

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

Luiz Vinícius Costa da Rosa

**EFEITOS NEUROCOMPORTAMENTAIS PROMOVIDOS PELA
CAFEÍNA EM DUAS POPULAÇÕES DE PEIXE-ZEBRA**

Santa Maria, RS
2017

Luiz Vinícius Costa da Rosa

**EFEITOS NEUROCOMPORTAMENTAIS PROMOVIDOS PELA CAFEÍNA EM
DUAS POPULAÇÕES DE PEIXE-ZEBRA**

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

Orientador: Prof. Dr. Denis Broock Rosemberg

Santa Maria, RS

2017

Luiz Vinícius Costa da Rosa

**EFEITOS NEUROCOMPORTAMENTAIS PROMOVIDOS PELA CAFEÍNA EM
DUAS POPULAÇÕES DE PEIXE-ZEBRA**

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

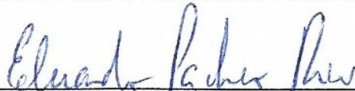
Aprovado em 19 de setembro de 2017:



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



Maria Rosa Chitolina Schetinger, Dra. (UFSM)



Eduardo Pacheco Rico, Dr. (UNESC)

Santa Maria, RS
2017

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho às pessoas responsáveis pela realização dessa dissertação:

Primeiramente a minha família, que sempre me apoiaram no decorrer da minha vida.

Aos meus colegas de laboratório, os quais sempre foram dispostos a me ajudar, tanto na idealização, como na execução dos trabalhos apresentados nessa dissertação.

Ao meu orientador Denis B. Rosemberg pela fé e a confiança em mim depositadas, por toda ajuda e ensinamentos transmitidos.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço aos meus pais Helen e Luiz Marino pelo seu amor, carinho e cuidado comigo. Vocês são os grandes responsáveis por essa conquista, pois seus ensinamentos e educação modelaram a pessoa que sou hoje. Amo muito vocês e espero que esta dissertação seja motivo de orgulho.

Aos meus avós, que, com suas experiências, me mostraram a importância da sabedoria. Além disso, aprendi que apesar do passar dos anos, nunca é tarde para mudar e evoluir.

Aos meus irmãos Luiz Marino e Bettina. Apesar das brigas de irmãos, a presença de vocês me ensinou que não somos o centro do mundo, que devemos saber a conviver e dividir o espaço. No fundo sempre tive amor e orgulho por vocês.

Aos meus amigos de infância, de faculdade e aos que fiz durante toda a minha vida. Obrigado por compartilharem suas vidas comigo.

Aos colegas do Laboratório de Neuropsicobiologia Experimental (LaNE), onde eu tive a grande oportunidade de trabalhar e aprender muito. Todos os momentos foram de grande valor, desde as trocas de conhecimentos nos seminários, até os momentos de descontração tomando café no laboratório ou cerveja em algum barzinho. Agradeço em especial à Ana Paula, à Barbara, ao Fabiano e à Vanessa, que me ajudaram na elaboração de protocolos, nos experimentos e na escrita do manuscrito científico.

Aos meus antigos mestres e professores, que com sua dedicação permitiram que tivesse minha carreira acadêmica.

Em especial ao meu orientador Denis Rosemberg, pelo seu apoio, pela sua paciência, pela fé em meu potencial e pela confiança depositadas em mim. Agradeço a sua disposição em compartilhar o seu conhecimento, me ensinando o caminho da pesquisa científica. Além de orientador tu és uma pessoa de grande coração, um amigo que fui privilegiado em conhecer. Obrigado também por ensinar que as interações sociais são de grande importância na carreira científica.

Agradeço à CAPES pelo suporte financeiro.

Finalmente, agradeço à Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), que, por sua excelência em educação técnico-científica, forneceu todos os meios necessários pra que esta Dissertação de Mestrado fosse concretizada. Sinto-me honrado de ter feito parte desta instituição como aluno de graduação e pós-graduação.

Obrigado a todos que permitiram a realização desse sonho.

“A ciência consiste em substituir o saber que parecia seguro por uma teoria, ou seja, por algo problemático”.

(José Ortega y Gasset)

Assim como casas são feitas de pedras, a ciência é feita de fatos. Mas uma pilha de pedras não é uma casa e uma coleção de fatos não é, necessariamente, ciência”.

(Jules Henri Poincare)

RESUMO

EFEITOS NEUROCOMPORTAMENTAIS PROMOVIDOS PELA CAFEÍNA EM DUAS POPULAÇÕES DE PEIXE-ZEBRA

AUTOR: LUIZ VINÍCIUS COSTA DA ROSA
ORIENTADOR: DENIS BROOCK ROSEMBERG

O peixe-zebra (*Danio rerio*) é um organismo modelo emergente na neurociência comportamental. Dentre as características que tornam esse organismo experimental atraente para pesquisas científicas, podemos citar o tamanho diminuto, o baixo custo, a facilidade para manutenção, a alta taxa de proliferação e o rápido desenvolvimento até a fase adulta. As populações de peixe-zebra do tipo selvagem (*WT*) e leopardo (*leo*) possuem diferenças comportamentais significativas e a população *leo* apresenta um acentuado comportamento basal ansiogênico. Dentre as diferentes moléculas que modulam o comportamento do tipo ansiedade, a cafeína é a substância psicoestimulante mais consumida nas dietas ocidentais. Apesar dos seus efeitos ansiogênicos já terem sido descritos na literatura, a influência dos efeitos mediados pela cafeína em populações com distintos padrões de ansiedade ainda não é bem compreendida. Em virtude da neurofenotipagem ser facilmente avaliada no peixe-zebra, o qual apresenta um comportamento exploratório capaz de ser analisado temporalmente e espacialmente em três dimensões, o presente estudo tem por objetivo investigar os efeitos mediados pela cafeína nas respostas de habituação à novidade e nos comportamentos locomotores, exploratórios e do tipo ansiedade. Para esse propósito, peixes-zebra foram expostos agudamente à cafeína (25, 50, 100 e 200 mg/L) por 15 minutos e logo após, foram transferidos individualmente a um novo aquário para a avaliação comportamental. A análise das variáveis comportamentais e a reconstrução do nado exploratório em três dimensões demonstraram que a cafeína possui efeito ansiogênico dependente de concentração, por alterar o nado vertical, episódios de congelamento e nado errático. Um efeito ansiogênico proeminente foi observado na resposta de habituação à novidade em *WT*, sugerindo um papel do fenótipo nas respostas comportamentais mediadas pela cafeína. Além disso, um padrão de nado anômalo foi observado na concentração de 200 mg/L em alguns indivíduos de ambas as populações, o que poderia refletir uma potencial neurotoxicidade da cafeína em altas concentrações. Em suma, o presente trabalho demonstrou que os efeitos da cafeína no peixe-zebra são dependentes de concentração e das populações estudadas. Ademais, o uso de diferentes populações de peixe-zebra poderá servir como uma estratégia para estudos do comportamento tipo ansiedade em futuros estudos farmacológicos.

Palavras chave: Peixe-zebra, cafeína, comportamentos defensivos, habituação à novidade.

ABSTRACT

NEUROBEHAVIORAL EFFECTS OF CAFFEINE IN TWO ZEBRAFISH POPULATIONS

AUTHOR: LUIZ VINÍCIUS COSTA DA ROSA
ADVISOR: DENIS BROOCK ROSEMBERG

The zebrafish (*Danio rerio*) is an emergent model organism in behavioral neuroscience. Several features make zebrafish an attractive vertebrate in scientific researches, such as the small size, low cost, the ease maintenance, abundant offspring, and the fast development until adult phase. The *wild-type* (*WT*) and *leopard* (*leo*) zebrafish populations present significant behavioral differences, in which *leo* has a more anxious profile at basal levels. Among the molecules that modulate anxiety-like behaviors, caffeine is the most consumed psychostimulant substance in the western diet. Although the anxiogenic effects of caffeine have been described previously, its influence on populations with different baselines of anxiety levels is unknown. Since behavioral neurophenotyping is easily assessed in zebrafish, especially due to their three dimensional swimming pattern, this study aimed to investigate the effects of caffeine on habituation to novelty stress and its influence on locomotion, exploration, and anxiety-like behaviors. Animals were acutely exposed to caffeine (25, 50, 100, and 200 mg/L) for 15 minutes and further transferred individually to a novel tank. Behavioral analyses and three-dimensional reconstructions of the swimming traces revealed a concentration-dependent effect of caffeine on anxiety-like behaviors by altering vertical activity, freezing episodes, and erratic movements. A prominent anxiogenic effect was verified in *WT* during habituation to novelty, suggesting an involvement of phenotype in this response. Furthermore, both populations showed abnormal behaviors following 200 mg/L caffeine, reflecting a potential caffeine-mediated neurotoxicity at high concentrations. Altogether, we demonstrate a concentration- and population-dependent effect of caffeine in zebrafish. Besides, the use of different zebrafish populations could serve as a tempting strategy to evaluate anxiety-like behaviors in future pharmacological approaches.

Keywords: Zebrafish, caffeine, defensive behaviors, habituation to novelty.

LISTA DE ABREVIATURAS

A₁ – Receptor de adenosina do tipo inibitório A₁

A_{2A} – Receptor de adenosina do tipo facilitatório A_{2A}

A_{2B} – Receptor de adenosina do tipo facilitatório A_{2B}

A₃ – Receptor de adenosina do tipo inibitório A₃

ATP – Trifosfato de adenosina

leo – População leopardo

SNC – Sistema nervoso central

ZBC – Catálogo comportamental do peixe zebra (do inglês, *Zebrafish Behavioral Catalogue*)

WT – População selvagem (do inglês, *wild type*)

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1:** Fórmula estrutural da cafeína e de seus principais metabólitos em animais e reações químicas envolvidas.....13
- Figura 2:** Efeitos celulares promovidos pela ativação dos receptores adenosinérgicos, os quais podem ser modulados pelo antagonismo não seletivo promovido pela cafeína.....14
- Figura 3:** Esquema de algumas características vantajosas do peixe-zebra na pesquisa científica. **(A)** Elevada taxa de proliferação. **(B)** Rápido desenvolvimento entre a fecundação e a maturidade sexual. **(C)** Locomoção exploratória tridimensional.....16
- Figura 4:** Triagem dos repertórios comportamentais do peixe-zebra. **(A)** Fenótipos comportamentais relacionados à ansiedade em peixe-zebra. **(B)** Teste do tanque novo.....18
- Figura 5:** Fenótipo dos peixes-zebra das populações selvagem (*WT*) e leopardo (*leo*).....20

SUMÁRIO

1. APRESENTAÇÃO	11
2. INTRODUÇÃO	12
2.1. Cafeína e seus efeitos nos sistemas biológicos.....	12
2.2. Ansiedade.....	15
2.3. O peixe-zebra como organismo modelo.....	16
2.4. Testes comportamentais em peixe-zebra.....	17
2.5. Populações de peixe zebra: selvagem e leopardo.....	19
3. OBJETIVOS	21
3.1. Objetivo Geral.....	21
3.2. Objetivos Específicos.....	21
4. MANUSCRITO CIENTÍFICO	22
5. CONCLUSÕES PARCIAIS	47
6. CONCLUSÃO FINAL	47
7. PERSPECTIVAS DO ESTUDO	48
REFERÊNCIAS	49
ANEXO A – CARTA DE APROVAÇÃO DA CEUA	54
ANEXO B – COMPROVANTE DE SUBMISSÃO DO MANUSCRITO CIENTÍFICO	55

1. APRESENTAÇÃO

Esta Dissertação aborda os efeitos neurocomportamentais mediados pela exposição aguda à cafeína em duas populações de peixe-zebra. Ela encontra-se estruturada da seguinte forma:

INTRODUÇÃO: Revisão da literatura com caracterização dos temas abordados na Dissertação.

MATERIAIS E MÉTODOS, RESULTADOS e DISCUSSÃO: Serão apresentados na forma de manuscrito científico.

CONCLUSÃO: Comentários gerais sobre os principais achados do trabalho.

PERSPECTIVAS: Apresentação das possibilidades de novos estudos a partir dos resultados obtidos.

REFERÊNCIAS: Lista as referências utilizadas na introdução da Dissertação.

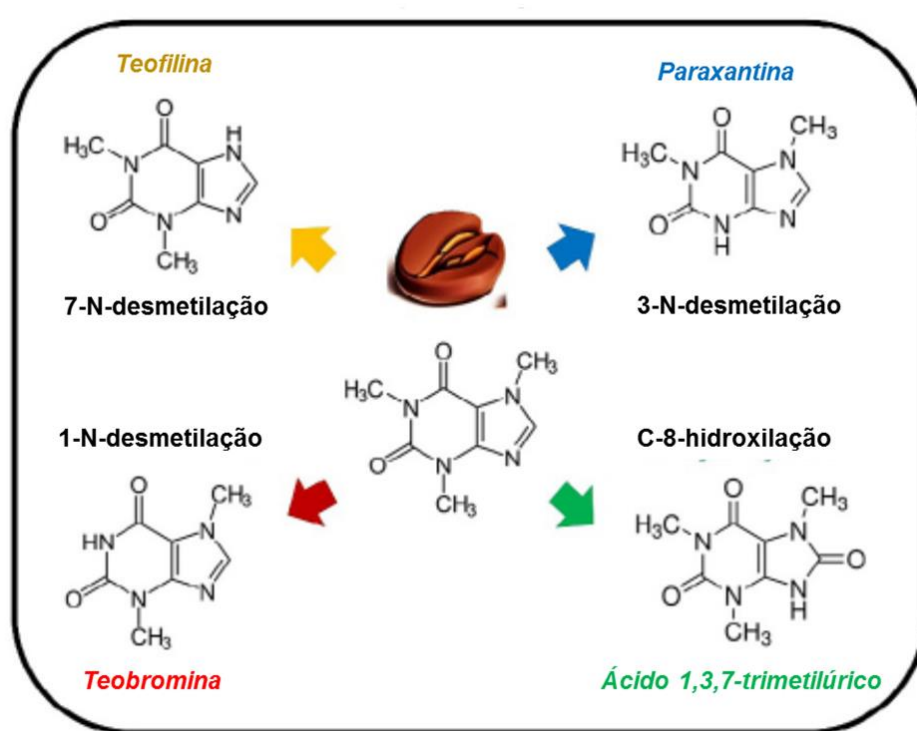
2. INTRODUÇÃO

2.1. Cafeína e seus efeitos nos sistemas biológicos

A cafeína (1,3,7-trimetilxantina), é uma das substâncias psicoestimulantes mais consumidas no mundo. Esta molécula é um alcaloide natural pertencente à classe das metilxantinas, a qual é encontrada em mais de sessenta tipos de plantas, tais como o grão de café (*Coffea Arabica* e *Coffea robusta*), noz de cola (*Cola acuminata*), erva-mate (*Ilex paraguariensis*), guaraná (*Paullinia cupana*), chá-da-índia (*Camelia siniensise*) e no cacau (*Theobroma cacao*) (MEJIA; RAMIREZ-MARES, 2014). Sua concentração presente nos alimentos varia conforme o tipo de produto, processamento e fatores de cultivo (CAPPELLETTI et al., 2015; FREDHOLM et al., 1999; PESTA et al., 2013; PORCIÚNCULA et al., 2013). Além disso, o consumo de cafeína é liberado pela Agência Brasileira de Vigilância Sanitária (“Legislação - Anvisa”, [s.d.]) e estima-se que o consumo médio diário brasileiro através da dieta alimentar seja de 117,7 mg (SARTORI; SILVA, 2016). Cabe ressaltar que a cafeína também pode ser consumida através de outras fontes, uma vez que é frequentemente utilizada como aditivo de bebidas energéticas, suplementos alimentares e medicações (“Legislação - Anvisa”, [s.d.]).

