possível considerar duas formas possíveis de se avaliar ansiedade no modelo zebrafish: a utilização adaptada de testes aplicados em roedores, ou, explorar e abordar situações que poderiam eliciar medo ou ansiedade nesse animal (Blaser, Chadwick & McGinnis, 2010).

O zebrafish quando testado em nado livre, não apresenta em quantidade significativa, comportamentos que são associados a ansiedade, como o freezing, ou associados ao medo, como os movimentos erráticos e saltos. Já em condições experimentais, esses comportamentos podem ser observados como marcadores comportamentais desses estados. Em experimentos que utilizam o teste de preferência claro e escuro, foi observada a preferência do animal pela câmara escura, em detrimento da câmara clara, o que pode ser uma variável dependente promissora para a mensuração de estados associados à ansiedade, tendo no comportamento de freezing, o melhor parâmetro observacional.

Com mais atenção a esse comportamento, não se pode afirmar ao certo o que desencadeia o freezing nessa situação. Uma vez que, a preferência desse animal a câmara escura, seria um instinto protetivo inato, ou seja, esse animal evita a área clara quando as duas opções (claro e escuro) estão disponíveis, preferindo a escuridão por motivos de cobertura. Já quando ele é confinado a um tanque claro, apresenta o comportamento inicial de freezing, que pode ser associado a ansiedade.

Em um trabalho posterior, Blaser e Rosemberg (2012) apresentaram outras singularidades que envolvem cripticidade do fundo, e a preferência ao mesmo em diferentes fases do ciclo de vida (informações essas que estão interligadas com acasalamento ou fuga), o que é muito relacionado ao instinto desse animal ao agrupamento. Entretanto, esse estudo

levanta questões sobre replicabilidade, uma vez que seus resultados trouxeram uma preferência por tanques transparentes e escuros em detrimento do branco, o que, pode ser associado a fatores externos da testagem, gerando um problema quando o estudo precisar ser replicado para consolidação de um modelo de teste de ansiedade.

Porém, até o momento, o teste de preferência entre claro/escuro se mostrou o melhor para o entendimento do fator ansiedade, como supracitado, esse teste coloca em conflito dois instintos natos do zebrafish, proteção e exploração, assim, resultando em parâmetros que são associados a um comportamento ansioso, especialmente o freezing, parâmetros esses observados nos três primeiros minutos de teste, onde após esse tempo, o animal mostra sinais de habituação, e retorna ao seu comportamento normal.

## TRANSTORNO DO ESPECTRO AUTISTA (TEA)

O Transtorno do espectro autista (TEA) é uma disfunção mental que afeta parte significativa da população. Esse transtorno apresenta como sintomatologia a comunicação social deficitária, um comportamento repetitivo recorrente e déficit cognitivo (Stewart et al., 2014) e, como em vários outros transtornos cognitivos, possui alto fator fenotípico hereditário. Atualmente, alguns genes já podem ser associados de forma precisa a essa condição, porém, outros fatores externos também estão inclusos, dificultando assim o entendimento da condição como um todo. O tratamento farmacológico é limitado e não conta com fármacos específicos para essa condição.

Nesse sentido, o uso do zebrafish representa um importante e promissor modelo de estudo farmacológico. É pertinente destacar a relativa facilidade de administração de substâncias hidrossolúveis, evitando assim a necessidade de formas invasivas de administração. Isso reduz o estresse causado no animal por ser manipulado. Com essa proposição em mente, levanta-se a possibilidade do uso desse modelo animal para o estudo do TEA. Os modelos atuais para o estudo desse transtorno são em sua maioria desenvolvidos em roedores, que apresentam vantagens de comportamento social complexo, porém algumas desvantagens na testagem e associação de comportamentos a comportamentos associados ao TEA.

No estudo desse modelo, Stewart et al. (2014) aponta a complexidade social intrínseca do modelo zebrafish no que tange a formação de grupos e por consequência, a ansiedade de separação quando esses são afastados dos seus coespecíficos. Esse tipo de comportamento que

pode ser documentado, sistematizado e mensurado, abre portas para o estudo do transtorno do espectro autista, uma vez que esses são aspectos típicos (apresentadas no zebrafish de forma menos complexa e intrincada) que caracterizam o espectro autista. Onde, após diversas testagens, pode-se refinar e diferenciar os animais que por sua vez não apresentam o comportamento social de agrupamento de forma natural, também interessante mencionar que esses comportamentos podem ser evidenciados pela adição de fármacos e modificação gênica, ampliando, assim, as oportunidades investigativas.

Em relação a essas interações, é considerável mencionar que, nenhum modelo animal pode compreender toda a complexidade dessa síndrome, uma vez que ela tem se mostrado cada vez mais complexa e relativa. Porém, pode-se desenvolver modelos e testes que, abordam aspectos específicos (genéticos, neurofisiológicos) dessa condição e combiná-los para a formação de um bom modelo translacional.

## TRANSTORNO DE DÉFICIT DE ATENÇÃO E HIPERATIVIDADE (TDAH)

O Déficit de atenção e hiperatividade (TDAH) é uma condição bastante comum, que tem sido intensamente investigada na atualidade. Clinicamente, essa condição é caracterizada por altos níveis de hiperatividade, impulsividade, fala excessiva e falta de atenção (Halperin, Matier, Bedi, Sharma & Newcorn, 1992; Spencer, Biederman & Mick 2007), são associados ao TDAH diversos genes, incluindo reguladores de dopamina, serotonina e noradrenalina, bem como fatores ambientais e pré-natais (abuso de substâncias durante a gravidez e nascimento prematuro são citados).

