
Comportamento de zebrafish exposto a benzodiazepínicos

Behavior of zebrafish exposed to benzodiazepines

Luana Lima dos Santos¹, Bruno Paes De-Carli¹

¹Curso de Ciências Biológicas da Universidade Paulista, Santos – SP, Brasil.

Resumo

Objetivo – Avaliar o comportamento tipo ansiedade de zebrafish exposto a duas drogas benzodiazepínicas (Clonazepam e Alprazolam). **Métodos** – Quinze exemplares foram utilizados nos testes de ansiedade, sendo 6 expostos ao Clonazepam e 9 ao Alprazolam. Os animais foram expostos em um recipiente com 2mg/L de medicamento e logo após deslocados para o aquário com a divisão clara/escuro. Foi contabilizado o tempo de permanência em cada porção do aquário, quantidade de deslocamentos e subidas à superfície. Todos os sujeitos foram observados e o comportamento gravado em vídeo para análise a posterior. **Resultados** – Para o Clonazepam, apesar dos indivíduos permanecerem mais tempo no lado escuro, após exposição constatou-se maior número de deslocamentos para a porção branca. Por outro lado, em relação ao Alprazolam, os peixes permaneceram maior tempo na porção clara e com número maior de deslocamentos para parte escura. **Conclusão** – De forma parcial, os resultados demonstraram que os medicamentos podem auxiliar no combate a ansiedade, pois esses animais na natureza têm preferência pelo habitat escuro explicado por um comportamento anti-predatório. Quando expostos às drogas ansiolíticas, o comportamento tende a sofrer alterações, passando a ter uma preferência pelo flanco mais claro.

Descritores: Toxicologia; Ansiedade; Comportamento animal; Farmacologia

Abstract

Objective – To evaluate the anxiety behavior of the zebrafish exposed to two benzodiazepines drugs Clonazepam and Alprazolam. **Methods** – Fifteen specimens were used on the anxiety tests, six were exposed to Clonazepam and nine to Alprazolam. Animals were exposed in a recipient with 2mg/L of respective drug and, right after, they were moved to the aquarium with the light/dark division. It was counted the permanence time in each portion of the aquarium, quantity of moves and rises to surface. Every subject was observed and the behavior was recorded on video for further analysis. **Results** – For Clonazepam, even though the individuals stayed more time in the dark side, after the exposition, it was verified a higher number of moves to the white portion. On the other hand, in regarding to Alprazolam, the fishes remained more time in the white portion and there was a higher number of moves to the dark part. **Conclusion** – Partially, the results demonstrated that drugs can assist on the anxiety combat, because these animals have preference for the dark habitat, which is explained by an anti-predatory behavior. When exposed to the anxiolytics drugs, the behavior tends to suffer alterations, and they start to have preference for the lighter flank.

Descriptors: Toxicology; Anxiety; Animal behavior; Pharmacology

Introdução

A ansiedade é tratada como um estado emocional, onde o sujeito sente uma angústia, e ou, euforia com algum evento que possa, ou não, acontecer. Esse sentimento também está muito relacionado ao medo e a insegurança¹. É uma desordem complexa e com grande relevância clínica, cujo estudo com modelos animais é importante para pesquisar sobre os mecanismos e drogas para o seu tratamento². Estudos sobre o comportamento tipo ansiedade são realizados com animais, por exemplo, camundongos e peixes, usando métodos de claro/escuro. Aqui, os experimentos que foram empregados para detalhar e acompanhar a conduta dos mesmos são adaptações de testes de roedores (claro/escuro, labirintos)³.

