



**Serviço Público Federal**  
**Universidade Federal do Pará**  
**Núcleo de Teoria e Pesquisa do Comportamento**  
**Programa de Pós-Graduação em Teoria e Pesquisa do Comportamento**

Desempenho do *Guppy* (*Poecilia reticulata*) em modelos de ansiedade: campo aberto, preferência claro-escuro e labirinto em cruz com rampa

André Luiz Viard Walsh Monteiro

Belém/PA  
2016



**Serviço Público Federal**  
**Universidade Federal do Pará**  
**Núcleo de Teoria e Pesquisa do Comportamento**  
**Programa de Pós-Graduação em Teoria e Pesquisa do Comportamento**

Desempenho do *Guppy (Poecilia reticulata)* em modelos de ansiedade: campo aberto, preferência claro-escuro e labirinto em cruz com rampa

André Luiz Viard Walsh Monteiro

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Teoria e Pesquisa do Comportamento da Universidade Federal do Pará, como requisito parcial para obtenção do grau de Doutor em Teoria e Pesquisa do Comportamento.

Tese parcialmente financiada com recursos da CAPES através de bolsa de doutorado.

Orientador: Prof Dr Amauri Gouveia Júnior

Belém/PA  
2016

Walsh-Monteiro, André Luiz Viard, 1979 -

Desempenho do *Guppy (Poecilia reticulata)* em modelos de ansiedade: campo aberto, preferência claro-escuro e labirinto em cruz com rampa / André Luiz Viard Walsh-Monteiro - 2016  
85f.:il

Orientador: Amauri Gouveia Júnior

Tese (Doutorado) – Universidade Federal do Pará,  
Núcleo de Teoria e Pesquisa do Comportamento, Pós-  
Graduação em Teoria e Pesquisa do Comportamento –  
Belém/Pa, 2016.

1. Comportamento animal. 2. Peixes. 3. Modelo animal. 4.  
Ansiedade e medo. I . Gouveia Jr., Amauri,  
II . Universidade Federal do Pará, NTPC, Pós-Graduação em  
Teoria e Pesquisa do Comportamento. III . Título.



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ  
 Núcleo de Teoria e Pesquisa do Comportamento UFPA  
 Programa de Pós-Graduação em Teoria e Pesquisa do Comportamento UFPA  
 E-mail: [ppgtpc@ufpa.br](mailto:ppgtpc@ufpa.br)  
 Fones: (91) 3211-3333 / 3211-3592  
 Rua Augusto Correa, nº 01  
 Guamá, Cep: 66.075-110  
 Belém - Pará

## Tese de Doutorado

### “Desempenho do Guppy (*Poecilia reticulata*) em modelos de ansiedade: campo aberto, preferência claro-escuro e labirinto em cruz com rampa”

**Aluno:** André Luiz Viard Walsh Monteiro

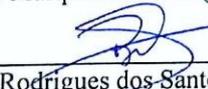
**Data da Defesa:** 23 de Setembro de 2016.

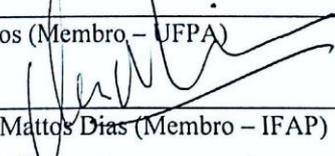
**Resultado:** Aprovado.

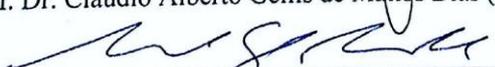
**Banca examinadora:**

  
 Prof. Dr. Amauri Gouveia Junior (Orientador – UFPA)

  
 Prof. Dr. Thiago Marques de Brito (Membro, via skype – UFMT)

  
 Prof. Dr. Bruno Rodrigues dos Santos (Membro – UFPA)

  
 Prof. Dr. Claudio Alberto Gellis de Mattos Dias (Membro – IFAP)

  
 Prof. Dr. Leonardo José Gil Barcellos (Membro – UPF)

Para Thayana e Paulo

## **Agradecimentos**

À minha família pela compreensão, paciência e incentivo, em todas as etapas.

Ao professor Amauri Gouveia Jr, sempre tendo e ensinando sobre resiliência e confiança. Sem seu empurrão a inscrição no doutorado ainda seria expectativa.

Aos colegas de colegiado do Instituto Federal do Pará, campus Tucuruí por entenderem o momento e autorizarem por unanimidade minha liberação.

Ao professor Luciano Queiroz que além de ceder boa parte do laboratório para receber todo aparato de manutenção e experimentação, ainda acolheu os estagiários. Ao técnico Lenon José de Azevedo da Silva, pela cooperação nas atividades no laboratório de aquicultura.

Aos estagiários de Iniciação Científica que ajudaram na realização de experimentos em tudo quanto é turno e com um número tão grande de variáveis que somados resultaram em quase 800 horas de análises: Rodrigo dos Santos Pessoa, Érica Miranda Sanches, Yara Cristina de Brito e Silva, Ana Cláudia da Costa Carvalho e os mais novos Leonaro Roger Sarmiento Baltazar, Anselmo Sousa Araújo e Anne Beatriz Mota da Silva.

“No meio da dificuldade reside a  
oportunidade”

Albert Einstein

## SUMÁRIO

<b>LISTA DE FIGURAS</b>	vi
<b>LISTA DE TABELAS</b>	viii
<b>RESUMO</b>	ix
<b>ABSTRACT</b>	x
<b>1 APRESENTAÇÃO</b>	1
<b>1.1 Introdução</b>	1
<b>1.2 Peixes como modelo comportamental em Neurociências</b>	2
<b>1.3 O <i>Guppy</i> (<i>Poecilia reticulata</i>)</b>	6
<b>1.4 Focos deste estudo</b>	9
<b>1.5 Objetivo Geral</b>	11
<b>2 MATERIAIS E MÉTODOS</b>	12
<b>2.1 Aspectos Éticos</b>	12
<b>2.2 Coleta e manutenção dos animais</b>	12
<b>2.3 Condições experimentais</b>	14
<b>2.4 Registro e análise dos vídeos</b>	15
<b>2.5 Análise estatística</b>	16
<b>3 ESTUDO I</b>	17
<b>3.1 Introdução</b>	17
<b>3.2 Objetivos específicos</b>	18
<b>3.3 Aparatos e procedimentos</b>	19
3.3.1 CAMPO ABERTO	19
3.3.2 PREFERÊNCIA CLARO-ESCURO	20
3.3.3 GRUPOS EXPERIMENTAIS	21
<b>3.4 Resultados</b>	22
3.4.1 CAMPO ABERTO	22
3.4.2 PREFERÊNCIA CLARO-ESCURO	25
<b>3.5 Síntese dos resultados do Estudo I</b>	34
<b>3.6 Discussão</b>	35
<b>3.7 Conclusões</b>	38
<b>4 ESTUDO II</b>	39
<b>4.1 Introdução</b>	39
<b>4.2 Objetivos específicos</b>	40
<b>4.3 Aparatos e procedimentos</b>	41
4.3.1 LABIRINTO EM CRUZ COM RAMPA	41
4.3.2 GRUPOS EXPERIMENTAIS	42
4.3.2.1 Sensibilidade ao aparato	42
4.3.2.2 Reexposição ao aparato	43
4.3.2.3 Efeito de drogas	44
<b>4.4 Resultados</b>	45
4.4.1 SENSIBILIDADE AO APARATO	45
4.4.2 REEXPOSIÇÃO AO APARATO	48
4.4.3 EFEITO DE DROGAS	53
<b>4.5 Discussão</b>	62
<b>4.6 Conclusões</b>	72
<b>REFERÊNCIAS</b>	73
<b>ANEXO</b>	85

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Indivíduos adultos da espécie <i>Poecilia reticulata</i>	7
<b>Figura 2.</b> Fluxo de eventos desde a coleta dos animais <i>in loco</i> até a realização do experimento	14
<b>Figura 3.</b> Sistematização geral das etapas experimentais de registro e análise de dados	15
<b>Figura 4.</b> Desenho esquemático do aquário circular utilizado para os testes de campo aberto	19
<b>Figura 5.</b> Desenho esquemático dos aquários retangulares utilizados par os testes de preferência claro-escuro	20
<b>Figura 6.</b> Tempo no compartimento para os grupos de machos testados no aquário em campo aberto nos diferentes turnos	22
<b>Figura 7.</b> Tempo no compartimento para os grupos de fêmeas testadas no aquário em campo aberto nos diferentes turnos	23
<b>Figura 8.</b> Número de entradas para os grupos de machos testados no aquário em campo aberto nos diferentes turnos	24
<b>Figura 9.</b> Número de entradas para os grupos de fêmeas testadas no aquário em campo aberto nos diferentes turnos	24
<b>Figura 10.</b> Tempo no compartimento para os grupos de machos testados no aquário claro-escuro nos diferentes turnos	26
<b>Figura 11.</b> Tempo no compartimento para os grupos de fêmeas testadas no aquário claro-escuro nos diferentes turnos	27
<b>Figura 12.</b> Número de transposições para os grupos de machos testados no aquário claro-escuro nos diferentes turnos	27
<b>Figura 13.</b> Número de transposições para os grupos de fêmeas testadas no aquário claro-escuro nos diferentes turnos	28
<b>Figura 14.</b> Tempo no compartimento para os grupos de machos testados no aquário claro-claro nos diferentes turnos	29
<b>Figura 15.</b> Tempo no compartimento para os grupos de fêmeas testadas no aquário claro-claro nos diferentes turnos	29
<b>Figura 16.</b> Número de transposições para os grupos de machos testados no aquário claro-claro nos diferentes turnos	30
<b>Figura 17.</b> Número de transposições para os grupos de fêmeas testadas no aquário claro-claro nos diferentes turnos	31
<b>Figura 18.</b> Tempo no compartimento para os grupos de machos testados no aquário escuro-escuro nos diferentes turnos	32
<b>Figura 19.</b> Tempo no compartimento para os grupos de fêmeas testadas no aquário escuro-escuro nos diferentes turnos	32
<b>Figura 20.</b> Número de transposições para os grupos de machos testados no aquário escuro-escuro nos diferentes turnos	33
<b>Figura 21.</b> Número de transposições para os grupos de fêmeas testadas no aquário escuro-escuro nos diferentes turnos	34
<b>Figura 22.</b> Desenho esquemático do aquário em cruz a ser utilizado nos testes de labirinto em cruz com rampa	42
<b>Figura 23.</b> Tempo no compartimento para os grupos de machos e fêmeas testados no labirinto em cruz com rampa em diferentes alturas de coluna d'água e de tempos de sessão	46

<b>Figura 24.</b> Percentual de entradas para os grupos de machos e fêmeas testados no labirinto em cruz com rampa em diferentes alturas de coluna d'água e de tempos de sessão	47
<b>Figura 25.</b> Tempo no compartimento para os grupos de machos reexpostos no labirinto em cruz com rampa e testados em diferentes intervalos de tempo	49
<b>Figura 26.</b> Tempo no compartimento para os grupos de fêmeas reexpostas no labirinto em cruz com rampa e testados em diferentes intervalos de tempo	50
<b>Figura 27.</b> Número de entradas para os grupos de machos reexpostos no labirinto em cruz com rampa e testados em diferentes intervalos de tempo	52
<b>Figura 28.</b> Tempo no compartimento para os grupos de fêmeas reexpostas no labirinto em cruz com rampa e testados em diferentes intervalos de tempo	53
<b>Figura 29.</b> Tempo no compartimento e número de entradas para os grupos de machos e fêmeas testados no labirinto em cruz com rampa em diferentes concentrações de álcool...	55
<b>Figura 30.</b> Tempo no compartimento e número de entradas para os grupos de machos e fêmeas testados no labirinto em cruz com rampa em diferentes concentrações de clonazepam	57
<b>Figura 31.</b> Tempo no compartimento e número de entradas para os grupos de machos e fêmeas testados no labirinto em cruz com rampa em diferentes concentrações de fluoxetina	58
<b>Figura 32.</b> Tempo no compartimento e número de entradas para os grupos de machos e fêmeas testados no labirinto em cruz com rampa em diferentes concentrações de imipramina	60
<b>Figura 33.</b> Tempo no compartimento e número de entradas para os grupos de machos e fêmeas testados no labirinto em cruz com rampa em diferentes concentrações de cafeína	61

**LISTA DE TABELAS**

<b>Tabela 1.</b> Diferentes experimentos com o uso de <i>Guppy</i> ( <i>Poecilia reticulata</i> ) como animal de pesquisa em comportamento	7
<b>Tabela 2.</b> Análise de parâmetros físicos, químicos e microbiológicos da água do local de coleta dos animais	12
<b>Tabela 3.</b> Descrição dos grupos experimentais para os testes de campo aberto e preferência claro-escuro	21
<b>Tabela 4.</b> Síntese dos principais resultados obtidos na aplicação dos testes em campo aberto e preferência claro-escuro	35
<b>Tabela 5.</b> Descrição dos grupos experimentais para verificação do nível de sensibilidade dos animais segundo a altura da coluna d'água e o tempo de realização do teste	43
<b>Tabela 6.</b> Descrição dos grupos experimentais para verificação do efeito da resposta após a reexposição do animal ao aparato por cinco tentativas em diferentes intervalos de tempo	44
<b>Tabela 7.</b> Descrição dos grupos experimentais expostos por 5 minutos as drogas e, posterior realização do teste no labirinto em cruz com rampa	45
<b>Tabela 8.</b> Síntese dos resultados obtidos após a aplicação do teste de labirinto em cruz com rampa aos animais expostos a drogas	62

Walsh-Monteiro, André (2016) Desempenho do *Guppy* (*Poecilia reticulata*) em modelos de ansiedade: campo aberto, preferência claro-escuro e labirinto em cruz com rampa. Tese de Doutorado. Belém, Programa de Pós-Graduação em Teoria e Pesquisa do Comportamento, Universidade Federal do Pará. 85 páginas.

## RESUMO

O uso de modelos animais em pesquisa experimental nas últimas décadas tem se mostrado mais diversificado do que o modelo clássico através do uso de roedores ou primatas. Isso se dá principalmente pelos avanços nos estudos moleculares, morfológicos e funcionais que revelaram uma grande homologia entre os vertebrados. Nesta perspectiva, o peixe *Zebrafish* (*Danio rerio*) tem se mostrado como o animal não-mamífero com maior ascensão como animal de estudo em ciências biológicas nas últimas décadas. Entretanto, outras espécies de peixes também se mostram promissoras como alternativas de uso como modelo animal. Este estudo utilizou o *Guppy* (*Poecilia reticulata*) como modelo para pesquisa em comportamento através de diferentes abordagens experimentais. No estudo I, guppies foram expostos e reexpostos em diferentes turnos (manhã, tarde, noite e madrugada) nos testes de campo aberto e preferência claro-escuro. Os resultados encontrados mostram que em ambos os testes, machos e fêmeas apresentam diferenças comportamentais, sendo sensíveis a reexposição, com capacidade de aprendizagem e controle do ciclo circadiano. No estudo II, foi desenvolvido um labirinto em cruz com rampa no qual se verificou a sensibilidade da espécie ao aparato, o perfil de resposta mediante reexposição e o efeito de drogas. Os resultados revelaram sensibilidade ao aparato para uma altura de coluna d'água de 8cm e 5 minutos de sessão e diferenças entre os sexos e aprendizagem por habituação ao longo das reexposições. O estudo farmacológico indica que neste aparato a espécie é sensível a drogas ansiolíticas e ansiogênicas. Ao final, pode-se concluir que o *Guppy* apresenta comportamento similar e respostas as drogas compatível com os dados descritos para *Zebrafish*. Tais similaridades reforçam o uso de peixes como uma alternativa ao uso de mamíferos na experimentação animal.

**Palavras-chaves:** *Guppy*, modelo animal, ciclo circadiano, memória, aprendizagem, medo, ansiedade.

Walsh-Monteiro, André (2016) *Guppy's (Poecilia reticulata) performance in anxiety models: open field, light-dark preference and plus-maze with ramp*. Doctoral thesis. Belem, Postgraduate Program in Theory and Research of Behavior, Federal University of Para. 85 pages.

## ABSTRACT

The use of animal models in experimental research in the last decades has shown to be more diversified than the classical model through the use of rodent or primate. This is mainly by advances in molecular, morphological and functional studies that revealed a big homology between the vertebrates. On this perspective, the *Zebrafish (Danio rerio)* has shown to be the non-mammal animal with biggest ascension as a study model in biological sciences in the latest decades. However, other species of fish also show to be promising as alternatives of use as animal model. This study used *Guppy (Poecilia reticulata)* as model for the research in behavior through different experimental approaches. In study I, guppies were exposed and re-exposed in different shifts (morning, afternoon, evening and night) in the open field test and light-dark preference. The found results show that in both tests, male and female present behavioral differences, being sensitive to re-exposure, with capacity of learning e controlling of the circadian cycle. In study II, was developed a plus-maze with ramp where it was verified the sensibility of the specie to the apparatus, the profile of response upon re-exposure and the drug effect. The results revealed sensibility to the apparatus with a height of water column at 8 cm and 5 minutes of session and differences between sex and learning by habituation along the re-expositions. The pharmacological study indicates that in this apparatus, the specie is sensitive to anxiolytic and anxiogenic drugs. Finally, we can conclude that *Guppy* presents similar behavior and drug responses compatible with the data described to the *Zebrafish*. These similarities reinforce the use of fishes as an alternative to the use of mammals in animal experimentation.

**Keywords:** *Guppy*, animal model, circadian cycle, memory, learning, fear, anxiety.

# 1 APRESENTAÇÃO

## 1.1 Introdução

O uso de modelos animais em pesquisa para fins didáticos ou de conhecimento remonta ao século VI a.C. quando Alcmeón de Crotona já realizava demonstrações de Anatomia e Fisiologia Comparada através de dissecações com animais vivos (Maehle & Tröhler, 1987). Após Alcmeón, outros filósofos-pesquisadores como Aristóteles, Erasistratus, Galeno e Vesalius também praticaram vivissecção e constataram e relataram semelhanças e diferenças em humanos e outros animais (Greek & Greek, 2000; Reich, 1995). O primeiro trabalho de grande relevância envolvendo Biologia Comparada foi apresentado no século XVII por William Harvey tendo como tema, a fisiologia circulatória e envolvia 80 espécies animais (Reich, 1995).

Já no século XVIII, com o desenvolvimento do pensamento iluminista, na mesma perspectiva em que os trabalhos já utilizavam animais como ferramentas de pesquisa, estudos mais refinados aumentavam e o protesto quanto ao uso destes animais também aumentava devido a crueldade, principalmente no uso de animais domésticos (Franco, 2013). Porém, apenas a partir do século XIX, com o avanço do conhecimento médico cientificamente verificado, que a pesquisa com o uso animal não-humano se mostrou mais eficaz no conhecimento e tratamento de doenças e as normatizações para manipulação animal e minimização do seu sofrimento começaram a surgir (Franco, 2013).

No século XIX e, principalmente no século XX, ratos e camundongos passaram a ser mais utilizados como animais em pesquisa por apresentarem menor apelo popular e uma série de facilidades para o uso em pesquisa: são pequenos, fáceis de manipular, baratos e de rápida reprodução, entre outras vantagens (Baumans, 2007; Kaliste & Mering, 2007). Os estabelecimentos das primeiras linhagem de roedores para pesquisa popularizaram seu uso, o que prevalece até os dias atuais (Heinrich, 2000).

Contudo, outros animais não mamíferos também passaram a ser utilizados como modelo animal de pesquisa, entre eles os peixes. Ainda em 1900, R. W. Shufeldt já

apresentava, mediante seus estudos, vantagens fisiológicas que justificariam o uso de peixes em pesquisas comportamentais devido a elevada acuidade visual e capacidade de discriminação de objetos. Apesar disso, pouco se desenvolveu sobre a pesquisa com peixes como modelo animal, ao menos até as últimas três décadas, quando começaram a se destacar estudos com o peixe-dourado (*Goldfish*, *Carassius auratus*), o *Zebrafish* (Paulistinha, Peixe-zebra, *Danio rerio*) e a tilápia-do-Nilo (*Oreochromis niloticus*) (Gouveia Jr, Maximino & Brito, 2006), além do peixe-de-briga-do-Sião (*Betta splendens*) (Carvalho, Mayer, Walsh-Monteiro & Gouveia Jr, 2015) e o *Guppy* (lebeste, *Poecilia reticulata*, Walsh-Monteiro, Pragana, Costa & Gouveia Jr, 2014).

## **1.2 Peixes como modelo comportamental em Neurociências**

O avanço no uso de peixes como animal de pesquisa, que teve um grande salto a partir da década de 1980 deu-se, para além das facilidades de manutenção e manipulação, pela homologia observada nestes indivíduos quando comparados com humanos e mamíferos não-humanos. O *Zebrafish*, por exemplo, possui homologia de 70% com o genoma humano (Howe et al., 2013), e tem sido amplamente utilizado em estudos associados a distúrbios neurocomportamentais (Kalueff, Stewart & Gerlai, 2014). Scharl (2014) expõe que apesar das diferenças anatômicas, existe semelhança molecular suficiente para o uso de peixes como modelo animal de pesquisa. Neste mesmo sentido, Mathur & Guo (2010) revelam que estudos comparativos de neuroanatomia apontam grandes similaridades funcionais entre o encéfalo de peixes e humanos. Algumas destas homologias podem ser exemplificadas pelo palio medial e o palio lateral de peixes que possuem como equivalentes, em mamíferos, a amígdala e o hipocampo, respectivamente (Portavella & Vargas, 2005).

Este interesse no uso de peixes como animal experimental deu-se também pela possibilidade do uso destes animais como instrumentos para simulação comportamental de situações semelhantes às que ocorrem em humanos, através de experimentos controlados. Desta forma, as induções por exposição, de determinados comportamentos em peixes, como por exemplo: ansiedade, depressão e memória, permitem ao pesquisador, explorar possíveis formas de tratamento, principalmente os que fazem uso de fármacos (Willner & Mitchell, 2002).

Em uma extensa revisão, Gouveia Jr e colaboradores (2006) apresentam as vantagens de se utilizar peixes como modelo de estudos etoexperimentais. Segundo os autores, como os peixes utilizados em pesquisa geralmente são de pequeno porte, em um aquário típico pode-se manter até 25 indivíduos. Isto resulta na ocupação de pouco espaço físico. Além disso, os aquários teste também são de pequeno porte. Deve-se lembrar também que, os custos e a manutenção de peixes são consideravelmente menores do que quando se compara a outros animais, como mamíferos. Além disso, Gouveia Jr e colaboradores (2006) também justificam a vantagem no uso de peixes pelas suas semelhanças em neuroanatomia e na sinalização neural, com tetrápodes, inclusive humanos (Guo, 2009; Wang, Takai, Yoshioka & Shirabe, 2006; Setini, Pierucci, Senatori & Nicotra, 2006; Anichtchik, Sallinen, Peitsaro & Panula, 2006; Teraoka, Russel, Regan, Chandrasekhar, Concha, Yokoyama et al., 2004; Wullimann & Mueller, 2004; Hauptmann, Söll & Gerster, 2002; Kaslin & Panula, 2001; Wullimann, 1998).

Assim, alguns modelos comportamentais utilizados em mamíferos foram adaptados, enquanto outros foram criados e validados especificamente para estudos em peixes. Entre os modelos comportamentais mais comumente utilizados em peixes, temos os testes: do campo aberto (Riehl, Kyzar, Allain, Green, Hook, Monning et al., 2011; Swain, Sigsta & Scalzo, 2004); do deslocamento vertical (Bencan, Sledge & Levin, 2009; Levin, Bencan & Cerutti, 2007); da esquivia inibitória (Garção & Mattioli, 2009; De Castro, Lima, de Freitas, Valente, Dummer, de Aguiar et al, 2009; Faganello, Medalha & Mattioli, 2003); e da preferência claro/escuro (Blaser & Peñalosa, 2011; Maximino, Marques de Brito, Dias, Gouveia Jr & Morato, 2010; Maximino, Brito, Moraes, Oliveira, Taccolini, Pereira et al, 2007; Serra, Medalha e Mattioli, 1999).