Existem alguns tratamentos farmacológicos para esse transtorno, e esses, combinados ao tratamento psicoterápico, tem apresentado resultados promissores no controle sintomático.

Neste cenário investigativo, o uso do zebrafish como modelo de estudo molecular e farmacológico dessa condição apresenta aspectos promissores que visam o desenvolvimento de fármacos mais eficazes e específicos. Sob o ponto de vista etológico, vários comportamentos podem ser associados a comportamentos característicos do TDAH, ainda que de forma rudimentar, fornecendo assim uma melhor compreensão da origem desse transtorno.

Um modelo de estudo de TDAH precisa expressar algumas características fundamentais relacionadas a esse transtorno como, impulsividade, falta de atenção e hiperatividade (Russell,

Sagvolden & Johansen 2005; Sagvolden, Russell, Aase, Johansen & Farshbaf, 2005). Esses comportamentos podem ser vistos no zebrafish, de forma simplificada. E, embora os estudos envolvendo esse animal não sejam específicos quanto aos genes que expressam determinados comportamentos, existem alguns testes que podem implicar um ou mais desses fatores associados ao TDAH. Um desses testes é o “*five choice serial reaction time task*” (5-CSRTT) que mede a capacidade do zebrafish em responder a cinco estímulos perceptualmente idênticos, apresentados em locais diferentes do aparato de teste em períodos aleatórios de tempo. Esse procedimento permite avaliar a atenção seletiva e por consequência a impulsividade desse animal (Fontana et al., 2019; Parker, Brock, Sudwarts & Brennan, 2014).

## SUBSTÂNCIAS PSICOATIVAS

### NICOTINA E A MEMÓRIA

É conhecido que o sistema colinérgico tem importante papel na memória e no processo de aprendizado de vertebrados e invertebrados. Essa importância inclui os animais teleósteos, como o zebrafish, que apresenta diversas estruturas relacionadas a memória e aprendizagem homólogas a estruturas observadas em mamíferos. Diversas pesquisas sugerem que o zebrafish possui uma memória espacial desenvolvida e que pode ser avaliada por meio de testes comportamentais (VORT-Virtual Object Recognition Test e T-maze). Essa característica torna possível o uso desse modelo comportamental no estudo de diversos distúrbios como Alzheimer, autismo e esquizofrenia, uma vez que, em todas essas condições, a memória e a localização espacial são bastante debilitadas. Faillace et al. (2017), sugere que a nicotina pode ser usada para modulação da memória, uma vez que a mesma e seus antagonistas podem melhorar ou piorar esse parâmetro dependendo da dosagem.

Alguns estudos sugerem que o zebrafish possui uma preferência inata a exploração de objetos novos, o que pode indicar reconhecimento/memória, onde a administração dessas drogas, ficaram conhecidas por modificar esse comportamento. Em Faillace et. al (2017) o zebrafish passou um tempo significativamente maior explorando formas cúbicas e circulares de mesmo tamanho, do que torres de tamanho maior, resultado esse que foi alterado na presença

de nicotina e fenilbutirato, o que sugere que essas drogas aumentam a capacidade desse animal em realizar distinções de tamanho e forma, em adição as cores.

Embora possamos associar a preferência na exploração dos objetos menores com memória, não se pode afirmar ao certo se, aquele objeto conhecido não elicia outro tipo de reação nesse animal, uma vez que se pode associar também a um medo inato ou ainda a falta de atratividade do mesmo. Ou seja, só podemos associar esse comportamento a memória quando existe a certeza de que ambos os objetos – conhecido e novo – em tese, suscitam o mesmo tipo comportamento.

## COCAÍNA

A cocaína é considerada uma das drogas ilegais mais consumidas e danosas da atualidade. Essa substância consiste em um alcaloide psicoativo de ação estimulante do sistema nervoso central muito utilizada como droga recreativa. Quando há exposição pré-natal em humanos, são relatados efeitos no bebê de alterações emocionais e déficits de atenção, o que, também pode acarretar problemas de memória e aprendizagem e de adaptações sociais (Riley, Maymi, Pawlyszyn, Yu & Zhdanova, 2018), características notavelmente associadas a diversas patologias, como autismo. Em estudos com o zebrafish, foi observada uma alteração de padrão onde, houve uma diminuição de resposta quando apresentados a luzes vermelhas, abrindo portas para o entendimento do papel dessa droga na habituação desses animais (Riley, Kopotiyenko & Zhdanova, 2015).

Riley e colaboradores em um estudo de 2018 observaram que as vias dopaminérgicas são afetadas com a exposição pré-natal crônica de cocaína, e como consequência disso, é observado nesses indivíduos uma tolerância maior a essas substâncias devido a exposição prematura (Heyser, Rajachandran, Spear & Spear, 1994; Meyer, Sherlock & Macdonald, 1992; Slamberová et al. 2012; Stanwood & Levitt, 2003).

O zebrafish (adulto) responde a ingestão aguda de cocaína mostrando comportamentos associados a ansiedade e, quando essa substância é retirada, sua abstinência modula os transportadores de dopamina, enquanto a ingestão pré-natal interfere na morfologia do tectum óptico desses animais (área de processamento visual nesses animais, homóloga ao colículo superior em mamíferos). É importante conhecer esses mecanismos, visto que, podem ser de

importante função para o desenvolvimento de drogas e tratamentos para TDAH e para as outras consequências da exposição pré-natal a cocaína, uma vez que a tolerância e modulação dessa droga podem ser observadas em estágios de desenvolvimento desse animal.

