



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ
NÚCLEO DE TEORIA E PESQUISA DO COMPORTAMENTO
PÓS-GRADUAÇÃO EM TEORIA E PESQUISA DO COMPORTAMENTO

BRUNO DE MATOS MANSUR

ELEMENTOS PARAMÉTRICOS DA AGRESSÃO EM
DANIO RERIO

BELÉM

2014

BRUNO DE MATOS MANSUR

ELEMENTOS PARAMÉTRICOS DA AGRESSÃO EM
DANIO RERIO

Trabalho apresentado ao Programa de Pós-Graduação em Teoria e Pesquisa do Comportamento da Universidade Federal do Pará, como requisito para obtenção do título de mestre em Teoria e Pesquisa do Comportamento.

Orientador: Prof. Dr. Amauri Gouveia Junior

BELÉM

2014

"Aprende a buscar esse conhecimento prostrando-se aos pés dos sábios, interrogando-os e servindo-os; e os sábios, os que vêem a verdade irão iniciar-te na sabedoria."

Krishna (Bhagavad Gita)

Agradecimentos

Em minha trajetória tive a oportunidade de encontrar pessoas especiais que me ajudaram a concluir etapas e objetivos me impulsionando de várias formas. Sou grato à todas elas, em primeiro lugar à meu pai, minha mãe e minha irmã, que foram muito além das obrigações familiares, sempre me apoiando, incentivando e desejando incondicionalmente meu sucesso em todas os momentos da minha vida.

Ao professor Dr. Amauri Gouveia Junior, que além de orientador acadêmico foi por muitas vezes um orientador para vida e um grande amigo, já há alguns bons anos.

Aos professores Dr. Silvio Morato e Dr. Denis Rosemberg, pelas valiosas contribuições na qualificação do trabalho e ao prof. Celio Estanislau pela participação na banca.

Aos professores François Tonneau e Maria Luisa (Malu), pelas disciplinas lecionadas e pelas contribuições ao meu intelecto quanto à estatística e redação científica.

Agradeço muito aos companheiros de mestrado, Ciléa Mesquita e Eduardo Paz. Além, é claro, dos companheiros, amigos e colegas de laboratório, que contribuíram para que o trabalho fosse mais leve e divertido: Bruno Rodrigues, Marcelo Pinheiro, Cláudio Dias, Raissa Cruz, Gabriela Nascimento e Paula Carvalho. Um especial agradecimento à Aline Tavares, aluna dedicada de iniciação científica que contribuiu muito para a conclusão dos experimentos.

Espero que este seja mais um passo, dentre vários passos futuros em minha carreira. Todos aqui citados, além de outras pessoas que torceram por mim, já contribuíram muito para o que quer que eu faça na vida a partir de agora.

Sumário

Resumo	1
Introdução.....	2
Agressão	2
O <i>Danio rerio</i>	3
Agressão em peixes	4
Agressão no <i>Danio rerio</i>	5
Modelos animais de psicopatologia	6
Objetivo Geral.....	7
Método	9
Método geral.....	9
Sujeitos	9
Testes comportamentais.....	9
Aparato	9
Procedimentos.....	9
Experimentos	12
Experimento I.....	12
Experimento II	12
Experimento III.....	13
Análise estatística	13
Experimento I.....	13
Experimentos II e II	13
Resultados Experimento I.....	14
Discussão Experimento I	18
Conclusão Experimento I.....	20
Resultados Experimento II	20
Discussão Experimento II.....	27
Conclusão Experimento II	28
Resultados Experimento III.....	28
Discussão Experimento III	35
Conclusão Experimento III.....	36
Discussão Experimentos II e III	37
Conclusão.....	38

Resumo

A agressividade é um conjunto de comportamentos que desempenham um papel importante na adaptação e sobrevivência dos indivíduos. O estudo e desenvolvimento de testes comportamentais com o *Danio rerio* tem grande relevância para diversas áreas da ciência, fornecendo ao cientista um instrumento confiável que monitora comportamentos em uma escala mais simples. O objetivo deste trabalho é estabelecer um modelo de estudo de agressão em *Danio rerio*, no qual os sujeitos são expostos a isolamento, seguido de interação agonística e verificar se o resultado de uma luta pode influenciar o resultado de lutas posteriores. Para tanto, desenvolvemos três experimentos: I - Determinar os efeitos do tempo de isolamento no padrão de agressividade; II - Determinar o efeito da natureza do oponente sobre o padrão de agressão e se há continuidade no padrão de Vencer/Perder com oponentes diversos; III - Determinar se há continuidade no padrão de Vencer/Perder com o mesmo oponente. Nossos experimentos mostram que o melhor tempo de isolamento para eliciar o display agressivo do peixe *Danio rerio* é o de 6h; o resultado das lutas com novos oponentes ingênuos não é influenciado pelo resultado de lutas anteriores; e o resultado de lutas com o mesmo oponente é inteiramente influenciado pelo resultado das lutas anteriores. O fato de o sujeito reconhecer seu oponente como o mesmo oponente da luta anterior parece ser um fator relevante no estabelecimento e manutenção da hierarquia, pois esta não se mantém quando o sujeito luta com um novo sujeito ingênuo. O reconhecimento social do oponente parece ser um comportamento relevante para o estabelecimento e manutenção da hierarquia no grupo, influenciando padrões de agressividade.

PALAVRAS CHAVE: Zebrafish; *Danio rerio*; Agressão; Lutas; Comportamento

KEY WORDS: Zebrafish; *Danio rerio*; Aggression; Priming; Behavior

Introdução

O estudo e desenvolvimento de testes comportamentais tem grande relevância para várias áreas da ciência, possibilitando que o cientista responda suas questões lançando mão de um instrumento confiável. A elaboração e validação de testes comportamentais deve ser feita de modo a facilitar o procedimento de teste, portanto a escolha do sujeito experimental é uma parte significativa que pode determinar a relevância e eficiência deste teste em determinada comunidade científica. A escolha do *Danio rerio* como modelo de organismo vertebrado se justifica por seus comportamentos poderem ser monitorados em uma escala mais simples do que em muitas espécies de peixes e animais (Barba, 2012). Assim como para outros testes comportamentais, o *Danio rerio* é, portanto, candidato potencial e conveniente para o estudo da agressividade.

Agressão

A agressão é o conjunto de comportamentos emitidos pelos animais quando há necessidade de proteção, disputa de recurso ou risco de predação iminente, podendo ser dirigida a um co-específico ou a um animal de outra espécie. Tal comportamento mantém-se entre as espécies com relação a seus elementos funcionais, variando na sua topografia de apresentação em função da espécie e de sua emissão como comportamento defensivo ou ofensivo (Blanchard & Blanchard, 1988; Blanchard & Blanchard, 2003).

Pode ser dividida em dois componentes diversos, sendo, um componente apetitivo ou consumatório. O primeiro é um conjunto de respostas variadas, mas não aleatórias, que aumentam a probabilidade do animal obter sucesso com a agressão; o segundo é a obtenção de um estímulo ligado a uma resposta que esta no topo da cadeia apetitiva. Desta forma, os componentes apetitivos são todas as respostas que não se relacionam temporalmente de forma direta ao estímulo alvo, como por exemplo, ações que antecedem o ato de comer, como caçar e abater uma presa, assim como ações que antecedem a cópula, como cortejar uma fêmea. Por sua vez, o comportamento consumatório é o comportamento final de uma sequência de comportamentos que se

apresenta de forma padronizada e que têm como objetivo a saciação, como por exemplo, a ação de comer ou o ato da cópula (Healy & Proctor, 2003).

Em mamíferos, a agressão está relacionada a uma complexa rede neural de áreas que está envolvida com outros comportamentos complexos, como a interação social não agressiva e emoções. Este circuito envolve o córtex pré-frontal, a amígdala, o hipocampo, a área medial pré-óptica, córtex cingulado anterior, a ínsula e o estriato ventral, com algumas variações entre espécies e entre agressão defensiva e ofensiva. (Nelson & Chiavegatto, 2001). A base bioquímica da agressão envolve hormônios esteróides, com destaque para os hormônios sexuais, neuropeptídeos como a vasopressina e a ocitocina, aminas como a histamina e o 5-Ht, bem como o óxido nítrico (Nelson & Chiavegatto, 2001).

Para o estudo da agressão em animais, têm-se analisado comumente um tipo de comportamento com componentes apetitivos e consumatórios denominado *display* (Evans, 1985; Bronstein, 1988). *Display* pode ser conceituado como padrões de comportamentos dirigidos a um fim e que auxiliam a comunicação (Paton & Caryl, 1986). O *display* agressivo é o conjunto de respostas próprias da espécie, com topografia reconhecível e relativamente estereotipada, desencadeado pela presença de um co-específico, que invade o território ou ameaça a posse de algum recurso, possuindo tanto componentes apetitivos como consumatórios. (Evans, 1985; Paton & Caryl, 1986; Blanchard & Blanchard, 1988)

O Danio rerio

O *Danio rerio*, identificado na literatura internacional como *Zebrafish* e no Brasil, como Paulistinha, devido a listras escuras horizontais em seu corpo, que se assemelham à bandeira do Estado de São Paulo, constitui-se em um pequeno peixe ósseo, originário do Delta do Ganges, em Bangladesh, de hábitos diurnos, onívoro e que vive em meio à vegetação em águas rasas (Spence et al., 2006). O *Danio rerio* vem sendo utilizado como modelo animal em diversas áreas da pesquisa devido a sua fácil manutenção e reprodução (Burne et al, 2011; Houart, 2001; Bilotta, Saszik, & Sutherland, 2001), sendo utilizado em pesquisa fisiológica e anatômica, além de desenvolvimental (Champagne, Hoefnagels, de Kloet, & Richardson, 2010; Gerlai,

2010; Norton & Bally-Cuif, 2010; Stewart & Maximino, 2011). Os estudos de comportamento deste animal ainda são de pequena representatividade, sendo que uma consulta a base do “*The Zebrafish Model Organism Database*” indica apenas 207 trabalhos referentes a comportamento ou aprendizagem, sendo que grande parte deles usa atividade motora em situação livre para medir efeito de drogas, não se constituindo em estudo do comportamento do animal, mas no uso do comportamento como índice de efeito de uma alteração farmacológica.

Modelos animais de psicopatologia adaptados a peixes são muitos e diversos, e cobrem um grande número de patologias, sendo que uma revisão destes pode ser encontrado em Gouveia Jr, Maximino & Brito (2006). Nosso laboratório se concentrou no estudo de modelos animais de ansiedade, especialmente a preferência claro/escuro, que foi validada como um modelo piscino de ansiedade, tanto em seus aspectos comportamentais como farmacológicos (Gouveia jr et al., 2005; Maximino, Brito, Dias, Gouveia, & Morato, 2010; Maximino, Brito, Batista, et al., 2010; Maximino, Brito, Colmanetti, et al., 2010; Maximino, Silva, Gouveia, Herculano, 2011), sendo também demonstrada a sua generalidade entre diversas espécies de peixes (Maximino et al., 2007). Tal esforço de nosso laboratório está de acordo com o *Zeitgeist* atual, o qual elegeu o *Danio rerio* como um animal de experimentação por excelência por sua fisiologia e genética conhecidas e facilidade de reprodução e alojamento (Norton *et al*, 2010; Gerlai, 2010, Champanhe *et al*, 2010, Stewart *et al*, 2010). Embora os estudos comportamentais com peixes remontem as origens da psicologia, com Thorndike (1911) utilizando *Fundulus sp* em estudos de labirinto e Lorenz (1983) com peixes ciclídeos, o interesse do estudo comportamental de peixes é relativamente recente, atendendo por um lado à necessidade de busca de outros animais de experimentação de menor custo de manutenção e por apresentarem uma grande possibilidade de usos, dado sua diversidade de habitats, hábitos e variação de fisiologia adaptada a diversos nichos, conforme já apontamos em trabalho anterior (Gouveia Jr. *et al*, 2006).

