

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
FARMACOLOGIA**

**DIAZEPAM E FLUOXETINA INIBEM A RESPOSTA
DE ESTRESSE EM *ZEBRAFISH* (*Danio rerio*)**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Murilo Sander de Abreu

**Santa Maria, RS, Brasil.
2014**

**DIAZEPAM E FLUOXETINA INIBEM A RESPOSTA DE
ESTRESSE EM ZEBRAFISH (*Danio rerio*)**

Murilo Sander de Abreu

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, Área de Concentração Farmacologia Aplicada à Produção Animal, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para a obtenção do grau de
Mestre em Farmacologia.

Orientador: Leonardo José Gil Barcellos
Co-orientador: Angelo Luis Stapassolli Piato

Santa Maria, RS, Brasil.
2014

Ficha catalográfica elaborada através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Central da UFSM, com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

Abreu, Murilo Sander de
DIAZEPAM E FLUOXETINA INIBEM A RESPOSTA DE ESTRESSE
EM ZEBRAFISH (Danio rerio) / Murilo Sander de Abreu.-
2014.
36 f.; 30cm

Orientador: Leonardo José Gil Barcellos
Coorientador: Angelo Luis Stapassolli Piato
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa
Maria, Centro de Ciências da Saúde, Programa de Pós-
Graduação em Farmacologia, RS, 2014

1. zebrafish 2. estresse 3. psicofármacos 4. diazepam
5. fluoxetina I. Barcellos, Leonardo José Gil II. Piato,
Angelo Luis Stapassolli III. Título.

**Universidade Federal De Santa Maria
Centro de Ciências da Saúde
Programa de Pós-Graduação em Farmacologia**

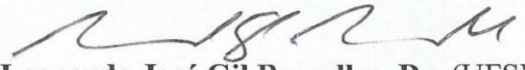
**A Comissão Examinadora, abaixo assinada,
aprova a Dissertação de Mestrado**

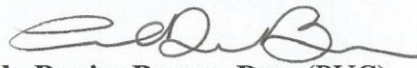
**DIAZEPAM E FLUOXETINA INIBEM A RESPOSTA DE ESTRESSE
EM ZEBRAFISH (*Danio rerio*)**

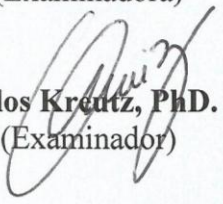
Elaborada por
Murilo Sander de Abreu

Como requisito parcial para a obtenção do grau de
Mestre em Farmacologia.

COMISSÃO EXAMINADORA:


Leonardo José Gil Barcellos, Dr. (UFSM)
(Presidente/Orientador)


Carla Denise Bonan, Dra. (PUC)
(Examinadora)


Luiz Carlos Krentz, PhD. (UPF)
(Examinador)

Passo Fundo, 27 de agosto de 2014.

RESUMO

Dissertação de Mestrado
Programa de Pós-Graduação em Farmacologia
Universidade Federal de Santa Maria

DIAZEPAM E FLUOXETINA INIBEM A RESPOSTA DE ESTRESSE EM ZEBRAFISH (*Danio rerio*)

Autor: Murilo Sander de Abreu
Orientador: Leonardo José Gil Barcellos
Co-orientador: Angelo Luis Stapassoli Piato
Data e local da defesa: Passo Fundo, 27 de agosto de 2014.

A presença de produtos farmacêuticos no ambiente aquático tem sido relatada há alguns anos em vários estudos. No entanto, o impacto de medicamentos sobre os organismos presentes nesses ecossistemas ainda é pouco conhecido. Assim, investigamos os efeitos da exposição aguda ao diazepam e à fluoxetina sobre a resposta ao estresse agudo em *zebrafish* (*Danio rerio*). Os peixes foram expostos aos fármacos por 15 minutos e, após esse período, o grupo denominado tempo 0 foi coletado; os demais grupos foram submetidos a um estímulo de estresse, com perseguição dos peixes com uma rede durante dois minutos, e, após, foram coletados nos tempos de 15, 60 e 240 minutos. Foram utilizadas três concentrações de diazepam a 0,88 µg/L (concentração ambiental); 16 µg/L; e 160 µg/L, concentração com efeitos comportamentais relatados em *zebrafish*. Em relação à fluoxetina, foram utilizadas as concentrações de 1 µg/L, 25 µg/L e 50 µg/L (25 a 50 vezes a concentração do ambiente, respectivamente). Nossos resultados demonstram que o diazepam e a fluoxetina inibem o eixo de estresse no *zebrafish*. A concentração intermediária de diazepam é capaz de suprimir a resposta de estresse, conforme se mediu pelos níveis de cortisol, ao passo que a fluoxetina é capaz de inibir a resposta ao estresse em concentrações semelhantes às encontradas no ambiente. Peixes com resposta de estresse prejudicada perdem a capacidade de manter a homeostase contra fatores de estresse, uma vez que reduz a capacidade de promover ajustes iônicos, metabólicos e comportamentais necessários para tal resposta. Assim, esses dados sugerem que a presença de fármacos psicoativos em ecossistemas aquáticos pode causar disfunção neuroendócrina em peixes.

Palavras chave: diazepam, fluoxetina, psicofármacos, estresse, *zebrafish*, *Danio rerio*.

ABSTRACT

Dissertation
Post-graduate Program in Pharmacology
Federal University of Santa Maria

DIAZEPAM AND FLUOXETINE INHIBIT THE STRESS RESPONSE IN ZEBRAFISH (*Danio rerio*)

Author: Murilo Sander de Abreu
Advisor: Leonardo José Gil Barcellos
Co-supervisor: Angelo Luis Stapassoli Piato
Place and date of defense: Passo Fundo, August 27, 2014.

The presence of pharmaceuticals in the aquatic environment has long been reported for some years in various studies. However, the impact of drugs on organisms present in aquatic ecosystems is still poorly known. Thus, we investigated the effects of acute exposure to diazepam or fluoxetine on the response to acute stress in zebrafish (*Danio rerio*). Fish were exposed to drugs for 15 minutes and, after this period, the group designated time 0 was collected; the other groups were subjected to a stimulus of stress, which consisted in persecution of fish with a net for two minutes, and after that, were collected at the times of 15, 60 and 240 minutes. Three concentrations of diazepam 0.88 µg/L (environmental concentration) were used; 16 µg/L; and 160 µg/L, concentrations that cause behavioral effects in zebrafish. Regarding fluoxetine at concentrations of 1 µg/L, 25 µg/L and 50 µg/L (25 to 50 times the concentration of the environment, respectively) were used. Our results show that diazepam and fluoxetine inhibit the axis of stress in the zebrafish. The intermediate concentration of diazepam is able to suppress the stress response, as measured by levels of cortisol whereas the fluoxetine is able to inhibit the stress response at concentrations similar to those found in the environment. Fish with an impaired stress response loses the ability to maintain homeostasis against stress factors, since it reduces the ability to promote ionic, metabolic and behavioral adjustments necessary for such response. Thus, these data suggest that the presence of psychoactive drugs in aquatic ecosystems may cause neuroendocrine dysfunction in fish.

Keywords: diazepam, fluoxetine, psychotropics, stress, zebrafish, *Danio rerio*.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Eixo Hipotálamo-hipófise-adrenal.....	11
Figura 2. Fórmula estrutural do diazepam.....	14
Figura 3. Representação esquemática do mecanismo de ação do diazepam.....	15
Figura 4. Fórmula estrutural da fluoxetina.....	16
Figura 5. Representação esquemática do mecanismo de ação da fluoxetina.....	17
Figura 6. <i>Zebrafish</i>	18

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	9
1.1. Resposta ao estresse.....	10
1.2. Fármacos no ambiente aquático.....	12
1.3. Diazepam	13
1.4. Fluoxetina	16
1.5. <i>Zebrafish</i>	17
2. OBJETIVOS	19
2.1. Objetivo geral.....	19
2.2. Objetivos específicos.....	19
3. ARTIGO PUBLICADO	20
4. DISCUSSÃO	26
5. CONCLUSÃO	29
REFERÊNCIAS	30

1. INTRODUÇÃO

A ação de um fármaco sobre o organismo, independentemente da via de administração, envolve processos farmacocinéticos e farmacodinâmicos que resultam na excreção de metabólitos para o meio ambiente. O ambiente aquático recebe a maior parte desses compostos excretados pelos organismos.

As agências reguladoras, através do tratamento dos efluentes, têm o objetivo de eliminar esses compostos de forma adequada para evitar potenciais danos aos seres humanos e aos ecossistemas aquáticos.

Os benzodiazepínicos e os inibidores seletivos da recaptação de serotonina (ISRS) são comumente encontrados em sistemas de efluentes, em águas residuais de efluentes, em águas superficiais e, até mesmo, na água potável. Há relatos (CALISTO; ESTEVES, 2009; CALISTO et al., 2011; HUMMEL et al., 2006; KOSJEK et al., 2012) de que esses fármacos persistem na água mesmo após o tratamento de efluentes, pelo fato de não serem fotodegradados.

Estudos (CURTIS et al., 1997; BENCAN et al., 2009; GEBAUER et al., 2011; BRODIN et al., 2013) mostram que os benzodiazepínicos, como o diazepam, e os ISRSs, como a fluoxetina, exercem efeitos ansiolíticos nos organismos e podem interferir na atividade do eixo neuroendócrino do estresse. A resposta ao estresse é um importante mecanismo que fornece condições de enfrentar situações adversas, elevando os níveis de cortisol e resultando na mobilização de energia para ações defensivas e participando dos processos de osmorregulação em peixes (BARTON, 1997; BARTON et al., 2002).

Embora esses fármacos tenham sido detectados numa grande variedade de ambientes (HIGNITE; AZARNOFF, 1977; HEBERER, 2002; KOLPIN et al., 2002; CALAMARI, et al., 2003; BROOKS et al., 2005; JONES et al., 2005; CALISTO; ESTEVES, 2009; ALONSO et al., 2010; CALISTO et al., 2011), há pouca informação sobre os potenciais efeitos nos organismos. Nesse contexto, nossa hipótese é que as concentrações de diazepam e fluoxetina encontradas no ambiente podem interferir na resposta ao estresse em peixes. Assim, testamos essa possibilidade utilizando como modelo experimental o *zebrafish* (*Danio rerio*), espécie de peixe que oferece muitas vantagens como organismo modelo devido ao fácil manuseio e

manutenção, e também em razão de sua homologia genética com os seres humanos de 70% (HOWE et al., 2013).

O presente trabalho está embasado na apresentação dos resultados obtidos sob a forma de artigo, para fins de defesa de Dissertação de Mestrado, dispondo das seguintes seções: introdução, objetivos, artigo publicado, discussão e conclusão.