Riley et al. (2015), sugere que a cocaína inibe as respostas a flashes de luz de diferentes espectros processados pelo tectum óptico, onde é importante notar que, embora tenham sido observadas alterações na apresentação pré-natal, não foram observadas mudanças imediatas significativas. Todavia, no decorrer do desenvolvimento desses animais os inibidores dos efeitos da cocaína no que tange processos visuais são considerados ausentes, o que pode indicar que o tectum óptico modula as mudanças ativas referentes a essa exposição.

## FÁRMACOS E TOXINAS

Como exposto, o TDAH é um distúrbio bastante comum, onde cada vez mais indivíduos são diagnosticados e medicados. O medicamento mais comum para esse transtorno é a Ritalina®, cujo princípio ativo é a substância Metilfenidato, um fármaco estimulante do sistema nervoso central. Esse fármaco atua de forma a estimular o aumento da produção e liberação de norepinefrina e dopamina no sistema nervoso central (Berridge et al. 2006). Este estudo foi observado um aumento nos níveis desses neurotransmissores após exposição embrionária, porém, esse nível elevado não se manteve após um mês de fertilização. Mais a fundo, quando realizado o teste de introdução ao tanque novo nesses animais foi observado que essa exposição embrionária alterou significativamente o comportamento de mergulho desses animais comparados ao grupo controle, assim como o percentual de tempo que eles exibiam o comportamento de nado de fundo. Em outro teste realizado, “three chamber spatial learning”, também se notou uma alteração, onde essa substância diminuiu a capacidade desses animais em reter e reproduzir memórias de localização espacial.

Como o alvo de ação dessa substância é o cérebro, com base nesses resultados conclui-se que esse fármaco possui efeitos de curto e longo prazo nos animais (possivelmente também em humanos em fase embrionária) uma vez que, a curto prazo houve um desbalanço neuroquímico nos animais expostos a substância *in-vitro*, e, a longo prazo podem ser associados problemas no comportamento de predação e retenção de memória espacial. O que, de forma translacional, pode levantar a questão do risco da exposição de fetos humanos a essa substância, uma vez que foi observado que a mesma possui efeitos permanentes na estrutura cerebral.

Dando seguimento as substâncias, traz-se ao foco agora não um fármaco, mas uma toxina, o éter decabromodifenílico ou BDE-209, listado na convenção de Estocolmo como um poluente orgânico bastante perigoso e persistente (nota-se que outras toxinas da mesma classe foram banidas em convenções anteriores), onde é válido mencionar que embora a toxina em si tenha essa restrição, seu uso comercial ainda é feito, como um retardador de chamas. O que é levantado em estudos a respeito dele, se refere ao seu potencial tóxico, os efeitos da sua exposição a tireoide, estresse, embriologia, reprodução e memória.

Em Chen et al. (2018), o sistema visual foi reconhecido como potencial afetado por poluentes ambientais, e visto que esse sistema em si pode ser indicador de comportamento neuronal normal (ou não), essa pode ser uma boa porta de entrada para a avaliação dos efeitos de substâncias tóxicas. Partindo disso, os resultados de Zhang, Xu, Yin e Wei (2020), mostraram que a exposição a essa substância no zebrafish sete dias após fertilização, trouxe um padrão incomum de nado hiperativo prejudicando a expressão normal de comportamento responsivo a luz do mesmo. Em coleção de diversos estudos dessa substância e de outras mesmas da família dos éteres fenílicos é que esse tem efeitos supressivo na expressão de genes que danificam a retina e a formação do sistema visual. Embora esses resultados sejam conclusivos nos efeitos dessa toxina no sistema visual, não foram encontradas ligações dela com alterações na tireoide.

## CAFEÍNA

Na correria dos dias atuais, o ser humano nunca pode parar, e para que isso seja possível muitas vezes se recorre a um estimulante para acompanhar a agitação, muitas das vezes o estimulante de escolha é a cafeína, presente em diversas formas como cafés, energéticos, chás e até chocolates. Essa substância é um antagonista não específico da adenosina, e seus efeitos giram em torno do tempo de resposta, alerta e diminuição da fadiga. E, é importante notar que a cafeína funciona de forma relativa à quantidade onde, dosagens baixas e medias aumentam a capacidade locomotora e a concentração, porém, dosagens altas aumentam a frequência cardíaca e pressão arterial, e suprimem hormônios como epinefrina e cortisol associando altos níveis de cafeína ao estresse e ansiedade.

O aumento da performance atenta provocada pela cafeína é relacionado aos receptores de adenosina, durante períodos extensos de alerta, o acúmulo de adenosina sinaliza que o

cérebro precisa descansar, porém com a adição da cafeína, ela adere aos receptores de adenosina e os estimulantes cerebrais naturais são mais prováveis a funcionar. Outro efeito modulador da cafeína é a regulação dos níveis de acetilcolina, influenciando no metabolismo e atividade, essa ativação do sistema colinérgico foi associada a funções cognitivas como atenção, memória e aprendizado (Fredholm, Bättig, Holmén, Nehlig & Zvartau, 1999)

Em Ruiz-Oliveira, Silva e Luchiari, 2019, foi avaliada a performance do zebrafish a exposição a essa substância em pequena e alta quantidade em detrimento da concentração para se obter uma recompensa. Onde sabe-se que o zebrafish possui uma tendência natural exploratória assim como a capacidade de associar um estímulo a uma pista visual. O teste consistiu na apresentação desse animal – previamente habituado a área de teste assim como a área alvo por condicionamento e recompensa – ao tanque onde os mesmos deveriam escolher a área alvo correta sem apresentação de recompensa, ou seja, o animal deveria se lembrar da localização da área alvo sem o auxílio da apresentação de uma recompensa.