A absorção da cafeína apresenta-se de maneira rápida e sem metabolismo de primeira passagem, atingindo o pico plasmático em torno de 30 minutos após a ingestão oral em humanos (BLANCHARD; SAWERS, 1983). Uma vez absorvida, a cafeína pode se ligar reversivelmente a proteínas plasmáticas (ARNAUD, 1987). Além disso, a cafeína possui uma fácil distribuição entre os tecidos, incluindo o Sistema Nervoso Central (SNC), pelo fato de atravessar a barreira hematoencefálica (ARNAUD, 2011). A metabolização da cafeína ocorre através de reações mediadas pelas enzimas da família do citocromo P450 e a enzima do tipo CYP1A2 é responsável por 90% depuração da cafeína em mamíferos (**Figura 1**).

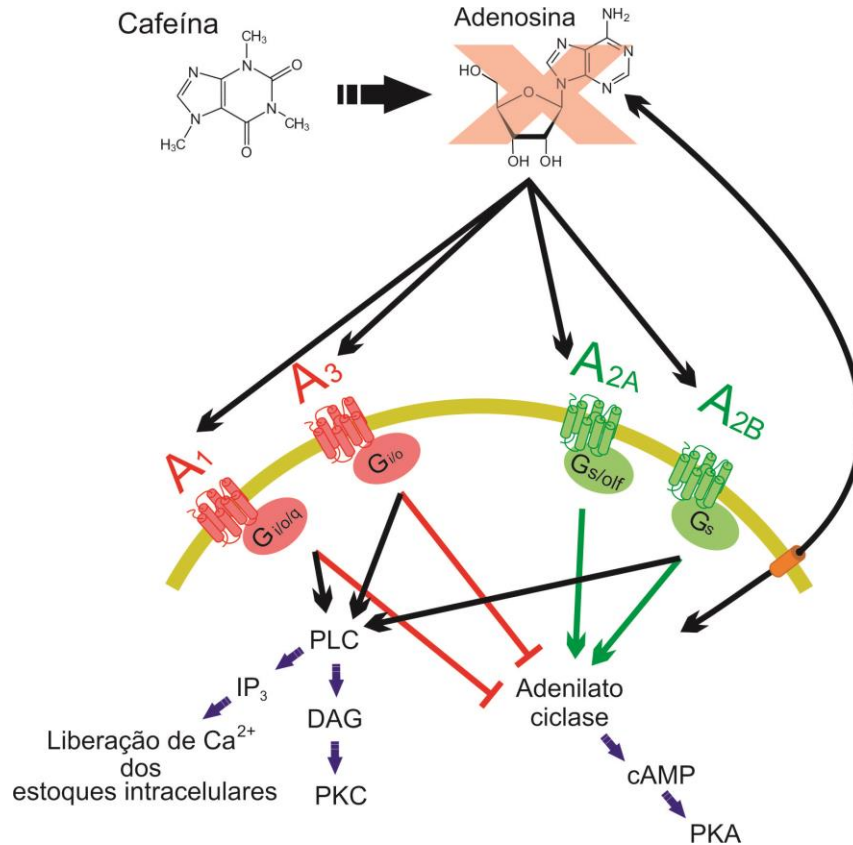
Figura 1: Fórmula estrutural da cafeína e de seus principais metabólitos em animais e reações químicas envolvidas.



Fonte: Adaptado de PORCIÚNCULA et al., 2013.

A excreção da cafeína ocorre majoritariamente por via renal (de 70 a 85%) e sua velocidade depende do fluxo urinário. Porém, apenas 2% da cafeína é eliminada na forma inalterada e o mecanismo responsável pela baixa eliminação é a extensiva reabsorção da cafeína e dos seus metabólitos primários nos túbulos renais (ARNAUD, 2011). Os principais efeitos biológicos da cafeína são atribuídos à inibição da nucleotídeo cíclico fosfodiesterase (responsável pela hidrólise da adenosina monofosfato cíclico), à regulação dos receptores de rianodina e ao antagonismo não seletivo dos receptores de adenosina de ação inibitória (A_1 e A_3) e facilitatória (A_{2A} , e A_{2B}) (FRANCIS et al., 2011; FREDHOLM et al., 1999; GUERREIRO; MARIEN; MICHEL, 2011; MÜLLER; JACOBSON, 2011). O antagonismo dos receptores adenosinérgicos é considerado o principal mecanismo responsável pelos efeitos majoritários da cafeína no SNC, o qual resulta em diferentes respostas celulares (Figura 2).

Figura 2: Efeitos celulares promovidos pela ativação dos receptores adenosinérgicos, os quais podem ser modulados pelo antagonismo não seletivo promovido pela cafeína.



Fonte: Adaptado de DIAS et al., 2013.

Uma vez que a adenosina é uma molécula neuromoduladora endógena (CUNHA, 2001; LUSARDI, 2009), o antagonismo competitivo dos receptores de adenosina resulta em alterações neurofisiológicas. Tais modificações exercem influência na fisiologia de diversos sistemas de neurotransmissão, às quais podem culminar em diferentes aspectos neurocomportamentais (ex: agressividade, atenção e ansiedade) (CHEREK; STEINBERG; BRAUCHI, 1983; CUNHA, 2001; ZWYGHUIZEN-DOORENBOS et al., 1990). Além disso, altas concentrações de cafeína possuem ação pró-convulsão principalmente através do antagonismo dos receptores A₁, o qual exerce uma ação inibitória pelo controle da liberação de aminoácidos excitatórios, tais como o glutamato. No geral, supõe-se que a cafeína não desencadeia convulsões por si só, porém potencializa a hiperexcitabilidade cerebral preexistente (BOISON, 2011).

2.2. Ansiedade

A ansiedade é uma resposta comportamental de caráter defensivo apresentada em diversas espécies no reino animal quando ocorrem situações de estresse e perigo em potencial (BLANCHARD; BLANCHARD; GRIEBEL, 2001). Apesar de ser um comportamento de autopreservação responsável pela sobrevivência, situações em que esse comportamento apresenta-se de maneira exacerbada são consideradas patológicas (BLANCHARD; SUMMERS; BLANCHARD, 2013; LANDGRAF; WIGGER, 2002; SUVEG et al., 2010). Desse modo, a exacerbação do comportamento do tipo ansiedade é associada com distúrbios de pânico, fobias simples, fobias sociais, estresse pós-traumático e outros transtornos do SNC (ANDLIN-SOBOCKI; WITTCHEN, 2005; KESSLER et al., 2012; LANDGRAF; WIGGER, 2002; SUVEG et al., 2010).

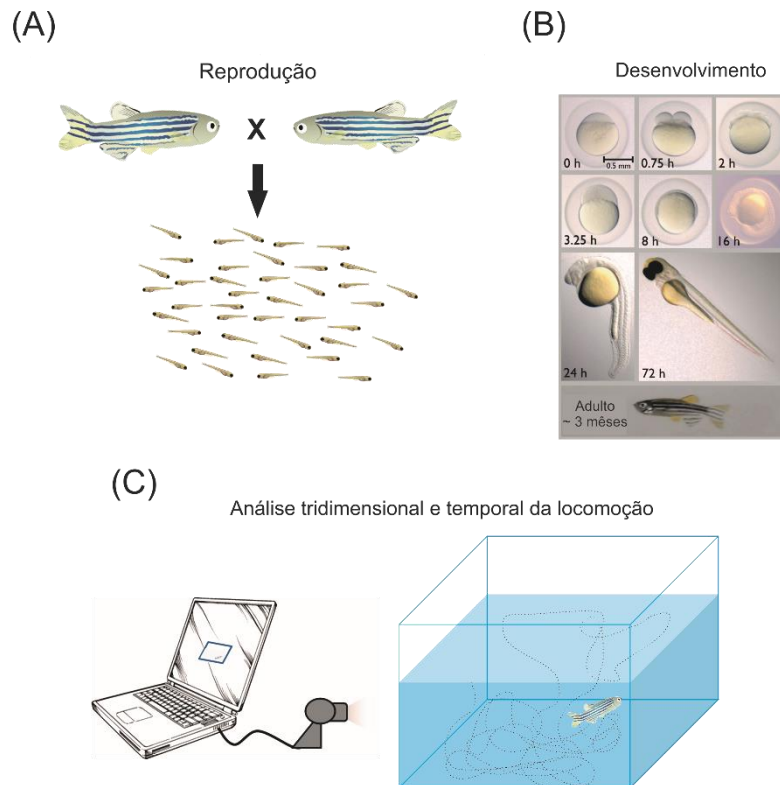
Os transtornos de ansiedade caracterizam-se como a desordem psiquiátrica mais prevalente no mundo, visto que um terço da população mundial desenvolve algum tipo de transtorno de ansiedade ao decorrer da vida (KESSLER et al., 2012). Somente nos Estados Unidos da América (EUA), os transtornos de ansiedade atingem aproximadamente 40 milhões de adultos e o tratamento pode custar mais de 42 bilhões de dólares por ano (HURRELL; HOUWING; HUDSON, 2017). Em virtude disso, estudos estão sendo desenvolvidos a fim de esclarecer os aspectos comportamentais e neuroquímicos responsáveis pelas respostas de ansiedade em diversas espécies (GOMES et al., 2013; KULESSKAYA; VOIKAR, 2014; MAXIMINO et al., 2010a; OLIVEIRA; FERNANDES; SISTO, 2014; QUADROS et al., 2016; ZANGROSSI; GRAEFF, 2014).

Diversos fenótipos comportamentais relacionados à ansiedade podem ser observados através da manipulação farmacológica de substâncias ansiogênicas, como por exemplo, a cafeína (BHORKAR et al., 2014; CARAVAN et al., 2016; EGAN et al., 2009; EL YACOUBI et al., 2000). Contudo, o perfil de ansiedade pode apresentar diferenças significativas entre populações em função de fatores ambientais e intrínsecos (BAXTER et al., 2013; KRIEG; XU; CICERO, 2016; LOPEZ; LABER, 2015). Assim, o uso de modelos animais para avaliar os fenótipos relacionados ao comportamento ansioso em diferentes populações é de grande importância em uma perspectiva translacional.

2.3. O peixe-zebra como organismo modelo

O peixe-zebra (*Danio rerio*) é um pequeno teleósteo de água doce nativo da Ásia que pertence à família Cyprinidae (WHITLOCK; WESTERFIELD, 2000). Dentre as vantagens apresentadas pela espécie podemos citar o pequeno tamanho (adultos medem cerca de 3 a 5 cm), o baixo custo e o reduzido espaço para manutenção, a alta taxa de proliferação (desova de 50 a 200 ovos por fêmea em condições otimizadas de reprodução), a presença de ovos translúcidos e o rápido desenvolvimento até a fase adulta (aproximadamente 2–3 meses) (LELE; KRONE, 1996). Além desses fatores, o peixe-zebra possui um comportamento relativamente complexo em relação aos demais modelos animais, o que permite a triagem de fenótipos comportamentais através da análise tridimensional e temporal da locomoção (CACHAT et al., 2011a; KALUEFF et al., 2013; ROSEMBERG et al., 2011) (**Figura 3**).

Figura 3: Esquema de algumas características vantajosas do peixe-zebra na pesquisa científica. **(A)** Elevada taxa de proliferação. **(B)** Rápido desenvolvimento entre a fecundação e a maturidade sexual. **(C)** Locomoção exploratória tridimensional.



Fonte: Do autor e <https://en.wikipedia.org/wiki/Zebrafish> (acessado e adaptado em agosto de 2017).

Um dos pioneiros no estudo da biologia do peixe-zebra foi George Streisinger, que utilizou técnicas de mutagênese sítio dirigidas para estudos relacionados à biologia do desenvolvimento (DAHM; GEISLER, 2006; GRUNWALD; EISEN, 2002; GULATI-LEEKHA; GOLDMAN, 2006). O genoma do peixe zebra já é completamente sequenciado e seus genes possuem um alto grau de similaridade com os genes dos mamíferos, o que possibilita seu uso como organismo modelo para o estudo de doenças humanas (HOWE et al., 2013). Devido às suas características, o peixe-zebra combina a complexidade de um vertebrado em um tamanho diminuto, o que favorece a elaboração de protocolos de triagens de médio/alto rendimento (GOLDSMITH, 2004; LEUNG; MOURRAIN, 2016).

Nas últimas décadas, o peixe-zebra vem sendo utilizado como organismo experimental nas áreas como bioquímica, neuroquímica, e farmacologia e biologia do comportamento (BLASER; CHADWICK; MCGINNIS, 2010; EGAN et al., 2009; FONTANA et al., 2016; GERLAI et al., 2000; RICO et al., 2011; ROSEMBERG et al., 2011). Da mesma maneira, o uso do peixe-zebra está crescendo gradativamente para estudos dos comportamentos defensivos e de fenótipos relacionados à ansiedade (CACHAT et al., 2010; MAXIMINO et al., 2010a; STEWART et al., 2011)

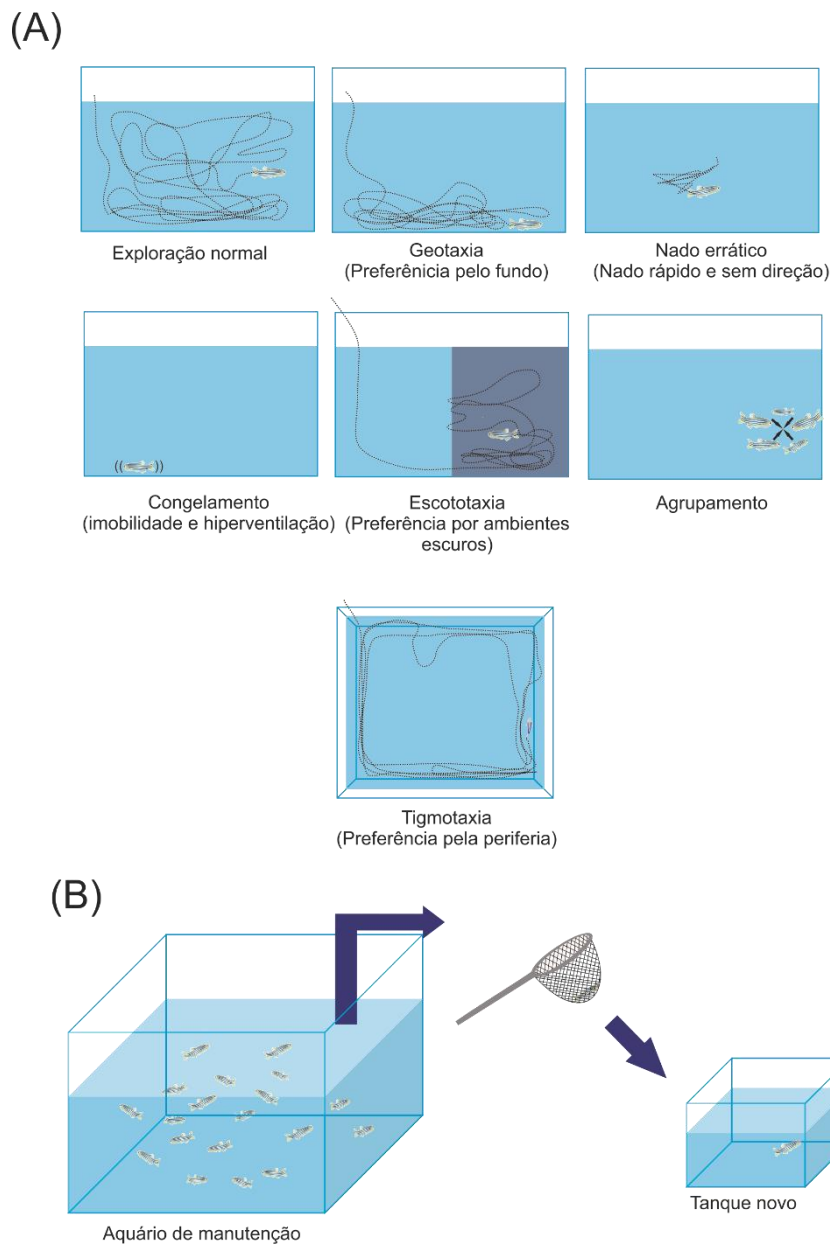
2.4. Testes comportamentais em peixe-zebra

O uso peixe-zebra vem ganhando espaço nas áreas de pesquisa em neurociência, com aplicabilidade para a compreensão do repertório comportamental em pesquisas de cunho ecológico e na medicina translacional (KALUEFF et al., 2013; LEUNG; MOURRAIN, 2016). A compreensão dos mecanismos neurobiológicos e dos fenótipos comportamentais associados na espécie pode fornecer importantes descobertas a respeito de potenciais biomarcadores, das bases genéticas envolvidas em diversas patologias, bem como investigar potenciais estratégias farmacológicas de caráter preventivo (KHAN et al., 2017; RICO et al., 2007). Em virtude disso, foi desenvolvido um catálogo detalhado que descreve os repertórios comportamentais existentes no peixe-zebra, tanto em estágio larval quanto adulto, permitindo assim, a identificação de fenótipos comportamentais (*Zebrafish Behavioral Catalogue, ZBC*) (KALUEFF et al., 2013).