Agressão em peixes

Em peixes, a espécie mais utilizada para estudo de agressão é o *Betta splendens* (Gouveia jr, Maximino, Romão, Brito, & Ventura, 2007); no entanto, existem descrições de *display* espécie-específicos para outras espécies, como por exemplo, a

Tilápia (*Oreochromis niloticus*) (Giaquinto & Volpato, 1997) e o *Danio rerio* (Schneider, 2011; Oliveira, Silva, & Simões, 2011). Grande parte do estudo de agressão em peixes se concentra no *Betta splendens*, devido a suas características morfológicas e pela estereotipia de seu display, gerando inúmeros trabalhos (p. ex., Simpson, 1968; McGregor, Peake, & Lampe, 2001; Gouveia Jr, 2006; Santos, 2009). O *display* agressivo do *Betta splendens* caracteriza-se pela movimentação em direção ao outro peixe-estímulo, acompanhado de um aumento da saturação da coloração natural, abertura do opérculo e abertura das nadadeiras dorsal e caudal (Evans, 1985; Bronstein, 1994). O *display* agressivo deste peixe é sensível a drogas moduladoras do sistema serotoninérgico, como a fluoxetina. Em doses agudas essa droga reduz a agressividade (Clotfelter, O'Hare, McNitt, Carpenter, & Summers, 2007), porém, em doses crônicas, a redução da emissão de *displays* agressivos não é encontrada (Clotfelter et al., 2007). A testosterona parece ter influência sobre o *display* do *Betta* (Dzieweczynski, Eklund, & Rowland, 2006), aumentando-o.

Agressão no D. rerio

Para o *D. rerio*, um *display* composto de uma sequência de comportamentos agonísticos estereotipados é relatado (Schneider, 2011). O trabalho de Oliveira *et al* (2011) ainda apresenta um dado que nos interessa, já que é relatado que ganhar ou perder uma luta, após 24h de isolamento, pode influenciar a probabilidade de sucesso em outra posterior, após mais uma hora de isolamento, favorecendo os vencedores. Tal fato pode ser relacionado a padrões de incontrolabilidade do ambiente necessários para ocorrência do desamparo ligado a uma história de vida, podendo vir a ser desenvolvido um modelo de depressão em peixes. Nosso estudo é baseado neste artigo e propõe uma continuação dos estudos

Existem dados na literatura que indicam a importância do isolamento social como intensificador da agressividade. Peixes ciclídeos da espécie *Archocentrus nigrofasciatus* exibem maior agressividade em lutas se forem isolados por 24h, se comparados a peixes mantidos em grupo (Earley et al, 2006). O peixe *Betta splendens* também apresenta aumento na emissão de *display* agressivo

Há ainda um neuropeptídeo que desempenha papel regulatório na agressão do *Danio rerio* (Larson, O'Malley, & Melloni, 2006), a arginina vasotocina (AVT), com

função semelhante à vasopressina em mamíferos, afetando agressividade, corte e cuidado parental, sendo um indicador de posição social no zebrafish. Os peixes dominantes apresentam maior agressividade e expressam AVT na camada magnocelular da área pré-óptica e não a expressam na camada parvocelular, enquanto que sujeitos dominados expressam AVT na camada parvocelular e não expressam na camada magnocelular.

Modelos animais de Psicopatologia

Um modelo de psicopatologia, para nossos fins, pode ser conceituado como um arranjo de estímulos que visa mimetizar e mensurar aspectos considerados essenciais em uma psicopatologia. Estes aspectos podem ser topográficos, de processos ou de sensibilidade a drogas (Willner, 1991; Gouveia Jr, 1999; Maximino & Herculano, 2010; Silva *et al*, 2005). Sua descrição, em geral, é feita de forma a utilizar um vocabulário misto de diversas linhas de psicologia e áreas de pesquisa que tem interesse no modelo, como a Farmacologia, a Ecologia, a Fisiologia, entre outras (Silva *et al*, 2005). O processo de aceitação de um modelo pela comunidade científica é antecedido por um processo de validação, que implica em descrever suas semelhanças com uma ou mais patologias a serem mimetizadas, sua capacidade de reagir a drogas e outras manipulações terapêuticas utilizadas na clínica destes transtornos, bem como, sua capacidade de gerar novos tratamentos e possibilidades de manejo, chamadas, respectivamente, de validade de face, farmacológica e preditiva (Willner, 1991). A construção de um modelo também é profundamente influenciada por condições históricas e sociais, o *Zeitgeist* (Willner, 1991).

O estudo da Psicopatologia Experimental é um estudo multidisciplinar por excelência, já que exige por parte do pesquisador domínio de elementos tanto de Psicopatologia, Farmacologia e Fisiologia quanto sobre a Ecologia Comportamental do animal a ser estudado, de forma a escolher respostas mais representativas do repertório deste animal para buscar homologias com as alterações registradas em humano (Maximino *et al*, 2010).

Embora a literatura indique a presença de vários modelos de ansiedade para o *Danio rerio*, desenvolvidos tanto utilizando respostas respondentes como operantes (Maximino *et al*, 2010c), não encontramos na literatura modelos de depressão

associados a este organismo. Quando vemos o cenário com peixes como um todo, um modelo clássico de depressão, o desamparo aprendido é narrado para o *Carassius auratus* (Goldfish, véu de noiva, Kinguio) (Behrend & Bitterman, 1963 Padilla *et al.*, 1970, Nash *et al.*, 1983, Brown *et al.*, 1985).

O desamparo aprendido pode ser descrito como uma interferência sobre a aprendizagem, em geral, de uma tarefa aversiva por um animal (cães, gatos, ratos, peixes, aves e humanos, entre outros), que é gerada por uma exposição prévia, com normalmente de 24 h de antecedência, a estímulos aversivos incontrolláveis e imprevisíveis, sendo em sua maioria utilizados choques elétricos (Seligman, 1975, Seligman & Maier, 1967; Maier & Seligman, 1976; Peterson, Maier & Seligman, 1993, Rodd *et al.*, 1997), embora outros tipos de incontrollabilidade, como a queda incontrollável, passividade na luta e restrição motora também gerarem o fenômeno (Anderson & Paden, 1966; Kahn, 1951; Ewing, 1967; Richter, 1957). Diversos autores consideram que tal fenômeno pode ser considerado um modelo animal de depressão, fato que é reforçado pelo efeito de drogas antidepressivas sobre este o fenômeno, (Seligman e Maier, 1967; Maier & Seligman, 1976; Peterson, Maier & Seligman, 1993; Hunziker, 2005; Gouveia Jr, 2001; Malberg & Duman, 2003) embora haja algumas contestações desta visão dominante (Glazer & Weiss, 1976).

A experiência de perder pode ser tratada como uma experiência de incontrollabilidade e o estresse de luta pode ser um estressor tão significativo quanto choques elétricos. No entanto, para poder se pensar na adaptação deste teste como modelo de depressão em peixes e como modelo de quantificação e estudo de agressão, é necessário que seus aspectos paramétricos sejam estudados, sendo parametrizados os elementos de aplicação do modelo e sua farmacologia.

Objetivo Geral

Estabelecer um modelo de estudo de agressão em *D. rerio* expostos a isolamento, seguido de interação.

Objetivos específicos:

- 1) Determinar o melhor período mínimo de isolamento para obtenção do padrão de agressão
- 2) Verificar se o resultado de uma luta (Vencer/Perder) influencia o resultado de lutas posteriores
- 3) Determinar a continuidade de padrão de Vencer/Perder com oponentes diversos
- 4) Determinar a continuidade de padrão de Vencer/Perder com o mesmo oponente

Método

Método geral

Sujeitos:

Foram utilizados 144 peixes adultos da espécie *Danio rerio* de tipo selvagem e sexo indeterminado, adquiridos em um pet shop local e armazenados em dois aquários coletivos de 100 l (n=88), com aeração constante, p.H médio mantido em 6.8, controle de temperatura (26 ± 2 °C) e luz (14/10 h de Claro/Escuro, início as 6 h), alimentados uma vez ao dia com ração comercial (*Tetra, Germany*).

Testes Comportamentais:

Aparato

Teste de agressão (padrão):

Foi utilizado um aquário de vidro retangular medindo 7,5 cm de comprimento, 11 cm de largura e 14 cm de altura, com coluna d'água de 10 cm. Este aquário possui uma porta opaca deslizante no centro, que dividia igualmente as duas partes, para isolar visualmente os sujeitos, mas não quimicamente.

Procedimento:

Teste de agressão (padrão):

Foi utilizado o protocolo de Oliveira et al (2011), que consiste no isolamento do animal por 24 h antes do teste em um aquário com uma divisão opaca entre os animais, organizados em pares padronizados por peso e tamanho, de forma que a diferença entre eles não seja maior que 3 mm e seu peso não tenha diferença maior que 3,6 %. Após o isolamento de 24 h, a barreira opaca é removida e a interação é filmada por 30 minutos para posterior análise. Somente os primeiros cinco minutos e os últimos cinco minutos

são analisados. O procedimento é repetido novamente após determinado período de isolamento. O etograma proposto por Schneider, (2011) era registrado em termos de frequência e duração da emissão dos comportamentos. O etograma utilizado é similar ao encontrado nos trabalhos de Oliveira et al (2011) (vide tabela 1). Quando o período de isolamento ultrapassava 24h, os sujeitos recebiam alimentação normalmente e recebiam aeração no aquário experimental. Nos experimentos II e III, o tempo de isolamento foi de 6h, devido ao experimento I apontar que este é o tempo de isolamento mais eficiente para eliciar a agressividade.

Tabela 1. Etograma dos comportamentos agressivos do *Zebrafish* apresentados durante interação agonística (Schneider, 2011). Os comportamentos podem ser classificados de acordo com as funções: Defensivo (D) ou Agressivo (Ag). Os comportamentos Agressivos podem ser Apetitivos (Ap) ou Consumatórios (C).

Comportamento	Função	Descrição
<i>Display</i> /Mostrar-se;	Ag/A	O sujeito ergue nadadeiras anais e dorsais e as movimenta, estando à distância aproximada de menos de um corpo do oponente
<i>Circle</i> /Circular	Ag/A	Os sujeitos se aproximam com nadadeiras eretas e nadam formando um círculo, um no encalço do outro, normalmente ascendendo na coluna de água. Podendo durar de segundos a minutos.
<i>Strike</i> /Atacar	Ag/C	O sujeito nada rapidamente em direção ao outro, mas sem contato físico.
<i>Bite</i> /Morder	Ag/C	O sujeito abre e fecha a boca em contato com a superfície do corpo do oponente, normalmente em áreas próximas a áreas mais ventrais e posteriores.
<i>Chase</i> /Perseguir	Ag/C	Similar ao <i>Strike</i> , mas com perseguição ativa por parte do agressor. Este comportamento acaba quando o oponente para.
<i>Retreat</i> /Recuar	D	O sujeito nada rapidamente para longe do oponente, em resposta a um <i>Strike</i> ou <i>Bite</i> .
<i>Flee</i> /Fugir	D	Reação de fuga contínua em resposta a um <i>Chase</i> .
<i>Freeze</i> /Congelar	D	O sujeito mantém-se imóvel com nadadeiras retraídas, próximo ao fundo ou à superfície, com a região caudal voltada para baixo.

Experimentos

Experimento I

Objetivo: Determinar os efeitos do tempo de isolamento no padrão de agressividade.

Sujeitos: 64 animais divididos em grupo, segundo tempo de isolamento (n=16)

Procedimento: Os animais foram isolados dentro do aparato padrão por períodos variáveis (1 h, 6 h, 24h e 48h) e posteriormente testados segundo o procedimento padrão em díades, gerando sempre um sujeito submisso e outro dominante após cada luta. Cada período era testado com um grupo de 16 animais.