O zebrafish (ZF) é um pequeno teleosteo usado atualmente como organismo modelo em diversas áreas das ciências. O ZF possui grande homologia com mamíferos (70-80%), apresenta um vasto repertório comportamental e, ainda, é sensível a diferentes compostos farmacológicos. Desse modo, a ciência possui um alto interesse sobre essa espécie e usa isso a favor, já que seus genes também são muito parecidos com os de humanos, podendo assim, estudar respostas comportamentais e mo-

leculares. Esses animais também são muito usados em testes de toxicidade por sua facilidade em absorver e metabolizar substâncias diversas, sendo assim são um ótimo indicador de mutações e doenças⁴⁻⁹.

Benzodiazepínicos são medicamentos considerados ansiolíticos, anticonvulsivantes e hipnóticos, utilizados para tratamento de ansiedade. Essa classe de fármacos é um dos mais usados no mundo, porém pode ser considerado um problema de saúde visto que seu uso prolongado e desorientado pode gerar dependência¹⁰. Em particular, o clonazepam figura como o medicamento mais vendido no Brasil entre os anos de 2007 e 2010, e está inserido no Programa de Monitoramento da Qualidade de Medicamentos de Saúde Mental do estado de São Paulo¹¹. O alprazolam é um benzodiazepínico de alta potência, indicado para o tratamento dos transtornos de ansiedade, do pânico e de ansiedade associada à depressão que apresenta menor efeito sedativo em comparação a outros medicamentos da mesma classe. O presente estudo teve como objetivo avaliar o comportamento tipo ansiedade de Zebrafish (*Danio rerio*) exposto à duas drogas benzodiazepínicas (Clonazepam e Alprazolam).

Métodos

O presente trabalho foi devidamente autorizado pelo Comitê de Ética animal da Universidade Paulista (UNIP), protocolo 068/17. Os indivíduos utilizados nos experimentos não foram sacrificados sendo mantidos em quarentena logo após os ensaios. Quinze exemplares de zebrafish (Figura 1) foram selecionados, sendo que o cardume foi mantido em um aquário de 120 litros (marca Boyu) com sistema de filtragem constituído de cerâmica e carvão ativado e alimentados com ração Tetramin em flocos.

O aquário teste contendo 20 litros de água de cultivo foi dividido em duas porções sendo uma clara e outra escura (altura: 30,0 cm; largura das laterais: 21,0 cm; comprimento total: 44,7 cm; lado preto: 22,2 cm; lado branco: 22,5 cm)¹². Para os testes com Alprazolam (n=9) e Clonazepam (n = 6), 2mg de cada substância foram diluídas com solução salina 0,9% adicionando 1 litro de água de cultivo constituindo uma solução estoque de 2 mg/L. O ensaio seguiu o seguinte delineamento: um grupo de peixes foi inserido em um aquário claro/escuro sem a exposição a droga, considerado "controle". Em seguida, os mesmos animais foram expostos a solução estoque dos dois medicamentos separadamente por 1 min e submetidos ao teste de claro/escuro, sendo essa etapa considerada "tratamento".

Os animais foram observados individualmente e suas ações monitoradas (2 minutos) para transcrição do comportamento *a posteriori*¹³. Assim, antes e após a exposição, o tempo de permanência, quantidade de deslocamentos e subidas a superfície foram quantificados. Para análise estatística, os dados foram submetidos ao teste de normalidade (Shapiro-Wilk) e homogeneidade de variâncias (Levene). Como os dados não atenderam esses pressupostos, foi conduzido o teste não paramétrico de Mann Whitney para amostras pareadas considerando as medianas. Todas as análises foram realizadas com um nível de significância de 95% ($\alpha = 0,05$)¹⁴.