A seção de introdução abordará uma breve elucidação sobre a resposta ao estresse, sobre a presença de fármacos no ambiente, com foco em fármacos psicoativos, principalmente diazepam e fluoxetina, além de abordar informações sobre o organismo modelo *zebrafish*. Estudos da literatura (SACKERMAN et al., 2010; GEBAUER et al., 2011; PARK et al., 2012; PRIETO et al., 2012; BRODIN et al., 2013) apresentam dados sobre os efeitos comportamentais e endócrinos desencadeados pela resposta ao estresse em peixes e pela presença de fármacos na água, demonstrando a importância da avaliação dos efeitos de tais elementos sobre as espécies que com eles tiverem contato.

Na seção do artigo publicado, serão apresentados os resultados que compõem a pesquisa. Nessa mesma seção, encontram-se descritos os materiais e os métodos, a análise estatística aplicada aos dados obtidos, os resultados, a discussão e as referências bibliográficas do trabalho.

Na discussão, há uma interpretação dos resultados obtidos e a correlação com os dados da literatura. Por fim, apresenta-se a conclusão dessa dissertação.

1.1.Resposta ao estresse

A resposta ao estresse é desencadeada pela presença de algum agente estressor envolvendo a coordenação dos aspectos de comportamento de esquiva, aumento da vigilância, ativação do sistema nervoso simpático e do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (HHA) (BEAR; CONNORS; PARADISO, 2008).

As respostas de estresse são divididas em três categorias: primárias, secundárias e terciárias (BARTON, 1997; BARTON et al., 2002). As respostas primárias são as hormonais, as secundárias são mudanças nos parâmetros fisiológicos e bioquímicos e as terciárias são o comprometimento no desempenho, as mudanças no comportamento e o aumento da

suscetibilidade a doenças. O cortisol, principal corticosteroide em peixes, é considerado um bom indicador para avaliação de estresse primário (MOMMSEN et al., 1999).

Estímulos estressores fisiológicos, psíquicos ou emocionais ativam os neurônios hipotalâmicos, os quais liberam o hormônio liberador de corticotrofina (CRH) para a circulação. Esse hormônio atua na hipófise, estimulando a liberação do hormônio adrenocorticotrófico (ACTH). Quando liberado no sangue, tal hormônio atua no córtex da glândula suprarrenal, que estimula a liberação de cortisol (Figura 1). Em peixes, o eixo HHI (WENDELAAR BONGA 1997) é análogo ao eixo HHA em humanos, fazendo com que a resposta ao estresse leve ao aumento similar do cortisol (BARCELLOS et al., 2007; 2010; 2011; 2014; CERICATO et al., 2008; 2009; PIATO et al., 2011; KOAKOSKI et al., 2014).

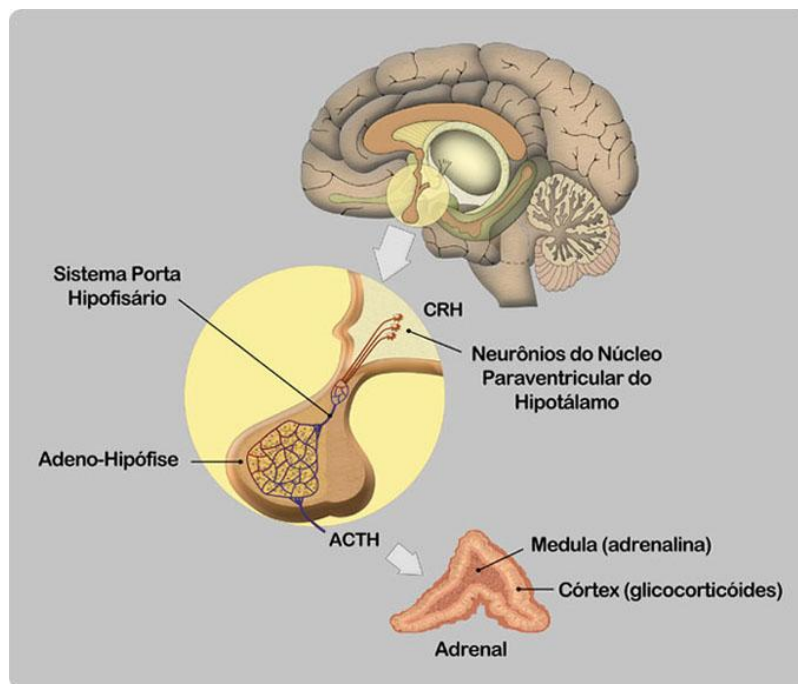


Figura 1. Eixo Hipotálamo-hipófise-adrenal. Fonte: <https://corticoides.files.wordpress.com/2012/06/3.jpg>

O cortisol atua em receptores de glicocorticóides presentes em tecidos-alvo de forma a promover a transcrição dos genes relacionados à mobilização de energia, à imunossupressão e ao comportamento. Além das alterações fisiológicas, a resposta ao estresse promove

alterações comportamentais em diversas espécies (SACKERMAN et al., 2010; GEBAUER et al., 2011; SNYDER et al., 2011; PARKER et al., 2012; PAGNUSSAT et al., 2013; LEE et al., 2014; MASANA et al., 2014; ZHANG et al., 2014). A exposição ao estresse promove consequências negativas no comportamento social de camundongos (MASANA et al., 2014); prejudica a função cognitiva e aumenta a ansiedade em *zebrafish* (PIATO et al., 2011).

1.2. Fármacos no ambiente aquático

A presença de fármacos e de seus metabólitos nos ecossistemas aquáticos vem sendo estudada há décadas (HIGNITE; AZARNOFF, 1977; HEBERER, 2002; KOLPIN et al., 2002; CALAMARI, et al., 2003; BROOKS et al., 2005; JONES et al., 2005; CALISTO; ESTEVES, 2009; ALONSO et al., 2010; CALISTO et al., 2011). Esses contaminantes provocam impactos negativos tanto na população humana usuária desses recursos como nos organismos aquáticos em contato com esses ecossistemas. Tendo em vista tamanha importância, seus possíveis efeitos sobre os organismos têm-se tornado prioridade para as agências reguladoras envolvidas na avaliação de risco humano e ambiental (DAUGHTON; TERNES, 1999; HEBERER, 2002; CALAMARI et al., 2003; BROOKS et al., 2005; JONES et al., 2005; CALISTO; ESTEVES, 2009; ALONSO et al., 2010; CALISTO et al., 2011; BRODIN et al., 2013).

Nos efluentes, pode ser encontrada uma ampla variedade de fármacos como, por exemplo, antibióticos, psicotrópicos e hormônios esteroides (KOLPIN et al., 2002; CALAMARI et al., 2003; BROOKS et al., 2005, CALISTO; ESTEVES, 2009, CALISTO et al., 2011).

Os benzodiazepínicos e os ISRSs são amplamente prescritos e o consumo aumenta anualmente (ANVISA, 2009). Os benzodiazepínicos são os ansiolíticos mais utilizados no mundo (CALISTO et al., 2009). A movimentação da indústria farmacêutica em 2012 foi de 20 bilhões de dólares para os antidepressivos e de 11 bilhões de dólares para os ansiolíticos (SCIENCE TRANSLACIONAL MEDICINE, 2012). Consequentemente, a contaminação dos efluentes por tais psicofármacos desperta preocupação devido ao potencial ecotoxicológico,

pois apresentam alta resistência à fotodegradação e persistência no ambiente por longos períodos (HUMMEL et al., 2006; CALISTO et al., 2011; KOSJEK et al., 2012).

Apesar de as concentrações encontradas nos ambientes aquáticos serem inferiores às concentrações letais para a grande maioria das espécies presentes nesses ecossistemas, há estudos que demonstram que as concentrações em órgãos como cérebro, músculos e fígado dos organismos em contato com esses fármacos é superior às concentrações da água (BRODIN et al., 2013; BROOKS et al., 2005; SACKERMAN et al., 2010). Brodin et al. (2013) observou que a concentração de oxazepam no tecido muscular de perca europeia (*Perca fluviatilis*) do Rio Fyris foi seis vezes maior que a quantidade na água, indicando bioacumulação desse fármaco no peixe.

Os benzodiazepínicos e os ISRSs podem desencadear um conjunto de alterações morfológicas, fisiológicas, neuroendócrinas, reprodutivas, motoras e comportamentais (AIRHART et al., 2007; SACKERMAN et al., 2010; GEBAUER et al., 2011; PRIETO et al., 2012; PARK et al., 2012; PRIETO et al., 2012; BRODIN et al., 2013). Prieto et al. (2012) verificaram que a fluoxetina apresenta efeito de alteração morfológica em neurônios dopaminérgicos em *zebrafish*, além de alterar o comportamento e os níveis de serotonina. Brodin et al. (2013) verificaram que percas europeias (*Perca fluviatilis*) expostas ao benzodiazepínico apresentam alteração de comportamento e da taxa de alimentação. Entretanto, pouco se sabe a respeito dos efeitos desses fármacos sobre a resposta ao estresse em *zebrafish*.

1.3. Diazepam

Os benzodiazepínicos pertencem ao grupo de substâncias que são normalmente usados como sedativos, amnésicos, ansiolíticos, relaxantes musculares e anticonvulsivantes (GARRET et al., 1994; RAMOS, 2004; GAILLARD et al., 2006; RANG; DALE, 2008; ROCHE, 2010). Em meados de 1950, registra-se o surgimento de uma nova classe de fármacos, com ação tranquilizante, as 1,4-benzodiazepinas, possuidoras de ação semelhante sobre o SNC (STERNBACH, 1983). O próximo avanço foi dado por Leo Sternbach que, em 1958, apresentou uma patente para o clordiazepóxido (Librium®), medicamento que, com os

seus congêneres, as benzodiazepinas, iriam tornar-se o maior sucesso da história da indústria farmacêutica. A comercialização começou em 1960 (CHASTE, 1995). Em 1963, foi lançado o diazepam (Valium®), que recebeu autorização de introdução no mercado somente no dia 1 de abril de 1964 (ROCHE, 2010).

No Brasil, o consumo anual de benzodiazepínicos é, em média, de 2,15% (uma vez ao ano) e de 1,22% (últimos 30 dias). Entre os benzodiazepínicos, o diazepam é o mais utilizado (MINISTÉRIO DA JUSTIÇA DO BRASIL).

O diazepam, representado na figura 2 ($C_{16}H_{13}ClN_2O$ ou 7-cloro-1,3-dihidro-1-metil-5-fenil-2H-1,4-benzodiazepina-2-ona), apresenta um pKa de 3,4 (KAPLAN et al., 1973; KOROLKOVAS; BURCKHALTER, 1988).