Estímulos potencialmente aversivos são comumente utilizados para a investigação de fenótipos comportamentais relacionados à ansiedade em peixe-zebra. Tais estímulos induzem respostas defensivas, como o aumento da geotaxia, nado errático, episódios de congelamento, tigmotaxia, escototaxia e comportamento de agrupamento (**Figura 4A**) (CANZIAN et al.,

2017; EGAN et al., 2009; MAXIMINO et al., 2010a; ROSEMBERG et al., 2011; SACKERMAN et al., 2010). Baseando-se nesse princípio, o teste do tanque novo é uma metodologia que analisa as respostas comportamentais dos peixes expostos a um ambiente desconhecido, pois assim como nos roedores, a novidade é um fator potencialmente aversivo ao qual o animal habitua-se gradativamente (**Figura 4B**) (CACHAT et al., 2010; EGAN et al., 2009; STEWART et al., 2011).

Figura 4: Triagem dos repertórios comportamentais do peixe-zebra. **(A)** Fenótipos comportamentais relacionados à ansiedade em peixe-zebra. **(B)** Teste do tanque novo.



Fonte: Do autor.

Apesar do estudo do comportamento do tipo ansiedade em peixe-zebra ser recente, diversos trabalhos têm mostrado avanços significativos nesta área do conhecimento (CANZIAN et al., 2017; GUO; WAGLE; MATHUR, 2012; KOKEL; PETERSON, 2008; MAXIMINO et al., 2013; MEZZOMO et al., 2016; QUADROS et al., 2016). Atualmente, pesquisas neuroquímicas, neuroanatômicas e farmacológicas em peixe-zebra estão sendo desenvolvidas a fim de buscar novos conhecimentos associados aos fatores desencadeadores de comportamento do tipo ansiedade (GUO; WAGLE; MATHUR, 2012; JESUTHASAN, 2012). Na literatura, a cafeína vem sendo utilizada como uma substância capaz de modular parâmetros locomotores (TRAN et al., 2017), atividade vertical (EGAN et al., 2009) e interação social induzida por estímulo robótico (LADU et al., 2015) em peixe-zebra. Apesar desses estudos descreverem alterações comportamentais mediadas pela cafeína na espécie, as potenciais diferenças relacionadas a respostas ansiogênicas em populações de peixe-zebra que apresentem diferentes basais de ansiedade ainda são desconhecidas. Dessa maneira, estudos referentes aos comportamentos do tipo ansiedade em peixe-zebra apresentam um grande potencial para a avaliação dos efeitos neurocomportamentais promovidos pela cafeína em indivíduos que possuem diferentes características frente à exposição a substâncias ansiogênicas.

2.5. Populações de peixe zebra: selvagem e leopardo

Como observado em roedores, diferentes populações de peixe zebra foram descritas na literatura (EGAN et al., 2009; HOPTAK-SOLGA et al., 2007; IRION et al., 2014; IWASHITA et al., 2006). A população do tipo selvagem (*WT*) possui pigmentação em forma de listras azuis contínuas na lateral do corpo, que vão da cabeça à cauda (HOPTAK-SOLGA et al., 2007). Em contraste, o fenótipo leopardo (*leo*) possui uma pigmentação irregular, apresentando um padrão de pintas ao invés de listras (**Figura 5**). Apesar da caracterização genética de ambas as populações ainda não ter sido completamente elucidada, acredita-se que *WT* seja geneticamente heterogêneo, assemelhando-se mais às populações nativas de peixe zebra (CANZIAN et al., 2017; PARRA; ADRIAN JR.; GERLAI, 2009). Além disso, *leo* apresenta um comportamento defensivo basal mais acentuado, sugerindo um comportamento do tipo ansiedade elevado em comparação ao *WT* (CANZIAN et al., 2017; EGAN et al., 2009; MAXIMINO et al., 2010b; QUADROS et al., 2016). Em virtude disso, a seleção dessas populações poderia melhorar o desenho experimental para triagens dos efeitos de compostos

potencialmente ansiogênicos, permitindo uma análise detalhada em perfis comportamentais distintos.

Em virtude dos comportamentos do tipo ansiedade entre as populações *WT* e *leo* serem distintos, é de grande relevância o estudo das modulações comportamentais promovidas pela exposição a substâncias potencialmente ansiogênicas nestas populações. Além disso a neurofenotipagem comportamental através de uma reconstrução tridimensional do nado de exploração poderia fornecer uma nova abordagem em relação ao comportamento do tipo ansiedade em peixes-zebra.

Figura 5: Fenótipo dos peixes-zebra das populações selvagem (*WT*) e leopardo (*leo*).



Fonte: <http://www.eb.tuebingen.mpg.de/research/emeriti/research-group-colour-pattern-formation.html> (adaptado e acessado em agosto de 2017).

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo geral

Avaliar os efeitos neurocomportamentais promovidos pela exposição aguda a diferentes concentrações de cafeína em duas populações de peixe-zebra.

3.2. Objetivos específicos

De modo específico, utilizando as populações *WT* e *leo*, os objetivos são:

- Avaliar se diferentes concentrações de cafeína afetam o padrão locomotor dos peixes;
- Investigar o padrão dos comportamentos relacionados à atividade exploratória vertical e tigmotaxia imediatamente após exposição aguda à cafeína;
- Analisar os efeitos promovidos pela cafeína nos comportamentos defensivos de congelamento e movimentos erráticos;
- Verificar o fenótipo neurocomportamental de habituação dos peixes a um novo ambiente após exposição a diferentes concentrações de cafeína.

4. MANUSCRITO CIENTÍFICO

Different effects of caffeine on behavioral neurophenotypes of two zebrafish populations

Luiz Vinícius Rosa, Ana Paula Ardais, Fabiano Vargas Costa, Barbara Dotto Fontana,
Vanessa Andreatta Quadros, Lisiane Oliveira Porciúncula, Denis Broock Rosemberg

*O manuscrito apresenta-se na forma ao qual foi submetido ao periódico
Pharmacology, Biochemistry and Behavior.*

Different effects of caffeine on behavioral neurophenotypes of two zebrafish populations

Luiz Vinícius Rosa^{a,b,*}, Ana Paula Ardais^c, Fabiano Vargas Costa^{a,b}, Barbara Dotto Fontana^{a,b}, Vanessa Andreatta Quadros^{a,b}, Lisiane Oliveira Porciúncula^d, Denis Broock 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 *Graduate Program in Health and Behavior, Catholic University of Pelotas. 373 Gonçalves Chaves Street, Pelotas, RS, 96015-560, Brazil.*

^d *Laboratory of Studies of Purinergic System, Department of Biochemistry, Institute of Basic Health Sciences, Federal University of Rio Grande do Sul. 2600 Ramiro Barcelos Street, annex building, Porto Alegre, RS, 90035-003, Brazil.*

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

* Correspondence to:

Denis B. Rosemberg

Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Centro de Ciências Naturais e Exatas, Universidade Federal de Santa Maria. Avenida Roraima, 1000, 97105–900, Santa Maria, RS, Brazil.

Tel: +55 55 33208665

E-mail address: dbrosemberg@gmail.com

Luiz Vinícius C. Rosa

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

Tel: +55 55 33208665

E-mail address: luiz.v.rosa@gmail.com

Highlights

- Behavioral effects of caffeine were tested in *WT* and *leo* zebrafish populations.
- Behavioral neurophenotyping was analyzed by endpoints and 3D swimming traces.
- Caffeine increased anxiogenic-like behaviors in zebrafish populations.
- Caffeine prominently impaired the habituation to novelty in *WT*.
- High caffeine concentrations induced abnormal behavior in zebrafish.

Abstract

Caffeine is a substance present in several foods and drinks of common western diet. Although its anxiogenic properties have been described, the influence of the different baselines of anxiety levels on caffeine-mediated responses is poorly understood. The short-fin *wild-type* (*WT*) and *leopard* (*leo*) zebrafish populations present significant behavioral differences, in which *leo* shows exacerbated anxiety-like responses. Since behavioral neurophenotyping may be easily assessed in adult zebrafish by associating temporal and spatial three-dimensional reconstructions of locomotion, this study investigated the effects of caffeine on exploratory and anxiety-like behavior of *WT* and *leo* zebrafish populations. For this propose, animals were acutely exposed to caffeine (25, 50, 100, and 200 mg/L) for 15 min and further tested in the novel tank. Endpoint data and 3D reconstruction plots revealed that caffeine was anxiogenic in both *WT* and *leo* populations by altering vertical swimming, freezing, and erratic movements depending on the concentration. Prominent anxiogenic effects during habituation to novelty were observed in *WT*, suggesting a fundamental role of the phenotype in caffeine-mediated neurobehavioral responses. Moreover, caffeine induced aberrant swimming profiles in *WT* and *leo* following 200 mg/L exposure. Overall, our novel findings show that caffeine effects in zebrafish differ in a population-dependent manner. Although future studies are needed to elucidate the neurochemical mechanisms underlying caffeine actions in zebrafish brain, our results contribute for behavioral neurophenotyping of vertebrates following acute caffeine exposure using alternative zebrafish models.

Keywords: Caffeine; anxiety-like behavior; vertical swimming; habituation to novelty; *wild-type*; *leopard*.

1. Introduction

Caffeine (1,3,7- Trimethylxanthine), is the most consumed psychostimulant substance present in several components of the western diet, such as coffee, chocolate, tea, and energy drinks (CAPPELLETTI et al., 2015; FREDHOLM et al., 1999; PESTA et al., 2013). The major effects of caffeine in the central nervous system (CNS) are attributed to the non-selective antagonism of adenosine A₁, A_{2A}, and A_{2B} receptors (FREDHOLM et al., 1999; PORCIÚNCULA et al., 2013). Since adenosine is an endogenous neuromodulator (CUNHA, 2001; LUSARDI, 2009), the blockade of adenosine receptors results in different neurophysiological responses, which reflect changes on behavioral phenotypes (e.g. alertness, aggressiveness, and increased anxiety) (CHEREK; STEINBERG; BRAUCHI, 1983; CUNHA, 2001; ZWYGHUIZEN-DOORENBOS et al., 1990).

Anxiety is a common behavioral response that occurs when animals face stressful and potential dangerous situations. Although anxiety has an adaptive role in organisms, exacerbated anxiety is a pathological condition commonly associated with panic disorders, specific phobias, and other anxiety-related disorders (ANDLIN-SOBOCKI; WITTCHEN, 2005; KESSLER et al., 2012; LANDGRAF; WIGGER, 2002; SUVEG et al., 2010). Anxiety-related disorders are the most prevalent psychiatric condition in the world and approximately one-third of the population is affected during the life (KESSLER et al., 2012). Thus, alternative tools for studying how different anxiety-related phenotypes respond to anxiogenic substances are of great relevance in a translational perspective.

Zebrafish (*Danio rerio*) is a popular animal model in behavioral neuroscience studies due to some interesting advantages, such as easy maintenance, low cost, abundant offspring, and evolutionarily conserved genetic and physiological features (EGAN et al., 2009; KYZAR et al., 2012; RICO et al., 2011). Besides, zebrafish express the major neurotransmitter systems

described for mammals, allowing a detailed pharmacological investigation regarding the effects of different compounds on the CNS.

One of the great advantages of zebrafish when comparing to other animal models is the relatively complex 3D swimming behavior, which allows temporal and spatial three-dimensional reconstructions of the locomotion (Cachat et al., 2011a).

As observed in rodents, different zebrafish populations have been described in the literature (EGAN et al., 2009; HOPTAK-SOLGA et al., 2007; IRION et al., 2014; IWASHITA et al., 2006). The short-fin *wild-type* (*WT*) display continuous blue stripes on the surface of the body up to the length of the caudal fin (HOPTAK-SOLGA et al., 2007). Contrastingly, the *leopard* (*leo*) phenotype has an irregular body pigmentation presenting spots rather than stripes. Although the genetic characterization of these outbred populations has not been fully elucidated, *WT* is expected to be genetically heterogeneous which more closely resembles natural wild populations of zebrafish (CANZIAN et al., 2017; PARRA; ADRIAN JR.; GERLAI, 2009). Additionally, *leo* shows pronounced defensive behaviors in a novel tank, suggesting increased anxiety (CANZIAN et al., 2017; EGAN et al., 2009; MAXIMINO et al., 2010b; QUADROS et al., 2016). Although previous studies have shown that caffeine may alter locomotion (Tran et al., 2017), vertical activity (Egan et al., 2009), response to a robot stimulus (Ladu et al., 2015), and object discrimination (Santos et al., 2016) of zebrafish, the influence of caffeine-mediated responses in populations with different baselines of anxiety levels is unknown. Thus, we evaluated the acute effects of caffeine on behavioral neurophenotypes of *WT* and *leo* zebrafish. For this propose, we associated several behavioral endpoints and three dimensional reconstructions of the zebrafish swimming traces to examine the exploratory and anxiety-like behaviors at different caffeine concentrations.

