

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS:  
FARMACOLOGIA E TERAPÊUTICA

Pablo Ricardo Bertelli

**EFEITOS DA MODULAÇÃO DE RECEPTORES GLP-1 PELO AGONISTA  
LIRAGLUTIDA EM MODELOS DE ESTRESSE EM PEIXES-ZEBRA**

Porto Alegre

2021

Pablo Ricardo Bertelli

**EFEITOS DA MODULAÇÃO DE RECEPTORES GLP-1 PELO AGONISTA  
LIRAGLUTIDA EM MODELOS DE ESTRESSE EM PEIXES-ZEBRA**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Farmacologia e Terapêutica do Instituto de Ciências Básicas da Saúde da Universidade Federal do Rio Grande do Sul como requisito parcial para a obtenção do título de doutor em Farmacologia e Terapêutica.

Orientador: Prof. Dr. Angelo Piato

Porto Alegre

2021

## CIP - Catalogação na Publicação

Bertelli, Pablo Ricardo

Efeitos da modulação de receptores GLP-1 pelo agonista liraglutida em modelos de estresse em peixes-zebra / Pablo Ricardo Bertelli. -- 2021. 69 f.

Orientadora: Angelo Piato.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Farmacologia e Terapêutica, Porto Alegre, BR-RS, 2021.

1. Liraglutida. 2. GLP-1. 3. Estresse. 4. Peixe-zebra. I. Piato, Angelo, orient. II. Título.

Pablo Ricardo Bertelli

**EFEITOS DA MODULAÇÃO DE RECEPTORES GLP-1 PELO AGONISTA  
LIRAGLUTIDA EM MODELOS DE ESTRESSE EM PEIXES-ZEBRA**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas:  
Farmacologia e Terapêutica do Instituto de Ciências Básicas da Saúde da  
Universidade Federal do Rio Grande do Sul como requisito parcial para a obtenção  
do título de Doutor em Farmacologia e Terapêutica.

Aprovado em: 25 de março de 2021.

**BANCA EXAMINADORA**

Anna Maria Siebel

---

Escola de Agrárias e Ambiente/Unochapecó

Diogo Losch de Oliveira

---

Departamento de Bioquímica/ICBS/UFRGS

Régis Adriel Zanette

---

Departamento de Farmacologia/ICBS/UFRGS

Angelo Piato

---

Departamento de Farmacologia/ICBS/UFRGS  
(Orientador)

## AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a energia superior a tudo e a todos, que rege a ordem, que me faz acreditar e seguir em frente, passo a passo, todos os dias.

Agradeço especialmente aos meus pais, Claudio e Teresinha Bertelli, os precursores desta caminhada, pela vida, por todo o amor, apoio, carinho, e suporte incondicional, amo muito vocês.

Aos meus filhos Francisco e Antônio por me ensinarem a ver a vida com outra perspectiva, por me impulsionar a sempre buscar, nunca desistir, obrigado por terem completado minha vida. Agradecer a minha esposa Ciane por estar ao meu lado nesta caminhada.

Agradeço ao meu orientador Dr. Angelo Piato por ter aberto as portas desta caminhada, pelos ensinamentos, pela paciência, pelo exemplo de pesquisador e profissional, por compartilhar um pouco de seu conhecimento comigo assim me tornando mais crítico e humilde, meu eterno obrigado!

Agradeço à professora Dra. Ana Paula Herrmann pelos ensinamentos, orientações, amizade, companheirismo e competência. Obrigado pelas suas contribuições.

Agradeço aos colegas do LAPCOM pelo acolhimento, pela troca de conhecimentos, aprendizado e companheirismo.

Agradeço aos professores e funcionários do PPG Farmacologia e Terapêutica da UFRGS pela oportunidade de fazer parte da história do PPG e poder aprimorar meu conhecimento.

Agradeço ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e a Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS) pela oportunidade, por todo o suporte, apoio estrutural e financeiro, obrigado!

*“Somos aquilo que lembramos,  
e também somos o que decidimos esquecer”*

**Iván Izquierdo**

## RESUMO

Os transtornos de ansiedade são extremamente deletérios e causam impactos significativos no indivíduo e na sociedade. Esses transtornos se estabelecem quando há um esgotamento, ou inadequação, da capacidade adaptativa do organismo em resposta à uma determinada demanda. Para essas condições são normalmente utilizados ansiolíticos que apresentam eficácia limitada e efeitos adversos significativos. Nesse sentido, a busca por novos fármacos é evidente. Apesar da limitação de evidências em relação ao receptor do peptídeo semelhante ao glucagon 1 (GLP-1R) e transtornos mentais, estudos recentes sugerem que a modulação desse sistema pode melhorar os sintomas dos transtornos relacionados ao estresse. O objetivo dessa tese foi investigar os efeitos da liraglutida, um agonista sintético do GLP-1R, sobre fenótipos neurocomportamentais e o status oxidativo no cérebro de peixes-zebra adultos. A exposição aguda à liraglutida mostrou efeitos semelhantes aos ansiolíticos no teste de claro/escuro, enquanto o tratamento crônico bloqueou o impacto do estresse crônico imprevisível sobre parâmetros comportamentais e fisiológicos. Os achados do nosso estudo demonstram, pela primeira vez, que a liraglutida possui atividade no sistema nervoso central (SNC) de peixes-zebra e pode bloquear os efeitos induzidos pelo estresse. Porém, mais estudos são necessários para elucidar o potencial de agonistas de GLP-1R nos transtornos mentais relacionados ao estresse.

## *ABSTRACT*

Anxiety disorders are extremely harmful and have significant impacts on the individual and society. These disorders are established when there is an exhaustion, or inadequacy, of the organism's adaptive capacity in response to a specific demand. Anxiolytics are usually used for these conditions; however, they have limited efficacy and significant adverse effects. In this sense, the research for new drugs is obvious. Despite the limited evidence regarding the glucagon-like peptide receptor 1 (GLP-1R) and mental disorders, recent studies suggest that modulation of this system can improve symptoms of stress-related disorders. The purpose of this work was to investigate the effects of liraglutide, a synthetic GLP-1R agonist, on neurobehavioral phenotypes and the oxidative status in the adult zebrafish brain. Acute exposure to liraglutide showed similar effects to anxiolytics in the light/dark test, while chronic treatment blocked the impact of unpredictable chronic stress on behavioral and physiological parameters. The findings of our study demonstrate, for the first time, that liraglutide has activity in the zebrafish central nervous system and can block the effects induced by stress. However, further studies are needed to elucidate the potential of GLP-1R agonists in stress-related mental disorders.



## APRESENTAÇÃO

Esta tese foi desenvolvida entre outubro/2016 e novembro/2020 no Laboratório de Psicofarmacologia e Comportamento (LAPCOM) do Departamento de Farmacologia do Instituto de Ciências Básicas da Saúde, da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS).

## LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 – Regiões cerebrais envolvidas nos transtornos de ansiedade.....	16
FIGURA 2 – Os efeitos pleiotrópicos relacionados aos agonistas do receptor GLP-1.....	22

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 – Cronograma de estressores do modelo de ECI.....69

## LISTA DE ANEXOS

ANEXO A – Carta de aprovação da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA/UFRGS) .....	65
ANEXO B – Material suplementar do manuscrito submetido ao periódico <i>Progress in Neuropsychopharmacology &amp; Biological Psychiatry</i> .....	66

## LISTA DE ABREVIATURAS

- BDNF Fator neurotrófico derivado do cérebro
- CEUA Comissão de Ética no Uso de Animais
- COVID-19 Doença do coronavírus 2019
- DSM-5 Manual de Diagnóstico e Estatística de Transtornos Mentais - 5ª edição
- ECI Estresse crônico imprevisível
- GLP-1 Peptídeo semelhante ao glucagon 1
- GLP-1R Receptor do peptídeo semelhante ao glucagon 1
- HPA Eixo hipotálamo-pituitária-adrenal
- LDT Teste de claro/escuro
- NPSH Grupos sulfidrila não proteicos
- NTT Teste de tanque novo
- PCR Proteína C reativa
- PTZ Pentilenotetrazol
- EROs Espécies reativas de oxigênio
- SARS-CoV-2 Síndrome respiratória aguda grave de coronavírus 2
- SNC Sistema nervoso central
- TAG Transtorno de ansiedade generalizada
- TCC Terapia cognitivo-comportamental

## SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO .....	15
1.1 Transtornos de ansiedade.....	15
1.2 Reposicionamento de fármacos.....	18
1.3 Agonistas de GLP-1: Liraglutida.....	20
2 OBJETIVOS .....	24
2.1 Objetivo Geral .....	24
2.2 Objetivos Específicos .....	24
3 RESULTADOS .....	25
3.1 Anti-stress effects of the glucagon-like peptide-1 receptor agonist liraglutide in zebrafish.....	25
4 DISCUSSÃO .....	50
5 CONCLUSÃO.....	55
6 REFERÊNCIAS.....	56
Anexo A - Carta de aprovação da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA/UFRGS) .....	65
Anexo B - Material suplementar do manuscrito submetido ao periódico Progress in Neuropsychopharmacology & Biological Psychiatry.....	66

## 1 INTRODUÇÃO

### 1.1 Transtornos de ansiedade

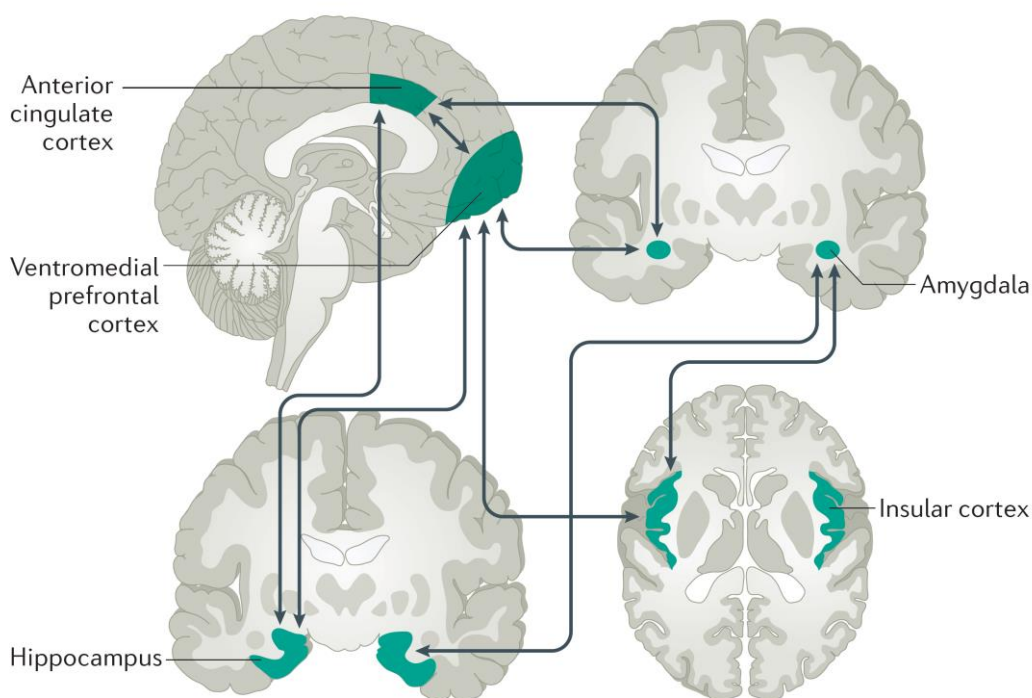
Os transtornos de ansiedade são condições graves e de alta prevalência que causam efeitos devastadores nos indivíduos e na sociedade. De acordo com o Manual de Diagnóstico e Estatística de Transtornos Mentais 5º ed. (abreviação em inglês DSM-5) estas condições podem ser divididas em: transtorno de ansiedade da separação, mutismo seletivo, fobia específica, transtorno de ansiedade social (fobia social), transtorno do pânico, agorafobia, transtorno de ansiedade generalizada, transtorno de ansiedade induzida por substância/medicamento e transtorno de ansiedade devido à outra condição médica.

Segundo dados de um estudo realizado na região metropolitana de São Paulo que faz parte da Pesquisa Mundial sobre Saúde Mental, a prevalência de transtornos mentais chega a quase 30%, sendo a mais alta entre os países pesquisados. Em segundo lugar aparece os Estados Unidos com pouco menos de 25%. Os transtornos de ansiedade foram os que acometeram em maior proporção a população estudada, afetando 19,9% dos avaliados na cidade brasileira. A razão da alta prevalência, de acordo o estudo, pode ser explicada pelo cruzamento de duas variáveis, a alta urbanização e a privação social (ANDRADE et al., 2012).

A pandemia disseminada em 2020 pelo vírus SARS-CoV-2 vem contribuindo para aumentar consideravelmente as taxas de ansiedade na população brasileira. Um estudo realizado entre os meses de abril e maio de 2020 via web, com uma amostra de 45161 participantes brasileiros de todas as regiões, sexos e idades que variaram de 18 a 60 anos ou mais, constatou que 52,6% dos entrevistados apresentaram sintomas relacionados à ansiedade (BARROS et al., 2020). Outro estudo com a participação de 1996 indivíduos, no formato de pesquisa *online*, realizado entre os meses de maio e julho de 2020, mostrou que cerca de 80% dos entrevistados, disse sentir-se ansioso (GOULARTE et al., 2021).

A ansiedade é uma doença multifatorial que pode acometer o indivíduo ao longo de todas as fases da vida (KESSLER et al., 2009), sendo resultado de uma demanda que supera as capacidades adaptativas do organismo (MCEWEN, 2000, 2004). Sua etiologia é complexa e ainda não está totalmente esclarecida. A

neurobiologia da doença é heterogênea e complexa, entretanto, sabe-se que regiões encefálicas como as amígdalas, o hipocampo e o córtex pré-frontal estão relacionados aos sintomas (CRASKE et al., 2017). Além disso, podem ocorrer a desregulação do eixo hipotálamo-pituitária-adrenal (HPA) e também alterações em sistemas de neurotransmissores (CUMMINGS; ZHONG, 2006; MILLER; RAISON, 2016). Fatores genéticos, ambientais e o gênero também estão relacionados à etiologia desse transtorno (CHANG et al., 2018).



**Figura 1.** Regiões cerebrais envolvidas nos transtornos de ansiedade. Adaptada de (CRASKE et al., 2017).

Evidências sugerem que os sistemas mostrados na Figura 1 podem se apresentar comprometidos funcionalmente, superativados no caso das amígdalas ou subativado como acontece em algumas regiões do córtex pré-frontal (FONZO et al., 2016; TEICHER et al., 2016). No caso do eixo HPA, a busca por biomarcadores que possam estar intimamente ligados aos transtornos de ansiedade como níveis de cortisol e hipersensibilidade a glicocorticoides tem sido uma estratégia para gerar padrões mensuráveis como objetivo de aprimorar o diagnóstico, sabendo que a literatura tem mostrado uma hiperatividade do eixo em modelos de ansiedade e estresse (DASKALAKIS et al., 2016; ZANNAS; BINDER, 2014).

Alguns estudos mostram que o sexo feminino tem duas vezes mais chances de desenvolver transtornos de ansiedade (COVER et al., 2014). Esse fato pode ser



explicado, pois, quando comparadas aos homens, a formação e extinção das memórias de medo se comportam de maneira diferenciada nas mulheres, e, além disso, os hormônios gonodais, como estrogênios, podem influenciar a neurogênese, a plasticidade sináptica e a expressão de receptores que são substratos essenciais para a memória e aprendizagem (LEBRON-MILAD; MILAD, 2012; MAENG; MILAD, 2015). A expressão receptores de estrogênio em neurônios do córtex pré-frontal medial, hipocampo e amígdalas, o aumento dos níveis de estrogênio durante a extinção da memória de aprendizagem em roedores fêmeas (que está ligado a um aumento na ativação do córtex pré-frontal, hipocampo e amígdalas), são alguns dos indícios de que a resposta comportamental frente a agentes estressores pode ser distinta (HWANG et al., 2015; MENDOZA-GARCÉS et al., 2011).

Outro fato que está presente em indivíduos com ansiedade é a ativação de vias imunoinflamatórias, ou seja, os pacientes podem apresentar leucocitose, elevação de proteína C reativa (PCR), além de um aumento nos níveis de citocinas pró-inflamatórias, tais como a interleucina 6 (IL-6) e o fator de necrose tumoral alfa (TNF-alfa) e ativação microglial (CAPURON; MILLER, 2011; KIECOLT-GLASER; DERRY; FAGUNDES, 2015; KRAMER et al., 2019; RÉUS et al., 2015). Tais disfunções são também comuns em pacientes com doenças crônicas como hipertensão e diabetes. Dessa forma, pacientes com doenças de fundo metabólico, por exemplo, apresentam maiores chances de desenvolver ansiedade/depressão, fato favorecido pela elevação de marcadores inflamatórios (MELO; SANTOS; FERREIRA, 2019; RÉUS et al., 2019).

Além das alterações em sistemas de neurotransmissores e ativação de cascatas imunoinflamatórias, a formação de espécies reativas de oxigênio (ROS) e nitrogênio é observada em diversos estudos. Estudos pré-clínicos têm sido extremamente úteis para esclarecer o papel do estresse oxidativo na ansiedade (SANTIAGO SANTANA et al., 2021). Hovatta e colaboradores (2010) foram os primeiros a demonstrar a relação entre a expressão de genes do sistema de defesa antioxidante no cérebro e o comportamento de tipo ansiedade em seis diferentes linhagens de camundongos (HOVATTA; JUHILA; DONNER, 2010). Berry et al. (2008) demonstraram que a deleção do gene p66Shc, responsável pela regulação de algumas espécies reativas de oxigênio, resulta em níveis menores de estresse oxidativo e reduz o comportamento tipo ansiedade em camundongos.

