

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA
CENTRO DE CIÊNCIAS NATURAIS E EXATAS
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS: BIOQUÍMICA
TOXICOLÓGICA

João Vitor de Borba

**AVALIAÇÃO DOS EFEITOS PROMOVIDOS PELO ESTRESSE
AGUDO E ESTRESSE CRÔNICO IMPREVISÍVEL SOBRE O PADRÃO
DO COMPORTAMENTO EXPLORATÓRIO EM PEIXE-ZEBRA**

Santa Maria, RS
2023

João Vitor de Borba

**AVALIAÇÃO DOS EFEITOS PROMOVIDOS PELO ESTRESSE AGUDO E
ESTRESSE CRÔNICO IMPREVISÍVEL SOBRE O PADRÃO DO
COMPORTAMENTO EXPLORATÓRIO EM PEIXE-ZEBRA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica Toxicológica, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas: Bioquímica Toxicológica.

Orientador: Prof. Dr. Denis Broock Rosemberg

Santa Maria, RS
2023

This study was financed in part by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Finance Code 001

de Borba, João Vitor
AVALIAÇÃO DOS EFEITOS PROMOVIDOS PELO ESTRESSE AGUDO
E ESTRESSE CRÔNICO IMPREVISÍVEL SOBRE O PADRÃO DO
COMPORTAMENTO EXPLORATÓRIO EM PEIXE-ZEBRA / João Vitor
de Borba.- 2023.
64 p.; 30 cm

Orientador: Denis Broock Rosemberg
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa
Maria, Centro de Ciências Naturais e Exatas, Programa de
Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica
Toxicológica, RS, 2023

1. Estresse 2. Campo aberto 3. Comportamento
exploratório 4. Zonas-base 5. Peixe-zebra I. Rosemberg,
Denis Broock II. Título.

Sistema de geração automática de ficha catalográfica da UFSM. Dados fornecidos pelo autor(a). Sob supervisão da Direção da Divisão de Processos Técnicos da Biblioteca Central. Bibliotecária responsável Paula Schoenfeldt Patta CRB 10/1728.

Declaro, JOÃO VITOR DE BORBA, para os devidos fins e sob as penas da lei, que a pesquisa constante neste trabalho de conclusão de curso (Dissertação) foi por mim elaborada e que as informações necessárias objeto de consulta em literatura e outras fontes estão devidamente referenciadas. Declaro, ainda, que este trabalho ou parte dele não foi apresentado anteriormente para obtenção de qualquer outro grau acadêmico, estando ciente de que a inveracidade da presente declaração poderá resultar na anulação da titulação pela Universidade, entre outras consequências legais.

João Vitor de Borba

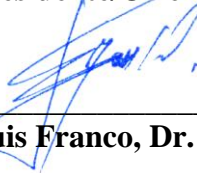
**AVALIAÇÃO DOS EFEITOS PROMOVIDOS PELO ESTRESSE AGUDO E
ESTRESSE CRÔNICO IMPREVISÍVEL SOBRE O PADRÃO DO
COMPORTAMENTO EXPLORATÓRIO EM PEIXE-ZEBRA**

Dissertação apresentada ao Programa De Pós-Graduação Em Ciências Biológicas: Bioquímica Toxicológica, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas: Bioquímica Toxicológica.

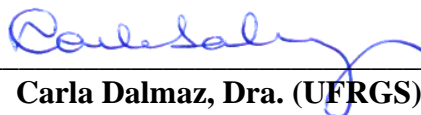
Aprovado em 27 de fevereiro de 2023



Denis Broock Rosenberg, Dr. (UFSM)
(Presidente/Orientador)



Jeferson Luis Franco, Dr. (UNIPAMPA)



Carla Dalmaz, Dra. (UFRGS)

Santa Maria, RS
2023

Com muito amor, dedico este trabalho ao meu pai, Acelino (*in memoriam*), e à minha mãe,
Edla. Vocês sempre serão minha referência máxima!

AGRADECIMENTOS

Esta Dissertação representa o fechamento de um importante ciclo, que abrirá as portas para um novo caminho. Chegar até aqui não seria possível sem a presença e o apoio incondicional de muitas pessoas. Primeiramente, agradeço ao meu pai, Acelino (*in memoriam*), e à minha mãe, Edla, por tudo que me ensinaram e por apostarem junto comigo nos frutos desse caminho que escolhi. Deixo também um agradecimento especial às minhas irmãs, Carla e Daniela, minhas amigas e conselheiras, e à minha tia, Cenira, que acompanha e apoia meus passos desde sempre. Meu muito obrigado aos tantos amigos e amigas, que sempre estiveram comigo nos momentos de celebração e que me confortaram nos dias difíceis. Agradeço imensamente ao Professor Doutor Denis Broock Rosemberg, o qual, desde o primeiro momento, abriu as portas de seu laboratório para mim e passou-me tantos ensinamentos - hora como orientador, hora como amigo – que seguirão comigo para o resto da vida. Obrigado a todos os colegas do Laboratório de Neuropsicobiologia Experimental, o LaNE, pela ajuda, troca de conhecimento e pela convivência que nos rendeu muitas risadas e bons momentos. A todos que mencionei até aqui, quero dizer que essa conquista é minha e também é de vocês!

Por fim, agradeço profundamente à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS) por todo o apoio financeiro que foi fundamental para o meu sustento e para a realização desse estudo durante o Mestrado. Da mesma forma, meu sincero agradecimento à Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), a qual deu-me acesso ao ensino superior de qualidade e à formação humana e técnica, capacitando-me para o mercado de trabalho e para a construção de meu caminho profissional, o qual - assim espero - renderá boas contribuições à nossa sociedade.

*Se as coisas são inatingíveis... ora!
Não é motivo para não querê-las...
Que tristes os caminhos, se não fora
A presença distante das estrelas!*

(Mário Quintana)

RESUMO

AValiação dos efeitos promovidos pelo estresse agudo e estresse crônico imprevisível sobre o padrão do comportamento exploratório em peixe-zebra

AUTOR: João Vitor de Borba
ORIENTADOR: Prof. Dr. Denis Broock Rosemberg

O estresse é um conjunto de reações biológicas que permitem ao organismo se adaptar a perturbações fisiológicas provocadas, geralmente, por algum estímulo externo. Atualmente, o termo é popularmente associado a níveis exacerbados de estresse, gerando danos físicos e mentais, os quais atingem grande parte da população mundial. Configurando-se como uma problemática ligada à saúde humana, o estresse é um importante tema em pesquisas utilizando diferentes modelos animais a fim de melhor compreender seus mecanismos fisiológicos e neurocomportamentais subjacentes. Assim, o peixe-zebra (*Danio rerio*) apresenta-se como um relevante organismo para a investigação dos efeitos gerados por diferentes tipos de estresse por possuir, por exemplo, um repertório comportamental bem caracterizado e vias biológicas semelhantes às de humanos. Dessa forma, o presente estudo teve como objetivo investigar os efeitos gerados por estresse agudo e estresse crônico imprevisível sobre a organização espaço-temporal da exploração em peixes-zebra submetidos ao teste de campo aberto. Para isso, animais adultos de ambos os sexos foram submetidos ao estresse agudo (EA) a partir da exposição à 1L de água dechlorada na ausência (grupo controle) ou presença de substância de alarme de coespecíficos (CAS – grupo EA) à 3,5 mL/L por 5 minutos. Já o protocolo de estresse crônico imprevisível (ECI) foi executado durante 7 dias consecutivos, em que diferentes estressores foram aplicados duas vezes ao dia de forma imprevisível. Logo após a exposição à CAS e no oitavo dia, no caso do grupo ECI, os animais foram posicionados individualmente no centro de arenas circulares com dimensões 25 x 6 cm (diâmetro x altura da coluna de água). O comportamento foi gravado por 30 minutos por uma câmera posicionada no topo do aparato e posteriormente analisado para identificação das zonas de preferência (zonas-base) e quantificação de parâmetros correlatos. De modo geral, após os primeiros 15 minutos de teste, o grupo EA utilizou suas zonas-base para executar excursões curtas direcionadas ao centro e periferia da arena. Já o perfil comportamental dos animais ECI foi caracterizado por altos níveis de imobilidade, nado em “bursts” e excursões direcionadas à periferia. Curiosamente, ao contrário do ECI, o estresse agudo não gerou aumento da tigmotaxia em relação ao controle. De modo geral, nossos resultados demonstram que a organização sequencial do comportamento exploratório em peixe-zebra é sensível à modulação por diferentes protocolos de estresse, reforçando a utilidade dos comportamentos relacionados aos pontos de preferência para a análise de distintos estados afetivos.

Palavras-chave: Estresse. Campo aberto. Comportamento exploratório. Zonas-base. Peixe-zebra.

ABSTRACT

ASSESSMENT OF THE EFFECTS OF ACUTE AND UNPREDICTABLE CHRONIC STRESS ON EXPLORATORY BEHAVIOR PATTERN IN ZEBRAFISH

AUTHOR: João Vitor de Borba
ADVISOR: Prof. Dr. Denis Broock Rosemberg

Stress is a set of biological reactions that allow the body to adapt itself to physiological disturbances generally evoked by some external stimulus. Currently, the term is popularly associated with exacerbated levels of stress, leading to physical and mental damage, which affect a large part of global population. Configured as a human health problem, stress is an important topic in research using different animal models in order to better understand its underlying physiological and neurobehavioral mechanisms. In this perspective, zebrafish (*Danio rerio*) represents a relevant organism for the investigation of the effects generated by different types of stress due to its well-characterized behavioral repertoire and biological pathways that resemble those of humans, for example. Thus, the present study aimed to investigate the effects generated by acute and unpredictable chronic stress on the spatio-temporal organization of exploration in zebrafish submitted to the open field test. For this, adult fish of both sexes were subjected to acute stress (AS) from exposure to 1L of dechlorinated water in absence (control group) or presence of conspecific alarm substance (CAS - AS group) at 3.5 mL/L for 5 minutes. Chronic unpredictable stress protocol (UCS) was performed during 7 consecutive days, in which different stressors were applied two times daily in an unpredictable manner. After CAS exposure and on the eighth day, in the case of the UCS group, the animals were individually positioned in the center of circular arenas with dimensions 25 x 6 cm (diameter x water column height). The behavior was recorded for 30 minutes by a camera positioned at the top of the apparatus and later analyzed to identify the homebases and quantify its related parameters. In general, after the first 15 minutes of trial, AS group used the homebase to perform brief trips to the center and periphery of the arena. Conversely, UCS behavioral profile was characterized by high levels of immobility, “burst swimming” and peripheral excursions. Curiously, differently of UCS, the acute stress did not generate an increase in thigmotaxis in comparison to control. In general, our results show that the sequential organization of exploratory behavior in zebrafish is sensible to the modulation of different stress protocols, reinforcing the utility of homebase-related behaviors for the analysis of distinct affective-like states.

Keywords: Stress. Open field. Exploratory behavior. Homebase. Zebrafish.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 - Adaptação da curva de Yerkes-Dodson mostrando os efeitos gerados por diferentes níveis de estresse.....	14
FIGURA 2 - Principais efeitos bioquímicos e fisiológicos gerados pela resposta ao estresse.....	18
FIGURA 3 - Protocolo de identificação das zonas-base adaptado para estudos com peixes.....	25
FIGURA 4 - Quadro geral dos principais parâmetros afetados por diferentes protocolos de estresse em peixe-zebra adulto.....	30

LISTA DE ABREVIATURAS

ACTH	Corticotropina
CAS	Substância de alarme de coespecíficos
CRH	Hormônio de liberação da corticotropina
EA	Estresse agudo
ECI	Estresse crônico imprevisível
GABA	Ácido gama-aminobutírico
GHRH	Hormônio liberador do hormônio de crescimento
GLUT4	Transportador de glicose do tipo 4
GR	Receptor de glicocorticoides
HPA	Eixo hipotálamo-pituitária-adrenal
HPI	Eixo hipotálamo-pituitária-inter-renal
K ⁺	Íon de potássio
<i>LEO</i>	População de fenótipo leopardo (do inglês, <i>leopard</i>)
Na ⁺	Íon de sódio
PEPCK	Fosfoenolpiruvato-carboxiquinase
<i>SF</i>	População selvagem de fenótipo nadadeira curta (do inglês, <i>short fin</i>)
SNA	Sistema nervosa autônomo
SNC	Sistema nervoso central
T3	Triiodotironina
T4	Tetraiodotironina
TEA	Transtornos do espectro autista
TOC	Transtorno obsessivo-compulsivo
TRH	Hormônio liberador da tireotropina
TSH	Hormônio tireoestimulante ou tireotropina

SUMÁRIO

1 APRESENTAÇÃO.....	12
2 INTRODUÇÃO.....	13
2.1 ESTRESSE: ASPECTOS GERAIS	13
2.2 BIOQUÍMICA E FISIOLOGIA DO ESTRESSE	15
2.3 RESPOSTAS NEUROCOMPORTAMENTAIS RELACIONADAS AO ESTRESSE....	19
2.4 TESTE DE CAMPO ABERTO	21
2.5 ORGANIZAÇÃO ESPAÇO-TEMPORAL DO COMPORTAMENTO EXPLORATÓRIO	23
2.6 O PEIXE-ZEBRA COMO ORGANISMO MODELO PARA AVALIAR AS RESPOSTAS NEUROCOMPORTAMENTAIS INDUZIDAS PELO ESTRESSE	27
3 OBJETIVOS	32
3.1 OBJETIVO GERAL	32
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	32
4 HIPÓTESES.....	33
5 ARTIGO CIENTÍFICO	34
6 CONCLUSÃO.....	47
7 LIMITAÇÕES E PERSPECTIVAS DO ESTUDO	48
REFERÊNCIAS.....	50
ANEXO A – CARTA DE APROVAÇÃO DA CEUA	60
ANEXO B – FIGURA SUPLEMENTAR DO ARTIGO CIENTÍFICO.....	61
ANEXO C – LISTA DOS TRABALHOS COLABORATIVOS DESENVOLVIDOS DURANTE O PERÍODO DE MESTRADO.....	63

1 APRESENTAÇÃO

A presente Dissertação está estruturada da seguinte forma: primeiramente é apresentada a **introdução** que inclui uma revisão da literatura sobre os temas abordados na dissertação, os objetivos e as hipóteses do estudo. A seguir, a **metodologia**, **resultados** e **discussão** estão apresentados em forma de **artigo científico**. O item **conclusão** contém as principais interpretações sobre o artigo científico apresentado na dissertação. O item **limitações e perspectivas do estudo** contém as possíveis abordagens ligadas ao tema estudado e as possibilidades de novos estudos que podem ser realizados a partir dos resultados obtidos. Por fim, as **referências bibliográficas** referem-se às citações contidas nas sessões introdução e limitações e perspectivas do estudo.

2 INTRODUÇÃO

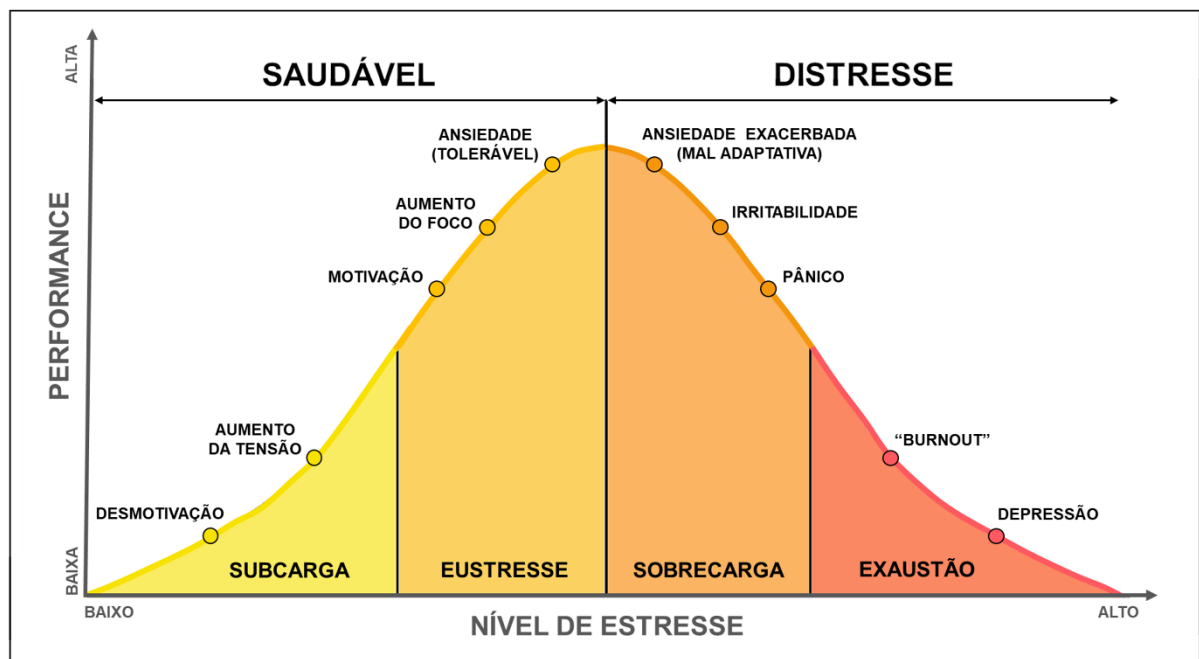
2.1 ESTRESSE: ASPECTOS GERAIS

Inicialmente identificado e descrito pelo endocrinologista Hans Selye nos anos 1930 como “síndrome da adaptação geral”, o estresse configura-se como um conjunto de reações bioquímicas e fisiológicas coordenadas que visam preparar o organismo para se adaptar a perturbações provenientes do seu meio interno ou externo (MCEWEN, 2007; RUSSELL; LIGHTMAN, 2019). Em um primeiro momento, Selye observou uma série de alterações morfológicas em ratos, como diminuição do volume do fígado e do tecido adiposo. Tal estágio foi inicialmente descrito como uma “reação de alarme generalizada frente a uma situação crítica” (SELYE H., 1936). Caso os estímulos estressores persistissem de forma branda, o organismo apresentava o segundo estágio da reação, no qual ocorre resistência com consequente adaptação às novas condições, sendo que os órgãos anteriormente afetados apresentam funcionamento praticamente normal. Entretanto, dependendo da duração e da intensidade do estresse, a resistência é perdida e o organismo tende a apresentar sintomas similares aos do primeiro estágio, com posterior quadro de exaustão (SELYE, 1950; SELYE H., 1936). Dessa forma, Selye dividiu posteriormente a reação de estresse em duas subcategorias: eustresse e distresse (BIENERTOVA-VASKU; LENART; SCHERINGER, 2020).

O eustresse (“estresse bom”) é definido como uma reação saudável em resposta a estímulos estressores, como variadas condições adversas do cotidiano, configurando-se, assim, como uma série de adaptações cruciais para a sobrevivência e enfrentamento de situações de “luta ou fuga” (LU; WEI; LI, 2021; RUSSELL; LIGHTMAN, 2019). Já a reação inversa, denominada distresse (“estresse ruim”), envolve uma série de reações e comportamentos mal adaptativos ao organismo frente a um ou mais estímulos estressores persistentes. O distresse geralmente culmina em um quadro de exaustão e incapacitação de funções fisiológicas e psíquicas normais (BIENERTOVA-VASKU; LENART; SCHERINGER, 2020; LU; WEI; LI, 2021). Atualmente, sabe-se que o estresse é uma reação multifatorial, cujos efeitos dependerão da combinação da duração dos estímulos estressores e de sua intensidade (DANG et al., 2019). De forma geral, estressores agudos e moderados desencadeiam respostas adaptativas correspondentes à reação de eustresse. Já estímulos momentâneos de alta intensidade ou crônicos e imprevisíveis geram reações mal adaptativas ligadas ao distresse (LU; WEI; LI, 2021; MCEWEN, 2007). Estressores repetitivos e invariáveis configuram o chamado estresse crônico previsível, o qual também pode apresentar

caráter adaptativo, com o retorno das funções fisiológicas e cognitivas ao seu funcionamento normal (DANG et al., 2019). A Lei de Yerkes-Dodson busca estabelecer uma relação empírica entre o nível de estresse e a performance do indivíduo frente as tarefas do cotidiano, em que, à medida em que a intensidade de estresse aumenta, a performance melhora até atingir um pico, a partir do qual começa a decair (BIENERTOVA-VASKU; LENART; SCHERINGER, 2020; ITO et al., 2015). Assim, é possível observar graficamente desde os efeitos positivos gerados pela reação de eustresse até os prejuízos físicos e mentais decorrentes de estresse excessivo (**Figura 1**).

Figura 1 - Adaptação da curva de Yerkes-Dodson mostrando os efeitos gerados por diferentes níveis de estresse.



Fonte: do autor (baseado em ANDERSON, 1976).

A partir do estudo realizado por Selye e dos conceitos de homeostase e alostase, o neuroendocrinologista Bruce McEwen e o psicólogo Eliot Stellar desenvolveram, nos anos 1990, o termo “carga alostática” (MCEWEN, 2007). A homeostase é entendida como o quadro em que as variáveis hormonais e fisiológicas de um modo geral se encontram em níveis ou flutuações normais (HULME; MORVILLE; GUTKIN, 2019). Quando essas variações ficam acima dos níveis habituais, como o que ocorre em uma reação de estresse, os mecanismos alostáticos são requeridos para reestabelecer a homeostase a partir de vias ativas, como a metabolização dos hormônios mediadores do estresse (HULME; MORVILLE;

GUTKIN, 2019; MCEWEN, 2007; STERLING, 2012). Entretanto, como a ativação crônica da alostase também pode estar associada a patologias, (por exemplo “burnout”), McEwen e Stellar introduziram o conceito de carga alostática ou sobrecarga. O termo é utilizado para se referir ao desgaste psicofisiológico causado pelo estresse exacerbado ou pela ineficiência na regulação da alostase, a qual pode ocorrer devido à dessensibilização dos mecanismos alostáticos ou pela falta de habituação a um estressor recorrente. Assim, as vias correspondentes não são inativadas, mesmo na ausência do estímulo, ou respondem a ele de forma desproporcional (MCEWEN, 2007). Atualmente, o termo estresse é tido como um conceito polissêmico, já que, na linguagem popular, é geralmente utilizado para se referir a situações de autopercepção em relação a um incômodo ou desgaste corporal ou psíquico (LU; WEI; LI, 2021; MCEWEN; AKIL, 2020). Entretanto, seu conceito biológico abrange inclusive as reações iniciais, sejam elas perceptíveis ou não ao indivíduo, as quais, por meio de uma série de sinalizações hormonais, permitem a mobilização de recursos energéticos como resposta a um estímulo ou ameaça percebida pelo organismo (RUSSELL; LIGHTMAN, 2019).

2.2 BIOQUÍMICA E FISIOLOGIA DO ESTRESSE

O estímulo capaz de ser percebido pelo organismo e desencadear a reação de estresse pode ser real ou não, já que sua natureza pode variar desde estressores sensoriais (físicos) ou gerados por quadros infecciosos, até psicológicos, como pensamentos ou memórias aversivas (RUSSELL; LIGHTMAN, 2019). A percepção do estímulo estressor é iniciada com a ativação do hipotálamo, o qual atua nos centros simpáticos da medula espinhal, estimulando o sistema nervoso autônomo (SNA) simpático (MCEWEN; GIANAROS, 2011; WON; KIM, 2016). Os nervos simpáticos atuam diretamente na medula da glândula adrenal, situada acima dos rins, acarretando a liberação de adrenalina e noradrenalina, hormônios responsáveis por diversos efeitos viscerais em situações de “luta ou fuga” (NOUSHAD et al., 2021). Os efeitos fisiológicos consistem em provocar estado de alerta através da dilatação das pupilas, piloereção, sudorese, dilatação brônquica, taquicardia, vasoconstrição periférica, inibição da atividade do estômago e do pâncreas, e constrição dos esfíncteres do trato gastrointestinal (TANK; WONG, 2015). Além disso, as catecolaminas estimulam a degradação do glicogênio hepático e muscular (glicogenólise) e do triacilglicerol (lipólise), estando associadas ao aumento dos níveis plasmáticos de glicose, glicerol e ácidos graxos livres (NOUSHAD et al., 2021; TANK; WONG, 2015).