Para identificar os sujeitos dominantes e submissos, ao fim dos 30 minutos de luta os sujeitos foram observados. Os critérios de dominância eram: coloração vivida, maior descolamento no aquário e emissão de comportamentos agressivos, como *Display*, *Circle*, *Strike*, *Bite*, *Chase*. Os critérios de submissão eram: coloração pálida, menor descolamento no aquário e emissão de comportamentos defensivos, como *Retreat*, *Flee*, *Freeze*. A análise estatística confirmou a divisão dos sujeitos como dominantes e submissos, o critério de classificação foi a frequência de emissão de comportamentos agressivos, para os dominantes (*Display*, *Circle*, *Strike*, *Bite*, *Chase*, *Retreat*) e comportamentos defensivos para os submissos (*Retreat*, *Flee*, *Freeze*).

Experimento II

Objetivo: Determinar o efeito da natureza do oponente sobre o padrão de Agressão e se há continuidade (aprendizagem) de padrão de Vencer/Perder com oponentes diversos.

Sujeitos: 56 animais divididos em grupos (14 experimentais e 42 adversários)

Procedimento: após o isolamento no período obtido no experimento I (6 horas), os primeiros animais a lutar (grupo experimental, 7 submissos e 7 dominantes) foram expostos a novas lutas com adversários ingênuos diferentes, com intervalos de 1, 2 e 4 dias e a coerência dos padrões de ganhar/perder foi observada.

Experimento III

Objetivo: determinar se há continuidade (aprendizagem) de padrão de Vencer/Perder com o mesmo oponente; e o tempo para extinção do comportamento de Vencer/perder

Sujeitos: 16 animais experimentais (8 submissos e 8 dominantes)

Procedimento: após o isolamento no período obtido no experimento I (6 horas), os animais foram expostos a repetidas lutas com o mesmo adversário, com intervalos de 1, 2 e 4 dias e a coerência dos padrões de ganhar/perder foi observada.

Análise estatística

Experimento I

Os dados foram analisados por ANOVA, segundo fatores em estudo, seguido de teste de Tukey, desde que atendido a critérios de normalidade (teste Komolgorov Smirnov). Quando estes não eram atendidos, foi utilizado Anova on Ranks (Kruskall-Wallis) seguido de teste de Dunn. Os dados dos sujeitos submissos e dominantes foram analisados separadamente. Para analisar a diferença entre sujeitos submissos e dominantes, foi utilizado teste t ou Mann-Whitney, quando os dados não eram paramétricos.

Experimentos II e III

A coerência e continuidade dos padrões de ganhar ou perder lutas consecutivas foi medida pelo coeficiente de Tau de Kendall. Os dados referentes às diferenças comportamentais no decorrer dos dias de teste foram analisados por Anova de medidas repetidas, seguido de pós-teste Holm-Sidak, devido aos comportamentos emitidos pelos sujeitos experimentais nos diferentes dias serem dependentes da reexposição às lutas com o mesmo oponente ou com oponentes novos. Quando os dados não apresentavam parametria, o teste utilizado era a Anova de medidas repetidas ranqueadas (Friedman), seguido de pós-teste de Dunn. Após o teste, os dados eram então analisados por regressão linear e teste de correlação de Pearson ou Spearman, dependendo da distribuição dos dados, com intuito de verificar se existe relação linear ou correlação

entre os comportamentos durante os diferentes dias. No experimento II, os sujeitos utilizados somente como adversários não tiveram seus comportamentos analisados. Em ambos os experimentos, os dados dos sujeitos submissos e dominantes foram analisados separadamente.

Tabela 1. Resumo dos experimentos:

Experimento	Sujeitos	Procedimento	Análise estatística
1	64	Isolamento com variação de tempo	ANOVA e Teste de Tukey; Anova on Ranks (Para comparar os tempos de isolamento) e Teste de Dunn. Teste T ou teste T ranqueado (para análise submisso x dominante).
2	56	Isolamento e variação do adversário entre as lutas	Coeficiente Tau de Kendal (Continuidade do padrão vencer/perder); ANOVA RM e Holm-Sidak ou ANOVA RM on Ranks e Teste de Dunn; seguido de regressão linear e teste de correlação (Diferença entre dias)
3	16	Isolamento e repetição de lutas ao longo do tempo	Coeficiente Tau de Kendal (Continuidade do padrão vencer/perder); ANOVA RM e Holm-Sidak ou ANOVA RM on Ranks e Teste de Dunn; seguido de regressão linear e teste de correlação (Diferença entre dias)
Total de sujeitos: 136 animais			

Resultados

Experimento I

Inicialmente, para comparar os tempos de isolamento, a análise estatística ocorreu separadamente para os sujeitos submissos e dominantes. O teste não mostrou nenhuma diferença entre tempos de isolamento para os sujeitos submissos. Dentre os

sujeitos dominantes, ocorreram diferenças estatísticas nos comportamentos *Strike* e *Bite*, ambos entre os grupos de 1h e 6h (vide tabela 2), sendo o que o grupo de 6h apresentou maior frequência de comportamentos, como apontado na figura 1.

Tabela 2. Resultado dos testes estatísticos comparando tempos de isolamento separadamente para os sujeitos dominantes e subordinados.

Subordinate		Dominant	
Display	[H(3,16) = 0,708, p = 0,854]	Display	[H(3,16) = 4,319, p = 0,229]
Strike	[F(3,16) = 1,666, p = 0,197]	Strike	[F(3,16) = 4,043, p = 0,017] 6h x 1h
Chase	[H(3,16) = 4,140, p = 0,247]	Chase	[H(3,16) = 2,457, p = 0,483]
Retreat	[F(3,16) = 5,709, p = 0,127]	Retreat	[H(3,16) = 1,079, p = 0,782]
Circle	[H(3,16) = 3,522, p = 0,318]	Circle	[F(3,16) = 1,582, p = 0,216]
Bite	[H(3,16) = 5,121, p = 0,163]	Bite	[H(3,16) = 8,102, p = 0,044] 6h x 1h
Flee	[F(3,16) = 0,814, p = 0,497]	Flee	[H(3,16) = 2,138, p = 0,544]
Freeze	[H(3,16) = 1,427, p = 0,699]	Freeze	[H(3,16) = 0,566, p = 0,904]

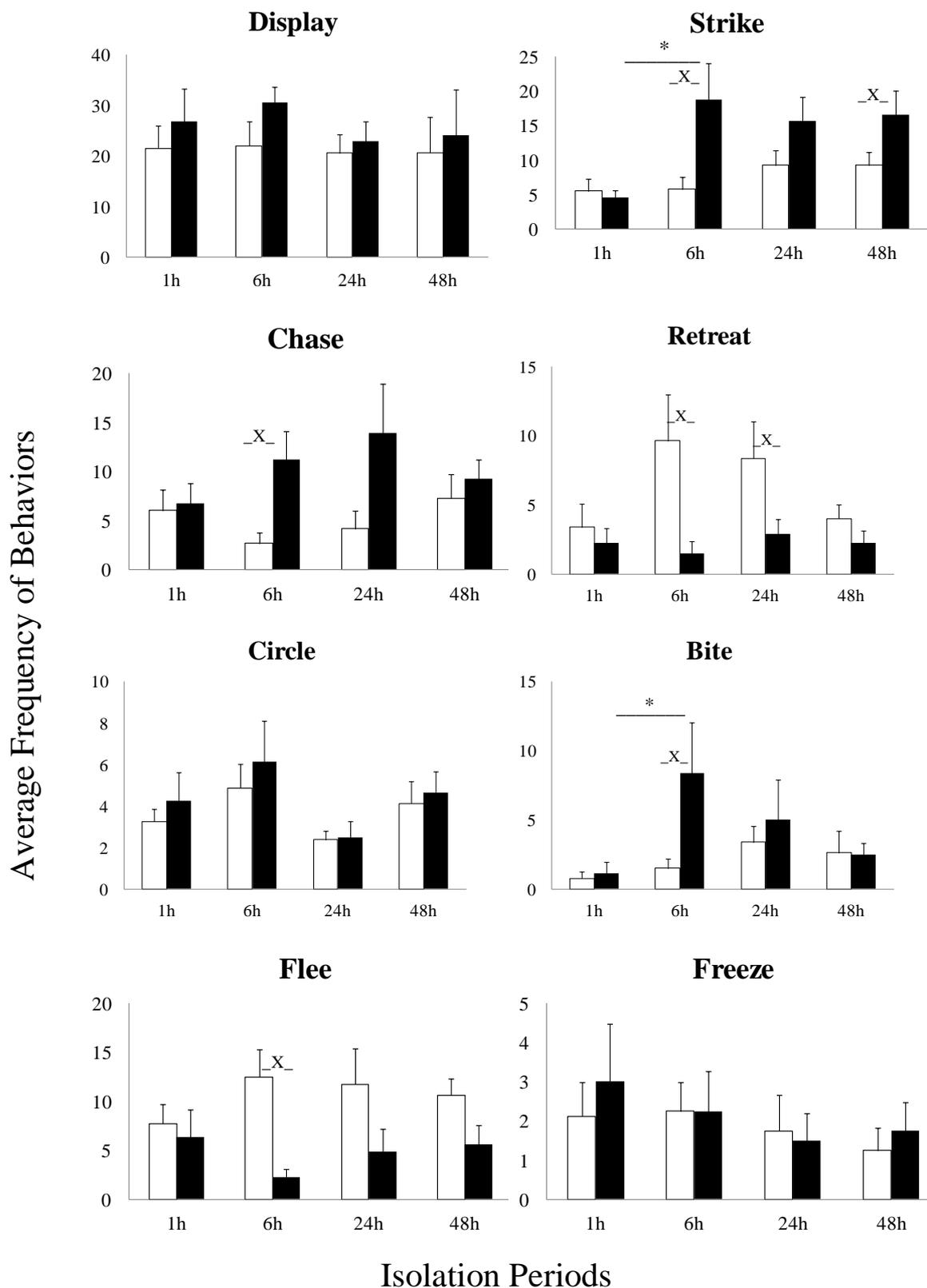


Figura 1. Média da frequência de emissão dos comportamentos do etograma (eixo y) e períodos de isolamento (eixo x). As barras brancas representam os comportamentos dos sujeitos submissos e as barras pretas dos dominantes. ___*___ = comportamentos que

diferem entre si, com $P \leq 0,05$; $_X_$ = diferença entre submisso e dominante com $P \leq 0,05$.

Para verificar qual período de isolamento proporciona uma diferença mais nítida entre dominante e submisso foi executado o Teste T ou teste T ranqueado, que apontou diferenças nos comportamentos *Strike*, *Chase*, *Retreat*, *Bite* e *Flee* no tempo de isolamento de 6h, como aponta a Tabela 3. O grupo de 24h de isolamento apresentou diferenças no comportamento *Retreat* e o grupo de 48h apontou diferenças em *Strike*. O grupo com tempo de isolamento de 1h não mostrou diferenças em nenhum dos comportamentos.

Tabela 3. Resultado dos testes estatísticos comparando os sujeitos dominantes e subordinados. t = teste T; T = Mann-Whitney; d.f = grau de liberdade; *P value* = valor de *P*; * = valor de $P \leq 0,05$; # = valor de $P \leq 0,09 > 0,05$.