2. Methods

2.1. Animals

Adult zebrafish (*Danio rerio*) (4–6 months-old, ~50:50 male:female ratio) of short-fin *wild-type* (*WT*) and *leopard* (*leo*) populations were obtained from a commercial supplier (Hobby Aquarios, RS, Brazil). Since the precise genetic identity of fish was unknown, we used the term “population” for both *WT* and *leo* phenotypes used in the current study. Animals were maintained for two weeks in 50-L thermostatic aquarium under constant mechanical and chemical filtration before the experiments to acclimate to the laboratory facility. The water was previously treated with AquaSafe™ (Tetra, USA) and the temperature was set at $27 \pm 1^\circ\text{C}$, pH 7.2. Illumination was provided by ceiling-mounted fluorescent light tubes on a 14/10 light/dark photoperiod cycle (lights on at 7:00 am and off at 9:00 pm). Fish were fed thrice daily with commercial flake fish food (alcon BASIC™, Alcon, Brazil). All animals used were naive and maintained in accordance with the National Institute of Health Guide for Care and Use of Laboratory Animals. The protocols were approved by the Ethics Commission on Animal Use of the Federal University of Santa Maria (process number 2220181215).

2.2. Caffeine exposure

Caffeine was purchased from Sigma Aldrich (St. Louis, MO, USA) and diluted in the home tank water at 25, 50, 100, 200 mg/L. Animals were acutely exposed in 500-mL beakers for 15 min in the presence or absence (control group) of caffeine. Both time of exposure and caffeine concentrations were chosen based on previous reports (EGAN et al., 2009; RUBERTO et al., 2016). Afterwards, fish were gently transferred to the experimental apparatus.

2.3. Novel tank test

The novel tank test was used to assess locomotor and exploratory activity of zebrafish. After the exposure period, fish were individually placed in the test apparatus (20 cm length x 15 cm height x 20 cm width), with a 10 cm water column height. Behavioral activities were measured for 6 min using frontal- and top-view recordings. For frontal view videos, the apparatus was divided into three equal horizontal areas (bottom, middle and top) to detect vertical swimming activity. For top view videos, the same tank was divided into two areas: periphery (less than 2.5 cm from the edge of the tank) and center (more than 2.5 cm from the edge of the tank) to measure thigmotaxis (**Figure 1**). All videos were further analyzed by video-tracking software (ANY-maze, Stoelting CO, USA) at 30 frames/second. The following endpoints were assessed: distance traveled, absolute turn angle, vertical transitions and time spent in top and bottom areas, latency to enter the top area, and thigmotaxis. Freezing behavior and erratic movements were manually quantified by two trained observers (inter-rater reliability > 0.85) blind to the experimental condition of fish. Freezing was defined as cessation of movements, except eyes, associated with a high frequency of opercular movements for more than 2 seconds (ZBC term 1.68). Erratic movements were defined as successive fast acceleration bouts with abrupt changes in movement direction (ZBC term 1.51) (KALUEFF et al., 2013).

2.4. Neurophenotyping of zebrafish behavior

The behavioral reconstruction of 3D swimming traces was performed as previously reported (CACHAT et al., 2011b; ROSEMBERG et al., 2011). Track results for each fish obtained by automated analysis (ANY-mazeTM software) were exported as raw data into separate spreadsheets, providing spatial coordinates x , y (frontal camera) and x , z (top camera) across a time scale broken down into fractions of a second. Then, the videos were analyzed

using the coordinates of the experimental tank properly calibrated in cm. For spatial reconstructions, data from both frontal and top views were merged using recording time for synchronization. The exported traces were analyzed based on similarity to each other by two trained observers (inter-rater reliability >0.85), on a consensus basis. The middle trace was selected as representative for the group. Spatial reconstructions of behavior were created with Graphis 3D graphing softwareTM. The occupancy plot for each swimming trace was directly exported from ANY-mazeTM software after frontal-view recording.

2.5. Statistics

Normality of data and homogeneity of the 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 analyzed by one-way analysis of variance (ANOVA) or repeated measures ANOVA using caffeine and time as factors depending on the experimental design. Differences between groups were further assessed by Student-Newman-Keuls multiple comparisons test. The level of significance was set at $p \leq 0.05$.

3. Results

3.1. Locomotor activity

Figure 2 shows the effects of acute caffeine exposure on locomotor activity of *WT* and *leo*. While caffeine did not alter the distance traveled in *WT* population (**Figure 2A**), 200 mg/L caffeine significantly decreased the distance traveled in *leo* when compared to its respective control group ($F_{(4,56)} = 3.094$, $p = 0.0226$) (**Figure 2B**). The absolute turn angle did not change in both populations.

3.2. Vertical exploration

Figure 3 depicts the vertical exploratory activities of zebrafish. All caffeine concentrations tested reduced the transitions to top in *WT* population ($F_{(4,59)} = 2.975$, $p = 0.0263$), whereas only 50 and 100 mg/L decreased the time spent in top ($F_{(4,59)} = 3.047$, $p = 0.0238$) and increased the latency to enter the upper segment ($F_{(4, 59)} = 3.614$, $p = 0.0106$). Transitions to bottom area decreased at 100 and 200 mg/L ($F_{(4,59)} = 3.698$, $p = 0.0094$) and the time spent in bottom significantly increased at 50 and 100 mg/L caffeine ($F_{(4,59)} = 3.187$, $p = 0.0194$). No differences were observed in thigmotaxis among *WT* groups (**Figure 3A**).

Temporal analyses of behavior showed significant effects of time ($F_{(5, 295)} = 9.090$, $p < 0.0001$) and caffeine ($F_{(4, 59)} = 3.069$, $p = 0.0230$). Caffeine-exposed *WT* fish had a decreased number of entries to the upper area across the trial. In the same way, repeated measures ANOVA yielded significant effects of time ($F_{(5, 295)} = 9.072$, $p < 0.0001$) and caffeine ($F_{(4, 59)} = 2.553$, $p = 0.0482$) for the time spent in top area. Both transitions and time spent in bottom area did not alter after caffeine exposure (**Supplementary Figure 1A**).

Figure 3B shows the effects of caffeine on behavioral endpoints of *leo*. Caffeine decreased the number of entries to top ($F_{(4,56)} = 4.724$, $p = 0.0023$) and the latency to enter the upper segment ($F_{(4,56)} = 3.421$, $p = 0.0143$) at 100 and 200mg/L. Animals exposed to 200 mg/L caffeine showed a significant reduction in the number of entries to bottom ($F_{(4,56)} = 4.515$, $p = 0.0031$). Moreover, caffeine did not change the time spent in both top and bottom areas. No differences were observed in thigmotaxis among *leo* groups (**Figure 3B**).

Concerning the temporal analysis of vertical transitions, repeated measures ANOVA yielded significant effects of time ($F_{(5, 208)} = 5.068$, $p < 0.0001$) and caffeine ($F_{(4, 56)} = 3.025$, $p = 0.0225$). Caffeine-exposed *leo* zebrafish showed a decrease in the number of entries to the upper area across the trial. On the other hand, the time spent in top area did not alter. Significant effects of time ($F_{(5, 280)} = 8.993$, $p < 0.0001$) and caffeine ($F_{(4, 56)} = 3.656$, $p =$

0.0103) for transitions to bottom area were observed in *leo* (**Supplementary Figure 1B**). Importantly, transitions and time spent in middle sections, as well as the latency to enter the middle area did not change in both populations (**data not shown**).

3.3. Freezing and erratic movements

Caffeine exposure (50 and 100 mg/L) increased freezing bouts in *WT* ($F_{(4,66)} = 4.590$, $p = 0.0025$). No significant effects were observed for freezing duration and erratic movements (**Figure 4A**). In *leo* population, fish exposed to 25 mg/L spent more time frozen ($F_{(4,56)} = 2.675$, $p = 0.0411$), while 50mg/L caffeine increased the number of erratic movements ($F_{(4,60)} = 4.013$, $p = 0.0060$). Freezing bouts did not significantly differ among *leo* groups (**Figure 4B**).

3.4. Spatiotemporal reconstruction of zebrafish behavior

Occupancy plots representing the time spent in each vertical area (**Figure 5**) and 3D reconstructions of swimming traces (**Figure 6**) were plotted to analyze the behavioral profile of *WT* and *leo* in the novel tank after acute caffeine exposure. Basically, the anxiogenic effect of caffeine was observed for each population depending on the concentration tested. Two behavioral phenotypes were detected in *WT* and *leo* zebrafish after 200 mg/L caffeine exposure. In general, the zebrafish spent more time in the bottom of the tank and showed reduced transitions to top, reflecting increased anxiety. However, an abnormal behavior was observed in both *WT* (28.57% animals) and *leo* (16.66% animals). This phenotype was characterized by an aberrant swimming at the water surface, decreased vertical transitions, and loss of posture. As expected, untreated *leo* showed reduced vertical activity when compared with control *WT* suggesting increased anxiety-like behavior.

Discussion

In this study, we report for the first time that caffeine affects the behavioral activity of two zebrafish populations. Automated endpoint data and 3D neurophenotyping plots revealed an anxiogenic effect of caffeine in both *WT* and *leo* populations and some animals displayed aberrant swimming following the exposure to high caffeine concentrations. Since prominent anxiogenic-like responses were observed in *WT* phenotype, it is conceivable that caffeine effects in zebrafish occur in a population-dependent manner.

Several endpoints associated with anxiety-like behavior in zebrafish were previously reported (Egan et al., 2009). Potential aversive conditions enhance defensive behaviors, increasing geotaxis, erratic movements, and freezing episodes. As described for rodents, novelty is an anxiogenic factor and many studies evaluate complex behavioral activities on these situations (CACHAT et al., 2011a; EGAN et al., 2009; STEWART et al., 2011). The novel tank test is the most commonly used protocol to measure anxiety-like behavior in zebrafish, where thigmotaxis and vertical drifts are the principal measures (BLASER; CHADWICK; MCGINNIS, 2010). The quantification of freezing and erratic swimming may represent additional variables affected by anxiogenic compounds (CANZIAN et al., 2017; KALUEFF et al., 2013; QUADROS et al., 2016). In contrast with rodents, zebrafish paradigms offer an enhanced dimensionality of behavioral phenotyping. Fish may swim in three dimensions, providing a complex representation of exploratory activity, which can be used for evaluating anxiogenic properties of distinct compounds (CACHAT et al., 2011b). In this scenario, the use of zebrafish populations with different baselines of anxiety levels provides a unique translational opportunity to perform an in-depth dissection of the neurobehavioral effects of caffeine.

WT acutely exposed to caffeine showed reduced vertical transitions. Furthermore, caffeine (50 and 100 mg/L) reduced the time spent in top, as well as increased the latency to

enter the top and freezing episodes. These data suggest an anxiogenic effect of caffeine by increasing defensive behavior, reflecting an impaired habituation to novelty across the 6-min trial. In *leo* population, caffeine reduced the transitions to top and increased the latency to enter the top at 100 and 200 mg/L, without affecting the time spent in the upper area. This result could reflect a floor effect due to the robust baseline defensive behavior or even indicate a different sensitivity to caffeine in comparison with *WT*. Importantly, other anxiety-like behavior endpoints (e.g. freezing duration and erratic movements) were substantially increased following 25 and 50 mg/L caffeine, respectively. In sum, these results corroborate with previous findings showing a distinct behavioral response of *WT* and *leo* when exposed to anxiogenic substances (CANZIAN et al., 2017; QUADROS et al., 2016). A recent study showed a strain-dependent effect of caffeine on behavioral functions of mice with different anxiety-like profile (HUGHES; HANCOCK, 2016). Moreover, a large body of evidence has shown an involvement of adenosine receptor antagonism in mediating anxiogenic responses of caffeine (ARDAIS et al., 2014; KULKARNI; SINGH; BISHNOI, 2007; PECHLIVANOVA et al., 2010; YAMADA; KOBAYASHI; KANDA, 2014). Despite the controversial role of A_1 receptors in modulating anxiety parameters (YAMADA; KOBAYASHI; KANDA, 2014), A_{2A} receptor null mice display reduced exploration, heightened anxiety and aggression, and aberrant locomotor responses to caffeine (LEDENT et al., 1997). In the literature, the molecular identification of A_1 , A_{2A} , and A_{2B} receptors in zebrafish brain has already been described (CAPIOTTI et al., 2011). The respective study showed the existence of two A_{2A} paralogs (named *adora2a.1* and *adora2a.2*) in the CNS, suggesting a complex scenario involving adenosine-mediated signaling in teleosts. Although we did not precisely know the genetic background of each population used, a distinct functionality of adenosine receptors in zebrafish should not be ruled out. Since adenosine is a ubiquitous CNS neuromodulator that regulates mood and emotion, future pharmacological

and genetic manipulations are necessary to clarify the involvement of distinct adenosine receptors in caffeine-mediated responses in both *WT* and *leo* populations. Noteworthy, our behavioral data suggest a fundamental role of the phenotype in caffeine-mediated neurobehavioral responses following acute exposure.

Using 3D reconstructions of swimming traces, we demonstrate that zebrafish exposed to high caffeine concentration (200 mg/L) can also show abnormal behavior characterized by aberrant swimming in water surface, decreased vertical activity and loss of swimming posture with subsequent fall to the bottom of tank. The existence of two behavioral phenotypes in *WT* and *leo* could explain, at least partially, the variability of data regarding the time spent in top area for both populations and the reduced distance traveled in *leo*. Similar effects on exploratory behavior of adult *WT* population were previously reported (WONG et al., 2010). Animals exposed to 250 mg/L caffeine for 20 min showed seizure-like behavior, characterized by spasms and clonic/tonic-related behavior (e.g. corkscrew and circular swimming). Moreover, these behavioral changes were accompanied by a significant increase in whole-body cortisol levels, suggesting that the activation of hypothalamus-pituitary-interrenal (HPI) could play a role in the central mechanisms of caffeine at higher concentrations. Indeed, caffeine enhanced steroidogenic acute regulatory protein (StAR) gene expression in NCI-H295A cells, modulating the rate-limiting step of glucocorticoid synthesis (PING et al., 2012). Considering the different behavioral phenotypes of *WT* and *leo* described herein, more studies are needed to investigate the involvement of HPI function in zebrafish populations after caffeine exposure and under basal conditions.

In conclusion, our novel findings show that caffeine elicits a robust anxiogenic effect in *WT* and *leo* zebrafish. Importantly, the occurrence of aversive phenotypes (e.g. freezing, erratic movements and bottom dwelling) depend on caffeine concentration and population tested. The aberrant swimming pattern observed in some animals suggests that individual

factors could be involved in the behavioral effects of caffeine at higher concentrations. Although additional studies are imperative to explore the mechanisms underlying the CNS actions of caffeine in zebrafish, the use of 3D reconstruction of movement patterns associated with the evaluation of behavioral endpoints enables a more precise characterization of zebrafish swimming traces. Thus, our data contribute for behavioral neurophenotyping of vertebrates following acute caffeine exposure.

Conflict of interest

The authors declare that no competing interests exist.

Author contributions

Conceived and designed the experiments: L.V.R., A.P.A., D.B.R. Performed the experiments: L.V.R., A.P.A., F.V.C. Analyzed the data: L.V.R., F.V.C., B.D.F., V.A.Q., D.B.R. Contributed reagents/materials/analysis tools: L.O.P., D.B.R. Wrote the paper: L.V.R., F.V.C., B.D.F., V.A.Q., D.B.R. All authors read and approved the final manuscript.