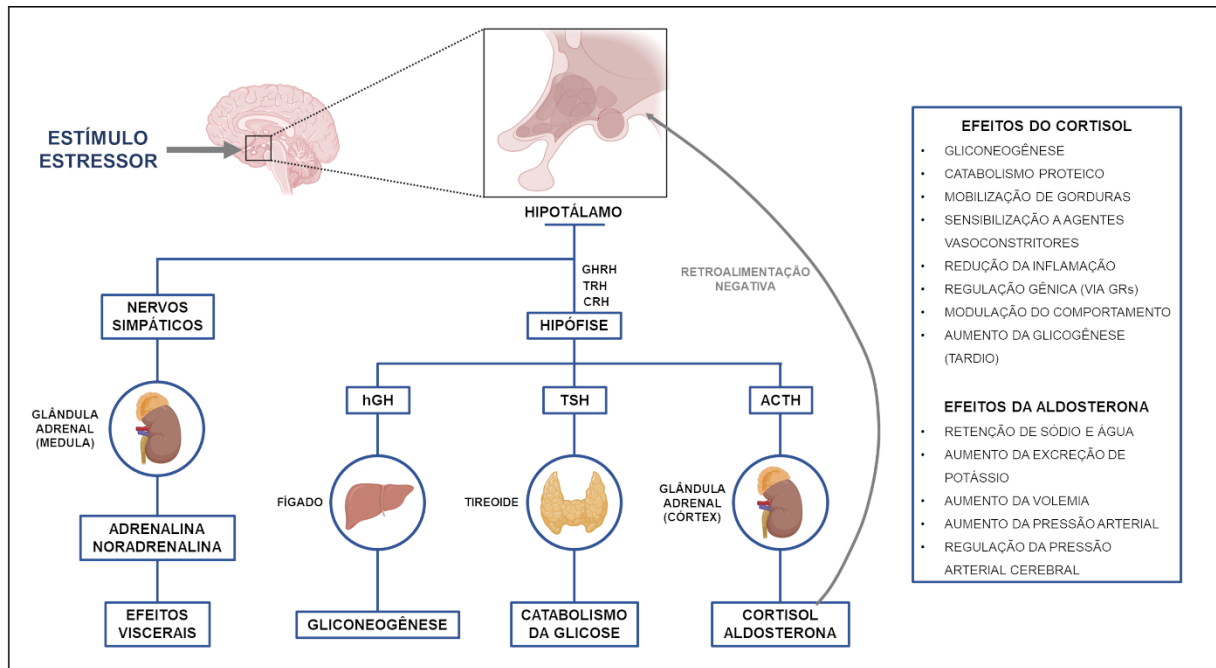
Além de atuar no SNA simpático, o hipotálamo é responsável por liberar hormônios com ação sobre a glândula pituitária ou hipófise. Em resposta à liberação do hormônio liberador do hormônio de crescimento (GHRH), por exemplo, a hipófise secreta o hormônio de crescimento propriamente dito, o qual atua no fígado, provocando, dentre outros efeitos, aumento da gliconeogênese e consequente maior mobilização energética (KATO et al., 2002; TANK; WONG, 2015). Já em resposta ao hormônio liberador da tireotropina (TRH), a hipófise secreta o hormônio tireoestimulante ou tireotropina (TSH), o qual estimula a produção e liberação de triiodotironina (T3) e da tetraiodotironina (T4), responsáveis pelo aumento do catabolismo de glicose (KYRIACOU; TZIAFERI; TOUMBA, 2022). Por fim, após a secreção do hormônio de liberação da corticotropina (CRH), a adeno-hipófise libera a corticotropina (ACTH), a qual atinge o córtex da glândula adrenal e estimula a secreção de glicocorticoides e mineralocorticoides, cujos principais representantes são o cortisol e a aldosterona, respectivamente (MCEWEN, 2007; MCEWEN; AKIL, 2020; RUSSELL; LIGHTMAN, 2019).

O cortisol é considerado o principal hormônio do estresse e sua liberação é estimulada cerca de 15 minutos após a secreção de ACTH, que ocorre de forma pulsátil entre 7 a 15 episódios por dia. Sob condições normais, os níveis circulantes de cortisol seguem um ritmo circadiano, sendo que seu pico pode ser percebido nas primeiras horas de vigília, com posterior decaimento e variações durante o dia (BAMBERGER; SCHULTE; CHROUSOS, 1996; SAPOLSKY; ROMERO; MUNCK, 2000). Entretanto, tal dinâmica é altamente sensível a fatores ambientais e internos, podendo ser alterada em resposta a alterações no sono, estímulos estressores e patologias, por exemplo. Assim, em resposta a uma situação de estresse, o cortisol é liberado na corrente sanguínea e exerce funções multissistêmicas, já que praticamente todos os tipos de células expressam receptores de glicocorticoides (BAMBERGER; SCHULTE; CHROUSOS, 1996). De forma geral, o hormônio atua de forma imediata no fígado, aumentando a expressão das enzimas da gliconeogênese, como a fosfoenolpiruvato-carboxiquinase (PEPCK), tirosina-aminotransferase e glicose-6-fosfatase, e consequentemente, a disponibilidade de glicose (LAWRENCE et al., 2019). No músculo, ocorre a inibição da síntese proteica e a translocação do transportador de glicose do tipo 4 (GLUT4) para a membrana plasmática, facilitando a captação da glicose pelas células. Além disso, há o aumento da mobilização de ácidos graxos e da sensibilização a agentes vasoconstritores, além da inibição da síntese de osteoblastos e colágeno no osso e na cartilagem, respectivamente (BAMBERGER; SCHULTE; CHROUSOS, 1996; SAPOLSKY; ROMERO; MUNCK, 2000). Uma vez liberado na corrente sanguínea, o cortisol atravessa a

barreira hematoencefálica, induz alterações comportamentais a partir da modulação da percepção e da emoção, e alcança o hipotálamo e a adeno-hipófise, inibindo a secreção de CRH e ACTH e autorregulando-se a partir de retroalimentação negativa (BAMBERGER; SCHULTE; CHROUSOS, 1996; CHIBA et al., 2012). Por fim, efeitos mais tardios podem ocorrer a partir da sua ligação a receptores de glicocorticoides (GR), os quais regulam a expressão de genes ligados ao metabolismo da glicose, função imune e comportamento (BAMBERGER; SCHULTE; CHROUSOS, 1996; PIATO et al., 2011). Além disso, devido ao aumento dos níveis de insulina em resposta à hiperglicemia, o fígado é estimulado novamente a sintetizar glicogênio (glicogênese). Em níveis circulantes altos e prolongados, o cortisol acarreta em perda de massa muscular esquelética e óssea, e exerce efeito anti-inflamatório global por aumentar a síntese de citocinas anti-inflamatórias e reduzir a síntese das pró-inflamatórias (MCEWEN, 2007).

Já a aldosterona atua principalmente nos túbulos contorcidos distais e nos ductos coletores dos rins, e sua principal função é regular o equilíbrio dos minerais sódio e potássio. Ao se ligar aos receptores de mineralocorticoides, o hormônio produz uma série de efeitos específicos, como aumento na síntese de canais de sódio (Na^+), o que facilita a retenção de sódio e a transferência de potássio (K^+) para a urina, gerando um gradiente eletroquímico com consequente aumento na reabsorção de água. Como resultado, ocorre incremento na volemia sanguínea e na pressão arterial (FERREIRA et al., 2021; FOURKIOTIS et al., 2012). Outras células, como neurônios do sistema nervoso central (SNC), miócitos cardíacos e células endoteliais também expressam receptores de mineralocorticoides. Assim, os efeitos multissistêmicos da aldosterona incluem regulação neural da pressão arterial e do apetite pelo sal, efeito inotrópico positivo sobre o coração e elevação da excreção de K^+ pelo cólon (FOURKIOTIS et al., 2012; XANTHAKIS; VASAN, 2013). Esse e outros efeitos gerados pela ativação simpática e pela cascata hormonal em resposta a determinado estímulo estressor estão resumidos na **Figura 2**.

Figura 2 – Principais efeitos bioquímicos e fisiológicos gerados pela resposta ao estresse.



Fonte: do autor.

Devido a todos os efeitos gerados pela cascata hormonal envolvida na resposta ao estresse, em situações em que os estímulos ocorrem de forma crônica, o organismo pode apresentar redução drástica nas massas muscular esquelética e óssea, osteoporose, supressão imunológica acentuada e hiperglicemia. Tal quadro geralmente está associado ao estágio de exaustão, gerando predisposição a uma série de patologias, como depressão, transtornos de ansiedade e diabetes, no qual surgem sintomas como taquicardia, fadiga, insônia, aumento da ansiedade e irritabilidade (ANTONIUK et al., 2019; CHIBA et al., 2012; MCEWEN, 2007; RUSSELL; LIGHTMAN, 2019; SANDI; HALLER, 2015; SAPOLSKY; ROMERO; MUNCK, 2000). Atualmente, quadros de desgaste e exaustão associados a altos níveis de estresse, como a Síndrome de Burnout, são recorrentes na população mundial, configurando um importante campo para a pesquisa voltada à saúde humana (WEST; DYRBYE; SHANAFELT, 2018). Assim, diversas formas de estudo, especialmente envolvendo modelos animais, são cruciais para a melhor compreensão dos mecanismos fisiológicos e neurocomportamentais do estresse, e para a busca de novas alternativas terapêuticas para os transtornos a ele associados.

2.3 RESPOSTAS NEUROCOMPORTAMENTAIS RELACIONADAS AO ESTRESSE

A maioria dos estudos relacionados às respostas neurocomportamentais provocadas pela reação de estresse são desenvolvidos em humanos e roedores (RUSSELL; LIGHTMAN, 2019; SANDI; HALLER, 2015; SCHWABE; WOLF; OITZL, 2010; VEDHARA et al., 2000; YARIBEYGI et al., 2017). Em resposta ao estresse agudo, os animais tendem a apresentar aumento de parâmetros relacionados à ansiedade e agressividade (SANDI; HALLER, 2015). Tais alterações comportamentais reforçam o caráter adaptativo do estresse agudo como reação a situações de “luta ou fuga” e são acompanhadas por aumento nos níveis de cortisol circulante (MCEWEN; AKIL, 2020; SANDI; HALLER, 2015). Em relação a processos de aprendizado e memória, o estresse pode auxiliar ou prejudicar a performance dependendo de cada situação. Por exemplo, participantes submetidos a uma pressão momentânea, como um teste de escrita, demonstraram melhora na retenção de memória por um período curto de tempo (VEDHARA et al., 2000; YARIBEYGI et al., 2017). Entretanto, estudos que usam exposição a situações estressoras antes de tarefas de aprendizado mostram tanto resultados positivos quanto negativos em relação à capacidade de memorização (DIAMOND et al., 2006; SCHWABE; WOLF; OITZL, 2010; YARIBEYGI et al., 2017). Tais dados demonstram, portanto, o caráter complexo dos efeitos do estresse sobre diferentes aspectos e reforçam a ideia de que os resultados dependem do tipo e da intensidade do estímulo empregado, incluindo, principalmente no caso de humanos, o grau de conexão emocional com o evento estressor (DIAMOND et al., 2007; LU; WEI; LI, 2021; YARIBEYGI et al., 2017).

No caso da exposição ao estresse crônico, também ocorre aumento da ansiedade e redução da motivação e da interação social, especialmente nos animais mais ansiosos (CASTRO et al., 2012; SANDI; HALLER, 2015). Por outro lado, longos períodos de isolamento tendem a elevar o interesse social, sugerindo que a privação social de longa duração gere aumento no interesse por coespecíficos (VAN DEN BERG et al., 1999). Em relação à agressividade, diferentes protocolos de estresse crônico geram aumento de comportamentos agressivos em camundongos, ratos e até mesmo cães (BEERDA et al., 1999; SANDI; HALLER, 2015; VAN DEN BERG et al., 1999). Curiosamente, estressores sociais crônicos envolvendo confronto direto entre os indivíduos geralmente acarretam em diminuição da agressividade em animais submetidos a consecutivas derrotas. No entanto, o efeito oposto é observado após repetidas vitórias, cujos animais apresentam níveis exacerbados e anormais de agressividade (MICZEK; BOER; HALLER, 2013; SANDI; HALLER, 2015).

Após períodos mais longos de exposição a situações de estresse, como em protocolos com duração de 15 dias ou até semanas, animais de diferentes espécies e humanos tendem a apresentar sinais comportamentais ligados à depressão, redução nas memórias espacial e verbal, e déficit cognitivo, acompanhado ou não de desordens de humor (YARIBEYGI et al., 2017). Tais efeitos são acompanhados por alterações morfológicas no SNC. No hipocampo, por exemplo, o qual apresenta receptores de glicocorticoides, é possível observar atrofia, redução na neurogênese e no número de neurônios, alterações nos terminais sinápticos e até diminuição de volume (LUPIEN; LEPAGE, 2001; SAPOLSKY et al., 2013; YARIBEYGI et al., 2017). Esses processos neurodegenerativos no lobo temporal podem afetar diretamente processos cognitivos ligados ao aprendizado e à memória, gerando efeitos que podem ser observados a longo prazo (LI et al., 2008; YARIBEYGI et al., 2017).

Estudos abordando diferentes tipos de estresse durante o desenvolvimento, seja nos estágios pré-natal, neonatal ou na juventude, demonstram que muitos efeitos fisiológicos e comportamentais ainda se mantêm na fase adulta (BERNSTEIN et al., 2003; GLUCKMAN et al., 2008). Em crianças e adolescentes, o estresse nos primeiros estágios de vida aumenta os riscos de distúrbios comportamentais, sejam eles internalizados ou externalizados. Os comportamentos internalizados abrangem ansiedade, depressão e inibição. Já os externalizados refletem maior agressividade, hiperatividade e problemas ligados ao comportamento sexual (FRIEDRICH, 1998; GLUCKMAN et al., 2008). Em modelos animais, a exposição ao estresse na fase pré-natal pode acarretar alterações no eixo HPA e consequente dano a regiões cerebrais em áreas ricas em receptores de glicocorticoides (GLOVER; O'CONNOR, 2002; JURUENA, 2014; SANDI; HALLER, 2015). Em relação à interação social, o estresse nas fases pré-natal, neonatal e juvenil geralmente reduz a motivação social na fase adulta (DE SOUZA et al., 2013; FRANKLIN et al., 2011; SANDI; HALLER, 2015), enquanto que os efeitos na agressividade parecem depender da fase de exposição. A privação materna, por exemplo, gera comportamentos mais agressivos em ratos adultos (SANDI; HALLER, 2015), enquanto que situações estressoras durante a gestação parecem reduzir tal parâmetro (PATIN et al., 2005). Além disso, estudos sugerem a influência epigenética da exposição ao estresse, sendo que os efeitos fisiológicos, como aumento nos níveis basais de cortisol, e comportamentais, como maior ansiedade frente à novidade, tendem a permanecer entre diferentes gerações (MCEWEN, 2007; SZYF, 2019).

Muitos testes já foram desenvolvidos para a avaliação das alterações comportamentais provocadas por esses diferentes tipos de estresse, sendo que cada teste é capaz de prover análises relacionadas a parâmetros específicos. Por exemplo, o teste de labirinto em cruz

elevado e o teste claro-escuro permitem avaliações ligadas a respostas de ansiedade (BOURIN; HASCOËT, 2003; GRAEFF; FERREIRA NETTO; ZANGROSSI, 1998; ZANGROSSI; GRAEFF, 2014). Comportamentos depressivos podem ser observados a partir do teste de preferência por sacarose, a qual se encontra reduzida em animais que apresentam sintomas do tipo depressivos, caracterizando um comportamento semelhante à anedonia (ANTONIUK et al., 2019; MOORE; BEIDLER; HONG, 2018). A preferência social pode ser avaliada em arenas compartimentalizadas com a presença de um coespecífico em uma das extremidades, contabilizando o tempo e as entradas na região próxima do coespecífico, ou por testes de interação em uma arena homogênea (SANDI; HALLER, 2015). Por fim, parâmetros ligados à locomoção, exploração e comportamentos do tipo ansiedade podem ser analisados a partir do teste de campo aberto (MOORE; BEIDLER; HONG, 2018; PRUT; BELZUNG, 2003).

2.4 TESTE DE CAMPO ABERTO

O teste de campo aberto (*open field test*) foi inicialmente desenvolvido para o estudo da emotividade em ratos e consiste em introduzir o animal em um ambiente desconhecido, geralmente uma arena homogênea, plana e iluminada, observando seu comportamento durante determinado período de tempo (PRUT; BELZUNG, 2003; WALSH; CUMMINS, 1976). Este teste permitiu a distinção de animais classificados como emocionais e não emocionais a partir do número de entradas na região central e dos níveis de defecação com apenas 2 minutos de análise durante *trials* repetidas (HALL, 1934). Atualmente, o campo aberto é um teste muito utilizado em estudos que envolvem psicologia animal principalmente devido à sua simplicidade, facilidade para quantificação de comportamentos e ampla aplicabilidade (EILAM, 2003; PRUT; BELZUNG, 2003; RODENBURG et al., 2003). O teste é aplicado principalmente em análises relacionadas aos comportamentos locomotor e exploratório, permitindo, por exemplo, a identificação de respostas do tipo ansiedade e de movimentos estereotipados (KRAEUTER; GUEST; SARNYAI, 2019; LAMPREA et al., 2008). Alterações locomotoras, como baixa movimentação, podem indicar anormalidades em processos motores e cognitivos (KRAEUTER; GUEST; SARNYAI, 2019) e representar respostas ansiosas ligadas à depressão (HAO et al., 2019; MOORE; BEIDLER; HONG, 2018). Em roedores, é observada uma preferência pela área periférica do aparato, visto que a permanência próxima às bordas representa uma proteção contra potenciais ameaças, geralmente acompanhada por episódios de avaliação de risco direcionados ao centro (LAMPREA et al., 2008; SIMON; DUPUIS; COSTENTIN, 1994). Essa preferência pelas

bordas ou paredes da arena é denominada tigmotaxia e apresenta-se aumentada em animais ansiosos (BACH, 2022; HIMANSHU et al., 2020). A avaliação da ansiedade pode ser acompanhada por medição da ativação do SNS, a partir dos níveis de defecação e micção, pela latência para consumir alimento posicionado na área central e pela comparação com resultados encontrados nos testes de labirinto elevado e claro/escuro (CATHY; SANDRA, 1996; HALL, 1934; MISSLIN; BELZUNG; VOGEL, 1989; PENTKOWSKI et al., 2021). Além disso, estudos abordam a validação farmacológica do teste por meio da administração de drogas ansiolíticas, as quais aumentam o tempo gasto e o número de entradas no centro do campo aberto, indicando redução do comportamento do tipo ansioso (GRIEBEL; HOLMES, 2013; PENTKOWSKI et al., 2021; PRUT; BELZUNG, 2003). Já os comportamentos estereotipados, definidos por trajetórias ou ações motoras repetitivas, coordenadas, rítmicas e aparentemente sem propósito, são avaliados em modelos animais relacionados a diversos transtornos (LIU et al., 2021). Essas respostas podem representar ansiedade, inclusive ligadas ao estresse, e comportamentos semelhantes aos encontrados em transtornos do espectro autista (TEA), transtorno obsessivo-compulsivo (TOC) e esquizofrenia (EILAM et al., 2012; FRAZIER et al., 2021; KRAEUTER; GUEST; SARNYAI, 2019; SZECHTMAN; SULIS; EILAM, 1998).

As análises realizadas no campo aberto também podem ser utilizadas para a melhor compreensão da construção sequencial (espaço-temporal) do comportamento exploratório (LEKE et al., 2012). Dessa forma, a verificação dos níveis de tigmotaxia está relacionada à organização espacial da exploração e pode ser quantificada por meio do tempo gasto na periferia em relação ao centro, sendo empregada em estudos com diferentes espécies, como roedores e peixes (EILAM, 2003, 2004; KALUEFF et al., 2013; MAXIMINO et al., 2010; SIMON; DUPUIS; COSTENTIN, 1994). Já no âmbito temporal, verifica-se a dinâmica de determinados componentes comportamentais, como o número e distância dos episódios de exploração do ambiente e a quantidade de episódios imóveis, a partir da definição dos pontos de preferência de cada animal, aqui denominados zonas-base (EILAM, 2003; EILAM; GOLANI, 1989; STEWART et al., 2012). A identificação desses pontos e a quantificação de seus parâmetros correlatos podem permitir a análise de respostas estereotipadas e repetitivas, sendo cada vez mais utilizadas em estudos que abordam o comportamento exploratório e suas diferentes modulações (BEN-PAZI; SZECHTMAN; EILAM, 2001; EDUT; EILAM, 2003; EILAM; GOLANI, 1990; WEISS et al., 2018).

O estudo da organização da exploração em animais também pode prover informações importantes sobre os circuitos cerebrais envolvidos na construção comportamental frente a um

ambiente desconhecido (JOHNSON et al., 2012; THOMPSON; BERKOWITZ; CLARK, 2018). Visto que a exploração é um mecanismo de aquisição de informações sobre determinado espaço, tal processo sugere estar diretamente ligado à memória espacial. Assim, vários estudos investigam o papel do hipocampo e das regiões límbicas associadas na organização exploratória (JOHNSON et al., 2012; LEHMANN; CLARK; WHISHAW, 2007; TRAVIS et al., 2010). Por exemplo, ratos com lesão hipocampal, em presença de pistas visuais, apresentam formação de zonas-base da mesma forma que o grupo controle. Entretanto, quando expostos a um ambiente escuro, os indivíduos lesionados não estabelecem tais pontos, distribuindo sua atividade por praticamente todo o aparato (THOMPSON; BERKOWITZ; CLARK, 2018). Atualmente, sabe-se que o hipocampo e o sistema límbico atuam na aquisição de informações ligadas à posição, distância, direção e limites espaciais. As chamadas *place cells*, por exemplo, localizam-se no hipocampo e são ativadas à medida em que o animal se desloca pelo ambiente, auxiliando na sua representação e na construção de memória espacial (JOHNSON et al., 2012). Já estudos de imagens em humanos associam o processamento de decisões exploratórias a maiores atividades na ínsula anterior e nas regiões pré-frontais, como o córtex frontopolar e o córtex cingulado anterior (CHAKROUN et al., 2020; TOMOV et al., 2020). Em indivíduos ansiosos, por exemplo, a ínsula apresenta hiperestimulação, enquanto que as regiões pré-frontais demonstram disfunções, dificultando a tomada de decisões (GRUPE; NITSCHKE, 2013).

Investigações sobre os mecanismos subjacentes a tais processos indicam papéis centrais de determinados neurotransmissores. A dopamina, por exemplo, atua no aprendizado e na formação de memória frente à novidade, além gerar motivação para a exploração (RANGEL-GOMEZ; MEETER, 2016). Por outro lado, níveis mais altos de ácido gama-aminobutírico (GABA) estão ligados à redução de atividades motoras, sugerindo estar relacionado ao processo de habituação ao novo ambiente (VIANNA et al., 2000). Tais dados reforçam a complexidade envolvida no processo de exploração e revelam a importância do estudo de sua organização espaço-temporal em diferentes níveis para a compreensão de seus mecanismos biológicos, inclusive em uma perspectiva translacional ligada à área da saúde humana.