		1h			6h			
		d.f	test	<i>P value</i>	d.f	test	<i>P value</i>	
Display	t	14	-1,704	0,111	t	14	0,771	0,453
Strike	t	14	0,505	0,615	T	14	44,000	0,010*
Chase	t	14	-0,300	0,768	t	14	-3,271	0,006*
Retreat	t	14	0,639	0,533	T	14	92,000	0,010*
Circle	T	14	63,000	0,645	T	14	-0,557	0,586
Bite	T	14	65,500	0,798	T	14	45,500	0,038*
Flee	t	14	0,464	0,650	T	14	98,000	0,001*
Freeze	t	14	-0,591	0,564	T	14	68,000	0,959

		24h			48h			
		d.f	test	<i>P value</i>	d.f	test	<i>P value</i>	
Display	t	14	-0,505	0,621	T	14	65,000	0,798
Strike	t	14	-1,781	0,097#	t	14	-2,189	0,046*
Chase	t	14	-2,074	0,057#	t	14	-0,731	0,477
Retreat	t	14	-0,161	0,044*	T	14	81,500	0,161
Circle	t	14	67,000	0,875	t	14	-0,393	0,700
Bite	T	14	65,500	0,959	t	14	0,0815	0,936
Flee	t	14	1,825	0,089#	T	14	86,000	0,065#
Freeze	t	14	0,251	0,805	t	14	-0,632	0,5347

Discussão

Experimento I

De acordo com a análise estatística, o melhor tempo para eliciar o comportamento de agressão do *D. rerio* parece ser o de seis horas, pois a análise de variância entre grupos mostrou uma maior frequência de emissão dos comportamentos

Strike e *Bite*. Além disso, podemos perceber nos gráficos que de maneira semelhante aos comportamentos *Strike* e *Bite* o comportamento *Circle* no tempo de seis horas obteve altas taxas de emissão, em concordância às altas taxas de emissão dos comportamentos *Flee* e *Retreat* dos sujeitos submissos, o que parece indicar que o tempo de seis horas sinaliza mais claramente a diferença entre sujeitos dominantes e submissos. Isto é confirmado pelo teste que comparou sujeitos submissos e dominantes (vide tabela 3). O teste mostra que no tempo de 6h os comportamentos *Strike*, *Chase*, *Retreat*, *Bite* e *Flee* diferiram significativamente entre sujeitos submissos e dominantes, de forma que *Strike*, *Chase* e *Bite* foram mais emitidos por dominantes, enquanto *Retreat* e *Flee* por sujeitos submissos. Estes são comportamentos importantes para a identificação da agressividade. Entretanto, foi possível observar a emissão de todos os comportamentos do display em todos os tempos testados, portanto o display ocorre em todas as situações, sendo que o isolamento de seis horas parece propiciar um modelo otimizado de agressão. Estes resultados contrastam com os dados obtidos por Larson et al. (2006), que propunha 5 dias de isolamento, ou mesmo de Schneider (2011), que afirma que o tempo de isolamento para eliciar o display agressivo não deve ser inferior a 24h. Todavia, a forma de isolamento difere da usada em nosso trabalho, sendo que no trabalho de Schneider os sujeitos foram isolados em recipientes individuais, enquanto que neste trabalho o isolamento foi visual e não químico.

O tempo de isolamento de 24h mostrou resultados interessantes para testagem, devido à análise gráfica dos comportamentos Display, *Strike*, *Chase*, *Retreat*, *Bite*, *Flee* e *Freeze*, sendo que a maior frequência de emissão de *Chase* foi neste tempo. O teste comparando sujeitos dominantes e submissos mostrou diferença significativa somente no comportamento *Retreat*. Outros comportamentos como *Strike*, *Chase* e *Flee* alcançam resultados interessantes, com valores de P menores do que 0,09. A diferença entre sujeitos dominantes e submissos é bem acentuada e os comportamentos de submissão, como *Freeze*, *Retreat* e *Flee* são marcadamente mais frequentes dentre os sujeitos submissos.

O isolamento de 48h ainda parece ser possível, entretanto, apresenta resultados menos eficazes que os tempos de 6h e de 24h, como pode ser observado nos gráficos. O comportamento *Strike* apresentou significância estatística e o comportamento *Flee* teve valor de $P = 0,065$. Um valor bem aproximado ao usualmente aceito para a rejeição da hipótese nula.

Dentre os tempos testados, o de uma hora parece ser o menos eficiente para eliciar os comportamentos de agressão, e é também o tempo que menos destaca as diferenças entre submisso e dominante. Portanto, de acordo com este estudo, é a opção menos eficiente de teste.

Conclusão

Experimento I

A análise dos dados nos permite concluir que o melhor tempo de isolamento para eliciar o display agressivo do peixe *Danio rerio* é o de 6h, sendo que o tempo de 24h também apresenta todos componentes do display de forma completa e eficaz, entretanto, menos marcante se comparado ao tempo de 6h. Os tempos de isolamento de 1h e de 48h também apresentam comportamentos do display, entretanto, a consistência e frequência destes comportamentos é diminuída, não sendo um bom indicador de dominância e agressividade.

Resultados

Experimento II

Inicialmente, com intuito de verificar se o resultado da primeira luta influencia o resultado das lutas posteriores com novos oponentes ingênuos, a coerência dos padrões de ganhar ou perder resultante da sequência de 4 lutas dos sujeitos experimentais contra os sujeitos ingênuos foi analisada. O teste utilizado para verificar se o padrão vencer/perder depende da luta anterior foi o coeficiente de Tau de Kendall. Os pares concordantes do coeficiente eram considerados como sendo os resultados de lutas iguais às lutas imediatamente anteriores, e os pares discordantes eram as lutas com resultados diferentes da antecedente. 3 pares eram possíveis por sujeito, pois nos testes havia uma sequência de quatro lutas para cada sujeito experimental.

O coeficiente de Kendall não rejeitou a hipótese nula em nenhuma das situações, apontando para a independência entre as lutas na análise de dominância (Vide tabela 4).

Tabela 4. Coeficiente Tau de Kendall verificando se lutas posteriores dependem das lutas anteriores no experimento 2, para os sujeitos dominantes, submissos e totais. Pares concordantes = Número de lutas com o mesmo resultado da anterior; Pares discordantes = Número de lutas com resultado diferente do anterior; τ = Coeficiente Tau de Kendall.

	Pares concordantes	Pares discordantes	τ	
Total	22	20	0,047619	
Dominante	9	12	-0,01429	
Submisso	13	8	0,02381	

Em seguida, para a análise dos dados referentes às diferenças comportamentais no decorrer dos dias de teste, foi utilizado Anova de medidas repetidas ou o teste de Friedman. A análise apontou diferenças estatisticamente significantes nos comportamentos *Freeze* e *Bite* entre os dominantes e também entre os sujeitos submissos (Vide tabela 5 e figura 2).

Tabela 5. Resultado dos testes estatísticos comparando os comportamentos entre os 4 dias de testes, para os sujeitos dominantes e submissos. F = Anova de medidas repetidas; χ^2 = Teste de Friedman; DF = grau de liberdade; SS = quadrados da soma; MS = quadrados da média; P = valor de P; * = valor de $P \leq 0,05$; ** = valor de $P \leq 0,09 > 0,05$.

	DF	SS	MS	F / χ^2	P	
Dominantes						
<i>Freeze</i>	χ^2	3		10,500	0,015*	
<i>Bite</i>	F	3	7033,821	2344,607	5,939	0,005*
<i>Circle</i>	χ^2			4,279	0,233	
<i>Display</i>	χ^2	3		7,629	0,054**	
<i>Flee</i>	F	3	0,104	0,0347	1,896	0,167
<i>Chase</i>	χ^2	3		1,870	0,600	
<i>Retreat</i>	F	3	0,00529	0,00176	0,668	0,582
<i>Strike</i>	F	3	0,0111	0,00371	1,123	0,366
Submissos						
<i>Freeze</i>	χ^2	3		10,946	0,012*	
<i>Bite</i>	F	3	5245,536	1748,512	7,15	0,002*
<i>Circle</i>	F	3	0,00219	0,00073	2,624	0,082**
<i>Display</i>	F	3	0,0621	0,0207	1,013	0,41
<i>Flee</i>	χ^2	3		5,162	0,160	
<i>Chase</i>	F	3	0,00289	0,000963	0,282	0,838
<i>Retreat</i>	χ^2	3		4,886	0,180	
<i>Strike</i>	F	3	0,0197	0,00656	2,113	0,134

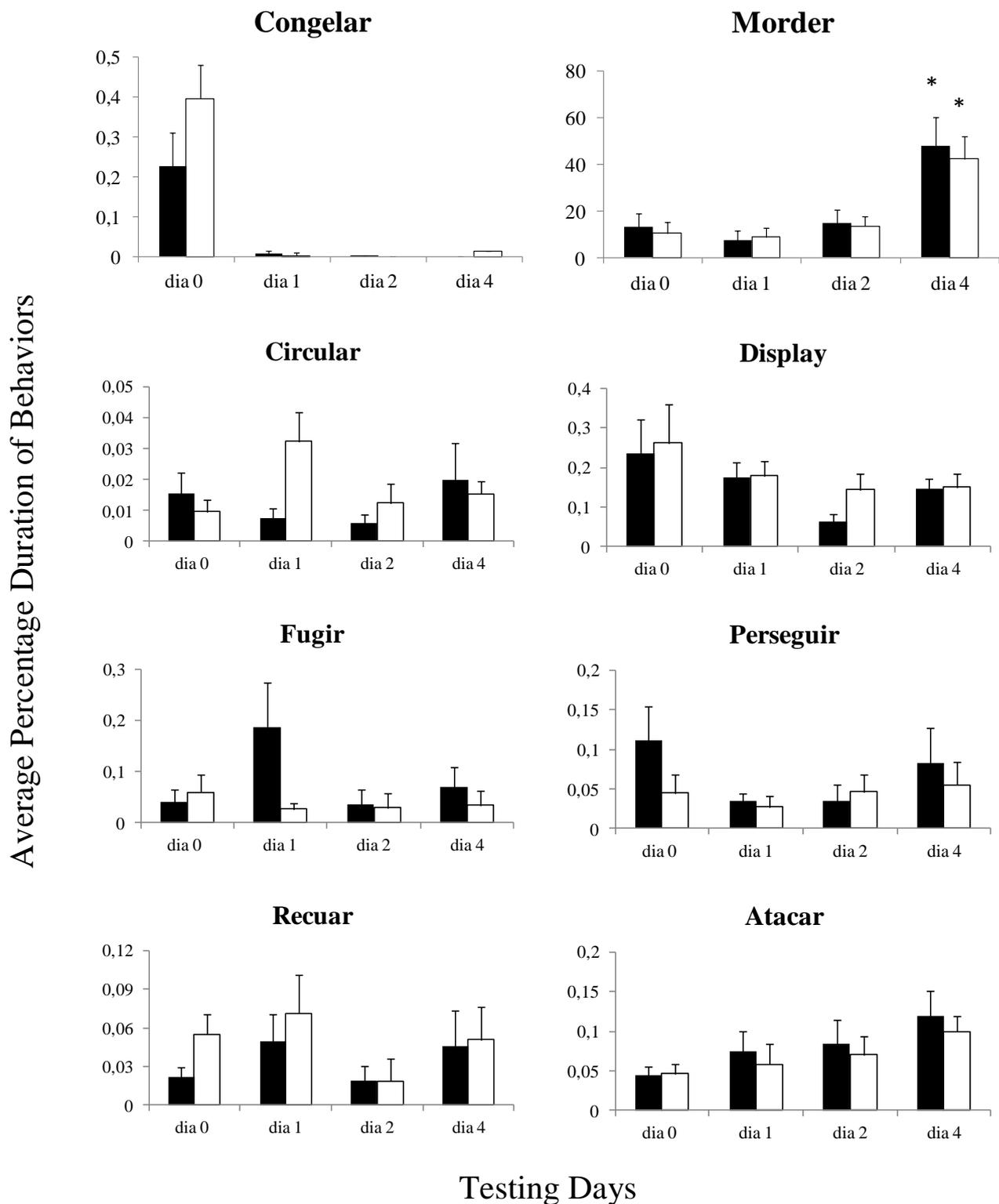


Figura 2. Duração percentual média da emissão dos comportamentos do etograma na sessão (eixo y) e dias de teste (eixo x). As barras pretas representam os comportamentos dos sujeitos dominantes e as barras brancas dos submissos. * = comportamentos que diferem do restante dos dias, com $P \leq 0,05$.