Resultados

No período anterior a exposição, para o fármaco Alprazolam, o tempo de permanência no lado escuro variou de 3 a 110 segundos (33,00±34,61) (Figura 3A), enquanto que após oscilou entre 4 e 114 segundos (47,66±41,82) (Figura 3B). No lado claro antes da interação medicamentosa, o tempo de permanência variou entre 10 e 120 segundos (59,66±38,96) (Figura 3A); após a exposição variou de 13 a 117 segundos (66,33±46,33) (Figura 3B). Verificou-se que os peixes "controle" se deslocaram na banda clara entre 1 e 8 vezes (4,33±2,59) (Figura 4A); depois da exposição, entre 1 e 7 vezes (3,44±2,12) (Figura 4B). Por outro lado, na banda escura, antes do contato com o Alprazolam, houve variação entre 1 e 9 vezes (4,88±2,97) (Figura 4A); posteriormente, entre 1 e 6 vezes (3,66±2,23) (Figura 4B). Quanto às subidas para a superfície, podemos constatar que, anteriormente a submissão ao fármaco, oscilou entre 0 e 4 vezes (1,33±1,22); e posteriormente, entre 0 e 6 vezes

(1,44±2,18) (Figura 5). Houve a constatação de comportamento estático em três indivíduos, um antes e três depois da exposição ao Alprazolam, sendo que o tempo dessa ação variou entre 85 e 109 segundos.

Para o Clonazepam, o tempo de permanência, previamente, na parcela escura variou entre 21 e 104 segundos (69,33±32,64) (Figura 6A); após o contato com o medicamento, oscilou de 27 a 104 segundos (74,50±35,28) (Figura 6B). Na porção clara, o período oscilou entre 13 e 121 segundos (41,00±41,89) e depois entre 13 e 81 segundos (35,83±23,49). A transferência entre as partes, anteriormente, foi de 3 a 11 vezes no escuro (6,00±3,28) e 2 a 11 vezes no claro (5,50±3,01) (Figura 7A); posteriormente, de 2 a 10 vezes no escuro (4,67±2,94) e 3 a 11 no claro (5,00±3,16) (Figura 7B). A quantidade de subidas a superfície, nesse experimento, foi nula antes e depois a interação com o benzodiazepínico. Para o mesmo indivíduo exposto ao Clonazepam, observou-se a estaticidade antes e depois da exposição que variou de 66 a 68 segundos. Para ambos os testes não foram constatadas diferenças na mediana ($p > 0,05$).

Discussão

O tipo de teste "claro/escuro" é um dos modelos comportamentais de ansiedade. Esses quando combinados com benzodiazepínicos, buscam compreender suas ações no organismo e possíveis efeitos de um determinado ansiolítico. Em experimentos em aquários de "claro/escuro", exemplares de *Danio rerio* demonstraram repulsa a ambientes claros e os dados demonstraram que esses tipos de ensaios podem ser considerados ferramentas para análises etológicas¹². O presente trabalho verificou que indivíduos de zebrafish expostos ao fármaco Alprazolam optaram pelo lado claro, porém os que tiveram interação com Clonazepam mostraram preferência pelo lado escuro do aquário. Essa constatação foi evidenciada principalmente por meio da observação do tempo de permanência.

Em experimentos realizados com o benzodiazepínico Clonazepam², os peixes mostraram uma maior propensão para o lado escuro. Esse tipo de comportamento pode estar associado à estratégia do teleósteo em fugir de predadores naturais ou em qual flanco o animal se sente mais seguro, não, necessariamente, por indução da droga¹⁵. Há também as chamadas "reações de alarme", que são apresentadas em animais que possuem convívio social, tendo a função de autoproteção do grupo. O feromônio é liberado e pode ser sentido pelo olfato, o que gera uma reação coletiva de fuga e procura por um esconderijo seguro^{16,17}. Aqui, no teste com Clonazepam, verificou-se o comportamento natural do zebrafish por lugares mais escuros.