Os animais em seguida foram tratados com duas doses crônicas de cafeína – uma mais baixa e outra mais alta - notou-se que o grupo controle e de exposição crônica baixa tiveram performances melhores, em detrimento do terceiro grupo que pode ser descrito com comportamento distrativo perante as tarefas. Assim como é importante mencionar que o tempo de freezing do grupo de exposição crônica menor a cafeína (10 mg/l) foi menor comparado aos outros grupos, essa quantidade de cafeína também melhorou o tempo de escolha do alvo correto na presença de distrações em detrimento aos outros grupos, esse grupo também teve uma velocidade maior comparado aos outros, e essa combinação de comportamentos pode ser interpretada como diminuição da fadiga.

## COMPORTAMENTO SOCIAL

Animais sociais, como o zebrafish, são observados formando grupos tanto em meio natural, quanto em laboratório. Comportamento esse imprescindível para a sobrevivência dos mesmos, pois tendem a formar grupos de coespecíficos, saudáveis e de cor semelhante. Isso pode ser uma grande ferramenta para se evitar predadores primariamente visuais.

Como mencionado anteriormente, déficits de comportamento e interação social podem estar associados a desenvolvimento neuronal. E com isso, o zebrafish tem se tornado uma



importante ferramenta para estudo dessa área por ser geneticamente modificável. Stednitz et al. (2018) realizaram um estudo em que foram realizadas alterações genéticas e lesões mecânicas na região do prosencéfalo com o objetivo de identificar o conjunto de células responsáveis pelo comportamento social desse animal – sem danificar regiões adjacentes. O zebrafish é um animal extremamente social, realizando agrupamentos e se direcionando ao seus coespecíficos, comportamento esse observado em qualquer linhagem desse animal, em ambos os sexos. Então, para um estudo preciso da supressão desse comportamento, é necessário identificar bem o estímulo, pois, mudanças sutis no mesmo, podem alterar o comportamento de resposta, como proximidade, atividade e orientação. Após o tratamento desses animais com um receptor antagonista da dopamina (apomorfina), foi notada uma alteração de comportamento semelhante a observada em roedores em Arakawa e Ikeda (1991). Também se observou que um estímulo eficiente é de um peixe socialmente engajado, uma vez que um coespecífico não responsivo, não catalisa o comportamento social. E, feita manipulação farmacológica, assim como a retirada de uma porção do prosencéfalo observa-se, déficits prognosticáveis na exibição de tal comportamento. Em adição, foi identificada uma porção crítica de neurônios colinérgicos no telencéfalo que também são de grande importância na exibição do comportamento social nesses animais.

Trazendo ao foco esse comportamento social numa perspectiva evolutiva, pode-se associar o agrupamento do zebrafish a sobrevivência, uma vez que consideremos a chamado “oddy effect hypothesis”, que consiste na dificuldade do predador focar em uma presa específica, uma vez que todos os indivíduos são semelhantes então, uma vantagem é a formação de grupos homogêneos, pois, um indivíduo diferente pode não só atrair atenção para si como atrair atenção do predador ao grupo (Ohguchi 1978; Landeu & Terbogrh 1986; Perry-Williams, Ioannou & Taylor, 2018; Ruxton, Jackson & Tosh, 2007; Theodorakis 1989; Tosh, Jackson & Ruxton, 2006).

Considerando essa hipótese, é plausível que indivíduos similares escolham se agrupar, porém, o critério de agrupamento escolhido é dependente da predação. Um predador que é orientado pela cor, não será dissuadido pela homogeneidade referente ao tamanho e vice-versa.

Um conhecido predador do zebrafish é o peixe-agulha (needlefish), e esse foi o animal utilizado no estudo de Aivaz et al. 2019, que após uma bateria de testes usando diversos agrupamentos do zebrafish – grupo homogêneo com indivíduos grandes (marrom), grupo homogêneo com indivíduos pequenos (vermelho), grupo heterogêneo de indivíduos pequenos

(um marrom, o restante vermelho), grupo heterogêneo de indivíduos pequenos (um vermelho, o restante marrom), grupo heterogêneo de indivíduos marrons (indivíduos pequenos, um de tamanho maior) e, grupo heterogêneo de indivíduos marrons (indivíduos grandes, um de tamanho menor) – apontou que, dadas as condições de escolha, o peixe-agulha pretere o grupo heterogêneo, tanto em relação ao tamanho quanto em relação a cor. Observou-se também que os predadores preferiam grupos heterogêneos com peixes de cores diferentes a tamanhos diferentes.

Sendo assim, é importante frisar a importância da socialização para a evolução e sobrevivência do zebrafish, uma vez que, a associação - ainda mais entre indivíduos semelhantes – pode ser uma questão de vida ou de morte para esse animal, uma vez que são menos atrativos a um predador quando agrupados.

## CONCLUSÃO

O presente estudo contribuiu para uma visão ampla e integrada da utilidade do modelo zebrafish como modelo translacional para diversas áreas da neurologia, neurobiologia e psicobiologia. Através de abordagens em sua maioria minimamente invasivas, pode se explorar uma vasta gama de reações comportamentais que podem ser usadas para aprimorar nossos modelos *in vivo* atuais, assim, fornecendo um modelo preciso sem danos significantes ao mesmo.