2.5 ORGANIZAÇÃO ESPAÇO-TEMPORAL DO COMPORTAMENTO EXPLORATÓRIO

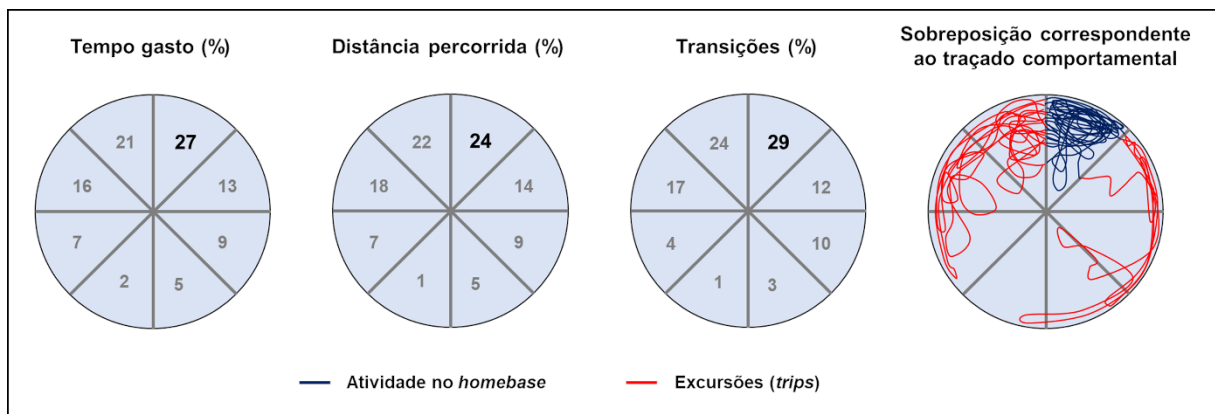
A análise da dinâmica da organização do comportamento exploratório no teste de campo aberto pode ser realizada a partir de aspectos espaciais e temporais. De forma geral, a distribuição espacial está relacionada à ocupação das diferentes áreas da arena, fornecendo

dados relacionados, por exemplo, à tigmotaxia (LAMPREA et al., 2008; SIMON; DUPUIS; COSTENTIN, 1994). Esse comportamento é definido como a preferência do animal por permanecer próximo às bordas ou paredes do aparato em que está inserido e geralmente é associado a respostas de esquiwa e ansiedade (MAXIMINO et al., 2010; SIMON; DUPUIS; COSTENTIN, 1994). A região periférica, portanto, atua como um local seguro ao animal frente à novidade e sua ocupação representa a aversão a ambientes abertos ou expostos, que pode ser observada em diferentes espécies e em outros testes, como o labirinto em cruz elevado (CAMPOS et al., 2013; HIMANSHU et al., 2020). A sensibilidade a manipulações farmacológicas reforça a tigmotaxia como um parâmetro capaz de refletir diferentes níveis de ansiedade. Nesse sentido, a administração de substâncias ansiogênicas, como a cafeína, tendem a aumentar o tempo gasto na periferia em distintas espécies de vertebrados (DE ABREU et al., 2021; PRUT; BELZUNG, 2003; SCHNÖRR et al., 2012). A exposição a drogas ansiolíticas, como benzodiazepínicos, por outro lado, gera a redução em tal comportamento (BACH, 2022; RICHENDRFER et al., 2012; SCHNÖRR et al., 2012). Já a apomorfina, por exemplo, apresenta efeitos dose-dependentes, com redução desse comportamento após a exposição a baixas concentrações e aumento em concentrações elevadas (EK et al., 2016). Assim, trata-se de um parâmetro com ampla aplicabilidade e com valor translacional em estudos neurofarmacológicos e comportamentais.

Já a distribuição temporal da exploração está relacionada à forma como o comportamento se organiza dentro de determinado intervalo de tempo. Assim, analisa-se o padrão de excursões exploratórias, de repertórios motores e de imobilidade a partir da identificação das regiões preferidas por cada animal (BEN-PAZI; SZECHTMAN; EILAM, 2001; EILAM, 2003; THOMPSON; BERKOWITZ; CLARK, 2018). As zonas-base são um ou mais pontos de referência estabelecidos naturalmente por organismos de variadas espécies a fim de orientar a exploração do ambiente (EILAM; GOLANI, 1989; STEWART et al., 2010). Estudos reportam o estabelecimento desses pontos em diferentes táxons, como roedores e peixes, demonstrando que sua localização se dá geralmente próxima às bordas da arena ou nos cantos de aparatos retangulares ou quadrados. A partir de suas zonas-base, os animais desempenham excursões a outras regiões do aparato, as quais podem conter episódios de imobilidade, retornando em seguida ao seu ponto de preferência (AVNI; ZADICARIO; EILAM, 2006; EILAM; SZECHTMAN, 2005; STEWART et al., 2010; THOMPSON; BERKOWITZ; CLARK, 2018). Em roedores, a zona-base é identificada como o ponto em que o animal retorna mais vezes e passa mais tempo durante o teste. Nesse local, o animal tende a apresentar uma variada gama de comportamentos, tais como *grooming*, *rearing* e

movimentos circulares, possivelmente associados ao reconhecimento do ambiente. Além disso, os episódios imóveis nesse ponto tendem a aumentar em função do tempo de teste (EILAM; GOLANI, 1989). No entanto, estudos demonstram que camundongos tendem a apresentar um menor repertório de comportamentos nesses pontos em relação a ratos, com ausência, por exemplo, de *grooming* e *rearing* (GORNÝ et al., 2002; THOMPSON; BERKOWITZ; CLARK, 2018). Em estudos utilizando peixes, o protocolo de identificação desses pontos foi adaptado às características comportamentais desses animais. Nesse caso, a imobilidade geralmente está associada à hipolocomoção, acinesia ou episódios de congelamento em resposta ao estresse e aumento da ansiedade (KALUEFF et al., 2013). Assim, a identificação das zonas-base em peixes procura eliminar a influência da imobilidade – contrária à exploração – e considera, além do tempo gasto em cada zona do tanque, o número de transições e a distância percorrida (STEWART et al., 2010). A posterior sobreposição desses fatores para cada área revela o ponto de preferência de cada animal testado (**Figura 3**).

Figura 3 – Protocolo de identificação das zonas-base adaptado para estudos com peixes.



Fonte: do autor.

A sensibilidade farmacológica desse comportamento também já foi explorada em diferentes espécies. Em ratos, a exposição a psicoestimulantes altera a ocupação dos pontos de preferência e a dinâmica de seus parâmetros correlatos. Por exemplo, animais tratados cronicamente com quinpirol, um agonista dos receptores dopaminérgicos D2 e D3, apresentaram um repertório de atos motores e tempo de visita menores em suas zonas-base, acompanhados por transições repetitivas entre um ponto e outro do aparato (SZECHTMAN;

SULIS; EILAM, 1998). Em roedores expostos à anfetamina, é possível observar comportamentos estereotipados no teste de campo aberto, com trajetórias espacialmente mais definidas, repetitivas e com maior número de episódios imóveis. Além disso, em doses maiores, ratos expostos à droga dividem sua atividade entre dois locais de preferência, ao contrário dos animais controle, que tendem a restringir suas zonas-base a um único local (EILAM; GOLANI, 1990). Tais alterações sugerem que a análise do comportamento exploratório após a administração dessas substâncias pode ser usada para o desenvolvimento de modelos animais ligados a transtornos neuropsiquiátricos, como o TOC e episódios do tipo psicóticos associados à esquizofrenia (EILAM et al., 2012; EILAM; SZECHTMAN, 2005; SZECHTMAN et al., 2016). Os comportamentos estereotipados observados após a administração de quinpirol, por exemplo, têm sido usados na comparação às compulsões observadas em pacientes com TOC (SZECHTMAN et al., 2016). Entretanto, a relação da dinâmica espaço-temporal do comportamento exploratório com diferentes estados afetivos, como distintos níveis de ansiedade ou até mesmo respostas do tipo ansiedade ligadas ao estresse, ainda não foi devidamente explorada.

Alterações na dinâmica de ocupação das zonas-base e de seus parâmetros correlatos após mudanças em determinadas condições do ambiente apontam a sensibilidade desse comportamento a componentes extrínsecos ao animal. O aumento das dimensões da arena é capaz de gerar excursões mais curtas e frequentes, e aumentar a ocupação da periferia (EILAM, 2003). Já a introdução de objetos ou paredes no campo aberto exerce influência sobre a localização dos pontos de preferência, os quais tendem a se deslocar para perto desses objetos (EILAM, 2003; THOMPSON; BERKOWITZ; CLARK, 2018). Em arenas escuras, o número de excursões tende a aumentar, ao passo que, em ambientes iluminados, esse efeito somente é observado após o aumento da complexidade do ambiente (EILAM, 2004). Tais resultados indicam, portanto, a importância das condições e da presença ou ausência de pistas ambientais para a organização da exploração. Estudos demonstram que pistas visuais, inclusive posicionadas fora do aparato de teste, influenciam e até modificam a localização das zonas-base. Entretanto, evidências sugerem uma preferência por estabelecer tais pontos próximo a pistas táteis, como objetos inseridos na arena, revelando uma hierarquia dos estímulos sensoriais em relação aos visuais (THOMPSON; BERKOWITZ; CLARK, 2018; WHISHAW et al., 2006). Dependendo da análise a ser realizada, esses fatores devem ser considerados, como em relação ao local em que os animais são colocados inicialmente no aparato, à presença de determinados elementos ou objetos no laboratório e até mesmo à localização do experimentador (JEDIDI-AYOUB et al., 2021). Por fim, a relação desses

pontos de preferência com a formação de representações e de memória espacial em relação ao ambiente é reforçada por estudos que mostram a conservação da localização das zonas-base durante repetidas sessões de teste. Por exemplo, ratos testados durante cinco dias seguidos no campo aberto mantiveram suas zonas-base próximas à pista visual, inclusive no quinto dia, quando a pista foi removida do teste (HINES; WHISHAW, 2005). Em outro estudo, os animais conservaram a localização de tais pontos durante as sessões até mesmo em um aparato tridimensional complexo (JEDIDI-AYOUB et al., 2021). Tais resultados demonstram que, a partir das pistas disponíveis no ambiente, os animais tendem a memorizar e aprender a relação fixa entre estas e a localização de seu ponto de preferência.

Além disso, a verificação da formação de zonas-base em diferentes táxons de vertebrados revela aspectos importantes de sua conservação evolutiva enquanto um importante componente para a orientação e aquisição de informações sobre o ambiente (STEWART et al., 2012). Entretanto, a investigação desse comportamento em certos grupos, como em peixes, ainda carece de análises mais aprofundadas acerca de sua organização e possível sensibilidade a diferentes modulações (CACHAT et al., 2013; IBRAHIM et al., 2014; STEWART et al., 2010). Assim, estudos utilizando espécies ainda consideradas alternativas na pesquisa científica podem auxiliar na afirmação desses organismos como modelos comportamentais relevantes, inclusive em pesquisas translacionais, além de ajudar a compreender o papel desse comportamento no processo evolutivo.

2.6 O PEIXE-ZEBRA COMO ORGANISMO MODELO PARA AVALIAR AS RESPOSTAS NEUROCOMPORTAMENTAIS INDUZIDAS PELO ESTRESSE

O peixe-zebra ou paulistinha (*Danio rerio*) é um teleósteo cuja utilização como modelo experimental tem se ampliado nos últimos anos, devido ao seu baixo custo, facilidade de manutenção e geração de proles numerosas. Além disso, a espécie apresenta cerca de 70% de similaridade genética com os seres humanos, características fisiológicas evolutivamente conservadas e um amplo repertório comportamental, o que permite seu uso em pesquisas translacionais (FONTANA et al., 2018; KALUEFF et al., 2013; STEWART et al., 2014). Por exemplo, análises relacionadas a comportamentos complexos, como ansiedade, agressividade, estresse, medo, dor e memória de curto e longo prazo podem ser realizadas a fim de se identificar o potencial terapêutico de novos fármacos e os efeitos provocados por compostos de interesse toxicológico (BAMBINO; CHU, 2017; KALUEFF; ECHEVARRIA; STEWART, 2014). Em relação ao teste de campo aberto, comportamentos como a tigmotaxia e a formação de zonas-base também são observados, indicando a conservação de

determinadas estratégias ligadas ao comportamento exploratório ao longo do processo evolutivo (MAXIMINO et al., 2010; SCHNÖRR et al., 2012; STEWART et al., 2010). Além disso, diversos estudos exploram a neurofisiologia do SNC do peixe-zebra, apontando que, apesar das grandes diferenças morfológicas em relação aos mamíferos, certas regiões apresentam funções análogas àsquelas observadas em roedores e humanos. O pálido lateral, por exemplo, executa funções semelhantes àsquelas desempenhadas pela amígdala e o hipocampo, sendo que este último possui papel chave no comportamento exploratório e na construção de memória espacial (VAZ; HOFMEISTER; LINDSTRAND, 2019). Já o bulbo olfatório é responsável por coletar informações de odor do ambiente e transmiti-las a outras regiões do cérebro, como o telencéfalo, o tálamo e a habênula (MIYASAKA et al., 2009). A nível celular, o peixe-zebra expressa subclasses de neurônios também encontrados em mamíferos, como os glutamatérgicos, com função excitatória; gabaérgicos, que são inibitórios; e neurônios aminérgicos, que expressam os neurotransmissores dopamina, serotonina, noradrenalina ou histamina (VAZ; HOFMEISTER; LINDSTRAND, 2019).

Em relação aos mecanismos envolvidos na resposta ao estresse, o peixe-zebra apresenta, assim como humanos, o cortisol como principal hormônio regulador das reações (ALSOP; VIJAYAN, 2009; EGAN et al., 2009). Sua liberação resulta da ativação do eixo hipotálamo-pituitária-inter-renal (HPI), análogo ao eixo hipotálamo-pituitária-adrenal (HPA). Assim, na presença de um estímulo estressor, ocorre a liberação do CRH pelo hipotálamo. Em resposta ao CRH, a glândula pituitária secreta ACTH, o qual, por meio da corrente sanguínea, atinge a glândula inter-renal, levando à liberação do cortisol. Da mesma forma como ocorre em mamíferos, o hormônio estimula processos como a gliconeogênese, o catabolismo proteico e liga-se a receptores de glicocorticoides (GR) (ALSOP; VIJAYAN, 2009; BURY; STURM, 2007; MOMMSEN; VIJAYAN; MOON, 1999; PIATO et al., 2011).

Estudos demonstram que maiores níveis de cortisol de corpo inteiro em peixe-zebra podem ser observados após a aplicação de protocolos de estresse agudo e crônico imprevisível (EGAN et al., 2009; MARCON et al., 2016, 2018; PIATO et al., 2011; QUADROS et al., 2016). Tais protocolos buscam desencadear tanto respostas adaptativas frente a um estímulo estressor momentâneo quanto mal adaptativas, a partir da aplicação contínua de estímulos aversivos. No caso do estresse agudo (EA), a exposição à substância de alarme de coespecíficos (CAS), além de alterar os níveis de cortisol, é capaz de provocar uma série de respostas comportamentais ligadas à ansiedade (ASSAD et al., 2020; LIMA et al., 2015; LUNKES et al., 2021; MEZZOMO et al., 2019; SHAMS; KHAN; GERLAI, 2021). A CAS é liberada pelas células epiteliais do peixe-zebra após algum dano físico e funciona como um

sinalizador químico para os coespecíficos, desencadeando respostas ligadas ao medo e à ansiedade (EGAN et al., 2009; QUADROS et al., 2016). Sua composição química ainda não é completamente elucidada, porém compostos como 3-N-óxido de hipoxantina, sulfato de condroitina e fragmentos de glicosaminoglicanos foram identificados como moléculas presentes na CAS. Quando administradas de forma isolada, essas moléculas provocam respostas aversivas em peixe-zebra, como congelamento e nado errático (SPEEDIE; GERLAI, 2008). A CAS, por sua vez, é capaz de aumentar a expressão de *c-fos* na habênula, região correspondente à amígdala em mamíferos e associada a reações de medo (NATHAN; OGAWA; PARHAR, 2015; OGAWA; NATHAN; PARHAR, 2014). Dessa forma, os animais expostos à CAS tendem a apresentar aumento da geotaxia (preferência pelo fundo) no teste de tanque novo, da tigmotaxia, da imobilidade, do nado errático e da coesão de cardume. Essa variedade de respostas ocorre sem, no entanto, alterar parâmetros gerais de locomoção, como distância percorrida e velocidade (ASSAD et al., 2020; LUNKES et al., 2021; QUADROS et al., 2016; ROSA et al., 2020). Curiosamente, o protocolo de perseguição com rede aumenta os níveis de cortisol, sem, entretanto, gerar respostas aversivas mais robustas como as observadas após a administração de CAS, sugerindo que tais alterações comportamentais podem depender do tipo e da intensidade do estressor empregado (MEZZOMO et al., 2019).

Em relação ao estresse crônico imprevisível (ECI), a variação do tipo de estresse e do horário de aplicação dos estímulos busca mimetizar situações que geram respostas fisiológicas e comportamentais mal adaptativas. Após a aplicação do protocolo de 7 dias, por exemplo, além do aumento de cortisol, ocorre a redução na expressão de GR cerebral em peixe-zebra, corroborando com uma regulação negativa da resposta ao ECI (PIATO et al., 2011). Já as principais alterações comportamentais observadas também envolvem o aumento da geotaxia, da tigmotaxia e da coesão de cardume, sendo que a locomoção geralmente se mantém inalterada (HENRÍQUEZ MARTÍNEZ et al., 2022; MARCON et al., 2016, 2018; THOMSON et al., 2020). Entretanto, é possível identificar sinais de déficit cognitivo, especialmente em testes relacionados à retenção de memória (PIATO et al., 2011). Já após a aplicação de ECI prolongado, que pode se estender por 14 dias ou até semanas de aplicação de estímulos estressores, além do aumento da ansiedade e de prejuízo a funções cognitivas, os animais tendem a apresentar respostas do tipo depressivas, como redução em parâmetros locomotores e na coesão de cardume (DEMIN et al., 2021; MOCELIN et al., 2019; PIATO et al., 2011; SONG et al., 2018). Tais diferenças observadas após a aplicação de cada protocolo ajudam a esclarecer como certos mecanismos fisiológicos e comportamentais buscam se

adaptar ou são influenciados de forma distinta de acordo com o tipo e intensidade dos estímulos empregados (**Figura 4**).

Figura 4 – Quadro geral dos principais parâmetros afetados por diferentes protocolos de estresse em peixe-zebra adulto.

Parâmetros	Estresse Agudo	ECI de 7 dias	ECI de 14 dias ou mais	Fontes
Geotaxia (tanque novo)	↑	↑	↑	(ASSAD et al., 2020; DEMIN et al., 2021; EGAN et al., 2009; MARCON et al., 2016, 2018; MEZZOMO et al., 2019; MOCELIN et al., 2019; PIATO et al., 2011; QUADROS et al., 2016; SONG et al., 2018; THOMSON et al., 2020)
Tigmotaxia	↑	↑	NA	(LIMA et al., 2015; MARTINEZ et al., 2022)
Imobilidade	↑	NA	↑	(EGAN et al., 2009; QUADROS et al., 2016; SONG et al., 2018)
Nado errático	↑	NA	NA	(EGAN et al., 2009; MEZZOMO et al., 2019; QUADROS et al., 2016)
Parâmetros locomotores	—	—	↓	(LUNKES et al., 2021; MARCON et al., 2016, 2018; PIATO et al., 2011; QUADROS et al., 2016; SONG et al., 2018; THOMSON et al., 2020)
Coesão de cardume	↑	↑	↓	(DEMIN et al., 2021; PIATO et al., 2011; ROSA et al., 2020)
Déficit cognitivo	NA	↑	↑	(PIATO et al., 2011)
Níveis de cortisol	↑	↑	↑	(LUNKES et al., 2021; MARCON et al., 2016, 2018; MEZZOMO et al., 2019; PIATO et al., 2011; SHAMS et al., 2021; SONG et al., 2018)

Setas para cima e para baixo indicam aumento e diminuição nos parâmetros correspondentes, respectivamente. As barras correspondem a parâmetros que permanecem inalterados após a aplicação dos protocolos. Parâmetros não avaliados estão representados por “NA”. Fonte: do autor.

Apesar da gama de informações conhecidas acerca dos efeitos promovidos por diferentes tipos de estresse, há poucas análises detalhadas a respeito de como a organização de comportamentos complexos, como a exploração, se adapta a esses processos. Além disso, apesar de o estabelecimento de zonas-base pelo peixe-zebra no teste de campo aberto já ter sido descrito (STEWART et al., 2010), o processo de organização sequencial do comportamento exploratório na espécie necessita de investigações. Assim, novos estudos podem inclusive esclarecer o quanto tal abordagem pode ser usada para compreender mecanismos neurocomportamentais de interesse em uma perspectiva translacional.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Investigar os efeitos promovidos pelo estresse agudo e estresse crônico imprevisível na organização sequencial do comportamento exploratório de peixe-zebra.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Analisar o padrão temporal da formação de zonas-base na ausência e presença dos diferentes estressores utilizando um índice para formação dessas zonas;

- Verificar como os diferentes tipos de estresse modulam padrões comportamentais relacionados à exploração e à zona-base a partir da quantificação das transições, tempo gasto e distância percorrida nesses pontos, bem como a análise do perfil de excursões e imobilidade apresentado por cada grupo experimental;

- Investigar a influência do EA e do ECI sobre parâmetros locomotores gerais, como a distância total percorrida e velocidade, tanto nas zonas-base quanto nas demais regiões da arena de campo aberto;

- Avaliar como os estressores aplicados influenciam o padrão geral de ocupação espacial a partir da verificação da distribuição da exploração entre o centro e a periferia do aparato e da quantificação dos níveis de tigmotaxia dos animais.

4 HIPÓTESES

1. A formação das zonas-base ocorre de modo gradual em peixe-zebra na medida em que o animal explora o aparato do campo aberto.

2. A distribuição espacial, ligada à tigmotaxia, e temporal, relacionada à ocupação das zonas-base, difere no peixe-zebra de acordo com o tipo de estresse.

3. Os parâmetros exploratórios correlatos a essas bases, como o padrão de excursões e de episódios imóveis, são diferentemente afetados pelo tipo de estresse aplicado.

5 ARTIGO CIENTÍFICO

Influence of acute and unpredictable chronic stress on spatio-temporal dynamics of exploratory activity in zebrafish with emphasis on homebase-related behaviors

João V. Borba, Eduarda Biasuz, Giovana R. Sabadin, Ana C. Savicki, Julia Canzian, Ana C.

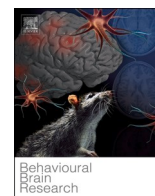
Luchiari, Isaac A. Adedara, Denis B. Rosemberg

Artigo científico publicado no periódico ***Behavioural Brain Research***, 435 (2022) 114034

(*Fator de Impacto = 3.332, Qualis CAPES CBII = A2*)

Contents lists available at [ScienceDirect](https://www.sciencedirect.com)

Behavioural Brain Research

journal homepage: www.elsevier.com/locate/bbr

Influence of acute and unpredictable chronic stress on spatio-temporal dynamics of exploratory activity in zebrafish with emphasis on homebase-related behaviors

João V. Borba^{a,b,*}, Eduarda Biasuz^a, Giovana R. Sabadin^a, Ana C. Savicki^a, Julia Canzian^{a,b}, Ana C. Luchiari^c, Isaac A. Adedara^{a,d}, Denis B. Rosemberg^{a,b,e,**}

^a Laboratory of Experimental Neuropsychobiology, Department of Biochemistry and Molecular Biology, Natural and Exact Sciences Center, Federal University of Santa Maria, 1000 Roraima Avenue, Santa Maria, RS 97105-900, Brazil

^b Graduate Program in Biological Sciences, Toxicological Biochemistry, Federal University of Santa Maria, 1000 Roraima Avenue, Santa Maria, RS 97105-900, Brazil

^c Department of Physiology and Behavior, Federal University of Rio Grande do Norte, Natal, RN 59078-900, Brazil

^d Drug Metabolism and Toxicology Research Laboratories, Department of Biochemistry, College of Medicine, University of Ibadan, Ibadan, Nigeria

^e The International Zebrafish Neuroscience Research Consortium (ZNRC), 309 Palmer Court, Slidell, LA 70458, USA

ARTICLE INFO

Keywords:

Spatio-temporal exploration

Homebase

Stress

Open field

Zebrafish

ABSTRACT

The open field is a suitable task to analyze the sequential organization of exploratory activity and the homebase formation represents an important feature of environmental recognition. Although the zebrafish can define homebase locations, there are no data reporting how stressful conditions modulate complex behaviors of this aquatic species in the open field so far. Here, we aimed to characterize the spatio-temporal exploratory activity of adult zebrafish in the open field test, as well as to verify the responsiveness of homebase-related parameters to acute stress (AS) and unpredictable chronic stress (UCS) protocols. Animals were exposed to conspecific alarm substance for 5 min or subjected to a 7-days stress protocol using distinct stressors in an unpredictable manner. Immediately after exposure to AS or 24 h after UCS, fish were individually placed in a circular tank and their behaviors were recorded for 30 min to identify the respective homebase for each animal. We observed that UCS, but not AS, increased thigmotaxis compared to the non-stressed fish. Notably, the sequential organization of exploratory activity showed robust differences depending on the stress protocol. After the first 15 min of trial, AS-challenged fish apparently used the homebase to organize briefly explorations to the environment. Conversely, the UCS group was more immobile in the homebase after periodically performing 'swimming bursts' to the periphery with a greater number of stops per trip. Physiological stress responses were confirmed by the increased whole-body cortisol in both AS and UCS groups. In conclusion, our novel findings report a different exploratory profile related to stress responses in adult zebrafish tested in the open field, supporting the sensitivity of homebase-related parameters to manipulations that modulate affective-like states.