Acknowledgements

The authors recognize the financial support and fellowships from Conselho Nacional de Pesquisa e Tecnologia (CNPq) and Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES). L.V.C., F.V.C., B.D.F., and V.A.Q. were recipient of fellowship from CAPES. A.P.A. was recipient of PNPd fellowship from CAPES. L.O.P. and D.B.R. were recipient of CNPq research productivity grant. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

References

- Andlin-Sobocki, P., Wittchen, H.-U., 2005. Cost of anxiety disorders in Europe. *Eur. J. Neurol.* 12 Suppl 1, 39–44.
- Blaser, R.E., Chadwick, L., McGinnis, G.C., 2010. Behavioral measures of anxiety in zebrafish (*Danio rerio*). *Behav. Brain Res.* 208, 56–62.
- Cachat, Jonathan, Stewart, A., Utterback, E., Hart, P., Gaikwad, S., Wong, K., Kyzar, E., Wu, N., Kalueff, A.V., 2011a. Three-Dimensional Neurophenotyping of Adult Zebrafish Behavior. *PLOS ONE* 6, e17597.
- Cachat, Jonathan M., Stewart, A., Utterback, E., Kyzar, E., Hart, P., Carlos, D., Gaikwad, S., Hook, M., Rhymes, K., Kalueff, A., 2011b. Deconstructing Adult Zebrafish Behavior with Swim Trace Visualizations, in: Kalueff, A.V., Cachat, J.M. (Eds.), *Zebrafish Neurobehavioral Protocols, Neuromethods*. Humana Press, pp. 191–201.
- Canzian, J., Fontana, B.D., Quadros, V.A., Rosemberg, D.B., 2017. Conspecific alarm substance differently alters group behavior of zebrafish populations: Putative involvement of cholinergic and purinergic signaling in anxiety- and fear-like responses. *Behav. Brain Res.* 320, 255–263.
- Capiotti, K.M., Menezes, F.P., Nazario, L.R., Pohlmann, J.B., de Oliveira, G.M.T., Fazenda, L., Bogo, M.R., Bonan, C.D., Da Silva, R.S., 2011. Early exposure to caffeine affects gene expression of adenosine receptors, DARPP-32 and BDNF without affecting sensibility and morphology of developing zebrafish (*Danio rerio*). *Neurotoxicol. Teratol.* 33, 680–685.
- Cappelletti, S., Daria, P., Sani, G., Aromatario, M., 2015. Caffeine: Cognitive and Physical Performance Enhancer or Psychoactive Drug? *Curr. Neuropharmacol.* 13, 71–88.
- Cherek, D.R., Steinberg, J.L., Brauchi, J.T., 1983. Effects of caffeine on human aggressive behavior. *Psychiatry Res.* 8, 137–145.
- Cunha, R.A., 2001. Adenosine as a neuromodulator and as a homeostatic regulator in the nervous system: different roles, different sources and different receptors. *Neurochem. Int.* 38, 107–125.
- Egan, R.J., Bergner, C.L., Hart, P.C., Cachat, J.M., Canavello, P.R., Elegante, M.F., Elkhayat, S.I., Bartels, B.K., Tien, A.K., Tien, D.H., Mohnot, S., Beeson, E., Glasgow, E., Amri, H., Zukowska, Z., Kalueff, A.V., 2009. Understanding behavioral and physiological phenotypes of stress and anxiety in zebrafish. *Behav. Brain Res.* 205, 38–44.
- Fredholm, B.B., Bättig, K., Holmén, J., Nehlig, A., Zvartau, E.E., 1999. Actions of caffeine in the brain with special reference to factors that contribute to its widespread use. *Pharmacol. Rev.* 51, 83–133.
- Hoptak-Solga, A.D., Klein, K.A., DeRosa, A.M., White, T.W., Iovine, M.K., 2007. Zebrafish short fin mutations in connexin43 lead to aberrant gap junctional intercellular communication. *FEBS Lett.* 581, 3297–3302.
- Hughes, R.N., Hancock, N.J., 2016. Strain-dependent effects of acute caffeine on anxiety-related behavior in PVG/c, Long-Evans and Wistar rats. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 140, 51–61.
- Irion, U., Frohnhöfer, H.G., Krauss, J., Çolak Champollion, T., Maischein, H.-M., Geiger-Rudolph, S., Weiler, C., Nüsslein-Volhard, C., 2014. Gap junctions composed of connexins 41.8 and 39.4 are essential for colour pattern formation in zebrafish. *eLife* 3, e05125.
- Iwashita, M., Watanabe, M., Ishii, M., Chen, T., Johnson, S.L., Kurachi, Y., Okada, N., Kondo, S., 2006. Pigment pattern in jaguar/obelix zebrafish is caused by a Kir7.1 mutation: implications for the regulation of melanosome movement. *PLoS Genet.* 2, e197.
- Kalueff, A.V., Gebhardt, M., Stewart, A.M., Cachat, J.M., Brimmer, M., Chawla, J.S., Craddock, C., Kyzar, E.J., Roth, A., Landsman, S., Gaikwad, S., Robinson, K., Baatrup, E., Tierney, K., Shamchuk, A., Norton, W., Miller, N., Nicolson, T., Braubach, O., Gilman, C.P., Pittman, J., Rosemberg, D.B., Gerlai, R., Echevarria, D., Lamb, E., Neuhauss, S.C.F., Weng, W., Bally-Cuif, L., Schneider, H., Zebrafish Neuroscience Research Consortium, 2013. Towards a comprehensive catalog of zebrafish behavior 1.0 and beyond. *Zebrafish* 10, 70–86.
- Kessler, R.C., Avenevoli, S., Costello, E.J., Georgiades, K., Green, J.G., Gruber, M.J., He, J., Koretz, D., McLaughlin, K.A., Petukhova, M., Sampson, N.A., Zaslavsky, A.M., Merikangas, K.R., 2012. Prevalence, persistence, and sociodemographic correlates of DSM-IV disorders in the National Comorbidity Survey Replication Adolescent Supplement. *Arch. Gen. Psychiatry* 69, 372–380.

- Kulkarni, S.K., Singh, K., Bishnoi, M., 2007. Involvement of adenosinergic receptors in anxiety related behaviours. *Indian J. Exp. Biol.* 45, 439–443.
- Kyzar, E.J., Collins, C., Gaikwad, S., Green, J., Roth, A., Monnig, L., El-Ounsi, M., Davis, A., Freeman, A., Capezio, N., Stewart, A.M., Kalueff, A.V., 2012. Effects of hallucinogenic agents mescaline and phencyclidine on zebrafish behavior and physiology. *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry* 37, 194–202.
- Ladu, F., Mwaffo, V., Li, J., Macri, S., Porfiri, M., 2015. Acute caffeine administration affects zebrafish response to a robotic stimulus. *Behav Brain Res.* 289, 48–54.
- Landgraf, R., Wigger, A., 2002. High vs low anxiety-related behavior rats: an animal model of extremes in trait anxiety. *Behav. Genet.* 32, 301–314.
- Ledent, C., Vaugeois, J.M., Schiffmann, S.N., Pedrazzini, T., El Yacoubi, M., Vanderhaeghen, J.J., Costentin, J., Heath, J.K., Vassart, G., Parmentier, M., 1997. Aggressiveness, hypoalgesia and high blood pressure in mice lacking the adenosine A2a receptor. *Nature* 388, 674–678.
- Lusardi, T., 2009. Adenosine Neuromodulation and Traumatic Brain Injury. *Curr. Neuropharmacol.* 7, 228–237.
- Maximino, C., de Brito, T.M., da Silva Batista, A.W., Herculano, A.M., Morato, S., Gouveia, A., 2010. Measuring anxiety in zebrafish: a critical review. *Behav. Brain Res.* 214, 157–171.
- Parra, K.V., Adrian Jr., J.C., Gerlai, R., 2009. The synthetic substance hypoxanthine 3-N-oxide elicits alarm reactions in zebrafish (*Danio rerio*). *Behav. Brain Res.* 205, 336–341.
- Pechlivanova, D., Tchekalarova, J., Nikolov, R., Yakimova, K., 2010. Dose-dependent effects of caffeine on behavior and thermoregulation in a chronic unpredictable stress model of depression in rats. *Behav. Brain Res.* 209, 205–211.
- Pesta, D.H., Angadi, S.S., Burtscher, M., Roberts, C.K., 2013. The effects of caffeine, nicotine, ethanol, and tetrahydrocannabinol on exercise performance. *Nutr. Metab.* 10, 71.
- Ping, J., Lei, Y.-Y., Liu, L., Wang, T., Feng, Y., Wang, H., 2012. Inheritable stimulatory effects of caffeine on steroidogenic acute regulatory protein expression and cortisol production in human adrenocortical cells. *Chem. Biol. Interact.* 195, 68–75.
- Porciúncula, L.O., Sallaberry, C., Mioranza, S., Botton, P.H.S., Rosemberg, D.B., 2013. The Janus face of caffeine. *Neurochem. Int.* 63, 594–609.
- Quadros, V.A., Silveira, A., Giuliani, G.S., Didonet, F., Silveira, A.S., Nunes, M.E., Silva, T.O., Loro, V.L., Rosemberg, D.B., 2016. Strain- and context-dependent behavioural responses of acute alarm substance exposure in zebrafish. *Behav. Processes* 122, 1–11.
- Rico, E.P., Rosemberg, D.B., Seibt, K.J., Capiotti, K.M., Da Silva, R.S., Bonan, C.D., 2011. Zebrafish neurotransmitter systems as potential pharmacological and toxicological targets. *Neurotoxicol. Teratol.* 33, 608–617.
- Rosemberg, D.B., Rico, E.P., Mussulini, B.H.M., Piato, A.L., Calcagnotto, M.E., Bonan, C.D., Dias, R.D., Blaser, R.E., Souza, D.O., de Oliveira, D.L., 2011. 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, e19397.
- Santos, L.C., Ruiz-Oliveira, J., Oliveira, J.J., Silva, P.F., Luchiari, A.C., 2016. Irish coffee: Effects of alcohol and caffeine on object discrimination in zebrafish. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 143, 34–43.
- Stewart, A., Wu, N., Cachat, J., Hart, P., Gaikwad, S., Wong, K., Utterback, E., Gilder, T., Kyzar, E., Newman, A., Carlos, D., Chang, K., Hook, M., Rhymes, C., Caffery, M., Greenberg, M., Zadina, J., Kalueff, A.V., 2011. Pharmacological modulation of anxiety-like phenotypes in adult zebrafish behavioral models. *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry* 35, 1421–1431.
- Suveg, C., Morelen, D., Brewer, G.A., Thomassin, K., 2010. The Emotion Dysregulation Model of Anxiety: a preliminary path analytic examination. *J. Anxiety Disord.* 24, 924–930.
- Tran, S., Fulcher, N., Nowicki, M., Desai, P., Tsang, B., Facciol, A., Chow, H., Gerlai, R., 2017. Time-dependent interacting effects of caffeine, diazepam, and ethanol on zebrafish behaviour. *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry* 75, 16–27.

- Wong, K., Stewart, A., Gilder, T., Wu, N., Frank, K., Gaikwad, S., Suciu, C., DiLeo, J., Utterback, E., Chang, K., Grossman, L., Cachat, J., Kalueff, A.V., 2010. Modeling seizure-related behavioral and endocrine phenotypes in adult zebrafish. *Brain Res.* 1348, 209–215.
- Yamada, K., Kobayashi, M., Kanda, T., 2014. Involvement of adenosine A2A receptors in depression and anxiety. *Int. Rev. Neurobiol.* 119, 373–393.
- Zwyghuizen-Doorenbos, A., Roehrs, T.A., Lipschutz, L., Timms, V., Roth, T., 1990. Effects of caffeine on alertness. *Psychopharmacology (Berl.)* 100, 36–39.

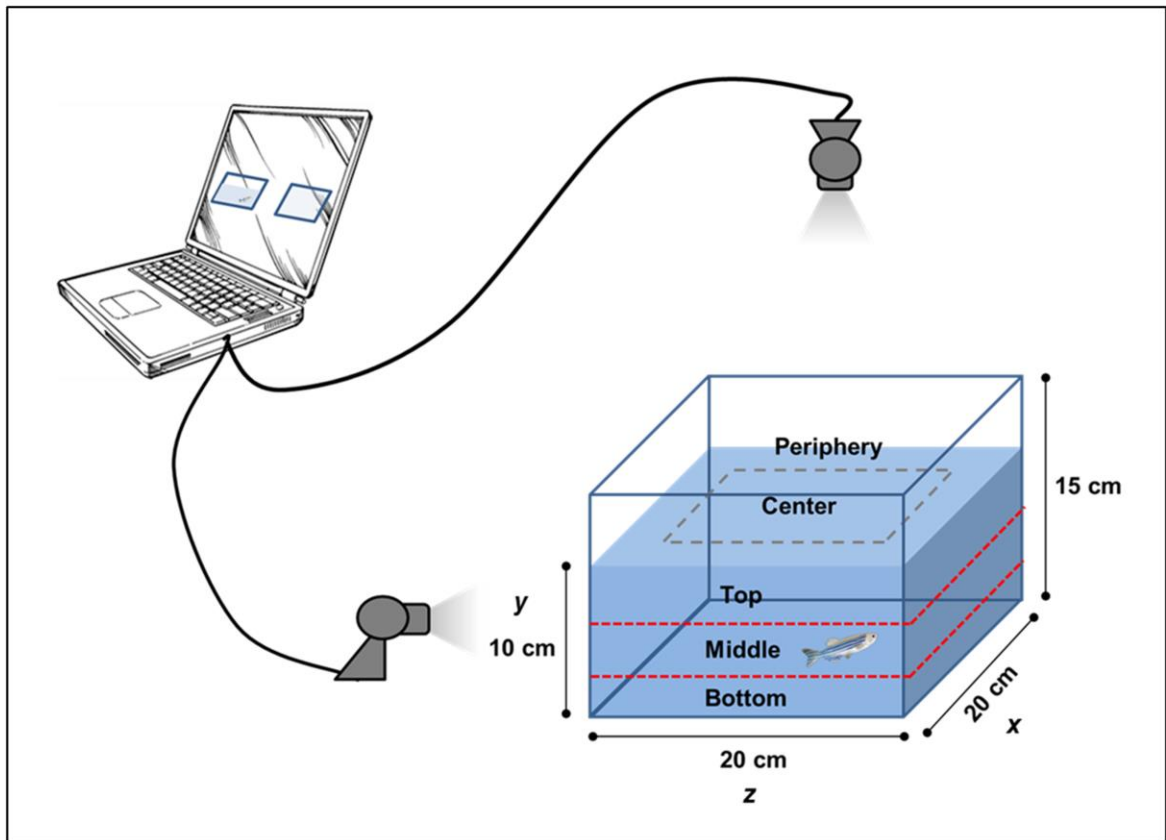


Figure 1. Novel tank apparatus. The aquarium was 20 cm × 20 cm × 15 cm (length × width × height) and the water level was 10 cm. Two webcams were connected to a laptop to register horizontal (center and periphery areas – top view) and vertical (top, middle, and bottom areas – frontal view) swimming activity of zebrafish at 30 frames/s.