Vários mecanismos de resposta desse modelo foram abordados, e com isso concluiu-se que o zebrafish apresenta respostas orientadas após habituação, o que tende ao aumento da excitação quando os animais são expostos a uma substância de alarme, assim como o estímulo à luz de forma abrupta uma “*startle response*” onde a atividade locomotora aumenta significativamente. Esse comportamento é seguido por um aumento de ansiedade que é caracterizado por uma rápida diminuição da atividade motora.

Não só o zebrafish foi testado em si, mas também diversos testes foram abordados usando esse modelo, com o intuito do aprimoramento e unificação dos mesmos visando uma fonte sem parcialidade, e com alta potencial de replicabilidade. É notável a necessidade do

desenvolvimento de experimentos específicos ao zebrafish que possam atender aos critérios de replicabilidade e reprodutibilidade (Gerlai, 2019).

O efeito de substâncias também foi abordado, visto que, por sua facilidade de manuseio e apresentação de substâncias e fármacos hidrosolúveis, diminuindo assim o estresse pelo manuseio. Pode-se observar que esse modelo responde de formas diferentes a substâncias diversas, o que abre uma alta gama de possibilidades para o estudo de fármacos de tratamento e retenção de doenças, assim como futuramente, o estudo de neurotoxinas em estruturas análogas a humanas.

Observa-se uma grande possibilidade de se estudar alguns aspectos de doenças como Parkinson, Alzheimer, TEA e o TDAH, visto que esse modelo pode ser modificado e modulado para apresentação de comportamentos característicos desses transtornos. A intervenção farmacológica e esses podem ser observados e tratados com fármacos, abrindo assim, possibilidades de tratamentos experimentais para futuros testes clínicos, também esperançosamente, solidificando esse modelo zebrafish como um modelo translacional.

Com a análise desses trabalhos, conclui-se que o zebrafish é um modelo muito promissor para os estudos biológicos, porém, ainda há um caminho a percorrer para que ele seja solidificado.

## REFERÊNCIAS

\* Artigos utilizados na revisão sistemática

\* Aivaz, A. N., Manica, A., Neuhaus, P., & Ruckstuhl, K. E. (2020). Picky predators and odd prey: colour and size matter in predator choice and zebrafish's vulnerability—a refinement of the oddity effect. *Ethology Ecology & Evolution*, 32(2), 135-147.

Ajtai, B. M., & Kálmán, M. (2001). Reactive glia support and guide axon growth in the rat thalamus during the first postnatal week. A sharply timed transition from permissive to non-permissive stage. *International Journal of Developmental Neuroscience*, 19(6), 589-597.

Anastopoulos, A. D., DuPaul, G. J., Weyandt, L. L., Morrissey-Kane, E., Sommer, J. L., Rhoads, L. H., ... & Gudmundsdottir, B. G. (2018). Rates and patterns of comorbidity among first-year college students with ADHD. *Journal of Clinical Child & Adolescent Psychology*, 47(2), 236-247.

\* Aoki, R., Tsuboi, T., & Okamoto, H. (2015). Y-maze avoidance: An automated and rapid associative learning paradigm in zebrafish. *Neuroscience research*, 91, 69-72.

Arakawa, O., & Ikeda, T. (1991). Apomorphine effect on single and paired rat open-field behavior. *Physiology & behavior*, 50(1), 189-194.

\* Avdesh, A., Martin-Iverson, M. T., Mondal, A., Chen, M., Askraba, S., Morgan, N., ... & Martins, R. N. (2012). Evaluation of color preference in zebrafish for learning and memory. *Journal of Alzheimer's Disease*, 28(2), 459-469.

Baker, M. (2016). Reproducibility: seek out stronger science. *Nature*, 537(7622), 703-704.

\* Barker, A. J., & Baier, H. (2015). Sensorimotor decision making in the zebrafish tectum. *Current Biology*, 25(21), 2804-2814.

Beppi, C., Straumann, D., & Bögli, S. Y. (2021). A model-based quantification of startle reflex habituation in larval zebrafish. *Scientific Reports*, 11(1), 1-14.

Berridge, C. W., Devilbiss, D. M., Andrzejewski, M. E., Arnsten, A. F., Kelley, A. E., Schmeichel, B., ... & Spencer, R. C. (2006). Methylphenidate preferentially increases

catecholamine neurotransmission within the prefrontal cortex at low doses that enhance cognitive function. *Biological psychiatry*, 60(10), 1111-1120.

\* Bilotta, J., & Saszik, S. (2001). The zebrafish as a model visual system. *International Journal of Developmental Neuroscience*, 19(7), 621-629.

Blaser, R. E., & Penalosa, Y. M. (2011). Stimuli affecting zebrafish (*Danio rerio*) behavior in the light/dark preference test. *Physiology & behavior*, 104(5), 831-837.

\* Blaser, R. E., & Rosemberg, D. B. (2012). Measures of anxiety in zebrafish (*Danio rerio*): dissociation of black/white preference and novel tank test. *PloS one*, 7(5), e36931.

\* Blaser, R. E., Chadwick, L., & McGinnis, G. C. (2010). Behavioral measures of anxiety in zebrafish (*Danio rerio*). *Behavioural brain research*, 208(1), 56-62.

\* Bloch, S., Froc, C., Pontiggia, A., & Yamamoto, K. (2019). Existence of working memory in teleosts: establishment of the delayed matching-to-sample task in adult zebrafish. *Behavioural brain research*, 370, 111924

\* Braida, D., Ponzoni, L., Martucci, R., & Sala, M. (2014). A new model to study visual attention in zebrafish. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*, 55, 80-86.