Para verificar se existe uma relação linear entre a variação comportamental no decorrer dos quatro dias de experimento, foi realizado o teste de regressão linear. Foram encontradas relações estatisticamente significativas nos comportamentos *Freeze*, *Bite*, e *Strike* entre os sujeitos dominantes e também entre os sujeitos submissos (Vide tabela 6 e figura 2).

Tabela 6. Resultado da regressão linear comparando os comportamentos entre os 4 dias de testes, para os sujeitos dominantes e submissos. R^2 = Coeficiente de determinação; Coefficient = Coeficiente; Std Error = Erro padrão; P = Valor de P ; * = valor de $P \leq 0,05$; ** = valor de $P \leq 0,06 > 0,05$.

	R^2	Coefficient	Std. Error	P
Dominante				
<i>Freeze</i>	0,232	-0,0461	0,0164	0,009*
<i>Bite</i>	0,334	9,465	2,62	0,001*
<i>Circle</i>	0,0161	0,00157	0,00241	0,52**
<i>Display</i>	0,0609	-0,0224	0,0173	0,205
<i>Flee</i>	0,00342	-0,00546	0,0183	0,768
<i>Chase</i>	0,00241	-0,00288	0,0115	0,804
<i>Retreat</i>	0,0123	0,00356	0,00625	0,574
<i>Strike</i>	0,129	0,0135	0,00685	0,06**
Submisso				
<i>Freeze</i>	0,171	-0,0759	0,0328	0,029*
<i>Bite</i>	0,382	8,412	2,1	0,001*
<i>Circle</i>	0,00103	-0,00038	0,00235	0,871
<i>Display</i>	0,0588	-0,0249	0,0195	0,214
<i>Flee</i>	0,0103	-0,00467	0,00897	0,607
<i>Chase</i>	0,0126	0,00433	0,00753	0,57**
<i>Retreat</i>	0,00773	-0,00354	0,00787	0,656
<i>Strike</i>	0,147	0,0177	0,00835	0,044*

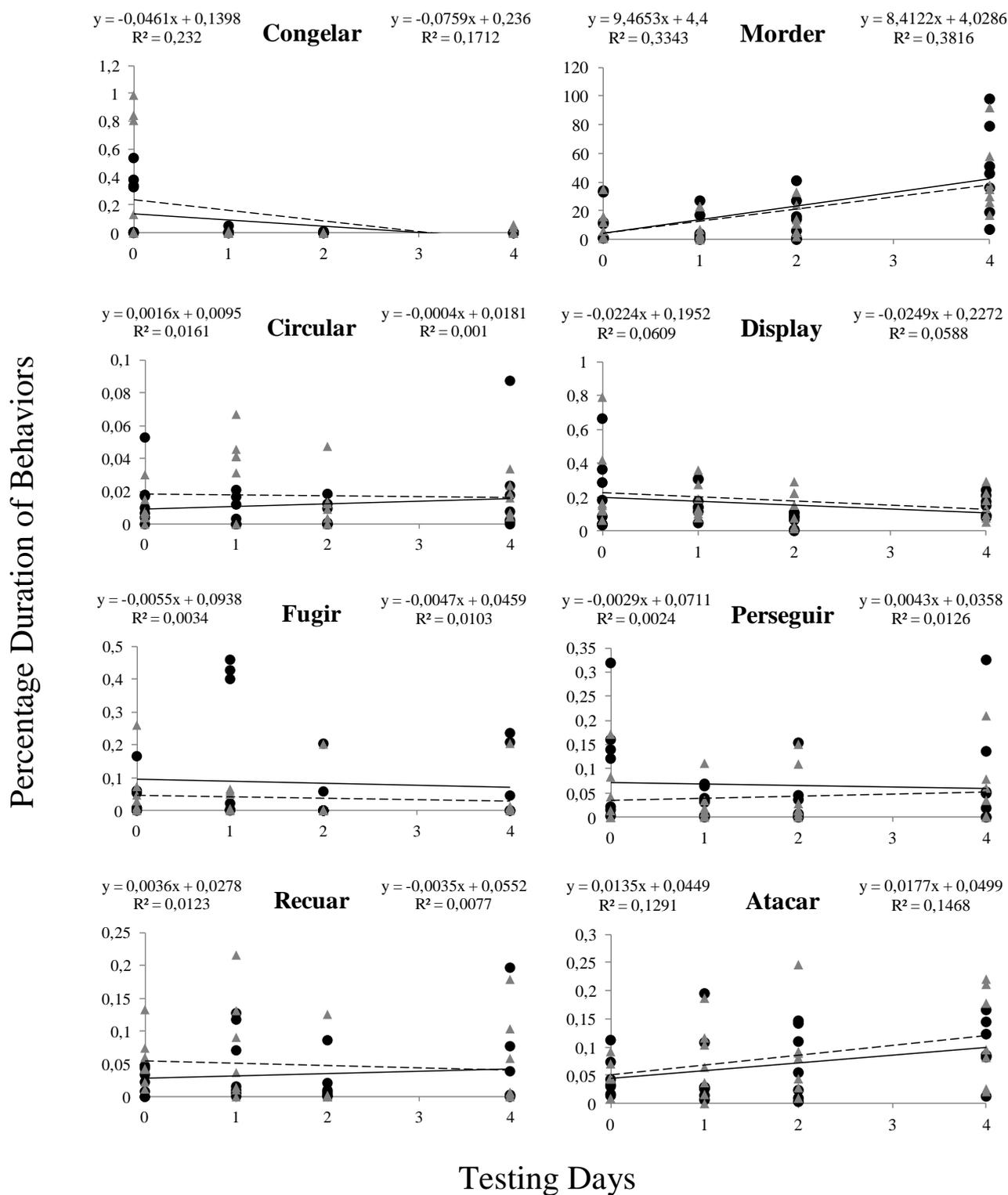


Figura 3. Duração percentual da emissão dos comportamentos do etograma na sessão (eixo y) e dias de teste (eixo x). Os pontos pretos representam o desempenho dos sujeitos dominantes e os triângulos cinzas dos submissos. A linha de tendência cheia representa o sujeito dominante, com sua respectiva função localizada à esquerda. A linha pontilhada e a função à direita representam o sujeito submisso.

Para verificar o quanto a reta de regressão representa os valores observados, uma análise de correlação de Pearson ou Spearman foi feita analisando o tempo total de permanência nos quatro dias de teste. Os comportamentos *Freeze* e *Bite* foram apontados como estatisticamente significantes entre os sujeitos dominantes. Entre os submissos os comportamentos foram *Freeze*, *Bite* e *Strike* (Vide tabela 7).

Tabela 7. Resultado da correlação dos comportamentos entre os 4 dias de testes, para os sujeitos dominantes e submissos. Correl. Coef = Coeficiente de correlação; *P* = Valor de *P*; Samples = Número de amostras; Test = Tipo de teste; S = Spearman; P = Pearson; * = valor de $P \leq 0,05$; ** = valor de $P \leq 0,07 > 0,05$.

	Correl. Coef	<i>P</i>	Samples	Test
Dominante				
<i>Freeze</i>	-0,59	0,001*	28	s
<i>Bite</i>	0,515	0,00503*	28	p
<i>Circle</i>	-0,032	0,871	28	s
<i>Display</i>	-0,313	0,105	28	p
<i>Flee</i>	-0,196	0,316	28	s
<i>Chase</i>	-0,171	0,381	28	s
<i>Retreat</i>	-0,0633	0,745	28	s
<i>Strike</i>	0,349	0,0686**	28	p
Submisso				
<i>Freeze</i>	-0,389	0,0406*	28	s
<i>Bite</i>	0,556	0,00213*	28	p
<i>Circle</i>	-0,0171	0,931	28	p
<i>Display</i>	-0,272	0,161	28	p
<i>Flee</i>	-0,239	0,218	28	s
<i>Chase</i>	0,111	0,57**	28	s
<i>Retreat</i>	-0,301	0,118	28	s
<i>Strike</i>	0,381	0,0454*	28	p

Discussão

Experimento II

No coeficiente de Kendall, valores próximos de 1 indicam concordância, enquanto que próximos de -1, discordância. Neste experimento, o coeficiente de Kendall apresentou valores muito próximos de 0 em todas as análises, como mostra a tabela 4. Tal valor não permite a rejeição da hipótese nula, portanto, o desempenho dos sujeitos parece não ser influenciado pelo resultado da luta anterior. Estes resultados contrastam com os encontrados no experimento de Oliveira et al (2011), no qual 85,71% dos sujeitos que venceram a primeira luta, venceram também a segunda. Em nosso experimento, se levarmos em conta somente a sequência das duas primeiras lutas, somente 42,85% dos sujeitos que foram dominantes na interação inicial mantiveram-se dominantes na luta seguinte, e 57,14% dos sujeitos submissos na primeira luta, mantiveram-se submissos na segunda luta. São resultados distintos e resultam possivelmente da diferença de tempos de isolamento, que no citado experimento foi de 24h. O tempo de 6h, de acordo com o experimento 1, possibilita de forma mais eficiente a apresentação dos elementos do display, desta forma, todos os sujeitos envolvidos no teste parecem ter uma probabilidade semelhante de vencer a segunda luta. Tanto o sujeito que venceu a primeira luta, quanto o sujeito submisso ou o desafiante ingênuo passam por um isolamento de 6h antes da segunda luta, portanto podem emitir um display energético e completo.

Para analisar as diferenças comportamentais no decorrer dos 4 dias de lutas, foram realizados testes de Anova com medidas repetidas, regressão linear e correlação, também para investigar se os padrões comportamentais se alteram de forma dependente da sequência de lutas. A Anova RM apontou diferenças estatisticamente significantes nos comportamentos *Freeze* e *Bite* entre os dominantes e também entre os sujeitos submissos, da mesma forma, o comportamento *Display* obteve um valor de *P* muito próximo à rejeição à hipótese nula, com 0,054 para os dominantes. Entre os submissos, o mesmo ocorreu com o comportamento *Circle*, com 0,082 (Vide tabela 5). Na regressão linear, novamente os comportamentos *Freeze* e *Bite* tiveram diferenças estatisticamente significantes entre os dominantes, o que foi reforçado pelo teste de correlação, mostrando que o comportamento *Freeze* decresce com os dias e o

comportamento *Bite* aumenta. Entre os submissos os comportamentos significativamente diferentes foram *Freeze*, *Bite* e *Strike*, na regressão linear e no teste de correlação. De forma semelhante aos dominantes, o comportamento *Freeze* decresce com os dias e os comportamentos *Bite* e *Strike* aumentam.

Todos os testes apontam diferenças nos comportamentos *Freeze* e *Bite*, o que parece apontar para um componente de aprendizado. Apesar de os sujeitos parecerem não ter um aprendizado referente à hierarquia, quando enfrentam um oponente novo, eles parecem sim alterar a emissão de seus comportamentos de luta, pois no primeiro dia de luta gastam pouco tempo com comportamentos de agressão ativa, como *Bite* e até mesmo *Strike*. Em contrapartida, passam mais tempo com comportamentos de ameaça, ou apetitivos, como *Freeze* e *Display*. No último dia, o quadro se inverte e os sujeitos passam mais tempo emitindo comportamentos de agressão ativa, ou consumatórios, e menos tempo com comportamentos de ameaça.

Conclusão

Experimento II

A análise dos dados nos permite concluir que o resultado das lutas com novos oponentes ingênuos não é influenciado pelo resultado de lutas anteriores. Durante os dias de experimento os sujeitos experimentais alteram a emissão dos comportamentos de luta, gastando mais tempo com comportamentos de ameaça, ou apetitivos, como *Freeze* e *Display* durante o primeiro dia e no último dia, o quadro se inverte e os sujeitos passam mais tempo emitindo comportamentos de agressão ativa, como *Bite* e *Strike*.

