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

Samara Machado Bruck

DESEMPENHO DE ENSAIOS COMPORTAMENTAIS NA DETECÇÃO DOS EFEITOS DE DIFERENTES ANSIOLÍTICOS EM PEIXES-ZEBRA

Porto Alegre
2025

Samara Machado Bruck

DESEMPENHO DE ENSAIOS COMPORTAMENTAIS NA DETECÇÃO DOS EFEITOS DE DIFERENTES ANSIOLÍTICOS EM PEIXES-ZEBRA

Dissertação 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 mestra em Farmacologia e Terapêutica.

Orientadora: Prof.ª Dr.ª Ana Paula Herrmann
Coorientador: Prof. Dr. Angelo Luis Stapassoli Piato

Porto Alegre
2025

CIP - Catalogação na Publicação

Bruck, Samara Machado
DESEMPENHO DE ENSAIOS COMPORTAMENTAIS NA DETECÇÃO DOS EFEITOS DE DIFERENTES ANSIOLÍTICOS EM PEIXES-ZEBRA / Samara Machado Bruck. -- 2025.
67 f.
Orientadora: Ana Paula Herrmann.

Coorientador: Angelo Luis Stapassoli Piato.

Dissertação (Mestrado) -- 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, 2025.

1. Ansiedade. 2. Validade preditiva. 3. Peixe-zebra. 4. Ansiolíticos. 5. Psicofarmacologia. I. Herrmann, Ana Paula, orient. II. Piato, Angelo Luis Stapassoli, coorient. III. Título.

Elaborada pelo Sistema de Geração Automática de Ficha Catalográfica da UFRGS com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

Samara Machado Bruck

DESEMPENHO DE ENSAIOS COMPORTAMENTAIS NA DETECÇÃO DOS EFEITOS DE DIFERENTES ANSIOLÍTICOS EM PEIXES-ZEBRA

Dissertação 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 mestra em Farmacologia e Terapêutica.

Aprovado em: 26 de setembro de 2025.

BANCA EXAMINADORA

_____

Bruno Dutra Arbo – UFRGS

_____

Murilo Sander de Abreu – UFCSPA

_____

Rosane Souza da Silva – UFRGS

_____

Ana Paula Herrmann – UFRGS (orientadora)

DEDICATÓRIA

A Deus, por Sua infinita bondade que me sustém. À minha família que foi minha base propulsora e, ao mesmo tempo, meu recanto seguro. À Bebê, minha gatinha, fonte de serotonina em momentos difíceis. A todos que regaram este sonho até ele florescer.

AGRADECIMENTOS

A Deus, que me presenteou com a curiosidade e o desejo de conhecê-Lo através da neurociência.

Aos meus pais, Mário e Claudete, pelo apoio incondicional, pelo incentivo constante e por nunca medirem esforços para que eu pudesse me dedicar aos estudos.

À minha irmã Marianne e ao meu cunhado Carlos pelas revisões, conselhos e preocupação.

À minha irmãzinha Theodora, ao meu sobrinho Elias e à minha gatinha Bebê por terem sido meus raios de sol nos meus dias mais chuvosos.

Ao Pedro, meu namorado, por todo amor e carinho, por vibrar por cada conquista junto comigo.

Aos meus amigos de infância e de FacFar, Adriano, Alice, Clarisse, Júlia, Keylla, Laura, Luan, Sophia, Stéphanie, Thayná, por terem sido presentes mesmo que fisicamente distantes.

À melhor orientadora do mundo, Prof.ª Dr.ª Ana Paula Herrmann, por ter confiado em mim, pelos ensinamentos, pelo auxílio em todas as etapas, pela paciência, pelos conselhos, pela parceria, pelo carinho e pela forma tão gentil de orientar. Obrigada, de coração, por tudo!

Ao meu coorientador, Prof. Dr. Angelo Piato, pela confiança, pelos ensinamentos, pelos conselhos, pelo auxílio em experimentos, pelo carinho e pelos aniversários compartilhados.

Aos meus colegas de jornada, Matheus, Sofia e Dani, pela companhia, pelo apoio nos experimentos, pelas risadas, conversas e pela parceria que tornou tudo mais leve.

Aos colegas do LAPCOM pela parceria e ajuda durante esses anos.

Aos ICs, em especial à Jéssica, pela dedicação, pela parceria e pelo auxílio na execução e na análise dos experimentos.

À CAPES, pela concessão da bolsa, à UFRGS e ao PPGFT e a todos os seus professores e funcionários pelo suporte nessa trajetória.

À banca avaliadora do presente trabalho pela disponibilidade e contribuição.

“So, the first question we must ask ourselves is, what is a Boggart?”
Hermione put up her hand.
“It's a shape-shifter,” she said. “It can take the shape of whatever it thinks will frighten us most.”

Rowling, J.K. Harry Potter and the Prisoner of Azkaban

RESUMO

Os transtornos de ansiedade se caracterizam por hiperreatividade a ameaças reais ou imaginadas e por antecipação ansiosa de eventos futuros, gerando prejuízos consistentes no funcionamento social, acadêmico e ocupacional. O tratamento farmacológico inclui, dentre outras opções, inibidores seletivos da recaptação de serotonina, inibidores da recaptação de serotonina e noradrenalina, benzodiazepínicos e buspirona, uma azapirona que atua como agonista parcial 5-HT_{1A}. Nesse contexto, o peixe-zebra tem sido empregado em estudos neuropsicofarmacológicos como modelo de triagem para novos ansiolíticos, embora a validade preditiva de paradigmas comportamentais amplamente utilizados permaneça incerta. Nesse trabalho, avaliamos os efeitos ansiolíticos agudos de fármacos clinicamente aprovados, com mecanismos distintos, em três ensaios comportamentais estabelecidos para peixes-zebra adultos: o teste do tanque novo, o teste do tanque aberto e o teste claro-escuro. Em peixes-zebra adultos expostos a moduladores serotoninérgicos (fluoxetina e buspirona), observou-se que o efeito tipo-ansiolítico desses fármacos é dependente do teste utilizado. No teste do tanque novo, a fluoxetina e a buspirona produziram efeitos ansiolíticos robustos, evidenciados por maior exploração da área superior e menor permanência no fundo da arena. O teste claro-escuro mostrou sensibilidade limitada, com detecção de efeitos apenas em doses mais altas de buspirona, e o teste do tanque aberto não identificou respostas ansiolíticas, questionando a utilidade da tigmotaxia como medida de ansiedade em peixe-zebra. Notavelmente, a modulação do receptor $GABA_A$ não gerou alterações comportamentais detectáveis em nenhum ensaio, apesar de que, em humanos, a classe é conhecida pelo rápido efeito ansiolítico, o que sugere que os circuitos sensíveis a benzodiazepínicos não foram adequadamente engajados nas condições experimentais e nos ensaios comportamentais empregados nesse estudo. Em conjunto, os achados indicam que a escolha do ensaio deve ser alinhada ao mecanismo de ação do fármaco. O teste do tanque novo emergiu como o paradigma mais sensível e reprodutível para a detecção de efeitos serotoninérgicos, enquanto a confiança exclusiva nos testes de claro-escuro ou tanque aberto aumenta o risco de achados falsos-negativos.