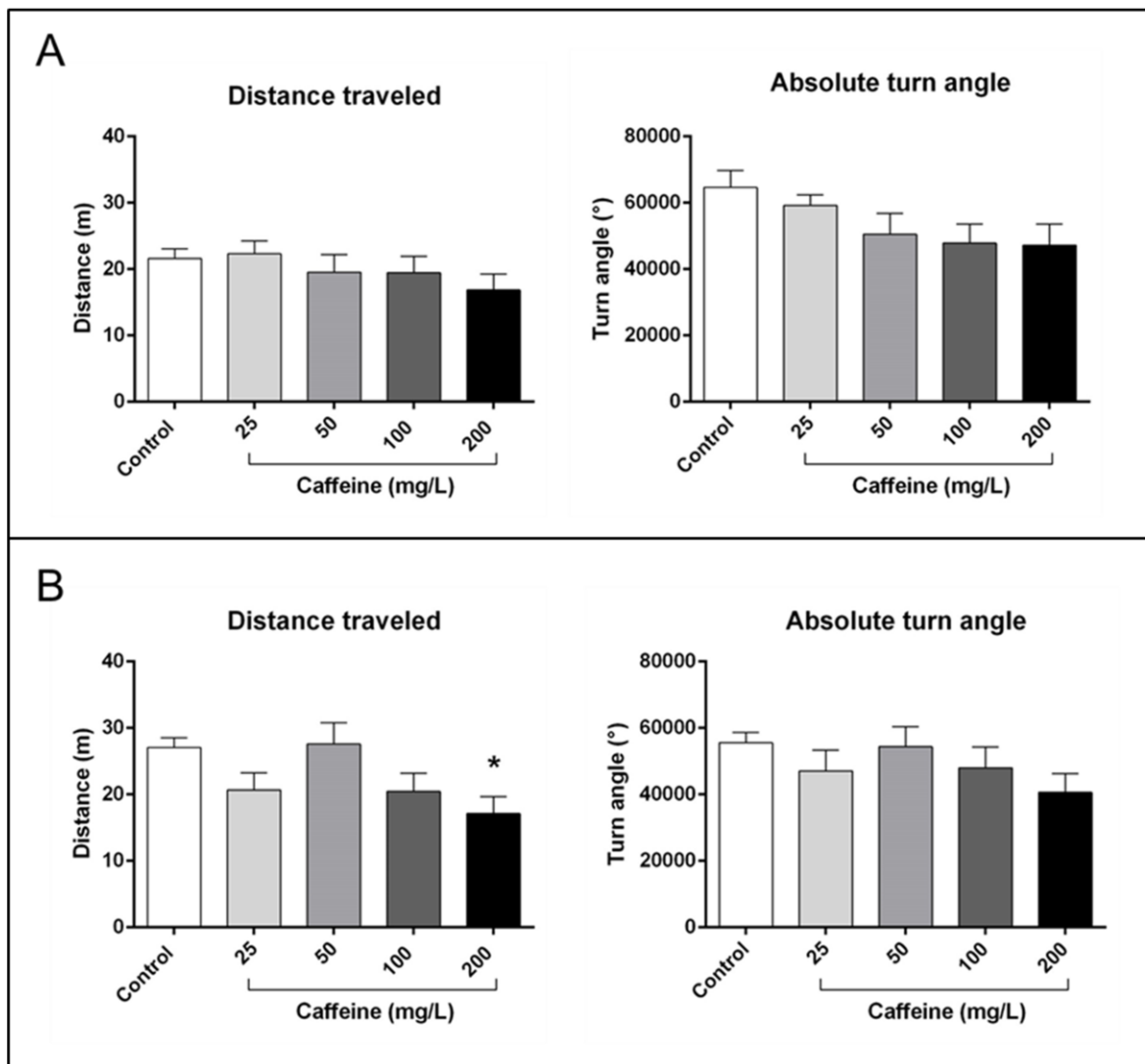


Figure 2. Effects of different caffeine concentrations (25–200 mg/L) on locomotor activity of WT (A) and *leo* (B) zebrafish populations. Data are expressed as means \pm S.E.M and analyzed by one-way ANOVA followed by Student-Newman-Keuls multiple comparison test (* $p \leq 0.05$, $n = 10$ –14 per group).

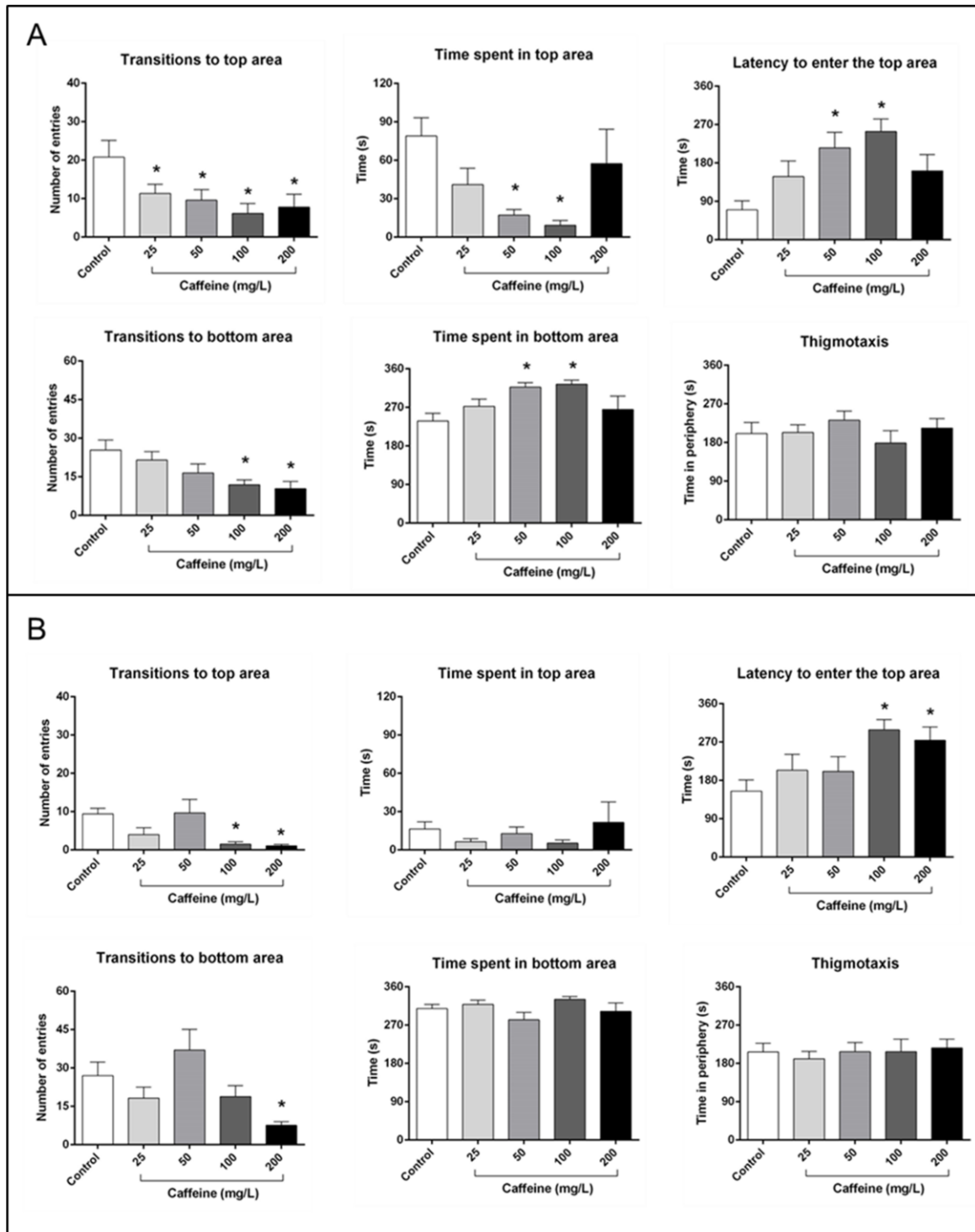


Figure 3. Vertical exploration and thigmotaxis of *WT* (A) and *leo* (B) zebrafish after acute caffeine (25–200 mg/L) exposure. Data are expressed as means \pm S.E.M and analyzed by one-way ANOVA followed by Student-Newman-Keuls multiple comparison test (* $p \leq 0.05$, $n = 10$ –14 per group).

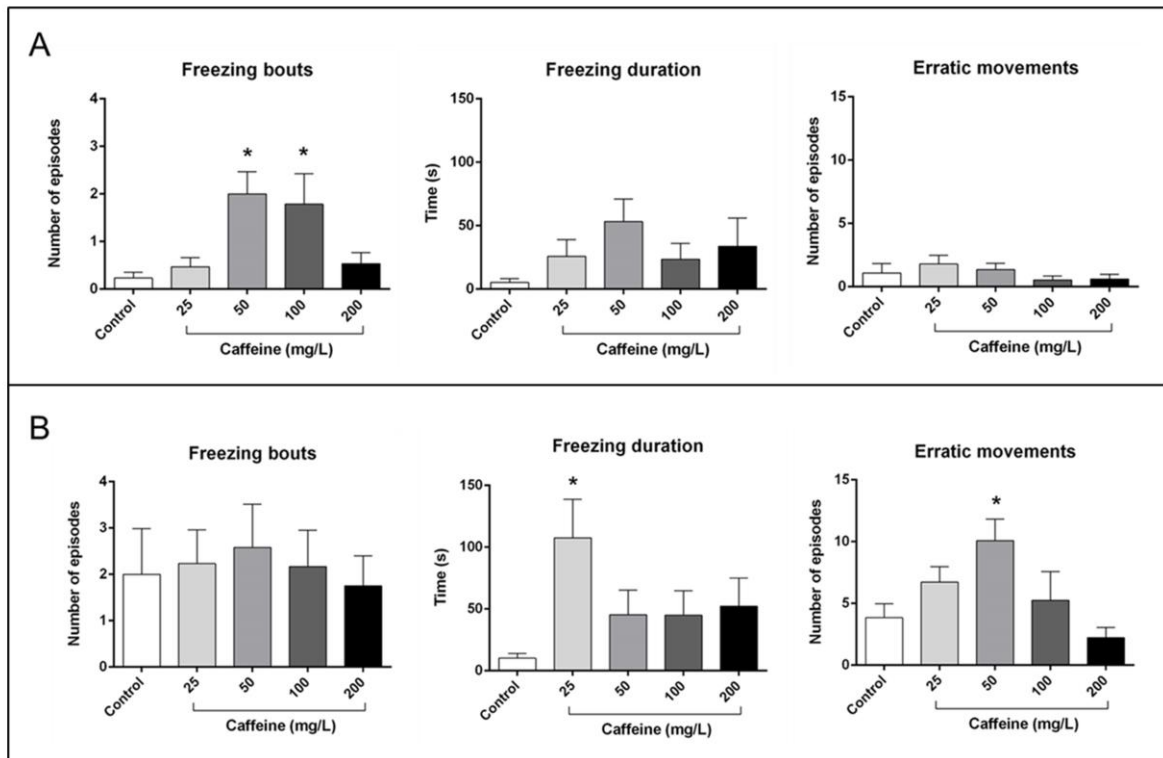


Figure 4. Freezing and erratic movements of *WT* (A) and *leo* (B) zebrafish populations after exposure to caffeine (25–200 mg/L). Data are expressed as means \pm S.E.M and analyzed by one-way ANOVA followed by Student-Newman-Keuls multiple comparison test (* $p \leq 0.05$, $n = 10$ –14 per group).

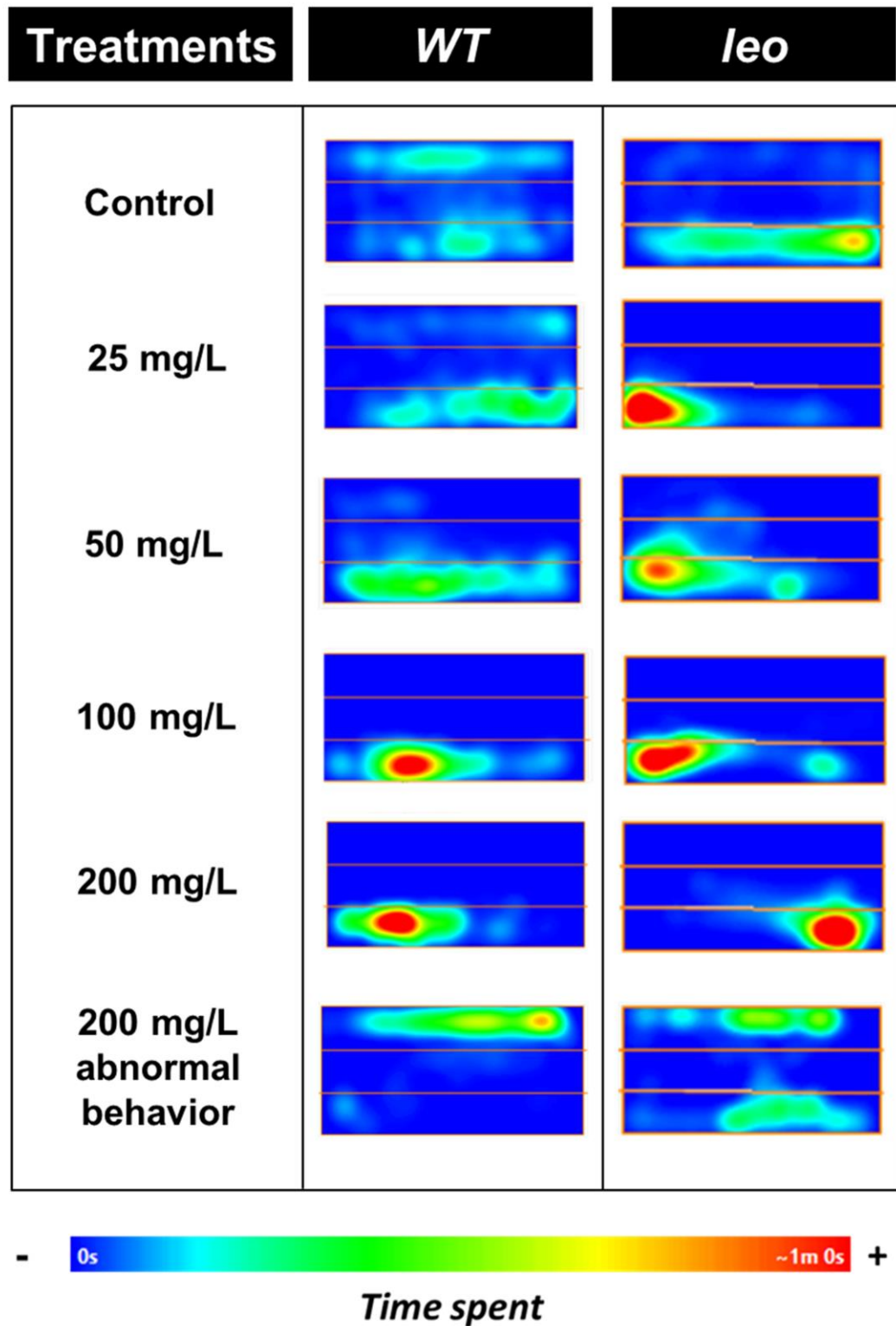


Figure 5. Representative occupancy plots of *WT* and *leo* populations in the absence or presence of caffeine (25–200 mg/L). Abnormal swimming behaviors observed at 200 mg/L are shown. The red dots indicate the regions in which animals spent more than 1 min across the 6 min-trial. Data were obtained by frontal-view recordings using automated tracking system (ANY-maze®, Stoelting CO, USA).