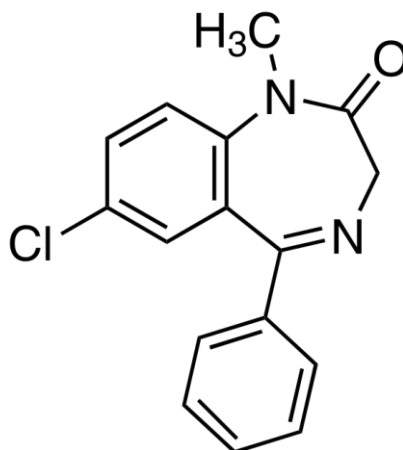


Figura 2. Fórmula estrutural do diazepam. Fonte: <http://en.wikipedia.org/wiki/Diazepam>

O diazepam é metabolizado pelo citocromo P450, através das enzimas 3A4, 2C8 e 2C9, que promovem N-demetilação, produzindo, assim, um metabólito ativo, o nordiazepam. Esse, por sua vez, é hidroxilado, formando oxazepam, que sofre imediata glicuronidação através de um processo de conjugação. Há, ainda, a possibilidade de hidroxilação do diazepam pelo Citocromo P-450, 3A4, formando o temazepam, que possui atividade metabólica de menor intensidade. Esses metabólitos exibem limitada atividade farmacológica, uma vez que são rapidamente conjugados e excretados (MORGAN et al., 2002).

Os benzodiazepínicos atuam seletivamente como agonistas nos receptores do neurotransmissor GABA (ácido gama-aminobutírico), mais especificamente na subunidade GABA-A, que medeia a transmissão sináptica inibitória em todo o sistema nervoso central

(SNC) (GAILLARD et al., 2006; SIGEL; STEINMANN, 2012). Os benzodiazepínicos intensificam a ação do GABA ao facilitar a abertura dos canais de cloreto, promovendo a hiperpolarização das células onde atuam (GILMAN; GOODMAN, 2001; KATZUNG et al., 2009).

Esses fármacos, do qual faz parte o diazepam, ligam-se especificamente a um local desse receptor, distinto de onde se liga o GABA, e atuam alostericamente, aumentando a afinidade do GABA pelo receptor, tal como se mostra na figura 3 (RANG; DALE, 2008; SIGEL; STEINMANN, 2012).

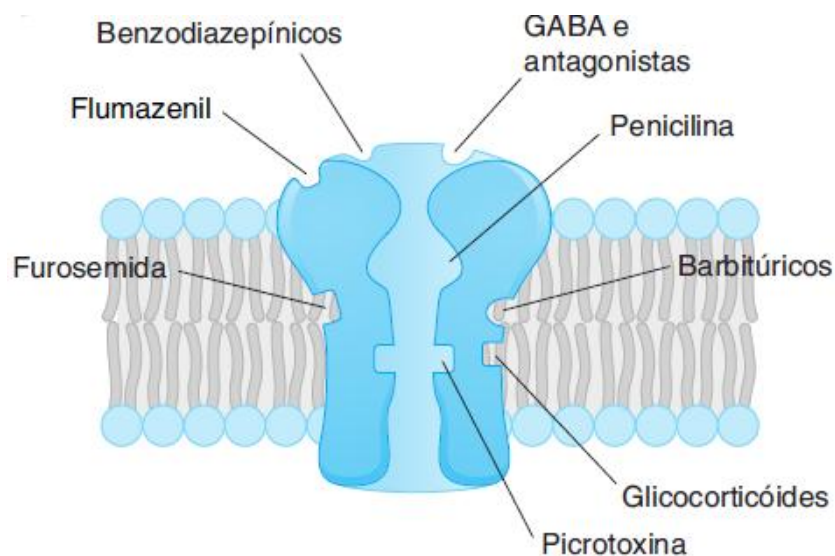


Figura 3. Representação esquemática do mecanismo de ação do diazepam. Fonte: <http://www.ufpi.br/subsiteFiles/lapnex/arquivos/files/Farmacologia%20da%20neurotransmissao%20gabaergica%20e%20glutamatergica.pdf>

Em cérebros de embriões de *zebrafish* padrão espacial e temporal da expressão de GABA foi determinado por meio de técnicas de imunohistoquímica. O GABA é distribuído em regiões, como núcleo telencefálico, o diencéfalo ventral e o mesencéfalo do sistema nervoso embrionário do *zebrafish*. Além disso, o número de neurônios marcados aumenta durante o desenvolvimento (DOLDAN et al., 1999). Da mesma forma, o padrão de expressão GABA foi investigado na retina e no nervo óptico do *zebrafish* (*Danio rerio*) durante o desenvolvimento embrionário, sendo GABA altamente conservado neurotransmissor da retina (CONNAUGHTON et al., 1999; JULIE et al., 1994).

1.4. Fluoxetina

A fluoxetina foi descrita pela primeira vez na literatura científica como *Lilly 110140* (na forma cloridrato), um inibidor seletivo da recaptção de serotonina. No início da década de 1970, começaram a surgir evidências do papel da serotonina (5-hidroxitriptamina, ou 5-HT) na depressão. Estudos revelaram o hidrocloreto de fluoxetina, um inibidor seletivo da recaptção da serotonina (Prozac®; Eli Lilly) (WONG et al. 1974, 1995, 2005).

Os ISRSs são consumidos em larga escala. De acordo com dados da ANVISA, de 2009 a 2011, no Distrito Federal, o consumo de fluoxetina, substância indicada para episódios de depressão maior, transtorno obsessivo compulsivo, bulimia nervosa e ansiedade, teve um aumento de 83% (ZIGMOND et al., 1999; FUCHS; WANNMACHER, 2010).

A fluoxetina, cujo nome IUPAC é N-metil-3-fenil-3-[4-(trifluorometil)fenoxi]propano-1-amina possui fórmula molecular $C_{17}H_{18}F_3NO$ e peso molecular de 309.32613g/mol está representado na figura 4.

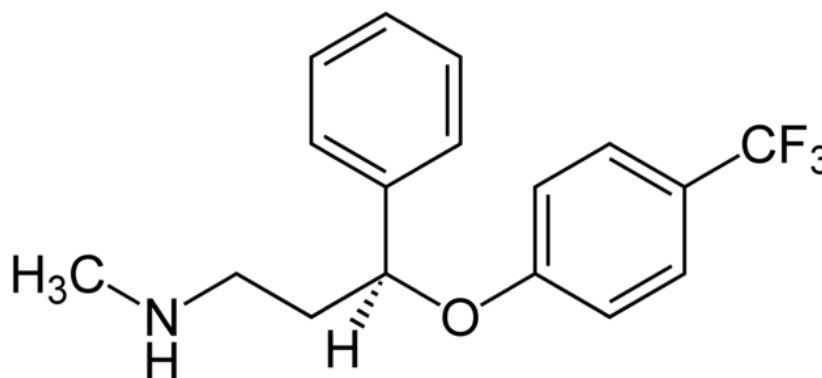


Figura 4. Fórmula estrutural da fluoxetina. Fonte: <http://pt.wikipedia.org/wiki/Fluoxetina>

A fluoxetina é extensivamente metabolizada no fígado à norfluoxetina. O metabolismo é mediado principalmente pelas isoenzimas do citocromo P450: CYP2D6 e CYP2C9, com uma moderada contribuição da isoenzima CYP2C19 e com uma pequena contribuição da CYP3A4. Essa metabolização leva à formação dos enantiômeros R- e S- da norfluoxetina,

com o S-enantiómero, considerado tão ativo quanto o fármaco original (HIEMKE; HARTTER, 2000; BRUNTON; LAZO; PARKER, 2006).

Os ISRSs atuam inibindo o transportador de serotonina (SERT) (Figura 5) responsável pela recaptação de serotonina pelo neurônio pré-sináptico. Isso aumenta a quantidade de serotonina disponível na sinapse, levando a um aumento global da neurotransmissão serotoninérgica no SNC (RANG; DALE, 2008).

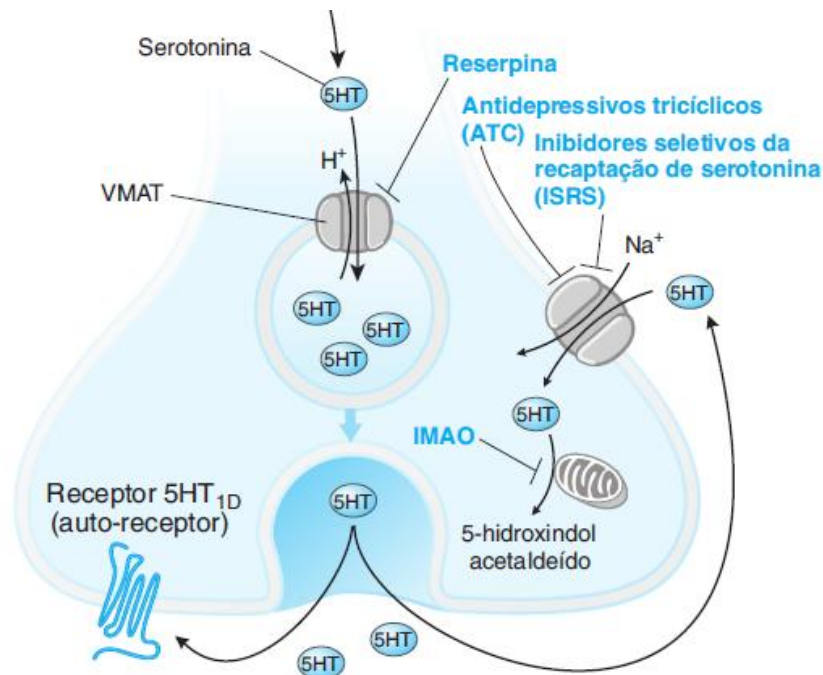


Figura 5. Representação esquemática do mecanismo de ação da fluoxetina. Fonte: <http://www.ufpi.br/subsiteFiles/lapnex/arquivos/files/Farmacologia%20da%20neurotransmissao%20serotoninergica%20e%20adrenergica%20central.pdf>

1.5. Zebrafish

O *zebrafish* (*Danio rerio*), conhecido como peixe-zebra ou paulistinha (Figura 6), é um pequeno teleosteo tropical de água doce, pertencente à família Cyprinidae, de origem asiática (ARUNACHALAM et al., 2013; ENGESZER et al., 2007). Desde o início do século XX, o *zebrafish* vem sendo utilizado como modelo animal para pesquisas em diversas áreas do conhecimento, dentre elas fisiologia, toxicologia, genética, cardiovascular, embriologia, metabolismo, oncologia, o que se justifica em razão da homologia genética com seres

humanos (HOWE et al., 2013). O modelo apresenta a complexidade de um animal vertebrado e a simplicidade de reprodução em larga.



Figura 6. *Zebrafish*. Fonte: <http://www.aquarioepeixes.com.br/peixesornamentais/wp-content/uploads/2010/10/zebrafish.jpg>

O *zebrafish* tem sido utilizado também como modelo nas neurociências, em estudos sobre doenças neurodegenerativas, comportamento e testes de candidatos a fármacos (BARBAZUK et al., 2000; SHIN; FISHMAN, 2002; MUELLER et al., 2004; GOLDSMITH, 2004; ZON; PETERSON, 2005; EGAN et al., 2009). Com sua elevada homologia, a espécie apresenta todos os neurotransmissores clássicos dos vertebrados (MUELLER et al., 2004) e o sistema neuroendócrino exibe resposta robusta ao estresse (ALSOP; VIJAYAN, 2009).