Além disso, animais expostos à dieta altamente palatável (enriquecida com sacarose) apresentam aumento na oxidação de proteínas no córtex frontal e isso parece estar relacionado ao aumento de ansiedade em ratos (SOUZA et al., 2007). Outro estudo demonstrou que a inibição da síntese de GSH pela administração de L-butionina-sulfoximina no hipocampo de camundongos induz um comportamento semelhante à ansiedade (MASOOD et al., 2008). Em resumo, vários estudos com modelos animais sugerem que manipulações genéticas ou farmacológicas do equilíbrio redox produzem mudanças comportamentais relacionadas a transtornos de ansiedade. O uso de antioxidantes pode prevenir muitos desses efeitos (MOCELIN et al., 2015; NAGAHARA et al., 2013; PATKI et al., 2015).

### *1.2 Reposicionamento de fármacos*

Além das dificuldades do correto diagnóstico dos transtornos de ansiedade, o tempo que o paciente leva para procurar atendimento, que pode chegar até 30 anos segundo dados da Pesquisa Mundial de Saúde Mental (CRASKE et al., 2017), a correta adesão ao tratamento e fatores adjacentes que agravam ainda mais o quadro clínico, temos as limitações dos tratamentos farmacológicos que geram amplas discussões dentro da comunidade científica, bem como dificuldades na escolha correta de qual ou quais fármacos irão auxiliar no manejo da doença gerando assim uma resposta insatisfatória (RAMIC et al., 2020; REICHENPFADER et al., 2014; SOLMI et al., 2020; WENZEL-SEIFERT; WITTMANN; HAEN, 2011).

Dentre as terapias disponíveis para melhoria da qualidade de vida dos pacientes com transtorno de ansiedade generalizada (TAG) há intervenções não-farmacológicas como a terapia cognitivo-comportamental (TCC) que consiste em compreender os fatores que levaram o paciente a desenvolver a patologia através do diálogo direto profissional/paciente (ANDRADE et al., 2012; KESSLER et al., 2009). As intervenções farmacológicas auxiliam no reparo de desequilíbrios neuroquímicos envolvidos na ansiedade. Ambas as intervenções podem ser utilizada individualmente ou em conjunto (CUIJPERS et al., 2016; HOFMANN; WU; BOETTCHER, 2014; KEEFE et al., 2014; MURROUGH et al., 2015). Ainda não temos literatura que comparem diretamente a eficácia da TCC versus a terapia farmacológica, porém estudos randomizados indicam que o benefício da medicação (inibidores seletivos da

recaptação da serotonina) e da TCC são aproximadamente equivalentes (MITTE, 2005).

A terapia farmacológica apresenta diversas limitações, podendo desencadear efeitos indesejáveis, como por exemplo, agravar a ansiedade. Os antidepressivos são os fármacos de primeira escolha para o tratamento dos transtornos de ansiedade, apresentando segurança e baixo potencial de abuso (MURROUGH et al., 2015; RAVINDRAN; STEIN, 2010). Entre eles podemos citar os inibidores seletivos da recaptação da serotonina (5-HT) (ISRS), incluindo o citalopram, a sertralina e a fluoxetina e os inibidores seletivos da recaptação da serotonina e da noradrenalina (ISRSN) como a venlafaxina (BANDELOW; MICHAELIS; WEDEKIND, 2017; SARTORI; SINGEWALD, 2019). Os efeitos colaterais dos ISRS e dos ISRSN incluem nervosismo no início da terapia, embotamento emocional, problemas gastrointestinais, insônia, disfunção sexual e também pode ocorrer um aumento do risco de ideação suicida (STÜBNER et al., 2018). Os antidepressivos tricíclicos (TCAs) e os inibidores da monoaminoxidase (IMAO) apresentam eficácia razoável, porém, geralmente são utilizados no tratamento de segunda linha devido à segurança e tolerabilidade. Os benzodiazepínicos (BZD) como o alprazolam, diazepam e clonazepam geralmente são utilizados em intervenções agudas ou adjunto aos ISRS, ISRSN, TCA e IMAO, porém, a longo prazo, podem causar dependência, abstinência, prejuízos cognitivos e até mesmo a morte por overdose (AGARWAL; LANDON, 2019; BAANDRUP et al., 2018; GOMEZ; BARTHEL; HOFMANN, 2018).

O reposicionamento de fármacos é uma estratégia para mudar paradigmas das abordagens tradicionais do desenvolvimento de novos fármacos. A definição comum deste processo ainda não está acordada na comunidade científica, para *International Union of Pure and Applied Chemistry* (IUPAC) a definição seria a seguinte: “Estratégia que busca descobrir novas aplicações para um fármaco existente, que não foram previamente referenciadas e que, atualmente, não são prescritas ou investigadas”. A organização também considera os termos *drug repurposing*, *drug repositioning*, *drug reprofiling* como sinônimos, já que todos parecem ser usados de forma intercambiável dentro da literatura científica (BUCKLE et al., 2013).

A estratégia de pesquisa e desenvolvimento de fármacos comumente utilizada tem alto custo e demanda longos períodos, além de diversos imprevistos durante o processo (SIROTA et al., 2011). O desenvolvimento de um único medicamento novo

pode custar mais de um bilhão de dólares (COLLIER, 2009). A estimativa de duração de um ciclo tradicional de pesquisa e desenvolvimento de novas entidades químicas pode levar até quinze anos, sendo que mais de 90% dos candidatos falha antes de chegar aos estudos clínicos de primeira fase (KUBICK et al., 2020). A estratégia de reposicionar fármacos é extremamente promissora, pois as propriedades farmacocinéticas/farmacodinâmicas já foram determinadas, bem como o perfil de efeitos adversos e a toxicidade. Isso tudo corrobora com o encurtamento para a aprovação de sua nova indicação terapêutica.

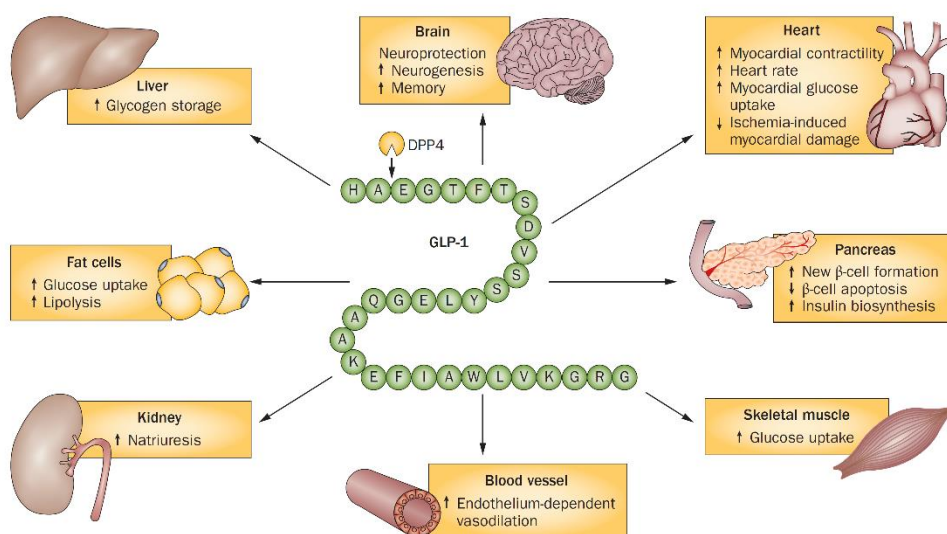
### 1.3 Agonistas de GLP-1: Liraglutida

Os análogos do peptídeo semelhante ao glucagon (GLP-1) são representantes sintéticos desse hormônio da família das incretinas (as incretinas são liberadas após as refeições, cuja principal função é estimular a produção de insulina) e fazem parte de uma nova geração de compostos para o tratamento da diabetes *mellitus* tipo 2 (DM2). A liraglutida e a exenatida são os principais representantes dessa classe que, além do efeito antidiabético, apresentam efeitos neuroprotetor e anti-inflamatório. O GLP-1 sofre rápida clivagem pela enzima dipeptidil peptidase 4 (DPP-4) que rapidamente elimina o peptídeo de circulação. Estes fármacos apresentam como principal vantagem um tempo de meia-vida prolongado – o GLP-1 endógeno possui cerca de 1,5-5 min, enquanto a liraglutida chega a 13 h (HOU et al., 2012; ISACSON et al., 2011; KRASNER et al., 2014). Tais efeitos têm sido explorados no tratamento de doenças neurodegenerativas como a doença de Parkinson (AVILES-OLMOS et al., 2013; KIM et al., 2017). Evidências mostram que os receptores de GLP-1 (GLP-1R) (Figura 1), além de estarem presentes em células pancreáticas, podem ser encontrados no SNC em estruturas como hipotálamo, bulbo olfatório e rombencéfalo (DANIELS; MIETLICKI-BAASE, 2019). Apesar disso, estudos que explorem os efeitos de agonistas de GLP-1 em transtornos mentais são escassos.

A liraglutida é aprovada para o tratamento de DM2 e também para a obesidade. Seus efeitos terapêuticos são associados à estimulação da secreção de insulina e à inibição da secreção de glucagon pelo pâncreas, bem como ao retardo do esvaziamento gástrico e redução do apetite. Outra linha de estudo demonstra a capacidade desse fármaco em aumentar a sensação de saciedade e possível

diminuição da ansiedade, sendo utilizado em terapias para a redução de peso (PAJECKI et al., 2013; PI-SUNYER et al., 2015). Além desses efeitos metabólicos, a liraglutida apresenta efeito tipo-ansiolítico, anti-inflamatórios e neuroprotetor, tanto *in vitro* (PANAGAKI; MICHAEL; HÖLSCHER, 2017) como *in vivo* em roedores (HARKAVYI et al., 2008; MCCLEAN et al., 2011). Administração crônica de liraglutida em roedores geneticamente modificados (APP/PS1) foi capaz de reverter os efeitos comportamentais e neuroquímicos em um modelo animal de doença de Alzheimer (MCCLEAN; HÖLSCHER, 2014). Em outro estudo, tanto a administração aguda como crônica de liraglutida induziu efeito tipo-ansiolítico em camundongos no teste de labirinto em cruz elevado (SHARMA et al., 2015). Recentemente, Liu et al. (2019) avaliaram o efeito da exposição crônica à liraglutida em um modelo de depressão induzido por administração crônica de corticosterona em camundongos. A liraglutida demonstrou efeito tipo-ansiolítico e tipo-antidepressivo, aumentando a densidade celular de neurônios imaturos na região subgranular do giro denteado do hipocampo. Além disso, o liraglutida aumentou o nível de GSK3 $\beta$  fosforilada no hipocampo, o que pode ser fundamental para a atividade tipo-antidepressiva. Além dos efeitos em modelos animais relacionados à depressão/ansiedade, a liraglutida preveniu os efeitos deletérios induzidos por pentilenotetrazol (PTZ, um agente pró-convulsivante) sobre parâmetros comportamentais e lipoperoxidação (DE SOUZA et al., 2019).

O mecanismo de ação desse fármaco em transtornos mentais ainda não foi totalmente esclarecido. Sabe-se que o GLP-1 (agonista endógeno), ao atravessar a barreira hematoencefálica, é capaz de modular processos celulares como a sinaptogênese, resposta inflamatória, estresse oxidativo e a formação de memória. Ainda, esse mediador é produzido em pequenas quantidades no SNC e é liberado pelos núcleos hipotalâmicos, regulando funções neuroendócrinas e autônomas do SNC (ATHAUDA; FOLTYNIE, 2016; DANIELS; MIETLICKI-BAASE, 2019; HEPPNER et al., 2015; HUNOT et al., 1997). Portanto, o mecanismo de ação da liraglutida pode estar relacionado à modulação dessas vias citadas e ter, conseqüentemente, implicações no tratamento de transtornos mentais (Figura 2).



**Figura 2.** Os efeitos pleiotrópicos relacionados aos agonistas do receptor GLP-1 (MEIER, 2012).

O peixe-zebra (*Danio rerio*), conhecido mundialmente como *zebrafish*, é amplamente utilizado como organismo modelo na pesquisa neurocomportamental (KALUEFF; STEWART; GERLAI, 2014, 2014; STEWART et al., 2014), pois apresenta um rico repertório comportamental e respostas neuroquímicas e fisiológicas ao estresse semelhantes aos mamíferos (MOCELIN et al., 2015; PAVLIDIS; THEODORIDI; TSALAFOUTA, 2015; PIATO et al., 2011a). Por exemplo, o sistema de resposta ao estresse através da ativação do eixo hipotálamo-pituitária-interrenal (HPI) em peixes-zebra é semelhante ao observado nos humanos (PIATO et al., 2011a). O efeito de fármacos nessa espécie também possui correlatos ao observado em roedores e humanos já que os sistemas de neurotransmissores e neuromoduladores são conservados (KALUEFF; STEWART; GERLAI, 2014; MARCON et al., 2016). Em relação ao comportamento, diversos protocolos experimentais já foram padronizados nessa espécie, a grande maioria análogos aos testes realizados em roedores. Os testes comportamentais do tanque novo e claro/escuro já foram validados para essa espécie e são de vasta utilidade quando se busca ampliar o conhecimento a respeito dos efeitos de fármacos/drogas com potencial utilização no tratamento de transtornos de humor e ansiedade (GEBAUER et al., 2011; GIACOMINI et al., 2016; MARCON et al., 2016; SINYAKOVA et al., 2018). Apesar de diferenças funcionais entre o GLP-1 de peixes e mamíferos quando se diz respeito ao metabolismo da glicose, eles parecem ser intercambiáveis em suas funções (MOMMSEN; ANDREWS; PLISETSKAYA, 1987; PLISETSKAYA; MOMMSEN, 1996; PLISETSKAYA, 1993). Além disso, o receptor de GLP-1 (GLP-1R) foi clonado e se liga com uma afinidade

semelhante do GLP-1 humano ao peixe-zebra (MOJSOV, 2000). Ainda mais relevante, os papéis fisiológicos do GLP-1 no cérebro de peixes teleósteos parecem ser análogos aos descritos para mamíferos, fatos que favorecem a escolha do modelo para o desenvolvimento deste trabalho (MOJSOV, 2000; MOMMSEN; MOJSOV, 1998; PLISETSKAYA; MOMMSEN, 1996; SILVERSTEIN et al., 2001) .

Portanto, considerando que (a) as bases neurobiológicas dos transtornos mentais envolvem alterações neuroinflamatórias e desequilíbrio do status oxidativo; (b) a farmacoterapia para tais condições é limitada e (c) a liraglutida potencialmente modula alvos relevantes para a fisiopatologia de transtornos mentais, a hipótese desse trabalho é que esse fármaco possui atividade tipo-ansiolítica em peixes-zebra que ocorre provavelmente através da modulação do status oxidativo.

## 2 OBJETIVOS

### *2.1 Objetivo Geral*

Avaliar o efeito da liraglutida, um agonista de receptores GLP-1, sobre parâmetros comportamentais e bioquímicos em peixes-zebra adultos.

### *2.2 Objetivos Específicos*

Avaliar o efeito de administração aguda de liraglutida sobre:

- a) parâmetros comportamentais nos testes de tanque novo e claro/escuro;
- b) parâmetros comportamentais e bioquímicos em um modelo de estresse agudo por contenção.

Avaliar o efeito de administração crônica (7 dias) de liraglutida no modelo de estresse crônico imprevisível (ECI) sobre:

- a) parâmetros comportamentais (testes de tanque aberto, de interação social e de tanque novo);
- b) parâmetro fisiológico de peso;
- c) parâmetros bioquímicos relacionados ao status oxidativo e glicemia.



### 3 RESULTADOS

#### *3.1 Anti-stress effects of the glucagon-like peptide-1 receptor agonist liraglutide in zebrafish*

##### **Anti-stress effects of the glucagon-like peptide-1 receptor agonist liraglutide in zebrafish**

Pablo R. Bertelli<sup>a,c#</sup>, Ricieri Mocelin<sup>c#</sup>, Matheus Marcon<sup>b</sup>, Adrieli Sachett<sup>b</sup>, Rosane Gomez<sup>a,b,c</sup>, Adriane R. Rosa<sup>a,c</sup>, Ana P. Herrmann<sup>a,c</sup>, Angelo Piato<sup>a,b,c</sup>

<sup>a</sup> Departamento de Farmacologia, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, RS, Brazil.

<sup>b</sup> Programa de Pós-graduação em Neurociências, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, RS, Brazil.

<sup>c</sup> Programa de Pós-graduação em Farmacologia e Terapêutica, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, RS, Brazil.

# The authors contributed equally to this manuscript.

\*Correspondence to:

Angelo Piato, Ph.D. Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas: Farmacolo Terapêutica, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Avenida Sarmiento Leite, 500/305, Porto Alegre, RS 90050-170, Brazil; Phone/Fax: +55 51 33083121; E-mail: angelopiato@ufrgs.br

**ABSTRACT**

Stress-related disorders are extremely harmful and cause significant impacts on the individual and society. Despite the lack of evidence on glucagon-like peptide-1 receptor (GLP-1R) and mental disorders, a few clinical and preclinical studies suggest that modulating this system could improve symptoms of stress-related disorders. This study aimed to investigate the effects of liraglutide, a GLP-1R agonist, on neurobehavioral phenotypes and brain oxidative status in adult zebrafish. Acute liraglutide promoted anxiolytic-like effects in the light/dark test, while chronic treatment blocked the impact of unpredictable chronic stress on behavioral and physiological parameters. Taken together, our study demonstrates that liraglutide is active on zebrafish brain and may counteract some of the effects induced by stress. More studies are warranted to further elucidate the potential of GLP-1R agonists for the management of brain disorders.

Keywords: GLP-1, acute stress, chronic stress, oxidative damage, mental disorders.