1. Introduction

The open field test is widely used in animal psychology and provides data related, for example, to locomotion, anxiety-like behaviors, and stereotyped movements in a simple and reliable manner [1,2]. The task consists basically of dividing a homogeneous, plain, and illuminated arena into zones (e.g., center and periphery) [3] to quantify a wide range

of behaviors during a specific period of time [4]. The test also allows the analysis of the sequential (spatio-temporal) organization of exploration, in which the spatial analysis of behavior may provide key information related to thigmotaxis (i.e., preference for periphery over the center area) in various species, such as rodents and fish [4–7]. Temporally, the number and distance of exploratory episodes in the environment (trips), as well as the number of stops are measured, using as a start point the

* Corresponding author at: Laboratory of Experimental Neuropsychobiology, Department of Biochemistry and Molecular Biology, Natural and Exact Sciences Center, Federal University of Santa Maria, 1000 Roraima Avenue, Santa Maria, RS 97105-900, Brazil.

** Correspondence to: Department of Biochemistry and Molecular Biology, Natural and Exact Sciences Center, Federal University of Santa Maria, Santa Maria, RS 97105-900, Brazil.

E-mail addresses: jvborba29@gmail.com (J.V. Borba), dbrosemberg@gmail.com (D.B. Rosemberg).

<https://doi.org/10.1016/j.bbr.2022.114034>

Received 19 May 2022; Received in revised form 21 July 2022; Accepted 28 July 2022

Available online 30 July 2022

0166-4328/© 2022 Elsevier B.V. All rights reserved.

homebase identification [8,9], which correlates with habituation process.

The homebase behavior is based on the establishment of reference points that serve as key locations to guide the exploration of the environment [9,10]. Organisms of different species, after defining these locations, generally close to the edges of the arena [4], move most of the time into these points and migrate from there to perform trips within the environment [10]. Changes in experimental conditions (e.g., dimensions of the arena, presence of walls and objects, and light intensity) affect the pattern of trips and stops, peripheral distribution, and the location of homebases [3,4], suggesting that both internal and external cues influence the organization of exploration [11]. Furthermore, homebase-related endpoints have shown to be sensitive, for example, to the administration of psychostimulants, constituting a possible tool for the study of psychiatric disorders, such as obsessive-compulsive disorder (OCD), and psychotic-like episodes [12–14]. For example, rats exposed to quinpirole, an agonist of D₂ and D₃ dopaminergic receptors show reduced repertoire of motor acts and shorter homebase visit intervals compared to control, associated with increased repetitive behavior, paralleling compulsive behaviors found in OCD [12]. Thus, the use of alternative vertebrate models may help understand how homebase-related behaviors can be modulated in the presence of distinct experimental manipulations in a spatio-temporal perspective.

The zebrafish (*Danio rerio*) has emerged as an experimental organism in translational research in the last decade, due to its low cost, ease of maintenance, and the presence of evolutionarily conserved genetic and physiological features [15,16]. In addition, this species has a well-characterized behavioral repertoire, allowing an in-depth investigation of complex behavioral patterns [7]. Both thigmotaxis and homebase formation in zebrafish have been reported previously, supporting the conservation of these behavioral strategies throughout the evolutionary process [8]. Previous data have shown that exposure to ibogaine (i.e., a psychoactive alkaloid) reduces the latency to homebase formation in zebrafish, reinforcing the sensitivity of such behavior to pharmacological manipulations in this aquatic species [17]. However, in relation to the reference points of exploration, studies using zebrafish as model organism are scarce, being often limited to the identification of homebases [8,10,18]. Moreover, the influence of manipulations that modulate affective-like states on homebase formation and how such points are used to explore the environment has not been reported yet. Here, we aimed to analyze for the first time the spatio-temporal organization of exploratory behavior in zebrafish subjected to the open field test and to verify the responsiveness of homebase-related parameters to different stress protocols (acute stress and unpredictable chronic stress). Based on the importance of 'safe points' as key locations in animal neurobehavioral research [9–12], we postulate that the two aforementioned stressful conditions may differently affect homebase-related behaviors in zebrafish and, thus, the overall exploratory activity in the open field.

2. Materials and methods

2.1. Animals and maintenance

Adult zebrafish (*Danio rerio*) with 4–6 months-old from both sexes (short fin phenotype, ~50:50 male/female ratio) were acquired from a local commercial supplier (Hobby Aquários, RS, Brazil). This outbred population is widely used in behavioral studies since they are expected to be genetically heterogeneous closely resembling those found in natural conditions, thereby decreasing the effects of arbitrary genetic drifts [19,20]. Fish were maintained for at least two weeks in 40-L thermostatic tanks at a maximum density of 2 animals per liter of dechlorinated water under constant mechanical and chemical filtration. Tanks were kept at 27 ± 1 °C, pH 7.2, conductivity at 1300–1500 $\mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$, dissolved oxygen at 6.0 ± 0.1 mg/L, total ammonia at < 0.01 mg/L, nitrate (NO₃) < 50 mg/L, nitrite (NO₂) < 0.1 mg/L, alkalinity and hardness at 75 mg/L

CaCO₃. Illumination was provided by fluorescent lamps, adjusted to a 14/10-hour light/dark photoperiod cycle (lights on at 7:00 am). Feeding was administered twice a day with commercial flake fish food (Alcon BASIC™, Alcon, Brazil). Animals used were naive and maintained following the National Institute of Health Guide for Care and Use of Laboratory Animals. All protocols were approved by the Institutional Animal Care and Use Committee (process number 7412110722).

2.2. Acute stress (AS) protocol: exposure to the conspecific alarm substance (CAS)

To evoke the AS in zebrafish, animals ($n = 12$ per group) were randomly distributed in each group and individually exposed to a 1-L tank containing dechlorinated water in the absence (control) or presence of 3.5 mL/L CAS for 5 min. Both exposure time and concentration used were based on previous reports, which showed robust aversive behaviors in zebrafish [21,22]. The extraction of CAS was performed as described previously [21,22]. Briefly, donor fish were removed from the maintenance tank, anesthetized in cold water at 4°C, and euthanized by decapitation. Donor fish were individually placed in a Petri dish with 10-mL of distilled water. Then, 10–15 superficial cuts were performed in each side of the body to release the pheromone from damaged club cells, avoiding blood extravasation and consequent contamination of the solution. The solution was mixed gently to fully cover lacerated portions of the animals. Importantly, CAS preparation was entirely made on ice and a total of 6 donor fish were used for independent CAS preparations in the acute stress protocol to ensure data reproducibility.

2.3. Unpredictable chronic stress (UCS) protocol

It is known that UCS can trigger anxiety-related behaviors in both rodents and fish without changing locomotion-based parameters [21,23,24]. As reported elsewhere [24,25], the UCS protocol was performed for 7 consecutive days, in which different stressors were applied two times daily in an unpredictable manner (Table 1). The stressors used were: i) chasing (using an aquarium net for 8 min); ii) cooling (exposure to dechlorinated water at 23°C for 30 min); iii) CAS exposure (3.5 mL/L for 5 min); iv) social isolation in a beaker containing 250 mL of dechlorinated water for 45 min; v) crowding (increased density of individuals, in which 10 animals were placed in a beaker containing 250 mL of water for 50 min); vi) tank change (three consecutive tank changes); vii) low water level (the dorsal region of the body remained above the surface for 2 min); and viii) heating (exposure to dechlorinated water at 33°C for 30 min). Before the experiments, animals were randomly divided into two experimental groups: control and UCS ($n = 14$ per group). During the 7-day stress period, control fish remained in the maintenance tanks under standard maintenance conditions.

Table 1

Protocol used for modeling UCS in zebrafish, with two exposures to distinct stressors per day during a 1-week period.

Days	Morning	Afternoon
1	9:00 AM Chasing	3:00 PM Crowding
2	11:00 AM Cooling	2:00 PM Tank change
3	8:30 AM Social isolation	4:00 PM Low water level
4	10:30 AM Crowding	2:30 PM Chasing
5	9:00 AM CAS exposure	4:30 PM Heating
6	11:30 AM Tank change	2:00 PM Social isolation
7	10:00 AM Low water level	5:00 PM Cooling

2.4. Open field test

Immediately after exposure to the acute stressor and 24 h after the UCS protocol (8th day), animals were gently placed in the center of the apparatus using an aquarium net. The open field was performed in a circular tank, with dimensions of 25 × 6 cm (diameter × water column height), with transparent walls and a homogeneous light gray bottom to ensure proper contrast and facilitate the detection of fish. Light intensity was set at 180 lux above the apparatus (measured using a luxmeter app from Android) to ensure a constant and uniform illumination by fluorescent light tubes. Importantly, the use of a 6-cm water column height was chosen to reduce vertical swimming activity of fish, stimulating the horizontal exploration in the tank [26]. The arena was virtually divided into center and periphery (6 cm from the edge) and 16 sections (8 on each area) were created to estimate homebase formation (Fig. S1). Behavioral activities were recorded for 30 min immediately after placing the fish into the tank using a top-located webcam at approximately 60 cm from the surface. Videos were analyzed at 30 frames/s using an appropriate video tracking tool (ANY-Maze™, Stoelting, CO, USA) to avoid influence of external observers. Data of interest (locomotion-, exploration-, and homebase-related behaviors) were later exported separately into Excel spreadsheets. Thigmotaxis was estimated by the ratio between time spent in periphery per time spent in center area. Two apparatuses were simultaneously used for behavioral analyses and the water was replaced after each trial. Groups were tested in a randomized manner (randomization provided by <https://www.random.org/>) and no blinding was performed since all data were directly extracted offline from the automated software.

2.4.1. Homebase identification

The identification of homebase was based in previous reports [10]. Basically, the exploratory activities of fish in each section of the tank (1–16, see Fig. S1) during the 30-min trial were analyzed and a homebase index (HI) was estimated by using the following formula: $HI = \text{distance traveled} \times \text{time spent} \times \text{number of entries}$. These endpoints were selected to eliminate the influence of immobility on such response, since homebase formation depends on exploration and recognition of a 'safe place' in the open field arena during the trial [10]. The respective formula was applied for each section to define the zones occupancy and to estimate the homebase for each fish (Fig. S1), which were used for further analyses and correlate with those with increased activity observed in the automated behavioral plots. The HI was also extracted every 5 min across the trial and highest index value for each animal was used to estimate the latency to homebase formation.

2.4.2. Quantification of trips and stops

After homebase formation, animals tend to perform trips to explore the environment, returning periodically to their selected 'safe point' [4, 9,10]. The number of trips was calculated by comparing the exits and entries in the homebase. The average duration of trips and average distance of trips were calculated using the following ratios: $\text{time spent in non-homebase areas} / \text{number of entries in the homebase}$ and $\text{distance traveled in non-homebase areas} / \text{number of entries in the homebase}$, respectively. To assess the number of stops per trip, the following formula was used: $\text{number of immobile episodes in non-homebase areas} / \text{number of trips}$. These behaviors were also chosen to construct representative ethograms expressing the overall exploratory activity pattern of each group as described previously [18,27,28].

2.5. Whole-body cortisol levels

Whole-body cortisol measurements were performed to confirm the effectiveness of the stress response at a physiological level. Cortisol extraction was performed as described previously [29,30]. After the stress protocols, other cohorts of fish ($n = 6$ per group) were euthanized, decapitated, and frozen in liquid nitrogen. Each animal was weighed,

minced, and further homogenized in 1 mL of phosphate buffer saline (PBS, pH 7.4). Samples were then transferred to 2.5 mL of ethyl ether, vortexed for 1 min and briefly placed in liquid nitrogen. The supernatant (unfrozen portion) was transferred to another tube and kept overnight at room temperature until complete evaporation. The final lipid-enriched fraction was resuspended in 500 μL of PBS and used for the cortisol measurements using the EIAgen™ CORTISOL test (BioChem Immuno-Systems). Samples were run in duplicate and results expressed as ng cortisol/g tissue using a standard curve with cortisol solutions at 0.5–60 $\mu\text{g/dL}$ [29].

2.6. Statistical analysis

Normality of data and homogeneity of variances were analyzed by Kolmogorov-Smirnov and Bartlett's tests, respectively. Results were expressed as means \pm standard error of the mean (S.E.M.) and nonparametric data were log-transformed. Statistics were performed by two-way repeated measures analysis of variance (RM-ANOVA), two-way ANOVA, or Student's *t*-test, depending on experimental data. Post-hoc analyses were carried out by the Student-Newman-Keuls multiple comparisons test whenever appropriate. One animal from UCS group was excluded from data analyses since it jumped out from the experimental tank in the final period of test. Thus, the number of subjects used for the AS protocol was set at 12 fish for both groups. For the unpredictable chronic stress protocol, the final number was 14 and 13 fish for non-stressed and stressed groups, respectively. Importantly, the number of subjects used is in accordance with previous data of zebrafish behavioral assays [18,24,31]. All statistical analyses were performed using a graphing and statistics software (GraphPad Prism 8.0™) and results were considered significant when $p \leq 0.05$. Effects sizes to all reported *t* and *F* values were expressed as Hedges' *g* (*g*) and partial eta squared (η^2), respectively.

3. Results

In order to elucidate the homebase formation pattern of zebrafish, we first analyzed the temporal dynamics of homebase-related behaviors across the 30-min trial (Fig. 1). In the AS protocol, there were no significant effects of interaction, time interval, or group factors for the endpoints measured (Fig. 1A). Regarding the UCS (Fig. 1B), Two-way RM-ANOVA yielded significant effects of group × time intervals interaction for transitions ($F_{(5,125)} = 2.760$, $p = 0.0212$, $\eta^2 = 0.099$) and distance traveled ($F_{(5,125)} = 2.530$, $p = 0.0322$, $\eta^2 = 0.092$). Temporal analyses also revealed a significant effect of time intervals ($F_{(5,125)} = 2.321$, $p = 0.0470$, $\eta^2 = 0.085$) and group ($F_{(1,25)} = 4.462$, $p = 0.0448$, $\eta^2 = 0.035$) for distance traveled in the homebase. Endpoint data (Fig. 2) revealed that AS did not change transitions, time, and distance traveled in the homebase (Fig. 2A). However, fish submitted to UCS traveled lower distances in the homebase compared with CTRL ($t = 2.110$, $df = 25$, $p = 0.0450$, $g = 0.788$) (Fig. 2B).

Fig. 3 shows the average duration of entries in the homebase for each stress protocol tested. We observed that AS did not change this parameter in the open field test (Fig. 3A). In the UCS, two-way RM-ANOVA yielded a significant effect of group ($F_{(1,25)} = 6.808$, $p = 0.0151$, $\eta^2 = 0.214$) across the test, in which UCS-exposed fish showed increased average duration of entries in the homebase in relation to the respective CTRL after endpoint analysis ($t = 2.608$, $df = 25$, $p = 0.0151$, $g = -0.974$) (Fig. 3B).

The homebase formation tendency of each group, as well as the exploratory profiles using the homebase as key point location are shown in Fig. 4. Notably, the homebase index reached maximum values after the first 15-min of test interval. No differences were found in the AS protocol regarding the latency to homebase formation (Fig. 4A). Moreover, AS did not elicit significant differences in the number, average duration of trips, and in the number of stops per trip, but the trips were shorter when compared to those observed in CTRL ($t = 2.204$, $df = 22$,

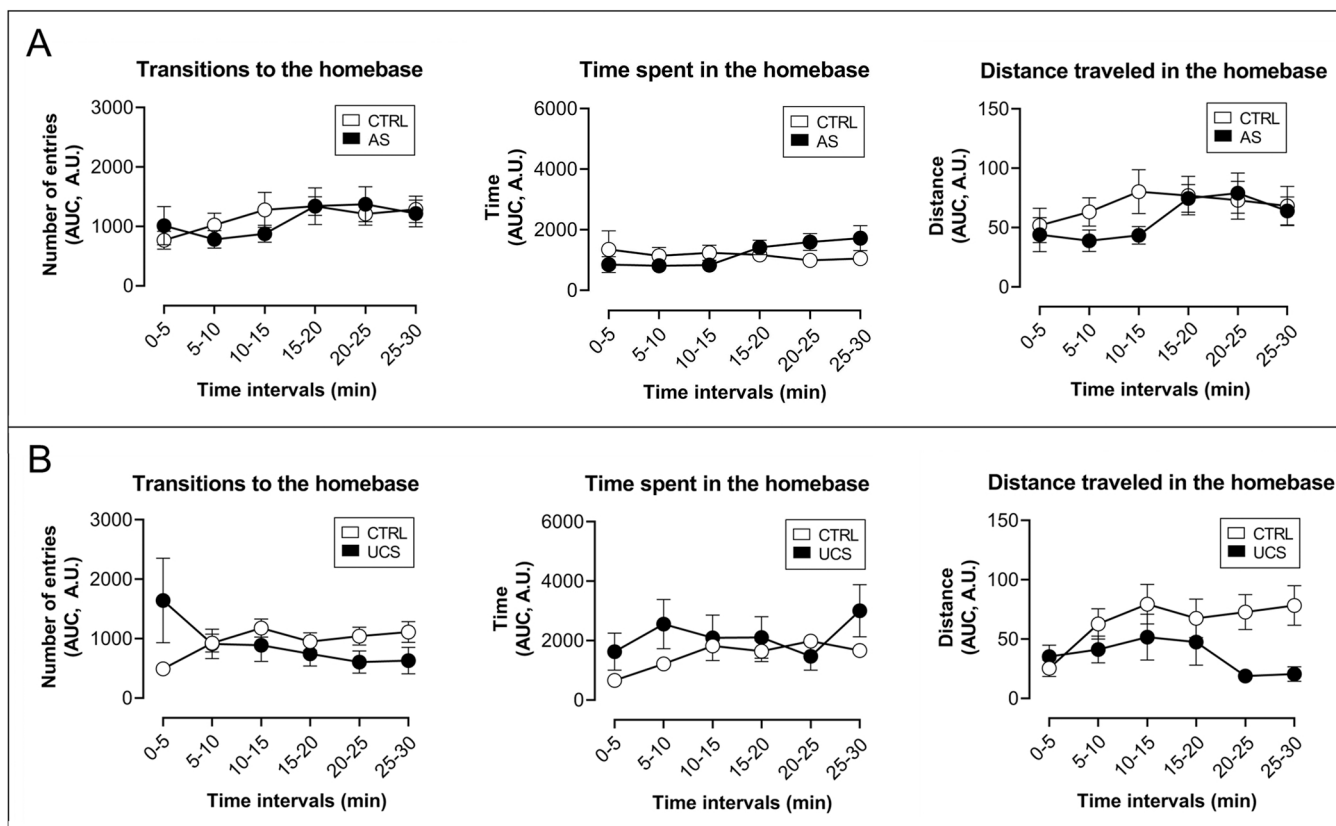


Fig. 1. Temporal dynamics of homebase-related behaviors in zebrafish following acute (AS) (A) or unpredictable chronic stress (UCS) (B) protocols. Behavioral responses were measured in 30 s fractions across the trial and later calculated in 5-min intervals as the area under the curve (AUC). Data are expressed as means \pm S.E.M. and analyzed by two-way RM-ANOVA followed by Student-Newman-Keuls multiple comparison test whenever necessary ($n = 12-14$ per group, $p \leq 0.05$ as significant).

$p = 0.0383$, $g = 0.869$) (Fig. 4B). The respective exploratory profile of fish subjected to AS was also shown as representative ethograms of behavior (Fig. 4C). Two-way RM-ANOVA yielded significant effects of group \times time intervals interaction for the homebase index ($F_{(5,125)} = 2.220$, $p = 0.048$, $\eta^2 = 0.082$) in UCS-challenged fish. The latency to homebase formation did not change and the homebase index were similar in the first 15-min interval. However, UCS markedly decreased the index values across the trial ($F_{(5,125)} = 2.496$, $p = 0.0343$, $\eta^2 = 0.091$), as observed in the last 10 min of test (Fig. 4D). Furthermore, UCS did not modify the average duration and length of trips, while the number of trips reduced significantly in stressed fish ($t = 2.253$, $df = 25$, $p = 0.0333$, $g = 0.842$) and the number of stops per trip increased in relation to CTRL ($t = 2.200$, $df = 25$, $p = 0.0373$, $g = -0.822$) (Fig. 4E). The marked differences on the number of stops and trips were depicted as representative ethograms for UCS-challenged fish (Fig. 4F).

In order to examine the exploration of the homebase during the first and second half of the trial, we further divided the 30-min of trial into two periods of 15 min (Fig. 5). Two-way RM-ANOVA yielded that the transitions to the homebase area increased in both CTRL and AS groups in the second period of test ($F_{(1,22)} = 12.42$, $p = 0.0019$, $\eta^2 = 0.361$). Significant effects of group \times time period interaction ($F_{(1,22)} = 5.659$, $p = 0.0265$, $\eta^2 = 0.205$) and time period ($F_{(1,22)} = 8.886$, $p = 0.0069$, $\eta^2 = 0.288$) were observed for time spent in the homebase and distance traveled in the homebase, respectively. Post-hoc analyses revealed that both endpoints increased in the last 15 min of test in AS group. The average duration of entries in the homebase did not vary between groups in the AS protocol when the first and second period of test were analyzed (Fig. 5A). In the UCS protocol (Fig. 5B), the transitions to the homebase increased in the last half of test in CTRL, but decreased in stressed fish as evidenced by the significant effect of group \times time period

interaction ($F_{(1,25)} = 5.488$, $p = 0.0274$, $\eta^2 = 0.180$). While no differences were found in the time spent in the homebase, the stressed group traveled lower distances in the homebase compared with CTRL in the last 15 min of test ($F_{(1,25)} = 4.984$, $p = 0.0348$, $\eta^2 = 0.166$ for the interaction factor). Furthermore, UCS group showed higher average duration of entries in the homebase in both time intervals ($F_{(1,25)} = 6.476$, $p = 0.0175$, $\eta^2 = 0.206$ for the group factor).