Dessa forma, o *zebrafish* pode ser considerado um excelente modelo para estudos de estresse, pois o eixo hipotálamo-hipófise-interrenal está bem caracterizado (ALSOP; VIJAYAN, 2009; FUZZEN et al., 2010; BLASER; GERLAI, 2006; EGAN et al., 2009; GRIFFITHS et al., 2012).

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

Verificar se o diazepam e a fluoxetina são capazes de interferir na resposta ao estresse agudo em *zebrafish*.

2.2. Objetivos específicos

Verificar se o diazepam, em diferentes concentrações, interfere nas concentrações corporais de cortisol em resposta a estresse agudo.

Verificar se a fluoxetina, em diferentes concentrações, interfere nas concentrações de cortisol em resposta a estresse agudo.

3. ARTIGO PUBLICADO

Diazepam and Fluoxetine Decrease the Stress Response in Zebrafish

Esse capítulo foi escrito de acordo com as normas da Revista *PLoS ONE*, onde foi publicado.

Abreu MS, Koakoski G, Ferreira D, Oliveira TA, Rosa JGS, Gusso D, Giacomini ACV, Piato AL, Barcellos LJG (2014) Diazepam and Fluoxetine Decrease the Stress Response in Zebrafish. *PLoS ONE* 9(7): e103232. doi:10.1371/journal.pone.0103232.



Diazepam and Fluoxetine Decrease the Stress Response in Zebrafish

Murilo Sander de Abreu¹, Gessi Koakoski¹, Daiane Ferreira¹, Thiago Acosta Oliveira¹, João Gabriel Santos da Rosa¹, Darlan Gusso², Ana Cristina Varrone Giacomini^{1,2}, Angelo Luis Piato³, Leonardo José Gil Barcellos^{1,4*}

1 Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), Santa Maria, RS, Brasil, **2** Universidade de Passo Fundo (UPF), Passo Fundo, RS, Brasil, **3** Departamento de Farmacologia, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil, **4** Programa de Pós-Graduação em Bioexperimentação, Universidade de Passo Fundo (UPF), Passo Fundo, RS, Brasil

Abstract

The presence of pharmaceutical products in the aquatic environment has been reported in several studies. However, the impact of these drugs on living organisms is still uncharacterized. Here, we investigated the effects of acute exposure to either diazepam or fluoxetine on the stress response in *Danio rerio*. We showed that diazepam and fluoxetine inhibited the stress axis in zebrafish. Intermediate concentrations of diazepam suppressed the stress response as measured by cortisol levels, whereas fluoxetine inhibited cortisol increase at concentrations similar to those found in the environment. These data suggest that the presence of psychoactive drugs in aquatic ecosystems could cause neuroendocrine dysfunction in fish.

Citation: Abreu MSd, Koakoski G, Ferreira D, Oliveira TA, Rosa JGSd, et al. (2014) Diazepam and Fluoxetine Decrease the Stress Response in Zebrafish. PLoS ONE 9(7): e103232. doi:10.1371/journal.pone.0103232

Editor: John F. Rawls, University of North Carolina at Chapel Hill, United States of America

Received: January 3, 2014; **Accepted:** June 30, 2014; **Published:** July 23, 2014

Copyright: © 2014 Abreu et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Funding: LJGB and ALP have a CNPq research fellowship (302073/2011-6 and 472715/2012-7, respectively). The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Competing Interests: The authors have declared that no competing interests exist.

* Email: lbarcellos@upf.br

Introduction

The presence of pharmaceutical drugs in the aquatic environment is a significant concern to regulatory agencies because these drugs could affect both the human population and aquatic ecosystems. Benzodiazepines and selective serotonin reuptake inhibitors (SSRIs) are present in wastewater effluent and are neither cleared nor photobleached after treatment of the effluents [1–3]. The environmental concentrations of these drugs range from 0.04 to 0.88 µg/L for diazepam [4–6] and 0.012 to 1 µg/L for fluoxetine [4,7–10]. Benzodiazepines and SSRIs exert anxiolytic effects and can interfere with neuroendocrine stress axis activity [11–14]. Although these drugs have been detected in an extensive variety of environments, there is little information regarding the effects of these compounds in living organisms [15].

The stress response system helps the individuals to deal with adverse conditions [16]. For instance, increases in cortisol levels during stress can lead to hyperglycemia, which could provide energy for defensive actions [17–19], and also participate of the osmoregulation processes in fish [20]. Thus, the harmful effects of pollutants on the fish stress response can adversely affect their survival [21–22], since both drugs can interfere with stress response in humans [23–25]. In this context, we hypothesized that the concentrations of diazepam and fluoxetine in the environment can interfere with the stress response in fish. We tested this possibility using zebrafish (*Danio rerio*) as the experimental model. This fish species has many advantages as a model organism because of its easy handling and maintenance as well as its genetic homology with humans [26–28]. Recent studies

have reinforced the use of the zebrafish model for stress research [28–35].

Materials and Methods

Ethical note

This study was approved by the Ethics Commission for Animal Use (CEUA) at Universidade de Passo Fundo, UPF, Passo Fundo, RS, Brazil (Protocol #7/2013-CEUA) and met the guidelines of Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA).

Animals

A stock population of 1188 mixed-sex, adult wild-type zebrafish (*Danio rerio*) of the short-fin (SF) strain were held in 2 tanks with constant aeration and equipped with biological filtering under a natural photoperiod (approximately 14 h light: 10 h dark). Water was maintained at 26±2°C and pH 7.0±0.25, with dissolved oxygen levels at 6.5±0.4 mg/L, total ammonia levels at 0.01 mg/L, total hardness at 6 mg/L, and alkalinity at 22 mg/L CaCO₃.

Experimental design

For each test substance (fluoxetine or diazepam), fish from the stock population were distributed in 32 glass aquaria (30×30×30 cm, six fish per tank), acclimatized for seven days and fed with commercial food flakes (TetraMin, Tetra, Melle, Germany). Twenty-four hours later, fish were exposed to the test substance for 15 minutes. Animals were then submitted to a stress stimulus, consisting of chasing fish with a net for two minutes was

applied [30], and sampled after 0, 15, 60 and 240 minutes for whole body cortisol analysis (Fig. 1). Similarly, groups were submitted to test substance without stress test (sampled at the same time points), aiming to evaluate an eventual stress effect of the substance per se. A basal situation, i.e. without drug exposure and stress test was performed as control.

This setup was replicated 3 times. For whole-body cortisol determination, pools of 2 fish (to obtain approximately 0.5 g of tissue) were examined, with a total of 6 pools of 2 fish for each treatment and time point.

Diazepam (União Química, 5 mg/ml) was used at the following three concentrations: 0.88 µg/L, which is the highest detected environmental concentration [5]; 16 µg/L, which is 10% of the concentration that promotes behavioral effects; and 160 µg/L, which is the concentration with reported effects in zebrafish behavior [36].

Fluoxetine (Daforin EMS, oral solution, 20 mg/mL) was tested at concentrations of 1 µg/L [7], 25 µg/L and 50 µg/L (25 and 50 times the environmental concentration, respectively).

Cortisol extraction and analysis

Fish were captured and immediately frozen in liquid nitrogen for 10–30 s, followed by storage at -20°C until cortisol extraction. Whole-body cortisol was extracted using the method described by Oliveira et al. [30]. The accuracy was tested by calculating the recoveries from samples spiked with known amounts of cortisol (50, 25 and 12.5 ng/mL). The mean detection of spiked samples was 94.3%. All of the cortisol values were adjusted for recovery with the following equation: cortisol value = measured value \times 1.0604.

Tissue extracts were resuspended in 1 mL PBS, and whole-body cortisol levels were measured in duplicate for each extraction using a commercially available enzyme-linked immunosorbent assay kit (EIAgen CORTISOL test, BioChem ImmunoSystems). This kit was fully validated for zebrafish tissue extracts using the methodology described by Sink et al. [37]. Precision was tested by performing 12 repeated assays on seven randomly chosen samples on the same 96-well plate and calculating the intra-assay coefficient of variation (CV). Reproducibility was tested by assaying the same samples on different plates and calculating the inter-assay CV. To test for linearity and parallelism, the tissue extracts underwent serial dilutions in the buffer provided with the kit. A strong positive correlation between the curves was observed ($R^2 = 0.9108$), and it was determined that the samples had low inter- and intra-assay CV values (7–10% and 5–9%, respectively).

Statistics

Homogeneity of variance was determined using Hartley's test, and normality was determined using the Kolmogorov-Smirnov test. Whole-body cortisol concentrations were compared using a two-way ANOVA, with drug concentration and time after the stressor as the independent variables, followed by a Bonferroni post-test. Differences with p values <0.05 were considered to be statistically significant.

Results

There were a significant interaction between drug concentration and time after stress induction ($P < 0.0001$; $F_{3,21} = 9.086$). Fish exposed to 16 µg/L of diazepam and submitted to the acute stress test (Fig. 2) had a reduced cortisol response to an acute stressor at 15 and 240 minutes after stress. Any effect on cortisol profiles were detected on the time course curve, in fish exposed only to diazepam without acute stress test.

For fluoxetine exposure (Fig. 3), we found a significant interaction between drug concentration and time after stress induction ($P < 0.0001$; $F_{3,21} = 7.492$). Exposure only to the three fluoxetine concentrations did not cause any effect on whole-body cortisol while the combination of drug exposure and stress test resulted in an impaired cortisol response to an acute stressor at 15 minutes compared to the stressed only fish, with the highest concentration (50 µg/L) causing the strongest inhibitory effect. However, these fish (Flu 50 µg/L+stress group) had lower pre-stress concentrations compared to groups Flu 1 µg/L+stress and 25 µg/L+stress.

Discussion

We show that acute exposure to diazepam and fluoxetine diluted in water impair the stress axis function, as drug-exposed fish had lower cortisol levels than control fish when exposed to an acute stress test. Both benzodiazepines and SSRIs possess anxiolytic activity [2,14,25,36], and it is reasonable to suggest that these deleterious effects on the stress axis were related to a central action of these drugs.