## 1. INTRODUCTION

Glucagon-like peptide-1 (GLP-1) is an incretin hormone that plays an essential role in regulating blood glucose levels and insulin sensitivity. It is secreted by L-cells in the gut epithelium in response to nutrients, promoting glucose homeostasis (KAHN; HULL; UTZSCHNEIDER, 2006). GLP-1 exerts its physiological actions by binding to the GLP-1 receptor (GLP-1R), which is expressed in abundance in peripheral and central tissues, enabling metabolic, endocrine, behavioral, and cardiovascular regulation in response to homeostatic signals (HOLT; TRAPP, 2016; KRASNER et al., 2014; RUSSELL-JONES, 2009). Studies have also shown the production of GLP-1 in the brain of mammals, where it may play a role in stress regulation by modulating the hypothalamic-pituitary-adrenal (HPA) axis and the autonomic nervous system (LÓPEZ-FERRERAS et al., 2018; ULRICH-LAI; HERMAN, 2009).

GLP-1R agonists are a new drug class developed for glycemic control in diabetic patients. The GLP-1R agonists currently approved for type-2 diabetes mellitus (T2DM) include albiglutide, dulaglutide, exenatide, liraglutide, lixisenatide, and semaglutide. Liraglutide has 97% homology to the human GLP-1 and was approved by the FDA in 2010. Like other GLP-1R agonists, it stimulates insulin secretion and inhibits glucagon release by the pancreas, delays gastric emptying, and reduces appetite (LIM et al., 2009; LÓPEZ-FERRERAS et al., 2018; MOJSOV, 2000; WHICHER et al., 2019). Due to its weight loss properties, liraglutide was repurposed by the Food and Drug Administration (FDA) in 2014 as a treatment for obesity.

The presence of GLP-1Rs in the brain prompted studies on the central effects of GLP-1R agonists, which revealed improvement in cognitive functions, protection against oxidative stress, neuroinflammation, increased synaptic plasticity, up-regulation of brain-derived neurotrophic factor (BDNF), and reduction in apoptosis signaling molecules in rodents (CITRARO et al., 2019; HAN et al., 2020; KRASS et al., 2015; LIU et al., 2019; TAUCHI et al., 2008; WEINA et al., 2018; YAN et al., 2019; ZHANG et al., 2020, 2009, 2019). GLP-1R agonists were also tested in preclinical models of anxiety and depression, including unpredictable chronic stress (UCS) and corticosterone exposure. These studies demonstrated the effects of GLP-1R agonists on forced swimming, tail suspension, elevated plus maze, open field, and light-dark tests, showing antidepressant/anxiolytic properties, as well as antioxidant effects in rodents (ABDELAZIZ et al., 2019; CHAVES FILHO et al., 2020; DE SOUZA et al., 2019; HAN et al., 2020; KRASS et al., 2015; LIU et al., 2019; WEINA et al., 2018). However, the effects of GLP-

1R agonists and their potential mechanism of action in stress-related mental disorders in zebrafish remains unknown.

Zebrafish has been progressively used in pharmacological and neuroscience studies because of the high similarities in physiology and metabolism compared to mammals. Despite the functional differences between fish and mammalian GLP-1s regarding glucose metabolism, they seem to be interchangeable in their functions (MOMMSEN; ANDREWS; PLISETSKAYA, 1987; PLISETSKAYA; MOMMSEN, 1996; PLISETSKAYA, 1993). Furthermore, the zebrafish GLP-1R has been cloned and found to bind with a similar affinity to both zebrafish and human GLP-1 (MOJSOV, 2000). Even more relevant to our study, the physiological roles of GLP-1 in the brain of teleost fish seem to be analogous to those described for mammals (MOJSOV, 2000; MOMMSEN; MOJSOV, 1998; PLISETSKAYA; MOMMSEN, 1996; SILVERSTEIN et al., 2001). We thus aimed to investigate the effects of liraglutide on stress-related outcomes relevant to anxiety and mood disorders on behavioral and neurochemical assays in zebrafish. More specifically, we examined the effects of liraglutide on behavior and oxidative status parameters altered by acute and chronic stress in adult zebrafish.

## **2. MATERIAL AND METHODS**

### **2.1. Animals and housing conditions**

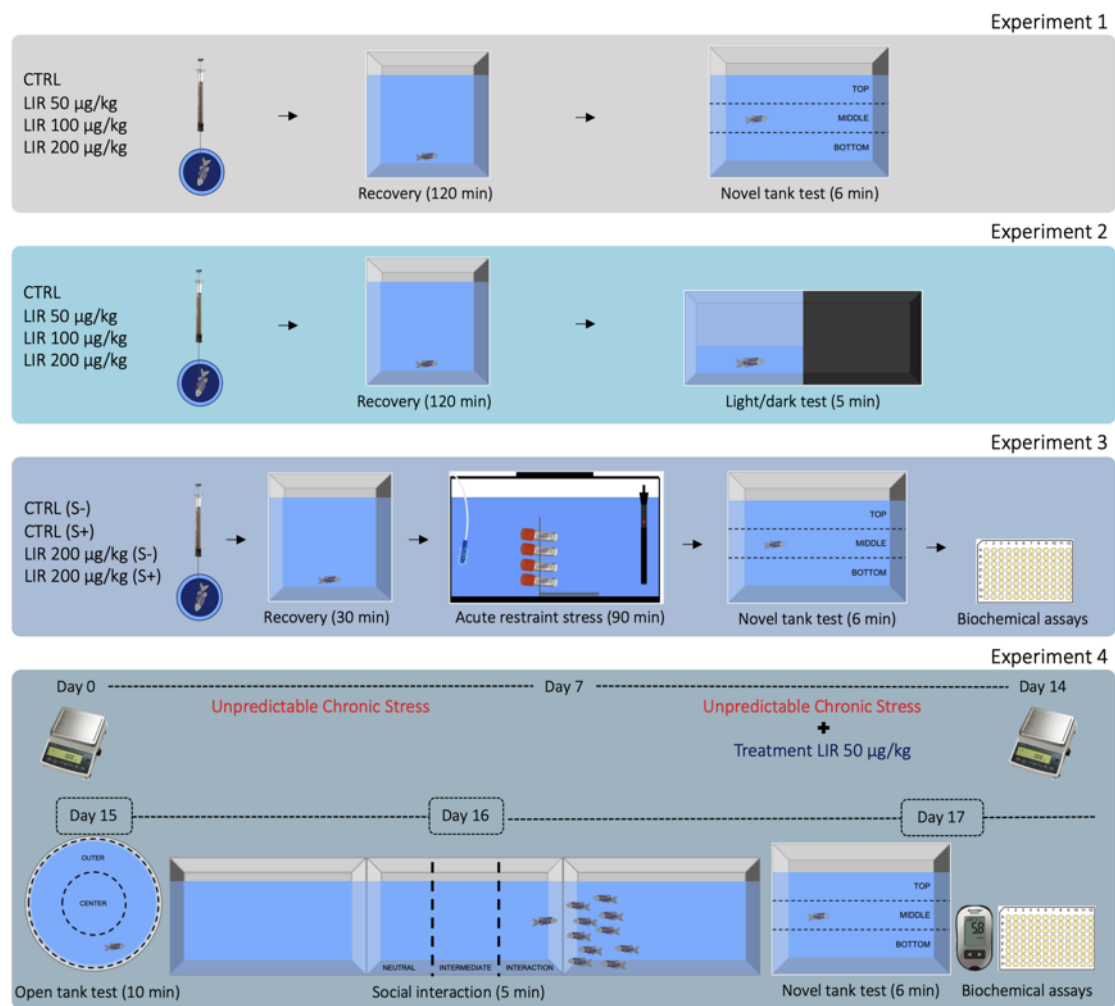
A total of 474 adult zebrafish of the outbred wild-type short-fin phenotype (*Danio rerio*, F. Hamilton 1822, 6-month-old, 3-4 cm long) of both sexes (50:50 male:female ratio) were obtained from a commercial supplier (Delphis, RS, Brazil). The animals were maintained in our facility (Altamar, SP, Brazil) according to established protocols (WESTERFIELD, 2007). After the quarantine period (30 days), animals were transferred to 16-L home tanks (40 x 20 x 24 cm) with non-chlorinated water kept under constant mechanical, biological and chemical filtration, where they acclimated for another five days before testing. Fish were fed three times a day with brine shrimp (*Artemia salina*) and commercial flake fish food (Poytara®, SP, Brazil). The Ethics Committee of the Universidade Federal do Rio Grande do Sul approved all protocols (#32485/2017). The manipulation and animal care were conducted according to the National Institute of Health Guide for Care and Use of Laboratory Animals and aimed to minimize the discomfort, suffering, and the number of animals used.

## 2.2. Drug administration

Liraglutide (LIR, Victoza<sup>®</sup>, Novo Nordisk, Denmark) and 0.9% sodium chloride solution (saline, ADV Farma, SP, Brazil) were acquired from a commercial supplier. Tricaine (MS-222, CAS #886-86-2) was acquired from Sigma-Aldrich. Drug solutions were prepared daily based on previous studies and a pilot study (unpublished data). Intraperitoneal (i.p.) injections were applied using a Hamilton Microliter™ Syringe (701N 10  $\mu$ L SYR 26s/2"/2) x Epidurakatheter 0.45 x 0.85 mm (Perifix<sup>®</sup>-Katheter, Braun, Germany) x Gingival Needle 30G/0.3 x 21 mm (GN injecta, SP, Brazil). The injection volume was 1  $\mu$ L/100 mg of animal weight. The animals of the control group received the same volume of saline solution (0.9% NaCl). The animals were anesthetized by immersion in a solution of tricaine (300 mg/L) until loss of motor coordination and reduced respiratory rate. The anesthetized fish were gently placed in a sponge soaked in water submerged in a petri dish, with the abdomen facing up and the fish's head positioned on the sponge hinge. The needle was inserted parallel to the spine in the abdomen's midline posterior to the pectoral fins. This procedure was conducted in approximately 10 seconds. For acute experiments, the time between injection and the behavioral tests was 120 minutes. For chronic experiments, behavioral tests took place 24 hours after the last injection.

## 2.3. Study design

The experimental design is shown in Figure 1. In all experiments, fish were randomly allocated into the experimental groups using a computerized random number generator ([www.random.org](http://www.random.org)). Behavioral and biochemical assays were conducted and analyzed by investigators blind to the experimental groups (each tank was coded by a researcher who did not participate in the experiments). The codes of experimental groups were revealed only during data analysis. Each experimental group originated from two identical home tanks, and no tank effects were observed in the analysis, so data were pooled together.



**Fig. 1.** Outline of the study design.

**Experiments 1 and 2:** The animals were anesthetized and injected with either saline (CTRL) or liraglutide (LIR; 50, 100, or 200  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ). After injection, fish were placed into recovery tanks (18 x 18 x 18 cm) for 120 minutes. Following recovery, fish were gently transferred to the novel tank test (NTT) in experiment 1 or to the light/dark test (LDT) in experiment 2 (MOCELIN et al., 2015; REIS et al., 2019).

**Experiment 3:** The acute restraint stress (ARS) protocol has been detailed in previous studies (DAL SANTO et al., 2014; GHISLENI et al., 2012; PIATO et al., 2011b; REIS et al., 2019). Briefly, fish were anesthetized and treated with saline (CTRL) or 200  $\mu\text{g}/\text{kg}$  LIR (this dose was chosen based on the anxiolytic-like effect observed in the LDT). After injection, fish were placed into recovery tanks (18 x 18 x 18 cm) for 30 min. Then, fish were allocated to stressed (ARS) or non-stressed groups. Fish in the stressed group were gently placed into 1.8-mL cryogenic tubes (Corning®) with openings at both ends (to allow adequate water circulation)

in a 16-L tank for 90 min. Non-stressed groups were transferred to a 16-L tank for 90 min. The animals were then individually transferred to the NTT, and behavioral parameters were quantified. After the NTT, the fish were cryoethanized and the brain dissected and homogenized for oxidative status biochemical assays.

**Experiment 4:** The unpredictable chronic stress (UCS) protocol was carried out based on previous studies by our group (MARCON et al., 2019; MOCELIN et al., 2019b; PIATO et al., 2011a). Schedule and stressors are detailed in the supplementary material (Table S1). Initially, fish were divided into control (non-stressed group, S-) and UCS (stressed group, S+). After seven days, the experimental groups were subdivided into vehicle (0.9% saline) and 50 µg/kg LIR (this dose was chosen because it did not alter behavior and metabolic parameters after daily injections for 7 days (Fig. S1). The animals were anesthetized daily and injected at 08:00 a.m., and then returned to the housing tanks. After UCS protocol, fish were submitted to the open tank test (OTT), social interaction (SI), and NTT, performed respectively on the 15<sup>th</sup>, 16<sup>th</sup>, and 17<sup>th</sup> day. Immediately after the NTT, fish were anesthetized by rapid cooling (immersion in water at 2–4 °C until unable to swim and cessation of opercular movement); blood was collected from the tail, and the brain dissected and homogenized for biochemical assays.

#### 2.4. Behavioral tests

All behavioral tests were performed in the morning. The novel tank test (NTT) was carried out as described previously (MARCON et al., 2019; MOCELIN et al., 2015, 2019a; REIS et al., 2019; VALADAS et al., 2019). Animals were individually placed in the NTT apparatus and recorded for 6 min. The software ANY-maze™ (Stoelting Co., USA) was used to virtually divide the tank into three equal horizontal zones and track the movement of the animals. The parameters quantified were total distance traveled (m), number of crossings (transitions between the zones of the tank), number of entries, and time spent in the top zone of the tank (s).

The light/dark test (LDT) was performed as previously described by our group (MOCELIN et al., 2015; PANCOTTO et al., 2018; REIS et al., 2019). Fish were individually transferred to the white compartment of the apparatus and video recorded for 5 min. The software BORIS® (Università Degli Studi di Torino, Italy) was used to quantify the time spent in the lit side (s) and the number of crossings. The test was conducted in ambient light.

The open tank test (OTT) was conducted as previously described (BENVENUTTI et al., 2020). Fish were individually placed in the center of the circular arena made of opaque white plastic (24 cm diameter, 8 cm walls), with a water depth of 3 cm, recorded for 10 min, and then analyzed using the ANY-maze™ software. The arena was virtually divided into the center (inner circle, 8 cm in diameter) and outer zones. The parameters quantified were total distance traveled (m), time immobile (s), absolute turn angle (°), and time spent in the center area of the tank (s).

The social interaction test (SI) was conducted as described previously (BENVENUTTI et al., 2020). Animals were placed for 7 min in a tank flanked by an empty tank (neutral stimulus) and a tank containing 10 zebrafish (social stimulus). Animals were habituated to the apparatus for 2 min and then analyzed for 5 min. The position of the social stimulus was counterbalanced between right or left throughout tests. The test apparatus was virtually divided into three vertical areas (interaction, middle and neutral); behavior was quantified using ANY-maze™ software. The following measures were quantified: total distance traveled, time spent in the interaction zone (s), interaction time of the fish face to face with the stimulus (s), and the number of interactions.

## 2.5. Biochemical assays

For the biochemical analyses, each sample was composed of 4 dissected brains pooled and gently homogenized in 600  $\mu$ L phosphate-buffered saline (PBS, pH 7.4, Sigma-Aldrich) using a disposable tissue grinder pestle in 1.5-mL microcentrifuge tubes. Homogenates were centrifuged at 10,000 *g* at 4 °C in a cooling centrifuge, and the supernatant packed in microtubes was used for experimental assays (MOCELIN et al., 2019a). Protein was quantified according to the Coomassie blue method (BRADFORD, 1976) using bovine serum albumin (Sigma-Aldrich) as a standard. The following parameters were quantified for the oxidative status assessment: lipid peroxidation (thiobarbituric acid reactive species – TBARS) and non-protein thiols (NPSH). All biochemical measures were performed in triplicate. Details of each procedure were described in previous studies (MARCON et al., 2019; MOCELIN et al., 2019a; REIS et al., 2019; VALADAS et al., 2019). The detailed protocols for tissue preparation and biochemical assays are also available at [protocols.io](https://www.protocols.io) (10.17504/protocols.io.bjkdkks6;



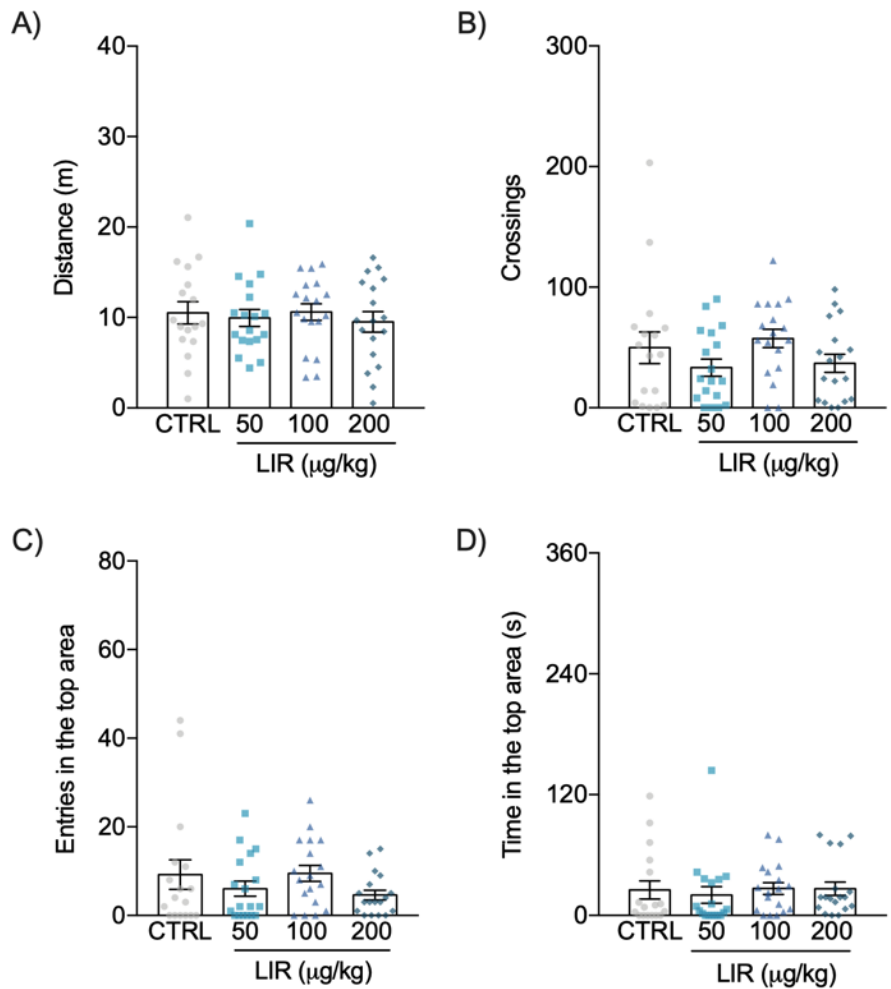
10.17504/protocols.io.bjnfkmbn; 10.17504/protocols.io.bjrkkm4w;  
10.17504/protocols.io.bjp8kmrw).