Fig. 6 shows the immobility of each experimental group in the open field test. In the AS protocol (Fig. 6A-B), temporal analyses of behavior did not show significant differences in time immobile in homebase and non-homebase areas for CTRL and AS groups. Although the time immobile in the homebase did not change between groups, endpoint data revealed that AS had increased immobility in non-homebase areas ($F_{(1,44)} = 4.080$, $p = 0.0495$, $\eta^2 = 0.085$) (Fig. 6A). Furthermore, we did not observe differences in the immobility across test and total time immobile between groups (Fig. 6B). For the UCS (Fig. 6C-D), two-way RM-ANOVA yielded significant effects of tank area \times time intervals interaction ($F_{(5,130)} = 3.394$, $p = 0.0065$, $\eta^2 = 0.115$), time intervals ($F_{(5,130)} = 3.178$, $p = 0.0097$, $\eta^2 = 0.109$), and tank area ($F_{(1,26)} = 5.639$, $p = 0.0252$, $\eta^2 = 0.178$) for CTRL fish, which were kept in housing tanks without stress for 7 days and showed higher immobility in non-homebase areas during the first 10 min. A significant effect of tank area \times time intervals interaction ($F_{(5,120)} = 2.401$, $p = 0.0409$, $\eta^2 = 0.091$) was verified in UCS-challenged fish, with higher immobility in non-homebase areas during the first 10 min and in the homebase after 20 min of test. Additionally, the time immobile in the homebase was higher in UCS group across the trial ($F_{(1,25)} = 13.41$, $p = 0.0012$, $\eta^2 = 0.349$), which also showed increased immobility in non-homebase areas compared with CTRL ($F_{(1,50)} = 27.56$, $p < 0.0001$, $\eta^2 = 0.355$) (Fig. 6C). The overall immobility for UCS group was higher than that

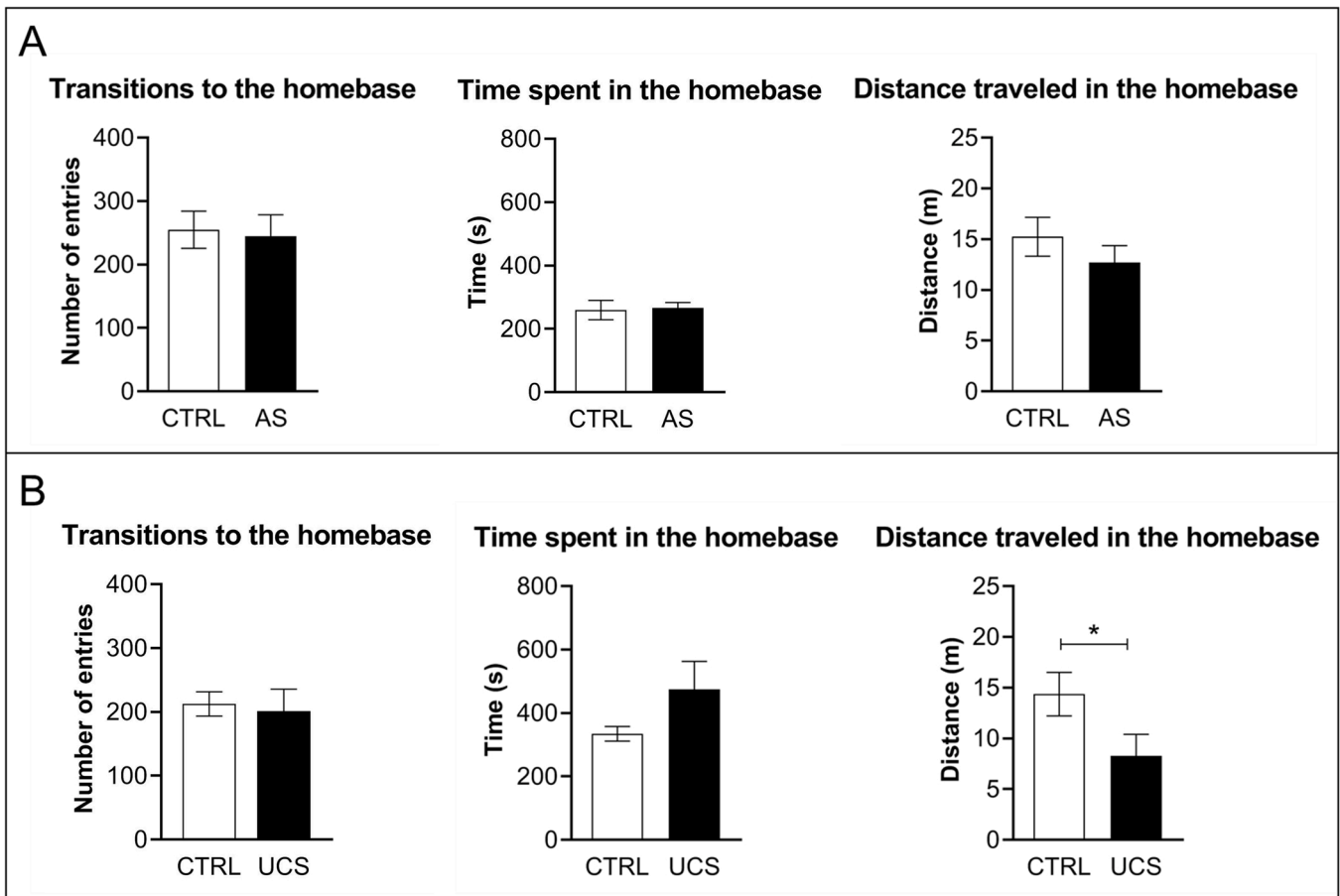


Fig. 2. Homebase-related behaviors in zebrafish following acute (AS) (A) or unpredictable chronic stress (UCS) (B) protocols. Behavioral endpoints were accessed in a 30-min trial. Data are expressed as means \pm S.E.M. and analyzed by Student's *t*-test ($n = 12$ – 14 per group, * $p \leq 0.05$).

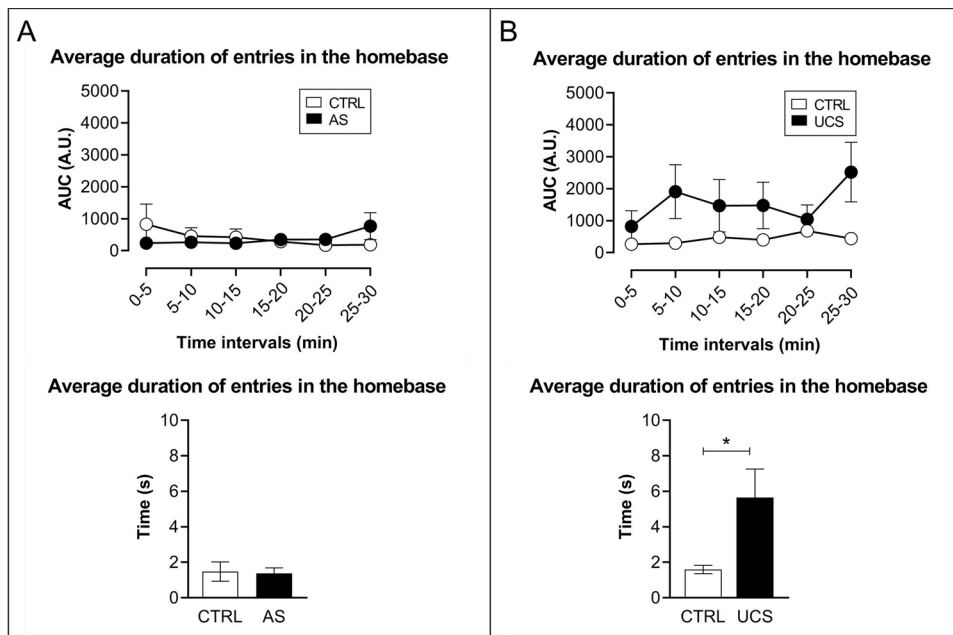


Fig. 3. Average duration of entries in the homebase following acute (AS) (A) or unpredictable chronic stress (UCS) (B) protocols. Temporal dynamics were measured in 30 s fractions across the trial and later calculated in 5-min intervals as the area under the curve (AUC). Behavioral endpoints were accessed in a 30-min trial. Results are expressed as means \pm S.E.M. and analyzed by two-way RM-ANOVA, or Student's *t*-test, depending on experimental data. Post-hoc analyses were carried out by the Student-Newman-Keuls multiple comparisons test whenever appropriate ($n = 12$ – 14 per group, * $p \leq 0.05$).

verified in CTRL, as evidenced by two-way RM-ANOVA for temporal analysis of behavior ($F_{(5125)} = 3.341$, $p = 0.0072$, $\eta p^2 = 0.118$ for time intervals factor; $F_{(1,25)} = 25.81$, $p < 0.0001$, $\eta p^2 = 0.508$ for group factor) corroborated by endpoint data ($t = 4.696$, $df = 25$, $p < 0.0001$, g

$= -1.750$) (Fig. 6D).

The influence of the stress protocols on locomotion was also assessed (Fig. 7). Both AS and UCS did not modify the total distance traveled and maximum speed. AS decreased the average speed in non-homebase

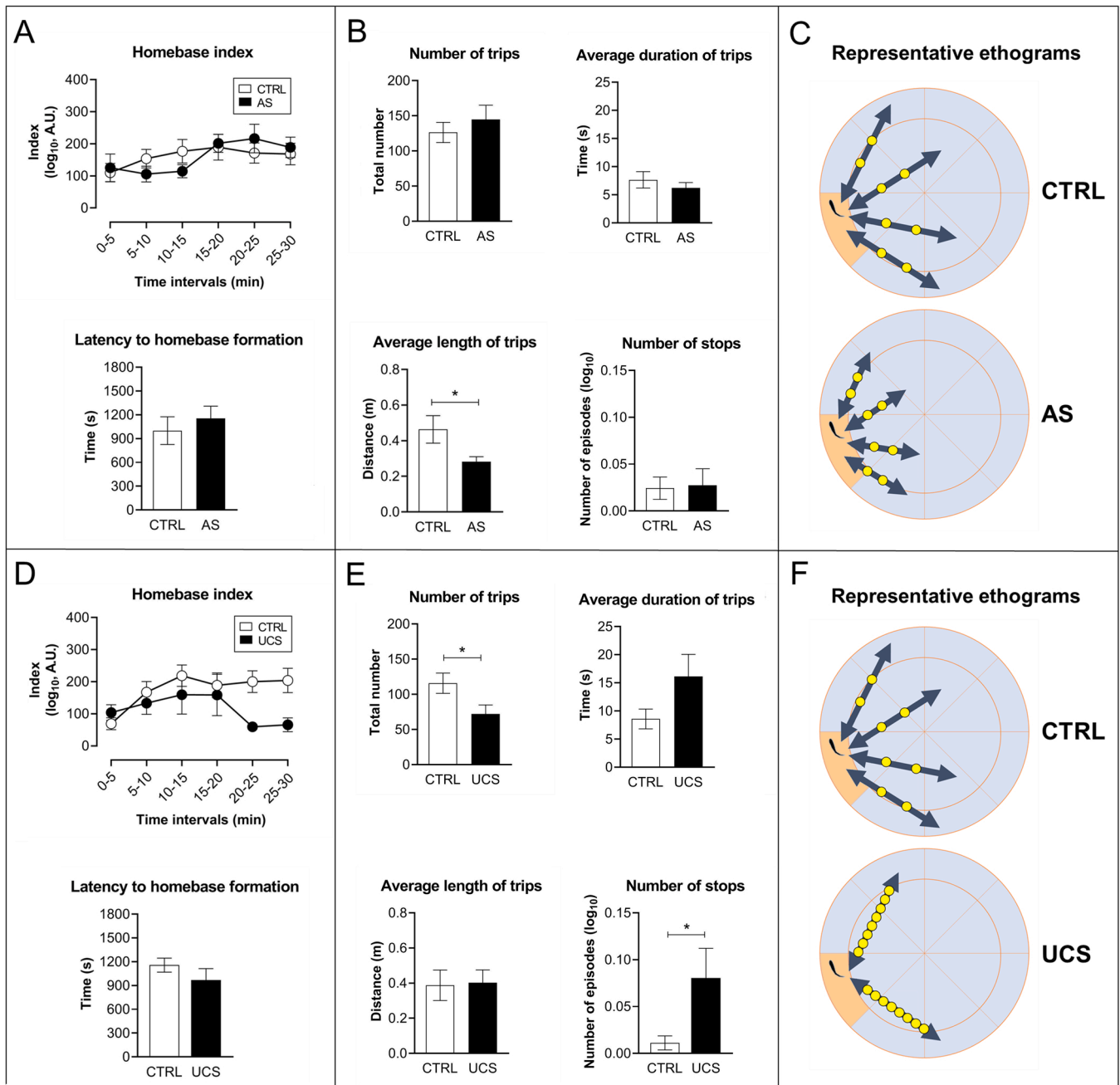


Fig. 4. Homebase formation and organization of exploratory activity following acute (AS) (A–C) or unpredictable chronic stress (UCS) (D–F). Homebase index was measured in 30 s fractions across the trial and later calculated in 5-min intervals as the area under the curve (AUC). Latency to homebase formation was estimated by the highest index value of each animal across the trial. Trips patterns and the number of stops per trip were accessed in the last 15 min of trial. Representative ethograms illustrate the exploratory profile of each group tested. Orange zones represent putative homebase locations and yellow circles, the number of stops per trip. The number, thickness, and length of arrows correspond to the number, duration, and length of trips, respectively. Results are expressed as means \pm S.E.M. and analyzed by two-way RM-ANOVA, or Student's *t*-test, depending on experimental data. Post-hoc analyses were carried out by the Student-Newman-Keuls multiple comparisons test whenever appropriate ($n = 12$ – 14 per group, * $p \leq 0.05$). (For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

areas when compared with the respective CTRL ($F_{(1,44)} = 8.482$, $p = 0.0056$, $\eta^2 = 0.162$ for group factor) (Fig. 7A). Conversely, UCS showed higher average speed in non-homebase areas than that verified in the homebase ($F_{(1,50)} = 14.81$, $p = 0.0003$, $\eta^2 = 0.229$ for tank area factor) (Fig. 7B).

Aiming to analyze the spatial activity of zebrafish in the open field test, the occupancy in center and periphery areas were assessed (Fig. 8). We did not find significant differences between CTRL and AS groups for all behaviors measured, although the acutely stressed fish showed a

tendency to initially spend more time in the center zone, which is reflected by the representative temporal analysis of behavior and occupancy plots (Fig. 8A). In the UCS experiment (Fig. 8B), two-way ANOVA yielded significant effects of group \times tank area interaction ($F_{(1,50)} = 7.895$, $p = 0.0071$, $\eta^2 = 0.136$) and tank area ($F_{(1,50)} = 33.56$, $p < 0.0001$, $\eta^2 = 0.402$) were found for the behavioral endpoint time spent per area. Post-hoc analysis revealed that both CTRL and UCS group spent more time in the periphery, in which stressed fish presented increased thigmotaxis ($t = 2.302$, $df = 25$, $p = 0.0299$, $g = -0.860$) as

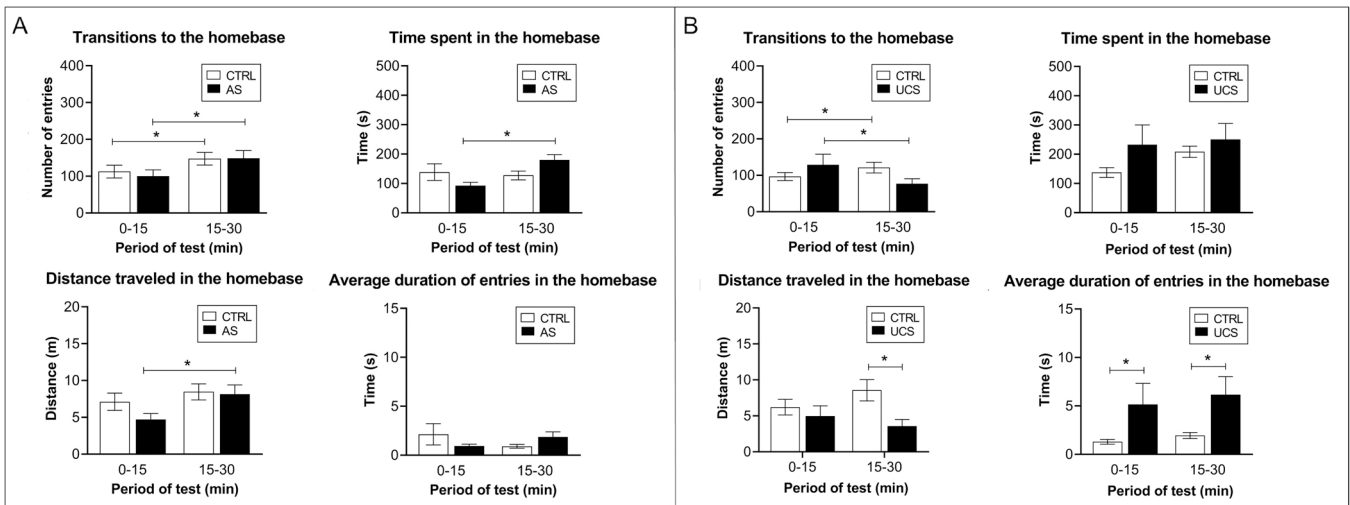


Fig. 5. Homebase-related behaviors in the first and last half of the test following acute (AS) (A) or unpredictable chronic stress (UCS) (B). Behavioral endpoints were accessed in two intervals (0–15 min and 15–30 min). Data are expressed as means \pm S.E.M. and analyzed by two-way RM-ANOVA followed by Student-Newman-Keuls multiple comparison test whenever necessary ($n = 12$ –14 per group, * $p \leq 0.05$).

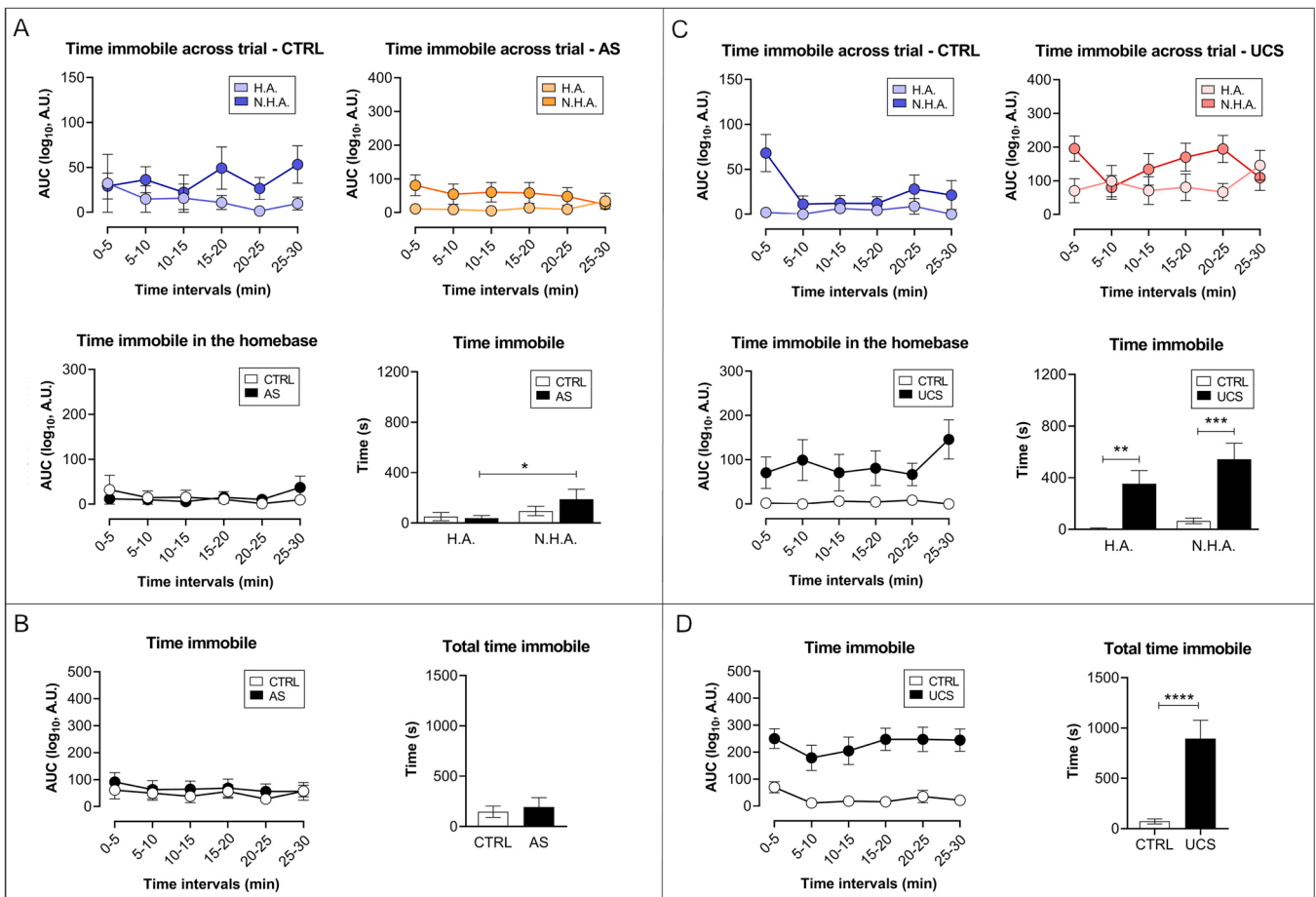


Fig. 6. Immobility in homebase area (H.A.), in non-homebase areas (N.H.A.), and in the entire arena following acute (AS) (A, B) or unpredictable chronic stress (UCS) (C, D). Temporal dynamics were measured in 30 s fractions across the test and later calculated in 5-min intervals as the area under the curve (AUC). Behavioral endpoints were accessed as total values in a 30-min trial. Results are expressed as means \pm S.E.M. and analyzed by two-way RM-ANOVA, two-way ANOVA, or Student's *t*-test, depending on experimental data. Post-hoc analyses were carried out by the Student-Newman-Keuls multiple comparisons test whenever appropriate ($n = 12$ –14 per group, * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$, *** $p \leq 0.0005$, **** $p \leq 0.0001$).

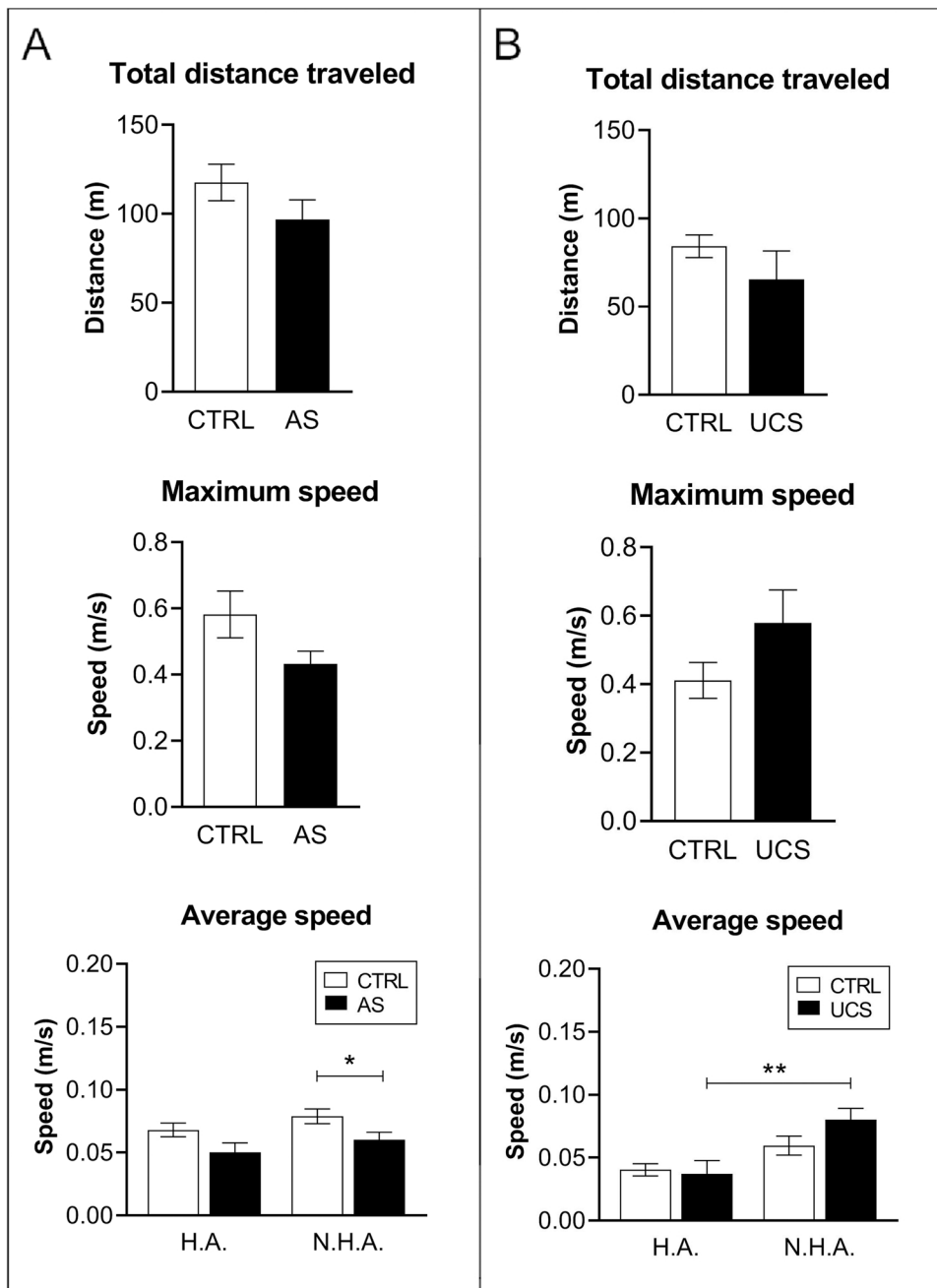


Fig. 7. Locomotion-related endpoints in zebrafish following acute (AS) (A) or unpredictable chronic stress (UCS) (B). Behavioral endpoints were accessed as total values in a 30-min trial and the average speed was estimated in both homebase area (H.A.) and non-homebase areas (N.H.A.). Data are expressed as means \pm S.E.M. and analyzed by Student's *t*-test or two-way ANOVA, depending on experimental data. Post-hoc analyses were carried out by the Student-Newman-Keuls multiple comparisons test whenever appropriate ($n = 12-14$ per group, * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$).

corroborated by the representative spatio-temporal data and heat maps. Although no differences were verified in the distance traveled per area, the average duration of entries in the center area was decreased in UCS group ($F_{(1,50)} = 13.73$, $p = 0.0005$, $\eta^2 = 0.215$ for tank area factor). Both CTRL and stressed fish were more mobile in the periphery, but a lower mobility was observed in UCS group for both tank areas ($F_{(1,50)} = 9.894$, $p = 0.0028$, $\eta^2 = 0.165$ and $F_{(1,50)} = 18.42$, $p < 0.0001$, $\eta^2 = 0.269$ for tank area and group factors, respectively).