The mechanism by which these drugs reduce the stress response may be directly related to the hypothalamus and/or pituitary gland, likely without the involvement of interrenal tissue. The serotonergic system of the brain plays a key role in autonomic, neuroendocrine and behavioral integration of the stress response in fish as well as mammals [38]. Benzodiazepines have been shown to influence the activity of the hypothalamus-pituitary-adrenal axis

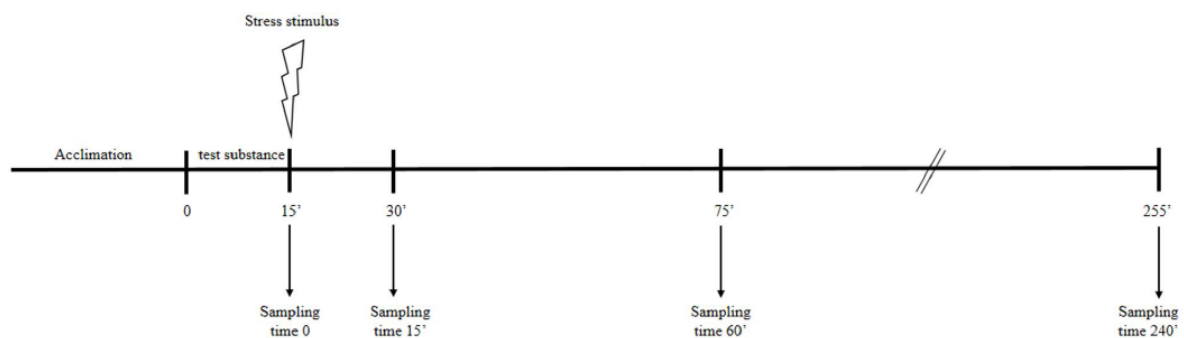


Figure 1. Schematic view of the experimental design of the study. The test substance refers to the control (no substance), diazepam (0.88, 16, or 160 µg/L) or fluoxetine (1, 25 or 50 µg/L). doi:10.1371/journal.pone.0103232.g001

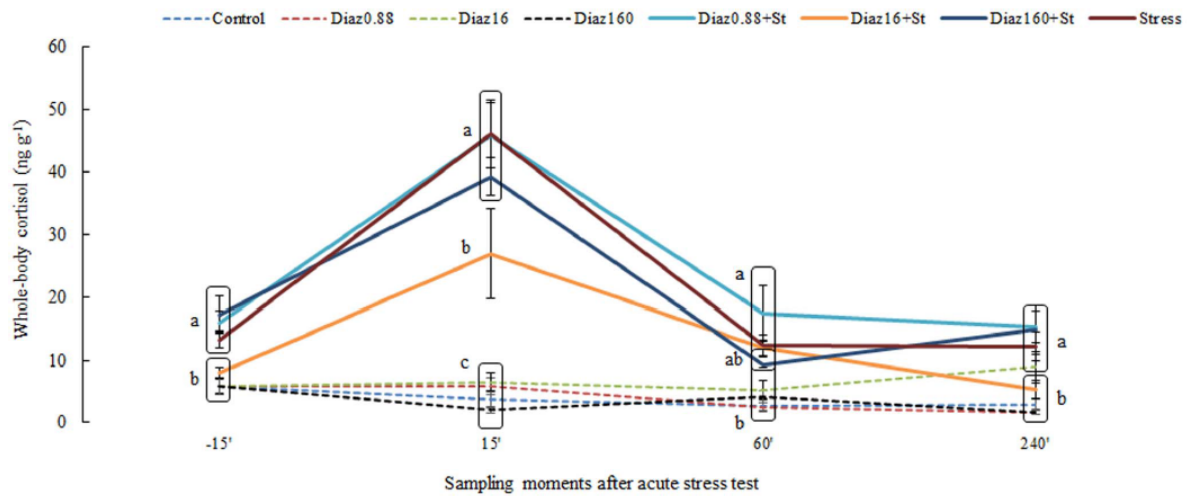


Figure 2. Whole-body cortisol concentrations in zebrafish to diazepam followed by an acute stress test and respective controls. The values are expressed as the mean \pm standard error of mean. Different small letters indicate significant group differences in each sampling time. doi:10.1371/journal.pone.0103232.g002

in humans by reducing basal adrenocorticotrophic hormone (ACTH) and cortisol release after acute administration [39–41].

Our results showed that only the intermediate concentration of diazepam (16 $\mu\text{g/L}$) altered cortisol levels after stress induction. Other concentrations did not affect the cortisol stress response, demonstrating that the concentration of diazepam in the environment [5] was insufficient to impair the stress axis. Surprisingly, the highest concentration used (160 $\mu\text{g/L}$) did not alter cortisol response, suggesting diazepam may have a U-shaped dose-response curve similar to the effects of alcohol on fish behavior [30,39] and stress response [42]. Similar curve pattern was found in cortisol effects on human memory [43].

However, acute exposure to all of the tested concentrations of fluoxetine impaired the cortisol response to acute stress, including the concentration identified in the environment (1 $\mu\text{g/L}$).

Although the anxiolytic effect exerted by diazepam and fluoxetine is well understood, the exact mechanisms by which these drugs block the biological response of cortisol in response to stress are still unclear. A fish with an impaired stress response loses its ability to maintain homeostasis against stressors by reducing the ability to promote ionic, metabolic and behavioral adjustments necessary for the stress response [22,31–33]. A fish unable to display a normal cortisol response shows a reduced ability to respond to ongoing challenges posed by aquaculture [40]. Additionally, increased activity and boldness as well as reduced sociability in zebrafish that came in contact with these substances may also increase the risk of predation [41,44], making the consequences of environmental contamination with these drugs difficult to predict.

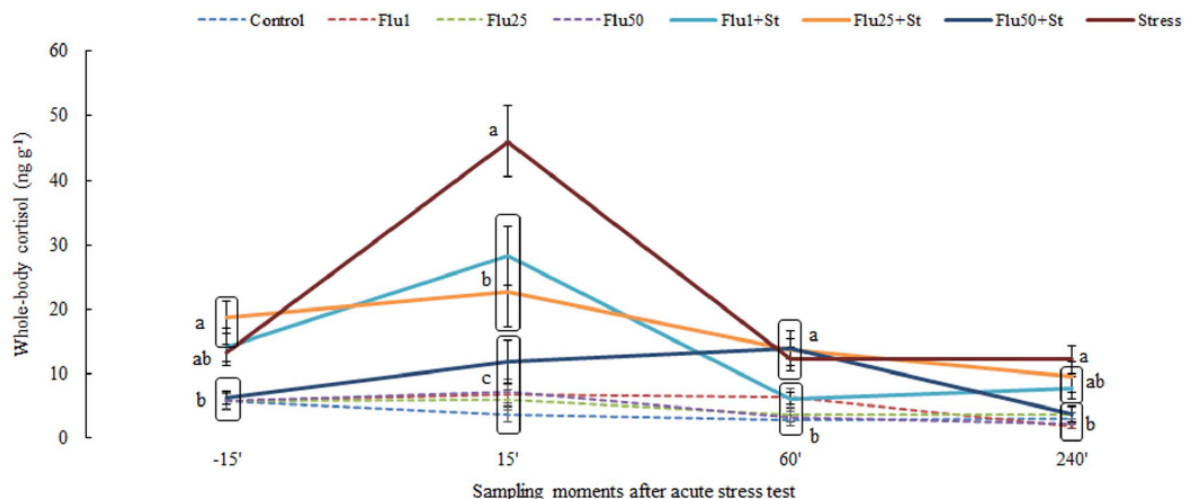


Figure 3. Whole-body cortisol concentrations in zebrafish to fluoxetine followed by an acute stress test and respective controls. The values are expressed as the mean \pm standard error of mean. Different small letters indicate significant group differences in each sampling time. doi:10.1371/journal.pone.0103232.g003

The effects of diazepam and fluoxetine on cortisol levels have been previously reported in other species. For example, diazepam has been shown to decrease plasma cortisol levels, especially in humans experiencing stress [45]. Another study in elephant seals (*Mirounga angustirostris*) found that when animals were sedated with a combination of drugs ([tiletamine hydrochloride 50 mg/mL, zolazepam hydrochloride 50 mg/mL], ketamine, and diazepam) in the field, they did not exhibit a cortisol stress response. The use of this drug combination appears to decrease the responsiveness of the animals to handling and subsequent stress [46]. A similar result was observed in a study with Weddell seals (*Leptonychotes weddellii*), as treatment with diazepam improved the cortisol response of handled animals [47]. With regard to fluoxetine, chronic exposure to this drug decreased the cortisol levels in zebrafish in the novel tank test [28,29]. Therefore, despite the differences in protocols and models, we have shown for the first time that animals exposed to either diazepam or fluoxetine diluted

in water have a blunted cortisol response when exposed to a highly stressful situation.

Our results highlight that the presence of anxiolytic drugs in aquatic ecosystems may promote ecologically important but undervalued effects. It is imperative that new testing protocols be developed to examine the environmental impact of waste pharmaceuticals on fish and other aquatic life. Together with previous research, our data indicate that zebrafish are sufficient model organisms for studying pharmaceutical pollutants and their impact on the environment.

Author Contributions

Conceived and designed the experiments: LJGB MSA ACVG. Performed the experiments: MSA ACVG GK DF DG TAO JGSR. Analyzed the data: MSA ACVG LJGB. Contributed reagents/materials/analysis tools: ALP. Wrote the paper: LJGB MSA ACVG ALP.