No teste de campo aberto, como o animal é exposto a um ambiente novo, a tendência é de que, passe mais tempo na periferia do que no centro do aparato. No campo aberto, mensuram-se: medidas de exploração relativas à locomoção, através da verificação no número de transposições entre as áreas do aparato, mas também se pode medir o tempo de permanência do animal no centro ou nas bordas do aparato, o que é uma medida de ansiedade. Em peixes, este modelo tem sido utilizado para verificar o efeito de drogas que atuam, principalmente, sobre a via dopaminérgica (Bjerke, 2002; López-Patino, Cabral & Zhdanova, 2008).

No teste de deslocamento vertical, mensura-se a escolha, entre os níveis mais superficiais e mais fundos dos aquários-testes e sua atividade locomotora. Para o *Zebrafish*,

verificou-se uma tendência a explorar mais o fundo do aquário, tendência essa associada a estados de medo (Gerlai, Lahav, Guo & Rosenthal, 2000). Para Levin e colaboradores (2007), a escolha pelo fundo no teste de deslocamento vertical, equivale à preferência dos roedores pelas paredes no teste de campo aberto e pelos braços fechados labirinto em cruz elevado, o que, segundo os autores, sugere que este seja um bom teste para mensuração de ansiedade. Este teste foi utilizado para a verificação do efeito de drogas, ansiolíticas e sedativas.

Bencan e colaboradores (2009) mostraram que clordiazepóxido e diazepam, em altas doses, geraram efeitos sedativos, caracterizado pela redução da atividade exploratória e locomotora, no teste de deslocamento vertical com *Zebrafish* e, em baixas doses, somente o primeiro induziu efeito ansiolítico, maior resposta locomotora em espaços considerados anteriormente potencialmente perigosos. No mesmo trabalho, a buspirona não produziu efeitos sedativos, mas sim efeitos ansiolíticos.

A esquiwa inibitória é utilizada como modelo para a testagem de aprendizagem nos animais, sejam eles mamíferos ou peixes. Pode-se expor o animal a um estímulo aversivo (peso de metal na água, forte luminosidade, choques na água, entre outros), medindo então seu comportamento de esquiwa e fuga, refazendo o teste após um período, por exemplo de 24h. Quando a resposta emitida no re-teste for uma esquiwa referente ao estímulo aversivo apresentado no re-teste, diz-se que a resposta apresentada é uma esquiwa ativa. Já a esquiwa inibitória (passiva) ocorre quando o animal evita o estímulo este estímulo. Para Richter-Levin (2004), o teste de esquiwa inibitória pode ser utilizado para a modulação emocional da memória. Estudos apontam diferentes receptores na aprendizagem e memória do comportamento ansiedade/medo de esquiwa, entre eles, temos: dopamina (Faganello et al, 2003) e serotonina (Beulig & Fowler, 2008).

O teste de preferência claro/escuro tem sido utilizado na última década como referência para o estudo da ansiedade, através da determinação da preferência por ambientes escuros por alguns peixes (escototaxia). Serra e colaboradores (1999) demonstraram que o *Zebrafish*, possui preferência por ambientes escuros. Em 2005, Gouveia Jr, Zampieri, Ramos, Silva, Mattioli e Morato, demonstraram o mesmo padrão de preferência ao escuro para o peixe-dourado (*Carassius auratus*). Variações nos aquários-testes metade claro metade escuro (50%:50%), para ambiente totalmente claro (branco), totalmente escuro (preto) ou em diferentes proporções entre claro/escuro, com estas e outras espécies de peixes teleósteos

(Maximino et al, 2007), sugerem uma preferência destes peixes por ambientes escuros, bem como, aversão por ambientes claros e desconhecidos (Maximino et al, 2010).

Estes resultados permitem sugerir que tais experimentos podem ser utilizados como modelo do comportamento tipo ansiedade para peixes, como no caso do *Zebrafish* considerado animal modelo não-mamífero, não só pela semelhança comportamental, mas também pelas homologias genéticas, anatômicas e fisiológicas existentes.

Especificamente quanto ao comportamento, o teste de preferência claro/escuro, e suas adaptações, tem sido aceito como modelo para estudo de medo e ansiedade em diferentes espécies de teleósteos, por apresentar-se como uma situação de conflito de escolha ao animal. É esta necessidade de avaliação do risco ao ambiente por parte dos sujeitos em teste, que pode lhes conduzir ao estado de medo ou ansiedade (Kavaliers & Choleris, 2001). Estudos realizados com diferentes espécies de peixes apontam para respostas comportamentais defensivas, quando estes são expostos a tais condições de conflito em preferência claro/escuro (Riehl et al, 2011; Blaser & Peñalosa, 2011; Maximino et al, 2007; Gouveia Jr et al, 2005; Serra et al, 1999).

Estudos sobre neuroanatomia funcional, neurofisiologia e neurofarmacologia vêm reforçando os resultados quanto à relação ansiedade-escototaxia apresentada por peixes nos testes de preferência claro/escuro (Maximino, da Silva, Gouveia Jr & Herculano, 2011; Santangelo, Morato & Mattioli, 2001).

Outros trabalhos com peixes, principalmente com o *Zebrafish*, devido a sua grande similaridade anatômica, fisiológica e molecular com o sistema nervoso de mamíferos (Guo, 2009; Hauptmann et al, 2002; Kaslin & Panula, 2001), demonstraram que os efeitos psicoativos de algumas drogas, como: etanol (Gerlai et al, 2000), cocaína (López-Patiño et al, 2008), anfetamina (Ninkovic, Folchert, Makhankov, Neuhauss, Sillabert, Straehle et al, 2006), morfina (Breteau, Lockwood, Kobayashi, Lin & Guo, 2007) e nicotina (Menelaou & Svoboda, 2009); afetam igualmente peixes e mamíferos, sejam por induzir comportamentos estereotipados do tipo ansiogênico, ansiolítico, sedativo ou mesmo relacionados à hiperatividade locomotora.

Como se pode observar, a literatura revela que no teste de preferência claro/escuro, algumas espécies de peixes apresentam comportamento relacionados à ansiedade que são semelhantes com tendência à escototaxia (Maximino et al, 2010; Maximino et al, 2007;

Gouveia Jr et al, 2005; Serra et al, 1999), o que representa um clássico mecanismo de defesa anti-predatória.

Este comportamento escototático parece sugerir, com base nas diferentes espécies e habitats estudados que, semelhanças neuroanatômicas e neurofisiológicas (Guo, 2009; Wang et al, 2006; Setini et al, 2006; Anichtchik et al, 2006; Teraoka et al, 2004; Wulliman & Mueller, 2004; Hauptmann et al, 2002; Kaslin & Panula, 2001; Wulliman, 1998) são conservadas, entre estes animais e entre estes e os tetrápodes, mesmo com tais grupos tendo sofrido evolução divergente, no que diz respeito à luminosidade do ambiente natural.

### **1.3 O Guppy (*Poecilia reticulata*)**

Considerando a expansão no uso de peixes como animais em pesquisa, optou-se pela espécie *Poecilia reticulata* (Guppy, lebiste), linhagem selvagem (figura 1) que possui ampla distribuição na região Neotropical. Guppies tem como características em laboratório o fato de serem de fácil manutenção e reprodução, além de apresentarem elevada resistência, inclusive a ambientes contaminados ou mesmo de baixa oxigenação (Andrade, Andrade, Boscolo & Soares, 2005). Dentre as áreas de estudo com guppies, destacam-se: genética, (Kong, Li & Sun, 2014), ecologia (Lindholm, Head, Brooks, Rollins, Ingleky & Zajitschek, 2014), etologia (Fischer, Harris, Hofmann, Hoke, 2013), desenvolvimento (Liu & Lee, 2014), neurociências (Lazzari, Bettini & Franceschini, 2013; Miletto Petrazinni, Agrillo, Piffer, Dadda, Bisazza, 2012) e comportamento (Kwan, Cheng, Rodd & Rowe, 2013; Maximino et al., 2007), o que torna o uso da espécie uma estratégia viável experimentalmente e de baixo custo operacional.



**Figura 1.** Indivíduos adultos da espécie *Poecilia reticulata*. Macho mais colorido, com nadadeira anal modificada em gonopódio e nadadeira caudal mais desenvolvida. Fonte: Banco de Imagem do Google.

A tabela 1 apresenta, de maneira não exaustiva, alguns trabalhos que utilizaram *Guppy* como animal experimental em comportamento e suas principais conclusões.

**Tabela 1.** Diferentes experimentos com o uso de *Guppy* (*Poecilia reticulata*) como animal de pesquisa em comportamento.

Ano	Autores	Descrição
1991	Dugatkin & Alfieri	Estudo mostrando que indivíduos que interagiram com co-específicos em cooperação anterior, tendem a lembrar da situação e escolher este parceiro em comparação a um desconhecido quando exposto a presença de um predador.
1996	Godin & Dugatkin	Estudo sobre a preferência das fêmeas por machos mais coloridos que se apresentam mais corajosos frente a um predador em relação a machos mais opacos e tímidos.
2002	O'Steen et al	Estudo demonstrando a seleção fenotípica e rápida evolução de respostas de fuga em populações de alta predação quando expostos a predadores em relação a populações de baixa predação e, também rápida redução da capacidade de fuga quando indivíduos de alta predação são introduzidos em ambientes de baixa predação, em poucas gerações.

2009	Kolluru et al	Estudo sobre o efeito de infecções parasitárias sobre a escolha por alimentos e acasalamento, onde machos parasitados passavam mais tempo forrageando do que cortejando as fêmeas, sendo o inverso encontrado nos machos não infectados. O estudo sugere que indivíduos infectados, por estarem com menor estado energético tendem a priorizar a busca por alimento do que pela reprodução.
2012	Agrillo et al	Estudo com universitários e guppies expostos a tarefas numéricas apresentando desempenhos equivalentes na realização de seus testes, permitindo sugerir que a discriminação numérica cognitiva seja baseada em uma circuitaria neural simples e que a origem evolutiva desta habilidade seja anterior à divergência teleosteos-tetrápodes.
2013	Ruell et al	Estudo sobre o risco de predação e a disponibilidade de alimentos na ornamentação de machos onde, a presença de sinalizadores químicos de predadores retardam o desenvolvimento de pigmentos coloridos, que são pistas visuais ao predador, resultando em adultos menos coloridos. Por outro lado, a redução na oferta de alimentos retarda o desenvolvimento dos pigmentos, porém o amadurecimento ocorre, mesmo que tardiamente.
2014	Hockley et al	Estudo sobre como o tamanho, o sexo e a carga parasitária influenciam o micro-habitat de escolha do indivíduo por ambientes com maior ou menor turbulência e velocidade da água. Demonstram que indivíduos menores tendem a ficar em ambientes de menor velocidade da água enquanto que os maiores ficam em locais de maior velocidade. Além disso, indivíduos parasitados evitam ambientes de maior velocidade e turbulência. Os autores fazem uma relação entre os resultados e a ecologia dos animais no ambiente natural.
2015	Kent & Ojanguren	Estudo sobre o impacto de mudanças agudas de temperatura da água (17-32°C) sobre a natação de juvenis demonstrando que embora em maiores temperaturas os indivíduos tendam a reduzir a velocidade e permanecer mais tempo no fundo, a sobrevivência nestas condições parece indicar o sucesso da espécie na invasão de outros ambientes.
2015	Volkova et al	Estudo sobre o efeito da contaminação ambiental por estrógenos demonstrando que esta contaminação pode induzir alterações comportamentais nos indivíduos expostos e modificações hereditárias, provocando maior estado ansioso nos indivíduos, inclusive nas gerações seguintes
2016	Chuard et al	Estudo competição intrasexo por parceiros reprodutivos em ambientes com alto e baixo risco de predação. Em ambientes de alta predação os machos apresentaram taxas de agressão mais baixas se comparados aos de ambiente de baixo risco de predação, contudo, nos dois ambientes o comportamento de corte às fêmeas e tentativa de acasalar não diferiram.

#### 1.4 Focos deste estudo

Os modelos animais que estudam doenças psicopatológicas humanas visam desenvolver para depois poder mensurar sintomas semelhantes àqueles expressados em humanos, a fim de que se possam compreender melhor os aspectos que envolvem tal patologia. Contudo, a criação de modelos animais válidos para doenças psicopatológicas não tem sido fácil. A natureza subjetiva dos sintomas a serem tratados tem sido a maior dificuldade para criação desses modelos. Além disso, revisões tem relatado que determinados transtornos podem ser uma condição estritamente humana, sendo, portanto, muito difíceis de serem projetados para modelos animais válidos (Willner, 1991).

Para que um modelo se torne válido, este deve passar por um processo extenso de validação. Willner (1991) adotou três critérios para a validação de um modelo animal: validade de face (que se refere ao grau de semelhança entre o que se pretende simular), validade preditiva (o modelo utilizado deve ter a capacidade de previsão do que se espera simular) e validade de construto (se os dados obtidos com o modelo fazem referência ao que se pretende estudar).

O uso de modelos animais, em especial através de peixes, segundo Gouveia Jr e colaboradores (2006) é uma boa alternativa para o estudo de drogas e condições que alteram o comportamento em casos onde o estudo *in vitro* ou clínico não é possível devido a impedimentos técnicos, éticos ou formais. Como já apontado acima, peixes como o *Guppy* e o *Zebrafish* têm sido amplamente utilizados em diferentes abordagens experimentais para o estudo do comportamento.

Neste estudo foram abordados diferentes protocolos experimentais em comportamento, sejam eles clássicos ou inéditos, utilizando o *Guppy* como animal de referência, tendo como temas centrais: ritmicidade biológica, ansiedade e medo.

A primeira parte deste estudo (Estudo I) foi voltada à relação entre a ritmicidade de guppies e seu comportamento manifestado em diferentes turnos do dia. Estudos em genética comparativa revelam que todos os organismos apresentam um perfil rítmico em suas atividades, independentemente se são mais simples, como unicelulares ou os mais complexos pluricelulares (Bell-Pedersen, Cassone, Earnest, Golden, Hardin, Thomas et al, 2005). Esta ritmicidade biológica faz uso de informações ambientais, como marcadores exógenos para

ajustes corporais, sejam eles fisiológicos ou comportamentais (Miller & Takahashi, 2014). Em peixes, a informação luminosa do ambiente tende a ser captada por fotorreceptores da retina e da glândula pineal, disparando assim os mecanismos neurais de ajustes rítmicos (Evans, Claiborne & Currie, 2013).

Contudo, em guppies os estudos de fotorreceptores da retina tendem a estar mais focados na discriminação de cores sobre o reconhecimento de parceiros reprodutivos, do que no efeito da luminosidade sobre a ritmicidade dos indivíduos. Watson e colaboradores (2010) mostraram que guppies apresentam nove opsinas diferentes em seus cones, o que resulta em ampla sensibilidade espectral e discriminação de comprimentos de onda. Temple (2011) sugere que toda esta variabilidade de opsinas visuais pode influenciar a escolha de parceiros reprodutivos. Assim como os estudos citados acima, outros focam a relação entre visão de cores e reprodução, não explorando a abordagem sobre a ritmicidade biológica de guppies.

A segunda parte deste estudo (Estudo II) esteve focada naquele que é o principal alvo de estudo com peixes em comportamento: ansiedade e medo. Isto se dá, possivelmente pelo fato de que a ansiedade representa um dos principais distúrbios psiquiátricos e abordagens que envolvam o entendimento da doença podem contribuir para seu tratamento (Andrade, Zangrossi & Graeff, 2013). A exploração deste tema em peixes é tão representativa em relação aos demais que, muitos são os testes criados ou adaptados geralmente a partir de mamíferos roedores (Gouveia Jr et al., 2006).

Contudo, o labirinto em cruz elevado, principal modelo de estudo comportamental em roedores, não possui equivalente piscino. Sendo assim, o que se propôs foi a criação de um labirinto em cruz com rampa para peixes que simulasse condições equivalente em modelo existente para roedores.

Além disso, vários estudos apontam a diferença sexual entre machos e fêmeas como uma variável importante a ser considerada e, esse dimorfismo sexual é claramente percebido nos guppies. Embora uma boa parcela dos trabalhos com estes animais foque o comportamento de escolha de parceiros reprodutivos (Ruel et al., 2013; Godin & Dugatkin, 1996), aqui o componente sexual será utilizado para a verificação da existência ou não de dimorfismo comportamental nas sessões experimentais que seguem, como no trabalho de Maximino e colaboradores (2007).

## 1.5 Objetivo Geral

Avaliar o desempenho do *Guppy* (*Poecilia reticulata*) em modelos experimentais de ansiedade: campo aberto, preferência claro-escuro e labirinto em cruz com rampa, com vistas a seu uso como modelo animal piscino alternativo.

## 2 MATERIAIS E MÉTODOS

### 2.1 Aspectos éticos

Todos os procedimentos experimentais realizados neste estudo foram condizentes com os padrões internacionais de *The International Guiding Principles for Biomedical Research Involving Animals* (NRC, 2004), sob análise da Comissão de Ética para Uso Animal da Universidade Federal do Pará, protocolo nº 9791220816.

### 2.2 Coleta e manutenção dos animais

Todas as fases de estudo resultaram no uso de 576 animais adultos, sendo metade de cada sexo, uma vez que o dimorfismo sexual da espécie é bastante perceptível.

Todos os peixes foram coletados com o auxílio de uma rede de filó no Igarapé Santana, localizado no centro urbano do município de Tucuruí, Pará. Além dos peixes, água do igarapé também foi coletada para análise de parâmetros físico-químicos (tabela 2).

**Tabela 2.** Análise de parâmetros físicos, químicos e microbiológicos da água do local de coleta dos animais.

Parâmetro / coleta	1ª coleta (março/2014)	2ª coleta (novembro/2014)
Temperatura no local (°C)	27,30	29,10
OD (mg/L)	7,16	5,76
pH	7,02	7,17
DQO (mg/L)	3,10	4,49
DBO (mg/L)	1,85	0,92
Condutividade (µS/cm)	34,30	37,10
NH <sup>4+</sup> (µg/L)	62,97	21,12
NO <sup>-2</sup> (µg/L)	0,08	0,39
NO <sup>-3</sup> (µg/L)	4,23	4,81
PO <sup>-4</sup> (µg/L)	0,97	0,99
Turbidez (NTU)	2,81	1,38
Óleos e Graxas (mg/L)	0,00	0,07

Legenda: OD = oxigênio dissolvido; DQO = demanda química de oxigênio; DBO = demanda bioquímica de oxigênio.

Após coletados, os animais foram acondicionados em aquários plásticos de 45L com água do próprio igarapé e então transportados ao laboratório. Devido o grande volume de água para uma pequena quantidade de peixes por aquários e a curta distância entre a área de coleta e o laboratório – 8,3Km – não foi necessário o uso de aeradores de água durante este deslocamento.

Já no ambiente laboratorial a água dos animais recém coletados teve sua temperatura, pH (pHmetro PHS-3E, Even) e níveis de amônia (Kit Amônia Tóxica Água Doce Labcon Test, Labcon) mensurados, a fim de se comparar as condições limnológicas da água em que os animais se encontravam e a preparada em laboratório.

Após esta verificação, os animais recebiam água pré-tratada no laboratório para que houvesse uma equalização entre as condições naturais e laboratoriais. Esta aclimação inicial durou cerca de duas horas. A cada 30 minutos cerca de 20% da água da coleta era substituída por água pré-tratada no laboratório. De maneira que ao final de duas horas apenas um pequeno volume de água de coleta restava.

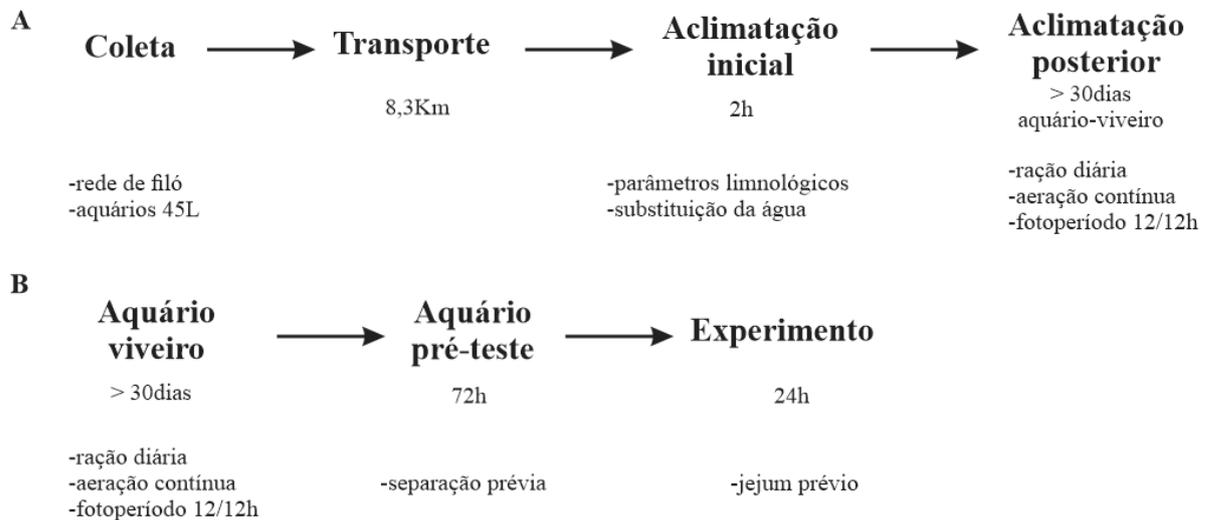
No laboratório os animais foram acondicionados em aquários viveiros de 50L. O sistema de aeração e filtração foi constante com compressores de ar (S-2000A, Boyu) acoplados a filtros biológicos. O fotoperíodo era de 12h luz e 12h escuro, como início às 6h00. Os parâmetros da água eram os seguintes: temperatura  $27 \pm 1$  °C; pH  $7 \pm 0,2$ , livre de cloro (Kit Teste pH e cloro, HTH) e com níveis desprezíveis de amônia e nitrito (Kit Nitrito Labcon Test, Labcon), sendo estes dois últimos verificados a cada 48h. Em caso de necessidade, tais parâmetros eram corrigidos, segundo recomendações da APHA (2012).

A alimentação ocorria uma vez ao dia, sempre pela manhã, com oferta de ração floculada (TetraColor Tropical Flakes, Tetra, Alemanha) por cinco minutos. Após este período a ração não consumida era removida.

O intervalo entre a coleta e a realização dos experimentos foi de no mínimo trinta dias, para aclimação dos animais ao ambiente artificial do laboratório e recuperação do estresse resultante da remoção do ambiente natural e transporte (Murty, 1988).

Os animais dos grupos testes eram separados para aquários ditos pré-testes, a partir do aquário viveiro, 72h antes do início dos experimentos e, tinham a alimentação suspensa nas 24h que antecediam o primeiro dia de experimento de maneira que se evitasse assim que a

possível saciedade alimentar reduzisse sua exploração durante o experimento. A figura 2 apresenta o fluxograma deste a coleta dos animais até o momento de seu uso experimental.