Palavras-chave: ansiedade, peixe-zebra, validade preditiva, bromazepam, fluoxetina, buspirona

ABSTRACT

Anxiety disorders are characterized by hyperreactivity to real or imagined threats and by the anxious anticipation of future events, resulting in consistent impairments in social, academic, and occupational functioning. Pharmacological treatment includes, among other options, selective serotonin reuptake inhibitors, serotonin and norepinephrine reuptake inhibitors, benzodiazepines, and buspirone, an azapirone that acts as a partial 5-HT_{1A} agonist. In this context, the zebrafish has been employed in neuropsychopharmacological studies as a screening model for novel anxiolytics, although the predictive validity of widely used behavioral paradigms remains uncertain. Here, we evaluated the acute anxiolytic effects of clinically approved drugs with distinct mechanisms of action across three established assays: the novel tank test, the open tank test, and the light–dark test. In adult zebrafish exposed to serotonergic modulators (fluoxetine and buspirone), anxiolytic-like effects were found to be assay dependent. In the novel tank test, fluoxetine and buspirone produced robust anxiolytic-like effects, evidenced by increased exploration of the upper portion of the arena and reduced bottom dwelling. The light–dark test showed limited sensitivity, detecting effects only at higher buspirone doses, and the open tank test failed to identify anxiolytic-like responses, casting doubt on the utility of thigmotaxis as a measure of anxiety in zebrafish. Notably, GABAA-receptor modulation did not yield detectable behavioral changes in any assay, despite this class producing rapid anxiolysis in humans, which suggests that benzodiazepine-sensitive circuits were not adequately engaged under the experimental conditions and behavioral assays employed in this study. Taken together, these findings indicate that assay selection should be aligned with the drug's mechanism of action. The novel tank test emerged as the most sensitive and reproducible paradigm for detecting serotonergic effects, whereas exclusive reliance on the light–dark or open tank tests increases the risk of false-negative conclusions.

Keywords: anxiety, zebrafish, predictive validity, bromazepam, fluoxetine, buspirone

LISTA DE ABREVIATURAS

5-HT	5-hidroxitriptamina, serotonina
5-HT_{1A}	Receptor serotoninérgico 5-HT_{1A}
5-HT_{1D}	Receptor serotoninérgico 5-HT_{1D}
5-HT_{2C}	Receptor serotoninérgico 5-HT_{2C}
5-HT_{7}	Receptor serotoninérgico 5-HT_{7}
ACTH	Hormônio adrenocorticotrófico
BZD	Benzodiazepínicos
CRH	Hormônio liberador de corticotropina
CSTC	Circuito cortico-estriado-tálamo-cortical
DALYs	*Disability-Adjusted Life Years*; Anos de Vida Ajustados por Incapacidade
FDA	Food and Drug Administration
GABA	Ácido gama-aminobutírico
$GABA_A$	Receptor GABA tipo A
HHS	Eixo hipotálamo-hipófise-suprarrenal
IRSN	Inibidores da recaptação de serotonina e noradrenalina
ISRS	Inibidores seletivos da recaptação de serotonina
LDT	Light-Dark Test/Teste de Claro-Escuro
NE	Noradrenalina
NTT	Novel Tank Test/Teste de Tanque Novo
OTT	Open Tank Test/Teste de Tanque Aberto
SERT	*Serotonin Transporter* (transportador de serotonina)
TAG	Transtorno de Ansiedade Generalizada

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO..... 11
1.1 TRANSTORNOS DE ANSIEDADE..... 11
1.2 NEUROBIOLOGIA DOS TRANSTORNOS DE ANSIEDADE..... 12
1.3 TRATAMENTO FARMACOLÓGICO ATUAL..... 13
1.3.1 Inibidores Seletivos da Recaptação de Serotonina..... 14
1.3.2 Benzodiazepínicos..... 15
1.3.3 Agonistas 5-HT1A..... 16
1.4. ENSAIOS PRÉ-CLÍNICOS RELEVANTES AOS TRANSTORNOS DE ANSIEDADE..... 17
1.4.1 Ensaios comportamentais em peixe-zebra..... 18
2 OBJETIVOS..... 20
2.1 Objetivo geral..... 20
2.2 Objetivos específicos..... 20
3 ARTIGO CIENTÍFICO..... 21
4 CONCLUSÃO..... 56
REFERÊNCIAS..... 57
ANEXO A – CARTA DE APROVAÇÃO DA CEUA..... 60
ANEXO B – NORMAS DE FORMATAÇÃO DA REVISTA EUROPEAN NEUROPSYCHOPHARMACOLOGY..... 61

1 INTRODUÇÃO

1.1 TRANSTORNOS DE ANSIEDADE

Em Harry Potter e o Prisioneiro de Azkaban (Rowling, 2001), os bichos-papões assumiam a forma do maior medo de cada personagem. Os transtornos de ansiedade, assim como esses seres, são multiformes, moldando-se à subjetividade de cada indivíduo. Do ponto de vista clínico, eles representam um grupo de condições caracterizadas por respostas desproporcionais de medo e ansiedade diante de ameaças reais ou percebidas, bem como pela antecipação de possíveis ameaças futuras (American Psychiatric Association, 2022; Stahl, 2022).

Essa categoria diagnóstica inclui o transtorno de ansiedade de separação, o mutismo seletivo, as fobias específicas, o transtorno de ansiedade social, o transtorno de pânico, a agorafobia e o transtorno de ansiedade generalizada, além de quadros induzidos por substâncias ou medicamentos (American Psychiatric Association, 2022). Apesar da heterogeneidade, tais condições compartilham frequentemente a característica de início precoce, com pico de incidência em torno dos 5 anos de idade e mediana próxima dos 20 anos. Do ponto de vista epidemiológico, aproximadamente 11,3% dos homens e 18,8% das mulheres apresentam algum transtorno de ansiedade ao longo da vida, indicando uma prevalência maior no sexo feminino (McGrath *et al.*, 2023).

Entre 2010 e 2021, os transtornos de ansiedade mostraram o maior aumento nas taxas padronizadas de anos de vida ajustados por incapacidade (DALYs) entre as principais causas de carga global de doenças, com crescimento de 16,7%. Em 2021, ocupavam a sexta posição entre as principais causas de anos vividos com incapacidade (YLDs), com média de 524,3 YLDs por 100.000 habitantes (Ferrari *et al.*, 2024).

Esses dados evidenciam não apenas a magnitude crescente dos transtornos de ansiedade, mas também o impacto expressivo que acarretam ao indivíduo e à sociedade. Tal cenário reforça a necessidade de estratégias terapêuticas mais eficazes e de modelos experimentais com maior sensibilidade e poder preditivo, capazes de auxiliar na triagem e no desenvolvimento de novos fármacos ansiolíticos.

1.2 NEUROBIOLOGIA DOS TRANSTORNOS DE ANSIEDADE

Os transtornos de ansiedade, embora heterogêneos, compartilham dois eixos psicobiológicos centrais: o medo, regulado principalmente pela amígdala, e a ansiedade ou preocupação, modulada por circuitos córtico-estriado-tálamo-corticais. (Stahl, 2022). O medo, uma resposta emocional aguda, é caracterizado por uma resposta rápida a uma ameaça real ou percebida que gera uma resposta de fuga ou luta, ativando o sistema nervoso autônomo e gerando sintomas como náusea, suor e taquicardia. Já a ansiedade envolve um estado de antecipação de ameaça futura, real ou percebida, que está relacionado à tensão muscular, estado de vigilância e comportamento de esquiva e preocupação (American Psychiatric Association, 2022; Craske *et al.*, 2009; Stahl, 2022). Quando transitórios, o medo e a ansiedade exercem um papel adaptativo, preparando o organismo para lidar com situações adversas. Contudo, quando persistem de maneira desproporcional ao estímulo ou ocorrem na ausência de ameaça real, podem se tornar patológicos e culminar em algum dos transtornos de ansiedade, ocasionando alto impacto pessoal, social e econômico (Ferrari *et al.*, 2024; McGrath *et al.*, 2023; Quevedo e Izquierdo, 2019).