References

- Calisto V, Domingues MRM, Esteves VI (2011) Photodegradation of psychiatric pharmaceuticals in aquatic environments e Kinetics and photodegradation products. *Water Res* 45: 6097–6106.
- Brodin T, Fick J, Jonsson M, Klaminder J (2013) Dilute Concentrations of a Psychiatric Drug Alter Behavior of Fish from Natural Populations. *Science* 339, 814.
- Gunnarson I, Jauhainen A, Kristiansson E, Nerman O, Larsson DG (2008) Evolutionary conservation of human drug targets in organisms used for environmental risk assessments. *Environ Sci Technol* 42: 5807–5813.
- Calisto V, Esteves VI (2009) Psychiatric pharmaceuticals in the environment. *Chemosphere* 77: 1257–1274.
- Temes T, Bonerz M, Schmidt T (2001) Determination of neutral pharmaceuticals in wastewater and rivers by liquid chromatography-electrospray tandem mass spectrometry. *J Chromatogr A* 938: 175–185.
- Calamari D, Zuccato E, Castiglioni S, Bagnati R, Fanelli R (2003) Strategic Survey of Therapeutic Drugs in the Rivers Po and Lambro in Northern Italy. *Environ Sci Technol* 37: 1241–1248.
- Kolpin DW, Furlong ET, Meyer MT, Thurman EM, Zaugg SD et al. (2002) Pharmaceuticals, hormones, and other organic wastewater contaminants in US streams, 1999–2000: A national reconnaissance. *Environ Sci Technol* 36: 1202–1211.
- Metcalfe CD, Miao XS, Koenig BG, Struger J (2003) Distribution Of Acidic And Neutral Drugs In Surface Waters Near Sewage Treatment Plants In The Lower Great Lakes, Canada. *Environ Toxicol Chem* 22: 2881–2889.
- Schultz MM, Furlong ET (2008) Trace Analysis of Antidepressant Pharmaceuticals and Their Select Degradates in Aquatic Matrixes by LC/ESI/MS/MS. *Anal Chem* 80: 1756–1762.
- Togunde OP, Oakes KD, Servos MR, Pawliszyn J (2012) Determination of Pharmaceutical Residues in Fish Bile by Solid-Phase Microextraction Couple with Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry (LC/MS/MS). *Environ Sci Technol* 46: 5302–5309.
- Oggier DM, Weisbrod CI, Stoller AM, Zenker AK, Fent K (2010) Effects of diazepam on gene expression and link to physiological effects in different life stages in zebrafish *Danio rerio*. *Environ Sci Technol* 44: 7685–7691.
- Park JW, Heah TP, Gouffon JS, Henry TB, Saylor GS (2012) Global gene expression in larval zebrafish (*Danio rerio*) exposed to selective serotonin reuptake inhibitors (fluoxetine and sertraline) reveals unique expression profiles and potential biomarkers of exposure. *Environ Pollut* 167: 163–170.
- Barbosa Junior A, Alves FL, Pereira ASF, Ide LM, Hoffmann A (2012) Behavioral characterization of the alarm reaction and anxiolytic-like effect of acute treatment with fluoxetine in piauçu fish. *Phys Behav* 105: 784–790.
- Bencan Z, Sledge D, Levin ED (2009) Buspirone, chlordiazepoxide and diazepam effects in a zebrafish model of anxiety. *Pharmacol Biochem Behav* 94: 75–80.
- Santos LH, Araújo AN, Fachini A, Pena A, Delerue-Matos C et al (2010) Ecotoxicological aspects related to the presence of pharmaceuticals in the aquatic environment. *J Hazard Mater* 175: 45–95.
- Barton BA (2002) Stress in fishes: a diversity of responses with particular reference to changes in circulating corticosteroids. *Integ Comp Biol* 42: 517–525.
- Eames SC, Philipson LH, Prince VE, Kinkel MD (2010) Blood sugar measurement in zebrafish reveals dynamics of glucose homeostasis. *Zebrafish* 7: 205–213.
- van Vuren JHJ, Hattingh J (1978) A seasonal study of the haematology of wild freshwater fish. *J Fish Biol* 13: 305–313.
- Groff JM, Zinkl JG (1999) Hematology and clinical chemistry of cyprinid fish. Common carp and goldfish. *Vet Clin North Am Exot Anim Pract* 2: 741–776.
- Mancera MJ, Carrión RL, Martín DP, Rio DM (2002) Osmoregulatory action of PRL, GH and cortisol in the gulfhead seabream (*Sparus aurata* L.). *Gen Comp Endocrinol* 129: 95–103.
- Cericato L, Neto JGM, Fagundes M, Kreutz LC et al. (2008) Cortisol response to acute stress in jundiá *Rhandaia quelen* acutely exposed to sub-lethal concentrations of agricultural chemicals. *Comp Biochem Physiol C* 148: 281–286.
- Cericato L, Neto JGM, Kreutz LC, Quevedo RM et al. (2009) Responsiveness of the interrenal tissue of Jundiá (*Rhandaia quelen*) to an in vivo ACTH test following acute exposure to sublethal concentrations of agricultural chemicals. *Comp Biochem Physiol C* 149: 363–367.
- McIntyre IM, Norman TR, Burrows GD, Armstrong SM (1993) Alterations to plasma melatonin and cortisol after evening alprazolam administration in humans. *Chronobiol Int* 10: 205–213.
- Osman OT, Hsiao JK, Potter WZ (1993) Dose-dependent effects of intravenous alprazolam on neuroendocrine, biochemical, cardiovascular, and behavioral parameters in humans. *Psychopharmacology* 111: 295–300.
- Curtis GC, Abelson JL, Gold PW (1997) Adrenocorticotrophic hormone and cortisol responses to corticotropin-releasing hormone: changes in panic disorder and effects of alprazolam treatment. *Biol Psychiatry* 41: 76–85.
- Barbazuk WB, Korf I, Kadavi C, Heyen J, Tate S et al. (2000) The synthetic relationship of the zebrafish and human genomes. *Genome Res* 10: 1351–1358.
- Goldsmith P (2004) Zebrafish as a pharmacological tool: the how, why and when. *Curr Opin Pharmacol* 4: 504–512.
- Egan R, Bergner CL, Hart PC, Cachat JM, Canavello PR et al. (2009) Understanding behavioral and physiological phenotypes of stress and anxiety in zebrafish. *Behav Brain Res* 205: 38–44.
- Cachat J, Stewart A, Grossman L, Gaikwad S, Kadri F et al. (2010) Measuring behavioral and endocrine responses to novelty stress in adult zebrafish. *Nature Prot* 5(11): 1786–1799.
- Oliveira TA, Koakoski G, Kreutz LC, Ferreira D et al. (2013) Alcohol Impairs Predation Risk Response and Communication in Zebrafish. *PLOS ONE* 8(10): e75780. doi:10.1371/journal.pone.0075780.
- Barcellos IJG, Ritter F, Kreutz LC, Quevedo RM, Silva LB et al. (2007) Wholebody cortisol increases after direct and visual contact with the predator in zebrafish, *Danio rerio*. *Aquaculture* 272: 774–778.
- Barcellos IJG, Ritter F, Kreutz LC, Cericato L (2010) Can Zebrafish *Danio rerio* learn about predation risk? The effect of a previous experience on the cortisol response in subsequent encounters with a predator. *J Fish Biol* 76: 1032–1038.
- Barcellos IJG, Volpato GL, Barreto RE, Coldebella I, Ferreira D (2011) Chemical communication of handling stress in fish. *Phys Behav* 103: 372–375.
- Piato AL, Capiotti KM, Tamborski A, Oses JP, Barcellos IJG et al. (2011) Unpredictable chronic stress model in zebrafish (*Danio rerio*): Behavioral and physiological responses. *Prog Neuro-Psychopharm Biol Psychiatry* 35: 561–567.
- Dal Santo G, Conterato GMM, Barcellos IJG, Rosemberg DB, Piato AL (2013) Acute restraint stress induces an imbalance in the oxidative status of the zebrafish brain. *Neurosci Lett* 558: 103–108.
- Gebauer DL, Pagnussat N, Piato AL, Schaefer IC, Bonan CD et al. (2011) Effects of anxiolytics in zebrafish: Similarities and differences between benzodiazepines, buspirone and ethanol. *Pharmacol Biochem Behav* 99: 480–486.
- Sink TD, Lochmann RT, Fecteau KA (2007) 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* 75: 165–171.
- Winberg S, Nilsson A, Hylland P et al. (1997) Serotonin as a regulator of hypothalamic-pituitary-interrenal activity in teleost fish. *Neurosci Lett* 230: 113–116.

Anxiolitics Decrease Stress Response in Zebrafish

39. Gerlai R, Lahav M, Guo S, Rosenthal A (2000) Drinks like a fish: zebrafish (*Danio rerio*) as a behavior genetic model to study alcohol effects. *Pharmacol Biochem Behav* 67: 773–82.
40. Brodeur JC, Sherwood G, Rasmussen JB, Hontela A (1997) Impaired cortisol secretion in yellow perch (*Perca flavescens*) from lakes contaminated by heavy metals: in vivo and in vitro assessment. *Can J Aquat Sci* 54: 2752–2758.
41. Dugatkin LA (1992) Tendency to inspect predators predicts mortality risk in the guppy (*Poecilia reticulata*). *Behav Ecol* 3: 124–127.
42. Barreto RE, Volpato GL (2004) Caution for using ventilatory frequency as an indicator of stress in fish. *Behav Proces* 66: 43–51.
43. Schilling TM, Kölsch M, Larra MF, Zech CM, Blumenthal TD, et al. (2013) For whom the bell (curve) tolls: Cortisol rapidly affects memory retrieval by an inverted U-shaped dose-response relationship. *Psychoneuroendocrinol* 38: 1565–1572.
44. Krause J, Ruxton GD (2002) *Living in Groups*. Oxford University Press. London, 2002. 210p.
45. Pomara N, Willoughby LM, Sirdis JJ, Cooper TB, Greenblatt DJ (2005) Cortisol response to diazepam: its relationship to age, dose, duration of treatment, and presence of generalized anxiety disorder. *Psychopharmacology* 178: 1–8.
46. Champagne CD, Houser DS, Costa DP, Crocker DE (2012) The effects of handling and anesthetic agents on the stress response and carbohydrate metabolism in northern elephant seals. *PLoS One*. 2012;7(5): e38442.
47. Harcourt RG, Turner E, Hall A, Waas JR, Hindell M (2010) Effects of capture stress on free-ranging, reproductively active male Weddell seals. *J Comp Physiol A Neuroethol Sens Neural Behav Physiol* 196: 147–54.

4. DISCUSSÃO

Nós mostramos que a exposição aguda a diazepam e a fluoxetina diluídos em água prejudica a função do eixo de estresse, tendo em vista que os peixes expostos aos fármacos apresentaram níveis de cortisol mais baixos do que os peixes de controle quando expostos a um teste de estresse agudo. Benzodiazepínicos e ISRSs possuem atividade tipo-ansiolítica (CURTIS et al., 1997; BENCAN et al., 2009; GEBAUER et al., 2011; BRODIN et al., 2013). É possível sugerir que esses efeitos deletérios sobre o eixo de estresse estavam relacionados a uma ação central dos fármacos. O mecanismo pelo qual esses fármacos reduzem a resposta ao estresse pode estar diretamente relacionado com o hipotálamo e/ou com a hipófise, provavelmente sem o envolvimento do tecido interrenal. O sistema serotoninérgico do cérebro desempenha papel-chave nos sistemas autonômico, neuroendócrino e de integração comportamental da resposta ao estresse no peixe, da mesma forma que nos mamíferos (WINBERG et al., 1997). Estudos revelam que a exposição aguda aos benzodiazepínicos influencia a atividade do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal em seres humanos, reduzindo concentrações basais do hormônio adrenocorticotrófico (ACTH) e de cortisol (DUGATKIN, 1992; BRODEUR et al., 1997; GERLAI et al., 2000).

Nossos resultados demonstraram que apenas a concentração intermediária de diazepam (16 µg/L) alterou os níveis de cortisol após a indução do estresse. As demais concentrações de diazepam não afetaram os níveis de cortisol frente à resposta ao estresse. Isso demonstra que a concentração de diazepam no ambiente (TERNES et al., 2001) não foi suficiente para prejudicar o eixo de estresse. Surpreendentemente, a concentração máxima utilizada (160 µg/L) não alterou a resposta de cortisol, revelando uma curva de dose-resposta em “forma de U”, semelhante aos efeitos do álcool sobre o comportamento (GERLAI et al.,

2000; OLIVEIRA et al., 2013) e a resposta de estresse (BARRETO;VOLPATO, 2004) em peixes. Curva padrão similar foi encontrada em efeitos do cortisol sobre a memória humana (SCHILLING et al., 2013).