**Figura 2.** Fluxo de eventos desde a coleta dos animais *in loco* até a realização do experimento. (A) Etapas iniciais desde a coleta até a aclimação dos animais para redução de estresse. (B) Etapas de preparação dos animais para realização dos experimentos.

### 2.3 Condições experimentais

Todos os experimentos foram realizados em ambiente com baixo ruído e iluminação de 350 lux ao redor dos aquários-testes. As luminárias eram posicionadas de forma que não houvesse formação de penumbra no aparato ou que as lâmpadas refletissem na água.

Entre o teste de um animal e outro a água dos aquários-testes era substituída a fim de evitar a presença de possíveis substâncias sinalizadoras estressoras, que pudessem vir a influenciar o animal seguinte a ser testado (Brito, 2011).

No caso do aquário que possuía metade de seu revestimento branco e a outra metade preta (teste claro-escuro), o mesmo era girando em 180° entre cada teste, para que se evitasse a possibilidade de condicionamento pelo animal ali testado ou mesmo manifestação de preferência lateral com a repetição do teste.

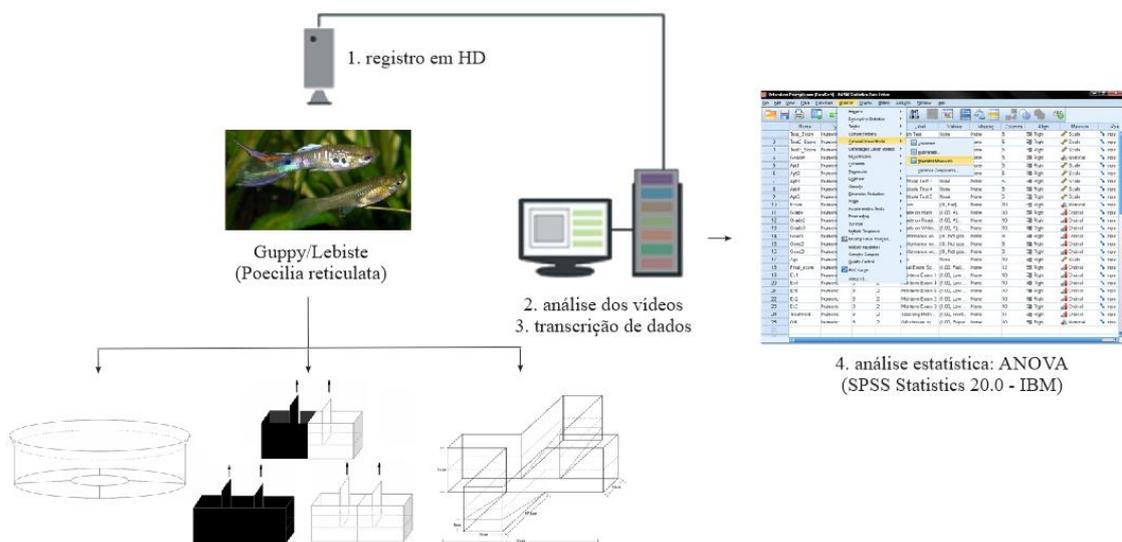
No caso das transposições ou entradas dos animais em áreas distintas dos aquários-teste, foi considerada a passagem para o outro ambiente quando 2/3 do corpo do animal estivesse neste outro ambiente.

## 2.4 Registro e análise dos vídeos

Todos os testes foram registrados em alta definição por filmadoras digitais (DCR-SR45, Sony e GZ-EX210, JVC) para em seguida serem analisados através do software livre VirtualDub versão 1.9.7 (VirtualDub, EUA). Todas as análises eram realizadas por pesquisador treinado.

Após a análise das variáveis, os dados obtidos eram transcritos para planilhas do software Excel 2007 (Microsoft Office 2007, Microsoft, EUA), considerando os milésimos de segundos nas variáveis referentes à medida de tempo.

Para a segunda fase do estudo, que envolveu os testes no labirinto em cruz com rampa, optou-se por converter os valores temporais e de números de entradas obtidos, por valores percentuais, de maneira que se pudesse padronizar todos os testes para uma escala comum, uma vez que, como descrito mais adiante, alguns testes foram executados em tempos de sessão diferentes. A figura 3 apresenta, de maneira esquemática as etapas essenciais da registro e análise dos experimentos.



**Figura 3.** Sistematização geral das etapas experimentais de registro e análise de dados.

## 2.5 Análise estatística

Para a análise estatística foi utilizado o software SPSS Statistics versão 20.0 (IBM corp, 2010, EUA). Inicialmente foram obtidos dados de média aritmética e erro padrão, como valores de referência. O passo seguinte foi a determinação do perfil de normalidade das amostras através do teste de Shapiro-Wilk.

De acordo com as variáveis analisadas e o resultado do teste de normalidade, foram utilizados os testes: ANOVA/MANOVA; Kruskal-Wallis; *t* de Student ou Mann-Whitney. Foi aplicado como pós-teste o teste Tukey.

Para os testes estatísticos, foi admitido um nível de confiabilidade de 95% ou valor de  $p \leq 0,05$ .

## 3 ESTUDO I

### 3.1 Introdução

Todos os organismos manifestam oscilações bioquímicas, fisiológicas e comportamentais rítmicas que variam em função de um temporizador endógeno evolutivamente conservado e de elevada vantagem adaptativa aos indivíduos (Elbaz, Foulkes, Gothif & Appelbaum, 2013). Estudos em genética comparada entre organismos uni e pluricelulares revelam que mesmo os seres mais simples apresentam características fisiológicas e metabólicas rítmicas (Bell-Pedersen et al., 2005).

Esta ritmicidade, filogeneticamente incorporada em todos os níveis de organização dos seres vivos é fundamental para a sobrevivência dos indivíduos (Dunlap, 1999) e tende a usar o ciclo ambiental claro-escuro como uma sugestão confiável para ajustes bioquímicos, fisiológicos e comportamentais (Miller & Takahashi, 2014). Este ciclo luminoso diário influencia diretamente o nicho ecológico dos indivíduos, podendo explicar, em partes o porquê de parte dos roedores tender a exercer suas atividades à noite, enquanto que humanos realizam as atividades preferencialmente de dia.

Em mamíferos, o núcleo supra-quiasmático do hipotálamo (NSQ) representa o principal oscilador temporal do organismo, uma vez que sua atividade tende a ser regulada pelos níveis de luminosidade do ambiente (Granados-Fuentes & Herzog, 2012). O NSQ possui papel fundamental na regulação do ciclo sono/vigília, participando, por exemplo da regulação da produção e liberação de melatonina pela glândula pineal e de outros neuropeptídeos e monoaminas cerebrais (Morris, Aeschbach & Scheer, 2012). Em peixes, o NSQ e as células fotorreceptoras da glândula pineal parecem estar envolvidas na regulação da ritmicidade biológica, como ocorre com os demais vertebrados (Evans, Claiborne & Currie, 2013; Vatine, Vallone, Gothif & Foulkes, 2011; Faraco, Appelbaum, Marin, Gaus, Mourrain & Mignot, 2006).

Uma grande parcela dos trabalhos sobre ritmicidade biológica em peixes nos últimos anos utiliza o *Zebrafish*. Estes trabalhos mostram que o *Danio rerio* começa a exibir um ritmo

estável de atividade locomotora no período diurno, ainda em estágios larvais, o que se mantém na vida adulta (Tovin et al., 2012; Hurd & Cahill, 2002). Tovin e colaboradores (2012) perceberam que o padrão de atividade locomotora dos animais é afetado diretamente pelo ciclo claro/escuro. Parte dos animais testados, expostos a iluminação constante, revelaram-se invariavelmente ativos, o que levou a perda completa de seus ritmos. Ao mesmo tempo, o inverso também se mostrou verdadeiro, alguns animais expostos a ambientes sem nenhuma iluminação também apresentaram redução da atividade locomotora e consequente perda dos ritmos (Tovin et al., 2012). Este, entre outros estudos, mostra a evidente relação/integração entre os efeitos ambientais, no caso o regime luminoso, e a regulação rítmica endógena, que acaba impactando na fisiologia e comportamento dos animais (Fonken et al., 2009; López-Olmeda et al, Madrid & Sánchez-Vásquez, 2006).

Em um estudo com *Zebrafish* em nosso laboratório utilizando o teste de preferência claro-escuro, em diferentes turnos e variações de luminosidade, verificou-se que o tempo de permanência nos ambientes claro ou escuro variavam não só com o regime de luminosidade em que o animal era exposto, mas também com o turno em que o teste era realizado (Dias, 2014).

Desta forma, compreender como variações ambientais cíclicas, afetam temporizadores biológicos dos indivíduos se apresenta como um conhecimento relevante para identificar, por exemplo, se a alteração de padrão locomotor do animal é consequência de um estado medo-ansiedade ou um comportamento relacionado a atividade locomotora rítmica do animal no horário em que a verificação está sendo realizada pelo experimentador.

Como o objeto central aqui é o uso do *Guppy* como animal de pesquisa comportamental, compreender se o regime luminoso diário influencia seu comportamento pode esclarecer, por exemplo, quais turnos do dia se revelam preferenciais para a realização de experimentos de maneira que falsos positivos ou negativos sejam evitados.

### **3.2 Objetivos específicos**

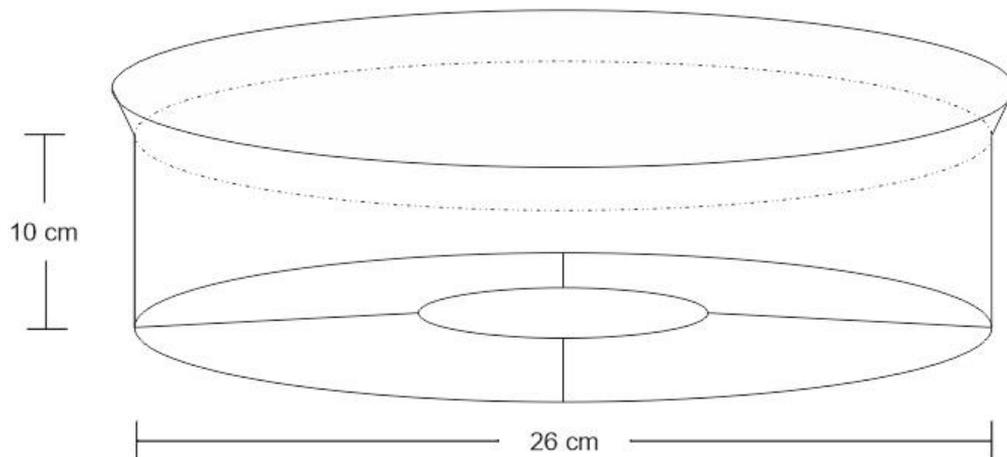
- Verificar o comportamento de guppies a exposição por cinco dias consecutivos nos testes de campo aberto e preferência claro-escuro;

- Comparar estas respostas entre os turnos de análise: manhã, tarde, noite, madrugada, e
- Comparar se ocorre dimorfismo sexual nas respostas comportamentais encontradas.

### 3.3 Aparatos e procedimentos

#### 3.3.1 CAMPO ABERTO

Para o teste de campo aberto foi utilizado um aquário plástico circular totalmente coberto por película plástica fosca atóxica branca neve, com 12cm de altura e 26cm de diâmetro. A coluna d'água tinha 10cm de altura. No fundo do aquário, duas linhas (branco gelo) perpendiculares se cruzavam no centro do aparato, onde havia um círculo central (branco gelo) com área representando 1/5 da área total de fundo do aquário. Desta forma, o aparato possuía um círculo central e quatro porções periféricas, cada uma representando 1/5 da área total de fundo (figura 4).



**Figura 4.** Desenho esquemático do aquário circular utilizado para os testes de campo aberto.

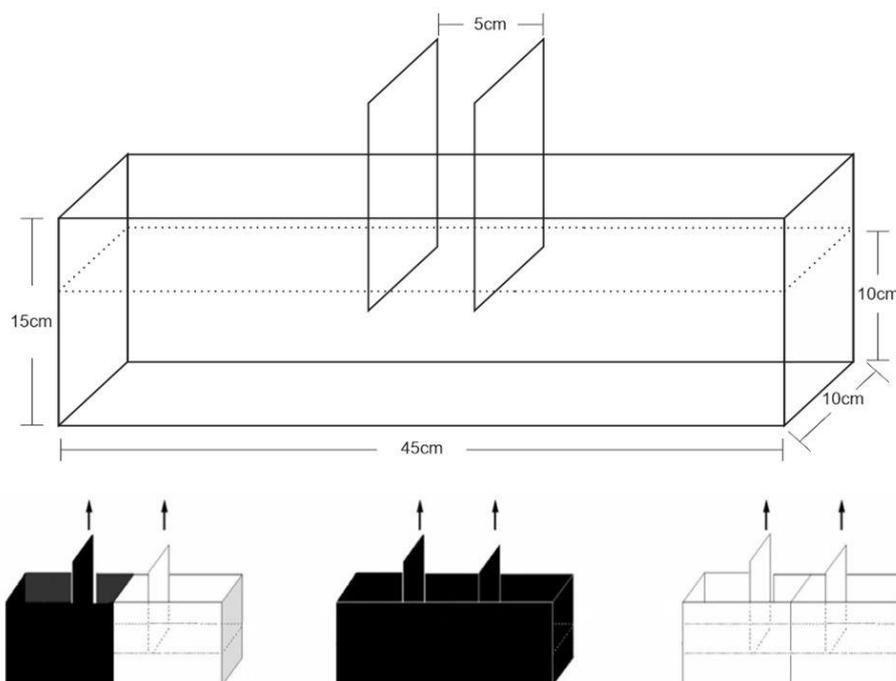
A sessão teste iniciava com a inserção do animal no centro do aparato e tinha duração de 15 minutos. O campo aberto permitiu mensurar o comportamento motor dos animais em

duas relações: centro-periferia e periferia-periferia, através do tempo total nestes compartimentos e o número de transposições entre os compartimentos (Carvalho et al., 2015).

### 3.3.2 PREFERÊNCIA CLARO-ESCURO

Para o teste de verificação de preferência claro-escuro foram utilizados três aquários diferentes, porém com dimensões iguais: 45cm de comprimento, 10cm de largura e 15cm de altura, adaptados do modelo proposto por Serra, Medalha e Mattioli (1999). A porção central do aquário possuía uma câmara de 5cm de largura, denominada câmara de habituação. Os três aquários foram forrados com película plástica fosca atóxica preta e branca neve, sendo: um aquário totalmente branco, outro totalmente preto e um terceiro, metade branco e metade preto (figura 5). A coluna d'água era de 10cm.

Para a realização do teste, o animal era colocado na câmara de habituação e, após cinco minutos, as portas corredeiras que delimitam a câmara eram removidas e por 15 minutos se registrava o número de transposições do animal pela linha média do aparato e o tempo total de permanência em cada lado do aparato (Maximino et al, 2010).



**Figura 5.** Desenho esquemático dos aquários retangulares utilizados para os testes de preferência claro-escuro. Adaptado de Maximino et al. (2007).

### 3.3.3 GRUPOS EXPERIMENTAIS

Os indivíduos foram testados em grupos separados por sexo, turno e aparato. Os turnos e seus respectivos períodos de experimentação foram: a. Diurno (8h00 às 10h30); b. Vespertino (14h00 às 16h30); c. Noturno (20h00 às 22h30); d. Madrugada (2h00 às 4h30).

Cada animal foi testado uma vez ao dia, por cinco dias consecutivos. Foram utilizados animais ingênuos (à primeira exposição teste) quanto a testes experimentais para cada um dos grupos (n = 6 indivíduos), conforme a tabela 3 abaixo.

**Tabela 3.** Descrição dos grupos experimentais para os testes de campo aberto e preferência claro-escuro (n=6; n total = 192).

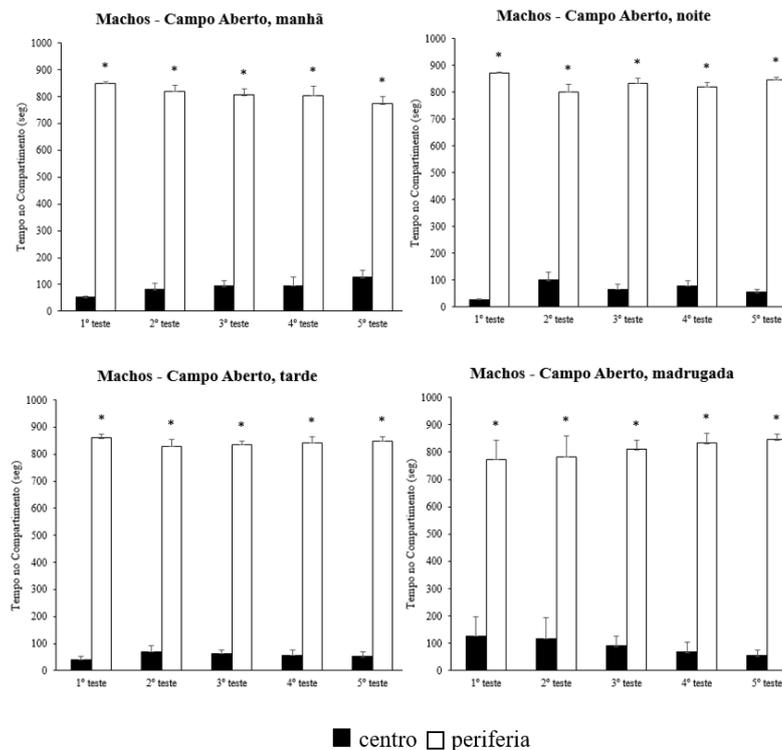
<b>Sexo</b>	<b>Turno</b>	<b>Teste</b>
Macho (n=96)	Manhã (n=24)	Campo Aberto (n=6)
		Claro-Escuro (n=6)
		Claro-Claro (n=6)
		Escuro-Escuro (n=6)
	Tarde (n=24)	Campo Aberto (n=6)
		Claro-Escuro (n=6)
		Claro-Claro (n=6)
		Escuro-Escuro (n=6)
	Noite (n=24)	Campo Aberto (n=6)
		Claro-Escuro (n=6)
		Claro-Claro (n=6)
		Escuro-Escuro (n=6)
Madrugada (n=24)	Campo Aberto (n=6)	
	Claro-Escuro (n=6)	
	Claro-Claro (n=6)	
	Escuro-Escuro (n=6)	
Fêmea (n=96)	Manhã (n=24)	Campo Aberto (n=6)
		Claro-Escuro (n=6)
		Claro-Claro (n=6)
		Escuro-Escuro (n=6)
	Tarde (n=24)	Campo Aberto (n=6)
		Claro-Escuro (n=6)
		Claro-Claro (n=6)
		Escuro-Escuro (n=6)
	Noite (n=24)	Campo Aberto (n=6)
		Claro-Escuro (n=6)
		Claro-Claro (n=6)
		Escuro-Escuro (n=6)
Madrugada (n=24)	Campo Aberto (n=6)	
	Claro-Escuro (n=6)	
	Claro-Claro (n=6)	
	Escuro-Escuro (n=6)	

Nos turnos noturno e madrugada, devido a ausência de iluminação natural, os animais eram removidos dos aquários pré-teste, apenas no instante em que eram realizados os testes no ambiente iluminado, conforme descrito acima.

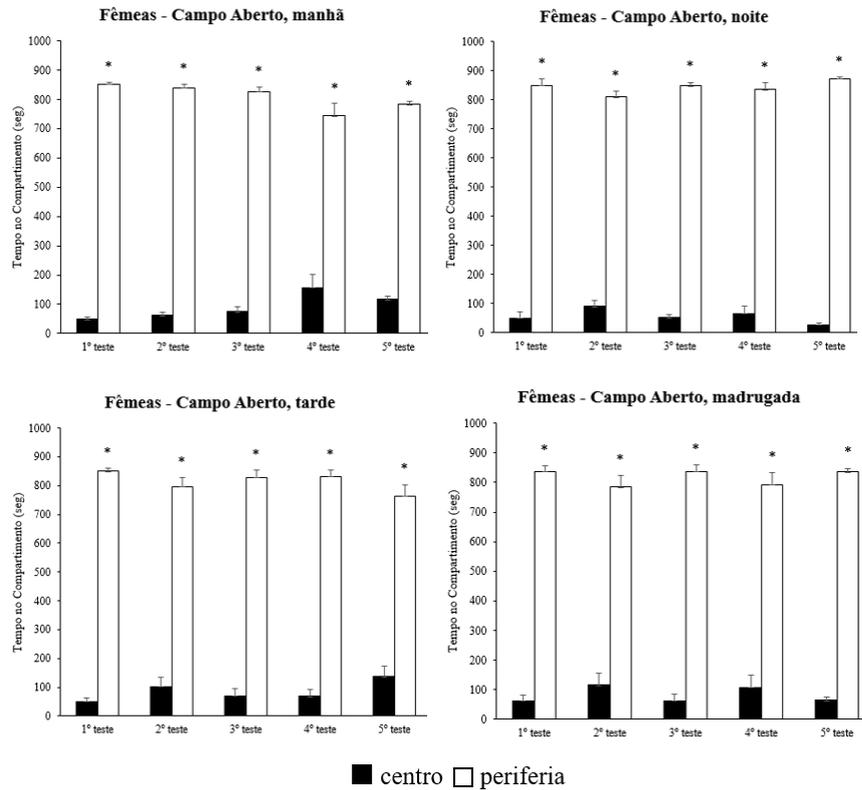
### 3.4 Resultados

#### 3.4.1 CAMPO ABERTO

As análises obtidas quanto ao tempo nos compartimentos periféricos ou central para o experimento em campo aberto revelou que, em todas as situações (sexo, turno e repetição do teste) houve preferência clara pelos compartimentos periféricos. Contudo, tal preferência temporal não diferiu em relação ao sexo, ao turno de realização do teste ou mesmo à reexposição (figuras 6 e 7).

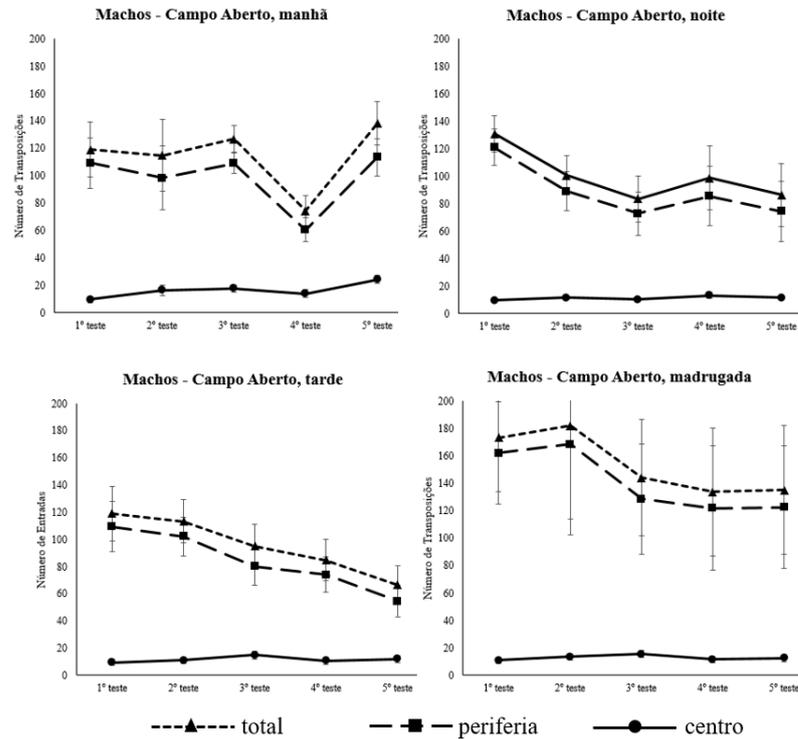


**Figura 6.** Tempo no compartimento para os grupos de machos testados no aquário em campo aberto nos diferentes turnos. Legenda: \*,  $p \leq 0,01$ .