A geração desses estados depende da detecção e avaliação de estímulos ambíguos pelos sistemas sensoriais e por estruturas de integração, com participação do tálamo, do córtex sensorial e dos colículos, seguida da atribuição de valência pela amígdala basolateral em interação com o hipocampo ventral e com o córtex pré-frontal medial. (Nardi, 2021; Quevedo e Izquierdo, 2019). Uma vez atribuído valor ameaçador, ocorre o recrutamento de núcleos hipotalâmicos e do tronco encefálico, que organizam respostas autonômicas e comportamentais. (Quevedo e Izquierdo, 2019).

Dessa forma, alterações em sistemas de neurotransmissores centrais são determinantes. Essas alterações ocorrem em múltiplos sistemas de neurotransmissores centrais, com destaque para a serotonina (5-HT), a norepinefrina (NE) e o ácido gama-aminobutírico (GABA). O sistema serotoninérgico desempenha um papel fundamental, sendo comum a observação de níveis plasmáticos reduzidos de serotonina em indivíduos com essas condições. As projeções de subpopulações de neurônios serotoninérgicos dos núcleos da rafe, por sua vez, exercem funções distintas dependendo de seus alvos: na amígdala, podem facilitar a expressão de medo e ansiedade; na substância cinzenta periaquedutal,

inibem respostas de fuga; e no núcleo mediano da rafe, aumentam a resiliência ao estresse. Nesse contexto, o receptor 5-$HT1_A$ é um modulador crucial da ansiedade em condições fisiológicas e patológicas. A NE, sintetizada no *locus coeruleus*, apresenta hiperfunção nos transtornos de ansiedade, sendo considerada um marcador da atividade do sistema nervoso simpático. Por fim, o sistema GABA, principal neurotransmissor inibitório do Sistema Nervoso Central, também está profundamente envolvido na neurobiologia desses transtornos, como evidenciado pelo efeito terapêutico dos benzodiazepínicos, que atuam modulando e potencializando sua ação (Nardi, 2021; Quevedo e Izquierdo, 2019).

Outro sistema de relevância é o eixo hipotálamo-hipófise-suprarrenal (HHS), que integra respostas neuroendócrinas ao estresse. Quando ativado, o hormônio liberador de corticotrofina (CRH) estimula a secreção de hormônio adrenocorticotrófico (ACTH) pela hipófise, culminando na liberação de cortisol pelas adrenais. O cortisol exerce efeitos adaptativos, aumentando a vigilância, a energia disponível e a memória de curto prazo. A literatura indica que, na ansiedade, o HHS apresenta padrões alterados: níveis basais mais baixos de cortisol e maior responsividade a glicocorticóides em humanos, além de hiperativação do eixo em uma ampla gama de modelos animais. Esses achados convergem com evidências de disfunção em sistemas límbicos e corticais, reforçando o papel dos glicocorticóides como moduladores de anomalias funcionais nesses circuitos (Nardi, 2021; Quevedo e Izquierdo, 2019).

Dessa forma, a ansiedade patológica pode ser entendida como resultado de uma complexa interação entre circuitos córtico-límbicos, neurotransmissores e eixo neuroendócrino, o que orienta tanto as abordagens atuais quanto a busca por novos alvos terapêuticos.

1.3 TRATAMENTO FARMACOLÓGICO ATUAL

O tratamento farmacológico dos transtornos de ansiedade envolve múltiplas classes de medicamentos, cada uma com indicações específicas conforme o subtipo do transtorno. Entre os fármacos mais utilizados destacam-se os inibidores seletivos de recaptação de serotonina (ISRS) e os inibidores de recaptação de serotonina e noradrenalina (IRSN), os benzodiazepínicos, os ligantes da subunidade α2-δ dos canais de cálcio, como a pregabalina, e, de forma mais restrita ao transtorno de

ansiedade generalizada (TAG), a buspirona, agonista parcial do receptor 5-HT_{1A} (Bandelow *et al.*, 2023; Cordioli; Gallois; Isolan, 2015; Nardi, 2021; Stahl, 2022).

No caso específico do TAG, o tratamento farmacológico de primeira linha inclui ISRS, IRNS ou pregabalina, sendo esperado início de resposta clínica entre 4 e 6 semanas. Uma vez alcançada resposta satisfatória, recomenda-se a manutenção da terapia por, no mínimo, 12 meses, a fim de reduzir o risco de recaída. Após esse período, podem ser realizadas tentativas graduais de retirada do fármaco; entretanto, caso ocorram duas recaídas sucessivas dos sintomas após tais tentativas, deve-se considerar a manutenção do tratamento por longo prazo (TelessaúdeRS, 2021; Cordioli; Gallois; Isolan, 2015).

Em situações de ausência de resposta ou resposta parcial, recomenda-se o ajuste da dose e, se persistente a refratariedade, a substituição por outro agente de primeira linha ou a utilização de fármacos de segunda linha, bem como a associação de medicamentos de diferentes classes em regime combinado (Cordioli; Gallois; Isolan, 2015; TelessaúdeRS, 2021)

Neste trabalho, três representantes de classes farmacológicas distintas são especialmente relevantes: a fluoxetina, um ISRS; o bromazepam, um benzodiazepínico; e a buspirona, uma azapirona com ação de agonista parcial em receptores 5-HT_{1A}.

1.3.1 Inibidores Seletivos da Recaptação de Serotonina

Os ISRS exercem sua ação primária ao bloquear o transportador de serotonina (SERT) na região somatodendrítica de neurônios do núcleo da rafe, elevando a disponibilidade local de 5-HT (Artigas *et al.*, 1996; Stahl, 2022). Com o aumento dos níveis de serotonina, há um estímulo aos autorreceptores 5-HT_{1A} e 5-HT_7 na região somatodendrítica do núcleo da rafe e de autorreceptores 5-HT_{1D} nos terminais serotoninérgicos (Brunton; Knollmann; Fonseca, 2024; Stahl, 2022). Essa ativação inicial reduz a frequência de disparo neuronal e a liberação de serotonina, o que explica a latência terapêutica e a ocorrência de efeitos adversos precoces (Artigas, 2013; Brunton; Knollmann; Fonseca, 2024; Stahl, 2022). Com o uso crônico, ocorre dessensibilização progressiva dos autorreceptores 5-HT_{1A}, reduzindo sua capacidade de inibir a atividade neuronal. Esse processo leva à desinibição dos neurônios serotoninérgicos e ao aumento sustentado da liberação de 5-HT nos

terminais axonais, alteração que se correlaciona com o início dos efeitos clínicos. Por fim, a dessensibilização gradual de receptores pós-sinápticos adicionais pode mediar a redução dos efeitos adversos, acompanhando o desenvolvimento de tolerância (Artigas, 2013; Brunton; Knollmann; Fonseca, 2024; Stahl, 2022).