For the quantification of blood glucose levels, fish were anesthetized by rapid cooling, and a cut was made on the tail; the blood was collected directly on the test strips inserted in the glucometer (Accu-Chek® Performa, Roche, Germany). After blood collection, the animal was euthanized by decapitation for brain tissue sampling.

## 2.6. Statistical analysis

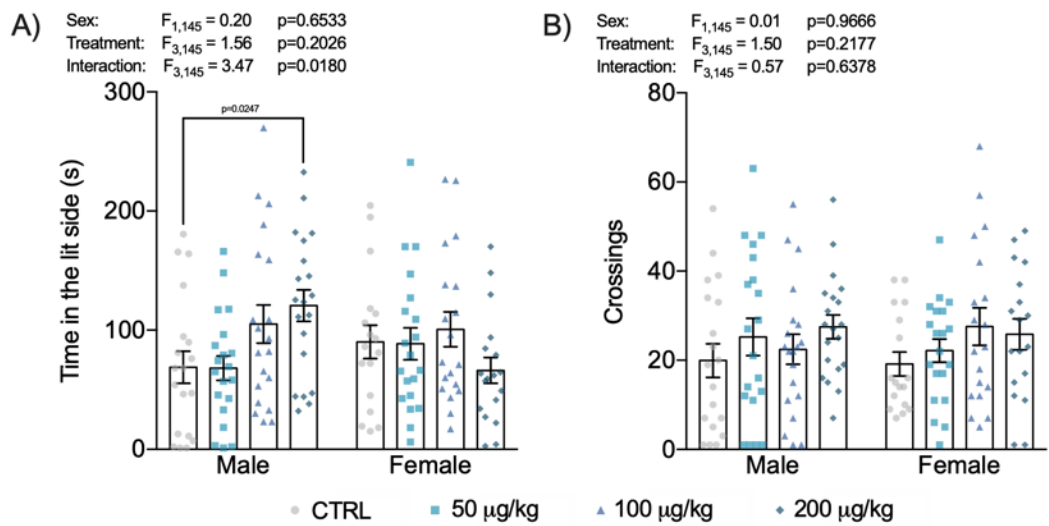
Normality and homogeneity of variances were confirmed for all data sets using D'Agostino-Pearson and Levene tests, respectively. Results were analyzed by one, two, or three-way ANOVA followed by Tukey as applicable. For behavioral data, the outliers were identified based on distance travelled using the ROUT statistical test (GraphPad® software) and were removed from the analyses. The tank and sex effects were tested in all comparisons; data were pooled when no effect was observed. Data are expressed as mean  $\pm$  standard error of the mean (S.E.M). The level of significance was set at  $p < 0.05$ .

## 3. RESULTS



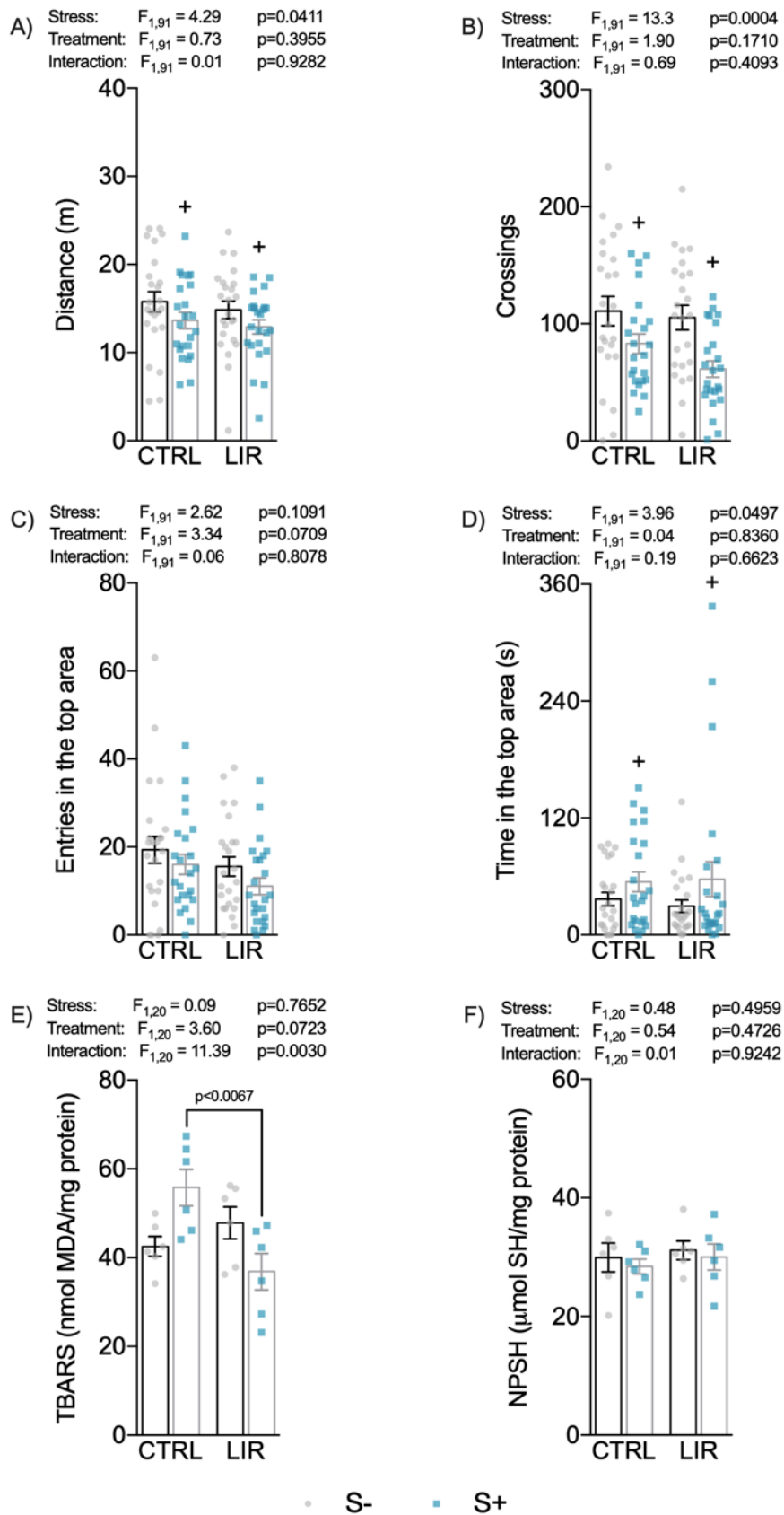
**Fig. 2.** Effects of liraglutide (LIR; 50, 100, and 200 µg/kg) on distance traveled (A), number of crossings (B), entries (C), and time in the top area (D) in the novel tank test. Data are expressed as mean ± S.E.M. One-way ANOVA/Tukey. n=17-18.

Figure 2 shows the acute effects of liraglutide on behavioral parameters in the NTT. No significant effects of liraglutide were observed after acute treatment.



**Fig. 3.** Effects of liraglutide (LIR; 50, 100, and 200  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ) on time in the lit side (A) and the number of crossings (B) in the light/dark test. Data are expressed as mean  $\pm$  S.E.M. Two-way ANOVA/Tukey. \* $p < 0.05$  x CTRL male.  $n = 17-20$ .

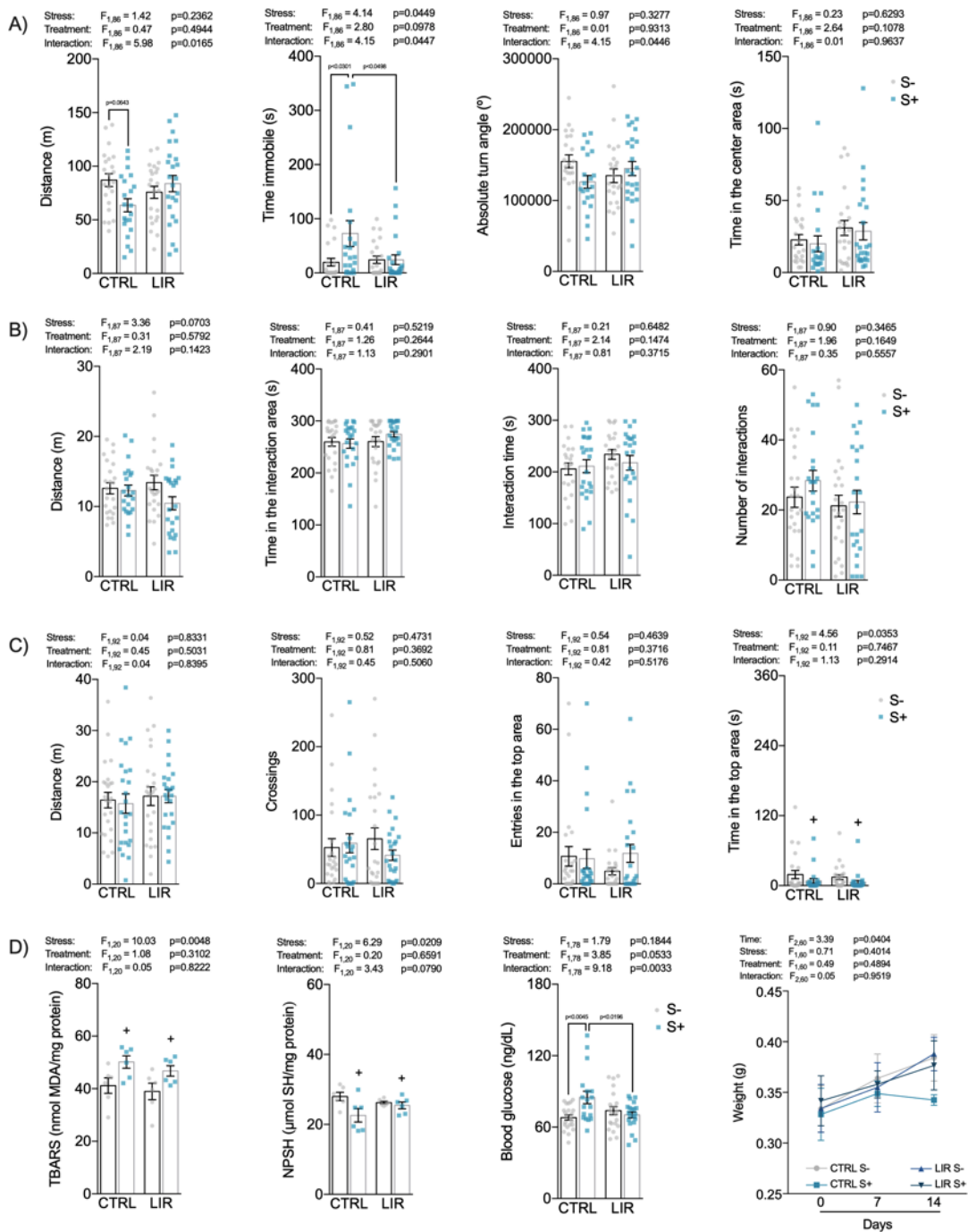
Figure 3 shows the acute effects of liraglutide on behavioral parameters in the LDT. For time on the lit side, two-way ANOVA revealed an interaction between sex and treatment factors. One-way ANOVA followed by Tukey's post hoc analysis restricted by sex, revealed that male zebrafish administered the highest liraglutide dose spent more time in the lit side than controls ( $p < 0.05$ , Fig. 3A). No significant effects were observed in the number of crossings (Fig. 3B).



**Fig. 4.** Effects of liraglutide (LIR; 200  $\mu\text{g/kg}$ ) on distance traveled (A), number of crossings (B), entries (C) and time (D) in the top area, lipid peroxidation (E), and non-protein thiols (F) in the acute restraint stress. CTRL, control;

LIR, liraglutide; S-, non-stressed; S+, stressed. Data are expressed as mean  $\pm$  S.E.M. Two-way ANOVA/Tukey. n=24 and n=6 (pool) for behavioral and biochemical analyses, respectively.

The effects of liraglutide on behavioral and oxidative status parameters in zebrafish submitted to ARS and tested in the NTT are presented in Figure 4. Two-way ANOVA revealed a main effect of stress on the total distance traveled (Fig. 4A), number of crossings (Fig. 4B), and the time spent in the top area (Fig. 4D). Liraglutide did not prevent the effects of acute stress on these behavioral parameters. ARS also increased lipid peroxidation, and liraglutide was able to prevent this effect (Fig. 4E). Liraglutide did not alter the behavioral and oxidative status parameters in non-stressed animals. No effects were observed for NPSH levels.



**Fig. 5.** Effects of liraglutide (LIR; 50  $\mu\text{g/kg}$ ) in zebrafish submitted to the unpredictable chronic stress in the open tank test (Fig. 5A, day 15); in the social interaction test (Fig. 5B, day 16); in the novel tank test (Fig. 5C, day 17); in the biochemical parameters, blood glucose and weight (Fig. 5D, day 17). CTRL, control; LIR, liraglutide; S-, non-stressed; S+, stressed. Data are expressed as mean  $\pm$  S.E.M. Two-way ANOVA/Tukey.  $n=21-24$  (A);  $n=22-23$  (B);  $n=24$  (C);  $n=5-6$  (D). Three-way ANOVA/Tukey was used to analyze bodyweight.  $n=6$ .

Figure 5 shows the influence of liraglutide on behavioral outcomes in zebrafish submitted to UCS. Two-way ANOVA revealed a main effect of stress on time immobile for the OTT and interaction between both factors on total distance, time immobile, and absolute turn angle. Post hoc analysis revealed that animals exposed to UCS showed a tendency for lower

distance traveled ( $p= 0.0643$ ), and they spent more time immobile. Liraglutide blocked these effects (Fig. 5A). No significant effects were observed in SI test (Fig. 5B). In the NTT, as expected, stress-exposed animals spent less time in the top area. Liraglutide was devoid of effects in the NTT (Fig. 5C).

In the biochemical parameters (Fig. 5D), chronic stress increased lipid peroxidation and decreased antioxidant defenses (NPSH levels). Liraglutide was unable to block these alterations. There was an increase in blood glucose levels in stressed animals, which was blocked by treatment with liraglutide. Despite the tendency of liraglutide to block the effects of UCS on animals' weight gain, no significant effects were observed except for the main effect of time.

#### 4. DISCUSSION

In this work, we demonstrated the behavioral and biochemical effects of liraglutide administration to adult zebrafish. Initially, liraglutide was evaluated in two protocols (NTT and LDT) after a single administration to determine the effects of this drug on locomotor, exploratory, and anxiety parameters. Finally, considering the comorbidity between diabetes and stress-related disorders such as anxiety and depression, we studied the effects of liraglutide in both acute and chronic stress models.

The NTT is a vertical exploratory test in which bottom-dwelling is analog to the thigmotaxis displayed by rodents in the open-field test (OFT) (LEVIN; BENCAN; CERUTTI, 2007; MOCELIN et al., 2015). Anxiolytic drugs such as buspirone, fluoxetine, and diazepam increase the time zebrafish spend in the top area in the NTT (BENCAN; SLEDGE; LEVIN, 2009; EGAN et al., 2009; GEBAUER et al., 2011; MOCELIN et al., 2015; REIS et al., 2019). In the LDT, anxiolytic drugs such as clonazepam, bromazepam, diazepam, and buspirone, increase the time zebrafish spend in the lit side of the apparatus (GEBAUER et al., 2011; MOCELIN et al., 2015; REIS et al., 2019). Here, we found that acute treatment with liraglutide did not affect the locomotor and exploratory behaviors in zebrafish, assessed by the total distance traveled and the number of crossings between areas in the NTT. The same was observed when animals were chronically exposed to liraglutide for seven days (Fig. S1). In the LDT, the highest dose of liraglutide (200  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ) induced anxiolytic-like behavior, i.e., increased the time spent in the lit side of the apparatus. This anxiolytic-like behavior in the LDT was observed only in male

zebrafish. The sex-dependent effect of liraglutide needs further investigation. Previous studies in zebrafish have shown that males are generally bolder in social interactions than females (ARIYOMO; CARTER; WATT, 2013; DAHLBOM et al., 2012; MORETZ; MARTINS; ROBISON, 2007), exploring more new environments (REOLON et al., 2018), and showing greater aggressiveness and cortisol levels when exposed to chronic stress (RAMBO et al., 2017). However, females have better memory acquisition in some cognitive tests such as inhibitory avoidance (REOLON et al., 2018), but not in others such as in the plus-maze (SISON; GERLAI, 2010). Some studies have shown there are sex-dependent responses when animals are exposed to drugs of abuse such as cocaine, the effects of the withdrawal being more intense and persistent in males than in females, but the related mechanism of action remains to be investigated (LÓPEZ PATIÑO et al., 2008). In general, studies showing differences in pharmacological responses between males and females in this species are scarce and warrants further investigation.