Em ensaios com diversos ansiolíticos⁷, constatou-se os indivíduos controles obtiveram uma tendência ao flanco claro, onde não chegaram a permanecer nem um minuto, dos cinco disponíveis. Após o contato com benzodiazepínicos, buspirona, etanol e a agregação/mistura de buspirona e diazepam, houve um maior

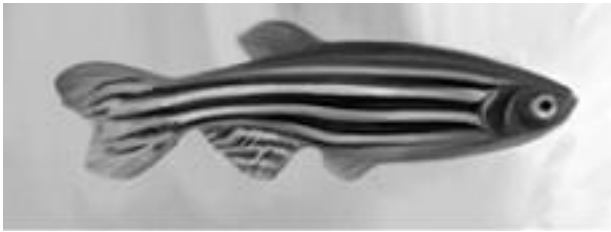


Figura 1. Ilustração de um exemplar de zebrafish (*Danio rerio*) utilizado nos experimentos.

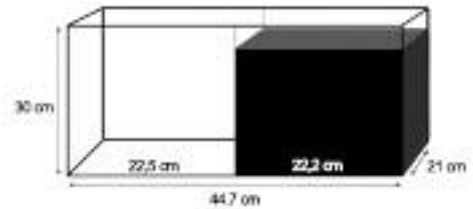


Figura 2. Ilustração do aquário teste utilizado nos experimentos.

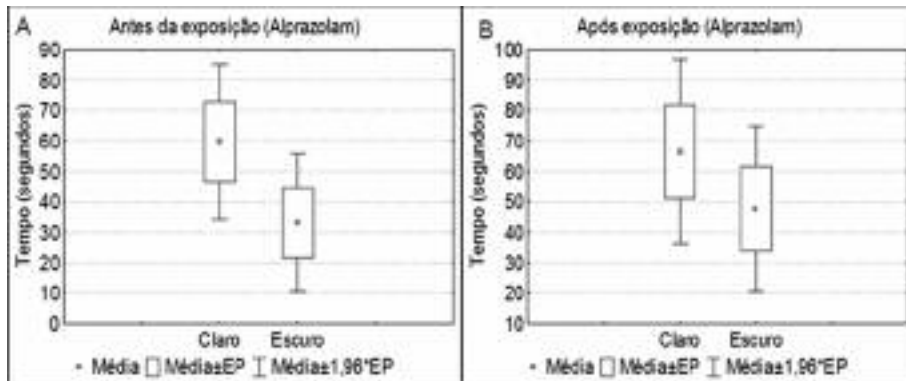


Gráfico 1. Tempo de permanência médio nas bandas clara/escuro antes (A) e depois (B) da interação com o Alprazolam.

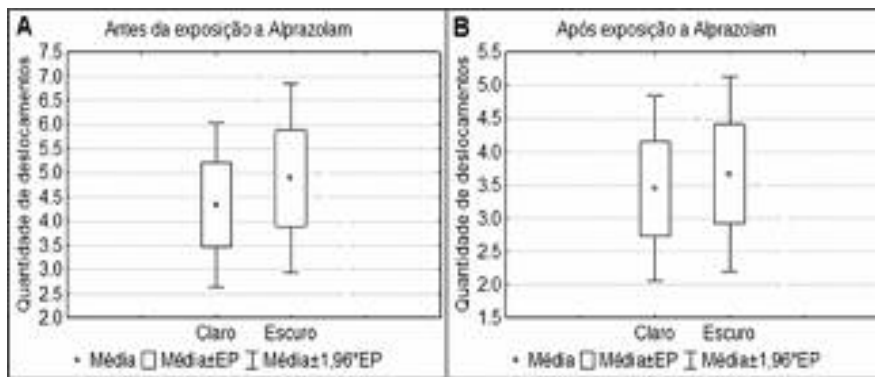


Gráfico 2. Quantidade média de deslocamentos nas bandas clara/escuro antes (A) e depois da exposição (B) com o Alprazolam.