Resultados

Experimento III

Inicialmente, com intuito de verificar se o resultado da primeira luta influencia o resultado das lutas posteriores com o mesmo oponente, a coerência dos padrões de ganhar ou perder resultante da sequência de 4 lutas dos sujeitos experimentais foi

analisada. O teste utilizado foi o coeficiente de Tau de Kendall. Os pares concordantes do coeficiente eram considerados como sendo os resultados de lutas iguais às lutas imediatamente anteriores, e os pares discordantes eram as lutas com resultados diferentes da antecedente. 3 pares eram possíveis por sujeito, pois nos testes havia uma sequência de quatro lutas para cada sujeito experimental.

O coeficiente de Kendall rejeitou a hipótese nula em todas situações, apontando uma total dependência entre as lutas na análise de dominância (Vide tabela 8).

Tabela 8. Coeficiente Tau de Kendall verificando se lutas posteriores dependem das lutas anteriores no experimento 2, para os sujeitos dominantes, submissos e totais. Pares concordantes = Número de lutas com o mesmo resultado da anterior; Pares discordantes = Número de lutas com resultado diferente do anterior; τ = Coeficiente Tau de Kendall.

	Pares concordantes	Pares discordantes	τ	
Total	48		0	1
Dominante	24		0	1
Submisso	24		0	1

Em seguida, para a análise dos dados referentes às diferenças comportamentais no decorrer dos dias de teste, foi utilizado Anova de medidas repetidas ou o teste de Friedman. A análise apontou diferenças estatisticamente significantes nos comportamentos *Bite* e *Display* entre os dominantes e *Display* entre os sujeitos submissos (Vide tabela 9).

Tabela 9. Resultado dos testes estatísticos comparando os comportamentos entre os 4 dias de testes, para os sujeitos dominantes e submissos. F = Anova de medidas repetidas; χ^2 = Teste de Friedman; DF = grau de liberdade; SS = quadrados da soma; MS = quadrados da média; P = valor de P; * = valor de $P \leq 0,05$; ** = valor de $P \leq 0,08 > 0,05$.

	DF	SS	MS	F / χ^2	P	
Dominantes						
<i>Freeze</i>	χ^2	3		0,333	0,95	
<i>Bite</i>	F	3	5100,25	1700,083	3,433	0,036*
<i>Circle</i>	F	3	0,00419	0,0014	2,816	0,064**
<i>Display</i>	F	3	0,175	0,0583	4,832	0,01*
<i>Flee</i>	χ^2	3		0,750	0,861	
<i>Chase</i>	χ^2	3		3,456	0,327	
<i>Retreat</i>	χ^2	3		5,192	0,158	
<i>Strike</i>	F	3	0,00328	0,00109	0,584	0,632
Submissos						
<i>Freeze</i>	χ^2	3		5,636	0,131	
<i>Bite</i>	F	3	2302,125	767,375	2,995	0,054**
<i>Circle</i>	χ^2	3		6,932	0,074**	
<i>Display</i>	χ^2	3		8,544	0,036*	
<i>Flee</i>	χ^2	3		1,500	0,682	
<i>Chase</i>	χ^2	3		3,391	0,335	
<i>Retreat</i>	χ^2	3		1,950	0,583	
<i>Strike</i>	F	3	0,00664	0,00221	1,94	0,154

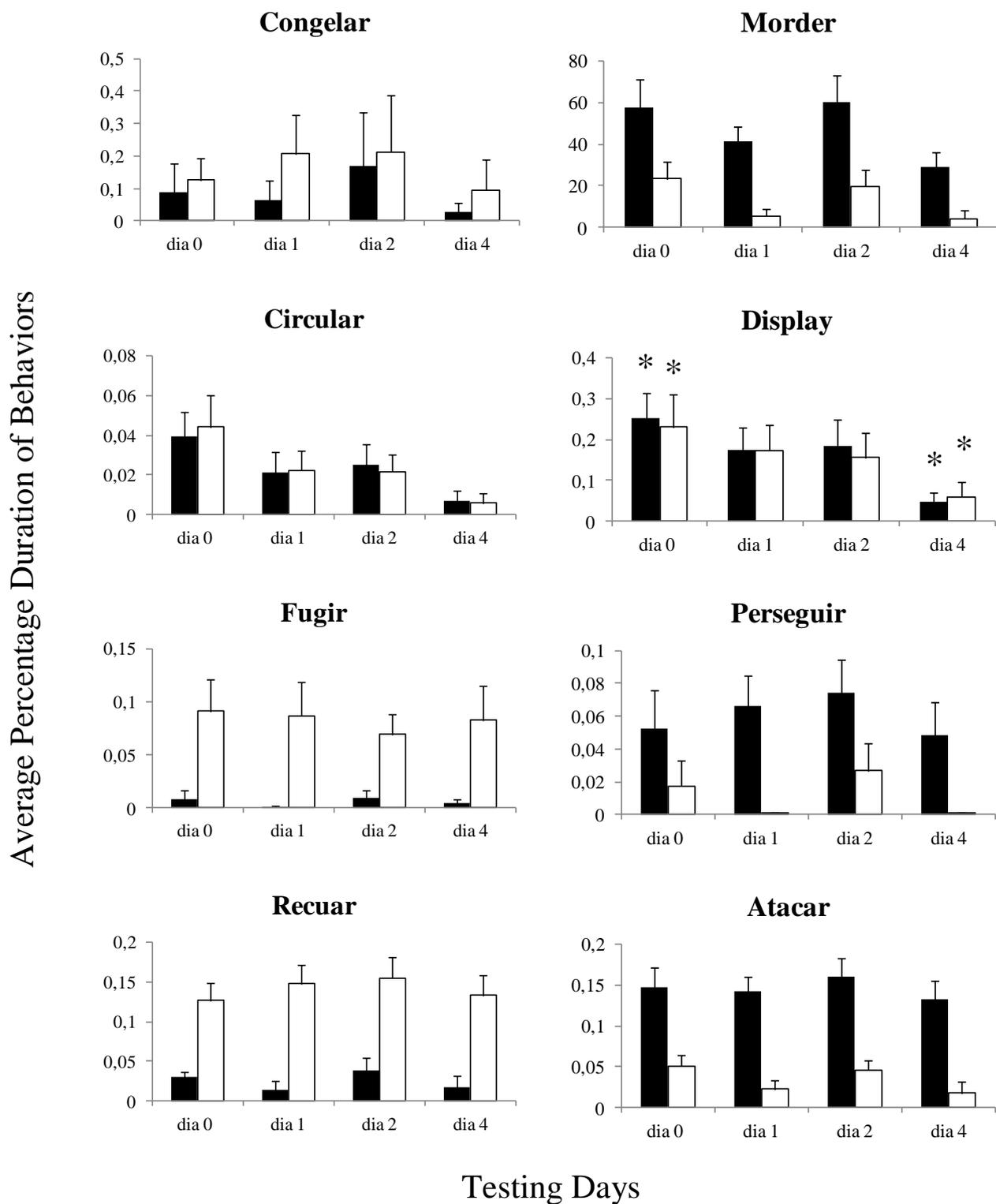


Figura 4. Duração percentual média da emissão dos comportamentos do etograma na sessão (eixo y) e dias de teste (eixo x). As barras pretas representam os comportamentos dos sujeitos dominantes e as barras brancas dos submissos. * = dias em que os comportamentos diferem, com $P \leq 0,05$.

Para verificar se existe uma relação linear entre a variação comportamental no decorrer dos dias de experimento, foi realizado o teste de regressão linear. Foram encontradas relações estatisticamente significativas nos comportamentos *Circle* e *Display* entre os sujeitos dominantes e também entre os sujeitos submissos (Vide tabela 10).

Tabela 10. Resultado da regressão linear comparando os comportamentos entre os 4 dias de testes, para os sujeitos dominantes e submissos. R^2 = Coeficiente de determinação; Coefficient = Coeficiente; Std Error = Erro padrão; P = Valor de P ; * = valor de $P \leq 0,05$.

	R^2	Coefficient	Std. Error	P
Dominante				
<i>Freeze</i>	0,00355	-0,0109	0,0333	0,746
<i>Bite</i>	0,0793	-5,9	3,67	0,118
<i>Circle</i>	0,136	-0,00713	0,00328	0,038*
<i>Display</i>	0,194	-0,048	0,0178	0,012*
<i>Flee</i>	0,00223	-0,00051	0,00196	0,798
<i>Chase</i>	0,00196	-0,00166	0,00685	0,81
<i>Retreat</i>	0,00686	0,00433	-0,455	0,652
<i>Strike</i>	0,00486	-0,00277	0,00725	0,704
Submisso				
<i>Freeze</i>	0,00312	-0,0123	0,04	0,761
<i>Bite</i>	0,0762	-3,479	2,212	0,126
<i>Circle</i>	0,166	-0,00859	0,00351	0,021*
<i>Display</i>	0,125	-0,0411	0,0199	0,047*
<i>Flee</i>	0,00209	-0,0024	0,00957	0,804
<i>Chase</i>	0,0138	-0,00257	0,00397	0,522
<i>Retreat</i>	0,000312	0,00828	0,0967	0,924
<i>Strike</i>	0,066	-0,00634	0,00436	0,156

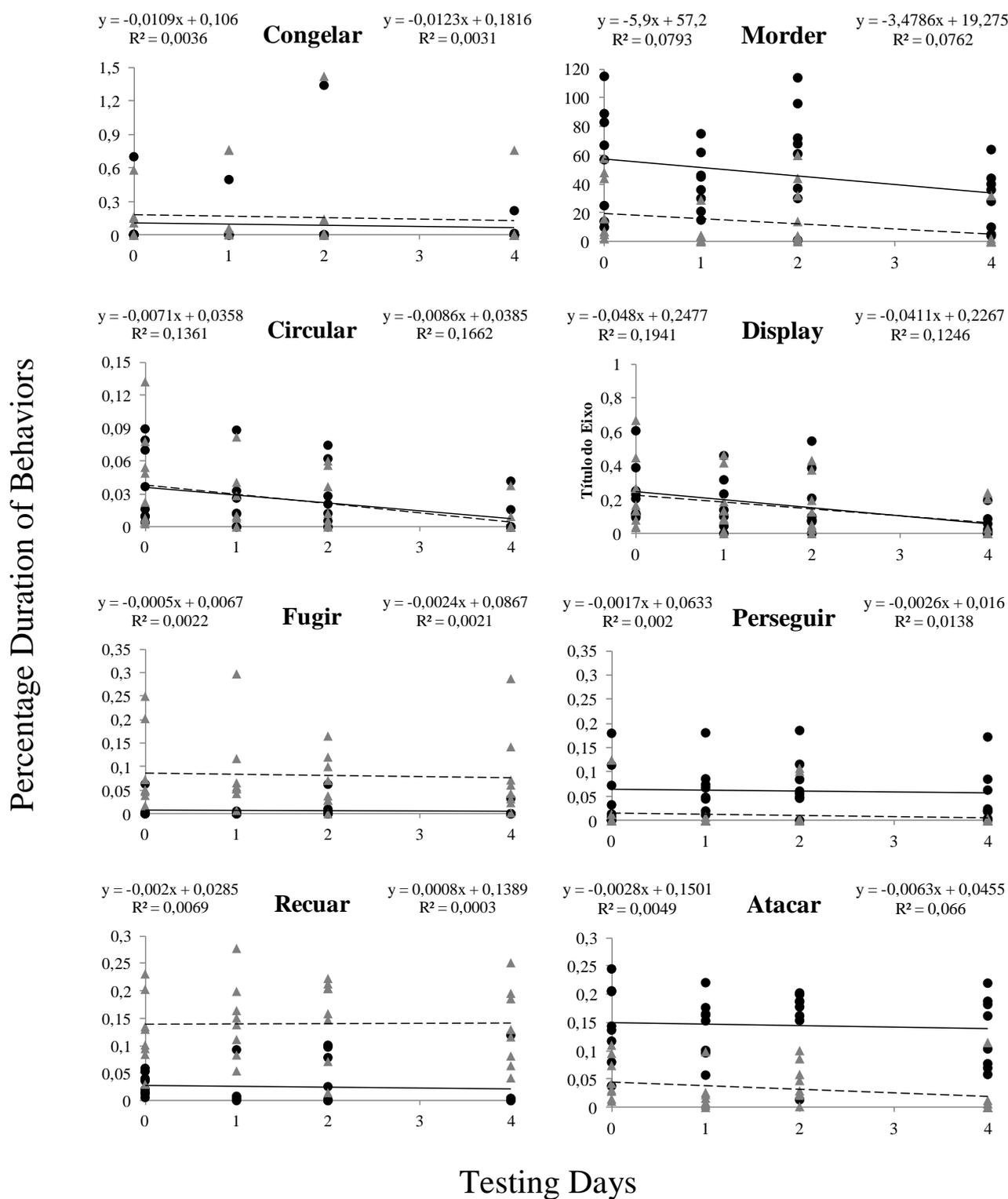


Figura 5. Duração percentual da emissão dos comportamentos do etograma na sessão (eixo y) e dias de teste (eixo x). Os pontos pretos representam o desempenho dos sujeitos dominantes e os triângulos cinzas dos submissos. A linha de tendência cheia representa o sujeito dominante, com sua respectiva função localizada à esquerda. A linha pontilhada e a função à direita representam o sujeito submisso.