No entanto, a exposição aguda a todas as concentrações testadas de fluoxetina prejudicou a resposta de cortisol ao estresse agudo, incluindo a concentração identificada no ambiente (1 µg/L). Embora o efeito ansiolítico exercido pelo diazepam e pela fluoxetina seja bem entendido, os mecanismos exatos pelos quais esses fármacos bloqueiam a resposta biológica de cortisol frente ao estresse ainda não são claros. Um peixe com uma resposta de estresse prejudicada perde a sua capacidade de manter a homeostase contra estressores, reduzindo, com isso, a capacidade de promover ajustes iônicos, metabólicos e comportamentais necessários para a resposta ao estresse (BARCELLOS et al., 2007; 2010; 2011; CERICATO et al., 2009). Um peixe incapaz de exibir uma resposta normal de cortisol mostra redução na capacidade de responder aos desafios colocados pela aquicultura em curso (BRODEUR et al., 1997). Além disso, o aumento da atividade e da ousadia, bem como a redução da sociabilidade em *zebrafish*, induzidos pelo contato com essas substâncias, também podem aumentar o risco de predação (DUGATKIN, 1992; KRAUSE; RUXTON, 2002), fazendo com que as consequências da contaminação ambiental com esses fármacos sejam difíceis de prever.

Os efeitos do diazepam e da fluoxetina sobre os níveis de cortisol foram previamente relatados em outras espécies. Por exemplo, tem sido demonstrado que o diazepam diminui os níveis de cortisol plasmáticos, especialmente em seres humanos expostos ao estresse (POMARA et al., 2005). Outro estudo em elefantes-marinhos (*Mirounga angustirostris*) mostrou que animais sedados com uma combinação de drogas ([cloridrato de tiletamina 50 mg/ml, cloridrato de zolazepam 50 mg/mL], cetamina e diazepam) não exibiram resposta de cortisol ao estresse. A utilização dessa combinação de fármacos parece diminuir a

responsividade dos animais à manipulação e ao estresse subsequente (CHAMPAGNE et al., 2012). Resultado semelhante foi observado num estudo com focas de Weddell (*Leptonychotes weddellii*), em que o tratamento com diazepam melhorou a resposta do cortisol dos animais tratados (HARCOURT et al., 2010). No que diz respeito à fluoxetina, a exposição crônica a esse fármaco diminuiu os níveis de cortisol em *zebrafish* no teste de tanque novo (EGAN et al., 2009; CACHAT et al., 2010). Portanto, apesar das diferenças nos protocolos e nos modelos, mostramos pela primeira vez, que animais expostos ao diazepam ou à fluoxetina diluídos em água têm uma resposta de cortisol embotada, quando expostos a uma situação altamente fatigante.

5. CONCLUSÃO

O diazepam e a fluoxetina, quando presentes no ambiente aquático, provocam inibição da elevação de cortisol em resposta ao estresse. A presença desses psicofármacos em ecossistemas aquáticos pode promover efeitos ecologicamente importantes, mas subvalorizados. É de extrema importância que novos protocolos de ensaio sejam desenvolvidos para analisar o impacto ambiental de resíduos farmacêuticos em peixes e em outros organismos aquáticos. Corroborando resultados de pesquisas anteriores, nossos dados indicam que o *zebrafish* é um organismo modelo que permite estudar poluentes farmacológicos e seu impacto sobre o meio ambiente.

REFERÊNCIAS

AIRHART, M. J. et al. Movement disorders and neurochemical changes in zebrafish larvae after bath exposure to fluoxetine (PROZAC). **Neurotoxicol Teratol.**, v. 29, p. 652–664, 2007.

ALONSO, A. G. et al. Pollution by psychoactive pharmaceuticals in the Rivers of Madrid metropolitan area (Spain). **Environment International**, v. 36, p. 195-201, 2010.

ALSOP, D; VIJAYAN, M. The zebrafish stress axis: molecular fallout from the teleost specific genome duplication event. **Gen. Comp. Endocrinol**, v. 161, p. 62-66, 2009.

ANVISA. **Relatório sistema nacional de gerenciamento de produtos controlados 2009**. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/sngpc/relatorio_2009.pdf. >. Acesso em: 7 maio 2014.

ARUNACHALAM, M. et al. Natural History of Zebrafish (*Danio rerio*) in India. **Zebrafish**, v. 10, 2013.

BARBAZUK, W.B. et al. The synthetic relationship of the zebrafish and human genomes. **Genome Res**, v.10, p. 1351–1358, 2000.

BARCELLOS, L.J.G. et al. Whole-body cortisol increases after direct and visual contact with the predator in zebrafish, *Danio rerio*. **Aquaculture**, v. 272, p. 774-778, 2007.

BARCELLOS, L.J.G. et al. Can Zebrafish *Danio rerio* learn about predation risk? The effect of a previous experience on the cortisol response in subsequent encounters with a predator. **Journal of Fish Biology**, v. 76, p. 1032-1038, 2010.

BARCELLOS, L.J.G. et al. Chemical communication of handling stress in fish. **Physiology & Behavior**, v. 103, p. 372-375, 2011.

BARCELLOS, L.J.G. et al. Chemical communication of predation risk in zebrafish does not depend on cortisol increase. **Scientific Reports**, v. 4, p. 5076, 2014.

BARRETO, R.E.; VOLPATO, G.L. Caution for using ventilatory frequency as an indicator of stress in fish. **Behav Proces**, v. 66, p. 43-51, 2004.

BARTON, B.A. Stress in finfish: past, present and future a historical perspective. *In*: Iwama, G.K., Pickering, A.D., Sumpter, J.P., Schreck, C.B. (Eds.). **Fish stress and health in aquaculture**. Society for Experimental Biology Seminar Series 62. Cambridge University Press, New York, NY. p. 1-33. 1997.

BARTON, B.A.; MORGAN, J.D.; VIJAYAN, M.M. Physiological and condition-related indicators of environmental stress in fish. *In*: Adams (ed.). **Biological indicator of aquatic ecosystem stress**. American Fisheries Society, p. 289-320. 2002.

BEAR, M.F.; CONNORS, B.W.; PARADISO, M.A. **Neurociências – Desvendando o Sistema Nervoso**. 3ª edição. Porto Alegre: ARTMED, 2008.

BENCAN, Z., SLEDGE, D., LEVIN, E.D. Buspirone, chlordiazepoxide and diazepam effects in a zebrafish model of anxiety. **Pharmacol Biochem Behav**, v. 94, p. 75–80, 2009.

BLASER, R.E.; GERLAI, R. Behavioral phenotyping in zebrafish: Comparison of three behavioral quantification methods. **Behavior Research Methods**, v. 38, p. 456-469, 2006.

BRODEUR, J.C.; SHERWOOD, G.; RASMUSSEN, J.B. et al.. Impaired cortisol secretion in yellow perch (*Perca flavescens*) from lakes contaminated by heavy metals: in vivo and in vitro assessment. **Can J Aquat Sci**, v. 54, p. 2752–2758, 1997.

BRODIN, T. et al. Dilute Concentration of a Psychiatric Drug Alter Behavior of Fish from Natural Populations. **Science**, v. 339, p. 814-815, 2013.

BROOKS, B. W. et al. Determinations of Select Antidepressant in Fish From An Effluent-Dominated Stream. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 24, n. 2, p. 464-469, 2005.

BRUNTON, L.L.; LAZO, J.S.; PARKER, K.L.. **Goodman and Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics**. 11th Edition, Mc-Graw Hill, New York, 2006.

CACHAT, J. et al. Measuring behavioral and endocrine responses to novelty stress in adult zebrafish. **Nature Prot**, v.5(11), p.1786-1799, 2010.

CALAMARI, D. et al. Strategic Survey of therapeutic Drugs in the Rivers PO and Lambro in Northern Italy. **Environmental Science and Technology**, v. 37, n.7, p. 1241-1248, 2003.

CALISTO, V.; DOMINGUES, M.R.M; ESTEVES, V.I. Photodegradation of Psychiatric pharmaceuticals in aquatic environments – Kinetics and photodegradation products. **Water Research**, v. 45, p. 6097- 6106, 2011.

CALISTO, V.; ESTEVES, V.I. Psychiatric pharmaceuticals in the environment. **Chemosphere**, v. 77, p. 1257-1274, 2009.

CERICATO, L.; NETO, J.G.M.; FAGUNDES, M.; KREUTZ, L.C. et al. Cortisol response to acute stress in jundiá *Rhamdia quelen* acutely exposed to sub-lethal concentrations of agrichemicals. **Comp Biochem Physiol**, v.148, p. 281–286, 2008.

CERICATO, L.; NETO, J.G.M.; KREUTZ, L.C.; QUEVEDO, R.M.; et al Responsiveness of the interrenal tissue of Jundiá (*Rhamdia quelen*) to an in vivo ACTH test following acute exposure to sublethal concentrations of agrichemicals. **Comp Biochem Physiol**, v. 149, p. 363–367, 2009.

CHAMPAGNE, C.D.; HOUSER, D.S.; COSTA, D.P.; CROCKER, D.E.. The effects of handling and anesthetic agents on the stress response and carbohydrate metabolism in northern elephant seals. **PLoS One**, v.7, e38442, 2012.

CHASTE, F.. **História contemporânea dos medicamentos**. Paris, Edition La Decouvert. 1995.

CONNAUGHTON, V.P.; BEHAR, T.N.; LIU, W.L. et al.. Immunocytochemical localization of excitatory and inhibitory neurotransmitters in the zebrafish retina. **Vis. Neurosci**, v. 16, p. 483–490, 1999.

CRASKE, M.G. et al. What is an anxiety disorder? **Depress Anxiety**, v.26(12), p.1066-85, 2009.

CURTIS, G.C.; ABELSON, J.L.; GOLD, P.W.. Adrenocorticotrophic hormone and cortisol responses to corticotropin-releasing hormone: changes in panic disorder and effects of alprazolam treatment. **Biol Psychiatry**, v. 41, p. 76–85, 1997.

DAUGHTON, C.G.; TERNES, T.A. Pharmaceuticals and personal care products in the environment: agents of subtle change? **Environmental Health Perspectives**, v. 107, p. 907-938, 1999.

DOLDAN, M.J.; PREGO, B.; HOLMQVIST, B.I. et al.. Distribution of GABA-immunolabeling in the early zebrafish (*Danio rerio*) brain. **Eur. J. Morphol**, v. 37, p. 126–129, 1999.

DUGATKIN, L. A. Tendency to inspect predators predicts mortality risk in the guppy (*Poecilia reticulata*). **Behav. Ecol**, v. 3, p. 124-127, 1992.

EGAN, R. et al. Understanding behavioral and physiological phenotypes of stress and anxiety in zebrafish. **Behav Brain Res**, v.205, p. 38–44, 2009.

ENGESZER, R.E. et al. Zebrafish in The Wild: A Review of Natural History And New Notes from The Field. **Zebrafish**, v. 4, 2007.

FUCHS, F.D.; WANNMACHER, L. Farmacologia Clínica- **Fundamentos da Terapêutica Racional**. 4ª edição. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2010.

FUZZEN, M.L.M.; VAN DER KRAAK, G.; BERNIER, N.J. Stirring up new ideas about the regulation of the hypothalamic-pituitary-interrenal axis in zebrafish (*Danio rerio*). **Zebrafish**, v. 7, p. 1–10, 2010.