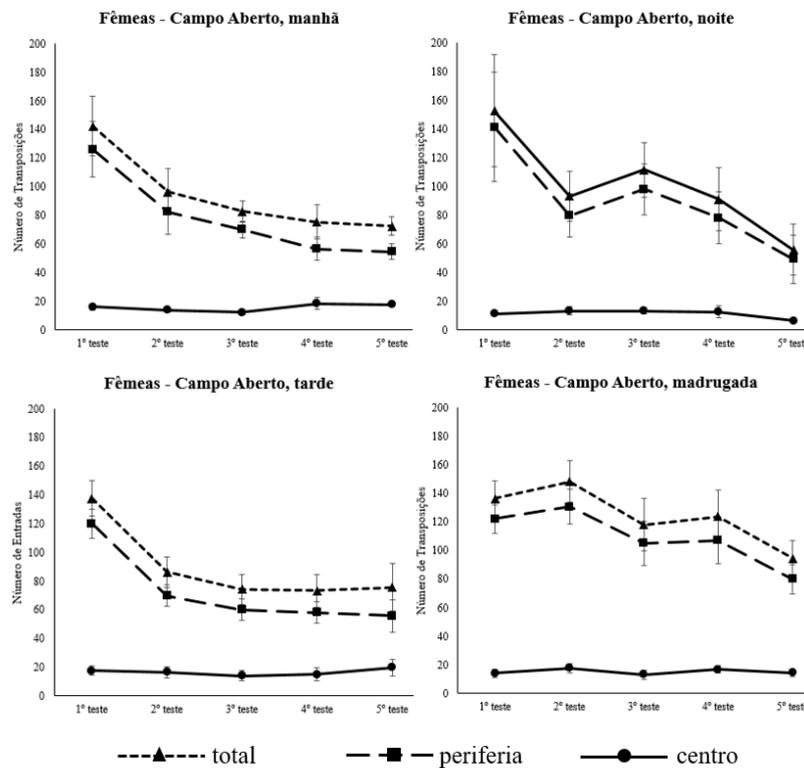


**Figura 7.** Tempo no compartimento para os grupos de fêmeas testadas no aquário em campo aberto nos diferentes turnos. Legenda: \*,  $p \leq 0,01$ .

Já com relação às transposições foram encontradas diferenças entre os sexos para a ambulação na periferia [ $F(39,200) = 6,188, p = 0,014$ ] e a ambulação total [ $F(39,200) = 4,844, 0,029$ ]. Também foram encontradas diferenças devido a reexposição na ambulação periférica [ $F(39,200) = 7,513, p < 0,001$ ] e ambulação total [ $F(39,200) = 6,559, p < 0,001$ ] (figuras 8 e 9).



**Figura 8.** Número de entradas para os grupos de machos testados no aquário em campo aberto nos diferentes turnos.



**Figura 9.** Número de entradas para os grupos de fêmeas testadas no aquário em campo aberto nos diferentes turnos.

Com relação aos quatro turnos de realização dos experimentos, foram encontradas diferenças nas três variáveis de ambulacão: periferia [ $F(39,200) = 7,768$ ,  $p < 0,001$ ], central [ $F(39,200) = 4,978$ ,  $p = 0,002$ ] e total [ $F(39,200) = 7,288$ ,  $p < 0,001$ ]. Não foram encontradas diferenças na interação entre as variáveis sexo, turno e reexposição para as transposições de ambulacão.

O teste *post-hoc* revelou diferenças na ambulacão na periferia entre manhã e madrugada ( $p = 0,002$ ), tarde e madrugada ( $p < 0,001$ ) e noite e madrugada ( $p = 0,002$ ). Para a ambulacão central, o pós-teste indicou diferenças entre manhã e noite ( $p = 0,001$ ). Assim como para a ambulacão na periferia, a ambulacão total apresentou diferenças entre a madrugada e os demais turnos: manhã ( $p = 0,007$ ), tarde ( $p < 0,001$ ) e noite ( $p = 0,001$ ).

Quanto às reexposições, o pós-teste indicou diferenças na ambulacão periférica entre o primeiro dia, e: terceiro dia ( $p = 0,004$ ), quarto dia ( $p < 0,001$ ) e quinto dia ( $p < 0,001$ ). Resultados semelhantes foram encontrados para a ambulacão total entre o primeiro dia, e: terceiro dia ( $p = 0,009$ ), quarto dia ( $p = 0,001$ ) e quinto dia ( $p < 0,001$ ).

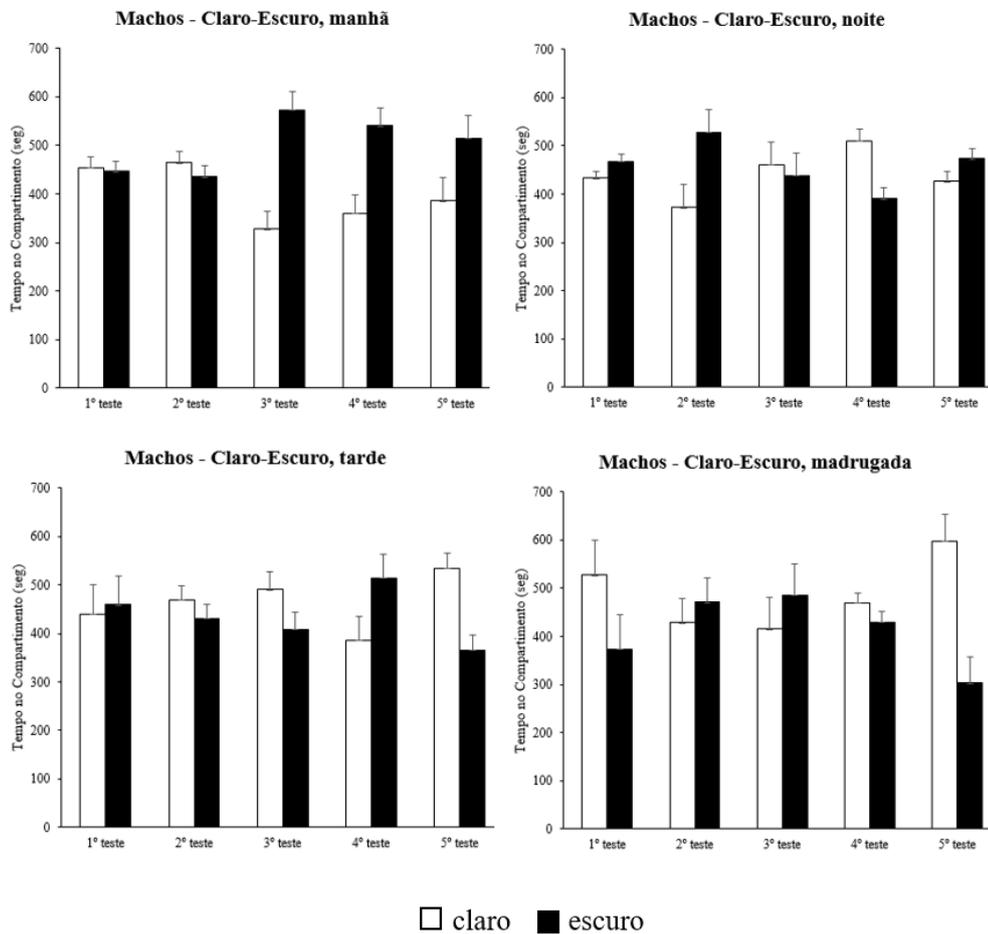
### 3.4.2 PREFERÊNCIA CLARO-ESCURO

Aos animais testados nos aquários metade branco e metade preto, não foram encontradas preferências pelo ambiente claro ou escuro. Foram encontradas diferenças estatísticas globais na comparação entre os sexos para as transposições no aparato [ $F(39,200) = 6,489$ ,  $p = 0,012$ ]. Também foram encontradas diferenças globais quanto ao tempo de permanência e o número de transposições para as variáveis referentes ao turno de realização do teste (tempo de permanência: [ $F(39,200) = 3,407$ ,  $p = 0,01$ ], transposições: [ $F(39,200) = 14,350$ ,  $p < 0,001$ ]) e reexposição ao aparato (tempo de permanência: [ $F(39,200) = 2,908$ ,  $p = 0,036$ ], transposições: [ $F(39,200) = 6,067$ ,  $p = 0,01$ ]) (figuras 10-13).

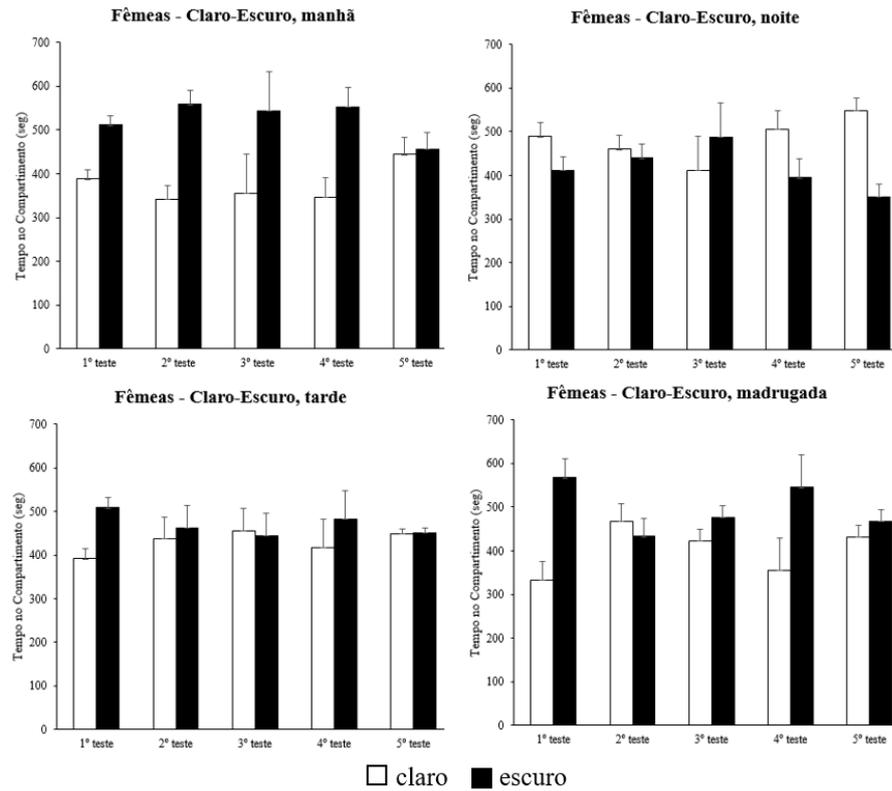
A interação sexo e turno de realização do experimento também revelou diferenças para o tempo de permanência [ $F(39,200) = 4,616$ ,  $p = 0,004$ ] e o número de transposições [ $F(39,200) = 3,563$ ,  $p = 0,015$ ]. Já a interação entre o turno e a reexposição só indicou diferenças para o tempo de permanência [ $F(39,200) = 1,785$ ,  $p = 0,05$ ].

A análise do pós-teste para a reexposição ao aparato indicou diferenças no tempo de permanência entre o primeiro dia de teste e: o terceiro ( $p = 0,018$ ), o quarto ( $p = 0,031$ ) e o quinto ( $p = 0,029$ ). Já o pós-teste da reexposição ao aparato quanto ao número de transposições entre o primeiro dia e os demais dias revelou  $p < 0,001$  em todas as ocasiões.

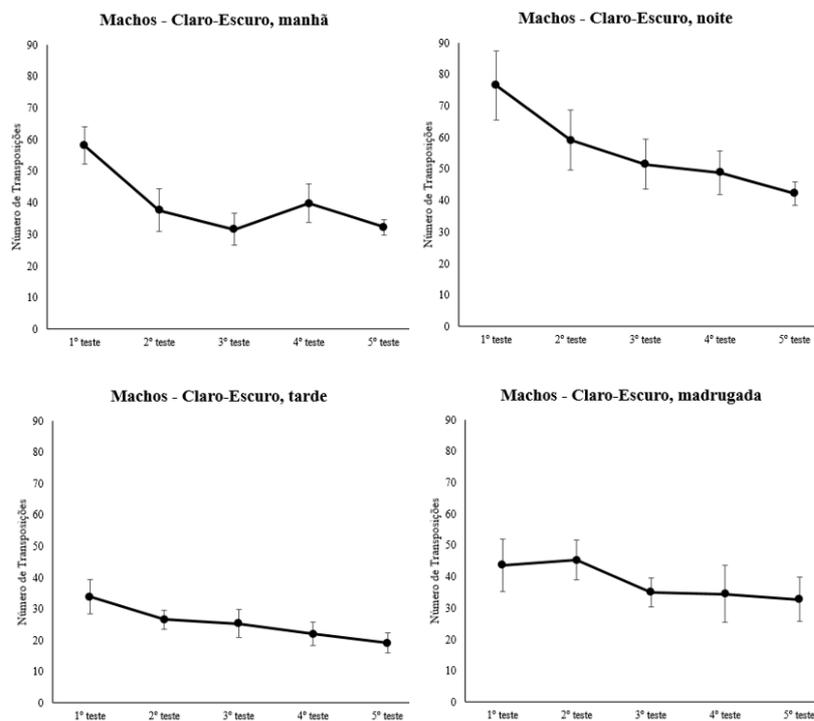
O pós-teste referente ao turno de realização do experimento indicou diferenças para o número de transposições entre os turnos: manhã x tarde ( $p = 0,011$ ), tarde x noite ( $p = 0,001$ ) e noite x madrugada ( $p = 0,044$ ).



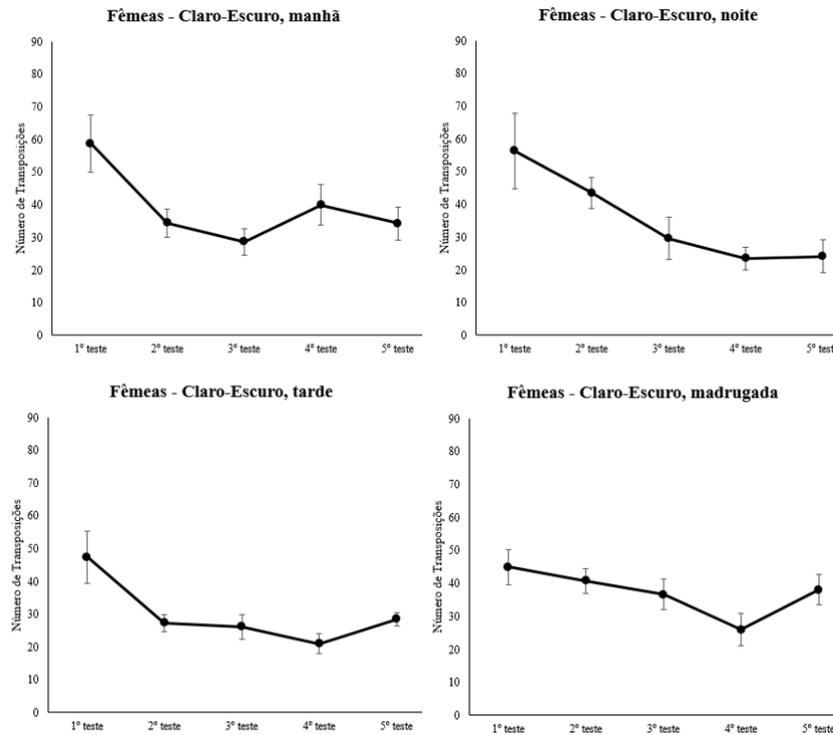
**Figura 10.** Tempo no compartimento para os grupos de machos testados no aquário claro-escuro nos diferentes turnos.



**Figura 11.** Tempo no compartimento para os grupos de fêmeas testadas no aquário claro-escuro nos diferentes turnos.

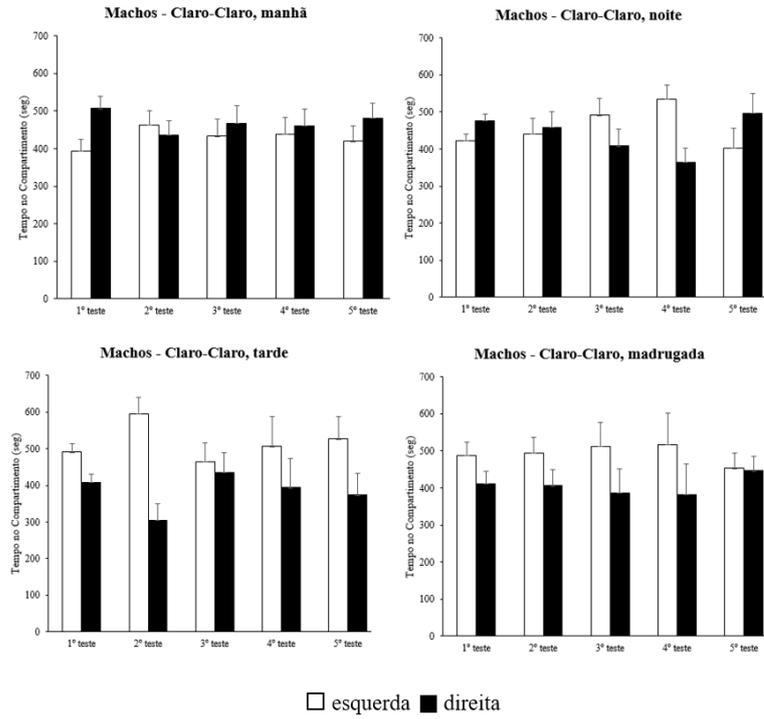


**Figura 12.** Número de transposições para os grupos de machos testados no aquário claro-escuro nos diferentes turnos.

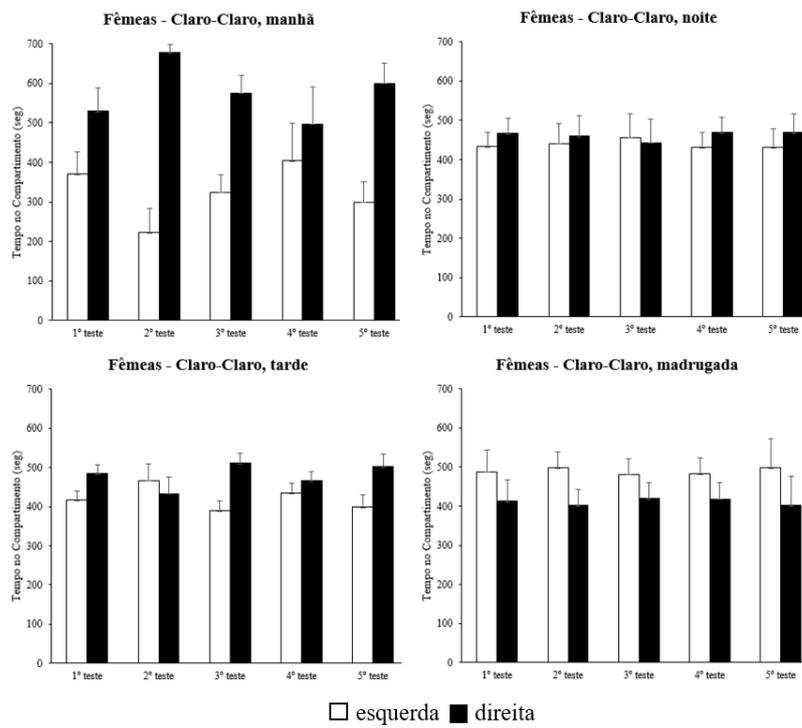


**Figura 13.** Número de transposições para os grupos de fêmeas testadas no aquário claro-escuro nos diferentes turnos.

A análise dos animais testados nos aquários totalmente brancos revelou diferenças globais no tempo de permanência para: sexo [ $F(39,200) = 12,949$ ,  $p < 0,001$ ], turno de realização do teste [ $F(39,200) = 10,023$ ,  $p < 0,001$ ] e na interação entre sexo e turno de realização do teste [ $F(39,200) = 2,711$ ,  $p = 0,046$ ]. Machos e fêmeas diferem no pós-teste para os turnos da manhã ( $p = 0,002$ ) e da noite ( $p = 0,005$ ). Para as fêmeas foram encontradas diferenças no pós-teste entre os turnos manhã x madrugada ( $p < 0,001$ ). Já para os machos a diferença foi entre manhã x noite ( $p = 0,012$ ) (figuras 14 e 15).



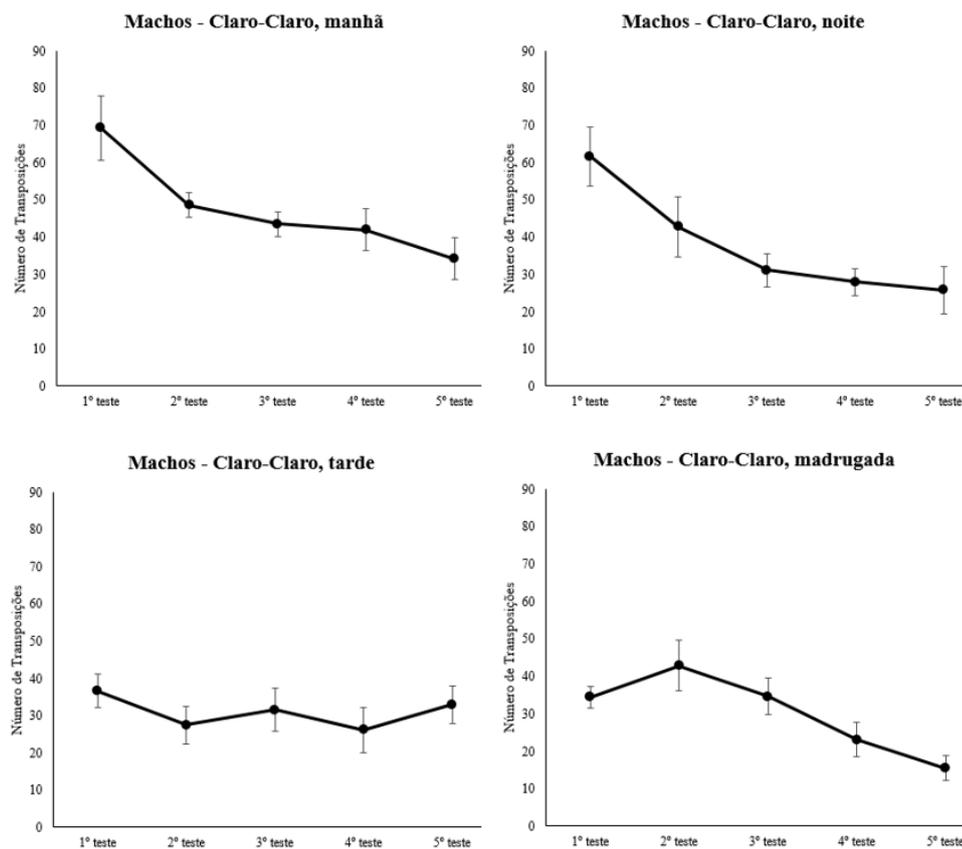
**Figura 14.** Tempo no compartimento para os grupos de machos testados no aquário claro-claro nos diferentes turnos.