A fluoxetina, primeiro ISRS aprovado pelo Food and Drug Administration (FDA) e a ser comercializado nos Estados Unidos, apresenta particularidades farmacodinâmicas relevantes. Além da inibição de SERT, exerce antagonismo em receptores 5-HT_{2C}, promovendo desinibição da liberação de dopamina e noradrenalina em regiões corticais, o que pode contribuir para a melhora de energia, motivação e atenção (Stahl, 2022). Seu início de ação ocorre em 2 a 4 semanas, com potencial efeito ativador precoce. No entanto, esse perfil ativador pode ser indesejável em pacientes com insônia, agitação ou ansiedade exacerbada, devido à possibilidade de intensificação transitória dos sintomas iniciais. Demonstra eficácia em diferentes transtornos de ansiedade, incluindo transtorno de pânico, ansiedade generalizada e fobia social (Cordioli; Gallois; Isolan, 2015; Stahl, 2021, 2022).

1.3.2 Benzodiazepínicos

Os benzodiazepínicos (BZD) atuam como moduladores alostéricos positivos dos receptores $GABA_A$, principais mediadores da neurotransmissão inibitória no sistema nervoso central. A ligação ocorre em um sítio específico distinto do sítio de ligação do GABA, aumentando a afinidade do neurotransmissor endógeno pelo receptor e, consequentemente, a frequência de abertura dos canais de cloreto (Brunton; Knollmann; Fonseca, 2024; Quevedo e Izquierdo, 2019; Stahl, 2022). Esses fármacos consolidaram-se, a partir da década de 1960, como uma alternativa mais segura e eficaz que os barbitúricos no tratamento dos transtornos de ansiedade (Ahmand, 2024; Quevedo e Izquierdo, 2019).

No contexto dos transtornos de ansiedade, os BZDs exercem efeitos ansiolíticos por meio da modulação dos receptores $GABA_A$ presentes na amígdala, atenuando os *outputs* relacionados ao medo. Além disso, há evidências de que esses fármacos reduzem a hiperatividade dos circuitos córtico-estriato-tálamo-corticais (CSTC), os quais estão implicados na geração de sintomas de preocupação excessiva. Esse efeito decorre do aumento da ação dos

interneurônios GABAérgicos no córtex pré-frontal, resultando em maior inibição neural e, por consequência, diminuição dos sintomas de preocupação (Stahl, 2022).

A rápida instalação dos efeitos ansiolíticos, sedativos, hipnóticos e anticonvulsivantes explica sua ampla utilização clínica (Ahmand, 2024; Brunton; Knollmann; Fonseca, 2024; Nardi, 2021; Quevedo e Izquierdo, 2019; Stahl, 2022). No entanto, o uso prolongado está associado à tolerância, dependência, modificações na arquitetura do sono e prejuízos cognitivos, o que justifica a recomendação de prescrição por períodos curtos e, muitas vezes, apenas como adjuvante de terapias de manutenção com antidepressivos (Ahmand, 2024; Bandelow *et al.*, 2023; Brunton; Knollmann; Fonseca, 2024; Nardi, 2021; Stahl, 2022, 2022).

O bromazepam é um dos representantes dessa classe e se caracteriza por boa biodisponibilidade oral e por um início de ação em torno de 20 minutos e com meia-vida intermediária (8 a 19h) (Busto *et al.*, 2000; Cordioli; Gallois; Isolan, 2015). Apresenta eficácia no controle de sintomas autonômicos intensos da ansiedade, sendo empregado em TAG, transtorno do pânico e transtorno de ansiedade social (Cordioli; Gallois; Isolan, 2015).

1.3.3 Agonistas 5-HT_{1A}

As azapironas são agonistas parciais de receptores de serotonina do tipo 5-$HT1_A$, a buspirona, única representante da classe aprovada pelo FDA, é indicada principalmente para o TAG, sem eficácia comprovada para outros transtornos ansiosos. Sua ação envolve receptores 5-$HT1_A$ pré e pós-sinápticos, resultando em aumento da atividade serotoninérgica em projeções para a amígdala, córtex pré-frontal, estriado e tálamo, contribuindo para a redução de sintomas de medo e preocupação (Ahmand, 2024; Brunton; Knollmann; Fonseca, 2024; Nardi, 2021; Stahl, 2022). O início de ação ansiolítica é tardio, semelhante ao observado com antidepressivos como ISRSs e ISNRs, sugerindo que os efeitos terapêuticos decorrem de adaptações neuroplásticas e de regulação de receptores, e não apenas da ocupação aguda dos receptores 5-$HT1_A$ (Stahl, 2022).

1.4. ENSAIOS PRÉ-CLÍNICOS RELEVANTES AOS TRANSTORNOS DE ANSIEDADE

A pesquisa pré-clínica constitui um eixo central no desenvolvimento de novos ansiolíticos, ao permitir a investigação de mecanismos neurobiológicos subjacentes e a realização de triagens farmacológicas em condições controladas. Os modelos animais assumem especial relevância nesse contexto, pois possibilitam a manipulação de variáveis genéticas, ambientais e farmacológicas em cenários inviáveis em humanos (Cryan; Sweeney, 2011; Lezak; Missig; Carlezon Jr, 2017).

Entre as ferramentas disponíveis, os testes comportamentais em roedores destacam-se por avaliar comportamentos do tipo ansioso a partir de paradigmas de conflito entre aproximação e evitação. No labirinto em cruz elevado, por exemplo, o animal enfrenta o dilema entre explorar os braços abertos ou permanecer na segurança dos braços fechados, sendo o maior tempo gasto nos braços fechados interpretado como indicativo de ansiedade. De forma análoga, o teste claro-escuro explora a preferência inata dos roedores por ambientes protegidos, de modo que um maior tempo no compartimento iluminado sugere redução do comportamento ansioso. Já o teste de campo aberto avalia a tigmotaxia, ou seja, a tendência de permanecer próximo às paredes em detrimento da área central; quanto maior o tempo nas regiões periféricas, mais forte é o indicativo de ansiedade (Heesbeen *et al.*, 2024a; Nardi, 2021; Rosso *et al.*, 2022; Stewart *et al.*, 2014).

Para que tais modelos tenham valor translacional, contudo, devem atender a três dimensões clássicas de validade: a validade de face, quando reproduzem manifestações comportamentais observáveis em humanos; a validade de construto, quando refletem mecanismos fisiopatológicos plausíveis; e a validade preditiva, quando antecipam os efeitos clínicos de fármacos (Quevedo e Izquierdo, 2019; Stewart; Kalueff, 2015). Entre essas, a validade preditiva assegura maior probabilidade de que as respostas observadas em animais possam ser transpostas para humanos (Rosso *et al.*, 2022).

Nos últimos anos, entretanto, tem crescido o reconhecimento de limitações metodológicas que comprometem a robustez e a reprodutibilidade dos achados pré-clínicos. Estudos indicam que, embora os ISRS possam induzir efeitos ansiolíticos em testes não condicionados, esses efeitos apresentam elevada variabilidade e dependem de detalhes experimentais específicos (Heesbeen *et al.*,

2024b). Além disso, revisões sistemáticas têm apontado falhas recorrentes em procedimentos de randomização e cegamento, falta de transparência nos relatos e viés de publicação, fatores que reduzem a confiabilidade da literatura disponível (Rosso *et al.*, 2022)

Esse debate tem colocado a questão da reprodutibilidade em pauta. Endereçando esse assunto, a Iniciativa Brasileira de Reprodutibilidade realizou um estudo multicêntrico de replicação, constatou que apenas 9 a 29% de uma amostra aleatória de experimentos pré-clínicos utilizando o teste de labirinto em cruz elevado e reportados em estudos brasileiros foram reproduzidos com sucesso por laboratórios independentes. Além disso, verificou-se que os tamanhos de efeito descritos nos estudos iniciais foram, em média, 60% superiores aos observados nas replicações, e que a variabilidade experimental foi frequentemente subestimada nos artigos originais (The Brazilian Reproducibility Initiative *et al.*, 2025). Tais evidências reforçam a necessidade de maior rigor metodológico, maior transparência nos relatos e poder estatístico adequado, de modo a aumentar a confiabilidade dos modelos animais e consolidar seu papel no desenvolvimento de novos fármacos ansiolíticos.