Lastly, we also performed whole-body cortisol measurement to confirm the effectiveness of the protocols used to elicit physiological stress responses (Fig. 9). As expected, both AS- (Fig. 9A) and UCS-challenged fish (Fig. 9B) showed higher cortisol levels in relation to their respective CTRL groups ($t = 3.282$, $df = 10$, $p = 0.0083$, $g = -1.749$ for AS; $t = 2.410$, $df = 10$, $p = 0.0367$, $g = -1.284$ for UCS, respectively).

4. Discussion

In this study, we report for the first time a detailed analysis of the spatio-temporal organization of exploration in adult zebrafish using different stress protocols. In general, we first evaluated how specific behavioral endpoints temporally change in order to define the homebase location of each fish in the open field. When challenged to stressful conditions, both AS and the UCS groups showed distinct strategies to explore the environment accompanied by increased whole-body cortisol levels. These findings support use of homebase-related behaviors as sensitive endpoints to evaluate how stress modulates the sequential pattern of exploration in the open field test.

The spatio-temporal organization of the exploratory behavior, which includes homebase formation, has been increasingly investigated in rodents so far. Exposure to some pharmacological agents (e.g., quinpirole and amphetamine) suggests the utility of these studies to validate

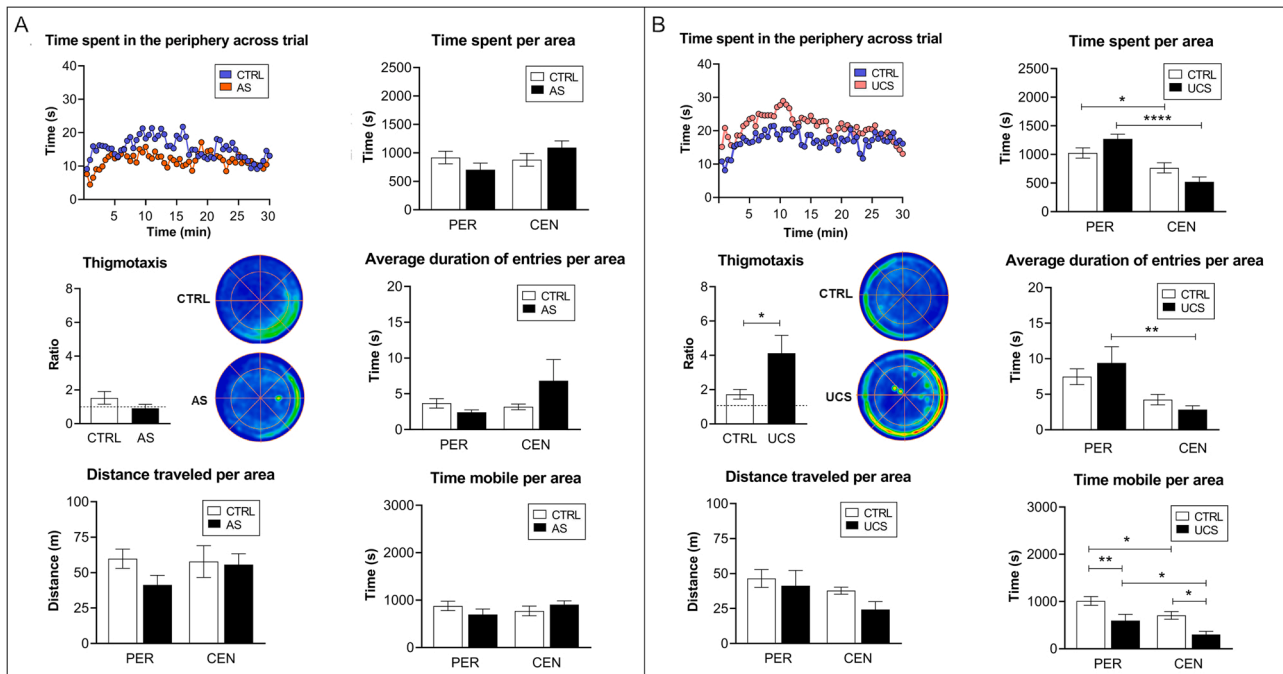


Fig. 8. Spatial organization of exploratory activity in periphery (PER) and center (CEN) areas following acute (AS) (A) or unpredictable chronic stress (UCS) (B). Representative average values for the temporal dynamics in the periphery area were expressed for each 30 s across the test. The occupancy plots represent the exploratory profile of each group tested. Behavioral endpoints are expressed as means \pm S.E.M. and analyzed by Student's *t*-test or two-way ANOVA depending on experimental data. Post-hoc analyses were carried out by the Student-Newman-Keuls multiple comparison test whenever necessary ($n = 12$ – 14 per group, * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$, **** $p \leq 0.0001$).

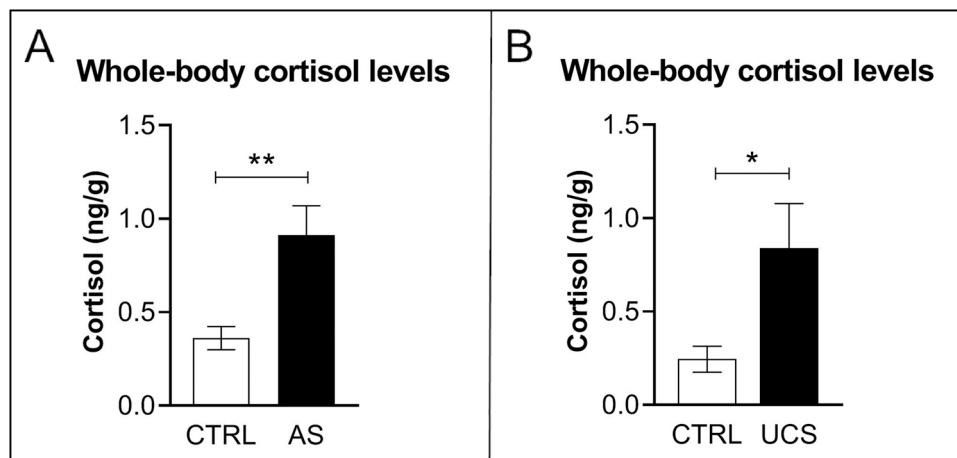


Fig. 9. Whole-body cortisol levels after acute (AS) (A) or unpredictable chronic stress (UCS) (B) protocols. Data are expressed as means \pm S.E.M. and analyzed by Student's *t*-test ($n = 6$ per group, * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$).

experimental models that mimic specific phenotypes closely resembling those found in some neuropsychiatric diseases [12,13,32]. It is known that measuring the locomotion based on 'safe places' also configures a potential tool to assess the construction of spatial memory [33,34], exploration [9,35,36], and motor activities [37]. However, most studies using zebrafish are limited to the homebase identification using few behavioral endpoints for data analyses [8,10,17,18,38], which makes difficult to elucidate how the spatio-temporal organization of the exploratory behavior in the species is modulated in aversive contexts.

Here, we applied two well-validated protocols to induce stress responses in zebrafish aiming to investigate their potential effects on exploratory activity in the open field test. Although the latency to homebase formation did not change, acutely stressed fish were more active in the homebase after 15 min (Figs. 1A and 4 A). The

establishment of the homebase generally occurs after habituation to novelty stress, leading to increased exploration when anxiety-like responses reduce [24,39,40]. For instance, thigmotaxis, a behavioral endpoint correlated with anxiety-like response [41,42], did not reveal significant differences between groups (Fig. 8A). Apparently, animals used the center area as a point of immobility and exploration in the first minutes in relation to non-stressed fish, which may reflect a distinct strategy to explore the apparatus and/or a different habituation response. In fact, specific characteristics of the apparatus (e.g., shape, size, or even the presence of transparent walls) can affect thigmotaxis, suggesting that these behaviors are organized in a complex manner and deserve further scrutiny [39,43].

Acute stress responses play an adaptive role in several species facing a potential threat [44,45]. In zebrafish, CAS exposure has shown

to activate hypothalamic-pituitary-interrenal (HPI) axis, thereby increasing whole-body cortisol levels and anxiety-like responses [19, 21]. Here, AS group performed shorter trips (Fig. 4B), showing more immobility (Fig. 6A) and reduced average speed in non-homebase areas (Fig. 7A). Furthermore, the number and durations of trips, number of stops per trip, total time immobile, and locomotion-based parameters did not differ (Figs. 4B, 6B, and 7A, respectively). These findings reinforce that the homebase in AS-challenged fish may serve as a reference point to guide brief excursions to other potential non-preferred regions (Fig. 4C) and that AS probably does not affect spatial memory.

In the UCS experiment, stressed fish showed a similar homebase formation profile, but an abrupt reduction of index values was verified in the last 10 min of test (Fig. 4D). Because the index value is suggestive of locomotion and exploration in the homebase, the increased immobility of UCS group can explain such data (Fig. 6D). Moreover, the reduced number of trips, increased number of stops per trip, and the higher average speed in non-homebase areas (Figs. 4E and 7B, respectively) suggest that potential ‘burst swimming’ and ‘freezing episodes’ were key components observed during the exploration. This pattern of behavior is usually observed after UCS protocols [24,46,47], suggesting impaired habituation process. In addition, the enhanced thigmotaxis indicates that trips were performed mostly in the periphery, corroborating increased anxiety-like behavior (Fig. 8B). Importantly, these results do not reflect motor dysfunction, since the total distance traveled in UCS group was similar to that found in non-stressed fish (Fig. 7B) as reported elsewhere [24,46,47]. Indeed, UCS-challenged fish apparently used the homebase as an immobility point, from where they performed ‘swimming bursts’ in the periphery with increased number of stops per trip (Fig. 4F). Since chronic stress is maladaptive, a disruption of the spatial memory and impairments in cognitive functions [24,48], which play crucial roles in the recognition of novel apparatuses and exploration should not be ruled out.

Evidence supports an evolutionarily conservation of behavioral and physiological responses of stress in zebrafish compared with those of mammals [49]. However, specific phenotypes can be verified depending on the duration of stressor. For example, protocols using unpredictable chronic stressors (*i.e.*, more than 14 days) may result in motor retardation and reduced shoal cohesion, suggesting a “depression-like state” [24]. Our novel findings show substantial differences in the spatio-temporal exploration after AS and the 7-day UCS protocol, especially considering homebase-related activities. Although similar aspects of stress action can be observed in AS- and UCS-challenged fish (*e.g.*, increased anxiety-like behavior and whole-body cortisol levels), the dynamics and strategy of exploration show robust differences according to the stressor. These findings reinforce the utility of zebrafish models to understand how stress affects multiple behavioral domains in a temporal perspective.

It is also relevant to emphasize that this study presents some limitations. Because UCS-mediated responses did not change the behaviors of male and female zebrafish tested in the novel tank diving test [46,47, 50], as well as other neurochemical parameters [49,51,52], animals used here were randomly selected from their housing tanks to better assess how stress affect zebrafish in a species-specific manner. However, it is conceivable that sex and individual differences can modulate some behavioral responses in zebrafish. For example, evidence shows that females present higher levels of anxiety than males, suggesting the patterns of boldness/shyness as sex-dependent [53,54]. Moreover, male and female zebrafish may respond differently to the UCS in terms of aggression-like behavior and HPI axis activation after tested in the respective behavioral context [55]. Although analyzing a potential sex effect is beyond the scope of this study, the elucidation of how sex and individual features play a role in exploration and complex behaviors is needed. Furthermore, testing the sensitivity of homebase-related behaviors to pharmacological modulators of anxiety using different populations with distinct baseline anxiety-like profiles (*e.g.*, short-fin and leopard) is also important, since zebrafish respond to anxiogenic and

anxiolytic drugs [22,31,42,56]. Mounting data show that homebase-related behaviors may be sensitive to changes in size [4], complexity [3], and illumination [3,11] of the arenas, which affect trips and stops patterns, suggesting the involvement of environmental cues in such behavioral organization [11,34]. Thus, testing other experimental setups to perform automated 3D reconstruction of exploratory behavior, as well as subsequent exposures to the same apparatus could serve as interesting strategies to improve the use of homebase-related behaviors in translational neuropsychiatry research.

In conclusion, our novel findings report how zebrafish organize the exploration in the open field test from a spatio-temporal perspective. Moreover, the analysis of homebase-related behaviors performed here may provide useful data to understand the effects generated by distinct stress protocols. In line with this, our “proof of concept” data support that zebrafish use different strategies to explore the environment in accordance to the respective behavioral modulation applied. Finally, we reinforce the utility of zebrafish to elucidate the organization and dynamics of complex behaviors with potential translational relevance with emphasis on cross-species analyses in experimental models of normal and pathological CNS functions.

Conflict of Interest

The authors declare that no competing interests exist.

Data Availability

Data will be made available on request.

Acknowledgements

The authors recognize the financial support and fellowships from Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) – Finance code 001, Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), and Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS). J.V.B. and J.C. are recipient of CAPES fellowship grant. E.B. and G.R.S. are recipient of PIBIC-CNPq fellowship grant. I.A.A. is recipient of post-doctoral fellowship from CAPES (CAPES Print Program, File No. 88887.568833/2020-00). D.B.R. is recipient of the CNPq research productivity grant (process number 307690/2021-0) and his work is also supported by FAPERGS Programa Pesquisador Gaúcho – PQG fellowship grant (process number 19/2551-0001764-2) and PROEX/CAPES fellowship grant (process number 23038.007445/2021-21; grant number 0036/2021). The funders had no role in study design, data collection, and analysis, decision to publish, or preparation of the paper.

Author contribution

Conceived and designed the experiments: JVB, DBR. Performed the experiments: JVB, EB, GRS, ACS. Analyzed the data: JVB, JC, IAA, ACL, DBR. Contributed reagents/materials/analysis tools DBR. Wrote the paper: JVB, IAA, ACL, DBR.

Appendix A. Supporting information

Supplementary data associated with this article can be found in the online version at doi:10.1016/j.bbr.2022.114034.

References

- [1] L. Prut, C. Belzung, The open field as a paradigm to measure the effects of drugs on anxiety-like behaviors: a review, *Eur. J. Pharm.* 463 (2003) 3–33, [https://doi.org/10.1016/S0014-2999\(03\)01272-X](https://doi.org/10.1016/S0014-2999(03)01272-X).
- [2] R.N. Walsh, R.A. Cummins, The open-field test: a critical review, *Psychol. Bull.* 83 (1976) 482–504, <https://doi.org/10.1037/0033-2909.83.3.482>.

- [3] D. Eilam, Locomotor activity in common spiny mice (*Acomys cahirinuse*): the effect of light and environmental complexity, *BMC Ecol.* 4 (2004) 1–10, <https://doi.org/10.1186/1472-6785-4-16>.
- [4] D. Eilam, Open-field behavior withstands drastic changes in arena size, *Behav. Brain Res.* 142 (2003) 53–62, [https://doi.org/10.1016/S0166-4328\(02\)00382-0](https://doi.org/10.1016/S0166-4328(02)00382-0).
- [5] R. Leke, D.L. de Oliveira, B.H.M. Mussulini, M.S. Pereira, V. Kazlauskas, G. Mazzini, C.R. Hartmann, T.R. Silveira, M. Simonsen, L.K. Bak, H. S. Waagepetersen, S. Keiding, A. Schousboe, L.V. Portela, Impairment of the organization of locomotor and exploratory behaviors in bile duct-ligated rats, *PLoS One* 7 (2012), <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0036322>.
- [6] P. Simon, R. Dupuis, J. Costentin, Thigmotaxis as an index of anxiety in mice. Influence of dopaminergic transmissions, *Behav. Brain Res.* 61 (1994) 59–64, [https://doi.org/10.1016/0166-4328\(94\)90008-6](https://doi.org/10.1016/0166-4328(94)90008-6).
- [7] A.V. Kalueff, M. Gebhardt, A.M. Stewart, J.M. Cachat, M. Brimmer, J.S. Chawla, C. Craddock, E.J. Kyzar, A. Roth, S. Landsman, S. Gaikwad, K. Robinson, G. Baatrup, K. Tierney, A. Shamchuk, W. Norton, N. Miller, T. Nicolson, O. Braubach, C.P. Gilman, J. Pittman, D.B. Roseberg, R. Gerlai, D. Echevarria, E. Lamb, S.C.F. Neuhaus, W. Weng, L. Bally-Cuif, H. Schneider, Towards a comprehensive catalog of zebrafish behavior 1.0 and beyond, *Zebrafish* 10 (2013) 70–86, <https://doi.org/10.1089/zeb.2012.0861>.
- [8] A.M. Stewart, S. Gaikwad, E. Kyzar, A.V. Kalueff, Understanding spatio-temporal strategies of adult zebrafish exploration in the open field test, *Brain Res.* 1451 (2012) 44–52, <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2012.02.064>.
- [9] D. Eilam, I. Golani, Home base behavior of rats (*Rattus norvegicus*) exploring a novel environment, *Behav. Brain Res.* 34 (1989) 199–211, [https://doi.org/10.1016/S0166-4328\(89\)80102-0](https://doi.org/10.1016/S0166-4328(89)80102-0).
- [10] A. Stewart, J. Cachat, K. Wong, S. Gaikwad, T. Gilder, J. DiLeo, K. Chang, E. Utterback, A.V. Kalueff, Homebase behavior of zebrafish in novelty-based paradigms, *Behav. Process.* 85 (2010) 198–203, <https://doi.org/10.1016/j.beproc.2010.07.009>.
- [11] R. Avni, P. Zadicario, D. Eilam, Exploration in a dark open field: a shift from directional to positional progression and a proposed model of acquiring spatial information, *Behav. Brain Res.* 171 (2006) 313–323, <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2006.04.006>.
- [12] H. Szechtman, W. Sulis, D. Eilam, Quinpirole induces compulsive checking behavior in rats: a potential animal model of obsessive-compulsive disorder (OCD), *Behav. Neurosci.* 112 (1998) 1475–1485, <https://doi.org/10.1037/0735-7044.112.6.1475>.
- [13] D. Eilam, H. Szechtman, Psychostimulant-induced behavior as an animal model of obsessive-compulsive disorder: An ethological approach to the form of compulsive rituals, *CNS Spectr.* 10 (2005) 191–202, <https://doi.org/10.1017/S109285290001004X>.
- [14] D. Eilam, I. Golani, Home base behavior in amphetamine-treated tame wild rats (*Rattus norvegicus*), *Behav. Brain Res.* 36 (1990) 161–170, [https://doi.org/10.1016/0166-4328\(90\)90170-J](https://doi.org/10.1016/0166-4328(90)90170-J).
- [15] A.M. Stewart, O. Braubach, J. Spitsbergen, R. Gerlai, A.V. Kalueff, Zebrafish models for translational neuroscience research: from tank to bedside, *Trends Neurosci.* 37 (2014) 264–278, <https://doi.org/10.1016/j.tins.2014.02.011>.
- [16] B.D. Fontana, N.J. Mezzomo, A.V. Kalueff, D.B. Roseberg, The developing utility of zebrafish models of neurological and neuropsychiatric disorders: a critical review, *Exp. Neurol.* 299 (2018) 157–171, <https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2017.10.004>.
- [17] J. Cachat, E.J. Kyzar, C. Collins, S. Gaikwad, J. Green, A. Roth, M. El-Ounsi, A. Davis, M. Pham, S. Landsman, A.M. Stewart, A.V. Kalueff, Unique and potent effects of acute ibogaine on zebrafish: The developing utility of novel aquatic models for hallucinogenic drug research, *Behav. Brain Res.* 236 (2013) 258–269, <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2012.08.041>.
- [18] D.B. Roseberg, E.P. Rico, B.H.M. Mussulini, A.L. Piato, M.E. Calcagnotto, C. D. Bonan, R.D. Dias, R.E. Blaser, D.O. Souza, D.L. de Oliveira, Differences in spatio-temporal behavior of zebrafish in the open tank paradigm after a short-period confinement into dark and bright environments, *PLoS One* 6 (2011), <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0019397>.
- [19] N. Speedie, R. Gerlai, Alarm substance induced behavioral responses in zebrafish (*Danio rerio*), *Behav. Brain Res.* 188 (2008) 168–177, <https://doi.org/10.1016/J.BBR.2007.10.031>.
- [20] M. Watanabe, M. Iwashita, M. Ishii, Y. Kurachi, A. Kawakami, S. Kondo, N. Okada, Spot pattern of leopard *Danio* is caused by mutation in the zebrafish connexin41.8 gene, *EMBO Rep.* 7 (2006) 893–897, <https://doi.org/10.1038/sj.embor.7400757>.
- [21] R.J. Egan, C.L. Bergner, P.C. Hart, J.M. Cachat, P.R. Canavella, M.F. Elegante, S. I. Elkhayat, B.K. Bartels, A.K. Tien, D.H. Tien, S. Mohnot, E. Beeson, E. Glasgow, H. Amri, Z. Zukowska, A.V. Kalueff, Understanding behavioral and physiological phenotypes of stress and anxiety in zebrafish, *Behav. Brain Res.* 205 (2009) 38–44, <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2009.06.022>.
- [22] V.A. Quadros, A. Silveira, G.S. Giuliani, F. Didonet, A.S. Silveira, M.E. Nunes, T. O. Silva, V.L. Loro, D.B. Roseberg, Strain and context-dependent behavioural responses of acute alarm substance exposure in zebrafish, *Behav. Process.* 122 (2016) 1–11, <https://doi.org/10.1016/j.beproc.2015.10.014>.
- [23] A. Du Preez, D. Onorato, I. Eiben, K. Musaelyan, M. Egeland, P.A. Zunszain, C. Fernandes, S. Thuret, C.M. Pariante, Chronic stress followed by social isolation promotes depressive-like behaviour, alters microglial and astrocyte biology and reduces hippocampal neurogenesis in male mice, *Brain. Behav. Immun.* 91 (2021) 24–47, <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2020.07.015>.
- [24] A.L. Piato, K.M. Capiotti, A.R. Tamborski, J.P. Osés, L.J.G. Barcellos, M.R. Bogo, D. R. Lara, M.R. Vianna, C.D. Bonan, Unpredictable chronic stress model in zebrafish (*Danio rerio*): Behavioral and physiological responses, *Prog. Neuro-Psychopharmacology, Biol. Psychiatry* 35 (2011) 561–567, <https://doi.org/10.1016/j.pnpbp.2010.12.018>.
- [25] A. Golla, H. Østby, F. Kermen, Chronic unpredictable stress induces anxiety-like behaviors in young zebrafish, *Sci. Rep.* 10 (2020) 1–10, <https://doi.org/10.1038/s41598-020-67182-4>.
- [26] F.V. Stefanello, T.E. Müller, F. Francescon, V.A. Quadros, T.P. Souza, J. Canzian, J. Leitemperger, V.L. Loro, D.B. Roseberg, Taurine modulates behavioral effects of intermittent ethanol exposure without changing brain monoamine oxidase activity in zebrafish: attenuation of shoal- and anxiety-like responses, and abolishment of memory acquisition deficit, *Pharmacol. Biochem. Behav.* 209 (2021), 173256, <https://doi.org/10.1016/j.pbb.2021.173256>.
- [27] B.D. Fontana, D.L. Meinerz, L.V.C. Rosa, N.J. Mezzomo, A. Silveira, G.S. Giuliani, V.A. Quadros, G.L.B. Filho, R.E. Blaser, D.B. Roseberg, Modulatory action of taurine on ethanol-induced aggressive behavior in zebrafish, *Pharmacol. Biochem. Behav.* 141 (2016) 18–27, <https://doi.org/10.1016/J.PBB.2015.11.011>.
- [28] L. Grossman, E. Utterback, A. Stewart, S. Gaikwad, K.M. Chung, C. Suci, K. Wong, M. Elegante, S. Elkhayat, J. Tan, T. Gilder, N. Wu, J. DiLeo, J. Cachat, A.V. Kalueff, Characterization of behavioral and endocrine effects of LSD on zebrafish, *Behav. Brain Res.* 214 (2010) 277–284, <https://doi.org/10.1016/J.BBR.2010.05.039>.
- [29] T.A. Oliveira, G. Koakoski, A.C. da Motta, A.L. Piato, R.E. Barreto, G.L. Volpato, L. J.G. Barcellos, Death-associated odors induce stress in zebrafish, *Horm. Behav.* 65 (2014) 340–344, <https://doi.org/10.1016/j.yhbeh.2014.02.009>.
- [30] T.D. Sink, R.T. Lochmann, K.A. Fecteau, Validation, use, and disadvantages of enzyme-linked immunosorbent assay kits for detection of cortisol in channel catfish, largemouth bass, red pacu, and golden shiners, *Fish. Physiol. Biochem.* 34 (2008) 95–101, <https://doi.org/10.1007/s10695-007-9150-9>.
- [31] L.V. Rosa, A.P. Ardais, F.V. Costa, B.D. Fontana, V.A. Quadros, L.O. Porciúncula, D. B. Roseberg, Different effects of caffeine on behavioral neurophenotypes of two zebrafish populations, *Pharmacol. Biochem. Behav.* 165 (2018) 1–8, <https://doi.org/10.1016/j.pbb.2017.12.002>.
- [32] D. Eilam, I. Golani, Home base behavior in amphetamine-treated tame wild rats (*Rattus norvegicus*), *Behav. Brain Res.* 36 (1990) 161–170, [https://doi.org/10.1016/0166-4328\(90\)90170-J](https://doi.org/10.1016/0166-4328(90)90170-J).
- [33] N. Broadbent, L.B. Lumeij, M. Corcoles, A.I. Ayres, M.Z. Bin Ibrahim, B. Masatsugu, A. Moreno, J.M. Carames, E. Begg, L. Strickland, T. Mazidzoglou, A. Padanyi, M. Munoz-Lopez, T. Takeuchi, M. Peters, R.G.M. Morris, D. Tse, A stable home-base promotes allocentric memory representations of episodic-like everyday spatial memory, *Eur. J. Neurosci.* 51 (2020) 1539–1558, <https://doi.org/10.1111/ejn.14681>.
- [34] S. Jedidi-Ayoub, K. Mishchanchuk, A. Liu, S. Renaudineau, É. Duvelle, R.M. Grieves, Volumetric spatial behaviour in rats reveals the anisotropic organisation of navigation, Springer Berlin Heidelberg, 2021. <https://doi.org/10.1007/s10071-020-01432-w>.
- [35] O. Weiss, A. Levi, E. Segev, M. Simbirsky, D. Eilam, Spatio-temporal organization during group formation in rats, *Anim. Cogn.* 21 (2018) 513–529, <https://doi.org/10.1007/s10071-018-1185-z>.
- [36] S. Gielman, Z. Hagbi, Y. Dulitzky, E. Blumenfeld-Lieberthal, D. Eilam, How do rodents explore a three-dimensional environment? Habitat-dependent and direction-dependent differences, *Behav. Process.* 178 (2020), 104183, <https://doi.org/10.1016/j.beproc.2020.104183>.
- [37] A. Ben-Pazi, H. Szechtman, D. Eilam, The morphogenesis of motor rituals in rats treated chronically with the dopamine agonist quinpirole, *Behav. Neurosci.* 115 (2001) 1301, <https://doi.org/10.1037/0735-7044.115.6.1301>.
- [38] M. Ibrahim, B.H.M. Mussulini, L. Moro, A.M. de Assis, D.B. Roseberg, D.L. de Oliveira, J.B.T. Rocha, R.S. Schwab, P.H. Schneider, D.O. Souza, E.P. Rico, Anxiolytic effects of diphenyl diselenide on adult zebrafish in a novelty paradigm, *Prog. Neuro Psychopharmacol. Biol. Psychiatry* 54 (2014) 187–194, <https://doi.org/10.1016/j.pnpbp.2014.06.002>.
- [39] C. Maximino, T.M. de Brito, R. Colmanetti, A.A.A. Pontes, H.M. de Castro, R.I.T. de Lacerda, S. Morato, A. Gouveia, Parametric analyses of anxiety in zebrafish scototaxis, *Behav. Brain Res.* 210 (2010) 1–7, <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2010.01.031>.
- [40] K. Wong, M. Elegante, B. Bartels, S. Elkhayat, D. Tien, S. Roy, J. Goodspeed, C. Suci, J. Tan, C. Grimes, A. Chung, M. Rosenberg, S. Gaikwad, A. Denmark, A. Jackson, F. Kadri, K.M. Chung, A. Stewart, T. Gilder, E. Beeson, I. Zapolsky, N. Wu, J. Cachat, A.V. Kalueff, Analyzing habituation responses to novelty in zebrafish (*Danio rerio*), *Behav. Brain Res.* 208 (2010) 450–457, <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2009.12.023>.
- [41] C. Maximino, T.M. de Brito, A.W. da Silva Batista, A.M. Herculano, S. Morato, A. Gouveia, Measuring anxiety in zebrafish: a critical review, *Behav. Brain Res.* 214 (2010) 157–171, <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2010.05.031>.
- [42] S.J. Schnörr, P.J. Steenbergen, M.K. Richardson, D.L. Champagne, Measuring thigmotaxis in larval zebrafish, *Behav. Brain Res.* 228 (2012) 367–374, <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2011.12.016>.
- [43] R.E. Blaser, L. Chadwick, G.C. McGinnis, Behavioral measures of anxiety in zebrafish (*Danio rerio*), *Behav. Brain Res.* 208 (2010) 56–62, <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2009.11.009>.
- [44] O. Ahmed, D. Seguin, R. Gerlai, An automated predator avoidance task in zebrafish, *Behav. Brain Res.* 216 (2011) 166–171, <https://doi.org/10.1016/J.BBR.2010.07.028>.
- [45] M.C.O. Ferrari, G.E. Brown, G.R. Bortolotti, D.P. Chivers, Linking predator risk and uncertainty to adaptive forgetting: A theoretical framework and empirical test using tadpoles, *Proc. R. Soc. B Biol. Sci.* 277 (2010) 2205–2210, <https://doi.org/10.1098/rspb.2009.2117>.
- [46] M. Marcon, A.P. Herrmann, R. Mocelin, C.L. Rambo, G. Koakoski, M.S. Abreu, G.M. M. Conterato, L.W. Kist, M.R. Bogo, L. Zanatta, L.J.G. Barcellos, A.L. Piato,