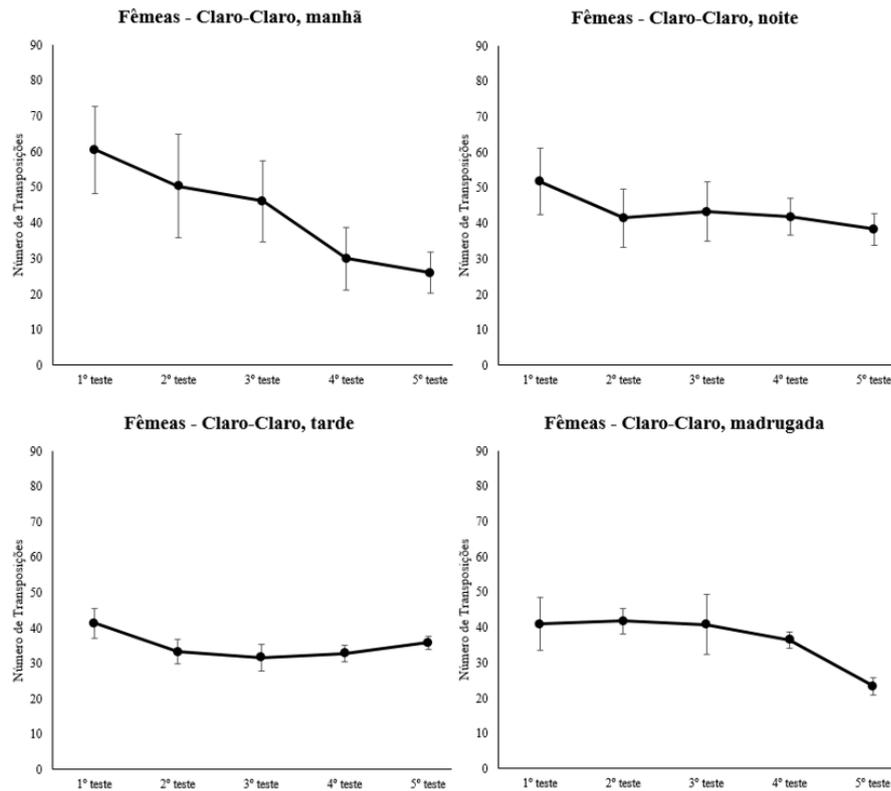
**Figura 15.** Tempo no compartimento para os grupos de fêmeas testadas no aquário claro-claro nos diferentes turnos.

Quanto ao número de transposições no aquário 100% branco, foram encontradas diferenças nas variáveis: reexposição [ $F(39,200) = 11,846$ ,  $p < 0,001$ ] e turno [ $F(39,200) = 8,012$ ,  $p < 0,001$ ], além da interação entre reexposição e turno de realização do teste [ $F(39,200) = 1,807$ ,  $p = 0,049$ ]. Na análise pós-teste as fêmeas apresentaram diferenças na reexposição entre o primeiro dia e o terceiro ( $p = 0,001$ ) e também com o quinto ( $p < 0,001$ ). Para os machos a diferença foi entre o primeiro e o quinto dia ( $p = 0,015$ ) e entre o terceiro dia e o segundo ( $p = 0,009$ ), quarto ( $p = 0,008$ ) e quinto dia ( $p < 0,001$ ) (figuras 16 e 17).

Também foram encontradas, na análise global, diferenças no pós-teste na comparação do primeiro teste (primeira exposição) do turno da manhã com os demais: tarde ( $p < 0,001$ ), noite ( $p < 0,001$ ) e madrugada ( $p < 0,001$ ). Isto se repetiu na 2ª reexposição entre manhã x noite ( $p = 0,008$ ) e manhã e madrugadas ( $p = 0,004$ ) e, também na 4ª reexposição (5º teste) entre manhã x tarde ( $p = 0,031$ ) e manhã x madrugada ( $p < 0,001$ ).



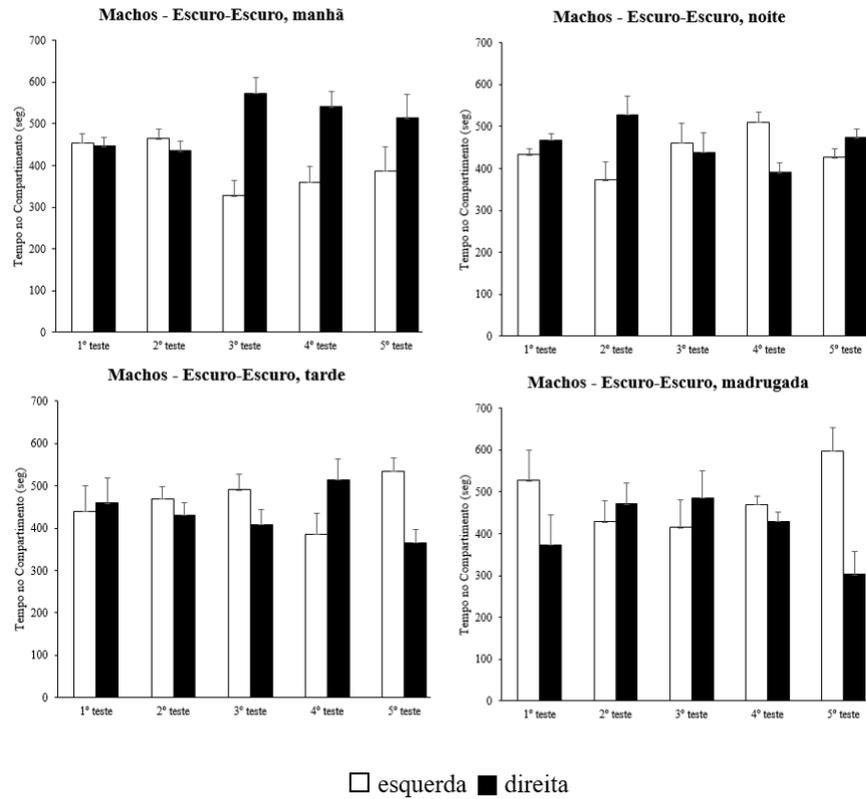
**Figura 16.** Número de transposições para os grupos de machos testados no aquário claro-claro nos diferentes turnos.



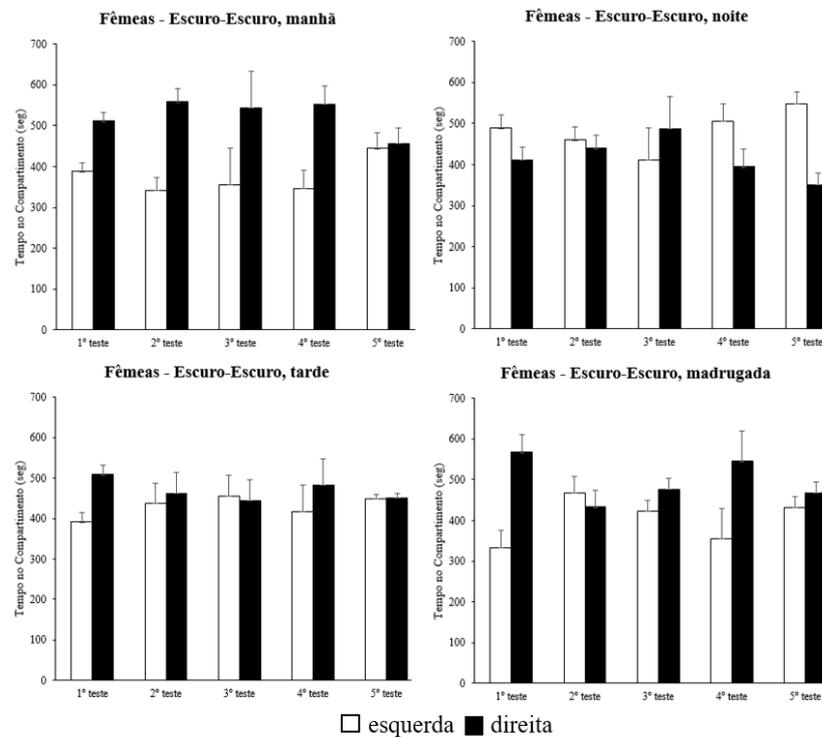
**Figura 17.** Número de transposições para os grupos de fêmeas testadas no aquário claro-claro nos diferentes turnos.

Para os animais testados nos aquários totalmente escuros, para o tempo de permanência foram encontradas diferenças apenas na variável turno [ $F(39,200) = 5,479$ ,  $p = 0,001$ ]. Para as demais não foram encontradas diferenças. A interação entre sexo e turno de teste também indicou diferença [ $F(39,200) = 3,459$ ,  $p = 0,017$ ]. Machos e fêmeas diferiram no pós-teste apenas no primeiro dia de teste ( $p = 0,046$ ), indiferente do turno (figuras 18 e 19)

O pós-teste também indicou diferenças no tempo de permanência para fêmeas, indiferente do dia entre: manhã e noite ( $p < 0,001$ ) e noite e madrugada ( $p = 0,022$ ). Para os machos esta diferença só foi encontrada entre manhã e madrugada ( $p = 0,009$ ).



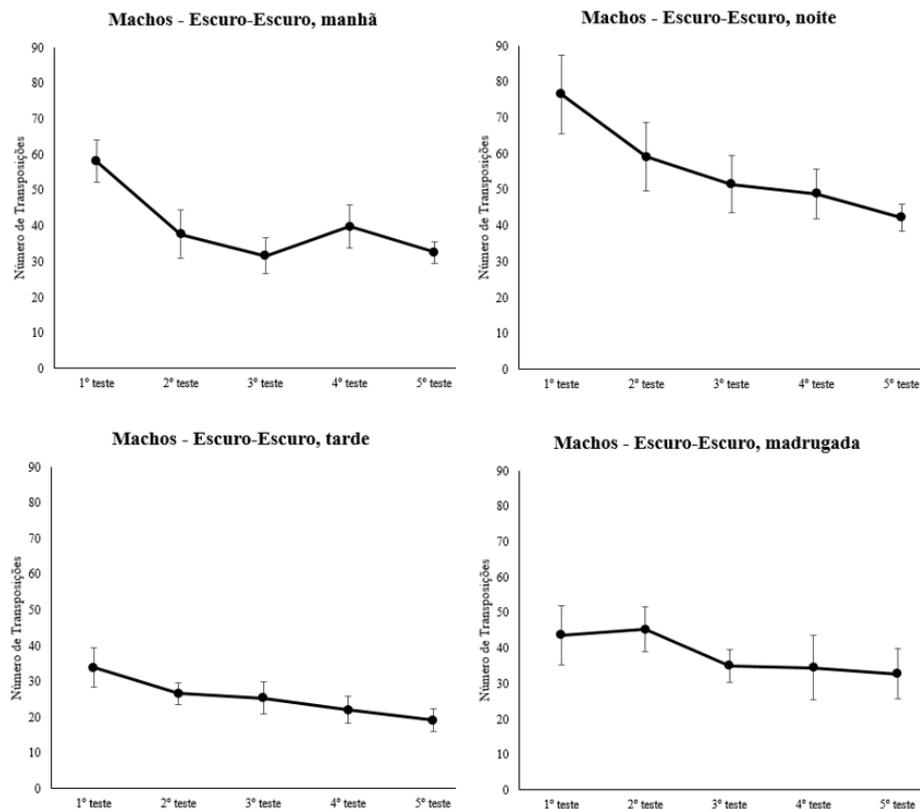
**Figura 18.** Tempo no compartimento para os grupos de machos testados no aquário escuro-escuro nos diferentes turnos.



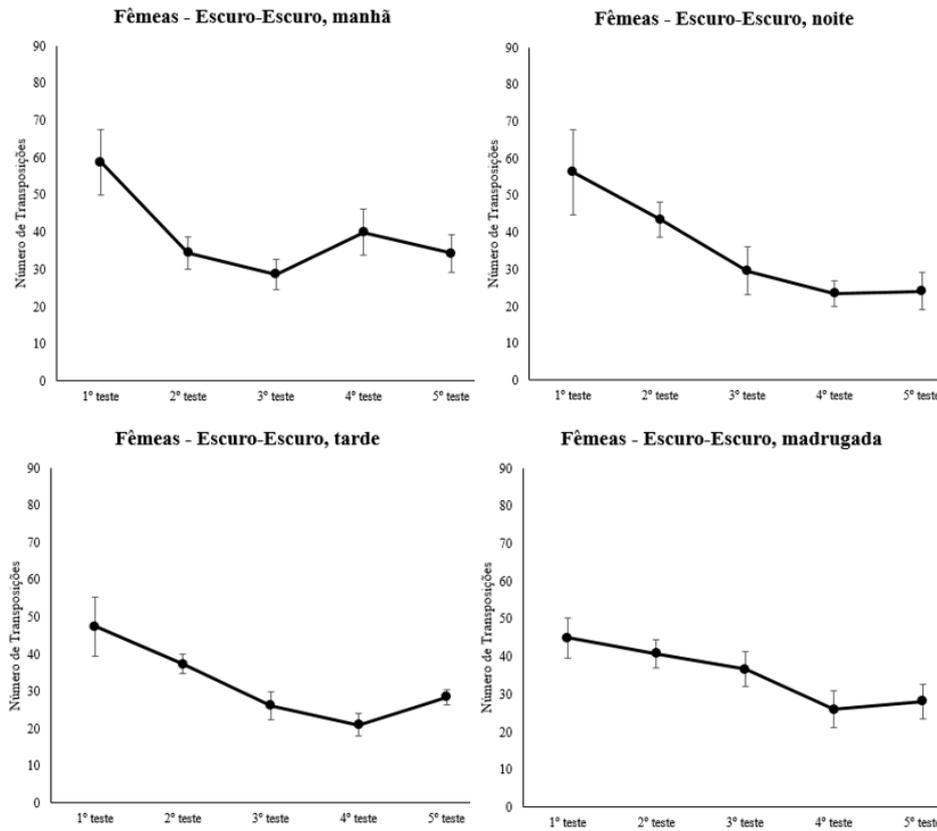
**Figura 19.** Tempo no compartimento para os grupos de fêmeas testadas no aquário escuro-escuro nos diferentes turnos.

Quanto ao número de transposições nos aquários totalmente escuros, foram encontradas diferenças nas variáveis: sexo [ $F(39,200) = 5,048$ ,  $p = 0,026$ ], reexposição [ $F(39,200) = 17,289$ ,  $p < 0,001$ ] e turno [ $F(39,200) = 15,062$ ,  $p < 0,001$ ]. A interação entre variáveis sexo e turno indicou [ $F(39,200) = 8,240$ ,  $p < 0,001$ ]. O pós-teste indicou diferenças globais entre o primeiro teste e as demais reexposições: segundo teste ( $p < 0,001$ ), terceiro teste ( $p < 0,001$ ), quarto teste ( $p < 0,001$ ) e quinto teste ( $p < 0,001$ ) (figuras 20 e 21).

Considerando apenas as fêmeas, estas diferenças ocorreram em todas as reexposições considerando o primeiro teste com o segundo ( $p < 0,001$ ), o terceiro ( $p < 0,001$ ), o quarto ( $p < 0,001$ ) e o quinto teste ( $p < 0,001$ ). Para os machos só houveram diferenças entre o primeiro dia e o terceiro ( $p < 0,001$ ), quarto ( $p < 0,001$ ) e quinto ( $p < 0,001$ ). Enquanto as fêmeas não apresentaram diferenças entre os turnos, os machos revelaram diferenças entre: manhã x tarde ( $p < 0,001$ ), manhã x noite ( $p < 0,001$ ), tarde x noite ( $p < 0,001$ ) e noite x madrugada ( $p < 0,001$ ). Machos e fêmeas diferiram significativamente apenas no turno noite ( $p < 0,001$ ) para o número de transposições.



**Figura 20.** Número de transposições para os grupos de machos testados no aquário escuro-escuro nos diferentes turnos.



**Figura 21.** Número de transposições para os grupos de fêmeas testadas no aquário escuro-escuro nos diferentes turnos.

### 3.5 Síntese dos resultados do Estudo I

A tabela 4 abaixo apresenta uma visão geral e sintética dos resultados globais encontrados no Estudo I, considerando os testes realizados e as variáveis manipuladas. Apenas os resultados com significância estatística são apresentados.

**Tabela 4.** Síntese dos principais resultados obtidos na aplicação dos testes em campo aberto e preferência claro-escuro.

Teste/Variável	Sexo	Turno	Reexposição
<b>Campo Aberto</b>	amb. periférica (fêmeas < macho)	amb. periférica (madrugada > demais) amb. central (madrugada > demais)	amb. periférica (repetição ↓)
	amb. total (fêmeas < macho)	amb. total (madrugada > demais)	amb. total (repetição ↓)
<b>Claro-Escuro</b>	transposições (fêmeas < macho)	tempo de permanência (manhã + escuro)	tempo de permanência (repetição ↓)
		transposições (todos ↓)	transposições (repetição ↓)
<b>Claro-Claro</b>	tempo de permanência (fêmeas < macho)	tempo de permanência (m: noite > manhã) (f: madrugada > manhã) transposições (todos ↓)	transposições (repetição ↓)
<b>Escuro-Escuro</b>	transposições (fêmeas < macho)	tempo de permanência (m: madrugada > manhã) (f: noite > manhã e madrug) transposições (todos ↓)	transposições (repetição ↓)

### 3.6 Discussão

Os resultados aqui encontrados nos testes tanto em campo aberto como no *set* de aquários do teste claro-escuro revelam duas respostas bastante claras: 1. Independente do teste, machos apresentam comportamento motor (ambulação e transposições) maior do que fêmeas; 2. A reexposição ao aparato faz com que este comportamento motor diminua, progressivamente do primeiro ao quinto dia de teste, indiferente do sexo.

O comportamento motor superior dos machos em comparação às fêmeas aqui parece estar associado a conceitos reprodutivos estabelecidos desde a década de 1990 para *Poecilia reticulata* (Godin & Dugatkin, 1996; Magurran. & Seghers, 1994a; Magurran & Seghers 1994b): machos forrageiam o ambiente não só por recursos energéticos mas também pela busca de fêmeas. Ao encontrá-las, estes machos podem assediar as fêmeas com mais de uma tentativa de acasalamento por minuto (Magurran & Seghers 1994b).

Esta coerção sexual dos machos sobre as fêmeas faz com que as desinteressadas em reproduzir fujam dos machos por longos períodos, o que tende a resultar em ajustes

fisiológicos para aumento da atividade locomotora e de desempenho aeróbico, mas também de gasto energético e necessidade de recursos alimentares (Killen, Croft, Salin & Darden, 2016). Em laboratório, optamos por separar machos e fêmeas em aquários-viveiros diferentes a fim de controlar o comportamento reprodutivo impedindo a resposta agressiva entre machos na disputa por fêmeas, uma vez que frequentemente as brigas provocavam mortes (Chuard et al, 2016). Assim, considerando o período de aclimação mínimo dos animais coletados e a manutenção dos mesmos no laboratório até a realização dos experimentos, é possível que a redução da atividade locomotora das fêmeas, em relação aos machos, naturalmente mais exploradores, possa ter sido influenciada pela perda, por parte das fêmeas, de parte ou total adaptação fisiológica motora existente no ambiente natural aonde o assédio não é controlado.

Além do assédio e da maior taxa de forrageio por machos, estudos da década de 1990 também demonstraram que machos mais coloridos e que se expunham mais a atividade locomotora de aproximação ao predador eram aqueles preferencialmente escolhidos pelas fêmeas para reprodução (Godin & Dugatkin, 1996).

Nesta espécie, como em muitas espécies de vertebrados, a coloração e o brilho presente nos machos representa um fenótipo de atração às fêmeas, caracterizando assim um mecanismo de seleção natural por seleção sexual. Contudo, machos mais coloridos em ambientes mais translúcidos estão mais expostos ao risco de predação (Ruell et al, 2013), daí a necessidade de associar a elevada locomoção característica dos machos com a necessidade de prevenir-se defensivamente a ambientes de menor exposição.

Outro aspecto ecológico importante, porém indiferente ao sexo está no fato das populações de *Guppy* serem divididas em dois grupos: alta predação e baixa predação (Magurran, 2005). Os indivíduos de alta predação são aqueles que estão em ambientes à jusante dos rios e coexistem com peixes predadores e, os machos tendem a ser menos coloridos (Rodd & Reznick, 1997). Já os de baixa predação são aqueles que vivem a montante dos rios ou em corpos d'água lênticos, os machos são mais coloridos e o ambiente não possui predadores (Rodd & Reznick, 1997). Os animais deste estudo se enquadram em guppies de ambientes de baixa predação, devido ambiente de coleta ser um igarapé de corpo lêntico, sem predadores e com a presença de outras poucas populações de peixes não predadores e de mesmo porte. Esta característica está de acordo com o comportamento observado nos indivíduos onde a ambulação e as transposições tornaram-se cada vez menores.

Além dos aspectos ecológicos, outras diferenças também devem ser levadas em consideração para a análise da atividade locomotora dos animais aqui estudados. Para Tran e Gerlai (2013) as diferenças individuais em grupos heterogêneos nos níveis de atividade locomotora podem interferir no seu desempenho e comportamento. Em seus experimentos, com *Zebrafish*, foi verificado que fêmeas possuem uma característica locomotora mais expressiva do que os machos no tanque de mergulho. Porém os machos apresentam essa mesma característica mais significativa no teste de campo aberto. Isto implica que machos e fêmeas podem se comportar de formas diferentes diante de determinadas tarefas, incluindo atividade exploratória, agressividade ou procura de parceiros (Tran & Gerlai, 2013).

Contudo, esta redução geral na atividade locomotora apresentada pode estar relacionada ao comportamento semelhante à ansiedade manifestado por estes animais nos primeiros testes por serem expostos a novos ambientes, o que naturalmente tende a revelar respostas de avaliação de risco entre: explorar o novo ambiente e proteger-se no desconhecido (McNaughton & Corr, 2004). A avaliação de risco em si, já representa um estado estressor, uma vez que, embora o perigo não esteja revelado, ele é possível e pode se apresentar a qualquer momento. Isto ocorre, segundo McNaughton & Corr (2004), pelo fato das memórias e emoções punitivas dos indivíduos tenderem a se sobrepor às positivas, o que revela uma superestimulação de risco.

Entre os conhecimentos acerca das bases neurocomportamentais da ansiedade, o Sistema de Inibição Comportamental parece ser um circuito importante na mediação de respostas comportamentais do tipo aproximação ou evitação frente a estas supostas situações aversivas. Associado a determinada forma de ativação do Sistema de Inibição Comportamental, têm-se o Sistema de Aproximação Comportamental e o Sistema de Luta-Fuga-Congelamento (Gray & McNaughton, 2003). O Sistema de Luta-Fuga-Congelamento, controla o comportamento do animal sempre que o seu objetivo for se retirar frente a uma situação de perigo. Sua relação com o Sistema de Inibição Comportamental não é conflitante, seu objetivo é o mesmo: a busca de um lugar seguro para o animal (Gray & McNaughton, 2003). Já o Sistema de Aproximação Comportamental está relacionado ao comportamento motivado do animal, na procura de recursos ambientais, como por exemplo, alimento (Berridge, 2004). Assim, o Sistema de Inibição Comportamental avalia situações conflitantes, processando e mediando respostas entre aproximação ou evitação (Gray & McNaughton, 2003).