Buchanan, F. (1822). *An Account of the Fishes Found in the River Ganges & Its Branches*. A. Constable & Company.

Campanari, M. L., Bourefis, A. R., Buee-Scherrer, V., & Kabashi, E. (2020). Freezing activity brief data from a new FUS mutant zebrafish line. *Data in Brief*, 31, 105921.

Champagne, D. L., Hoefnagels, C. C., De Kloet, R. E., & Richardson, M. K. (2010). Translating rodent behavioral repertoire to zebrafish (*Danio rerio*): relevance for stress research. *Behavioural brain research*, 214(2), 332-342.

Chen, L., Tsui, M. M., Shi, Q., Hu, C., Wang, Q., Zhou, B., ... & Lam, J. C. (2018). Accumulation of perfluorobutane sulfonate (PFBS) and impairment of visual function in the eyes of marine medaka after a life-cycle exposure. *Aquatic Toxicology*, 201, 1-10.

Darland, T., & Dowling, J. E. (2001). Behavioral screening for cocaine sensitivity in mutagenized zebrafish. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 98(20), 11691-11696.

\* do Nascimento, B. G., e Oliveira, H. S. T. O., Silva, H. T. L., de Siqueira-Silva, D. H., Lima-Maximino, M., & Maximino, C. (2020). A model to study orienting responses in zebrafish, and applications towards the emotion–cognition interaction. *Animal Cognition*, 23(5), 965-972.

Easter Jr, S. S., & Nicola, G. N. (1996). The development of vision in the zebrafish (*Danio rerio*). *Developmental biology*, 180(2), 646-663.

\* Echevarria, D. J., Jouandot, D. J., & Toms, C. N. (2011). Assessing attention in the zebrafish: Are we there yet?. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*, 35(6), 1416-1420.

\* Facciol, A., Tran, S., & Gerlai, R. (2017). Re-examining the factors affecting choice in the light–dark preference test in zebrafish. *Behavioural brain research*, 327, 21-28.

\* Faillace, M. P., Pisera-Fuster, A., Medrano, M. P., Bejarano, A. C., & Bernabeu, R. O. (2017). Short-and long-term effects of nicotine and the histone deacetylase inhibitor phenylbutyrate on novel object recognition in zebrafish. *Psychopharmacology*, 234(6), 943-955.

\* Fontana, B. D., Francescon, F., Rosemberg, D. B., Norton, W. H., Kalueff, A. V., & Parker, M. O. (2019). Zebrafish models for attention deficit hyperactivity disorder (ADHD). *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, 100, 9-18.

Fredholm, B. B., Bättig, K., Holmén, J., Nehlig, A., & Zvartau, E. E. (1999). Actions of caffeine in the brain with special reference to factors that contribute to its widespread use. *Pharmacological reviews*, 51(1), 83-133.

Gahtan, E., Tanger, P., & Baier, H. (2005). Visual prey capture in larval zebrafish is controlled by identified reticulospinal neurons downstream of the tectum. *Journal of Neuroscience*, 25(40), 9294-9303.

\* Gerlai, R. (2019). Reproducibility and replicability in zebrafish behavioral neuroscience research. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 178, 30-38.

Gerlai, R., Lahav, M., Guo, S., & Rosenthal, A. (2000). Drinks like a fish: zebra fish (*Danio rerio*) as a behavior genetic model to study alcohol effects. *Pharmacology biochemistry and behavior*, 67(4), 773-782.

Gowan, J. D., Coizet, V., Devonshire, I. M., & Overton, P. G. (2008). D-amphetamine depresses visual responses in the rat superior colliculus: a possible mechanism for amphetamine-induced decreases in distractibility. *Journal of Neural Transmission*, 115(3), 377-387.

Grienberger, C., & Konnerth, A. (2012). Imaging calcium in neurons. *Neuron*, 73(5), 862-885.

Halperin, J. M., Matier, K., Bedi, G., Sharma, V., & Newcorn, J. H. (1992). Specificity of inattention, impulsivity, and hyperactivity to the diagnosis of attention-deficit hyperactivity disorder. *Journal of the American Academy of Child & Adolescent Psychiatry*, 31(2), 190-196.

Hamilton, F. (1822). *An account of the fishes found in the river Ganges and its branches* (Vol. 1). Archibald Constable.

Heyser, C. J., Rajachandran, L., Spear, N. E., & Spear, L. P. (1994). Responsiveness to cocaine challenge in adult rats following prenatal exposure to cocaine. *Psychopharmacology*, 116(1), 45-55.

\* Jia, J., Fernandes, Y., & Gerlai, R. (2014). Short-term memory in zebrafish (*Danio rerio*). *Behavioural brain research*, 270, 29-36.

Kandel, E. R., Schwartz, J. H., Jessell, T. M., Siegelbaum, S., Hudspeth, A. J., & Mack, S. (Eds.). (2000). *Principles of neural science*. 4. ed. New York: McGraw-hill.

Kessler, R. C., Adler, L., Barkley, R., Biederman, J., Conners, C. K., Demler, O., ... & Zaslavsky, A. M. (2006). The prevalence and correlates of adult ADHD in the United States: results from the National Comorbidity Survey Replication. *American Journal of psychiatry*, 163(4), 716-723.

Kimmel, C. B., Patterson, J., & Kimmel, R. O. (1974). The development and behavioral characteristics of the startle response in the zebra fish. *Developmental Psychobiology: The Journal of the International Society for Developmental Psychobiology*, 7(1), 47-60.