Diante desse cenário, estratégias como a heterogeneização planejada dos experimentos e a realização de estudos multicêntricos têm sido apontadas como caminhos para aumentar a validade translacional (Carneiro *et al.*, 2023; The Brazilian Reproducibility Initiative *et al.*, 2025). Entre as propostas, ganha destaque o uso de espécies alternativas, capazes de ampliar a diversidade etológica e fisiológica avaliada. Nesse movimento, o peixe-zebra tem emergido como um dos modelos mais promissores, especialmente no contexto do *screening* de fármacos ansiolíticos, abrindo novas perspectivas para superar parte das limitações observadas em roedores e aproximar a pesquisa pré-clínica da realidade clínica (Stewart; Kalueff, 2015b).

1.4.1 Ensaios comportamentais em peixe-zebra

A crescente utilização do peixe-zebra (*Danio rerio*) como modelo em neuropsicofarmacologia decorre da sua homologia genética com mamíferos, da conservação de circuitos neuroquímicos fundamentais e da viabilidade de estudos em larga escala que permitem avaliar simultaneamente mecanismos celulares e

comportamentais (Rico *et al.*, 2011; Stewart *et al.*, 2014). Nesse contexto, diversos paradigmas comportamentais foram adaptados ou desenvolvidos para o peixe-zebra, permitindo avaliar fenótipos relacionados à ansiedade. Entre eles, destacam-se o teste claro-escuro, o teste de tanque novo e o teste de campo aberto, que exploram a propensão inata à evitação de ambientes iluminados ou expostos, bem como o padrão inicial de mergulho em situações de novidade (Bencan; Sledge; Levin, 2009; Blaser; Chadwick; McGinnis, 2010). Esses ensaios têm demonstrado responsividade a ansiolíticos de diferentes classes, incluindo benzodiazepínicos, agonistas parciais de 5-HT1A e ISRS, ainda que com graus distintos de sensibilidade e especificidade (Bencan; Sledge; Levin, 2009).

Ao mesmo tempo, diferenças anatômicas e funcionais em relação a mamíferos, como a organização dos núcleos serotoninérgicos e a distribuição diferencial de receptores, indicam que certas respostas farmacológicas podem divergir entre espécies (Näslund *et al.*, 2025). É importante, dessa forma, avaliar, cuidadosamente, a validade preditiva dos modelos utilizados, uma vez que a administração aguda de ISRS produz efeitos distintos em peixes-zebra, roedores e humanos. Em humanos e roedores, a elevação aguda da 5-HT por ISRS costuma associar-se a efeitos ansiogênicos, ao passo que, no peixe-zebra, a literatura aponta predominantemente efeitos do tipo ansiolítico (Grillon; Levenson; Pine, 2007; Näslund *et al.*, 2017, 2025).

Além disso, persistem desafios de reprodutibilidade. Estudos multicêntricos mostram que variáveis de criação e manejo, como densidade, composição alimentar e ruído ambiental, influenciam substancialmente os desfechos comportamentais em testes de ansiedade com peixe-zebra, reforçando a necessidade de descrição detalhada das condições experimentais para assegurar comparabilidade entre laboratórios e mitigar vieses metodológicos (Hillman *et al.*, 2025).

Neste contexto, esta dissertação compara a validade preditiva de ensaios comportamentais estabelecidos para detectar fenótipos do tipo ansioso em peixes-zebra adultos, examinando os efeitos agudos de ansiolíticos clinicamente aprovados de classes distintas (fluoxetina, bromazepam e buspirona). Ao confrontar a magnitude e a consistência dos efeitos farmacológicos nos testes claro-escuro, tanque novo e tanque aberto, buscamos identificar quais paradigmas apresentam maior sensibilidade às ações desses compostos. Espera-se que os achados

contribuam para a otimização e a padronização de ensaios comportamentais com relevância translacional para a pesquisa em ansiedade.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Avaliar a sensibilidade de diferentes ensaios comportamentais em peixes-zebra adultos (*Danio rerio*) na detecção dos efeitos agudos de ansiolíticos clinicamente aprovados pertencentes a distintas classes farmacológicas.

2.2 Objetivos específicos

a) comparar os efeitos da administração aguda de fluoxetina, buspirona e bromazepam em peixes-zebra adultos submetidos aos testes de tanque novo, de tanque aberto e de claro/escuro;
b) identificar os desfechos comportamentais mais adequados como medida de efeito tipo-ansiolítico em peixes-zebra;
c) analisar a eventual indução de alterações locomotoras pelos fármacos testados.

3 ARTIGO CIENTÍFICO

O artigo científico apresentado a seguir será depositado como preprint no repositório bioRxiv e posteriormente submetido à revista European Neuropsychopharmacology para revisão pelos pares. Os demais produtos associados a esse estudo (pré-registro de experimentos e o conjunto de dados brutos e análises) estão disponíveis em acesso aberto na plataforma Open Science Framework em osf.io/967tz (doi.org/10.17605/OSF.IO/967TZ).

4 CONCLUSÃO

A análise dos ensaios comportamentais demonstra que a sensibilidade na detecção de efeitos ansiolíticos depende diretamente do teste empregado e da classe do fármaco testado. Entre os testes conduzidos, o NTT destacou-se como o mais robusto e sensível, evidenciando efeitos consistentes da fluoxetina e da buspirona. Sendo que, diferentemente do que se observa em humanos e roedores, nos quais a elevação aguda da serotonina por meio do uso desses fármacos tende a produzir efeitos ansiogênicos transitórios, no peixe-zebra a administração aguda reduziu o comportamento tipo-ansioso. Já o teste de claro-escuro detectou comportamentos tipo-ansiolíticos apenas em concentrações elevadas dos fármacos testados, sugerindo uma aplicabilidade restrita para esse fim, enquanto o teste de tanque aberto não se mostrou adequado para detectar o efeito de fármacos ansiolíticos, sugerindo que a tigmotaxia pode não ser uma boa medida de ansiedade em peixes-zebra.

A ausência de efeitos do bromazepam, apesar de sua eficácia clínica em humanos, ressalta as limitações do modelo frente a compostos GABAérgicos e, ao mesmo tempo, evidencia a proeminência das vias serotoninérgicas na modulação do comportamento tipo-ansioso em peixes-zebra. Tal padrão reforça a utilidade do NTT, associado ao uso de fármacos serotoninérgicos como controle positivo, como possível estratégia em um contexto de *screening* de novos fármacos ansiolíticos.

Esses achados também dialogam com o debate mais amplo da pesquisa pré-clínica, em que a reprodutibilidade e a padronização são desafios a serem vencidos. Nossa dificuldade em replicar alguns achados previamente publicados evidencia a necessidade de relatar de maneira transparente e completa aspectos como o manejo dos animais, as condições ambientais e o desenho experimental.