Neste estudo, o primeiro dia de testes mostrou que o número de transposições e ambulações dos animais nos aparatos foram mais elevados em relação aos demais dias, provavelmente devido maior ativação do Sistema de Inibição Comportamental (Gray & McNaughton, 2003), com uma sobreposição do Sistema de Aproximação Comportamental sobre o Sistema Luta-Fuga-Congelamento. Este contexto tende a provocar um efeito ansiogênico sobre o comportamento do animal no primeiro dia de teste. Assim, instintivamente o animal tende a explorar o ambiente, ativando o Sistema de Aproximação Comportamental, mas também ativa o Sistema de Inibição Comportamental, que resulta na resposta ansiosa resultante da apreensão da possibilidade de perigo em um ambiente desconhecido (McNaughton & Corr, 2004).

O que se percebe é que ao longo dos demais dias de teste, o Sistema de Inibição Comportamental parece sofrer modificação progressiva de atuação, uma vez que, já no segundo dia, o número de transposições ou ambulações é inferior ao primeiro dia de teste, sendo esta característica mais perceptível a nos últimos dias de teste. Acredita-se que há uma elevação do efeito de aproximação (Sistema de Aproximação Comportamental) em relação ao efeito de evitação (Sistema Luta-Fuga-Congelamento). Desta forma, percebe-se uma redução do estado ansioso evidenciada pela menor ambulação, com habituação (Bear, Connors & Paradiso, 2008). Assim, a experiência obtida pelos animais no primeiro dia pela exploração do aparato-teste revela aos animais a ausência de riscos, que por sua vez resulta

progressivamente em um desinteresse na exploração do aparato por conhecimento já estabelecido.

A habituação intrassessão com redução no número de transposições e ambulação no aparato observada nos guppies também ocorre em outros peixes como os peixes-zebra no decorrer das reexposições dos animais aos testes em aquários claro-escuro (Maximino, da Silva, Gouveia Jr & Herculano, 2011). Já o inverso é obtido em peixes dourados, onde se observa um aumento dos cruzamentos, um indicativo de não habituação ao aparato, que pode ser interpretado pela tendência no aumento do comportamento exploratório em ambientes que oferecem pouco risco (Brito, 2011).

Desta maneira, para machos e fêmeas de *Guppy*, a diminuição do comportamento exploratório observado ao longo dos dias de teste aponta para um mecanismo de controle do comportamento exploratório regulado pela novidade do novo ambiente, sendo a diminuição progressiva desse tempo uma tendência a partir do momento em que o novo deixa de ser a novidade (Hughes, 1997; O'Keefe & Nadel, 1978). De acordo com teoria do mapa cognitivo, o decréscimo progressivo na exploração por animais diante de ambientes novos pode estar ligado à representação interna do ambiente que esses constroem na medida em que o ambiente é explorado, e conforme o mapa cognitivo se torna cada vez mais elaborado, um decréscimo no comportamento exploratório também ocorre (O'Keefe & Nadel, 1978).

Quanto ao tempo de permanência, os resultados apresentados no campo aberto mostram que para ambos os sexos, indiferente do turno ou do dia de reexposição a resposta ansiosa é conservada com os animais passando grande parte do tempo na periferia do aquário. Tal fato pode indicar diferenças nos tipos de medo eliciados por ambos os aparatos.

### **3.7 Conclusões**

Dado o exposto no presente estudo, pode-se concluir que guppies apresentam diferenças sexuais no comportamento em ambos os testes e diferença entre os testes, sendo sensíveis a reexposição, com capacidade de aprendizagem (habituação) ao aparato preservada e controle do ciclo circadiano sobre sua atividade. Isto pode indicar que os testes medem tipos de afeto diferentes por um lado, enquanto que variáveis biológicas relacionadas à ecologia do animal, como diferenças na atividade locomotora entre os sexos, podem controlar as diferenças encontradas.

## 4 ESTUDO II

### 4.1 Introdução

Considerando a ansiedade como uma das mais diagnosticadas e emergentes desordens psiquiátricas, novas abordagens experimentais para diagnóstico e tratamento representam estratégias válidas para maior sucesso no entendimento e terapia desta patologia (Andrade et al, 2013). Entre estas abordagens o uso de modelos animais não humanos tem permitido identificar determinados padrões conservados evolutivamente (Stewart & Kalueff, 2014).

Algumas destas abordagens experimentais envolvem o uso de modelos animais vertebrados, com destaque aos mamíferos roedores. Neste aspecto, muitos modelos experimentais utilizados em roedores já foram adaptados ou inspiraram modelos equivalentes para peixes, como por exemplo: campo aberto (Walsh-Monteiro et al., 2014; Riehl et al., 2011), esQUIVA inibitória (Garção & Mattioli, 2009), preferência claro-escuro (Maximino et al, 2011; Maximino et al., 2010; Blaser & Peñalosa, 2011) e deslocamento vertical (Bencan et al, 2009; Levin et al, 2007). Contudo, o labirinto em cruz elevado é um destes modelos que ainda não possui equivalência para peixes.

O labirinto em cruz elevado foi criado por Handley e Mithiani (1984) e validado para ratos por Pellow, Chopin, File e Briley (1985) e para camundongos por Lister (1990). Sua estrutura consiste em um aparato geralmente de madeira, suspenso do solo com quatro braços, sendo dois abertos e outros dois, opostos entre si, com paredes suspensas nas laterais e no fundo (Pellow et al., 1985). Quando roedores são colocados no centro do aparato para iniciar o teste, o comportamento típico consiste em passar a maior parte da sessão de teste, cerca de 80%, nos braços fechados, também entrando um maior número de vezes nestes braços. Tal comportamento é julgado como um índice confiável de ansiedade, no qual a exploração e tempo nos braços abertos é inversamente correspondente a ansiedade (Pellow et al., 1985). Drogas ansiolíticas, como benzodiazepínicos e barbitúricos, aumentam significativamente o número de entradas e o tempo gasto nos braços abertos, assim como substâncias ansiogênicas, como cafeína e anfetamina, reduzem as entradas e o tempo gasto nos braços abertos (Hogg, 1996; Pellow & File, 1986).

O modelo piscino de deslocamento vertical em aquário transparente representa um procedimento experimental que se aproxima do labirinto em cruz elevado, por mensurar níveis de ansiedade e medo, segundo a escolha do animal pela camada mais superficial ou profunda da coluna d'água. Em *Zebrafish*, verificou-se uma tendência de escolha ao fundo em estados de medo (Gerlai et al, 2000). Para Levin e colaboradores (2007), a escolha pelo fundo no teste de deslocamento vertical, equivale à preferência pelas paredes no teste de campo aberto e pelos braços fechados no labirinto em cruz elevado, o que, segundo os autores, sugere que este seja um bom índice de mensuração de ansiedade. Em trabalho com *Zebrafish*, onde propomos este modelo (Walsh-Monteiro et al., 2016 - submetido) tivemos evidências que o padrão de exploração desta espécie e o efeito de clonazepam e álcool apresenta semelhanças com os dados do labirinto em cruz elevado em roedores.

De forma similar, o teste de deslocamento vertical foi utilizado para a verificação do efeito de drogas, ansiolíticas e sedativas, onde Bencan e colaboradores (2009) mostraram que clordiazepóxido e diazepam, em altas doses, geraram efeitos sedativos e, em baixas doses, somente o primeiro induz efeito ansiolítico.

Desta forma, nesta fase do estudo foi proposto o desenvolvimento para o guppy, um labirinto em cruz com rampa, inspirado no labirinto em cruz elevado de roedores e já testado no *Zebrafish*, considerando o comportamento de evitação tipicamente apresentado por peixes a ambientes novos e rasos e as possíveis implicações fisiológicas e farmacológicas relacionadas.

#### **4.2 Objetivos específicos**

- Verificar a sensibilidade de guppies ao teste de labirinto em cruz com rampa em diferentes tempos de sessão e altura da coluna d'água;
- Verificar o efeito da reexposição de guppies ao teste de labirinto em cruz com rampa em diferentes intervalos de tempo;

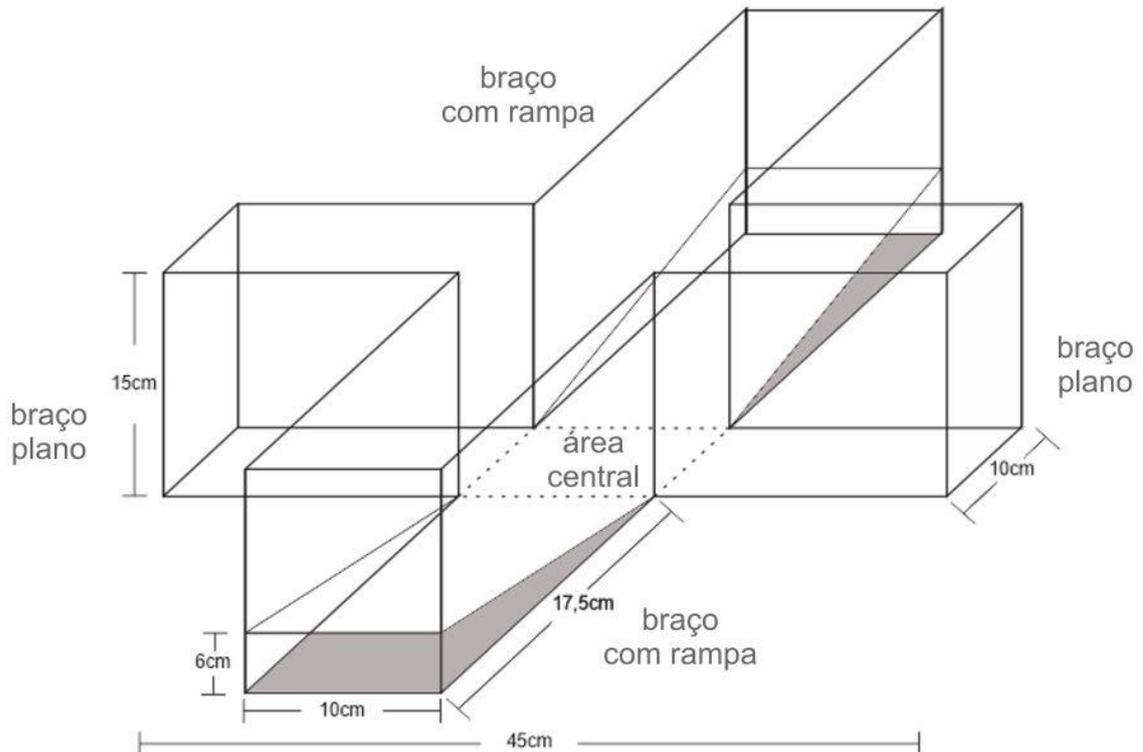
- Determinar o efeito da exposição aguda de drogas sobre guppies expostos ao teste de labirinto em cruz com rampa, e
- Comparar se ocorre dimorfismo sexual nas respostas comportamentais encontradas.

### **4.3 Aparatos e procedimentos**

#### **4.3.1 LABIRINTO EM CRUZ COM RAMPA**

Para esta fase do estudo foram utilizados aquários em labirinto em cruz medindo 45cm de comprimento total por 10cm de largura nos braços. Cada um dos quatro braços possuía 17,5cm de comprimento, de maneira que houvesse um compartimento central (área central, sem paredes) de interseção entre os braços medindo 10x10cm. O aquário possuía 15cm de altura.

Dois braços opostos possuíam rampas partindo do início do braço (fim da área central e início do braço), terminando na parede de fundo do referido braço. A inclinação da rampa era de  $18^{\circ}66'$ , estando assim a uma altura de 6cm em relação ao piso na parede de fundo do braço (figura 22). Os outros dois braços opostos não apresentavam rampas, sendo classificados como braços planos.



**Figura 22.** Desenho esquemático do aquário em cruz utilizado nos testes de labirinto em cruz com rampa.

O teste inicia com a inserção do animal na área central do labirinto, seguido de exploração livre pelo tempo de sessão.

#### 4.3.2 GRUPOS EXPERIMENTAIS

##### 4.3.2.1 Sensibilidade ao aparato

Considerando que a expectativa deste estudo é estabelecer um novo protocolo experimental para peixes que seja equivalente ao Labirinto em Cruz Elevado (LCE) para roedores, inicialmente foram realizados testes de identificação de equivalências, para isso, as variáveis utilizadas, foram: altura da coluna d'água (que influencia diretamente na altura da lâmina d'água mais próxima da borda da rampa, tornando-as mais rasa ou mais profunda) e

tempo de teste por sessão. Desta forma, os grupos formados (n=6; sexo masculino e sexo feminino), foram (tabela 5):

**Tabela 5.** Descrição dos grupos experimentais para verificação do nível de sensibilidade dos animais segundo a altura da coluna d'água e o tempo de realização do teste (n=6; n total = 108).

<b>Sigla do grupo</b>	<b>Descrição do grupo (n=6)</b>
7cm-5min	Macho, 7cm de coluna d'água e 5 minutos de teste Fêmea, 7cm de coluna d'água e 5 minutos de teste
7cm-10min	Macho, 7cm de coluna d'água e 10 minutos de teste Fêmea, 7cm de coluna d'água e 10 minutos de teste
7cm-15min	Macho, 7cm de coluna d'água e 15 minutos de teste Fêmea, 7cm de coluna d'água e 15 minutos de teste
8cm-5min	Macho, 8cm de coluna d'água e 5 minutos de teste Fêmea, 8cm de coluna d'água e 5 minutos de teste
8cm-10min	Macho, 8cm de coluna d'água e 10 minutos de teste Fêmea, 8cm de coluna d'água e 10 minutos de teste
8cm-15min	Macho, 8cm de coluna d'água e 15 minutos de teste Fêmea, 8cm de coluna d'água e 15 minutos de teste
10cm-5min	Macho, 10cm de coluna d'água e 5 minutos de teste Fêmea, 10cm de coluna d'água e 5 minutos de teste
10cm-10min	Macho, 10cm de coluna d'água e 10 minutos de teste Fêmea, 10cm de coluna d'água e 10 minutos de teste
10cm-15min	Macho, 10cm de coluna d'água e 15 minutos de teste Fêmea, 10cm de coluna d'água e 15 minutos de teste

#### 4.3.2.2 Reexposição ao aparato

Após a determinação do tempo de sessão teste e altura da coluna d'água que equivalha ao que se obtém no LCE, foram realizados testes para verificar se a reexposição do animal ao teste apresenta algum tipo de resposta de habituação, modificação ou manutenção comportamental em relação ao comportamento manifestado à primeira exposição experimental.

Para tal, foram formados novos grupos experimentais (n=6, para ambos os sexos) para a realização de cinco exposições em diferentes intervalos entre as sessões (tabela 6). Os grupos formados nesta fase, foram:

**Tabela 6.** Descrição dos grupos experimentais para verificação do efeito da resposta após a reexposição do animal ao aparato por cinco tentativas em diferentes intervalos de tempo (n=6; n total = 48).

<b>Sigla do grupo</b>	<b>Descrição do grupo</b>
30min (n=12)	Macho, Reteste em intervalos de 30 minutos Fêmea, Reteste em intervalos de 30 minutos
60min (n=12)	Macho, Reteste em intervalos de 60 minutos Fêmea, Reteste em intervalos de 60 minutos
120min (n=12)	Macho, Reteste em intervalos de 120 minutos Fêmea, Reteste em intervalos de 120 minutos
24h (n=12)	Macho, Reteste em intervalos de 24 horas Fêmea, Reteste em intervalos de 24 horas

#### 4.3.2.3 Efeito de drogas

A terceira e última fase de testes foi associada à verificação do efeito agudo de drogas sobre o comportamento dos animais. Para tal, drogas de diferentes efeitos neurobiológicos, em diferentes variações de concentração foram administradas por via hídrica (Magno, Fontes, Gonçalves & Gouveia Jr, 2015).

As drogas foram diluídas em água filtrada e pré-tratada no laboratório para uso dos peixes. Em seguida, os animais eram expostos, por cinco minutos, à 200mL desta solução de diluição da droga em um béquer de vidro de 500mL. As concentrações farmacológicas utilizadas foram as mesmas apresentadas por Magno e colaboradores (2015).

Considerando que as fêmeas possuem maior massa corporal que os machos, foram utilizadas fêmeas com o dobro do peso médio dos machos daquele grupo de exposição à droga e, estas receberam concentrações também dobradas de drogas, para fins de equalização da exposição farmacológicas nos dois sexos (tabela 7).

Imediatamente após a exposição às drogas os animais eram conduzidos ao teste. Assim como nos grupos testados anteriormente, foram testados machos e fêmeas em grupos separados (n=6). Os grupos testados, foram:

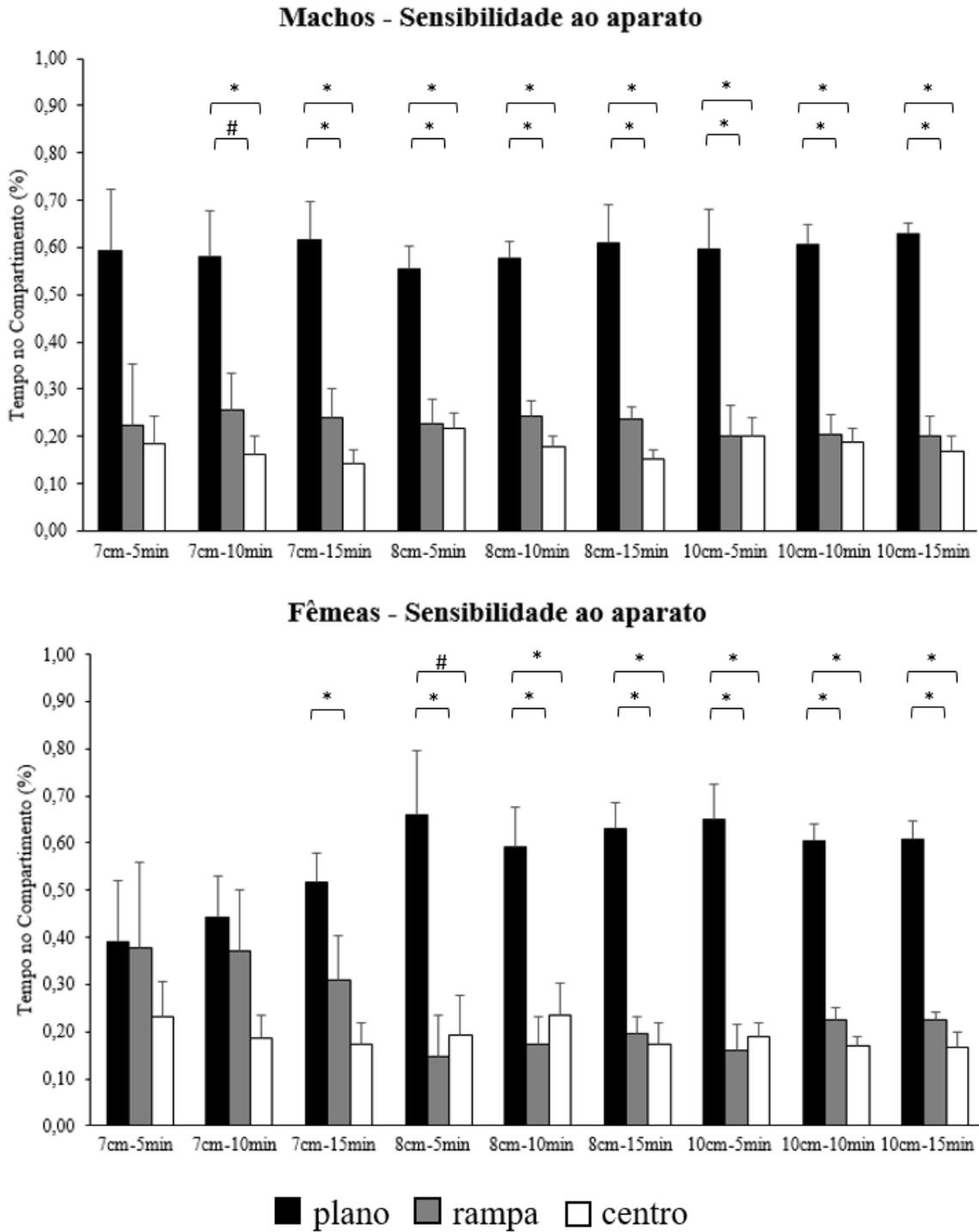
**Tabela 7.** Descrição dos grupos experimentais expostos por 5 minutos as drogas e, posterior realização do teste no labirinto em cruz com rampa (n=6; n total = 228).

<b>Uso clínico</b>	<b>Droga</b>	<b>Doses (mg/L)</b>
Controle (n=12)	-	Macho: controle negativo Fêmea: controle positivo
Depressor (n=48)	Etanol	Macho: 0,25; 0,50; 1,00; 2,00 Fêmea: 0,50; 1,00; 2,00; 4,00
Ansiolítico (n=36)	Clonazepam	Macho: 0,0005; 0,0015; 0,0030 Fêmea: 0,0010; 0,0030; 0,0060
Antidepressivos (n=96)	Fluoxetina	Macho: 0,50; 1,00; 2,00; 3,00 Fêmea: 1,00; 2,00; 4,00; 6,00
	Imipramina	Macho: 0,25; 0,50; 1,00; 2,00 Fêmea: 0,50; 1,00; 2,00; 4,00
Estimulante (n=36)	Cafeína	Macho: 2,50; 5,00; 10,00 Fêmea: 5,00; 10,00; 20,00

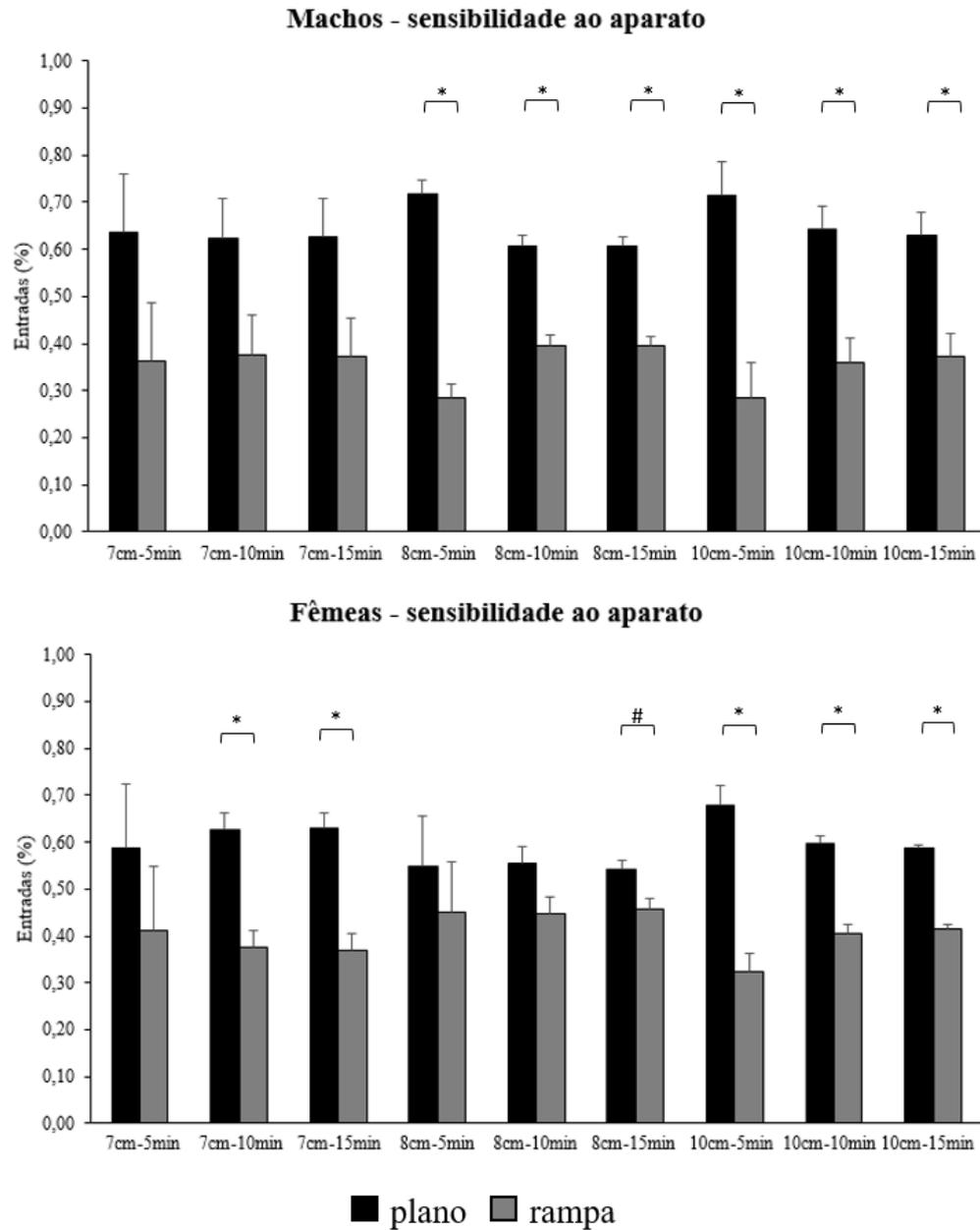
## 4.4 Resultados

### 4.4.1 SENSIBILIDADE AO APARATO

O estudo inicial com o labirinto em cruz com rampa não revelou diferenças estatísticas significativas tanto para o tempo de permanência nos compartimentos quanto para as entradas nos braços para as variáveis: sexo, altura da coluna d'água e tempo de sessão de teste. Também não foram encontradas interações entre estas variáveis. Apenas a análise por ANOVA de uma via revelou diferenças entre as variáveis intragrupos, tanto para tempo de permanência nos compartimentos ou para os percentuais de entradas nos braços para a maioria dos grupos testados (figuras 23 e 24).