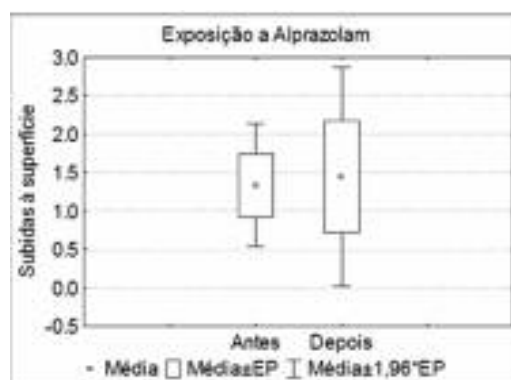


Gráfico 3. Número médio de subidas à superfície nas bandas clara/escuro após exposição com o Alprazolam.

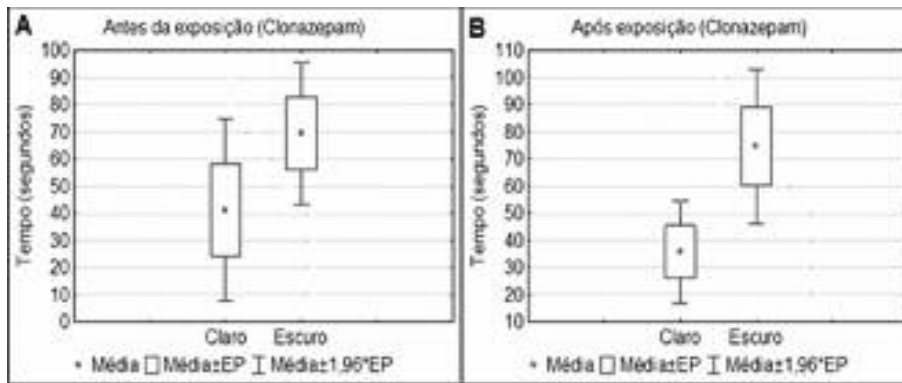


Gráfico 4. Tempo de permanência nas bandas clara/escuro antes (A) e após (B) a interação com o Clonazepam.

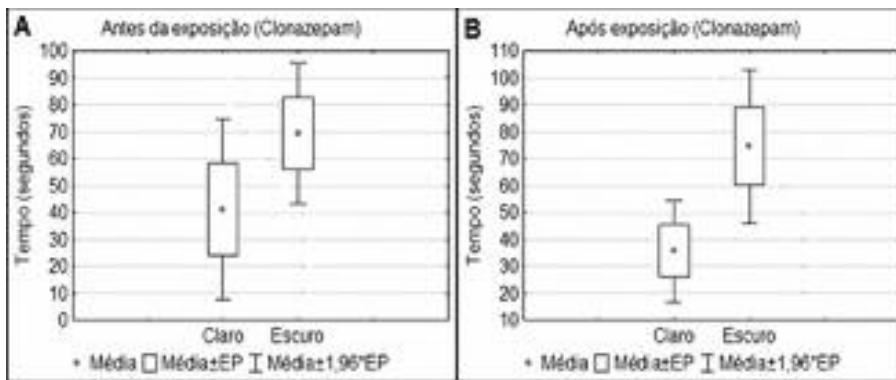


Gráfico 5. Quantidade de deslocamentos nas bandas clara/escuro antes (A) e após (B) a exposição com o Clonazepam.

deslocamento para o lado claro. Com o efeito do fármaco, pode-se averiguar que o tempo no compartimento claro passou a ser 60 segundos em média. No presente estudo, foi evidenciado resultados divergentes para os dois fármacos, sendo que para o Clonazepam evidenciou-se uma maior quantidade de deslocamentos para lado claro após exposição. Em relação ao Alprazolam, os indivíduos se deslocaram um maior número de vezes para o lado escuro.

Ensaio com a emissão de luzes coloridas (vermelho, azul, amarelo e verde) visando determinar os efeitos ansiolíticos com o trato de Alprazolam, com exemplares de Zebrafish, verificou uma predileção pela cor vermelha. Outrossim, averiguou-se o comportamento de estaticidade nas cores amarela e verde com as doses mais altas¹³. Conduta semelhante foi observado na presente pesquisa antes e durante a exposição aos dois medicamentos. Essa atitude pode estar relacionada a um estado anestésico do animal¹⁸.