Krauss, A., & Neumeier, C. (2003). Wavelength dependence of the optomotor response in zebrafish (*Danio rerio*). *Vision research*, 43(11), 1275-1284.

Landeau, L., & Terborgh, J. (1986). Oddity and the 'confusion effect' in predation. *Animal Behaviour*, 34(5), 1372-1380.

\* Levin, E. D., Sledge, D., Roach, S., Petro, A., Donerly, S., & Linney, E. (2011). Persistent behavioral impairment caused by embryonic methylphenidate exposure in zebrafish. *Neurotoxicology and teratology*, 33(6), 668-673.

\* Luisa, P., Sala, M., & Braidà, D. (2016). Zebrafish: An Animal Model to Study Nicotinic Drugs on Spatial Memory and Visual Attention. In *Nicotinic Acetylcholine Receptor Technologies* (pp. 33-50). Humana Press, New York, NY.

Marraccini, M. E., Weyandt, L. L., Gudmundsdottir, B. G., Oster, D. R., & McCallum, A. (2017). Attention-Deficit Hyperactivity Disorder: Clinical Considerations for Women. *Journal of midwifery & women's health*, 62(6), 684-695.

\* Maximino, C., de Brito, T. M., Colmanetti, R., Pontes, A. A. A., de Castro, H. M., de Lacerda, R. I. T., ... & Gouveia Jr, A. (2010). Parametric analyses of anxiety in zebrafish scototaxis. *Behavioural brain research*, 210(1), 1-7.

Maximino, C., de Brito, T. M., da Silva Batista, A. W., Herculano, A. M., Morato, S., & Gouveia Jr, A. (2010). Measuring anxiety in zebrafish: a critical review. *Behavioural brain research*, 214(2), 157-171

Maximino, C., do Carmo Silva, R. X., dos Santos Campos, K., de Oliveira, J. S., Rocha, S. P., Pyterson, M. P., ... & Lima-Maximino, M. (2019). Sensory ecology of ostariophysan alarm substances. *Journal of fish biology*, 95(1), 274-286.

Maximino, Caio. A assimetria cerebral em uma perspectiva evolutiva. In: *Blog da sociedade brasileira de neurociências e comportamento*. A assimetria cerebral em uma perspectiva evolutiva. [S. l.], 13 maio 2009. Disponível em: <http://blog.sbneec.org.br/2009/05/a-assimetria-cerebral-em-uma-perspectiva-evolutiva/>. Acesso em: 21 set. 2021.

Meier, A., Nelson, R., & Connaughton, V. P. (2018). Color processing in zebrafish retina. *Frontiers in cellular neuroscience*, 12, 327.



Meshalkina, D. A., Kizlyk, M. N., Kysil, E. V., Collier, A. D., Echevarria, D. J., Abreu, M. S., ... & Kalueff, A. V. (2018). Zebrafish models of autism spectrum disorder. *Experimental neurology*, 299, 207-216.

Meyer, J. S., Sherlock, J. D., & Macdonald, N. R. (1992). Effects of prenatal cocaine on behavioral responses to a cocaine challenge on postnatal day 11. *Neurotoxicology and teratology*, 14(3), 183-189.

Moher, D., Tetzlaff, J., Tricco, A. C., Sampson, M., & Altman, D. G. (2007). Epidemiology and reporting characteristics of systematic reviews. *PLoS medicine*, 4(3), e78.

Morris, A. C., & Fadool, J. M. (2005). Studying rod photoreceptor development in zebrafish. *Physiology & behavior*, 86(3), 306-313.

Mueller, T., & Wullimann, M. F. (2009). An evolutionary interpretation of teleostean forebrain anatomy. *Brain, behavior and evolution*, 74(1), 30-42.

Neuhauss, S. C. (2003). Behavioral genetic approaches to visual system development and function in zebrafish. *Journal of neurobiology*, 54(1), 148-160.

Ohguchi, O. (1978). Experiments on the selection against colour oddity of water fleas by three-spined sticklebacks. *Zeitschrift für Tierpsychologie*, 47(3), 254-267.

Orger, M. B., & de Polavieja, G. G. (2017). Zebrafish behavior: opportunities and challenges. *Annual review of neuroscience*, 40, 125-147.

\* Orger, M. B., Smear, M. C., Anstis, S. M., & Baier, H. (2000). Perception of Fourier and non-Fourier motion by larval zebrafish. *Nature neuroscience*, 3(11), 1128-1133.

Overton, P. G., & Devonshire, I. M. (2008). Cocaine facilitates craving via an action on sensory processing. *Bioscience Hypotheses*, 1(2), 70-77.

Parker, M. O., Brock, A. J., Sudwarts, A., & Brennan, C. H. (2014). Atomoxetine reduces anticipatory responding in a 5-choice serial reaction time task for adult zebrafish. *Psychopharmacology*, 231(13), 2671-2679.

Penry-Williams, I. L., Ioannou, C. C., & Taylor, M. I. (2018). The oddity effect drives prey choice but not necessarily attack time. *Ethology*, *124*(7), 496-503.

Popper, K. (2013). *A lógica da pesquisa científica* (2<sup>o</sup>th ed.) Cultrix.

Portavella, M., Torres, B., & Salas, C. (2004). Avoidance response in goldfish: emotional and temporal involvement of medial and lateral telencephalic pallium. *Journal of Neuroscience*, *24*(9), 2335-2342.

\* Portugues, R., & Engert, F. (2009). The neural basis of visual behaviors in the larval zebrafish. *Current opinion in neurobiology*, *19*(6), 644-647.