Como perspectivas, destaca-se a importância de expandir a avaliação para regimes crônicos, integrar medidas neurobiológicas às respostas comportamentais e fortalecer colaborações multicêntricas que permitam a padronização e a validação global dos protocolos. Com essas estratégias, o peixe-zebra tem potencial para se consolidar não apenas como um modelo alternativo, mas como uma ferramenta translacional de relevância estratégica no desenvolvimento de novos ansiolíticos.

REFERÊNCIAS

AHMAND, S. **Manual de farmacologia psiquiátrica de Kaplan & Sadock**. Tradução: André Garcia Islabão. 8. ed. Porto Alegre, RS: Artmed, 2024.

AMERICAN PSYCHIATRIC ASSOCIATION, A. **Manual diagnóstico e estatístico de transtornos mentais: DSM-5-TR**. 5. ed. Porto Alegre, RS: Artmed, 2022.

ARTIGAS, F. *et al.* Acceleration of the effect of selected antidepressant drugs in major depression by 5-HT1A antagonists. **Trends in Neurosciences**, v. 19, n. 9, p. 378–383, 1996.

ARTIGAS, F. Serotonin receptors involved in antidepressant effects. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 137, n. 1, p. 119–131, 2013.

BANDELOW, B. *et al.* World Federation of Societies of Biological Psychiatry (WFSBP) guidelines for treatment of anxiety, obsessive-compulsive and posttraumatic stress disorders – Version 3. Part I: Anxiety disorders. **The World Journal of Biological Psychiatry**, v. 24, n. 2, p. 79–117, 2023.

BRUNTON, L. L.; KNOLLMANN, B.; FONSECA, A. L. da (org.). **As bases farmacológicas da terapêutica de Goodman & Gilman**. Tradução: Patricia Lydie Josephine Voeux; Simone Kobe de Oliveira. 14. ed. Porto Alegre, RS: Artmed, 2024.

BUSTO, U. E. *et al.* A comparative pharmacokinetic and dynamic evaluation of alprazolam sustained-release, bromazepam, and lorazepam. **Journal of Clinical Psychopharmacology**, v. 20, n. 6, p. 628–635, 2000.

CARNEIRO, C. F. D. *et al.* Mapping strategies towards improved external validity in preclinical translational research. **Expert Opinion on Drug Discovery**, v. 18, n. 11, p. 1273–1285, 2023.

CORDIOLI, A. V.; GALLOIS, C. B.; ISOLAN, L. **Psicofármacos: Consulta Rápida**. 5ª ed. Porto Alegre, RS: Artmed, 2015.

CRASKE, M. G. *et al.* What is an anxiety disorder?. **Depression and Anxiety**, v. 26, n. 12, p. 1066–1085, 2009.

CRYAN, J. F.; SWEENEY, F. F. The age of anxiety: role of animal models of anxiolytic action in drug discovery. **British Journal of Pharmacology**, v. 164, n. 4, p. 1129–1161, 2011.

FERRARI, A. J. *et al.* Global incidence, prevalence, years lived with disability (YLDs), disability-adjusted life-years (DALYs), and healthy life expectancy (HALE) for 371 diseases and injuries in 204 countries and territories and 811 subnational locations, 1990–2021: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2021. **The Lancet**, v. 403, n. 10440, p. 2133–2161, 2024.

GRILLON, C.; LEVENSON, J.; PINE, D. S. A Single Dose of the Selective Serotonin Reuptake Inhibitor Citalopram Exacerbates Anxiety in Humans: A Fear-Potentiated Startle Study. **Neuropsychopharmacology**, v. 32, n. 1, p. 225–231, 2007.

HEESBEEN, E. J. *et al.* The effect of SSRIs on unconditioned anxiety: a systematic review and meta-analysis of animal studies. **Psychopharmacology**, v. 241, n. 9, p. 1731–1755, 2024a.

HEESBEEN, E. J. *et al.* The effect of SSRIs on unconditioned anxiety: a systematic review and meta-analysis of animal studies. **Psychopharmacology**, v. 241, n. 9, p. 1731–1755, 2024b.

HILLMAN, C. *et al.* Housing and husbandry factors affecting zebrafish novel tank test responses: a global multi-laboratory study. **Lab Animal**, v. 54, n. 6, p. 156–164, 2025.

LEZAK, K. R.; MISSIG, G.; CARLEZON JR, W. A. Behavioral methods to study anxiety in rodents. **Dialogues in Clinical Neuroscience**, v. 19, n. 2, p. 181–191, 2017.

MCGRATH, J. J. *et al.* Age of onset and cumulative risk of mental disorders: a cross-national analysis of population surveys from 29 countries. **The Lancet Psychiatry**, v. 10, n. 9, p. 668–681, 2023.

NARDI, A. E. **Tratado de psiquiatria da Associação Brasileira de Psiquiatria**. Porto Alegre, RS: Artmed, 2021.

NÄSLUND, J. *et al.* Anxiolytic-like effects of acute serotonin-releasing agents in zebrafish models of anxiety: experimental study and systematic review. **Acta Neuropsychiatrica**, v. 37, p. e35, 2025.

NÄSLUND, J. *et al.* Incidence of early anxiety aggravation in trials of selective serotonin reuptake inhibitors in depression. **Acta Psychiatrica Scandinavica**, v. 136, n. 4, p. 343–351, 2017.

QUEVEDO, J.; IZQUIERDO, I. **Neurobiologia dos Transtornos Psiquiátricos**. 1ª ed. Porto Alegre, RS: Artmed, 2019.

RICO, E. P. *et al.* Zebrafish neurotransmitter systems as potential pharmacological and toxicological targets. **Neurotoxicology and Teratology**, v. 33, n. 6, p. 608–617, 2011.

ROSSO, M. *et al.* Reliability of common mouse behavioural tests of anxiety: A systematic review and meta-analysis on the effects of anxiolytics. **Neuroscience & Biobehavioral Reviews**, v. 143, p. 104928, 2022.

ROWLING, J. K. **Harry Potter E O Prisioneiro De Azkaban**. Rio de Janeiro, RJ: Rocco, 2001.

STAHL, S. **Fundamentos de psicofarmacologia de Stahl: guia de prescrição**. Porto Alegre, RS: Artmed, 2021.

STAHL, S. M. **Psicofarmacologia - Bases Neurocientíficas e Aplicações Práticas**. 5. ed. Rio de Janeiro, RJ: Editora Guanabara Koogan Ltda, 2022.

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

STEWART, A. M.; KALUEFF, A. V. Developing better and more valid animal models of brain disorders. **Behavioural Brain Research**, v. 276, p. 28–31, 2015a.

STEWART, A. M.; KALUEFF, A. V. Developing better and more valid animal models of brain disorders. **Behavioural Brain Research**, v. 276, p. 28–31, 2015b.

TELESSAÚDERS, U. F. R. G. S. **Protocolos de Regulação Ambulatorial - Psiquiatria Adulto: versão digital 2021**. Porto Alegre, RS: TelessaúdeRS-UFRGS, 2021. Disponível em: https://telessauders.ufrgs.br/protocolos/protocolo-de-psiquiatria-adulto.

THE BRAZILIAN REPRODUCIBILITY INITIATIVE *et al.* **Estimating the replicability of Brazilian biomedical science**. Scientific Communication and Education, 2025. Disponível em: http://biorxiv.org/lookup/doi/10.1101/2025.04.02.645026. Acesso em: 15 jun. 2025.