Em outras pesquisas utilizando drogas antidepressivas, ansiolíticos e estimulantes com *Danio rerio*⁸, apurou-se a aversividade do lado claro em testes de esquiwa inibitória. A interação à fluoxetina, imipramina, cafeína e dietilpropina demonstrou uma indução a ansiedade, impossibilitando a esquiwa natatória, com exceção da imipramina. Os indivíduos expostos a diazepam apresentaram esquiwa, enquanto que o clonazepam inibiu

a ansiedade. No presente trabalho, apenas para o Clonazepam, verificou-se um maior número de deslocamentos para o lado claro. Nesse caso, pode-se inferir que os animais foram afetados pelo fármaco com a diminuição do comportamento tipo ansiedade.

O mesmo comportamento de aversão a ambientes claros é observado no peixe dourado (*Carassius auratus*)¹⁹. Verificou-se que no teste de esquiwa inibitória usando o Clonazepam em pequenas quantidades não houve diminuição da esquiwa, mas isso não apresentou diferenças significativas. Em contrapartida nos ensaios feitos neste estudo, com o clonazepam, não houve aumento na esquiwa inibitória. Cabe ressaltar que o horário e o período em que os animais foram expostos à luminosidade pode alterar a regularidade da mudança de compartimento, sendo esse fator significativo. Na presente pesquisa, os deslocamentos dos peixes expostos bem como o tempo de permanência não variaram significativamente ($p > 0,05$), todavia os zigzagues entre os flancos diminuíram depois do contato com os fármacos. Ademais, somente após o contato com Clonazepam verificou-se resultados divergentes em relação à quantidade de deslocamentos. Observou-se também, que a média de subidas a superfície para respirar foi maior depois da exposição ao Alprazolam, porém o mesmo não ocorreu com o Clonazepam. A subida à superfície é um parâmetro ligado a processos respira-

tórios dos animais. Portanto a maior subida à superfície estaria relacionada à dificuldade respiratória apresentada pelos animais após a intoxicação²¹.

Conclusão

Os resultados demonstraram que determinados medicamentos podem auxiliar no combate a ansiedade, pois esses animais na natureza têm preferência pelo habitat escuro explicado por um comportamento anti-predatório. Quando expostos às drogas ansiolíticas, o comportamento tende a sofrer alterações e, nesse caso, espera-se que os animais passem a ter uma preferência pelo flanco mais claro.

Os peixes apresentaram comportamento diferenciado quando expostos ao Alprazolam em relação ao descrito na literatura. Isso pode estar relacionado a metodologia empregada, já que os diferentes trabalhos utilizados para comparação adotam diferentes concentrações e tempos diferenciados. Já com o Clonazepam, os resultados condizem com outros estudos relatados onde há propensão pela porção clara. Por fim, esses testes serviram para auxiliar na compreensão do mecanismo de drogas que visam controlar o estado ansiolítico.

Referências

1. Zamignani DR, Banaco, RA. Um panorama analítico-comportamental sobre os transtornos de ansiedade. *Rev Bras Ter Cognit Cogn.* 2005; 7 (1):77-92
2. Magno LDP. Validação farmacológica da preferência claro-escuro em *Danio rerio*. [dissertação de Mestrado] – Belém: Universidade Federal do Pará, 2012.
3. Saverino C, Gerlai R. The social zebrafish: behavioral responses to conspecific, heterospecific, and computer animated fish. *Behav Brain Res.* 2008; 191 (1): 77-87.
4. Al-Sabti K, Metcalfe CD. Fish micronuclei for assessing genotoxicity in water. *Mutat. Res.* 1995; 343: 121-35.
5. Sant'ana MCB. Zebrafish (*Danio rerio*) como modelo para estudo da toxicidade induzida pelo ferro. [dissertação de mestrado] – Porto Alegre: Universidade Católica do Rio Grande do Sul, 2009.
6. Schneider ACR. Implementação de um novo modelo de experimentação animal: zebrafish. *Rev HCPA.* 2009; 29 (2):100-3.