Para verificar o quanto a reta de regressão representa os valores observados, uma análise de correlação de Pearson ou Spearman foi feita. Os comportamentos *Circle*, *Display* e *Retreat* foram apontados como estatisticamente significantes entre os sujeitos dominantes. Entre os submissos os comportamentos foram *Circle* e *Display*.

Tabela 11. Resultado da correlação dos comportamentos entre os 4 dias de testes, para os sujeitos dominantes e submissos. Correl. Coef = Coeficiente de correlação; *P* = Valor de *P*; Samples = Número de amostras; Test = Tipo de teste; S = Spearman; P = Pearson; * = valor de $P \leq 0,05$.

	Correl. Coef	<i>P</i>	Samples	Test
Dominante				
<i>Freeze</i>	-0,0251	0,891	32	s
<i>Bite</i>	-0,282	0,118	32	p
<i>Circle</i>	-0,369	0,0377*	32	p
<i>Display</i>	-0,441	0,0116*	32	p
<i>Flee</i>	-0,186	0,306	32	s
<i>Chase</i>	0,0227	0,9	32	s
<i>Retreat</i>	-0,384	0,0303*	32	s
<i>Strike</i>	-0,0697	0,704	32	p
Submisso				
<i>Freeze</i>	-0,278	0,123	32	s
<i>Bite</i>	-0,276	0,126	32	p
<i>Circle</i>	-0,483	0,00535*	32	s
<i>Display</i>	-0,411	0,0197*	32	s
<i>Flee</i>	-0,0848	0,642	32	s
<i>Chase</i>	-0,0239	0,896	32	s
<i>Retreat</i>	0,0272	0,881	32	s
<i>Strike</i>	-0,257	0,156	32	p

Discussão

Experimento III

Neste experimento, o coeficiente de Kendall apresentou o valor 1, que é o valor de concordância máxima entre pares. Todos as lutas mantiveram os mesmos resultados no decorrer dos dias. Os sujeitos que iniciaram dominantes mantiveram-se dominantes por todas as repetições e, por conseguinte, os submissos também mantiveram-se submissos. Este é um forte indício de que o resultado da primeira luta influencia o resultado das lutas posteriores com o mesmo oponente, mostrando um padrão perfeito e coerente de manutenção dos padrões de ganhar ou perder durante as 4 repetições de lutas no teste.

Para analisar as diferenças comportamentais no decorrer dos 4 dias de lutas, foram realizados testes de Anova com medidas repetidas, regressão linear e correlação, também para investigar se os padrões comportamentais se alteram de forma dependente da sequência de lutas. A Anova RM apontou diferenças estatisticamente significantes nos comportamentos *Bite* e *Display* entre os dominantes, sendo que o comportamento *Circle* apresentou valor de *P* muito próximo de ser estatisticamente significativo (0,064). Entre os comportamentos submissos somente o comportamento *Display* obteve significância estatística, entretanto, os comportamentos *Bite* e *Circle* apresentaram valores de *P* muito próximos à significância (0,054 e 0,074, respectivamente), como mostrado na tabela 9.

Na regressão linear, os comportamentos que alcançaram significância estatística foram *Circle* e *Display*, para os sujeitos dominantes e submissos. Ambos os comportamentos mostram uma tendência decrescente no decorrer dos dias de teste. Tal tendência é confirmada pelos testes de correlação, que também apontam os comportamentos *Circle* e *Display* como estatisticamente significantes entre os sujeitos dominantes, além do comportamento *Retreat*, todos com coeficiente de correlação negativo em relação aos dias de teste. Da mesma forma, entre os sujeitos submissos, os comportamentos *Circle* e *Display* apresentaram significância estatística e correlação negativa.

Os comportamentos mais significantes dentre os testes foram *Bite*, *Display*, *Circle* e *Retreat*. O Comportamento *Bite* não mostrou diferenças no pós teste, mas pela análise dos gráficos (figuras 4 e 5) e dos testes de regressão linear e correlação, o comportamento *Bite* parece ter uma leve tendência de diminuição durante os dias de

teste. Os comportamentos *Display* e *Circle* tiveram uma clara tendência de diminuição, mostrada nos gráficos e nos testes de regressão e correlação. O comportamento *Retreat* só apareceu no teste de correlação entre os dias de teste nos sujeitos dominantes, apontando uma leve correlação negativa. Todos esses comportamentos diminuíram no decorrer das repetições de luta, o que parece indicar uma curva de aprendizado decrescente, ou de habituação. Os sujeitos parecem ter seus comportamentos de display diminuídos após o estabelecimento da hierarquia, que é mantida no decorrer das lutas. Esse comportamento parece ser explicado por uma questão de economia comportamental. Os sujeitos após estabelecimento da hierarquia têm o tempo de duração de emissão de seus comportamentos agressivos diminuídos para redução de gasto energético, pois para o sujeito submisso, não é vantajoso emitir comportamentos agressivos em uma luta contra um sujeito que já o venceu, portanto é exibida menor persistência no início de cada luta. Entre os sujeitos dominantes, cada luta tem sua resolução mais rápida do que a anterior, exigindo menor exibição de comportamentos agressivos e menor gasto energético. Isto implica também no reconhecimento entre os sujeitos, que no decorrer dos dias de teste parecem identificar seus pares como oponentes repetidos de lutas anteriores. Essa identificação parece ocorrer mesmo após 4 dias de intervalo entre lutas.

Conclusão

Experimento III

A análise dos dados nos permite concluir que o resultado das lutas com o mesmo oponente é inteiramente influenciado pelo resultado de lutas anteriores. Durante os dias de experimento os comportamentos em geral tem uma tendência de diminuição, apontando para habituação gradual do comportamento agressivo após estabelecimento da hierarquia, já na primeira luta. Isso é um indício de que o *Danio rerio* reconhece outros sujeitos como submissos ou dominantes, mesmo após 4 dias de intervalo entre lutas.

Discussão

Experimentos II e III

O resultado de lutas anteriores não influencia as lutas posteriores, quando os sujeitos experimentais enfrentam sujeitos ingênuos. Entretanto, o resultado das lutas anteriores influencia fortemente as lutas posteriores com o mesmo oponente. O fato de o sujeito reconhecer seu oponente como o mesmo oponente da luta anterior parece ser um fator relevante no estabelecimento e manutenção da hierarquia. Um indício disto são as mudanças ocorridas nos comportamentos emitidos durante as 4 repetições de lutas. No experimento 2, os sujeitos experimentais iniciavam as lutas emitindo comportamentos de ameaça, ou apetitivos, que são comportamentos típicos da fase paramétrica do display, em que ambos os sujeitos atacam de forma semelhante (Oliveira et al., 2011) e ainda não houve estabelecimento de hierarquia. Na última luta é verificada a inversão do quadro e os sujeitos passam mais tempo emitindo comportamentos de agressão ativa, que são comportamentos mais frequentes na resolução da luta, portanto mais eficientes para um desfecho mais rápido da luta. Dessa forma, o sujeito aprende os comportamentos mais eficazes de display, mas isto não aumenta sua probabilidade de sucesso, até onde foi verificado neste experimento. De forma contrária ao experimento 2, no experimento 3 em que as lutas foram repetidas sempre com os mesmos oponentes, o sujeito reconhece seu oponente como o mesmo oponente da luta anterior e provavelmente por este fator o resultado das lutas anteriores sempre foi igual ao das lutas posteriores. Um indício de que este reconhecimento ocorre pode ser observado na redução dos comportamentos em geral no decorrer dos dias do experimento 3, apontando para habituação gradual do comportamento agressivo após estabelecimento da hierarquia. No experimento 2, quando o *Danio rerio* luta contra oponentes ingênuos nas mesmas condições do experimento 3, não houve manutenção de hierarquia, mas no experimento 3, devido ao reconhecimento entre os sujeitos a hierarquia se manteve no decorrer dos dias de teste.

Conclusão

I - O melhor tempo de isolamento para eliciar o display agressivo do peixe *Danio rerio* é o de 6h, sendo que o tempo de 24h também apresenta todos componentes do display de forma completa e eficaz, entretanto, menos marcante se comparado ao tempo de 6h.

II - O resultado das lutas com novos oponentes ingênuos não é influenciado pelo resultado de lutas anteriores. Durante os dias de experimento os sujeitos experimentais alteram a emissão dos comportamentos de luta, gastando mais tempo com comportamentos de ameaça durante o primeiro dia e no último dia o quadro se inverte e os sujeitos passam mais tempo emitindo comportamentos de agressão ativa, que são comportamentos mais eficientes para a resolução da luta, porém isto não aumenta sua probabilidade de sucesso.

III - O resultado de lutas com o mesmo oponente é inteiramente influenciado pelo resultado das lutas anteriores. O *Danio rerio* reconhece seus oponentes como submissos ou dominantes, mesmo após 4 dias de intervalo entre lutas, como apontado pela habituação gradual dos comportamentos após estabelecimento da hierarquia na primeira luta.

Referências

- Anderson, D. C., & Paden, P. (1966). Passive avoidance response learning as a function of prior tumbling-trauma. *Psychonomic Science*, *4*, 129-130.
- Barba, D. (2012). Ethanol's influence on habituation and stress response in *Danio rerio*. *journal of mcpherson college science*, *20*(May), 2-4.
- Behrend, E. R., & Bitterman, M. E. (1963). Sidman avoidance in the fish. *Journal of the Experimental Analysis of Behavior*, *6*, 1, 47-52. doi: 10.1901/jeab.1963.6-47.
- Bilotta, J., Saszik, S., & Sutherland, S. E. (2001). Rod contributions to the electroretinogram of the dark-adapted developing zebrafish. *Developmental dynamics : an official publication of the American Association of Anatomists*, *222*(4), 564-70. doi:10.1002/dvdy.1188
- Blanchard, D. C., & Blanchard, R. J. (2003). What can animal aggression research tell us about human aggression? *Hormones and Behavior*, *44*(3), 171-177. doi:10.1016/S0018-506X(03)00133-8
- Blanchard, D. C., & Blanchard, R. J. (1988). Ethoexperimental approaches to the biology of emotion. *Annual Reviews Psychology*, *39*, 43-68. doi:10.1146/annurev.ps.39.020188.000355
- Bronstein, P. M. (1988). Aggression, by John Klama. London: Longman Scientific, 169. *Aggressive Behavior*, *14*, 463-464. doi: 10.1002/1098-2337(1988)14:6<463::AID-AB2480140607>3.0.CO;2-T
- Bronstein, P.M. (1994). On the predictability, sensibilization, and habituation of aggression in males bettas (*Betta splendens*). *Journal of comparative Psychology*, *108*, 45-57.
- Brown, G. E., Smith, P. J., & Peters, R. B. (1985). Effects of escapable versus inescapable shocks on avoidance behavior in the goldfish (*Carassius auratus*). *Psychological reports*, *57*, 1027-1030.