ANEXO A – CARTA DE APROVAÇÃO DA CEUA

U F R G S
UNIVERSIDADE FEDERAL
DO RIO GRANDE DO SUL

PRÓ-REITORIA DE PESQUISA

Comissão De Ética No Uso De Animais

CEUA UFRGS

CARTA DE APROVAÇÃO

Comissão De Ética No Uso De Animais analisou o projeto:

Número: 44567
Título: Avaliação dos efeitos ansiolíticos do alcaloide indólico alstonina em peixes-zebra

Vigência: 01/09/2023 à 31/08/2025

Pesquisadores:

Equipe UFRGS:

ÂNGELO LUIS STAPASSOLI PIATO - coordenador desde 01/09/2023
Ana Paula Herrmann - coordenador desde 01/09/2023
SAMARA MACHADO BRUCK - desde 01/09/2023
SOFIA ZANINI BECKER - desde 01/09/2023
MATHEUS GALLAS LOPES - desde 01/09/2023
DANIELA VARISCO MÜLLER - zzz Outra Função zzz desde 01/09/2023
LEONARDO MARENSI BASTOS - zzz Outra Função zzz desde 01/09/2023
AMANDA PATELLI ALVES - zzz Outra Função zzz desde 01/09/2023

Comissão De Ética No Uso De Animais aprovou o mesmo , em reunião realizada em 04/12/2023 - Mconf, em seus aspectos éticos e metodológicos, para a utilização de 896 zebrafish (Danio rerio), sendo 448 fêmeas e 448 machos, provenientes da Delphis Aquarium CNPJ: 00.187.830/0001-70, 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, 23 de Fevereiro de 2024

gov.br Documento assinado digitalmente
MAITE DE MORAES VIEIRA
Data: 02/04/2024 11:21:06-0300
Verifique em https://validar.iti.gov.br

MAITE DE MORAES VIEIRA
Coordenador da comissão de ética

ANEXO B – NORMAS DE FORMATAÇÃO DA REVISTA EUROPEAN NEUROPSYCHOPHARMACOLOGY

https://www.sciencedirect.com/journal/european-neuropsychopharmacology/publish/guide-for-authors

Guide for authors

Aims and Scope

European Neuropsychopharmacology is the official publication of the European College of Neuropsychopharmacology (ECNP). In accordance with the mission of the College, the journal focuses on clinical and basic science contributions that advance our understanding of brain function and human behaviour and enable translation into improved treatments and enhanced public health impact in psychiatry. Recent years have been characterized by exciting advances in basic knowledge and available experimental techniques in neuroscience and genomics. However, clinical translation of these findings has not been as rapid. The journal aims to narrow this gap by promoting findings that are expected to have a major impact on both our understanding of the biological bases of mental disorders and the development and improvement of treatments, ideally paving the way for prevention and recovery.

Types of Papers:

Full length Research Papers of original experimental or clinical research: max. 6500 words (including tables and legends to figures) and no more than 80 references; Short Communications: max 2500 words and no more than 25 references; Reviews on specialised topics: no word limit, no more than 150 references. Letters to the Editor can be related or not to material published in the journal but are limited to 500 words and 5 references. Insights papers: authors should only choose this article type if they have been invited by the Editorial team. This should be a controversial topic, maximum of 1000 words, maximum of 2 authors, no abstract, no tables, maximum of 1 figure, maximum of 10 references and Declaration of Interest Statement.

A total word-count should be submitted together with your manuscript.

A covering letter must accompany all submissions to European Neuropsychopharmacology whereby it is understood to imply that the data contained therein has not previously been published (except in the form of an abstract, a published lecture or academic thesis, see 'Multiple, redundant or concurrent publication' for more information), and that they have been approved by the responsible authorities in the laboratory where the work was carried out. Manuscripts submitted under multiple authorship are reviewed under the assumption that all listed authors concur with the submission and have approved the final manuscript. If

accepted, the paper shall not be published either whole or in part elsewhere without the consent of the Publisher. To verify originality, your article may be checked by the originality detection service Crossref Similarity Check. All authors MUST disclose details of preprint posting, including DOI and licensing terms.

Submission of Manuscripts

The submission to and peer review process of *European Neuropsychopharmacology* proceeds totally online. To submit your article, please visit https://www.editorialmanager.com/neupsy and you will be guided stepwise through the creation and uploading of the various files. Once the uploading is done, the system automatically generates an electronic (PDF) proof, which is then used for reviewing. All correspondence, including the Editor's decision and request for revisions, will be processed through the system and will reach the corresponding author by e-mail.

Queries

For questions about the editorial process (including the status of manuscripts under review) or for technical support on submissions, please visit our Support Center.

The Author Information box to the right of the page provides further relevant information.

Organisation of the Manuscript

Only submissions in English will be considered. The title page should include: the title, the name(s) and affiliation(s) of the author(s), and address for correspondence, and telephone numbers for editorial queries.

All articles should include an Abstract (a single paragraph of no more than 250 words), and 3-6 key words taken from Index Medicus for abstracting and indexing purposes.

The text should be ordered under the following headings: 1. Introduction, 2. Experimental procedures, 3. Results, 4. Discussion, Author Disclosures (see separete section on this), References.

HIGHLIGHTS

Highlights are a short collection of bullet points that convey the core findings of the article. Highlights are optional and should be submitted in a separate file in the online submission system. Please use 'Highlights' in the file name and include 3 to 5 bullet points (maximum 85 characters, including spaces, per bullet point). See https://www.elsevier.com/highlights for examples.

NEW - Supplementary data

European Neuropsychopharmacology now also accepts electronic supplementary material (e-components) to support and enhance presentation of your scientific

research. Supplementary files offer the Author additional possibilities to publish supporting applications, movies, animation sequences, high-resolution images, background datasets, sound clips and more. Supplementary files supplied will be published online alongside the electronic version of your article in Elsevier Web products, including ScienceDirect: http://www.sciencedirect.com. In order to ensure that your submitted material is directly usable, please ensure that data is provided in one of our recommended file formats. Authors should submit the material in electronic format together with the article and supply a concise and descriptive caption for each file. For more detailed instructions please visit our artwork instruction pages at https://www.elsevier.com/artworkinstructions.

At their discretion authors are also invited to submit 5-15 Power Point slides summarizing in words, tables or figures their paper. The slides will be posted on the journal site and readers will have the opportunity to download and use the slides for didactical purposes only.

Please use the template provided to format your content.

Please note also that the slides will appear online exactly as they are submitted without further type-setting.

Author Disclosure

Role of Funding Source. Authors are kindly requested to briefly describe the role of the study sponsor(s), if any, in study design; in the collection, analysis and interpretation of data; in the writing of the report; and in the decision to submit the paper for publication. If the funding source(s) had no such involvement, authors should so state.

eg, Funding for this study was provided by NIMH Grant XXXXXXX; the NIMH had no further role in study design; in the collection, analysis and interpretation of data; in the writing of the report; and in the decision to submit the paper for publication.

Following the Role of the Funding Source text, authors are required to declare their individual contribution to the manuscript under a subheading Contributors.

eg, Author X designed the study and wrote the protocol. Author Y managed the literature searches and analyses. Authors X and Z undertook the statistical analysis, and author W wrote the first draft of the manuscript. All authors contributed to and have approved the final manuscript.

The third aspect of the Journal's new policy concerns the Conflict of Interest. ALL authors are requested to disclose any actual or potential conflict of interest including any financial, personal or other relationships with other people or organizations within three (3) years of beginning the work submitted that could inappropriately influence, or be perceived to influence, their work.