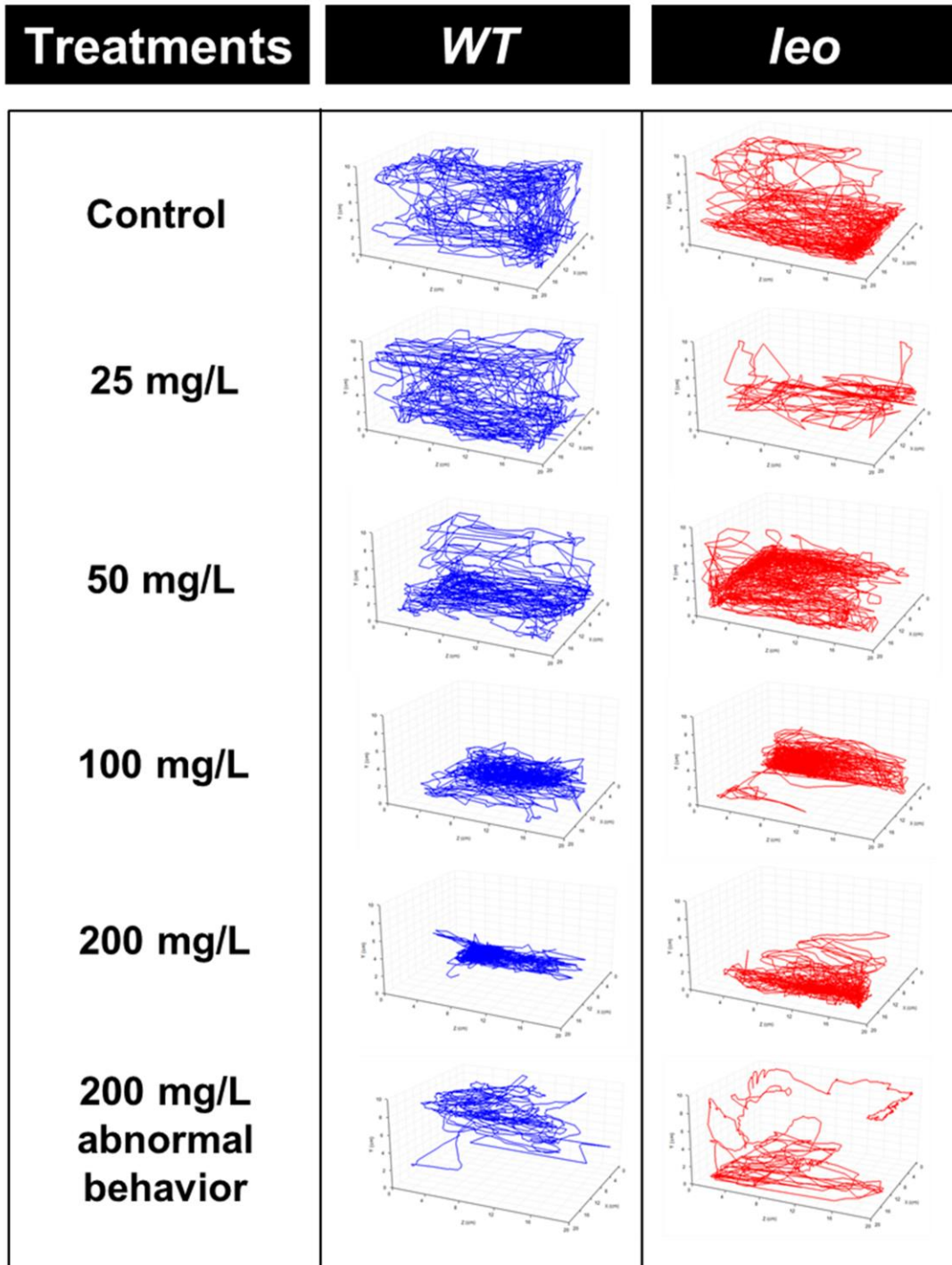
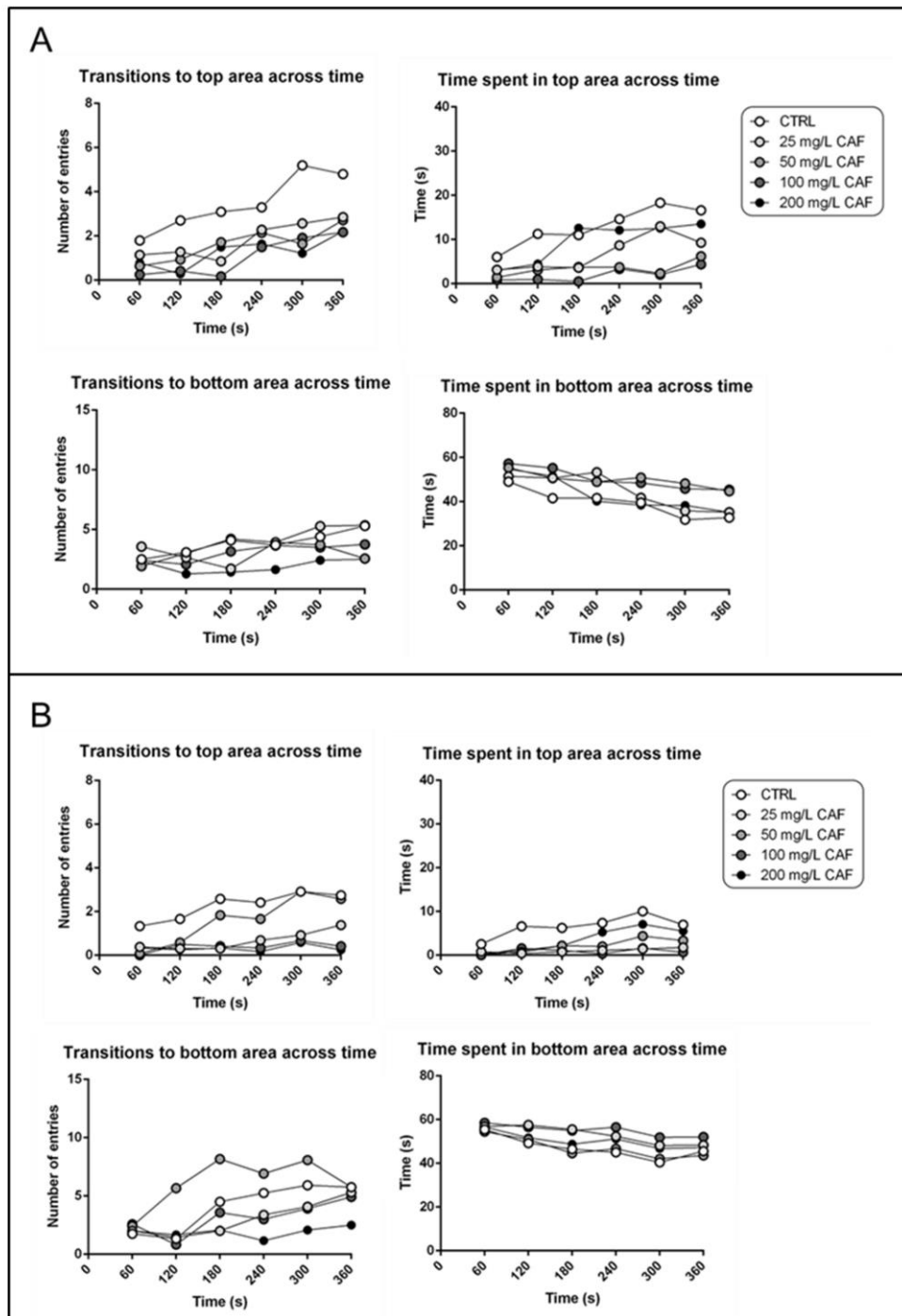


Figure 6. Representative three dimensional neurophenotypes of *WT* and *leo* populations in the absence or presence of caffeine (25–200 mg/L). Abnormal swimming behaviors observed at 200 mg/L are shown. Reconstructions of swimming traces show *x*, *y*, and *z*-coordinates (exported from ANY-maze®, Stoelting CO, USA video-tracking software) using frontal- and top-view recordings of the 6-min trial.



Supplementary Figure 1. Effects of caffeine (25–200 mg/L) on vertical distribution of *WT* (A) and *leo* (B) during a single 6-min trial in the novel tank. The habituation to novelty stress was assessed in control (CTRL) and caffeine-exposed fish (CAF). The figure shows the mean values for each point. Data were analyzed by repeated measures ANOVA followed by Student-Newman-Keuls multiple comparison test considering $p \leq 0.05$ as significant ($n = 10$ –14 per group).

5. CONCLUSÕES PARCIAIS

- A concentração mais elevada de cafeína diminuiu a locomoção dos peixes *leo*, porém não promoveu alterações em *WT*. Contudo, alguns animais de ambas as populações apresentaram um padrão de nado anômalo quando expostos a altas concentrações de cafeína, sugerindo que fatores individuais podem estar envolvidos nesse fenótipo;
- Apesar de não alterar a tigmotaxia, a cafeína diminuiu a exploração vertical de *WT* e *leo*, sugerindo um aumento do comportamento do tipo ansiedade nas populações de peixe-zebra estudadas;
- A ocorrência de comportamentos defensivos (nado errático, tempo de congelamento e quantidade de episódios de congelamentos) é dependente da concentração de cafeína utilizada e do tipo de população exposta;
- A análise tridimensional do fenótipo neurocomportamental da atividade exploratória demonstrou que ambas as populações apresentaram alterações no padrão de habituação à novidade após a exposição à cafeína. Porém, tais efeitos foram mais pronunciados na população *WT*.

6. CONCLUSÃO FINAL

De modo geral, os resultados apresentados nessa Dissertação sugerem que as respostas neurocomportamentais promovidas pela exposição aguda à cafeína em peixe-zebra variam de acordo com a concentração e população. Ademais, o uso de diferentes populações de peixe-zebra poderia servir como uma estratégia para estudos do comportamento tipo ansiedade em futuros estudos farmacológicos.

7. PERSPECTIVAS DO ESTUDO

Este trabalho mostrou que os efeitos comportamentais promovidos pela exposição aguda à cafeína em peixe-zebra são dependentes de concentração e das populações estudadas. Dessa maneira, utilizando populações *WT* e *leo*, as perspectivas do estudo são:

- Avaliar os efeitos da exposição crônica à cafeína na locomoção, exploração e comportamento defensivos;
- Explorar as ações promovidas pela cafeína em tarefas de comportamento de grupo e interação social;
- Estudar os efeitos da cafeína *per se* em tarefas de aprendizagem e memória, bem como em modelos de déficit cognitivo induzido farmacologicamente por escopolamina ou MK-801;
- Examinar o potencial efeito excitotóxico de altas concentrações de cafeína;
- Verificar se a cafeína é capaz de modular parâmetros relacionados ao estresse oxidativo;
- Avaliar os efeitos promovidos pelo antagonismo seletivo dos receptores de adenosina em respostas comportamentais e bioquímicas.

REFERÊNCIAS

- ANDLIN-SOBOCKI, P.; WITTCHEN, H.-U. Cost of anxiety disorders in Europe. **European Journal of Neurology**, v. 12 Suppl 1, p. 39–44, jun. 2005.
- ARNAUD, M. J. The pharmacology of caffeine. **Progress in Drug Research. Fortschritte Der Arzneimittelforschung. Progres Des Recherches Pharmaceutiques**, v. 31, p. 273–313, 1987.
- ARNAUD, M. J. Pharmacokinetics and metabolism of natural methylxanthines in animal and man. **Handbook of Experimental Pharmacology**, n. 200, p. 33–91, 2011.
- BAXTER, A. J. et al. Global prevalence of anxiety disorders: a systematic review and meta-regression. **Psychological Medicine**, v. 43, n. 5, p. 897–910, maio 2013.
- BHORKAR, A. A. et al. Involvement of the central melanocortin system in the effects of caffeine on anxiety-like behavior in mice. **Life Sciences**, v. 95, n. 2, p. 72–80, 30 jan. 2014.
- BLANCHARD, D. C.; BLANCHARD, R. J.; GRIEBEL, G. Defensive Responses to Predator Threat in the Rat and Mouse. In: **Current Protocols in Neuroscience**. [s.l.] John Wiley & Sons, Inc., 2001.
- BLANCHARD, D. C.; SUMMERS, C. H.; BLANCHARD, R. J. The role of behavior in translational models for psychopathology: functionality and dysfunctional behaviors. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, v. 37, n. 8, p. 1567–1577, set. 2013.
- BLANCHARD, J.; SAWERS, S. J. The absolute bioavailability of caffeine in man. **European Journal of Clinical Pharmacology**, v. 24, n. 1, p. 93–98, 1983.
- BLASER, R. E.; CHADWICK, L.; MCGINNIS, G. C. Behavioral measures of anxiety in zebrafish (*Danio rerio*). **Behavioural Brain Research**, v. 208, n. 1, p. 56–62, 17 mar. 2010.
- BOISON, D. Methylxanthines, seizures, and excitotoxicity. **Handbook of Experimental Pharmacology**, n. 200, p. 251–266, 2011.
- CACHAT, J. et al. Measuring behavioral and endocrine responses to novelty stress in adult zebrafish. **Nature Protocols**, v. 5, n. 11, p. 1786–1799, nov. 2010.
- CACHAT, J. et al. Three-Dimensional Neurophenotyping of Adult Zebrafish Behavior. **PLOS ONE**, v. 6, n. 3, p. e17597, 3 jul. 2011.
- CANZIAN, J. et al. Conspecific alarm substance differently alters group behavior of zebrafish populations: Putative involvement of cholinergic and purinergic signaling in anxiety- and fear-like responses. **Behavioural Brain Research**, v. 320, p. 255–263, 1 mar. 2017.
- CAPIOTTI, K. M. et al. Early exposure to caffeine affects gene expression of adenosine receptors, DARPP-32 and BDNF without affecting sensibility and morphology of developing zebrafish (*Danio rerio*). **Neurotoxicology and Teratology**, v. 33, n. 6, p. 680–685, dez. 2011.
- CAPPELLETTI, S. et al. Caffeine: Cognitive and Physical Performance Enhancer or Psychoactive Drug? **Current Neuropharmacology**, v. 13, n. 1, p. 71–88, jan. 2015.

- CARAVAN, I. et al. Modulatory effects of caffeine on oxidative stress and anxiety-like behavior in ovariectomized rats. **Canadian Journal of Physiology and Pharmacology**, v. 94, n. 9, p. 961–972, set. 2016.
- CHEREK, D. R.; STEINBERG, J. L.; BRAUCHI, J. T. Effects of caffeine on human aggressive behavior. **Psychiatry Research**, v. 8, n. 2, p. 137–145, fev. 1983.
- CUNHA, R. A. Adenosine as a neuromodulator and as a homeostatic regulator in the nervous system: different roles, different sources and different receptors. **Neurochemistry International**, v. 38, n. 2, p. 107–125, fev. 2001.
- DAHM, R.; GEISLER, R. Learning from small fry: the zebrafish as a genetic model organism for aquaculture fish species. **Marine Biotechnology (New York, N.Y.)**, v. 8, n. 4, p. 329–345, ago. 2006.
- DIAS, R. B. et al. Adenosine: setting the stage for plasticity. **Trends in Neurosciences**, v. 36, n. 4, p. 248–257, abr. 2013.
- 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, 14 dez. 2009.
- EL YACOUBI, M. et al. The anxiogenic-like effect of caffeine in two experimental procedures measuring anxiety in the mouse is not shared by selective A(2A) adenosine receptor antagonists. **Psychopharmacology**, v. 148, n. 2, p. 153–163, fev. 2000.
- FONTANA, B. D. et al. Modulatory action of taurine on ethanol-induced aggressive behavior in zebrafish. **Pharmacology, Biochemistry, and Behavior**, v. 141, p. 18–27, fev. 2016.
- FRANCIS, S. H. et al. Inhibition of cyclic nucleotide phosphodiesterases by methylxanthines and related compounds. **Handbook of Experimental Pharmacology**, n. 200, p. 93–133, 2011.
- FREDHOLM, B. B. et al. Actions of caffeine in the brain with special reference to factors that contribute to its widespread use. **Pharmacological Reviews**, v. 51, n. 1, p. 83–133, mar. 1999.
- GERLAI, R. et al. Drinks like a fish: zebra fish (*Danio rerio*) as a behavior genetic model to study alcohol effects. **Pharmacology, Biochemistry, and Behavior**, v. 67, n. 4, p. 773–782, dez. 2000.
- GOLDSMITH, P. Zebrafish as a pharmacological tool: the how, why and when. **Current Opinion in Pharmacology**, v. 4, n. 5, p. 504–512, out. 2004.
- GOMES, V. DE C. et al. Behavioral evaluation of eight rat lines selected for high and low anxiety-related responses. **Behavioural Brain Research**, v. 257, p. 39–48, 15 nov. 2013.
- GRUNWALD, D. J.; EISEN, J. S. Headwaters of the zebrafish -- emergence of a new model vertebrate. **Nature Reviews. Genetics**, v. 3, n. 9, p. 717–724, 2002.
- GUERREIRO, S.; MARIEN, M.; MICHEL, P. P. Methylxanthines and ryanodine receptor channels. **Handbook of Experimental Pharmacology**, n. 200, p. 135–150, 2011.