**Figura 23.** Tempo no compartimento para os grupos de machos e fêmeas testados no labirinto em cruz com rampa em diferentes alturas de coluna d'água e de tempos de sessão. Legenda: #,  $p \leq 0,05$ ; \*,  $p \leq 0,01$ .



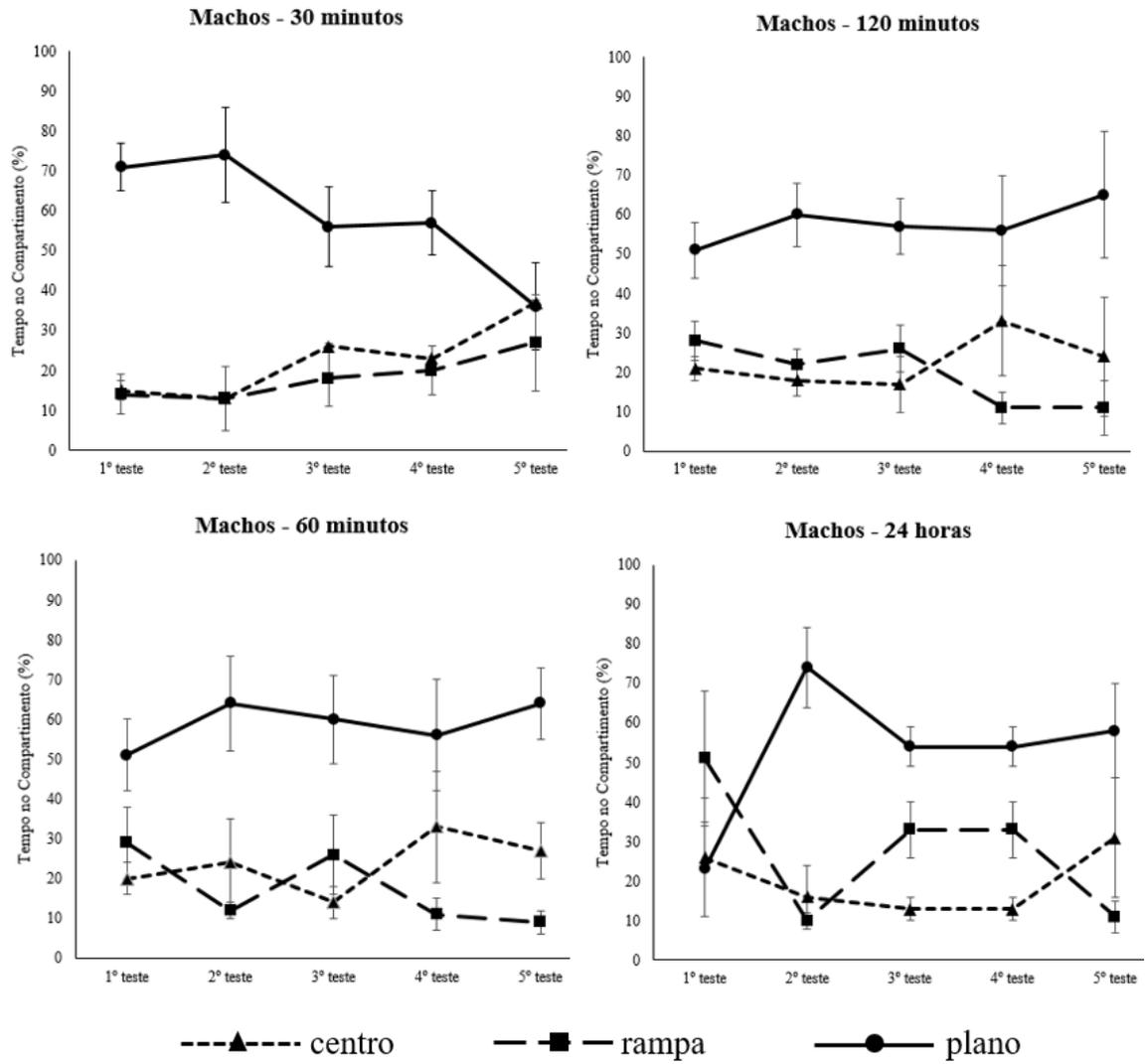
**Figura 24.** Percentual de entradas para os grupos de machos e fêmeas testados no labirinto em cruz com rampa em diferentes alturas de coluna d'água e de tempos de sessão. Legenda: #,  $p \leq 0,05$ ; \*,  $p \leq 0,01$ .

#### 4.4.2 REEXPOSIÇÃO AO APARATO

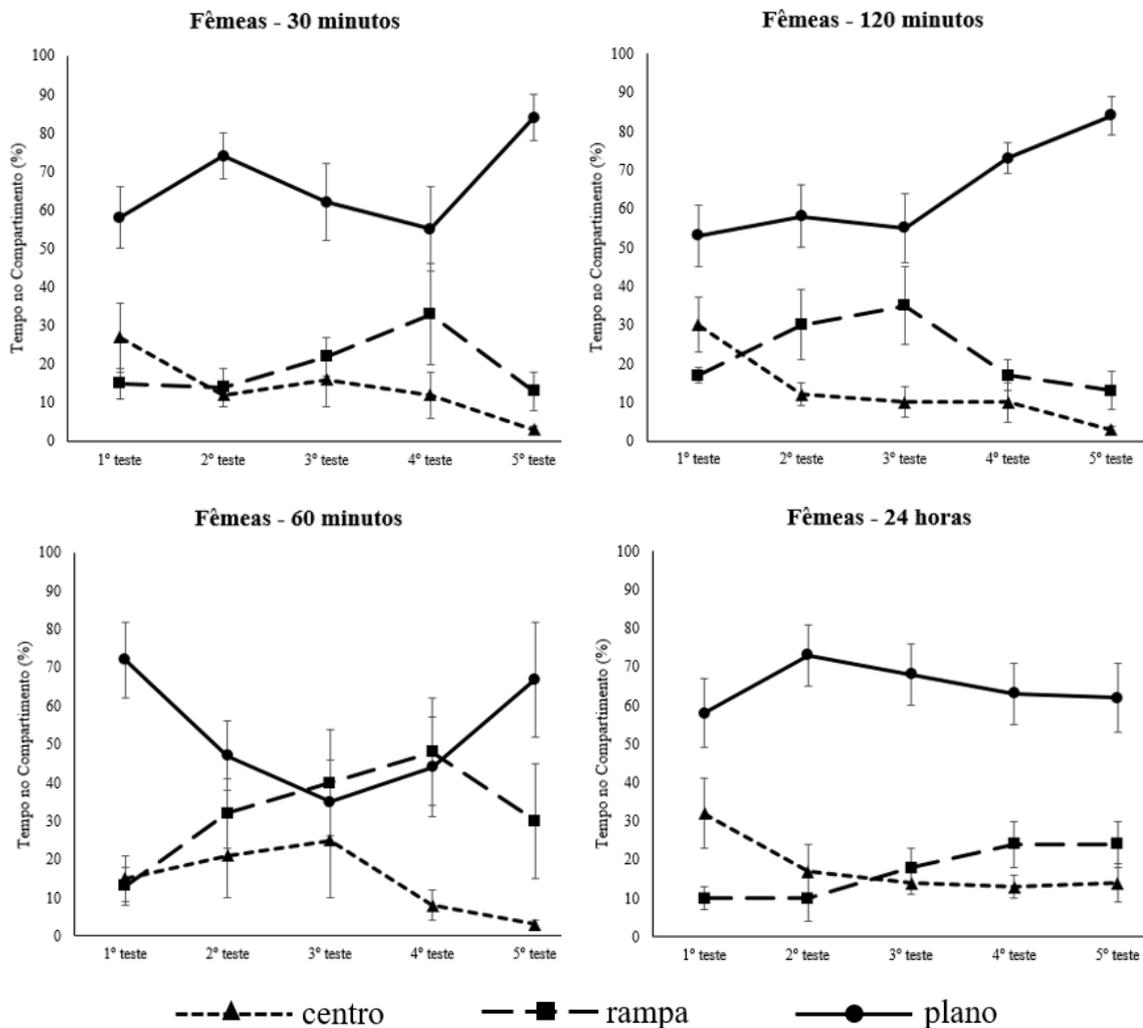
Após a determinação da sensibilidade da espécie ao labirinto em cruz com rampa, os animais foram reexpostos cinco vezes ao aparato, com duração de 5 minutos para cada sessão-teste e uma altura de coluna d'água de 8cm, em diferentes intervalos de tempo. Desta análise, não foram encontradas diferenças nas três variáveis isoladas: sexo, tempo de intervalo entre as sessões e reexposições para a variável tempo na rampa. Contudo, diferenças foram encontradas nas interações entre sexo e tempo de intervalos [ $F(39,200) = 2,592$ ,  $p = 0,049$ ] e sexo e reexposições [ $F(39,200) = 3,666$ ,  $p = 0,007$ ]. O pós-teste indica diferenças para as fêmeas nos grupos testados nos intervalos de 60 minutos e 24 horas ( $p = 0,017$ ). Além disso, machos e fêmeas diferiram para o tempo despendido nos braços com rampa nos grupos com intervalos de 60 minutos ( $p = 0,015$ ). Também foram encontradas diferenças entre machos e fêmeas, para todos os intervalos no primeiro ( $p = 0,004$ ) e quarto teste ( $p = 0,037$ ) (figuras 25 e 26).

Nenhuma diferença foi encontrada no tempo de permanência nos braços planos.

Para o tempo de permanência na área central do labirinto, foram encontradas diferenças apenas para a interação sexo e reexposição [ $F(39,200) = 3,607$ ,  $p = 0,007$ ]. No pós-teste tais diferenças foram encontradas entre o primeiro e o quinto teste ( $p = 0,004$ ) para as fêmeas. Para os machos não foram encontradas diferenças.



**Figura 25.** Tempo no compartimento para os grupos de machos reexpostos no labirinto em cruz com rampa e testados em diferentes intervalos de tempo.



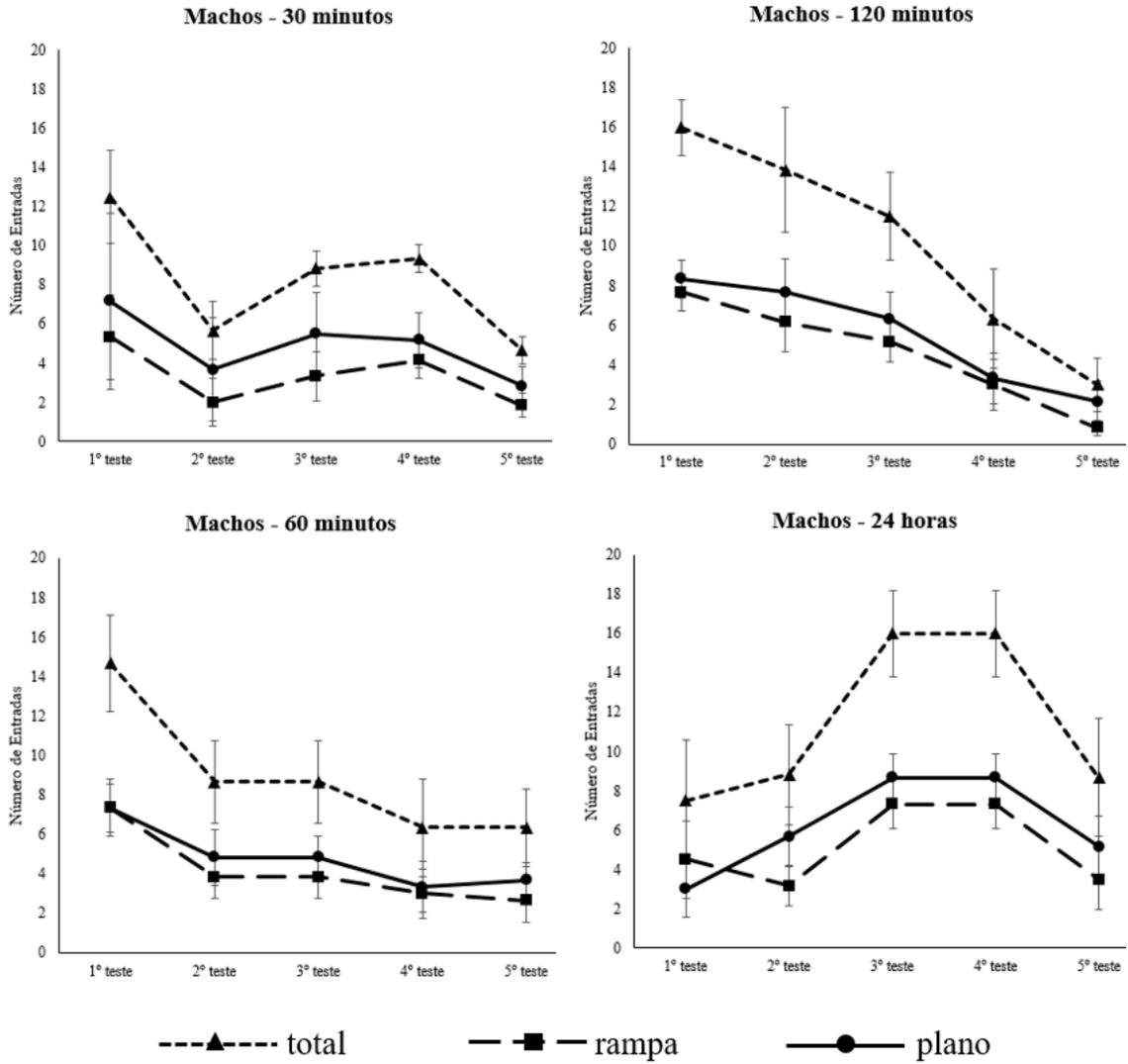
**Figura 26.** Tempo no compartimento para os grupos de fêmeas reexpostas no labirinto em cruz com rampa e testados em diferentes intervalos de tempo.

Foram encontradas diferenças no número de entradas nos braços planos segundo a reexposição ao labirinto [ $F(39,200) = 4,292$ ,  $p = 0,002$ ]. Também foram encontradas diferenças na interação entre a reexposição e o tempo de intervalo entre sessões [ $F(39,200) = 2,515$ ,  $p = 0,004$ ] (figuras 27 e 28). No pós-teste, fêmeas diferem nas reexposições entre o primeiro e quinto teste ( $p = 0,033$ ), assim como os machos ( $p = 0,045$ ). Para ambos os sexos, quando analisados conjuntamente, são encontradas diferenças nas reexposições para intervalos de 120 minutos entre: primeiro e quarto ( $p = 0,014$ ), primeiro e quinto ( $p < 0,001$ ) e segundo e quinto teste ( $p = 0,002$ ).

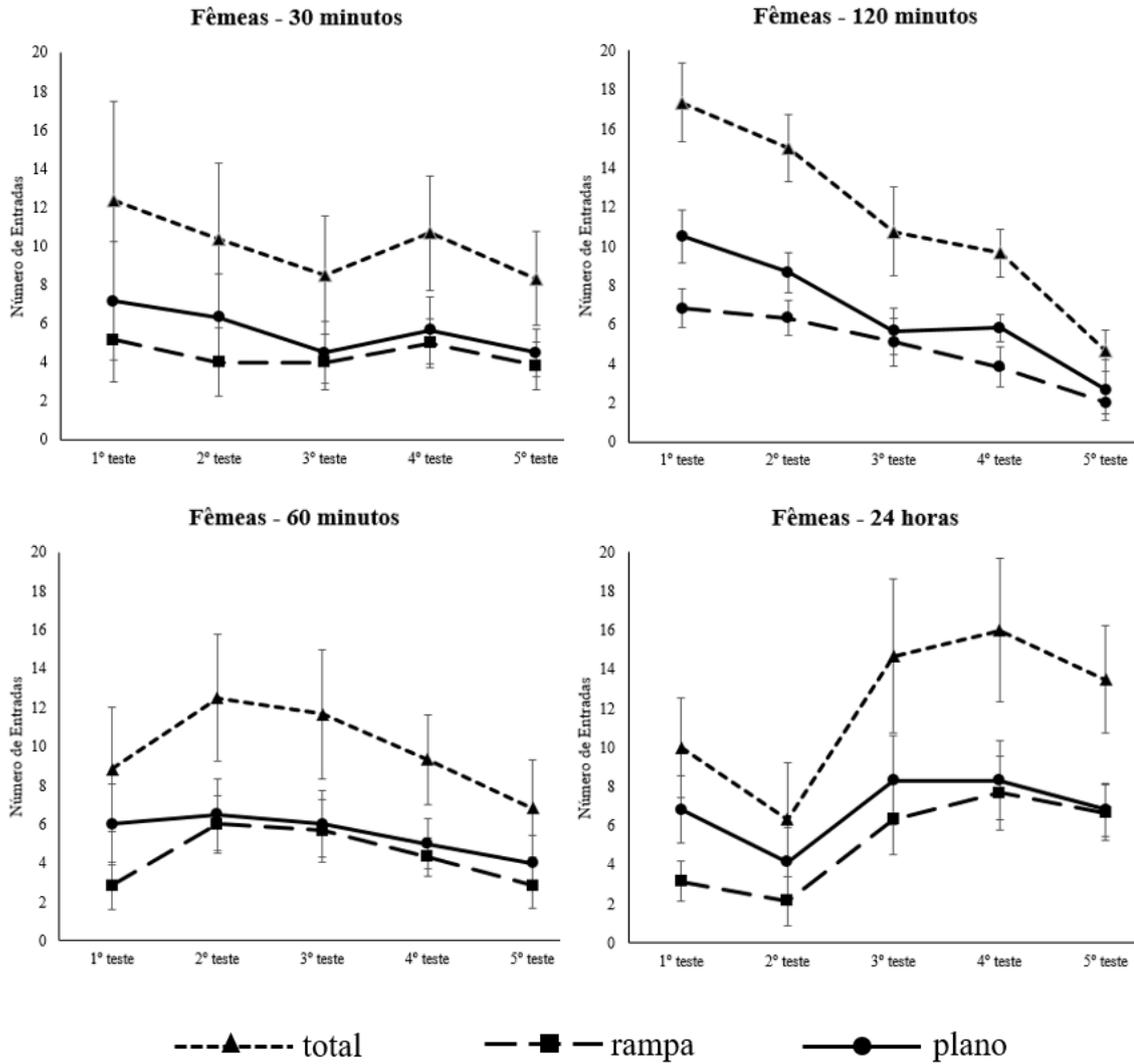
Quanto ao número de entradas nos braços com rampa, foram encontradas diferenças na reexposição [ $F(39,200) = 3,974$ ,  $p = 0,004$ ] e na interação entre reexposições e intervalos

de sessão [ $F(39,200) = 2,907$ ,  $p = 0,001$ ]. No pós-teste, machos diferem nas reexposições entre o primeiro e segundo ( $p = 0,042$ ) e primeiro e quinto teste ( $p < 0,001$ ). Para fêmeas não foram encontradas diferenças. Analisando conjuntamente ambos os sexos, são encontradas diferenças nas entradas nos braços com rampa para os grupos testados com intervalos de 120 minutos entre os testes para o primeiro e quarto ( $p = 0,028$ ), primeiro e quinto ( $p < 0,001$ ) e segundo e quinto teste ( $p = 0,002$ ). Também foram encontradas diferenças entre os grupos testados com intervalos de 120 minutos e 24 horas no primeiro teste ( $p = 0,045$ ), segundo ( $p = 0,032$ ), quarto ( $p = 0,038$ ) e quinto teste ( $p = 0,026$ ).

Assim como para os braços planos e com rampa, o número de entradas totais também revelou diferenças para a reexposição [ $F(39,200) = 4,439$ ,  $p = 0,002$ ] e a interação entre reexposições e intervalos de sessão [ $F(39,200) = 2,913$ ,  $p < 0,001$ ]. No pós-teste para os machos existe diferença na reexposição entre o primeiro e o quinto ( $p = 0,003$ ) e o terceiro e o quinto teste ( $p = 0,03$ ). Para ambos os sexos, os grupos testados com intervalos de 120 minutos entre sessões apresentaram diferenças entre o primeiro e quarto ( $p = 0,012$ ) e primeiro e quinto teste ( $p < 0,001$ ). Também foram encontradas diferenças no número total de entradas entre 120 minutos e 24 horas para o primeiro ( $p = 0,019$ ), quarto ( $p = 0,029$ ) e quinto teste ( $p = 0,038$ ).



**Figura 27.** Número de entradas para os grupos de machos reexpostos no labirinto em cruz com rampa e testados em diferentes intervalos de tempo.



**Figura 28.** Tempo no compartimento para os grupos de fêmeas reexpostas no labirinto em cruz com rampa e testados em diferentes intervalos de tempo.