- Burne, T., Scott, E., van Swinderen, B., Hilliard, M., Reinhard, J., Claudianos, C.,... McGrath, J. (2011). Big ideas for small brains: what can psychiatry learn from worms, flies, bees and fish?. *Molecular Psychiatry*, *16*, 7–16; doi:10.1038/mp.2010.35.
- Champagne, D. L., Hoefnagels, C. C. M., De Kloet, R. E., & Richardson, M. K. (2010). Translating rodent behavioral repertoire to zebrafish (*Danio rerio*): relevance for stress research. *Behavioural brain research*, *214*(2), 332–42. doi:10.1016/j.bbr.2010.06.001
- Clotfelter, E. D., O'Hare, E. P., McNitt, M. M., Carpenter, R. E., & Summers, C. H. (2007). Serotonin decreases aggression via 5-HT_{1A} receptors in the fighting fish *Betta splendens*. *Pharmacology, biochemistry, and behavior*, *87*(2), 222–31. doi:10.1016/j.pbb.2007.04.018
- Dzieweczynski, T. L., Eklund, A. C., & Rowland, W. J. (2006). Male 11-ketotestosterone levels change as a result of being watched in Siamese fighting fish, *Betta splendens*. *General and comparative endocrinology*, *147*(2), 184–9. doi:10.1016/j.ygcen.2005.12.023
- Evans, C. S. (1985). Display vigor and subsequent fight performance in the Siamese fighting fish, *Betta splendens*. *Behavioral Processes*, *11*, 113–121. <http://dx.doi.org/10.1016/>
- Ewing, L. S. (1967). Fighting and death from stress in a cockroach. *Science (New York, N.Y.)*, *155*(17), 1035–1036.
- Gerlai, R. (2010). High-throughput behavioral screens: the first step towards finding genes involved in vertebrate brain function using zebrafish. *Molecules (Basel, Switzerland)*, *15*(4), 2609–22. doi:10.3390/molecules15042609
- Giaquinto, P. C., & Volpato, G. L. (1997). Chemical communication, aggression, and conspecific recognition in the fish Nile tilapia. *Physiology & behavior*, *62*(6), 1333–8. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9383122>

- Glazer, H. I. & Weiss, J. M. (1976). Long-term interference effect: An alternative to “learned helplessness”. *Journal of Experimental Psychology: Animal Behavior Processes*, 2, 202-213.
- Gouveia Jr, A. (1999). Modelos animais em psicopatologia: Breves notas introdutórias. *Estudos de Psicologia*, 16,(1), 13-16.
- Gouveia Jr., A. (2001). Influências do estado hormonal no desempenho de ratos nos testes do labirinto em T elevado e do nado forçado. (Tese de Doutorado), Universidade de São Paulo. São Paulo, SP.
- Gouveia Jr, A., Maximino, C., & Brito, T. M. (2006). Comportamento de Peixes: vantagens e utilidades na neurociências. Bauru: [s.n.], 1-80.
- Gouveia jr, A., Maximino, C., Romão, C. F., Brito, T. M., & Ventura, D. F. (2007). effects of trophic poisoning with methylmercury on the appetitive elements of the agonistic sequence in fighting-fish (*Betta splendens*). *The Spanish journal of psychology*, 10(2), 436–448.
- Gouveia jr, A., Zampieri, R. A., Ramos, L. A., Silva, E. F., Mattioli, R., & Morato, S. (2005). Preference of Goldfish (*Carassius auratus*) for dark places. *revista de etologia*, 7(2), 63–66.
- Healy, A. F., & Proctor, R. W. (2003). Handbook of Psychology: Experimental Psychology (Vol. 4): John Wiley & Sons.
- Houart, C. (2001). The zebrafish an Experimental Organism. *Encyclopedia of Life Sciences*, 1-5.
- Hunziker, M. H. L. (2005). O Desamparo Aprendido Revisitado : Estudos com Animais 1 Learned Helplessness Revisited : Animal Studies. *Psicologia: teoria e pesquisa*, 21(2), 131–139.
- Kahn, M. W. (1951). The effect of severe defeat at various age levels on the aggressive behavior of mice. *Journal of Genetic Psychology*, 79, 117–130.

- Larson, E. T., O'Malley, D. M., & Melloni, R. H. (2006). Aggression and vasotocin are associated with dominant-subordinate relationships in zebrafish. *Behavioural brain research*, *167*(1), 94–102. doi:10.1016/j.bbr.2005.08.020
- Lorenz, K. (1983). *Der Abbau des Menschlichen*. Munich: Piper.
- Maier, S. F., & Seligman, M. E. (1976). Learned helplessness: Theory and evidence. *Journal of Experimental Psychology: General*, *105*(1), 3–46. doi:10.1037//0096-3445.105.1.3
- Malberg, J. E., & Duman, R. S. (2003). Cell proliferation in adult hippocampus is decreased by inescapable stress: reversal by fluoxetine treatment. *Neuropsychopharmacology : official publication of the American College of Neuropsychopharmacology*, *28*(9), 1562–71. doi:10.1038/sj.npp.1300234
- Maximino, C., Brito, T. M., Batista, A. W. S., Herculano, A. M., Morato, S., & Gouveia jr, A. (2010). Measuring anxiety in zebrafish: a critical review. *Behavioural brain research*, *214*(2), 157–71. doi:10.1016/j.bbr.2010.05.031
- Maximino, C., Brito, T. M., Colmanetti, R., Pontes, A. A. A., Castro, H. M., Lacerda, R. I. T., ... Gouveia jr, A. (2010). Parametric analyses of anxiety in zebrafish scototaxis. *Behavioural Brain Research*, *210*(1), 1–7. doi:10.1016/j.bbr.2010.01.031
- Maximino, C., Brito, T. M., Dias, C. A. G. M., Gouveia jr, A., & Morato, S. (2010). Scototaxis as anxiety-like behavior in fish. *Nature protocols*, *5*(2), 209–16. doi:10.1038/nprot.2009.225
- Maximino, C., Brito, T. M., Moraes, F. D., Oliveira, F. V. C., Taccolini, I. B., Pereira, P. M., ... Gouveia jr, A. (2007). A Comparative Analysis of the Preference for Dark Environments in Five Teleosts. *International Journal of Comparative Psychology*, *20*(4), 351–367.
- Maximino, C., & Herculano, A. M. (2010). A review of monoaminergic neuropsychopharmacology in zebrafish. *Zebrafish*, *7*(4), 359–78. doi:10.1089/zeb.2010.0669

- Maximino, C., Silva, A. W. B., Gouveia Jr, A., & Herculano, A. M. (2011). Pharmacological analysis of zebrafish (*Danio rerio*) scototaxis. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*, 35, (2), 624–631.
- McGregor, P. K., Peake, T. M., & Lampe, H. M. (2001). Fighting fish *Betta splendens* extract relative information from apparent interactions: what happens when what you see is not what you get. *Animal Behaviour*, 62(6), 1059–1065.
doi:10.1006/anbe.2001.1850
- Nash, S. M., Martinez, S, L. Dudeck, M. M., & S. F. (1983). Learned Helplessness in Goldfish under Conditions of Low Shock Intensity. *The Journal of General Psychology*, 108, (1), 97-101.
- Nelson, R. J., & Chiavegatto, S. (2001). Molecular basis of aggression. *Trends in neurosciences*, 24(12), 713–9. Retrieved from
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11718876>
- Norton, W., & Bally-Cuif, L. (2010). Adult zebrafish as a model organism for behavioural genetics. *BMC neuroscience*, 11, 90. doi:10.1186/1471-2202-11-90
- Oliveira, R. F., Silva, J. F., & Simões, J. M. (2011). Fighting Zebrafish: Characterization of Aggressive Behavior and Winner–Loser Effects. *Zebrafish*, 8, (2), 73-81. doi:10.1089/zeb.2011.0690.
- Padilla, A. M., Padilla, C., Ketterer, T., & Giacalone, D. (1970). Inescapable shocks and subsequent escape/avoidance conditioning in goldfish, *Carassius auratus*. *Psychonomic Science*, 20, 295–296.
- Paton, D., & Caryl, P. G. (1986). Communication by agonistic displays. I: Variation in information content between samples. *Behaviour*, 18, 23-239.
- Peterson, C., Maier, S. F. & Seligman, M. E. P. (1993). *Learned helplessness: a theory for the age of personal control*. New York: Oxford University Press.
- Richter, C. (1957). On the phenomenon of sudden death in animals and man. *Psychosomatic Medicine*, 19, 191-198.

- Rodd, Z. A., Rosellini, R. A., Stock, H. S., & Gallup jr, Gordon, G. (1997). Learned Helplessness in Chickens (*Gallus gallus*): Evidence for Attentional Bias. *Learning and Motivation*, 28, (1), 43-55.
- Santos, B. R. (2009). Efeitos da intoxicação progressiva e aguda de chumbo sobre parâmetros comportamentais do *Betta splendens*: Escototaxia e display agressivo [Effects of acute and progressive poisoning with lead on *Betta splendens* escototaxy and aggressive display] (Unpublished master's thesis), Universidade Estadual Paulista. Bauru, Brasil. Retrieved from http://www.athena.biblioteca.unesp.br/exlibris/bd/bba/33004056085P0/2009/santos_br_me_bauru.pdf.
- Schneider, H. (2011). Measuring Agonistic Behavior in Zebrafish. In: Kalueff, A. V., Cachat, J. M. (Eds.), *Zebrafish neurobehavioral protocols*. New York: Humana Press, 125-134.
- Seligman, M. E. P. & Maier, S. F. (1967). Failure to escape traumatic shock. *Journal of Experimental Psychology*, 74, 1-9.
- Seligman, M. E. P. (1975). Helplessness: On depression, development and death. Freeman: San Francisco. Seligman, M. E. P. & Maier, S. F. (1967). Failure to escape traumatic shock. *Journal of Experimental Psychology*, 74, 1-9.
- Silva, M. T. A., Guerra, L. G. G. C., & Alves, C. R. R. (2005). Modelos Comportamentais em Neurociências. *Revista Brasileira de Análise do Comportamento*, 1, (2), 167-185.
- Simpson, M. J. A. (1968). The display of the Siamese fighting fish, *Betta splendens*. *Animal Behavior Monographs*, 1, 1-73.
- Spence, R., Fatema, M. K., Reichard, M., Huq, K. a., Wahab, M. a., Ahmed, Z. F., & Smith, C. (2006). The distribution and habitat preferences of the zebrafish in Bangladesh. *Journal of Fish Biology*, 69(5), 1435-1448. doi:10.1111/j.1095-8649.2006.01206.x
- Stewart, A., Maximino, C., Brito, T. M., Herculano, A. M., Gouveia jr, A., Morato, S., ... Kalueff, V. A. (2011). Neurophenotyping adult zebrafish using the light/dark

box paradigm. *Zebrafish Neurobehavioral Protocols*, 51, 157-167. doi:
10.1007/978-1-60761-953-6_13

Thorndike, E. L. (1911). A note on the psychology of fishes. *American Naturalist*, 33,
396.

Willner, P. (1991). Models of depression. In P. Willner (Org.), *Behavioural models in psychopharmacology: Theoretical, industrial, and clinical perspectives*.
Cambridge : Cambridge University Press.