- GULATI-LEEKHA, A.; GOLDMAN, D. A reporter-assisted mutagenesis screen using alpha 1-tubulin-GFP transgenic zebrafish uncovers missteps during neuronal development and axonogenesis. **Developmental Biology**, v. 296, n. 1, p. 29–47, 1 ago. 2006.
- GUO, S.; WAGLE, M.; MATHUR, P. Toward molecular genetic dissection of neural circuits for emotional and motivational behaviors. **Developmental Neurobiology**, v. 72, n. 3, p. 358–365, mar. 2012.
- HOPTAK-SOLGA, A. D. et al. Zebrafish short fin mutations in connexin43 lead to aberrant gap junctional intercellular communication. **FEBS letters**, v. 581, n. 17, p. 3297–3302, 10 jul. 2007.
- HOWE, K. et al. The zebrafish reference genome sequence and its relationship to the human genome. **Nature**, v. 496, n. 7446, p. 498–503, 25 abr. 2013.
- HURRELL, K. E.; HOUWING, F. L.; HUDSON, J. L. Parental Meta-Emotion Philosophy and Emotion Coaching in Families of Children and Adolescents with an Anxiety Disorder. **Journal of Abnormal Child Psychology**, v. 45, n. 3, p. 569–582, abr. 2017.
- IRION, U. et al. Gap junctions composed of connexins 41.8 and 39.4 are essential for colour pattern formation in zebrafish. **eLife**, v. 3, p. e05125, 23 dez. 2014.
- IWASHITA, M. et al. Pigment pattern in jaguar/obelix zebrafish is caused by a Kir7.1 mutation: implications for the regulation of melanosome movement. **PLoS genetics**, v. 2, n. 11, p. e197, 24 nov. 2006.
- JESUTHASAN, S. Fear, anxiety, and control in the zebrafish. **Developmental Neurobiology**, v. 72, n. 3, p. 395–403, mar. 2012.
- KALUEFF, A. V. et al. Towards a comprehensive catalog of zebrafish behavior 1.0 and beyond. **Zebrafish**, v. 10, n. 1, p. 70–86, mar. 2013.
- KESSLER, R. C. et al. Prevalence, persistence, and sociodemographic correlates of DSM-IV disorders in the National Comorbidity Survey Replication Adolescent Supplement. **Archives of General Psychiatry**, v. 69, n. 4, p. 372–380, abr. 2012.
- KHAN, K. M. et al. Zebrafish models in neuropsychopharmacology and CNS drug discovery. **British Journal of Pharmacology**, v. 174, n. 13, p. 1925–1944, jul. 2017.
- KOKEL, D.; PETERSON, R. T. Chemobehavioural phenomics and behaviour-based psychiatric drug discovery in the zebrafish. **Briefings in Functional Genomics & Proteomics**, v. 7, n. 6, p. 483–490, nov. 2008.
- KRIEG, A.; XU, Y.; CICERO, D. C. Comparing Social Anxiety Between Asian Americans and European Americans: An Examination of Measurement Invariance. **Assessment**, 29 jun. 2016.
- KULESSKAYA, N.; VOIKAR, V. Assessment of mouse anxiety-like behavior in the light-dark box and open-field arena: role of equipment and procedure. **Physiology & Behavior**, v. 133, p. 30–38, 22 jun. 2014.

- LADU, F. et al. Acute caffeine administration affects zebrafish response to a robotic stimulus. **Behavioural Brain Research**, v. 289, p. 48–54, 1 ago. 2015.
- LANDGRAF, R.; WIGGER, A. High vs low anxiety-related behavior rats: an animal model of extremes in trait anxiety. **Behavior Genetics**, v. 32, n. 5, p. 301–314, set. 2002.
- Legislação - Anvisa**. Disponível em: <[http://portal.anvisa.gov.br/legislacao#/>](http://portal.anvisa.gov.br/legislacao#/). Acesso em: 23 ago. 2017.
- LELE, Z.; KRONE, P. H. The zebrafish as a model system in developmental, toxicological and transgenic research. **Biotechnology Advances**, v. 14, n. 1, p. 57–72, 1996.
- LEUNG, L. C.; MOURRAIN, P. Drug discovery: Zebrafish uncover novel antipsychotics. **Nature Chemical Biology**, v. 12, n. 7, p. 468–469, 17 jun. 2016.
- LOPEZ, M. F.; LABER, K. Impact of social isolation and enriched environment during adolescence on voluntary ethanol intake and anxiety in C57BL/6J mice. **Physiology & Behavior**, v. 148, p. 151–156, 1 set. 2015.
- LUSARDI, T. . Adenosine Neuromodulation and Traumatic Brain Injury. **Current Neuropharmacology**, v. 7, n. 3, p. 228–237, set. 2009.
- MAXIMINO, C. et al. Parametric analyses of anxiety in zebrafish scototaxis. **Behavioural Brain Research**, v. 210, n. 1, p. 1–7, 26 jun. 2010a.
- MAXIMINO, C. et al. Measuring anxiety in zebrafish: a critical review. **Behavioural Brain Research**, v. 214, n. 2, p. 157–171, 25 dez. 2010b.
- MAXIMINO, C. et al. Behavioral and neurochemical changes in the zebrafish leopard strain. **Genes, Brain, and Behavior**, v. 12, n. 5, p. 576–582, jul. 2013.
- MEJIA, G. E.; RAMIREZ-MARES, M. V. Impact of caffeine and coffee on our health. **Trends in endocrinology and metabolism: TEM**, v. 25, n. 10, p. 489–492, out. 2014.
- MEZZOMO, N. J. et al. The role of taurine on anxiety-like behaviors in zebrafish: A comparative study using the novel tank and the light-dark tasks. **Neuroscience Letters**, v. 613, p. 19–24, 2 fev. 2016.
- MÜLLER, C. E.; JACOBSON, K. A. Xanthines as adenosine receptor antagonists. **Handbook of Experimental Pharmacology**, n. 200, p. 151–199, 2011.
- OLIVEIRA, S. M. D. S. S.; FERNANDES, D. C.; SISTO, F. F. Analysis of the school anxiety inventory in Brazil using the Rasch rating scale model. **Psychological Reports**, v. 115, n. 1, p. 165–178, ago. 2014.
- PARRA, K. V.; ADRIAN JR., J. C.; GERLAI, R. The synthetic substance hypoxanthine 3-N-oxide elicits alarm reactions in zebrafish (*Danio rerio*). **Behavioural Brain Research**, v. 205, n. 2, p. 336–341, 28 dez. 2009.
- PESTA, D. H. et al. The effects of caffeine, nicotine, ethanol, and tetrahydrocannabinol on exercise performance. **Nutrition & Metabolism**, v. 10, p. 71, 13 dez. 2013.

- PORCIÚNCULA, L. O. et al. The Janus face of caffeine. **Neurochemistry International**, v. 63, n. 6, p. 594–609, nov. 2013.
- 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, jan. 2016.
- RICO, E. P. et al. Ethanol alters acetylcholinesterase activity and gene expression in zebrafish brain. **Toxicology Letters**, v. 174, n. 1–3, p. 25–30, 1 nov. 2007.
- RICO, E. P. et al. Zebrafish neurotransmitter systems as potential pharmacological and toxicological targets. **Neurotoxicology and Teratology**, v. 33, n. 6, p. 608–617, dez. 2011.
- ROSEMBERG, D. B. et al. Differences in spatio-temporal behavior of zebrafish in the open tank paradigm after a short-period confinement into dark and bright environments. **PloS One**, v. 6, n. 5, p. e19397, 2 maio 2011.
- SACKERMAN, J. et al. Zebrafish Behavior in Novel Environments: Effects of Acute Exposure to Anxiolytic Compounds and Choice of Danio rerio Line. **International Journal of Comparative Psychology**, v. 23, n. 1, p. 43–61, 1 jan. 2010.
- SARTORI, A. G. DE O.; SILVA, M. V. DA. Caffeine in Brazil: intake, socioeconomic and demographic determinants, and major dietary sources. **Nutrire**, v. 41, n. 1, p. 11, 1 dez. 2016.
- STEWART, A. et al. Pharmacological modulation of anxiety-like phenotypes in adult zebrafish behavioral models. **Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry**, v. 35, n. 6, p. 1421–1431, 1 ago. 2011.
- SUVEG, C. et al. The Emotion Dysregulation Model of Anxiety: a preliminary path analytic examination. **Journal of Anxiety Disorders**, v. 24, n. 8, p. 924–930, dez. 2010.
- TRAN, S. et al. Time-dependent interacting effects of caffeine, diazepam, and ethanol on zebrafish behaviour. **Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry**, v. 75, p. 16–27, 3 abr. 2017.
- WHITLOCK, K. E.; WESTERFIELD, M. The olfactory placodes of the zebrafish form by convergence of cellular fields at the edge of the neural plate. **Development (Cambridge, England)**, v. 127, n. 17, p. 3645–3653, set. 2000.
- ZANGROSSI, H.; GRAEFF, F. G. Serotonin in anxiety and panic: contributions of the elevated T-maze. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, v. 46 Pt 3, p. 397–406, out. 2014.
- ZWYGHUIZEN-DOORENBOS, A. et al. Effects of caffeine on alertness. **Psychopharmacology**, v. 100, n. 1, p. 36–39, 1 mar. 1990.

ANEXO A – CARTA DE APROVAÇÃO DA CEUA



Comissão de Ética no Uso de Animais

da

Universidade Federal de Santa Maria

CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "Papel da cafeína no modelo de déficit cognitivo induzido por escopolamina em peixe zebra (Danio rerio) em tarefa de memória espacial e em parâmetros de estresse oxidativo", protocolada sob o CEUA nº 2220181215, sob a responsabilidade de **Denis Broock Rosemberg** e equipe; *Luiz Vinicius Costa da Rosa; Julia Canzian Marion; Nathalia Pesamosca Zancan; Talise Ellwanger Muller; Tális de Oliveira Silva; Vania Lucia Loro* - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovada** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de Santa Maria (CEUA/UFSM) na reunião de 25/02/2016.

We certify that the proposal "The role of caffeine in cognitive impairment model induced by scopolamine in zebrafish (Danio rerio): evaluation of a spatial memory task and oxidative stress parameters", utilizing 290 Fishes (males and females), protocol number CEUA 2220181215, under the responsibility of **Denis Broock Rosemberg** and team; *Luiz Vinicius Costa da Rosa; Julia Canzian Marion; Nathalia Pesamosca Zancan; Talise Ellwanger Muller; Tális de Oliveira Silva; Vania Lucia Loro* - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **approved** by the Ethic Committee on Animal Use of the Federal University of Santa Maria (CEUA/UFSM) in the meeting of 02/25/2016.

Finalidade da Proposta: **Pesquisa (Acadêmica)**

Vigência da Proposta: de **03/2016** a **02/2018**

Área: **Bioquímica E Biologia Molecular**

Origem: **Não aplicável biotério**

Espécie: **Peixes**

sexo: **Machos e Fêmeas**

idade: **4 a 6 meses**

N: **290**

Linhagem: **Danio rerio**

Peso: **0,250 a 0,280 g**

Resumo: O peixe zebra (*Danio rerio*), mundialmente conhecido como zebrafish, é um teleosteo amplamente utilizado em diferentes áreas da pesquisa científica. Dentre as características que tornam o peixe zebra um atrativo modelo quando comparado com roedores, podemos citar a facilidade de manutenção e manipulação. Além disso, existe a possibilidade de se estudar mecanismos bioquímicos e alterações fenotípicas promovidas por diferentes compostos em média/larga escala. O seu pequeno tamanho aliado ao alto grau de homologia do genoma com os genes de mamíferos e à típica complexidade dos organismos vertebrados facilitam a extrapolação dos resultados obtidos de maneira mais direta do que os dados oriundos de experimentos com invertebrados. A caracterização dos sistemas de neurotransmissão, bem como de diferentes paradigmas comportamentais do peixe zebra tem representado um avanço para o conhecimento dos mecanismos relacionados à aprendizagem e memória. A caracterização de fenótipos através da exposição à escopolamina já foi realizada no peixe zebra, o qual apresentou déficit cognitivo de aquisição de memória por alteração na neurotransmissão colinérgica. Estudos com roedores demonstraram que exposição a escopolamina pode induzir a toxicidade por espécies reativas. A escopolamina age bloqueando os receptores muscarínicos, podendo, inclusive, induzir um aumento na atividade da acetilcolinesterase e modular os níveis de acetilcolina na fenda sináptica.

A cafeína (1,3,7-trimetilxantina) é um agonista não seletivo dos receptores de adenosina, um importante neuromodulador endógeno. A sinalização por adenosina modula a liberação de uma série de neurotransmissores, incluído nestes a acetilcolina. De maneira geral, acreditamos que o desenvolvimento desse projeto contribuirá de forma significativa para uma melhor compreensão e caracterização dos mecanismos envolvidos nos diversos efeitos relacionados a moléculas que causem déficit cognitivo, bem como da ação da cafeína em parâmetros comportamentais. Assim, objetivamos validar novas ferramentas para o estudo e triagem de novas moléculas com potencial ação neuroprotetora em larga escala

Local do experimento: Laboratório de Fisiologia de Peixes (LAFIPE), UFSM, CCS - Departamento de Farmacologia e Fisiologia.

Santa Maria, 30 de agosto de 2017

Prof. Dra. Daniela Bitencourt Rosa Leal
Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade Federal de Santa Maria



Prof. Dr. Denis Broock Rosemberg
Vice-Cordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade Federal de Santa Maria

ANEXO B – COMPROVANTE DE SUBMISSÃO DO MANUSCRITO CIENTÍFICO

PHARMACOLOGY
BIOCHEMISTRY AND BEHAVIOR

Denise Rosenberg | My Journals | Log Out | Help **EVISE***

Home Reports

 Due to a system upgrade, EVISE will be unavailable on Thursday August 31 from 6:00 to 16:00 BST. 

My Author Tasks

[Start New Submission](#) Click here to view your submissions with a final decision

My Submissions with Journal (1)

Different effects of caffeine on behavioral neurophenotypes of two zebrafish populations
Current status: Under Review (20/Aug/2017)

PBB_2017_385
Section Editor: Edward Levin
Article Type: Research Paper
Initial submission : 10/Aug/2017