There are many acute stress protocols established for zebrafish (ABREU et al., 2014; BLAZINA; VIANNA; LARA, 2013; PIATO et al., 2011b). For example, restraining zebrafish in a small tube induces a consistent anxiety-like behavior, decreasing the time and entries in the top area of the NTT apparatus. Despite the robust effects on anxiety outcomes, the effects of the ARS on locomotor parameters are heterogeneous, increasing (GHISLENI et al., 2012), decreasing (REIS et al., 2019), and sometimes not affecting (ASSAD et al., 2020; PIATO et al., 2011b) locomotion. These contradictory results concerning the effects of ARS on zebrafish locomotion could be related to the different protocols used (restraint time, for example) in the different studies and/or methods used for quantifying the behavior. Here, 90 min of ARS decreased the locomotor parameters and induced an apparent anxiogenic behavior, whereas liraglutide did not prevent these phenotypes. Moreover, ARS increased lipid peroxidation. This result is in agreement with our previous study (DAL SANTO et al., 2014). Liraglutide presented neuroprotective effects in our study, blocking the lipoperoxidation induced by acute stress. The effects of GLP-1R agonists in animal models of anxiety are conflicting. For example, intracerebroventricularly-injected GLP-1 induced anxiogenic effects in the elevated plus-maze test in rats (GULEC; ISBIL-BUYUKCOSKUN; KAHVECI, 2010). Moreover, liraglutide was anxiogenic in the OFT in rats (KAMBLE et al., 2016). However, exenatide showed anxiolytic and antidepressant-like effects in a diabetic mouse model (KOMSUOGLU CELIKYURT et al.,



2014) and liraglutide induced anxiolytic effects in elevated plus-maze in rats (SHARMA et al., 2015). In a mice study, both exenatide and liraglutide did not affect anxiety levels in the light/dark test, but both decreased distance and rearing (KRASS et al., 2012). Therefore, the *per se* effects of GLP-1R agonists are very conflicting, and it can be explained, at least in part, by the different doses used in these studies.

Mental disorders such as depression and anxiety present complex neurobiology, and the mechanisms related to these conditions are not entirely understood. The gut-brain axis and neuropeptides like GLP-1 are rising as potential key regulators of behavior (POZZI et al., 2019). Animal models of chronic stress have been used to recapitulate the phenotypes observed in patients with mood disorders (WILLNER, 2005, 2017). Specifically, in zebrafish, the UCS induces behavioral, neurochemical, and molecular alterations that resemble the clinical presentation of patients with anxiety or depressive disorders. Antidepressants and anxiolytics have been previously shown to block the effects of chronic stress in zebrafish (MARCON et al., 2016; SONG et al., 2017). Moreover, drugs with antioxidant and neuroprotective mechanisms have also shown protective effects in this model (MARCON et al., 2019; MOCELIN et al., 2019b). Here, we submitted zebrafish to UCS for two weeks. After this period, zebrafish behavior was assessed in three tests: OTT, SI, and NTT. We extended the behavioral outcomes reported in previous studies from our group to expand the characterization of the impact of UCS in zebrafish. In the OTT, UCS decreased the distance and absolute turn angle and increased the immobility time. Liraglutide was able to block these effects. As expected, in the NTT, the UCS decreased the time in the top area. In the social interaction test, however, no significant effects were observed. Our results replicate and reinforce previous studies showing that UCS induces anxiety-like behavior in the NTT (MARCON et al., 2016, 2019; MOCELIN et al., 2019b; PIATO et al., 2011a). Liraglutide did not prevent the effects of UCS on those last two behavior tests. UCS also increased lipid peroxidation and decreased the levels of an important antioxidative defense in the brain. Previous studies reported that UCS promoted an imbalance in oxidative status, increased lipoperoxidation, and decreased antioxidant defenses (MARCON et al., 2018, 2019; MOCELIN et al., 2019b). Although liraglutide counteracted lipid peroxidation induced by an acute stressor, it did block the neurochemical effects of chronic stress. In rodents, there is some evidence regarding the positive effects of GLP-1R agonists in chronic stress. For example,

liraglutide diminished depressive- and anxiety-like phenotypes induced by chronic administration of corticosterone. This effect can be related to modulation of the hypothalamus-pituitary-adrenal (HPA) axis (WEINA et al., 2018). In contrast, another study has shown no benefit of using GLP-1R agonists in models of depression/anxiety. Fourteen days of treatment with exenatide or liraglutide did not affect the anxiety level in LDT nor induced an antidepressant-like effect in the forced swimming test in mice (KRASS et al., 2015). In the same study, chronic treatment with liraglutide did not affect depression-related behaviors in Flinders Sensitive Line rats, a genetic model of depression. These divergent results can be explained, at least in part, by the doses and the administration route used in the studies. Despite these inconsistencies, in our study, liraglutide prevented some, but not all, behaviors induced by UCS.

Here, UCS increased glycemia and decreased weight gain. Liraglutide prevented the effects of UCS on glycemia without effects on zebrafish weight. In all doses, liraglutide per se did not alter the glycemia (see Fig. S1). In higher doses, the drug affected the weight gain after 7-days treatment (Fig. S1). Although liraglutide induces a clear meal-dependent hypoglycemic effect in mammals through interaction with GLP-1R, the peripheral effects of GLP-1R agonists in the teleost fish are distinct (MOJSOV, 2000). GLP-1 has a glucagon-like activity in teleost fish, increasing glycemia through hepatic glycogenolysis and gluconeogenesis, an antagonistic response to insulin (MOMMSEN; ANDREWS; PLISETSKAYA, 1987; PLISETSKAYA; MOMMSEN, 1996; YEUNG et al., 2002). Despite this divergent response between mammals and fish, the central effects are conserved, as GLP-1 controls feeding behavior in the same manner in both groups (SILVERSTEIN et al., 2001; TURTON et al., 1996). Despite the hyperglycemic effects of GLP-1R activation in zebrafish, here liraglutide prevented the increase in circulating glucose induced by UCS. Although this may be an unexpected result, the effects of GLP-1R agonists in zebrafish are poorly understood.

The high comorbidity between mental disorders and diabetes is explained by a myriad of interactions including central and peripheral factors as a bidirectional association that results in not only alterations in the glucose and insulin metabolism but also oxidative damage and inflammation (CARTER; SWARDFAGER, 2016; GRIGOLON et al., 2019; NEFS et al., 2012, 2019). The role of GLP-1 in the stress response is recent (GHOSAL; MYERS; HERMAN, 2013). Few studies have investigated GLP-1R agonists' effects in acute/chronic stress, even in mice

and rats. In zebrafish, we suggest liraglutide improves the global stress response, and these effects can be explained, at least in part, by its antioxidant effects, but the mechanisms need to be better studied.

## **5. CONCLUSION**

Liraglutide is part of a new generation of drugs approved for glycemic control in diabetic patients. Recent findings suggested GLP-1R agonists may be effective in treating mental disorders, but only a few studies assessed their effects in stress-related mental disorders. Our study adds to a growing body of literature demonstrating GLP-1R agonists' role in modulating behavior and homeostasis after acute or chronic stress. Whereas diabetic patients are prone to developing mental disorders, a drug able to treat both conditions would reduce costs, adverse effects, and nonadherence to treatment. Therefore, GLP-1R agonists are potential candidates to be repurposed for mental disorders; however, more studies are necessary to elucidate the mechanisms of liraglutide in preclinical and clinical studies.

## **FUNDING**

This work was supported by the National Council of Technological and Scientific Development (CNPq, Proc. 401162/2016-8, and 302800/2017-4); P.B, R.M, and M.M are recipients of a fellowship from the Brazilian agency Coordination for the Improvement of Higher Education Personnel (CAPES); A.S is the recipient of a fellowship from CNPq.

## **AUTHOR CONTRIBUTION**

Conceived and designed the experiments: PB, RM, AR, RG, AP; Performed the experiments: PB, RM, MM, AS; Analyzed the data: PB, RM, AS, AH, AP; Contributed reagents/materials/analysis tools: AP; Wrote the paper and prepared figures: PB, RM, AH, AP; Authored or reviewed drafts of the paper: all authors; Approved the final draft: all authors.

## **ACKNOWLEDGMENTS**

The authors extend their sincere thanks to the LAPCOM team members for their contribution.

## CONFLICT OF INTEREST

All authors declare that they have no conflicts of interest.

## ETHICAL STATEMENT

The Ethics Committee of the Federal University of Rio Grande do Sul approved all protocols (process number # 32485). The manipulation and animal care were conducted according to the National Institute of Health Guide for Care and Use of Laboratory Animals and aimed to minimize the discomfort, suffering, and the number of animals used.

## REFERENCES

ABDELAZIZ, A. I. et al. Activation of pCREB/Nrf-2 signaling mediates re-positioning of liraglutide as hepato-protective for methotrexate -induced liver injury (MILI). **Food and Chemical Toxicology: An International Journal Published for the British Industrial Biological Research Association**, v. 132, p. 110719, out. 2019.

ABREU, M. S. DE et al. Diazepam and fluoxetine decrease the stress response in zebrafish. **PLoS One**, v. 9, n. 7, p. e103232, 2014.

ARIYOMO, T. O.; CARTER, M.; WATT, P. J. Heritability of boldness and aggressiveness in the zebrafish. **Behavior Genetics**, v. 43, n. 2, p. 161–167, mar. 2013.

ASSAD, N. et al. Acute Restraint Stress Evokes Anxiety-Like Behavior Mediated by Telencephalic Inactivation and GabAergic Dysfunction in Zebrafish Brains. **Scientific Reports**, v. 10, n. 1, p. 5551, 26 2020.

BENCAN, Z.; SLEDGE, D.; LEVIN, E. D. Buspirone, chlordiazepoxide and diazepam effects in a zebrafish model of anxiety. **Pharmacology, Biochemistry, and Behavior**, v. 94, n. 1, p. 75–80, nov. 2009.

BENVENUTTI, R. et al. How do zebrafish respond to MK-801 and amphetamine? Relevance for assessing schizophrenia-relevant endophenotypes in alternative model organisms. **bioRxiv**, p. 2020.08.03.234567, 4 ago. 2020.

BLAZINA, A. R.; VIANNA, M. R.; LARA, D. R. The spinning task: a new protocol to easily assess motor coordination and resistance in zebrafish. **Zebrafish**, v. 10, n. 4, p. 480–485, dez. 2013.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, p. 248–254, 7 maio 1976.

CARTER, J.; SWARDFAGER, W. Mood and metabolism: Anhedonia as a clinical target in Type 2 diabetes. **Psychoneuroendocrinology**, v. 69, p. 123–132, 2016.

CHAVES FILHO, A. J. M. et al. The GLP-1 receptor agonist liraglutide reverses mania-like alterations and memory deficits induced by D-amphetamine and augments lithium effects in mice: Relevance for bipolar disorder. **Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry**, v. 99, p. 109872, 20 2020.

CITRARO, R. et al. Evaluation of the effects of liraglutide on the development of epilepsy and behavioural alterations in two animal models of epileptogenesis. **Brain Research Bulletin**, v. 153, p. 133–142, 2019.

DAHLBOM, S. J. et al. Aggression and monoamines: Effects of sex and social rank in zebrafish (*Danio rerio*). **Behavioural Brain Research**, v. 228, n. 2, p. 333–338, 17 mar. 2012.

DAL SANTO, G. et al. Acute restraint stress induces an imbalance in the oxidative status of the zebrafish brain. **Neuroscience Letters**, v. 558, p. 103–108, 13 jan. 2014.

DE SOUZA, A. G. et al. Prevention of pentylenetetrazole-induced kindling and behavioral comorbidities in mice by levetiracetam combined with the GLP-1 agonist liraglutide: Involvement of brain antioxidant and BDNF upregulating properties. **Biomedicine & Pharmacotherapy = Biomedecine & Pharmacotherapie**, v. 109, p. 429–439, jan. 2019.

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.

GEBAUER, D. L. et al. Effects of anxiolytics in zebrafish: similarities and differences between benzodiazepines, buspirone and ethanol. **Pharmacology, Biochemistry, and Behavior**, v. 99, n. 3, p. 480–486, set. 2011.

GHISLENI, G. et al. The role of CRH in behavioral responses to acute restraint stress in zebrafish. **Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry**, v. 36, n. 1, p. 176–182, 10 jan. 2012.

GHOSAL, S.; MYERS, B.; HERMAN, J. P. Role of central glucagon-like peptide-1 in stress regulation. **Physiology & Behavior**, v. 122, p. 201–207, 2 out. 2013.

GRIGOLON, R. B. et al. Association between diabetes and mood disorders and the potential use of anti-hyperglycemic agents as antidepressants. **Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry**, v. 95, p. 109720, 20 2019.

GULEC, G.; ISBIL-BUYUKCOSKUN, N.; KAHVECI, N. Effects of centrally-injected glucagon-like peptide-1 on pilocarpine-induced seizures, anxiety and locomotor and exploratory activity in rat. **Neuropeptides**, v. 44, n. 4, p. 285–291, ago. 2010.

HAN, X. et al. Liraglutide ameliorates obesity-related nonalcoholic fatty liver disease by regulating Sestrin2-mediated Nrf2/HO-1 pathway. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 525, n. 4, p. 895–901, 14 maio 2020.

HOLT, M. K.; TRAPP, S. The physiological role of the brain GLP-1 system in stress. **Cogent Biology**, v. 2, n. 1, p. 1229086, 31 dez. 2016.

KAHN, S. E.; HULL, R. L.; UTZSCHNEIDER, K. M. Mechanisms linking obesity to insulin resistance and type 2 diabetes. **Nature**, v. 444, n. 7121, p. 840–846, 14 dez. 2006.

KAMBLE, M. et al. Neurobehavioral effects of liraglutide and sitagliptin in experimental models. **European Journal of Pharmacology**, v. 774, p. 64–70, 5 mar. 2016.

KOMSUOGLU CELIKYURT, I. et al. Exenatide treatment exerts anxiolytic- and antidepressant-like effects and reverses neuropathy in a mouse model of type-2 diabetes. **Medical Science Monitor Basic Research**, v. 20, p. 112–117, 30 jul. 2014.

KRASNER, N. M. et al. Glucagon-like peptide-1 (GLP-1) analog liraglutide inhibits endothelial cell inflammation through a calcium and AMPK dependent mechanism. **PLoS One**, v. 9, n. 5, p. e97554, 2014.

KRASS, M. et al. Acute administration of GLP-1 receptor agonists induces hypolocomotion but not anxiety in mice. **Acta Neuropsychiatrica**, v. 24, n. 5, p. 296–300, out. 2012.

KRASS, M. et al. GLP-1 receptor agonists have a sustained stimulatory effect on corticosterone release after chronic treatment. **Acta Neuropsychiatrica**, v. 27, n. 1, p. 25–32, fev. 2015.

LEVIN, E. D.; BENCAN, Z.; CERUTTI, D. T. Anxiolytic effects of nicotine in zebrafish. **Physiology & Behavior**, v. 90, n. 1, p. 54–58, 30 jan. 2007.

LIM, G. E. et al. Insulin Regulates Glucagon-Like Peptide-1 Secretion from the Enteroendocrine L Cell. **Endocrinology**, v. 150, n. 2, p. 580–591, fev. 2009.

LIU, W. et al. Possible role of GLP-1 in antidepressant effects of metformin and exercise in CUMS mice. **Journal of Affective Disorders**, v. 246, p. 486–497, 01 2019.

LÓPEZ PATIÑO, M. A. et al. Gender differences in zebrafish responses to cocaine withdrawal. **Physiology & Behavior**, v. 95, n. 1–2, p. 36–47, 3 set. 2008.

LÓPEZ-FERRERAS, L. et al. Lateral hypothalamic GLP-1 receptors are critical for the control of food reinforcement, ingestive behavior and body weight. **Molecular Psychiatry**, v. 23, n. 5, p. 1157–1168, 2018.

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

MARCON, M. et al. Enriched environment prevents oxidative stress in zebrafish submitted to unpredictable chronic stress. **PeerJ**, v. 6, p. e5136, 5 jul. 2018.

MARCON, M. et al. Acetyl-L-carnitine as a putative candidate for the treatment of stress-related psychiatric disorders: Novel evidence from a zebrafish model. **Neuropharmacology**, v. 150, p. 145–152, 15 2019.

MEIER, J. J. GLP-1 receptor agonists for individualized treatment of type 2 diabetes mellitus. **Nature Reviews. Endocrinology**, v. 8, n. 12, p. 728–742, dez. 2012.

MOCELIN, R. et al. N-acetylcysteine prevents stress-induced anxiety behavior in zebrafish. **Pharmacology, Biochemistry, and Behavior**, v. 139 Pt B, p. 121–126, dez. 2015.

MOCELIN, R. et al. Withdrawal effects following repeated ethanol exposure are prevented by N-acetylcysteine in zebrafish. **Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry**, v. 93, p. 161–170, 13 2019a.

MOCELIN, R. et al. N-Acetylcysteine Reverses Anxiety and Oxidative Damage Induced by Unpredictable Chronic Stress in Zebrafish. **Molecular Neurobiology**, v. 56, n. 2, p. 1188–1195, fev. 2019b.

MOJISOV, S. Glucagon-like Peptide-1 (GLP-1) and the Control of Glucose Metabolism in Mammals and Teleost Fish. **Integrative and Comparative Biology**, v. 40, n. 2, p. 246–258, 1 abr. 2000.

MOMMSEN, T. P.; ANDREWS, P. C.; PLISETSKAYA, E. M. Glucagon-like peptides activate hepatic gluconeogenesis. **FEBS letters**, v. 219, n. 1, p. 227–232, 13 jul. 1987.