- Prevention of unpredictable chronic stress-related phenomena in zebrafish exposed to bromazepam, fluoxetine and nortriptyline, *Psychopharmacol. (Berl.)* 233 (2016) 3815–3824, <https://doi.org/10.1007/s00213-016-4408-5>.
- [47] M. Marcon, R. Mocelin, R. Benvenuti, T. Costa, A.P. Herrmann, D.L. De Oliveira, G. Koakoski, L.J.G. Barcellos, A. Piato, Environmental enrichment modulates the response to chronic stress in zebrafish, *J. Exp. Biol.* 221 (2018), <https://doi.org/10.1242/jeb.176735>.
- [48] J.J. Cerqueira, F. Mailliet, O.F.X. Almeida, T.M. Jay, N. Sousa, The Prefrontal Cortex as a Key Target of the Maladaptive Response to Stress, (2007). <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4372-06.2007>.
- [49] K.A. Demin, A.S. Taranov, N.P. Ilyin, A.M. Lakstygala, A.D. Volgin, M.S. de Abreu, T. Strelakova, A.V. Kalueff, Understanding neurobehavioral effects of acute and chronic stress in zebrafish, *Stress* 24 (2021) 1–18, <https://doi.org/10.1080/10253890.2020.1724948>.
- [50] R. Mocelin, M. Marcon, S. D'ambros, J. Mattos, A. Sachett, A.M. Siebel, A.P. Herrmann, A. Piato, N-Acetylcysteine Reverses Anxiety and Oxidative Damage Induced by Unpredictable Chronic Stress in Zebrafish, (2035). <https://doi.org/10.1007/s12035-018-1165-y>.
- [51] C. Song, B.P. Liu, Y.P. Zhang, Z. Peng, J.J. Wang, A.D. Collier, D.J. Echevarria, K. V. Savelieva, R.F. Lawrence, C.S. Rex, D.A. Meshalkina, A.V. Kalueff, Modeling consequences of prolonged strong unpredictable stress in zebrafish: complex effects on behavior and physiology, *Prog. Neuro Psychopharmacol. Biol. Psychiatry* 81 (2018) 384–394, <https://doi.org/10.1016/j.pnpbp.2017.08.021>.
- [52] K.A. Demin, A.M. Lakstygala, N.A. Krotova, A. Masharsky, N. Tagawa, M. V. Chernysh, N.P. Ilyin, A.S. Taranov, D.S. Galstyan, K.A. Derzhavina, N. A. Levchenko, T.O. Kolesnikova, M.S. Mor, M.L. Vasyutina, E.V. Efimova, N. Katolikova, A.D. Prjibelski, R.R. Gainetdinov, M.S. de Abreu, T. G. Amstislavskaya, T. Strelakova, A.V. Kalueff, Understanding complex dynamics of behavioral, neurochemical and transcriptomic changes induced by prolonged chronic unpredictable stress in zebrafish, *Sci. Rep.* 10 (2020) 1–20, <https://doi.org/10.1038/s41598-020-75855-3>.
- [53] B.D. Fontana, M. Cleal, M.O. Parker, Female adult zebrafish (*Danio rerio*) show higher levels of anxiety-like behavior than males, but do not differ in learning and memory capacity, *Eur. J. Neurosci.* 52 (2020) 2604–2613, <https://doi.org/10.1111/ejn.14588>.
- [54] T.P. Souza, F. Franscescon, F.V. Stefanello, T.E. Müller, L.W. Santos, D. B. Rosemberg, Acute effects of ethanol on behavioral responses of male and female zebrafish in the open field test with the influence of a non-familiar object, *Behav. Process.* 191 (2021), <https://doi.org/10.1016/j.beproc.2021.104474>.
- [55] C.L. Rambo, R. Mocelin, M. Marcon, D. Villanova, G. Koakoski, M.S. de Abreu, T. A. Oliveira, L.J.G. Barcellos, A.L. Piato, C.D. Bonan, Gender differences in aggression and cortisol levels in zebrafish subjected to unpredictable chronic stress, *Physiol. Behav.* 171 (2017) 50–54, <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2016.12.032>.
- [56] H. Richendrer, S.D. Pelkowski, R.M. Colwill, R. Creton, On the edge: Pharmacological evidence for anxiety-related behavior in zebrafish larvae, *Behav. Brain Res.* 228 (2012) 99–106, <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2011.11.041>.

6 CONCLUSÃO

Em conclusão, os resultados do presente estudo descrevem, pela primeira vez, como ocorre a formação de zonas-base em peixe-zebra em uma perspectiva espaço-temporal na ausência e presença de diferentes tipos de estresse. Com isso, é possível afirmar que o estabelecimento dos pontos de preferência ocorre na medida em que o animal reconhece e adapta-se ao ambiente, revelando que testes com duração de pelo menos 30 minutos são capazes de fornecer informações suficientes acerca de tal dinâmica comportamental. Além disso, o peixe-zebra é capaz de adotar diferentes estratégias de exploração de acordo com o tipo de estresse ao qual é submetido. Assim, animais estressados agudamente demonstram um padrão de comportamentos que reflete o caráter adaptativo frente a esse tipo de estresse, utilizando suas zonas-base como ponto de segurança a partir do qual executam curtas excursões ao ambiente. Já os animais estressados cronicamente apresentam comportamentos condizentes com os efeitos mal adaptativos provocados pelo ECI. Nesse caso, os altos níveis de imobilidade, o nado em “bursts” e a alta ocupação periférica refletem um alto grau de ansiedade e possíveis prejuízos a funções cognitivas relacionadas ao reconhecimento e memória espacial gerados pelo protocolo aplicado. Por fim, o estudo reforça a utilidade da análise espaço-temporal da exploração como ferramenta para a compreensão de respostas complexas em peixe-zebra, demonstrando uma sensibilidade dos parâmetros comportamentais relacionados às zonas-base a modulações do estado afetivo. Assim, a presente estratégia utilizada no estudo salienta a relevância do peixe-zebra para a investigação de mecanismos neurocomportamentais de interesse inclusive em pesquisas translacionais.

7 LIMITAÇÕES E PERSPECTIVAS DO ESTUDO

O presente estudo demonstra como o comportamento exploratório de peixe-zebra se organiza em uma perspectiva espaço-temporal em animais estressados e não estressados, e revela como a ocupação da zona-base responde a diferentes tipos de estresse. Entretanto, é importante ressaltar algumas limitações. Sabe-se, por exemplo, que o peixe-zebra apresenta, dentro de uma mesma população, diferenças individuais que variam desde perfis tímidos até de maior ousadia (ARAUJO-SILVA et al., 2018). Além disso, estudos demonstram que comportamentos do tipo tímido e ousado são dependentes do sexo, em que as fêmeas aparentam ser mais ansiosas do que os machos (FONTANA; CLEAL; PARKER, 2020; RAMBO et al., 2017; SOUZA et al., 2021). Apesar de não integrar o escopo do estudo e de a análise ter como objetivo representar os efeitos do estresse a nível de espécie, torna-se importante investigar como tais diferenças modulam o padrão espaço-temporal da exploração e exercem influência sobre a interpretação de resultados. Nessa perspectiva, diferenças basais nos níveis de ansiedade também já são conhecidas em relação a diferentes populações de peixe-zebra, como *SF (short-fin)* e *LEO (leopard)* (QUADROS et al., 2016; ROSA et al., 2018). Assim, futuros estudos podem utilizar essa abordagem para ampliar o conhecimento acerca das características neurocomportamentais de cada população. Em roedores, a exposição a diferentes drogas psicoestimulantes e seus efeitos sobre o comportamento ligado às zonas-base consolidam modelos animais para o estudo de certos transtornos neuropsiquiátricos, como o TOC e a esquizofrenia (EILAM; SZECHTMAN, 2005; SZECHTMAN et al., 2016). Assim, a administração de drogas que causem comportamentos repetitivos e estereotipados em peixes, como quinpirole e anfetamina, podem contribuir para a validação da espécie no estudo desses perfis comportamentais. Além disso, triagens utilizando diferentes compostos ansiogênicos e ansiolíticos podem esclarecer como diferentes níveis de ansiedade modulam a atividade exploratória em uma perspectiva espaço-temporal e estabelecer esse tipo de análise no estudo de doenças ligadas a transtornos de ansiedade. Já a verificação da conservação das zonas-base após sessões repetidas pode auxiliar no maior entendimento da memória espacial do peixe-zebra, cuja modulação pode ser testada a partir da exposição a drogas que exercem efeitos sobre a consolidação de memória, como o MK-801 e a escopolamina (BENVENUTTI et al., 2022; VOLGIN et al., 2019). Por fim, o presente estudo aplicou o teste de campo aberto em duas dimensões, limitando propositalmente a atividade exploratória dos animais a uma distribuição horizontal. Porém, por tratar-se de um organismo aquático, cujos comportamentos são organizados tridimensionalmente (ROSA et

al., 2020; YANG et al., 2021), análises 3D podem gerar abordagens mais detalhadas sobre a organização sequencial da exploração e da ocupação das zonas-base na espécie.

REFERÊNCIAS

- ALSOP, D.; VIJAYAN, M. The zebrafish stress axis: Molecular fallout from the teleost-specific genome duplication event. **General and Comparative Endocrinology**, v. 161, n. 1, p. 62–66, 2009.
- ANDERSON, C. R. Coping behaviors as intervening mechanisms in the inverted-U stress-performance relationship. **Journal of Applied Psychology**, v. 61, n. 1, p. 30–34, 1976.
- ANTONIUK, S. et al. Chronic unpredictable mild stress for modeling depression in rodents: Meta-analysis of model reliability. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, v. 99, p. 101–116, 2019.
- ARAUJO-SILVA, H. et al. Individual differences in response to alcohol exposure in zebrafish (*Danio rerio*). **PLoS ONE**, v. 13, p. 1–12, 2018.
- ASSAD, N. et al. Acute Restraint Stress Evokes Anxiety-Like Behavior Mediated by Telencephalic Inactivation and GabAergic Dysfunction in Zebrafish Brains. **Scientific Reports**, v. 10, n. 1, p. 1–8, 2020.
- AVNI, R.; ZADICARIO, P.; EILAM, D. Exploration in a dark open field: A shift from directional to positional progression and a proposed model of acquiring spatial information. **Behavioural Brain Research**, v. 171, n. 2, p. 313–323, 2006.
- BACH, D. R. Cross-species anxiety tests in psychiatry: pitfalls and promises. **Molecular Psychiatry**, v. 27, n. 1, p. 154–163, 2022.
- BAMBERGER, C. M.; SCHULTE, H. M.; CHROUSOS, G. P. Molecular determinants of glucocorticoid receptor function and tissue sensitivity to glucocorticoids. **Endocrine Reviews**, v. 17, n. 3, p. 245–261, 1996.
- BAMBINO, K.; CHU, J. Zebrafish in Toxicology and Environmental Health. In: **Current Topics in Developmental Biology**. 1. ed. Elsevier Inc., 2017. v. 124p. 331–367.
- BEERDA, B. et al. Chronic stress in dogs subjected to social and spatial restriction. I. Behavioral responses. **Physiology and Behavior**, v. 66, n. 2, p. 233–242, 1999.
- BEN-PAZI, A.; SZECHTMAN, H.; EILAM, D. The morphogenesis of motor rituals in rats treated chronically with the dopamine agonist quinpirole. **Behavioral Neuroscience**, v. 115, n. 6, p. 1301, 2001.
- BENVENUTTI, R. et al. Glutamate NMDA Receptor Antagonists with Relevance to Schizophrenia: A Review of Zebrafish Behavioral Studies. **Current Neuropharmacology**, v. 20, p. 494–509, 2022.
- BERNSTEIN, D. P. et al. Development and validation of a brief screening version of the Childhood Trauma Questionnaire. **Child Abuse and Neglect**, v. 27, n. 2, p. 169–190, 2003.
- BIENERTOVA-VASKU, J.; LENART, P.; SCHERINGER, M. Eustress and Distress: Neither Good Nor Bad, but Rather the Same? **BioEssays**, v. 42, n. 7, p. 1–5, 2020.
- BOURIN, M.; HASCOËT, M. The mouse light/dark box test. **European Journal of**

Pharmacology, v. 463, n. 1–3, p. 55–65, 2003.

BURY, N. R.; STURM, A. Evolution of the corticosteroid receptor signalling pathway in fish. **General and Comparative Endocrinology**, v. 153, n. 1–3, p. 47–56, 2007.

CACHAT, J. et al. Unique and potent effects of acute ibogaine on zebrafish: The developing utility of novel aquatic models for hallucinogenic drug research. **Behavioural Brain Research**, v. 236, n. 1, p. 258–269, 2013.

CAMPOS, A. C. et al. Animal models of anxiety disorders and stress. **Revista Brasileira de Psiquiatria**, v. 35, p. 101–111, 2013.

CASTRO, J. E. et al. Personality traits in rats predict vulnerability and resilience to developing stress-induced depression-like behaviors, HPA axis hyper-reactivity and brain changes in pERK1/2 activity. **Psychoneuroendocrinology**, v. 37, n. 8, p. 1209–1223, 2012.

CATHY, F.; SANDRA, E. The Influence of Open Arm Ledges and Maze Experience in the Elevated Plus-Maze. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 54, n. 1, p. 31–40, 1996.

CHAKROUN, K. et al. Dopaminergic modulation of the exploration / exploitation trade-off in human decision-making. **eLife**, v. 9, p. 1–44, 2020.

CHIBA, S. et al. Chronic restraint stress causes anxiety- and depression-like behaviors, downregulates glucocorticoid receptor expression, and attenuates glutamate release induced by brain-derived neurotrophic factor in the prefrontal cortex. **Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry**, v. 39, n. 1, p. 112–119, 2012.

DANG, R. et al. Predictable chronic mild stress promotes recovery from LPS-induced depression. **Molecular Brain**, v. 12, n. 1, p. 1–12, 2019.

DE ABREU, M. S. et al. Unconventional anxiety pharmacology in zebrafish: Drugs beyond traditional anxiogenic and anxiolytic spectra. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 207, p. 173205, 2021.

DE SOUZA, M. A. et al. Prenatal stress produces social behavior deficits and alters the number of oxytocin and vasopressin neurons in adult rats. **Neurochemical Research**, v. 38, n. 7, p. 1479–1489, 2013.

DEMIN, K. A. et al. Understanding neurobehavioral effects of acute and chronic stress in zebrafish. **Stress**, v. 24, n. 1, p. 1–18, 2021.

DIAMOND, D. et al. Influence of Predator Stress on the Consolidation versus Retrieval of Long-Term Spatial Memory and Hippocampal Spinogenesis. **Hippocampus**, v. 16, p. 571–576, 2006.

DIAMOND, D. M. et al. The temporal dynamics model of emotional memory processing: A synthesis on the neurobiological basis of stress-induced amnesia, flashback and traumatic memories, and the Yerkes-Dodson law. **Neural Plasticity**, v. 2007, 2007.

EDUT, S.; EILAM, D. Rodents in open space adjust their behavioral response to the different risk levels during barn-owl attack. **BMC Ecology**, v. 3, p. 1–16, 2003.

- EGAN, R. J. et al. Understanding behavioral and physiological phenotypes of stress and anxiety in zebrafish. **Behavioural Brain Research**, v. 205, n. 1, p. 38–44, 2009.
- EILAM, D. Open-field behavior withstands drastic changes in arena size. **Behavioural Brain Research**, v. 142, n. 1–2, p. 53–62, 2003.
- EILAM, D. Locomotor activity in common spiny mice (*Acomys cahirinuse*): The effect of light and environmental complexity. **BMC Ecology**, v. 4, p. 1–10, 2004.
- EILAM, D. et al. Animal behavior as a conceptual framework for the study of obsessive-compulsive disorder (OCD). **Behavioural Brain Research**, v. 231, n. 2, p. 289–296, 2012.
- EILAM, D.; GOLANI, I. Home base behavior of rats (*Rattus norvegicus*) exploring a novel environment. **Behavioural Brain Research**, v. 34, n. 3, p. 199–211, 1989.
- EILAM, D.; GOLANI, I. Home base behavior in amphetamine-treated tame wild rats (*Rattus norvegicus*). **Behavioural Brain Research**, v. 36, n. 1–2, p. 161–170, 1 jan. 1990.
- EILAM, D.; SZECHTMAN, H. Psychostimulant-induced behavior as an animal model of obsessive-compulsive disorder: An ethological approach to the form of compulsive rituals. **CNS Spectrums**, v. 10, n. 3, p. 191–202, 2005.
- EK, F. et al. Behavioral Analysis of Dopaminergic Activation in Zebrafish and Rats Reveals Similar Phenotypes. **ACS Chemical Neuroscience**, v. 7, n. 5, p. 633–646, 2016.
- FERREIRA, N. S. et al. Aldosterone , Inflammation , Immune System , and Hypertension. **American Journal of Hypertension**, v. 34, p. 15–27, 2021.
- FONTANA, B. D. et al. The developing utility of zebrafish models of neurological and neuropsychiatric disorders: A critical review. **Experimental Neurology**, v. 299, p. 157–171, 2018.
- FONTANA, B. D.; CLEAL, M.; PARKER, M. O. Female adult zebrafish (*Danio rerio*) show higher levels of anxiety-like behavior than males, but do not differ in learning and memory capacity. **European Journal of Neuroscience**, v. 52, n. 1, p. 2604–2613, 2020.
- FOURKIOTIS, V. G. et al. Aldosterone and the Kidney. **Hormone and Methabolic Reearch**, v. 44, p. 194–201, 2012.
- FRANKLIN, T. B. et al. Influence of early stress on social abilities and serotonergic functions across generations in mice. **PLoS ONE**, v. 6, n. 7, p. 1–7, 2011.
- FRAZIER, T. W. et al. Big Data Approach to Characterize Restricted and Repetitive Behaviors in Autism. **Journal of the American Academy of Child & Adolescent Psychiatry**, v. 61, p. 446–457, 2021.
- FRIEDRICH, W. N. Behavioral manifestations of child sexual abuse. **Child Abuse and Neglect**, v. 22, n. 6, p. 533–535, 1998.
- GLOVER, V.; O’CONNOR, T. G. Effects of antenatal stress and anxiety. Implications for development and psychiatry. **British Journal of Psychiatry**, v. 180, p. 389–391, 2002.