Proulx, M. J., Parker, M. O., Tahir, Y., & Brennan, C. H. (2014). Parallel mechanisms for visual search in zebrafish. *PLoS One*, *9*(10), e111540.

Puma, C., Deschaux, O., Molimard, R., & Bizot, J. C. (1999). Nicotine improves memory in an object recognition task in rats. *European Neuropsychopharmacology*, *9*(4), 323-327.

Rainey, K. (2015). *Zebrafish Flex Their Muscles Aboard the International Space Station*. [http://www.nasa.gov/mission\\_pages/station/research/news/zebrafish\\_muscle](http://www.nasa.gov/mission_pages/station/research/news/zebrafish_muscle)

\* Riley, E., Kopotiyenko, K., & Zhdanova, I. (2015). Prenatal and acute cocaine exposure affects neural responses and habituation to visual stimuli. *Frontiers in neural circuits*, *9*, 41.

\* Riley, E., Maymi, V., Pawlyszyn, S., Yu, L., & Zhdanova, I. V. (2018). Prenatal cocaine exposure disrupts the dopaminergic system and its postnatal responses to cocaine. *Genes, Brain and Behavior*, *17*(4), e12436.

\* Risner, M. L., Lemerise, E., Vukmanic, E. V., & Moore, A. (2006). Behavioral spectral sensitivity of the zebrafish (*Danio rerio*). *Vision research*, *46*(17), 2625-2635.

\* Ruiz-Oliveira, J., Silva, P. F., & Luchiari, A. C. (2019). Coffee time: Low caffeine dose promotes attention and focus in zebrafish. *Learning & behavior*, *47*(3), 227-233.

Russell, V. A., Sagvolden, T., & Johansen, E. B. (2005). Animal models of attention-deficit hyperactivity disorder. *Behavioral and Brain functions*, *1*(1), 1-17.

Ruxton, G. D., Jackson, A. L., & Tosh, C. R. (2007). Confusion of predators does not rely on specialist coordinated behavior. *Behavioral Ecology*, 18(3), 590-596.

Sagvolden, T., Russell, V. A., Aase, H., Johansen, E. B., & Farshbaf, M. (2005). Rodent models of attention-deficit/hyperactivity disorder. *Biological psychiatry*, 57(11), 1239-1247.

Serra, E. L., Medalha, C. C., & Mattioli, R. (1999). Natural preference of zebrafish (*Danio rerio*) for a dark environment. *Brazilian journal of medical and biological research*, 32, 1551-1553.

Šlamberová, R., Yamamotová, A., Pometlová, M., Schutová, B., Hrubá, L., Nohejlová-Deykun, K., ... & Macúchová, E. (2012). Does prenatal methamphetamine exposure induce cross-sensitization to cocaine and morphine in adult male rats. *Prague Med Rep*, 113(3), 189-205.

Soares, V. D. M. (2009). *Efeitos da exposição aguda a nicotina sobre a atividade da acetilcolinesterase em cérebro do Peixe-Zebra (Danio rerio)* (Master's thesis, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul).

Spencer, T. J., Biederman, J., & Mick, E. (2007). Attention-deficit/hyperactivity disorder: diagnosis, lifespan, comorbidities, and neurobiology. *Journal of pediatric psychology*, 32(6), 631-642.

Stanwood, G. D., & Levitt, P. (2003). Repeated iv cocaine exposure produces long-lasting behavioral sensitization in pregnant adults, but behavioral tolerance in their offspring. *Neuroscience*, 122(3), 579-583.

\* Stednitz, S. J., McDermott, E. M., Ncube, D., Tallafuss, A., Eisen, J. S., & Washbourne, P. (2018). Forebrain control of behaviorally driven social orienting in zebrafish. *Current Biology*, 28(15), 2445-2451.

\* Stewart, A. M., Braubach, O., Spitsbergen, J., Gerlai, R., & Kalueff, A. V. (2014). Zebrafish models for translational neuroscience research: from tank to bedside. *Trends in neurosciences*, 37(5), 264-278.

Stewart, A. M., Nguyen, M., Wong, K., Poudel, M. K., & Kalueff, A. V. (2014). Developing zebrafish models of autism spectrum disorder (ASD). *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*, 50, 27-36.

Stewart, A., Gaikwad, S., Kyzar, E., Green, J., Roth, A., & Kalueff, A. V. (2012). Modeling anxiety using adult zebrafish: a conceptual review. *Neuropharmacology*, 62(1), 135-143.

*The New POPS*. (n.d.). Retrieved October 4, 2021, from <http://www.pops.int/TheConvention/ThePOPs/TheNewPOPs/tabid/2511/Default.aspx>

Tinsley, M. R., Quinn, J. J., & Fanselow, M. S. (2004). The role of muscarinic and nicotinic cholinergic neurotransmission in aversive conditioning: comparing pavlovian fear conditioning and inhibitory avoidance. *Learning & Memory*, 11(1), 35-42.

Theodorakis, C. W. (1989). Size segregation and the effects of oddity on predation risk in minnow schools. *Animal Behaviour*, 38(3), 496-502.

Tosh, C. R., Jackson, A. L., & Ruxton, G. D. (2006). The confusion effect in predatory neural networks. *The American Naturalist*, 167(2), E52-E65.

\* Zhang, B., Xu, T., Yin, D., & Wei, S. (2020). The potential relationship between neurobehavioral toxicity and visual dysfunction of BDE-209 on zebrafish larvae: a pilot study. *Environmental Sciences Europe*, 32(1), 1-8.