MOMMSEN, T. P.; MOJISOV, S. Glucagon-like peptide-1 activates the adenylyl cyclase system in rockfish enterocytes and brain membranes. **Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology**, v. 121, n. 1, p. 49–56, 1 set. 1998.

MORETZ, J. A.; MARTINS, E. P.; ROBISON, B. D. Behavioral syndromes and the evolution of correlated behavior in zebrafish. **Behavioral Ecology**, v. 18, n. 3, p. 556–562, 1 maio 2007.

NEFS, G. et al. Suboptimal glycemic control in type 2 diabetes: a key role for anhedonia? **Journal of Psychiatric Research**, v. 46, n. 4, p. 549–554, abr. 2012.

NEFS, G. et al. Comorbid elevated symptoms of anxiety and depression in adults with type 1 or type 2 diabetes: Results from the International Diabetes MILES Study. **Journal of Diabetes and Its Complications**, v. 33, n. 8, p. 523–529, 2019.

PANCOTTO, L. et al. Anxiolytic and anti-stress effects of acute administration of acetyl-L-carnitine in zebrafish. **PeerJ**, v. 6, p. e5309, 2018.

PIATO, Â. L. et al. Unpredictable chronic stress model in zebrafish (*Danio rerio*): behavioral and physiological responses. **Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry**, v. 35, n. 2, p. 561–567, 30 mar. 2011a.

PIATO, A. L. et al. Acute restraint stress in zebrafish: behavioral parameters and purinergic signaling. **Neurochemical Research**, v. 36, n. 10, p. 1876–1886, out. 2011b.

PLISETSKAYA, E. M.; MOMMSEN, T. P. Glucagon and glucagon-like peptides in fishes. **International Review of Cytology**, v. 168, p. 187–257, 1996.

PLISETSKAYA, EM. Pancreatic hormones and metabolism in ectotherm vertebrates: current views. **The Endocrinology of Growth, Development, and Metabolism in Vertebrates**, p. 265–287, 1993.

POZZI, M. et al. A systematic review of the antidepressant effects of glucagon-like peptide 1 (GLP-1) functional agonists. **Journal of Affective Disorders**, v. 257, 01 2019.

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

REIS, C. G. et al. Effects of N-acetylcysteine amide on anxiety and stress behavior in zebrafish. **Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology**, 25 nov. 2019.

REOLON, G. K. et al. Sex and the housing: Effects on behavior, cortisol levels and weight in zebrafish. **Behavioural Brain Research**, v. 336, p. 85–92, 15 2018.

RUSSELL-JONES, D. Molecular, pharmacological and clinical aspects of liraglutide, a once-daily human GLP-1 analogue. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 297, n. 1–2, p. 137–140, 15 jan. 2009.

SHARMA, A. N. et al. Glucagon-like peptide-1 (GLP-1) receptor agonist prevents development of tolerance to anti-anxiety effect of ethanol and withdrawal-induced anxiety in rats. **Metabolic Brain Disease**, v. 30, n. 3, p. 719–730, jun. 2015.

SILVERSTEIN, J. et al. Neuropeptide regulation of feeding in catfish, *Ictalurus punctatus*: A role for glucagon-like peptide-1 (GLP-1)? **Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology**, v. 129, p. 623–631, 1 jul. 2001.

SISON, M.; GERLAI, R. Associative learning in zebrafish (*Danio rerio*) in the plus maze. **Behavioural Brain Research**, v. 207, n. 1, p. 99–104, 11 fev. 2010.

SONG, C. et al. Modeling consequences of prolonged strong unpredictable stress in zebrafish: Complex effects on behavior and physiology. **Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry**, 26 ago. 2017.

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

TAUCHI, M. et al. Role of central glucagon-like peptide-1 in hypothalamo-pituitary-adrenocortical facilitation following chronic stress. **Experimental Neurology**, v. 210, n. 2, p. 458–466, abr. 2008.

TURTON, M. D. et al. A role for glucagon-like peptide-1 in the central regulation of feeding. **Nature**, v. 379, n. 6560, p. 69–72, 4 jan. 1996.

ULRICH-LAI, Y. M.; HERMAN, J. P. Neural regulation of endocrine and autonomic stress responses. **Nature reviews. Neuroscience**, v. 10, n. 6, p. 397–409, jun. 2009.



VALADAS, J. et al. Propiconazole induces abnormal behavior and oxidative stress in zebrafish. **Environmental Science and Pollution Research International**, v. 26, n. 27, p. 27808–27815, set. 2019.

WEINA et al. Liraglutide attenuates the depressive- and anxiety-like behaviour in the corticosterone induced depression model via improving hippocampal neural plasticity. **Brain Research**, v. 1694, p. 55–62, 27 abr. 2018.

WESTERFIELD, M. **The Zebrafish Book. A Guide for the Laboratory Use of Zebrafish (Danio rerio)**. 5th Edition ed. University of Oregon Press, Eugene.: [s.n.].

WHICHER, C. A. et al. Liraglutide and the management of overweight and obesity in people with schizophrenia, schizoaffective disorder and first-episode psychosis: protocol for a pilot trial. **Trials**, v. 20, n. 1, p. 633, 20 nov. 2019.

WILLNER, P. Chronic mild stress (CMS) revisited: consistency and behavioural-neurobiological concordance in the effects of CMS. **Neuropsychobiology**, v. 52, n. 2, p. 90–110, 2005.

WILLNER, P. The chronic mild stress (CMS) model of depression: History, evaluation and usage. **Neurobiology of Stress**, v. 6, p. 78–93, fev. 2017.

YAN, W. et al. The neuroprotection of liraglutide on diabetic cognitive deficits is associated with improved hippocampal synapses and inhibited neuronal apoptosis. **Life Sciences**, v. 231, p. 116566, 15 ago. 2019.

YEUNG, C.-M. et al. Isolation and Structure-Function Studies of a Glucagon-Like Peptide 1 Receptor from Goldfish *Carassius auratus*: Identification of Three Charged Residues in Extracellular Domains Critical for Receptor Function. **Endocrinology**, v. 143, n. 12, p. 4646–4654, 1 dez. 2002.

ZHANG, L. et al. The Novel Dual GLP-1/GIP Receptor Agonist DA-CH5 Is Superior to Single GLP-1 Receptor Agonists in the MPTP Model of Parkinson's Disease. **Journal of Parkinson's Disease**, v. 10, n. 2, p. 523–542, 2020.

ZHANG, R. et al. Glucocorticoid regulation of preproglucagon transcription and RNA stability during stress. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 106, n. 14, p. 5913–5918, 7 abr. 2009.

ZHANG, Y. et al. Liraglutide Ameliorates Hyperhomocysteinemia-Induced Alzheimer-Like Pathology and Memory Deficits in Rats via Multi-molecular Targeting. **Neuroscience Bulletin**, v. 35, n. 4, p. 724–734, ago. 2019.

## 4 DISCUSSÃO

Os resultados obtidos neste trabalho demonstraram os efeitos comportamentais e bioquímicos da liraglutida em peixes-zebra adultos. Inicialmente, foi realizada uma avaliação dos efeitos do fármaco em dois protocolos (NTT e LDT) a fim de averiguar parâmetros locomotores, exploratórios e de ansiedade. Finalmente, considerando a comorbidade entre diabetes e transtornos relacionados ao estresse, como ansiedade e depressão, estudamos os efeitos da liraglutida em modelos de estresse agudo e crônico.

Dentre os resultados obtidos, foi possível observar pela primeira vez que a liraglutida possui efeito tipo-ansiolítico no teste de claro/escuro quando administrada de forma aguda em machos. Não foram observados efeitos nos testes de tanque novo e no teste de estresse agudo por contenção. Além disso, o tratamento crônico com liraglutida não induz *per se* alterações comportamentais no teste de tanque novo nem na glicemia. Apesar da tendência do fármaco em bloquear os efeitos do ECI no ganho de peso dos animais, não foram observados efeitos significativos, exceto para o efeito principal do tempo. Quando avaliado os efeitos da liraglutida frente ao ECI nos testes de OTT, SI e NTT, nos dois últimos, liraglutida não preveniu os efeitos do estresse, já no OTT foram observadas alterações significantes, bem como nos testes bioquímicos e na glicemia.

No teste de tanque novo, o tratamento agudo com liraglutida não afetou a locomoção e a atividade exploratória dos animais, avaliados pela distância total e número de cruzamentos entre as diferentes zonas do aquário (inferior, média e topo). Além disso, a liraglutida não mostrou *per se* efeito tipo-ansiolítico, avaliado através do número de entradas e tempo no topo do aquário. Estudos já demonstraram que ansiolíticos como a fluoxetina, clonazepam, diazepam, buspirona aumentam o número de entradas e o tempo de permanência na zona superior do aquário (EGAN et al., 2009; GEBAUER et al., 2011; SCHAEFER et al., 2015) enquanto que fármacos/drogas (cafeína, MDMA) ou intervenções ansiogênicas (estresse por perseguição, exposição à substância de alarme, retirada de álcool) diminuem o número de entradas e o tempo de permanência na zona superior do aquário (EGAN et al., 2009; MARCON et al., 2019; PANCOTTO et al., 2018; RIHEL et al., 2010).

No teste de claro/escuro, o tratamento com liraglutida (50, 100 e 200 µg/kg) não alterou os parâmetros avaliados. Entretanto, quando os dados foram separados por sexo, macho tratados com a maior dose (200 µg/kg) aumentaram o tempo de permanência no lado claro do aparato, indicando efeito tipo-ansiolítico. É importante ressaltar, que em nenhuma das doses testadas observou-se alteração na atividade locomotora dos animais. O teste de claro/escuro é amplamente utilizado para avaliação de compostos com potencial efeito ansiolítico. Compostos como os benzodiazepínicos (clonazepam, bromazepam, diazepam), fluoxetina, buspirona e álcool aumentam o tempo de permanência de peixes-zebra no lado claro do aparato (GEBAUER et al., 2011; MAGNO et al., 2015). Além disso, compostos como N-acetilcisteína e L-acetilcarnitina apresentam o mesmo efeito, apesar de não apresentarem efeitos no teste de tanque novo (MARCON et al., 2019; MOCELIN et al., 2015; PANCOTTO et al., 2018).

O efeito sexo-dependente da liraglutida necessita de melhor investigação. Estudos anteriores em peixes-zebra mostraram que machos são geralmente mais ousados em interações sociais do que fêmeas (ARIYOMO; CARTER; WATT, 2013; DAHLBOM et al., 2012; MORETZ; MARTINS; ROBISON, 2007), exploram mais ambientes novos (REOLON et al., 2018), e apresentam maior agressividade e níveis de cortisol quando expostos ao estresse crônico (RAMBO et al., 2017). Entretanto, fêmeas possuem melhor aquisição de memória em alguns testes cognitivos como esquiva inibitória (REOLON et al., 2018), mas não em outros como no labirinto de cruz elevado (SISON; GERLAI, 2010). Alguns trabalhos mostram que há respostas dependente de sexo quando os animais são expostos a drogas de abuso como a cocaína, sendo os efeitos da retirada mais intensos e persistentes em machos do que em fêmeas, mas o mecanismo de ação relacionado ainda carece de investigação (LÓPEZ PATIÑO et al., 2008). Portanto, estudos que mostrem diferenças nas respostas farmacológicas entre machos e fêmeas nessa espécie são escassos e esse trabalho é o primeiro a mostrar que os machos, mas não as fêmeas, respondem à liraglutida no teste de claro/escuro.

No teste de estresse agudo por contenção, os animais foram mantidos por 90 minutos em um tubo sem possibilidade de movimentação. Animais estressados apresentaram diminuição na distância, número de cruzamentos e aumento do tempo de permanência no topo. Provavelmente o estresse foi tão intenso que prejudicou a

capacidade do animal em explorar adequadamente as diferentes zonas do aquário, causando claro efeito motor. O aumento no tempo de permanência no topo não pode ser interpretado como efeito tipo-ansiolítico devido à diminuição da capacidade exploratório/motora do animal. Os resultados disponíveis na literatura com esse protocolo são bastante divergentes. Ghisleni et al. (2012) mostraram que animais estressados por 90 minutos apresentaram aumento no número de cruzamentos, distância, velocidade média e ângulo absoluto de virada. Já em estudo realizado por Piato et al. (2011b), animais estressados por 90 minutos apresentaram diminuição no tempo de permanência na zona superior do aquário, sem efeitos sobre a locomoção e comportamento social dos animais. As diferenças observadas nesses trabalhos podem ser justificadas pelas condições experimentais utilizadas como por exemplo, a forma de quantificação dos comportamentos e os diferentes tipos de aparato para avaliação comportamental, entre outras possibilidades. A liraglutida não foi capaz de prevenir os efeitos comportamentais induzidos pelo estresse agudo por contenção.

Posteriormente, avaliamos os efeitos da administração crônica de liraglutida sobre parâmetros comportamentais e bioquímicos em peixes-zebra. A liraglutida não induz alterações *per se* no teste de tanque novo. Além disso, a administração crônica não afeta a glicemia. Apesar de ser clinicamente utilizada como hipoglicemiante, a liraglutida não causa hipoglicemia em indivíduos saudáveis (JACKSON et al., 2010; OSTAWAL et al., 2016). O resultado observado no peso dos animais está de acordo com a indicação clínica desse fármaco para o tratamento da obesidade. Clinicamente a dose utilizada para obesidade é de aproximadamente 43 µg/kg/dia. Ainda que os efeitos sobre o peso tenham sido observados nas doses de 100 e 200 µg/kg/dia e não na dose de 50 µg/kg/dia, é importante consideramos as diferenças farmacocinéticas entre as espécies ainda pouco compreendidas.

A avaliação dos efeitos da liraglutida no modelo de ECI trouxe achados valiosos para compreensão da ação do fármaco no organismo modelo utilizado nesse estudo. O ECI induz alterações comportamentais, neuroquímicas e moleculares que se assemelham aos achados clínicos de pacientes com transtornos de ansiedade ou depressão. Neste trabalho os animais foram submetidos por duas semanas ao modelo de ECI. No OTT, o ECI diminuiu a distância percorrida e o ângulo absoluto de virada e aumentou o tempo de imobilidade. A liraglutida foi capaz de bloquear esses efeitos. Como esperado, no NTT, o UCS diminuiu o tempo na área superior. No teste de

interação social, no entanto, nenhum efeito significativo foi observado. Os resultados obtidos replicam e reforçam estudos anteriores que mostram que o ECI induz comportamento semelhante à ansiedade no NTT (MARCON et al., 2019; MOCELIN et al., 2019; PIATO et al., 2011a). A liraglutida não preveniu os efeitos do EIC nos dois últimos testes de comportamento. O EIC também aumentou a peroxidação lipídica e diminuiu os níveis de uma importante defesa antioxidante no cérebro. Estudos anteriores relataram que o EIC promoveu um desequilíbrio no estado oxidativo, aumentando a lipoperoxidação e diminuindo as defesas antioxidantes (MARCON et al., 2019; MOCELIN et al., 2019). A liraglutida foi capaz de prevenir a peroxidação lipídica induzida por estresse agudo, mas não foi capaz de reverter a lipoperoxidação em animais submetidos ao ECI. Em roedores, há algumas evidências sobre os efeitos positivos dos agonistas do GLP-1R frente ao estresse crônico. Por exemplo, a liraglutida diminuiu fenótipos depressivos induzidos pela administração crônica de corticosterona. Esse efeito pode estar relacionado à modulação do eixo HPA (WEINA et al., 2018). Entretanto, nenhum benefício do uso de agonistas do GLP-1R em modelos de depressão / ansiedade foi observado. Quatorze dias de tratamento com exenatida ou liraglutida não afetaram o nível de ansiedade no LDT, nem induziram um efeito do tipo antidepressivo no teste de nado forçado em camundongos (KRASS et al., 2015).

Nesse trabalho, o ECI aumentou a glicemia enquanto a liraglutida preveniu esse efeito, porém sem efeitos sobre o peso dos peixes-zebra. Quando avaliado *per se*, o fármaco não alterou a glicemia nas doses testadas (ver Fig. S1). Embora a liraglutida induza um efeito hipoglicêmico dependente da alimentação em mamíferos por meio da interação com o GLP-1R, os efeitos periféricos dos agonistas do GLP-1R nos peixes teleósteos são distintos (MOJSOV, 2000). O GLP-1 tem uma atividade semelhante ao glucagon em peixes teleósteos, aumentando a glicemia por meio da glicogenólise hepática e gliconeogênese, uma resposta antagônica à insulina (MOMMSEN; ANDREWS; PLISETSKAYA, 1987; PLISETSKAYA; MOMMSEN, 1996; YEUNG et al., 2002). Apesar dessa resposta divergente entre mamíferos e peixes, os efeitos centrais são conservados, pois o GLP-1 controla o comportamento alimentar da mesma maneira em ambos os grupos (SILVERSTEIN et al., 2001; TURTON et al., 1996). Apesar dos efeitos hiperglicêmicos da ativação do GLP1-R no peixe-zebra, aqui a liraglutida evitou o aumento da glicose induzida pelo ECI. Embora este possa

ser um resultado inesperado, os efeitos dos agonistas do GLP-1R no peixe-zebra ainda não são bem conhecidos.

A alta comorbidade entre transtornos mentais e diabetes é explicada por uma série de interações, incluindo fatores centrais e periféricos com uma associação bidirecional que resulta não apenas em alterações no metabolismo de glicose e insulina, mas também em danos oxidativos e inflamação (CARTER; SWARDFAGER, 2016; GRIGOLON et al., 2019; NEFS et al., 2012, 2019). O papel do GLP-1 na resposta ao estresse é recente (GHOSAL; MYERS; HERMAN, 2013). Poucos estudos investigaram os efeitos dos agonistas do GLP-1R frente ao estresse agudo/crônico, mesmo em modelos animais. No peixe-zebra, sugerimos que a liraglutida melhora a resposta geral ao estresse, e esses efeitos podem ser explicados, pelo menos em parte, por seus efeitos antioxidantes, porém os mecanismos precisam de uma maior investigação.