7. Gebauer DLP. Avaliação de padrões comportamentais induzidos por ansiolíticos em zebrafish (*danio rerio*) [dissertação de mestrado] - Porto Alegre: Faculdade de Biociências; 2010.
8. Santos BR. Validação farmacológica da esquiiva inibitória do *Danio rerio* [tese]. Belém: Universidade do Pará; 2013.
9. Martínez-Sales M, García-Ximénez F, Espinós F. J. Zebrafish as a possible bioindicator of organic pollutants with effects on reproduction in drinking waters. *J Environ Sci.* 2015; 33: 254-60.
10. Castro GLG. Uso de Benzodiazepínicos como automedicação: consequências do uso abusivo, dependência, farmacovigilância e farmacoepidemiologia. *Rev Interdisciplinar.* 2013; 6(1): 112-23.
11. Eserian JK, Lombardo M. 2015. Monitoramento da qualidade de comprimidos de clonazepam distribuídos na rede pública estadual de São Paulo e sua contribuição para o sucesso terapêutico. *Rev Eletr Farm.* 2015; 12(4): 57-64.
12. Serra EL, Medalha CC, Mattioli R. Natural preference of zebrafish (*Danio rerio*) for a dark environment. *Braz J Med Biol Res.* 1999; 32 (12): 1551-3.
13. Pieróg M. Effects of alprazolam treatment on anxiety-like behavior induced by color stimulation in adult zebrafish. *Prog Neuro-Psychopharmacol Biol Psychiatry.* 2018; 82: 297-306.
14. Zar JH. Biostatistical analysis. Englewood Cliffs. NJ: Prentice-Hall. 1974.
15. Gerlai R. Zebra fish: an uncharted behavior genetic model. *Behav Genet.* 2003; 33(5): 461-8.
16. Mansur B, Santos B, Gouveia Júnior A. Efeitos da substância de alarme no teste claro/escuro no Zebrafish, *Danio rerio*. *Biota Amazônia.* 2014; 4(1): 87-93.
17. Frisch KV. Über einen Schreckstoff der Fischhaut und seine biologische Bedeutung. *Z Vgl Physiol* 1942; 29(1-2): 46-145.
18. Hisano H, Ishikawa MM, Ferreira RA; Bulgarelli ALA, Costa TR, Pádua SB, et al. Tempo de indução e de recuperação de dourados *Salminus brasiliensis* (Cuvier, 1816), submetidos a diferentes concentrações de óleo de cravo *Eugenia* sp. *Acta Sci Biol Sci.* 2008; 30(3): 303-07.
19. Carvalho PDP, Gouveia Júnior A. Efeitos do clonazepam na esquiiva inibitória no peixe-dourado (*Carassius auratus*). *Braz J Behav Ana.* 2010; 6 (1): 1-8.
20. Dias CAGM, Santos BR, Mansur BM, Pinheiro MS. Preferência claro/escuro em *Danio rerio*: Efeitos do horário da coleta e de regime de luz. *Biota Amazônia.* 2014; 4(3).
21. Grosso FG, Moura RP, Raymundo WD, Bernardi MM. Toxicidade das águas do Rio Tietê coletadas na grande São Paulo em peixes *Danio rerio*. *Rev Inst Ciênc Saúde.* 2008; 26(4):387-91.

Endereço para correspondência:

Bruno Paes De-Carli
Av. Francisco Manoel, Vila Mathias
Unip – Campus Rangel
Santos-SP, CEP 11045-300
Brasil
E-mail: bruno.carli@docente.unip.br

Recebido em 18 de julho de 2018
Aceito em 21 de agosto de 2018