Examples of potential conflicts of interest which should be disclosed include employment, consultancies, stock ownership (except for personal investment purposes equal to the lesser of one percent (1%) or USD 5000), honoraria, paid expert testimony, patent applications, registrations, and grants. If there are no conflicts of interest, authors should state that there are none.

eg, Author Y owns shares in pharma company A. Author X and Z have consulted for pharma company B. All other authors declare that they have no conflicts of interest.

Finally, before the references, the Journal will publish Acknowledgements, in a separate section, and not as a footnote on the title page.

eg, We thank Mr A, who kindly provided the data necessary for our analysis, and Miss B, who assisted with the preparation and proof-reading of the manuscript.

NB. During the online submission process the author will be prompted to upload these four mandatory author disclosures as separate items. They will be automatically incorporated in the PDF builder of the online submission system. Please do not include in the main manuscripts.

Papers that do not conform to the general criteria for publication in *European Neuropsychopharmacology* will be returned immediately to authors to avoid unnecessary delay in submission elsewhere.

Figures and Photographs

Figures and Photographs of good quality should be submitted online as a separate file. Please use a lettering that remains clearly readable even after reduction to about 66%. For every figure or photograph, a legend should be provided. All authors wishing to use illustrations already published must first obtain the permission of the author and publisher and/or copyright holders and give precise reference to the original work. This permission must include the right to publish in electronic media.

Tables

Tables should be numbered consecutively with Arabic numerals and must be cited in the text in sequence. Each table, with an appropriate brief legend, comprehensible without reference to the text, should be typed on a separate page and uploaded online. Tables should be kept as simple as possible and wherever possible a graphical representation used instead. Table titles should be complete but brief. Information other than that defining the data should be presented as footnotes.

Please refer to the generic Elsevier artwork instructions: https://www.elsevier.com/artwork

Data references

This journal encourages you to cite underlying or relevant datasets in your manuscript by citing them in your text and including a data reference in your Reference List. Data references should include the following elements: author

name(s), dataset title, data repository, version (where available), year, and global persistent identifier. Add [dataset] immediately before the reference so we can properly identify it as a data reference. This identifier will not appear in your published article.

References

Authors are responsible for the accuracy of the references. Only published articles and those in press (the journal should be stated) may be included; unpublished results and personal communications should be cited as such in the text.

Text:

All citations in the text should refer to:

Single author: the author's name (without initials, unless there is ambiguity) and the year of publication;

Two authors: both authors' names and the year of publication;

Three or more authors: first author's name followed by "el al." and the year of publication.

Citations may be made directly (or parenthetically). Groups of references should be listed first alphabetically, then chronologically.

Examples: "as demonstrated (Allan, 1996a, 1996b, 1999; Allan and Jones, 1995). Kramer et al. (2000) have recently shown ...."

List:

References should be arranged first alphabetically and then further sorted chronologically if necessary. More than one reference from the same author(s) in the same year must be identified by the letters "a", "b", "c", etc., placed after the year of publication.

Examples:

Reference to a journal publication:

Van der Geer, J., Hanraads, J.A.J., Lupton, R.A., 2000. The art of writing a scientific article. J. Sci. Commun. 163, 51-59.

Reference to a book:

Strunk Jr., W., White, E.B., 1979. The Elements of Style, third ed. Macmillan, New York.

Reference to a chapter in an edited book:

Mettam, G.R., Adams, L.B., 1999. How to prepare an electronic version of your article, in: Jones, B.S., Smith , R.Z. (Eds.), Introduction to the Electronic Age. E-Publishing Inc., New York, pp. 281-304.

Reference to a dataset:

Oguro, M., Imahiro, S., Saito, S., Nakashizuka, T., 2015. Mortality data for Japanese oak wilt disease and surrounding forest compositions. Mendeley Data, v1. http://dx.doi.org/10.17632/xwj98nb39r.1.

Nomenclature

Metric units must be used throughout; laboratory units must be followed by SI (Systeme International) units. The generic name of the drug should be used unless the specific trade name of the drug is directly relevant to the discussion. For receptor nomenclature, authors are referred to the special supplement of Trends in Pharmacological Sciences devoted to this. Ethics of experimentation Procedures involving experiments on human subjects should be in accordance with the ethical standards of the Committee on Human Experimentation of the institution in which the experiments were done or in accordance with the Helsinki Declaration of 1975. Procedures involving experimentation on animals should be done in accordance with the guidelines of the institution in which the experiments were done.

Neuroscience-based Nomenclature (NbN)

European Neuropsychopharmacology requires the use of Neuroscience-based Nomenclature (NbN) terminology for psychotropic medications, as it reflects contemporary pharmacological knowledge, rather than arbitrary descriptors based on indications or chemical structure. Please download the free app for correct use of NbN terminology. An overview of the Glossary is below (NbN Glossary). While you are welcome to use NbN throughout the manuscript, as a minimum requirement we ask that on first mention in the paper, substances are referred to by their NbN classification and that all substances studied in the paper receive NbN compliant keywords.

Colour illustrations online

Please make sure that artwork files are in an acceptable format (TIFF, EPS or MS Office files) and with the correct resolution. Polaroid colour prints are not suitable.

If, together with your accepted article, you submit usable colour figures then Elsevier will ensure, at no additional charge, that these figures will appear in colour on the Web (e.g. ScienceDirect and other sites) regardless of whether or not these illustrations are reproduced in colour in the printed version. For colour reproduction in print, you will receive information regarding the costs from Elsevier after receipt of your accepted article. Please indicate your preference for colour in print or on the Web only. For further information on the preparation of electronic artwork, please see https://www.elsevier.com/artwork.

Please note: Because of technical complications which can arise by converting colour figures to "grey scale" (for the printed version should you not opt for colour in

print) please submit in addition usable black and white versions of all the colour illustrations.

Copyright Transfer

Upon acceptance of an article, you will be asked to transfer copyright. This transfer will ensure the widest possible dissemination of information. If excerpts from other copyrighted works are included in the submission, the author(s) must obtain written permission from the copyright owners and credit the source(s) in the article. Elsevier has preprinted forms for use by authors in these cases: contact Elsevier's Rights Department, Philadelphia, PA, USA: phone (+1) 215 238 7869, fax (+1) 215 238 2239, e-mail permissions@elsevier.com. Requests for materials from other Elsevier publications may also be completed on-line via the Elsevier homepage https://www.elsevier.com/locate/permissions.

Elsevier supports responsible sharing

Find out how you can share your research published in Elsevier journals.

Ethics of Experimentation

Procedures involving experiments on human subjects should be in accordance with the ethical standards of the Committee on Human Experimentation of the institution in which the experiments were done or in accordance with the Helsinki Declaration of 1975. Procedures involving experimentation on animals should be done in accordance with the guidelines of the institution in which the experiments were done.

Proofs

One set of proofs will be supplied to the author to check for type-setting accuracy: no changes to the manuscript will be allowed at this stage. Elsevier will do everything possible to correct your article and publish it accurately and without delay. It is important, therefore, to ensure that all author corrections are marked clearly on your proofs and returned to us in one communication. No additional corrections are possible following receipt by Elsevier of the first set of marked up proofs. In the interests of publication time, authors should respond as quickly as possible, preferably by e-mail.

Reprints

PDF offprints are provided free of charge. No reprints are provided free of charge. Reprints (50 copies minimum) can be ordered at quoted prices on order forms sent out together with the proofs.