## 5 CONCLUSÃO

Os resultados demonstram, pela primeira vez, que a liraglutida é capaz de prevenir os efeitos comportamentais, bioquímicos e fisiológicos induzidos por estresse em peixes-zebra e fornecem evidências que justificam a continuidade dos estudos avaliando os efeitos da liraglutida em transtornos mentais associados ao estresse.

O peixe-zebra é um organismo modelo adequado para estudos sobre o reposicionamento de fármacos, bem como para a elucidação dos mecanismos neurobiológicos envolvidos nos transtornos causados pelo estresse.

## 6 REFERÊNCIAS

AGARWAL, S. D.; LANDON, B. E. Patterns in Outpatient Benzodiazepine Prescribing in the United States. **JAMA network open**, v. 2, n. 1, p. e187399, 2019.

ANDRADE, L. H. et al. Mental Disorders in Megacities: Findings from the São Paulo Megacity Mental Health Survey, Brazil. **PLOS ONE**, v. 7, n. 2, p. e31879, 14 fev. 2012.

ARIYOMO, T. O.; CARTER, M.; WATT, P. J. Heritability of boldness and aggressiveness in the zebrafish. **Behavior Genetics**, v. 43, n. 2, p. 161–167, mar. 2013.

ATHAUDA, D.; FOLTYNIE, T. The glucagon-like peptide 1 (GLP) receptor as a therapeutic target in Parkinson's disease: mechanisms of action. **Drug Discovery Today**, v. 21, n. 5, p. 802–818, 2016.

AVILES-OLMOS, I. et al. Exenatide and the treatment of patients with Parkinson's disease. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 123, n. 6, p. 2730–2736, jun. 2013.

BAANDRUP, L. et al. Pharmacological interventions for benzodiazepine discontinuation in chronic benzodiazepine users. **The Cochrane Database of Systematic Reviews**, v. 3, p. CD011481, 15 mar. 2018.

BANDELOW, B.; MICHAELIS, S.; WEDEKIND, D. Treatment of anxiety disorders. **Dialogues in Clinical Neuroscience**, v. 19, n. 2, p. 93–107, jun. 2017.

BARROS, M. B. DE A. et al. Relato de tristeza/depressão, nervosismo/ansiedade e problemas de sono na população adulta brasileira durante a pandemia de COVID-19. **Epidemiologia e Serviços de Saúde**, v. 29, p. e2020427, 24 ago. 2020.

BERRY, A. et al. Deletion of the lifespan determinant p66Shc improves performance in a spatial memory task, decreases levels of oxidative stress markers in the hippocampus and increases levels of the neurotrophin BDNF in adult mice. **Experimental Gerontology**, v. 43, n. 3, p. 200–208, 1 mar. 2008.

BUCKLE, D. R. et al. Glossary of terms used in medicinal chemistry. Part II (IUPAC Recommendations 2013). **Pure and Applied Chemistry**, v. 85, n. 8, p. 1725–1758, 31 jul. 2013.

CAPURON, L.; MILLER, A. H. Immune system to brain signaling: neuropsychopharmacological implications. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 130, n. 2, p. 226–238, maio 2011.

CARTER, J.; SWARDFAGER, W. Mood and metabolism: Anhedonia as a clinical target in Type 2 diabetes. **Psychoneuroendocrinology**, v. 69, p. 123–132, 2016.

CHANG, H. et al. The protocadherin 17 gene affects cognition, personality, amygdala structure and function, synapse development and risk of major mood disorders. **Molecular Psychiatry**, v. 23, n. 2, p. 400–412, fev. 2018.



COLLIER, R. Drug development cost estimates hard to swallow. **CMAJ**, v. 180, n. 3, p. 279–280, 3 fev. 2009.

COVER, K. K. et al. Mechanisms of estradiol in fear circuitry: implications for sex differences in psychopathology. **Translational Psychiatry**, v. 4, p. e422, 5 ago. 2014.

CRASKE, M. G. et al. Anxiety disorders. **Nature Reviews Disease Primers**, v. 3, p. 17024, 4 maio 2017.

CUIJPERS, P. et al. Interpersonal Psychotherapy for Mental Health Problems: A Comprehensive Meta-Analysis. **The American Journal of Psychiatry**, v. 173, n. 7, p. 680–687, 1 jul. 2016.

CUMMINGS, J. L.; ZHONG, K. Treatments for behavioural disorders in neurodegenerative diseases: drug development strategies. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 5, n. 1, p. 64, jan. 2006.

DAHLBOM, S. J. et al. Aggression and monoamines: Effects of sex and social rank in zebrafish (*Danio rerio*). **Behavioural Brain Research**, v. 228, n. 2, p. 333–338, 17 mar. 2012.

DANIELS, D.; MIETLICKI-BAASE, E. G. Glucagon-Like Peptide 1 in the Brain: Where Is It Coming From, Where Is It Going? **Diabetes**, v. 68, n. 1, p. 15–17, 1 jan. 2019.

DASKALAKIS, N. P. et al. New translational perspectives for blood-based biomarkers of PTSD: From glucocorticoid to immune mediators of stress susceptibility. **Experimental Neurology**, v. 284, n. Pt B, p. 133–140, out. 2016.

DE SOUZA, A. G. et al. Prevention of pentylenetetrazole-induced kindling and behavioral comorbidities in mice by levetiracetam combined with the GLP-1 agonist liraglutide: Involvement of brain antioxidant and BDNF upregulating properties. **Biomedicine & Pharmacotherapy = Biomedecine & Pharmacotherapie**, v. 109, p. 429–439, jan. 2019.

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.

FONZO, G. A. et al. Early Life Stress and the Anxious Brain: Evidence for A Neural Mechanism Linking Childhood Emotional Maltreatment to Anxiety in Adulthood. **Psychological medicine**, v. 46, n. 5, p. 1037–1054, abr. 2016.

GEBAUER, D. L. et al. Effects of anxiolytics in zebrafish: similarities and differences between benzodiazepines, buspirone and ethanol. **Pharmacology, Biochemistry, and Behavior**, v. 99, n. 3, p. 480–486, set. 2011.

GHISLENI, G. et al. The role of CRH in behavioral responses to acute restraint stress in zebrafish. **Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry**, v. 36, n. 1, p. 176–182, 10 jan. 2012.

GHOSAL, S.; MYERS, B.; HERMAN, J. P. Role of central glucagon-like peptide-1 in stress regulation. **Physiology & Behavior**, v. 122, p. 201–207, 2 out. 2013.

GIACOMINI, A. C. V. V. et al. Fluoxetine and diazepam acutely modulate stress induced-behavior. **Behavioural Brain Research**, v. 296, p. 301–310, 1 jan. 2016.

GOMEZ, A. F.; BARTHEL, A. L.; HOFMANN, S. G. Comparing the Efficacy of Benzodiazepines and Serotonergic Anti-Depressants for Adults with Generalized Anxiety Disorder: A meta-analytic review. **Expert opinion on pharmacotherapy**, v. 19, n. 8, p. 883–894, jun. 2018.

GOULARTE, J. F. et al. COVID-19 and mental health in Brazil: Psychiatric symptoms in the general population. **Journal of Psychiatric Research**, v. 132, p. 32–37, 1 jan. 2021.

GRIGOLON, R. B. et al. Association between diabetes and mood disorders and the potential use of anti-hyperglycemic agents as antidepressants. **Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry**, v. 95, p. 109720, 20 2019.

HARKAVYI, A. et al. Glucagon-like peptide 1 receptor stimulation reverses key deficits in distinct rodent models of Parkinson's disease. **Journal of Neuroinflammation**, v. 5, p. 19, 21 maio 2008.

HEPPNER, K. M. et al. Expression and distribution of glucagon-like peptide-1 receptor mRNA, protein and binding in the male nonhuman primate (*Macaca mulatta*) brain. **Endocrinology**, v. 156, n. 1, p. 255–267, jan. 2015.

HOFMANN, S. G.; WU, J. Q.; BOETTCHER, H. Effect of Cognitive Behavioral Therapy for Anxiety Disorders on Quality of Life: A Meta-Analysis. **Journal of consulting and clinical psychology**, v. 82, n. 3, p. 375–391, jun. 2014.

HOU, J. et al. Liraglutide, a long-acting GLP-1 mimetic, and its metabolite attenuate inflammation after intracerebral hemorrhage. **Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism: Official Journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism**, v. 32, n. 12, p. 2201–2210, dez. 2012.

HOVATTA, I.; JUHILA, J.; DONNER, J. Oxidative stress in anxiety and comorbid disorders. **Neuroscience Research**, v. 68, n. 4, p. 261–275, 1 dez. 2010.

HUNOT, S. et al. Nuclear translocation of NF- $\kappa$ B is increased in dopaminergic neurons of patients with Parkinson disease. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 94, n. 14, p. 7531–7536, 8 jul. 1997.

HWANG, M. J. et al. Contribution of estradiol levels and hormonal contraceptives to sex differences within the fear network during fear conditioning and extinction. **BMC Psychiatry**, v. 15, n. 1, p. 295, 18 nov. 2015.

ISACSON, R. et al. The glucagon-like peptide 1 receptor agonist exendin-4 improves reference memory performance and decreases immobility in the forced swim test. **European Journal of Pharmacology**, v. 650, n. 1, p. 249–255, 10 jan. 2011.

JACKSON, S. H. et al. Liraglutide (Victoza). **Pharmacy and Therapeutics**, v. 35, n. 9, p. 498–529, set. 2010.

KALUEFF, A. V.; STEWART, A. M.; GERLAI, R. Zebrafish as an emerging model for studying complex brain disorders. **Trends in Pharmacological Sciences**, v. 35, n. 2, p. 63–75, fev. 2014.

KEEFE, J. R. et al. A meta-analytic review of psychodynamic therapies for anxiety disorders. **Clinical Psychology Review**, v. 34, n. 4, p. 309–323, 1 jun. 2014.

KESSLER, R. C. et al. Epidemiology of anxiety disorders. **Current topics in behavioral neurosciences**, v. 2, p. 21–35, 2009.

KIECOLT-GLASER, J. K.; DERRY, H. M.; FAGUNDES, C. P. Inflammation: depression fans the flames and feasts on the heat. **The American Journal of Psychiatry**, v. 172, n. 11, p. 1075–1091, 1 nov. 2015.

KIM, D. S. et al. A New Treatment Strategy for Parkinson's Disease through the Gut-Brain Axis. **Cell Transplantation**, v. 26, n. 9, p. 1560–1571, set. 2017.

KRAMER, N. E. et al. A clinical model for identifying an inflammatory phenotype in mood disorders. **Journal of Psychiatric Research**, v. 113, p. 148–158, jun. 2019.

KRASNER, N. M. et al. Glucagon-like peptide-1 (GLP-1) analog liraglutide inhibits endothelial cell inflammation through a calcium and AMPK dependent mechanism. **PloS One**, v. 9, n. 5, p. e97554, 2014.

KRASS, M. et al. GLP-1 receptor agonists have a sustained stimulatory effect on corticosterone release after chronic treatment. **Acta Neuropsychiatrica**, v. 27, n. 1, p. 25–32, fev. 2015.

KUBICK, N. et al. Repurposing Zileuton as a Depression Drug Using an AI and In Vitro Approach. **Molecules (Basel, Switzerland)**, v. 25, n. 9, 5 maio 2020.

LEBRON-MILAD, K.; MILAD, M. R. Sex differences, gonadal hormones and the fear extinction network: implications for anxiety disorders. **Biology of Mood & Anxiety Disorders**, v. 2, p. 3, 7 fev. 2012.

LIU, W. et al. Possible role of GLP-1 in antidepressant effects of metformin and exercise in CUMS mice. **Journal of Affective Disorders**, v. 246, p. 486–497, 01 2019.

LÓPEZ PATIÑO, M. A. et al. Gender differences in zebrafish responses to cocaine withdrawal. **Physiology & Behavior**, v. 95, n. 1–2, p. 36–47, 3 set. 2008.

MAENG, L. Y.; MILAD, M. R. Sex differences in anxiety disorders: Interactions between fear, stress, and gonadal hormones. **Hormones and Behavior**, v. 76, p. 106–117, nov. 2015.

MAGNO, L. D. P. et al. Pharmacological study of the light/dark preference test in zebrafish (*Danio rerio*): Waterborne administration. **Pharmacology, Biochemistry, and Behavior**, v. 135, p. 169–176, ago. 2015.

MARCON, M. et al. Acetyl-L-carnitine as a putative candidate for the treatment of stress-related psychiatric disorders: Novel evidence from a zebrafish model. **Neuropharmacology**, v. 150, p. 145–152, 15 2019.

MASOOD, A. et al. Reversal of Oxidative Stress-Induced Anxiety by Inhibition of Phosphodiesterase-2 in Mice. **The Journal of pharmacology and experimental therapeutics**, v. 326, n. 2, p. 369–379, ago. 2008.

MCCLEAN, P. L. et al. The diabetes drug liraglutide prevents degenerative processes in a mouse model of Alzheimer's disease. **The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience**, v. 31, n. 17, p. 6587–6594, 27 abr. 2011.

MCCLEAN, P. L.; HÖLSCHER, C. Liraglutide can reverse memory impairment, synaptic loss and reduce plaque load in aged APP/PS1 mice, a model of Alzheimer's disease. **Neuropharmacology**, v. 76 Pt A, p. 57–67, jan. 2014.

MCEWEN, B. S. Allostasis and allostatic load: implications for neuropsychopharmacology. **Neuropsychopharmacology: Official Publication of the American College of Neuropsychopharmacology**, v. 22, n. 2, p. 108–124, fev. 2000.

MCEWEN, B. S. Protection and damage from acute and chronic stress: allostasis and allostatic overload and relevance to the pathophysiology of psychiatric disorders. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1032, p. 1–7, dez. 2004.

MEIER, J. J. GLP-1 receptor agonists for individualized treatment of type 2 diabetes mellitus. **Nature Reviews. Endocrinology**, v. 8, n. 12, p. 728–742, dez. 2012.

MELO, H. M.; SANTOS, L. E.; FERREIRA, S. T. Diet-Derived Fatty Acids, Brain Inflammation, and Mental Health. **Frontiers in Neuroscience**, v. 13, 2019.

MENDOZA-GARCÉS, L. et al. Differential expression of estrogen receptors in two hippocampal regions during the estrous cycle of the rat. **Anatomical Record (Hoboken, N.J.: 2007)**, v. 294, n. 11, p. 1913–1919, nov. 2011.

MILLER, A. H.; RAISON, C. L. The role of inflammation in depression: from evolutionary imperative to modern treatment target. **Nature Reviews. Immunology**, v. 16, n. 1, p. 22–34, jan. 2016.

MITTE, J. Meta-analysis of cognitive-behavioral treatments for generalized anxiety disorder: a comparison with pharmacotherapy. **American Psychological Association**, v. 131, n. 5, p. 785-95, jan. 2005.

MOCELIN, R. et al. N-acetylcysteine prevents stress-induced anxiety behavior in zebrafish. **Pharmacology, Biochemistry, and Behavior**, 7 ago. 2015.

MOCELIN, R. et al. Withdrawal effects following repeated ethanol exposure are prevented by N-acetylcysteine in zebrafish. **Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry**, v. 93, p. 161–170, 13 2019.

MOJISOV, S. Glucagon-like Peptide-1 (GLP-1) and the Control of Glucose Metabolism in Mammals and Teleost Fish. **Integrative and Comparative Biology**, v. 40, n. 2, p. 246–258, 1 abr. 2000.

MOMMSEN, T. P.; ANDREWS, P. C.; PLISETSKAYA, E. M. Glucagon-like peptides activate hepatic gluconeogenesis. **FEBS letters**, v. 219, n. 1, p. 227–232, 13 jul. 1987.

MOMMSEN, T. P.; MOJISOV, S. Glucagon-like peptide-1 activates the adenylyl cyclase system in rockfish enterocytes and brain membranes. **Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology**, v. 121, n. 1, p. 49–56, 1 set. 1998.

MORETZ, J. A.; MARTINS, E. P.; ROBISON, B. D. Behavioral syndromes and the evolution of correlated behavior in zebrafish. **Behavioral Ecology**, v. 18, n. 3, p. 556–562, 1 maio 2007.

MURROUGH, J. W. et al. Emerging drugs for the treatment of anxiety. **Expert Opinion on Emerging Drugs**, v. 20, n. 3, p. 393–406, set. 2015.

NAGAHARA, N. et al. Antioxidant enzyme, 3-mercaptopyruvate sulfurtransferase-knockout mice exhibit increased anxiety-like behaviors: a model for human mercaptolactate-cysteine disulfiduria. **Scientific Reports**, v. 3, 13 jun. 2013.

NEFS, G. et al. Suboptimal glycemic control in type 2 diabetes: a key role for anhedonia? **Journal of Psychiatric Research**, v. 46, n. 4, p. 549–554, abr. 2012.

NEFS, G. et al. Comorbid elevated symptoms of anxiety and depression in adults with type 1 or type 2 diabetes: Results from the International Diabetes MILES Study. **Journal of Diabetes and Its Complications**, v. 33, n. 8, p. 523–529, 2019.

OSTAWAL, A. et al. Clinical Effectiveness of Liraglutide in Type 2 Diabetes Treatment in the Real-World Setting: A Systematic Literature Review. **Diabetes Therapy**, v. 7, n. 3, p. 411–438, set. 2016.

PAJECKI, D. et al. Short-term use of liraglutide in the management of patients with weight regain after bariatric surgery. **Revista Do Colegio Brasileiro De Cirurgioes**, v. 40, n. 3, p. 191–195, jun. 2013.