GLUCKMAN, P. et al. Effect of In Utero and Early-Life Conditions on Adult Health and Disease. **The New England Journal of Medicine**, v. 23, n. 1, p. 1–7, 2008.

GORNY, J. H. et al. Fimbria-Fornix Lesions Disrupt the Dead Reckoning (Homing) Component of Exploratory Behavior in Mice. **LEARNING & MEMORY**, v. 9, p. 387–394, 2002.

GRAEFF, F. G.; FERREIRA NETTO, C.; ZANGROSSI, H. The elevated T-maze as an experimental model of anxiety. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, v. 23, n. 2, p. 237–246, 1998.

GRIEBEL, G.; HOLMES, A. 50 years of hurdles and hope in anxiolytic drug discovery. **Nature Reviews. Drug Discovery**, v. 12, n. 9, p. 667–687, 2013.

GRUPE, D. W.; NITSCHKE, J. B. Uncertainty and Anticipation in Anxiety: An integrated neurobiological and psychological perspective. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 14, n. 7, p. 488–501, 2013.

HALL, C. S. Emotional behavior in the rat. I. Defecation and urination as measures of individual differences in emotionality. **Journal of comparative psychology**, v. 18, n. 5, p. 385–403, 1934.

HAO, Y. et al. Selecting an appropriate animal model of depression. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 20, n. 19, p. 1–16, 2019.

HENRÍQUEZ MARTÍNEZ, A. et al. Age-Dependent Effects of Chronic Stress on Zebrafish Behavior and Regeneration. **Frontiers in Physiology**, v. 13, p. 1–12, 2022.

HIMANSHU et al. A review of behavioral tests to evaluate different types of anxiety and anti-anxiety effects. **Clinical Psychopharmacology and Neuroscience**, v. 18, n. 3, p. 341–351, 2020.

HINES, D. J.; WHISHAW, I. Q. Home bases formed to visual cues but not to self-movement (dead reckoning) cues in exploring hippocampectomized rats. **European Journal of Neuroscience**, v. 22, p. 2363–2375, 2005.

HULME, O. J.; MORVILLE, T.; GUTKIN, B. Neurocomputational theories of homeostatic control. **Physics of Life Reviews**, v. 31, p. 214–232, 2019.

IBRAHIM, M. et al. Anxiolytic effects of diphenyl diselenide on adult zebrafish in a novelty paradigm. **Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry**, v. 54, p. 187–194, 2014.

ITO, E. et al. The Yerkes-Dodson law and appropriate stimuli for conditioned taste aversion in Lymnaea. **Journal of Experimental Biology**, v. 218, n. 3, p. 336–339, 2015.

JEDIDI-AYOUB, S. et al. Volumetric spatial behaviour in rats reveals the anisotropic organisation of navigation. **Animal Cognition**, v. 24, n. 1, p. 133–163, 2021.

JOHNSON, A. et al. The hippocampus and exploration : dynamically evolving behavior and neural representations. **Frontiers in human neuroscience**, v. 6, p. 1–17, 2012.

JURUENA, M. F. Early-life stress and HPA axis trigger recurrent adulthood depression. **Epilepsy and Behavior**, v. 38, p. 148–159, 2014.

KALUEFF, A. V. et al. Towards a comprehensive catalog of zebrafish behavior 1.0 and beyond. **Zebrafish**, v. 10, n. 1, p. 70–86, 2013.

KALUEFF, A. V.; ECHEVARRIA, D. J.; STEWART, A. M. Gaining translational momentum: More zebrafish models for neuroscience research. **Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry**, v. 55, p. 1–6, 2014.

KATO, Y. et al. Regulation of human growth hormone secretion and its disorders. **Internal Medicine**, v. 41, n. 1, p. 7–13, 2002.

KRAEUTER, A.; GUEST, P. C.; SARNYAI, Z. The Open Field Test for Measuring Locomotor Activity and Anxiety-Like Behavior. In: M., W. (Ed.). **Methods in Molecular Biology**. V. 1916p. 99–103.

KYRIACOU, A.; TZIAFERI, V.; TOUMBA, M. Stress, Thyroid Dysregulation, and Thyroid Cancer in Children and Adolescents: Proposed Impending Mechanisms. **Hormone Research in Paediatrics**, p. 1–10, 2022.

LAMPREA, M. R. et al. Thigmotactic responses in an open-field. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 41, n. 2, p. 135–140, 2008.

LAWRENCE, M. J. et al. Cortisol modulates metabolism and energy mobilization in wild-caught pumpkinseed (*Lepomis gibbosus*). **Fish Physiology and Biochemistry**, v. 45, n. 6, p. 1813–1828, 2019.

LEHMANN, H.; CLARK, B. J.; WHISHAW, I. Q. Similar Development of Cued and Learned Home Bases in Control and Hippocampal-Damaged Rats in an Open Field Exploratory Task. **Hippocampus**, v. 380, p. 370–380, 2007.

LEKE, R. et al. Impairment of the organization of locomotor and exploratory behaviors in bile duct-ligated rats. **PLoS ONE**, v. 7, n. 5, 2012.

LI, S. et al. Chronic mild stress impairs cognition in mice: From brain homeostasis to behavior. **Life Sciences**, v. 82, n. 17–18, p. 934–942, 2008.

LIMA, M. G. et al. Putative involvement of the nitrenergic system on the consolidation, but not initiation, of behavioral sensitization after conspecific alarm substance in zebrafish. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 139, p. 127–133, 2015.

LIU, H. et al. Dissection of the relationship between anxiety and stereotyped self-grooming using the Shank3B mutant autistic model, acute stress model and chronic pain model. **Neurobiology of Stress**, v. 15, p. 100417, 2021.

LU, S.; WEI, F.; LI, G. The evolution of the concept of stress and the framework of the stress system. **Cell Stress**, v. 5, n. 6, p. 76–85, 2021.

LUNKES, L. C. et al. Melatonin administration attenuates acute stress by inducing sleep state in zebrafish (*Danio rerio*). **Comparative Biochemistry and Physiology, Part - C**, v. 246, p. 1–7, 2021.

LUPIEN, S. J.; LEPAGE, M. Stress, memory, and the hippocampus: Can't live with it, can't live without it. **Behavioural Brain Research**, v. 127, n. 1–2, p. 137–158, 2001.

MARCON, M. et al. Prevention of unpredictable chronic stress-related phenomena in zebrafish exposed to bromazepam, fluoxetine and nortriptyline. **Psychopharmacology**, v. 233, n. 21–22, p. 3815–3824, 2016.

MARCON, M. et al. Environmental enrichment modulates the response to chronic stress in zebrafish. **Journal of Experimental Biology**, v. 221, n. 4, 2018.

MAXIMINO, C. et al. Measuring anxiety in zebrafish: A critical review. **Behavioural Brain Research**, v. 214, n. 2, p. 157–171, 2010.

MCEWEN, B. S. Physiology and neurobiology of stress and adaptation: Central role of the brain. **Physiological Reviews**, v. 87, n. 3, p. 873–904, jul. 2007.

MCEWEN, B. S.; AKIL, H. Revisiting the stress concept: Implications for affective disorders. **Journal of Neuroscience**, v. 40, n. 1, p. 12–21, 2020.

MCEWEN, B. S.; GIANAROS, P. J. Stress- and Allostasis-Induced Brain Plasticity. **Annual Review of Medicine**, v. 62, n. 1, p. 431–445, 2011.

MEZZOMO, N. J. et al. Taurine modulates the stress response in zebrafish. **Hormones and Behavior**, v. 109, p. 44–52, 2019.

MICZEK, K. A.; BOER, S. F.; HALLER, J. Excessive Aggression as Model of Violence: A Critical Evaluation of Current Preclinical Methods. **Psychopharmacology**, v. 23, n. 1, p. 1–7, 2013.

MISSLIN, R.; BELZUNG, C.; VOGEL, E. Behavioural Validation of a Light/Dark Choice Procedure for Testing Anti-Anxiety Agents. **Behavioural Processes**, v. 18, n. 1–3, p. 119–132, 1989.

MIYASAKA, N. et al. From the Olfactory Bulb to Higher Brain Centers: Genetic Visualization of Secondary Olfactory Pathways in Zebrafish. **The Journal of Neuroscience**, v. 29, n. 15, p. 4756–4767, 2009.

MOCELIN, R. et al. N-Acetylcysteine Reverses Anxiety and Oxidative Damage Induced by Unpredictable Chronic Stress in Zebrafish. **Molecular Neurobiology**, v. 56, p. 1188–1195, 2019.

MOMMSEN, T. P.; VIJAYAN, M. M.; MOON, T. W. Cortisol in teleosts: dynamics, mechanisms of action, and metabolic regulation. **Reviews in Fish Biology and Fisheries**, v. 9, p. 211–268, 1999.

MOORE, A.; BEIDLER, J.; HONG, M. Y. Resveratrol and depression in animal models: A systematic review of the biological mechanisms. **Molecules**, v. 23, n. 9, 2018.

NATHAN, F. M.; OGAWA, S.; PARHAR, I. Kisspeptin1 modulates odorant-evoked fear response via two serotonin receptor subtypes (5-HT1A and 5-HT2) in zebrafish. **Journal of Neurochemistry**, v. 133, p. 870–878, 2015.

NOUSHAD, S. et al. Physiological biomarkers of chronic stress: A systematic review. **International journal of health sciences**, v. 15, n. 5, p. 46–59, 2021.

OGAWA, S.; NATHAN, F. M.; PARHAR, I. S. Habenular kisspeptin modulates fear in the zebrafish. **PNAS**, v. 111, n. 10, 2014.

PATIN, V. et al. Effects of prenatal stress on anxiety and social interactions in adult rats. **Developmental Brain Research**, v. 160, n. 2, p. 265–274, 2005.

PENTKOWSKI, N. S. et al. Anxiety and Alzheimer's disease: Behavioral Analysis and Neural Basis in Rodent Models of Alzheimer's-Related Neuropathology. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, v. 127, n. 1, p. 647–658, 2021.

PIATO, A. L. et al. Unpredictable chronic stress model in zebrafish (*Danio rerio*): Behavioral and physiological responses. **Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry**, v. 35, n. 2, p. 561–567, 2011.

PRUT, L.; BELZUNG, C. The open field as a paradigm to measure the effects of drugs on anxiety-like behaviors: A review. **European Journal of Pharmacology**, v. 463, n. 1–3, p. 3–33, 2003.

QUADROS, V. A. et al. Strain- and context-dependent behavioural responses of acute alarm substance exposure in zebrafish. **Behavioural Processes**, v. 122, p. 1–11, 2016.

RAMBO, C. L. et al. Gender differences in aggression and cortisol levels in zebrafish subjected to unpredictable chronic stress. **Physiology and Behavior**, v. 171, p. 50–54, 15 mar. 2017.

RANGEL-GOMEZ, M.; MEETER, M. Neurotransmitters and Novelty: A Systematic Review. **Journal of Psychopharmacology**, v. 30, p. 3–12, 2016.

RICHENDRER, H. et al. On the edge: Pharmacological evidence for anxiety-related behavior in zebrafish larvae. **Behavioural Brain Research**, v. 228, n. 1, p. 99–106, 2012.

RODENBURG, T. B. et al. Heritability of Feather Pecking and Open-Field Response of Laying Hens at Two Different Ages. **Breeding and Genetics**, v. 82, n. 6, p. 861–867, 2003.

ROSA, L. V. et al. Different effects of caffeine on behavioral neurophenotypes of two zebrafish populations. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 165, p. 1–8, 2018.

ROSA, L. V. et al. Three- and bi-dimensional analyses of the shoaling behavior in zebrafish: Influence of modulators of anxiety-like responses. **Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry**, v. 102, p. 109957, 2020.

RUSSELL, G.; LIGHTMAN, S. The human stress response. **Nature Reviews Endocrinology**, v. 15, 2019.

SANDI, C.; HALLER, J. Stress and the social brain: Behavioural effects and neurobiological mechanisms. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 16, n. 5, p. 290–304, 2015.

SAPOLSKY, R. M. et al. Hippocampal damage associated with prolonged glucocorticoid exposure in primates. **The Science of Mental Health: Stress and the Brain**, v. 9, p. 119–

124, 2013.

SAPOLSKY, R. M.; ROMERO, L. M.; MUNCK, A. U. How do glucocorticoids influence stress responses? Integrating permissive, suppressive, stimulatory, and preparative actions. **Endocrine Reviews**, v. 21, n. 1, p. 55–89, 2000.

SCHNÖRR, S. J. et al. Measuring thigmotaxis in larval zebrafish. **Behavioural Brain Research**, v. 228, n. 2, p. 367–374, 2012.

SCHWABE, L.; WOLF, O. T.; OITZL, M. S. Memory formation under stress: Quantity and quality. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, v. 34, n. 4, p. 584–591, 2010.

SELYE H. A syndrome produced by Diverse Nocuous Agents. **Nature**, v. 138, n. Mai., p. 32, 1936.

SELYE, H. Stress and the general adaptation syndrome. **International Archives of Allergy and Immunology**, v. 3, n. 4, p. 267–278, 1950.

SHAMS, S.; KHAN, A.; GERLAI, R. Early social deprivation does not affect cortisol response to acute and chronic stress in zebrafish. **Stress**, v. 24, n. 3, p. 273–281, 2021.

SIMON, P.; DUPUIS, R.; COSTENTIN, J. Thigmotaxis as an index of anxiety in mice. Influence of dopaminergic transmissions. **Behavioural Brain Research**, v. 61, n. 1, p. 59–64, 1994.

SONG, C. et al. Modeling consequences of prolonged strong unpredictable stress in zebrafish: Complex effects on behavior and physiology. **Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry**, v. 81, p. 384–394, 2 fev. 2018.

SOUZA, T. P. et al. Acute effects of ethanol on behavioral responses of male and female zebrafish in the open field test with the influence of a non-familiar object. **Behavioural Processes**, v. 191, 1 out. 2021.

SPEEDIE, N.; GERLAI, R. Alarm substance induced behavioral responses in zebrafish (*Danio rerio*). **Behavioural Brain Research**, v. 188, n. 1, p. 168–177, 17 mar. 2008.

STERLING, P. Allostasis: A model of predictive regulation. **Physiology and Behavior**, v. 106, n. 1, p. 5–15, 2012.

STEWART, A. et al. Homebase behavior of zebrafish in novelty-based paradigms. **Behavioural Processes**, v. 85, n. 2, p. 198–203, 2010.

STEWART, A. M. et al. Understanding spatio-temporal strategies of adult zebrafish exploration in the open field test. **Brain Research**, v. 1451, p. 44–52, 27 abr. 2012.

STEWART, A. M. et al. Zebrafish models for translational neuroscience research: From tank to bedside. **Trends in Neurosciences**, v. 37, n. 5, p. 264–278, 2014.

SZECHTMAN, H. et al. Obsessive-compulsive disorder: Insights from animal models. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, v. 76, p. 254–279, 2016.

SZECHTMAN, H.; SULIS, W.; EILAM, D. Quinpirole induces compulsive checking

behavior in rats: A potential animal model of obsessive-compulsive disorder (OCD). **Behavioral Neuroscience**, v. 112, n. 6, p. 1475–1485, 1998.

SZYF, M. The epigenetics of perinatal stress. **Dialogues in Clinical Neuroscience**, v. 21, n. 4, p. 369–378, 2019.

TANK, A. W.; WONG, D. L. Peripheral and central effects of circulating catecholamines. **Comprehensive Physiology**, v. 5, n. 1, p. 1–15, 2015.

THOMPSON, S. M.; BERKOWITZ, L. E.; CLARK, B. J. Behavioral and Neural Subsystems of Rodent Exploration. **Learning and motivation**, v. 61, p. 3–15, 2018.

THOMSON, J. S. et al. Acute and chronic stress prevents responses to pain in zebrafish: evidence for stress-induced analgesia. **Journal of Experimental Biology**, v. 223, n. 14, 2020.

TOMOV, M. S. et al. Dissociable neural correlates of uncertainty underlie different exploration strategies. **Nature Communications**, 2020.

TRAVIS, S. G. et al. Hippocampal Damage Produces Retrograde but Not Anterograde Amnesia for a Cued Location in a Spontaneous Exploratory Task in Rats. **Hippocampus**, v. 20, p. 1095–1104, 2010.

VAN DEN BERG, C. L. et al. Isolation changes the incentive value of sucrose and social behaviour in juvenile and adult rats. **Behavioural Brain Research**, v. 106, n. 1–2, p. 133–142, 1999.

VAZ, R.; HOFMEISTER, W.; LINDSTRAND, A. Zebrafish Models of Neurodevelopmental Disorders : Limitations and Benefits of Current Tools and Techniques. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 20, p. 2–26, 2019.

VEDHARA, K. et al. Acute stress, memory, attention and cortisol. **Psychoneuroendocrinology**, v. 25, n. 6, p. 535–549, 2000.

VIANNA, M. R. M. et al. Role of Hippocampal Signaling Pathways in Long-Term Memory Formation of a Nonassociative Learning Task in the Rat. **LEARNING & MEMORY**, v. 7, p. 333–340, 2000.

VOLGIN, A. D. et al. Understanding Central Nervous System Effects of Deliriant Hallucinogenic Drugs through Experimental Animal Models. **ACS Chemical Neuroscience**, v. 10, p. 143–154, 2019.

WALSH, R. N.; CUMMINS, R. A. The open-field test: A critical review. **Psychological Bulletin**, v. 83, n. 3, p. 482–504, 1976.

WEISS, O. et al. Spatio-temporal organization during group formation in rats. **Animal Cognition**, v. 21, n. 4, p. 513–529, 2018.

WEST, C. P.; DYRBYE, L. N.; SHANAFELT, T. D. Physician burnout: contributors , consequences and solutions. **Journal of Internal Medicine**, v. 283, p. 516–529, 2018.

WHISHAW, I. Q. et al. The exploratory behavior of rats in an open environment optimizes security. **Behavioral Neuroscience**, v. 171, p. 230–239, 2006.

WON, E.; KIM, Y.-K. Stress, the Autonomic Nervous System, and the Immune-kynurenine Pathway in the Etiology of Depression. **Current Neuropharmacology**, v. 14, p. 665–673, 2016.

XANTHAKIS, V.; VASAN, R. S. Aldosterone and the Risk of Hypertension. **Current Hypertension Reports**, v. 15, n. 2, p. 102–107, 2013.

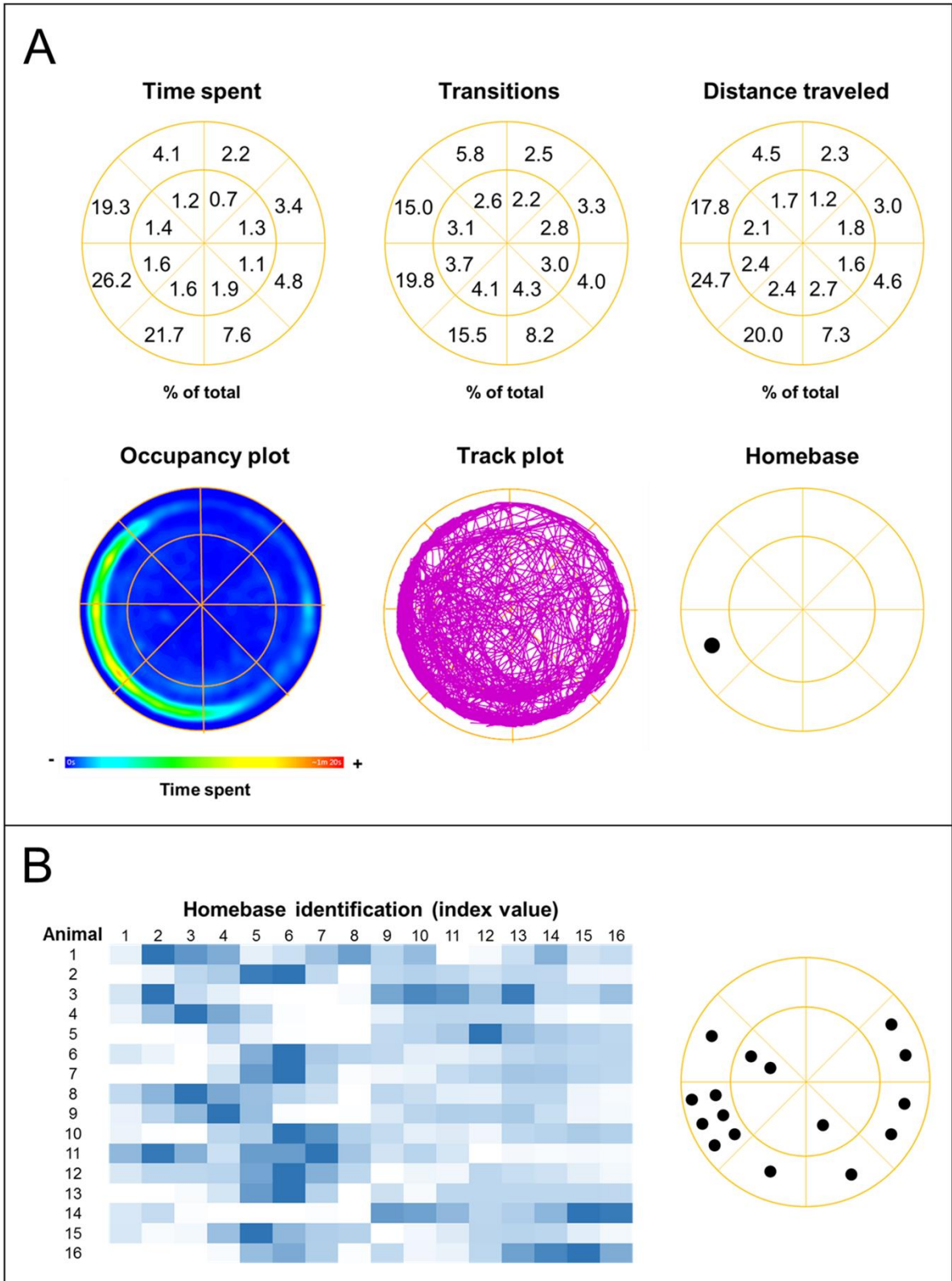
YANG, P. et al. Zebrafish behavior feature recognition using three - dimensional tracking and machine learning. **Scientific Reports**, p. 1–9, 2021.

YARIBEYGI, H. et al. The Impact Of Stress On Body Function: A Review. **EXCLI Journal**, v. 16, p. 1057–1072, 2017.

ZANGROSSI, H.; GRAEFF, F. G. Serotonin in anxiety and panic: Contributions of the elevated T-maze. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, v. 46, p. 397–406, 2014.

ANEXO B – FIGURA SUPLEMENTAR DO ARTIGO CIENTÍFICO

Fig. S1. Schematic identification of homebase formation in zebrafish. The figure shows a representative analysis of a single subject tested in the open field with the percentage values of time spent, transitions, and distance traveled per section, corroborated by automated behavioral plots (**A**). The homebase index calculated for 16 fish is shown as heatmap, in which more intense colors represent higher values for the individuals tested (**B**). Different homebase locations were identified and shown as black dots.



ANEXO C – LISTA DOS TRABALHOS COLABORATIVOS DESENVOLVIDOS DURANTE O PERÍODO DE MESTRADO

1. Adedara IA, Souza TP, Canzian J, Olabiyi, AA, Borba, JV, Biasuz E, Sabadin GR, Gonçalves FL, Costa FV, Schetinger MRC, Farombi EO, Rosemberg DB. Induction of aggression and anxiety-like responses by perfluorooctanoic acid is accompanied by modulation of cholinergic- and purinergic signaling-related parameters in adult zebrafish. **Ecotoxicol Environ Saf.** 2022 Jul 1; 239: 113635. doi: 10.1016/j.ecoenv.2022.113635.