GAILLARD et al. Benzodiazépines et schizophrénie – revue de la littérature. **L'en héphale**, v. 32, p. 1003-1010, 2006.

GARRET et al. **Terapêutica medicamentosa e suas bases farmacológicas: manual de farmacologia e farmacoterapia**. Porto, Porto Editora. 1994.

GEBAUER, et al. Effects of anxiolytics in zebrafish: Similarities and differences between benzodiazepines, buspirone and ethanol. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior**, v. 99, p. 480–486, 2011.

GERLAI, R.; LAHAV, M.; GUO, S. et al.. Drinks like a fish: zebrafish (*Danio rerio*) as a behavior genetic model to study alcohol effects. **Pharmacol Biochem Behav**, v. 67, p. 773–82, 2000.

GILMAN, A., GOODMAN, L.. **The pharmacological basis of therapeutics**. Rio de Janeiro, McGraw-Hill, 2001.

GOLDSMITH P. Zebrafish as a pharmacological tool: the how, why and when. **Curr Opin Pharmacol**, v.4, p. 504–512, 2004.

GRIFFITHS, B.B. et al. A zebrafish model of glucocorticoid resistance shows serotonergic modulation of the stress response. **Frontiers in Behavioral Neuroscience**, v.6, p. 1-10, 2012.

HEBERER, T. Tracing persistent pharmaceutical residues from municipal sewage to drinking water. **Journal of Hydrology**, v. 266, p. 175-189, 2002.

HIEMKE, C.; HARTTER, S. Pharmacokinetics of selective serotonin reuptake inhibitors. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 85, p. 11–28, 2000.

HIGNITE, C.; AZARNOFF, D.L. Drugs and drug metabolites as environmental contaminants: chlorophenoxyisobutyrate and salicylic acid in sewage water effluent. **Life Sciences**, v. 20, p. 337-341, 1977.

HOWE, K. et al. The zebrafish reference genome sequence and its relationship to the human genome. **Nature**, v. 496, p. 498-505, 2013.

HUMMEL, D. et al. Simultaneous Determination Of Psychoactive Drugs And Their Metabolites In Aqueous Matrices By Liquid Chromatography Mass Spectrometry. **Environmental Science And Technology**, v. 40, p. 7321-7328, 2006.

JONES, O.A.; LESTER, J.N. Voulvoulis, N. Pharmaceuticals: a threat to drinking water? **TRENDS in Biotechnology**, v. 23, n. 4, p. 163-167, 2005.

JULIE, H.S.; STELLA, C.M.; GERHARD, H.. The development of GABA immunoreactivity in the retina of the zebrafish (*Brachydanio rerio*). **J. Comp. Neurol**, v. 345, p. 596–601, 1994.

KAPLAN, S. et al.. Pharmacokinetic profile of diazepam in man following single intravenous and oral and chronic oral administrations. **Journal of pharmaceutical sciences**, v. 62, p. 1789-1796, 1973.

KATZUNG, B.; TREVOR, A.; MASTERS, S. **Basic and clinical pharmacology**. New York, McGraw-Hill, p. 318-333, 2009.

KOAKOSKI, G. et al. Agrochemicals chronically inhibit the cortisol response to stress in fish. **Chemosphere**, v. 112, p. 85-91, 2014.

KOLPIN, D.W. et al. Pharmaceuticals, hormones, and other organic wastewater contaminants in US streams, 1999-2000: a national reconnaissance. **Environmental Science and Technology**, v. 36, p. 1202-1211, 2002.

KOROLKOVAS, A.; BURCKHALTER, J. **Química farmacêutica**. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, 1988.

KOSJEK, T. et al. Environmental Occurrence, Fate And Transformation Of Benzodiazepines In Water Treatment. **Water Res.**, v. 46, p. 355- 368, 2012.

KRAUSE J.; RUXTON, G.D. **Living in Groups**. London: Oxford University Press, 2002.

LEE, K.T. et al. Stress-induced behavioral and metabolic adaptations lead to an obesity-prone phenotype in ewes with elevated cortisol responses. **Psychoneuroendocrinology**, v. 47, p. 166-177, 2014.

MASANA, et al. The stress-inducible actin-interacting protein DRR1 shapes social behavior. **Psychoneuroendocrinology**, v. 48, p. 98–110, 2014.

MINISTÉRIO DA JUSTIÇA DO BRASIL. **INFORMAÇÕES SOBRE DROGAS/Tipos de drogas/Tranqüilizantes ou Ansiolíticos**. Disponível em: <http://www.obid.senad.gov.br/portais/OBID/conteudo/index.php?id_conteudo=11290&rastr o=INFORMA%C3%87%C3%95ES+SOBRE+DROGAS%2FTipos+de+drogas/Tranq%C3%BCilizantes+ou+Ansiol%C3%ADticos>. Acesso em: 5 de julho de 2014.

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.

MORGAN, J.R.G.E.; MIKHAIL, M.S.; MURRAY, M.J. et al. **Clinical Anesthesiology**, 3^a Ed, USA, The Mc Graw Hill Companies Inc, 2002.

MUELLER, T.; VERNIER, P.; WULLIMANN, M.F. The adult central nervous cholinergic system of a neurogenetic model animal, the zebrafish *Danio rerio*. **Brain Res**, v.1011, p. 156–169, 2004.

OLIVEIRA, T.A. et al. Alcohol impairs predation risk response and communication in zebrafish. **PLoS One**, v.8, e75780, 2013.

PAGNUSSAT, N.; PIATO, A.L.; SCHAEFER, I.C.; BLANK, M.; TAMBORSKI, A.R.; GUERIM, L.D.; BONAN, C.D.; VIANNA, M.R.M.; LARA, D.R. One for All and All for One: The Importance of Shoaling on Behavioral and Stress Responses in Zebrafish. **Zebrafish**; 10: 338-342, 2013.

PARK, J.W. et al. Global gene expression in larval zebrafish (*Danio rerio*) exposed to selective serotonin reuptake inhibitors (fluoxetine and sertraline) reveals unique expression profiles and potential biomarkers of exposure. **Environmental Pollution**, v. 167, p. 163-170, 2012.

PARKER, M.O.; MILLINGTON, M.E.; COMBE, F.J.; BRENNAN, C.H. Housing Conditions Differentially Affect Physiological and Behavioural Stress Responses of Zebrafish, as well as the Response to Anxiolytics. **PLoS ONE**, v.7, e34992, 2012.

PIATO, A.L.; CAPIOTTI, K.M.; TAMBORSKI, A.; OSES, J.P.; BARCELLOS, L.J.G. et al. Unpredictable chronic stress model in zebrafish (*Danio rerio*): Behavioral and physiological responses. **Progr Neuro-Psychopharm Biol Psychiatry**, v. 35, p. 561-567, 2011.

POMARA, N. et al. Cortisol response to diazepam: its relationship to age, dose, duration of treatment, and presence of generalized anxiety disorder. **Psychopharmacology**, v. 178, p. 1-8, 2005.

PRIETO, M.J. et al. Effect of Risperidone and Fluoxetine on Movement and Neurochemical Changes of Zebrafish. **Open Journal of Medical Chemistry**, v. 2, p. 129-138, 2012.

RAMOS, A.. **Psicofármacos - nova estratégia**. Porto, Lidel, 2004.

RANG, H.; DALE, M.. **Farmacologia**. Rio de Janeiro, Elsevier, 2008.

ROCHE. **Resumo das características do medicamento**. Amadora, Roche, 2010.

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, 2010.

SCHILLING TM et al. For whom the bell (curve) tolls: Cortisol rapidly affects memory retrieval by an inverted U-shaped dose-response relationship. **Psychoneuroendocrinol**, v. 38, p. 1565-1572, 2013.

SCIENCE TRANSLACIONAL MEDICINE. **Shining Light on Madness**. Disponível em: <<http://www.technologyreview.com/featuredstory/528146/shining-light-on-madness/>>. Acesso em: 10 de julho de 2014.

SHIN, J.T.; FISHMAN, M.C. From Zebrafish to human: modular medical models. **Annu Rev Genomics Hum Genet**, v. 3, p. 311-340, 2002.

SIGEL, E.; STEINMANN, M. Structure, function and modulation of GABAA receptors. **The journal of biological chemistry**, v. 287, p. 1-9, 2012.

SILVA, S.R.F.da. **Farmacocinética do diazepam**. 2013. 79 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade Fernando Pessoa, Porto, 2013.

SNYDER, J.S. et al. Adult hippocampal neurogenesis buffers stress responses and depressive behavior. **Nature**, v. 476, p. 458-461, 2011.

STERNBACH, L. H. The Discovery of CNS Active 1,4 Benzodiazepines. **The Benzodiazepines**, 1ª Ed , New York- Raven Press, 1983.

TERNES, T.; BONERZ, M.; SCHMIDT, T. Determination of neutral pharmaceuticals in wastewater and rivers by liquid chromatography-electrospray tandem mass spectrometry. **J Chromatogr A**, v. 938, p. 175-185, 2001.

WENDELAAR BONGA, S.E. The stress response in fish. **Physiol. Rev.** 77: 591-625, 1997.

WINBERG, S.; NILSSON, A.; HYLLAND, P. et al. Serotonin as a regulator of hypothalamic-pituitary-interrenal activity in teleost fish. **Neurosci Lett**, v. 230, p. 113-116, 1997.

WONG, D.T.; BYMASTER, F.P.; ENGLEMAN, E.A.. Prozac (fluoxetine, Lilly 110140), the first selective serotonin uptake inhibitor and an antidepressant drug: twenty years since its first publication. **Life Sci.**, v. 57, p. 411-41, 1995.

WONG, D.T.; HORNG, J.S.; BYMASTER, F.P.; et al.. A selective inhibitor of serotonin uptake: Lilly 110140, 3-(p-trifluoromethylphenoxy)-N-methyl-3-phenylpropylamine. **Life Sci.** v.15, p. 471-9, 1974.

WONG, D.T.; PERRY, K.W.; BYMASTER, F.P. Case history: the discovery of fluoxetine hydrochloride (Prozac). **Nat Rev Drug Disco**, v. 4, p.764-74, 2005.

ZHANG, W. et al. Greater Physiological and Behavioral Effects of Interrupted Stress Pattern Compared to Daily Restraint Stress in Rats. **PLoS ONE**, v. 9(7): e102247, 2014.

ZIGMOND, M.J.; BLOOM, F.E.; LANDIS, S.C., ROBERTS, J.L. SQUIRE, L.R. **Fundamental Neuroscience**, London: ACADEMIC PRESS, 1999.

ZIV, L. et al. An affective disorder in zebrafish with mutation of the glucocorticoid receptor. **Molecular Psychiatry**, v.18, p. 681-691, 2013.

ZON, L.I.; PETERSON, R.T. In vivo drug discovery in the zebrafish. **Nat Rev Drug Discov**, v. 4, p. 35-44, 2005.