PANAGAKI, T.; MICHAEL, M.; HÖLSCHER, C. Liraglutide restores chronic ER stress, autophagy impairments and apoptotic signalling in SH-SY5Y cells. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, p. 16158, 23 nov. 2017.

PANCOTTO, L. et al. Anxiolytic and anti-stress effects of acute administration of acetyl-L-carnitine in zebrafish. **PeerJ**, v. 6, p. e5309, 2018.

PATKI, G. et al. Tempol Treatment Reduces Anxiety-Like Behaviors Induced by Multiple Anxiogenic Drugs in Rats. **PLOS ONE**, v. 10, n. 3, p. e0117498, 20 mar. 2015.

PAVLIDIS, M.; THEODORIDI, A.; TSALAFOUTA, A. Neuroendocrine regulation of the stress response in adult zebrafish, *Danio rerio*. **Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry**, v. 60, p. 121–131, 3 jul. 2015.

PIATO, Â. L. et al. Unpredictable chronic stress model in zebrafish (*Danio rerio*): behavioral and physiological responses. **Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry**, v. 35, n. 2, p. 561–567, 30 mar. 2011a.

PIATO, A. L. et al. Acute restraint stress in zebrafish: behavioral parameters and purinergic signaling. **Neurochemical Research**, v. 36, n. 10, p. 1876–1886, out. 2011b.

PI-SUNYER, X. et al. A Randomized, Controlled Trial of 3.0 mg of Liraglutide in Weight Management. **New England Journal of Medicine**, v. 373, n. 1, p. 11–22, 2 jul. 2015.

PLISETSKAYA, E. M.; MOMMSEN, T. P. Glucagon and glucagon-like peptides in fishes. **International Review of Cytology**, v. 168, p. 187–257, 1996.

PLISETSKAYA, EM. Pancreatic hormones and metabolism in ectotherm vertebrates: current views. **The Endocrinology of Growth, Development, and Metabolism in Vertebrates**, p. 265–287, 1993.

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

RAMIC, E. et al. Assessment of the Antidepressant Side Effects Occurrence in Patients Treated in Primary Care. **Materia Socio-Medica**, v. 32, n. 2, p. 131–134, jun. 2020.

RAVINDRAN, L. N.; STEIN, M. B. The pharmacologic treatment of anxiety disorders: a review of progress. **The Journal of Clinical Psychiatry**, v. 71, n. 7, p. 839–854, jul. 2010.

REICHENPFADER, U. et al. Sexual Dysfunction associated with Second-Generation Antidepressants in Patients with Major Depressive Disorder: Results from a Systematic Review with Network Meta-Analysis. **Drug Safety**, v. 37, n. 1, p. 19–31, 1 jan. 2014.

REOLON, G. K. et al. Sex and the housing: Effects on behavior, cortisol levels and weight in zebrafish. **Behavioural Brain Research**, v. 336, p. 85–92, 15 2018a.

RÉUS, G. Z. et al. The role of inflammation and microglial activation in the pathophysiology of psychiatric disorders. **Neuroscience**, v. 300, p. 141–154, 6 ago. 2015.

RÉUS, G. Z. et al. **Relationship of Oxidative Stress as a Link between Diabetes Mellitus and Major Depressive Disorder**. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, v. 2019, p. 131-154, 3 mar. 2019.

RIHEL, J. et al. Zebrafish behavioral profiling links drugs to biological targets and rest/wake regulation. **Science (New York, N.Y.)**, v. 327, n. 5963, p. 348–351, 15 jan. 2010.

SANTIAGO SANTANA, J. M. et al. Oxidative stress and neuroinflammation in a rat model of co-morbid obesity and psychogenic stress. **Behavioural Brain Research**, v. 400, p. 112995, 26 fev. 2021.

SARTORI, S. B.; SINGEWALD, N. Novel pharmacological targets in drug development for the treatment of anxiety and anxiety-related disorders. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 204, p. 107402, 2019.

SCHAEFER, I. et al. The side-by-side exploratory test. **Behavioural Pharmacology**, v. 26, n. 7, p. 691–696, 1 out. 2015.

SHARMA, A. N. et al. Glucagon-like peptide-1 (GLP-1) receptor agonist prevents development of tolerance to anti-anxiety effect of ethanol and withdrawal-induced anxiety in rats. **Metabolic Brain Disease**, v. 30, n. 3, p. 719–730, jun. 2015.

SILVERSTEIN, J. et al. Neuropeptide regulation of feeding in catfish, *Ictalurus punctatus*: A role for glucagon-like peptide-1 (GLP-1)? **Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology**, v. 129, p. 623–631, 1 jul. 2001.

SINYAKOVA, N. A. et al. Effects of Fluoxetine and Potential Antidepressant 8-Trifluoromethyl 1,2,3,4,5-Benzopentathiepin-6-Amine Hydrochloride (TC-2153) on Behavior of *Danio rerio* Fish in the Novel Tank Test and Brain Content of Biogenic Amines and Their Metabolites. **Bulletin of Experimental Biology and Medicine**, v. 164, n. 5, p. 620–623, mar. 2018.

SIROTA, M. et al. Discovery and Preclinical Validation of Drug Indications Using Compendia of Public Gene Expression Data. **Science Translational Medicine**, v. 3, n. 96, p. 96ra77-96ra77, 17 ago. 2011.

SISON, M.; GERLAI, R. Associative learning in zebrafish (*Danio rerio*) in the plus maze. **Behavioural Brain Research**, v. 207, n. 1, p. 99–104, 11 fev. 2010.

SOLMI, M. et al. Safety of 80 antidepressants, antipsychotics, anti-attention-deficit/hyperactivity medications and mood stabilizers in children and adolescents with psychiatric disorders: a large scale systematic meta-review of 78 adverse effects. **World Psychiatry**, v. 19, n. 2, p. 214–232, 2020.

SOUZA, C. G. et al. Highly palatable diet consumption increases protein oxidation in rat frontal cortex and anxiety-like behavior. **Life Sciences**, v. 81, n. 3, p. 198–203, 27 jun. 2007.

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

STÜBNER, S. et al. Suicidal Ideation and Suicidal Behavior as Rare Adverse Events of Antidepressant Medication: Current Report from the AMSP Multicenter Drug Safety Surveillance Project. **International Journal of Neuropsychopharmacology**, v. 21, n. 9, p. 814–821, 22 jun. 2018.

TEICHER, M. H. et al. The effects of childhood maltreatment on brain structure, function and connectivity. **Nature Reviews. Neuroscience**, v. 17, n. 10, p. 652–666, 19 2016.

TURTON, M. D. et al. A role for glucagon-like peptide-1 in the central regulation of feeding. **Nature**, v. 379, n. 6560, p. 69–72, 4 jan. 1996.

WEINA et al. Liraglutide attenuates the depressive- and anxiety-like behaviour in the corticosterone induced depression model via improving hippocampal neural plasticity. **Brain Research**, v. 1694, p. 55–62, 27 abr. 2018.

WENZEL-SEIFERT, K.; WITTMANN, M.; HAEN, E. QTc Prolongation by Psychotropic Drugs and the Risk of Torsade de Pointes. **Deutsches Ärzteblatt International**, v. 108, n. 41, p. 687–693, out. 2011.

YEUNG, C.-M. et al. Isolation and Structure-Function Studies of a Glucagon-Like Peptide 1 Receptor from Goldfish *Carassius auratus*: Identification of Three Charged Residues in Extracellular Domains Critical for Receptor Function. **Endocrinology**, v. 143, n. 12, p. 4646–4654, 1 dez. 2002.

ZANNAS, A. S.; BINDER, E. B. Gene-environment interactions at the FKBP5 locus: sensitive periods, mechanisms and pleiotropism. **Genes, Brain, and Behavior**, v. 13, n. 1, p. 25–37, jan. 2014.



## Anexo A - Carta de aprovação da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA/UFRGS)

**UFRGS**UNIVERSIDADE FEDERAL  
DO RIO GRANDE DO SUL**PRÓ-REITORIA DE PESQUISA**

Comissão De Ética No Uso De Animais



### **CARTA DE APROVAÇÃO**

Comissão De Ética No Uso De Animais analisou o projeto:

**Número:** 32485

**Título:** AVALIACAO DO EFEITO DE UM AGONISTA DE GLP-1 (LIRAGLUTIDA) EM PEIXES-ZEBRA

**Vigência:** 01/10/2016 à 01/10/2020

**Pesquisadores:**

**Equipe UFRGS:**

ÂNGELO LUIS STAPASSOLI PIATO - coordenador desde 01/10/2016  
RADHARANI BENVENUTTI - Aluno de Mestrado desde 01/10/2016  
Pablo Ricardo Bertelli - Aluno de Doutorado desde 01/10/2016  
Riceri Naue Mocelin - Aluno de Doutorado desde 01/10/2016  
Matheus Felipe Marcon - Aluno de Doutorado desde 01/10/2016

***Comissão De Ética No Uso De Animais aprovou o mesmo , em reunião realizada em 08/05/2017 - SALA 330 DO ANEXO I DO PRÉDIO DA REITORIA - CAMPUS CENTRO - UFRGS-PAULO DA GAMA,110 BAIRRO FARROUPILHA -,em seus aspectos éticos e metodológicos, para a utilização de 495 peixes-zebra (Danio rerio), selvagens adultos jovens (mais de 3 meses de vida, 50/50 machos e fêmeas), pesando aproximadamente 200-300 mg, provenientes do Departamento de Bioquímica da UFRGS,, de acordo com os preceitos das Diretrizes e Normas Nacionais e Internacionais, especialmente a Lei 11.794 de 08 de novembro de 2008, o Decreto 6899 de 15 de julho de 2009, e as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), que disciplinam a produção, manutenção e/ou utilização de animais do filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem) em atividade de ensino ou pesquisa.***

Porto Alegre, Sexta-Feira, 19 de Maio de 2017

MARCELO MELLER ALIEVI  
Coordenador da comissão de ética

Anexo B - Material suplementar do manuscrito submetido ao periódico Progress in  
Neuropsychopharmacology & Biological Psychiatry

### SUPPLEMENTAL MATERIAL

#### ANTI-STRESS EFFECTS OF THE GLUCAGON-LIKE PEPTIDE-1 RECEPTOR AGONIST LIRAGLUTIDE IN ZEBRAFISH

Pablo R. Bertelli<sup>a,c#</sup>, Ricieri Mocelin<sup>c#</sup>, Matheus Marcon<sup>b</sup>, Adrieli Sachett<sup>b</sup>, Rosane Gomez<sup>a,b,c</sup>,  
Adriane R. Rosa<sup>a,c</sup>, Ana P. Herrmann<sup>a,c</sup>, Angelo Piato<sup>a,b,c</sup>

<sup>a</sup> Departamento de Farmacologia, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, RS, Brazil.

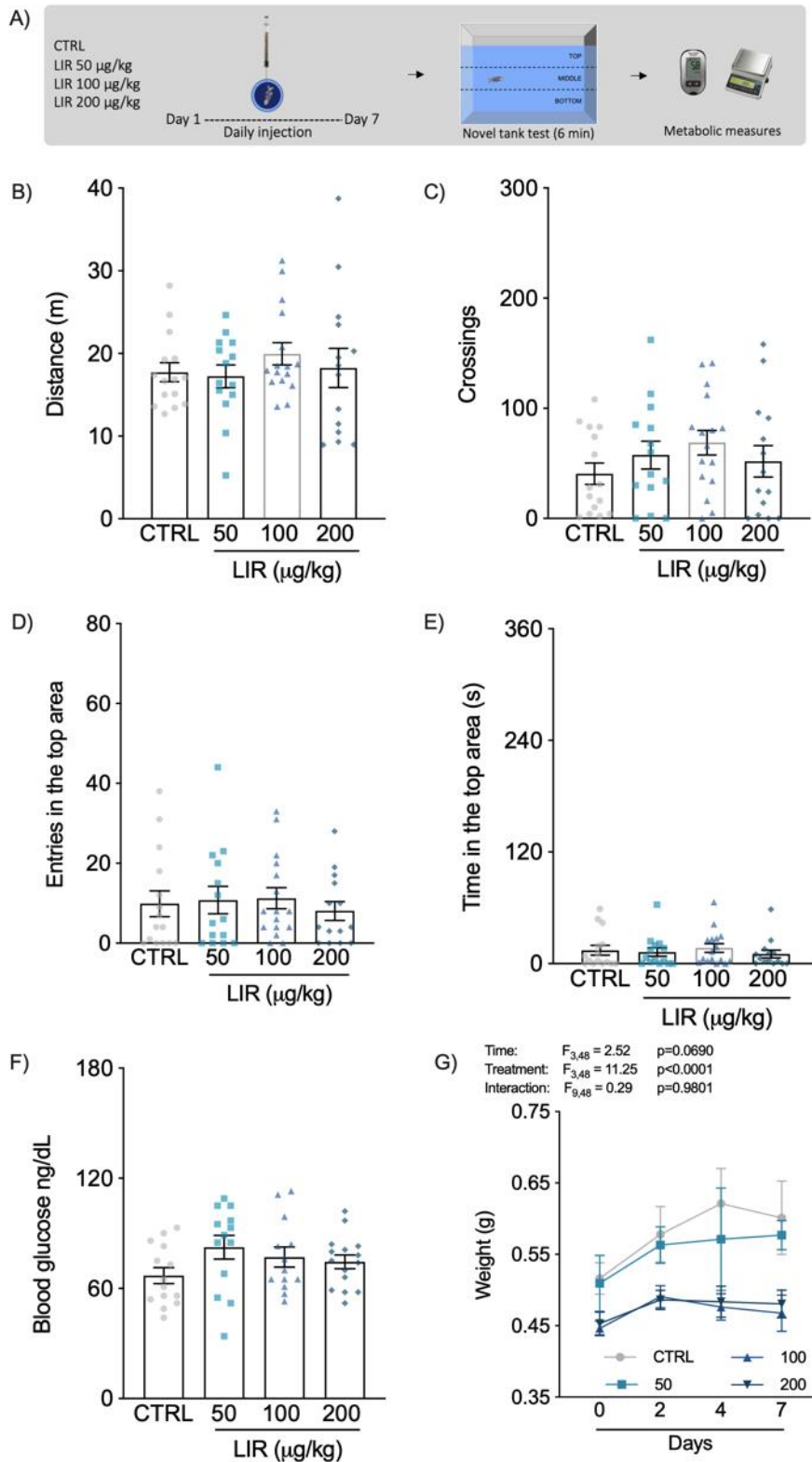
<sup>b</sup> Programa de Pós-graduação em Neurociências, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, RS, Brazil.

<sup>c</sup> Programa de Pós-graduação em Farmacologia e Terapêutica, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, RS, Brazil.

# The authors contributed equally to this manuscript.

\*Correspondence to:

Angelo Piato, Ph.D. Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas: Farmacologia e Terapêutica, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Avenida Sarmiento Leite, 500/305, Porto Alegre, RS 90050-170, Brazil; Phone/Fax: +55 51 33083121; E-mail address: angelopiato@ufrgs.br



**Fig. S1.** Experimental design (S1A). Effects of liraglutide (LIR; 50, 100, and 200 µg/kg) on behavior (distance traveled [S1B], number of crossings [S1C], entries [S1D] and time [S1E] in the top area in the novel tank test). Figures S1F and S1G show the effects of liraglutide (50, 100, and 200 µg/kg) on blood glucose and weight. Data are expressed as mean ± S.E.M. One-way ANOVA/Tukey (n=14-16). Bodyweight was analyzed by two-way ANOVA/Tukey (n=4).

Figure S1 shows the chronic effects of liraglutide on behavioral, blood glucose, and weight parameters. Figure S1A represents experimental design. One-way ANOVA followed by Tukey post hoc analysis showed no significant effects of liraglutide treatment on the behavioral parameters in the NTT (Fig. S1B-D). Regarding blood glucose, one-way ANOVA did not reveal any effects of liraglutide after seven days of treatment (Fig. S1F). Two-way ANOVA revealed a main effect of treatment, where animals treated with the highest doses of liraglutide (100 and 200  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ) had lower bodyweights as compared to controls (Fig. S1G).

DAY	1	2	3	4	5	6	7
MORNING	8h15	12h20	11h30	9h30	11h40	12h30	8h00
	tank change, three consecutive times with 30 min interval	crowding in a 250-mL beaker (50 min)	heating tank water to 18°C (30 min)	low water level on housing tanks until dorsal body wall was exposed (5 min)	cooling tank water to 18°C (30 min)	low water level on housing tanks until dorsal body wall was exposed (5 min)	crowding in a 250-mL beaker (50 min)
AFTERNOON	12h55	16h15	15h30	16h30	16h00	15h30	15h30
	cooling tank water to 18°C (30 min)	Chasing with a net (8 min)	crowding in a 250-mL beaker (50 min)	tank change, three consecutive times with 30 min interval	crowding in a 250-mL beaker (50 min)	heating tank water to 18°C (30 min)	Chasing with a net (8 min)
MORNING	12h00	8h00	10h30	9h00	9h30	12h00	8h45
	tank change, three consecutive times with 30 min interval	crowding in a 250-mL beaker (50 min)	low water level on housing tanks until dorsal body wall was exposed (5 min)	heating tank water to 18°C (30 min)	tank change, three consecutive times with 30 min interval	low water level on housing tanks until dorsal body wall was exposed (5 min)	crowding in a 250-mL beaker (50 min)
AFTERNOON	17h30	12h30	15h30	16h00	13h30	17h10	16h30
	cooling tank water to 18°C (30 min)	Chasing with a net (8 min)	crowding in a 250-mL beaker (50 min)	tank change, three consecutive times with 30 min interval	heating tank water to 18°C (30 min)	crowding in a 250-mL beaker (50 min)	Chasing with a net (8 min)

**Table. S1.** Schedule and stressors of the unpredictable chronic stress protocol.