#### 4.4.3 EFEITO DE DROGAS

O estudo farmacológico revelou que os grupos expostos ao álcool revelaram diferenças no tempo de permanência nos braços planos para as variáveis: sexo [ $F(9,50) = 4,214$ ,  $p = 0,045$ ], dose [ $F(9,50) = 2,878$ ,  $p = 0,032$ ] e a interação entre sexo e dose de droga [ $F(9,50) = 7,193$ ,  $p < 0,001$ ]. No pós-teste, fêmeas diferiram entre as doses 2 e 4mg/L ( $p = 0,001$ ), já os machos entre 0,25 e 0,50 ( $p = 0,003$ ) e 0,25 e 1mg/L ( $p = 0,003$ ). Já a

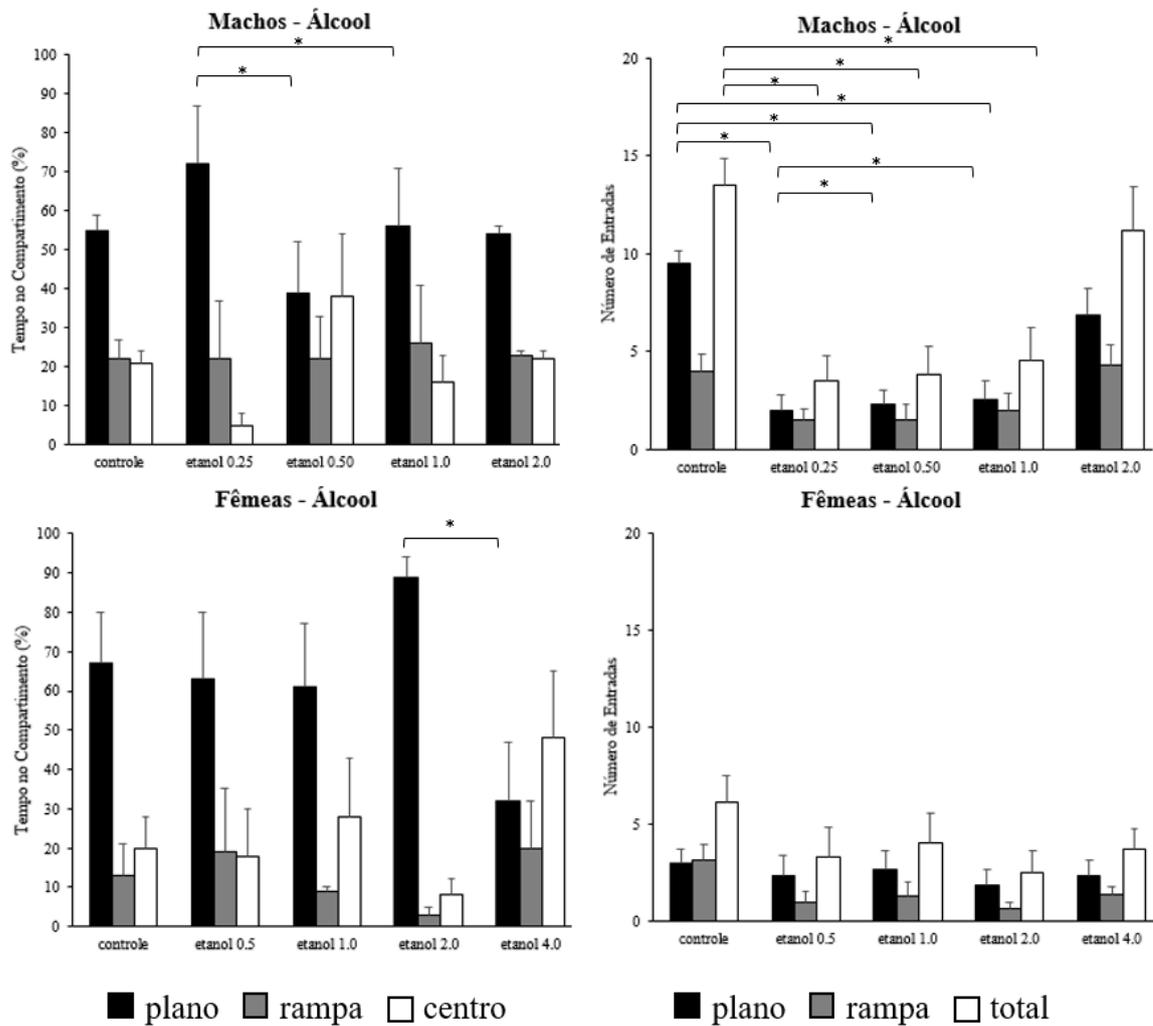
comparação entre machos e fêmeas indicou diferenças no pós-teste entre as doses equivalentes 0,50 e 1 ( $p = 0,002$ ) e 1 e 2mg/L ( $p < 0,001$ ), respectivamente (figura 29).

Para a variável tempo de permanência nos braços com rampa, diferenças foram encontradas apenas para a variável sexo [ $F(9,50) = 4,763$ ,  $p = 0,034$ ], sendo esta diferença entre machos e fêmeas observada no pós-teste ( $p = 0,034$ ). Não foram encontradas diferenças no tempo de permanência na área central do aparato para os animais expostos ao álcool.

Para o número de entradas nos braços planos diferenças foram encontradas para: sexo [ $F(9,50) = 27,224$ ,  $p < 0,001$ ], dose [ $F(9,50) = 8,807$ ,  $p < 0,001$ ] e a interação sexo e dose [ $F(9,50) = 5,575$ ,  $p < 0,001$ ]. No pós-teste para os machos foram encontradas diferenças entre o controle e as doses: 0,25 ( $p < 0,001$ ), 0,50 ( $p < 0,001$ ) e 1mg/L ( $p < 0,001$ ), além das doses 0,25 e 2,0 ( $p = 0,002$ ) e 0,50 e 2,0 ( $p = 0,031$ ). Machos e fêmeas diferiram no pós-teste para as entradas nos braços planos no controle ( $p < 0,001$ ) e na dose mais alta ( $p < 0,001$ ).

O número de entradas nos braços com rampa para os animais expostos ao álcool indicou diferenças entre as variáveis: sexo [ $F(9,50) = 12,396$ ,  $p < 0,001$ ] e dose [ $F(9,50) = 3,443$ ,  $p = 0,015$ ]. Na análise global, machos e fêmeas diferem no pós-teste ( $p = 0,001$ ). Além disso, a análise de todos indivíduos, indiferente do sexo, mostram diferenças entre o controle e a dose mais baixa ( $p = 0,01$ ).

Assim como para os braços planos, o total de entradas também revelou diferenças para: sexo [ $F(9,50) = 23,459$ ,  $p < 0,001$ ], dose [ $F(9,50) = 7,114$ ,  $p < 0,001$ ] e a interação sexo e dose [ $F(9,50) = 2,737$ ,  $p = 0,039$ ]. O pós-teste revelou diferenças para os machos entre o controle e as doses 0,25 ( $p < 0,001$ ), 0,50 ( $p = 0,002$ ) e 1mg/L ( $p = 0,019$ ) e, entre as doses 0,25 e 2,0 ( $p = 0,003$ ). Ainda no pós-teste, machos e fêmeas diferiram nas entradas total entre controle ( $p < 0,001$ ) e as doses submáxima ( $p = 0,022$ ) e máxima ( $p < 0,001$ ).



**Figura 29.** Tempo no compartimento e número de entradas para os grupos de machos e fêmeas testados no labirinto em cruz com rampa em diferentes concentrações de álcool. Legenda: \*,  $p \leq 0,01$ .

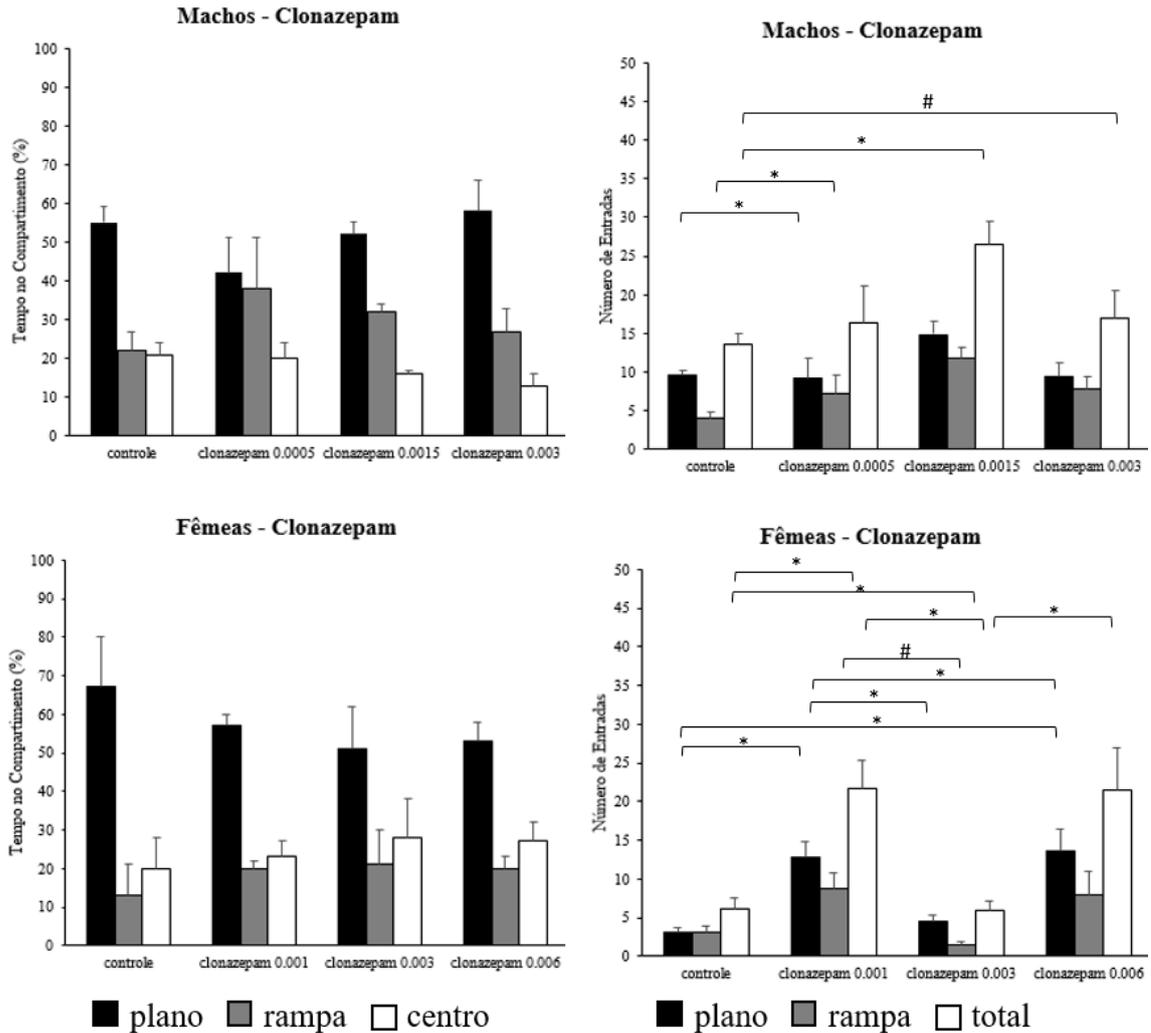
No estudo de exposição ao clonazepam, não foram encontradas diferenças quanto ao sexo ou as doses utilizadas para as análises relacionadas ao tempo de permanência nos compartimentos (braços planos, braços com rampa ou área central do labirinto). Já para o número de entradas nos compartimentos, diferenças foram encontradas (figura 30).

O número de entradas nos braços planos diferiu quanto ao sexo [ $F(9,50) = 13,182$ ,  $p < 0,001$ ], dose [ $F(9,50) = 7,839$ ,  $p < 0,001$ ] ou a interação sexo e dose [ $F(9,50) = 7,918$ ,  $p < 0,01$ ]. No pós-teste fêmeas diferiram entre controle e 0,001 ( $p < 0,001$ ) e, controle e 0,006mg/L ( $p < 0,001$ ), entre 0,001 e 0,003 ( $p = 0,005$ ) e 0,003 e 0,006mg/L ( $p = 0,002$ ). Para

os machos diferenças pós-teste foram encontradas entre controle e 0,0015mg/L ( $p = 0,016$ ). Machos e fêmeas diferiram apenas na dose intermediária de clonazepam ( $p < 0,001$ ).

Também foram encontradas diferenças no sexo [ $F(9,50) = 11,642$ ,  $p = 0,001$ ], dose [ $F(9,50) = 6,099$ ,  $p = 0,002$ ] e interação sexo e dose [ $F(9,50) = 4,416$ ,  $p = 0,009$ ] para as entradas nos braços com rampa. Fêmeas diferiram no pós-teste entre as doses de 0,001 e 0,003 ( $p = 0,029$ ), já machos entre o controle e 0,0015 ( $p = 0,003$ ). Machos e fêmeas diferiram na dose intermediária ( $p < 0,001$ ).

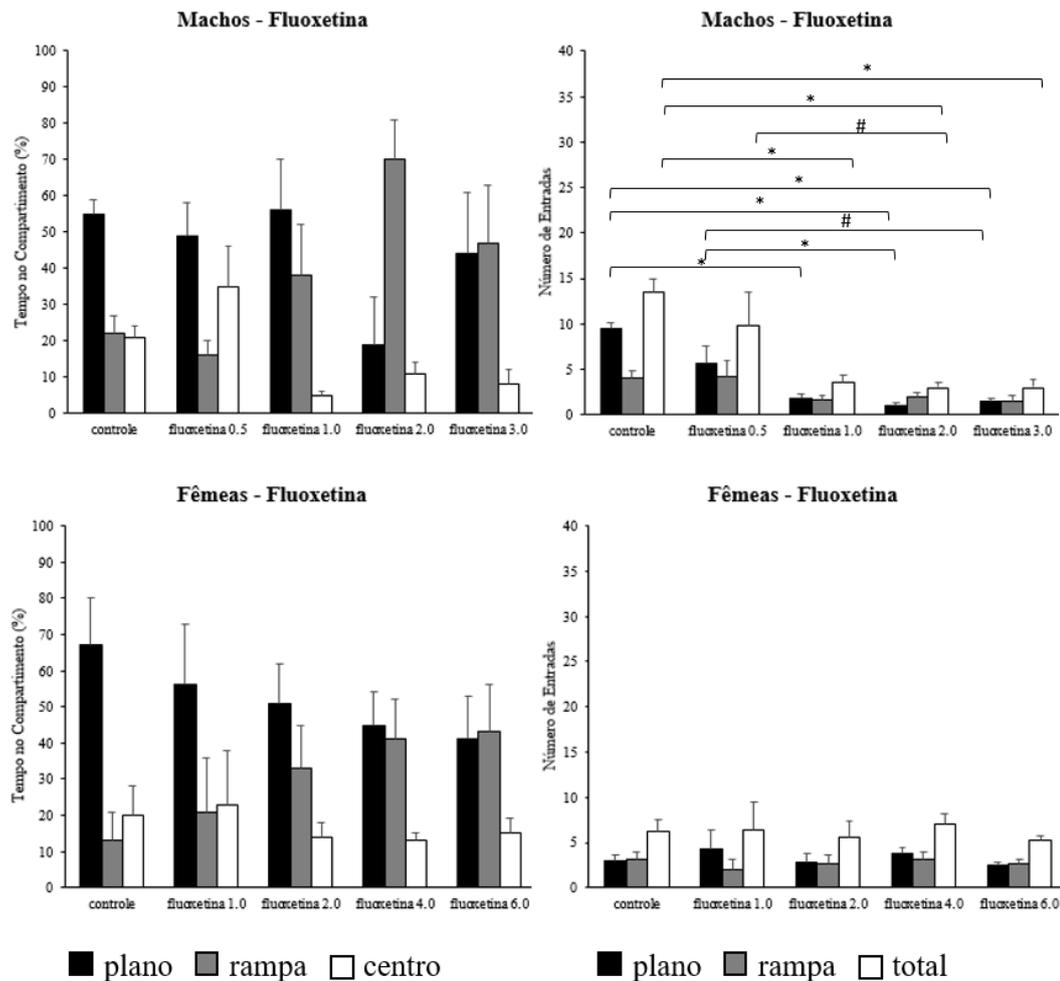
Para o número total de entradas, mais uma vez as diferenças foram entre sexo [ $F(9,50) = 14,100$ ,  $p < 0,001$ ], dose [ $F(9,50) = 7,874$ ,  $p < 0,001$ ] e a interação sexo e dose [ $F(9,50) = 5,929$ ,  $p = 0,002$ ]. No pós-teste foram encontradas diferenças globais entre machos e fêmeas ( $p < 0,001$ ) e entre o controle e as doses (indiferente do sexo): menor ( $p = 0,005$ ), intermediária ( $p = 0,045$ ) e maior ( $p < 0,001$ ). Quando considerados apenas os machos, diferenças foram encontradas entre o controle e: 0,0015 ( $p = 0,004$ ) e 0,003mg/L ( $p = 0,026$ ). Já para as fêmeas foram encontradas diferenças entre controle e 0,001 ( $p = 0,004$ ) e 0,003 ( $p = 0,004$ ) e também entre 0,001 e 0,003 ( $p = 0,007$ ) e 0,003 e 0,006mg/L ( $p = 0,007$ ).



**Figura 30.** Tempo no compartimento e número de entradas para os grupos de machos e fêmeas testados no labirinto em cruz com rampa em diferentes concentrações de clonazepam. Legenda: #,  $p \leq 0,05$ ; \*,  $p \leq 0,01$ .

Aos animais expostos às diferentes doses de fluoxetina, não foram encontradas diferenças nos tempos de permanência nos braços planos. Porém diferenças foram encontradas para as doses nos braços com rampa [ $F(9,50) = 5,295$ ,  $p = 0,001$ ] e na área central do aparato [ $F(9,50) = 2,880$ ,  $p = 0,032$ ]. O pós-teste indicou, indiferente do sexo, diferenças nos braços com rampa entre o controle e as duas maiores doses: 2;4mg/L ( $p = 0,012$ ) e 3;6mg/L ( $p = 0,024$ ) e, entre a dose mais baixa 0,5;1 e as doses mais altas: 2;4mg/L ( $p = 0,015$ ) e 3;6mg/L ( $p = 0,03$ ). Quanto ao tempo na área central, o pós-teste só indicou diferenças entre as doses de 0,5;1 e 1;2mg/L ( $p = 0,045$ ) (figura 31).

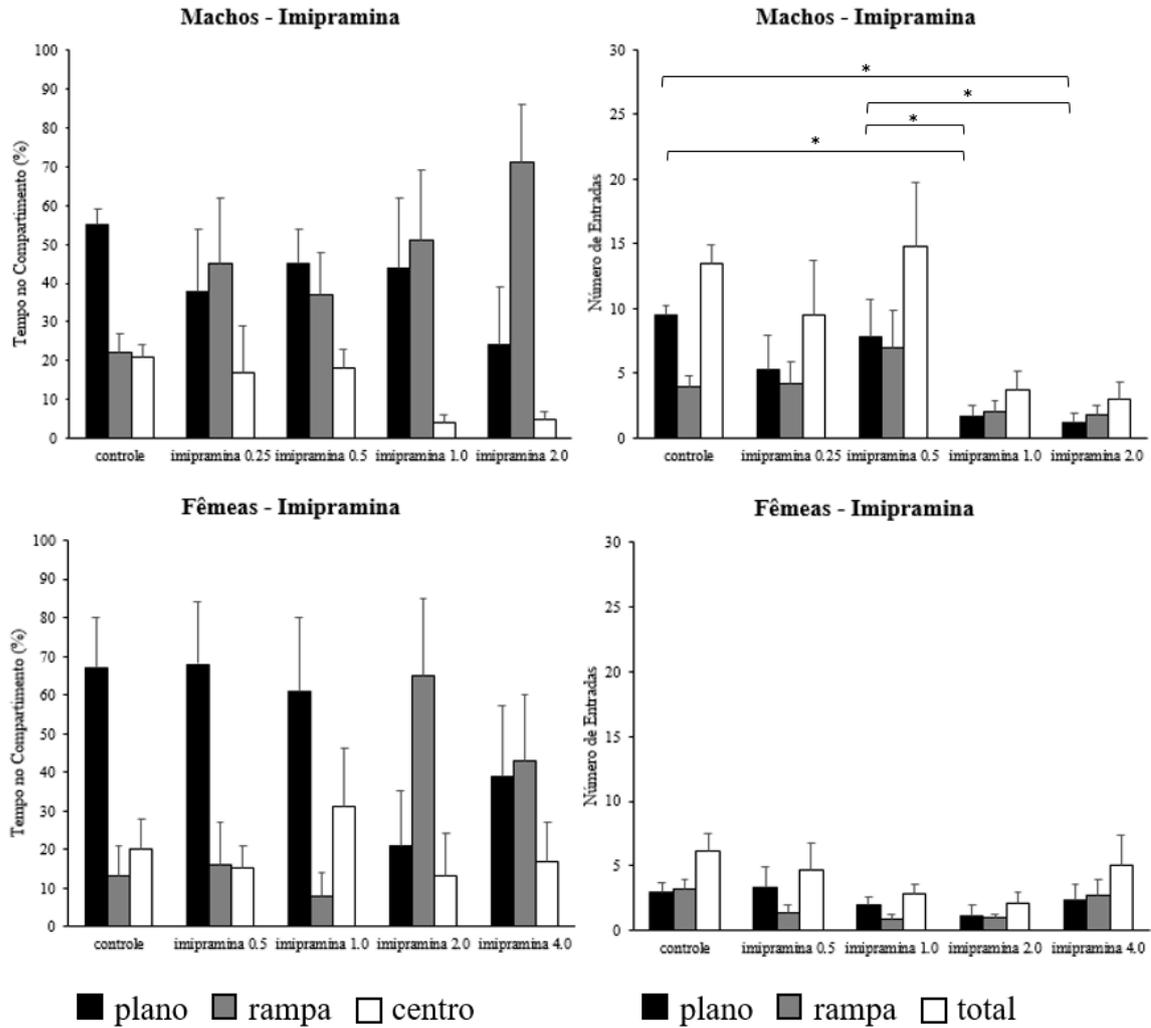
Quanto ao número de entradas, não foram encontradas diferenças quanto ao sexo mas estas diferenças foram encontradas para dose e interação sexo e dose, respectivamente, para: entradas nos braços planos [F(9,50) = 7,082,  $p < 0,001$ ], [F(9,50) = 6,628,  $p < 0,001$ ], entradas totais [F(9,50) = 3,392,  $p = 0,016$ ] e [F(9,50) = 3,447,  $p = 0,015$ ]. Não foram encontradas diferenças quanto as entradas nos braços com rampa. O pós-teste revela diferenças para as entradas nos braços planos para os machos, entre controle e: 1 ( $p < 0,001$ ), 2 ( $p < 0,001$ ) e 3mg/L ( $p < 0,001$ ), bem como entre 0,5 e 2 ( $p = 0,008$ ) e 3mg/L ( $p = 0,021$ ). O pós-teste nas entradas totais revelou diferenças apenas nos machos, sendo entre: controle e 1 ( $p = 0,008$ ), 2 ( $p < 0,001$ ) e 3mg/L ( $p = 0,004$ ), além de entre 0,5 e 2 ( $p = 0,032$ ). Machos e fêmeas diferiram no controle para as entradas nos braços plano ( $p < 0,001$ ) e entradas totais ( $p = 0,007$ ).



**Figura 31.** Tempo no compartimento e número de entradas para os grupos de machos e fêmeas testados no labirinto em cruz com rampa em diferentes concentrações de fluoxetina. Legenda: #,  $p \leq 0,05$ ; \*,  $p \leq 0,01$ .

Aos animais expostos à imipramina, foram encontradas diferenças no tempo de permanência nos braços planos para as doses [ $F(9,50) = 2,827$ ,  $p = 0,034$ ]. Já nos braços com rampa estas diferenças ocorreram entre sexo [ $F(9,50) = 6,526$ ,  $p = 0,014$ ] e doses [ $F(9,50) = 5,813$ ,  $p < 0,01$ ]. O pós-teste referente as doses nos braços com rampa revelaram diferenças, indiferente do sexo, entre controle e: 1 ( $p = 0,007$ ) e 2mg/L ( $p = 0,013$ ), além de entre 0,5 e: 1 ( $p = 0,016$ ) e 2mg/L ( $p = 0,031$ ). Não foram encontradas diferenças no tempo de permanência na área central do labirinto (figura 32).

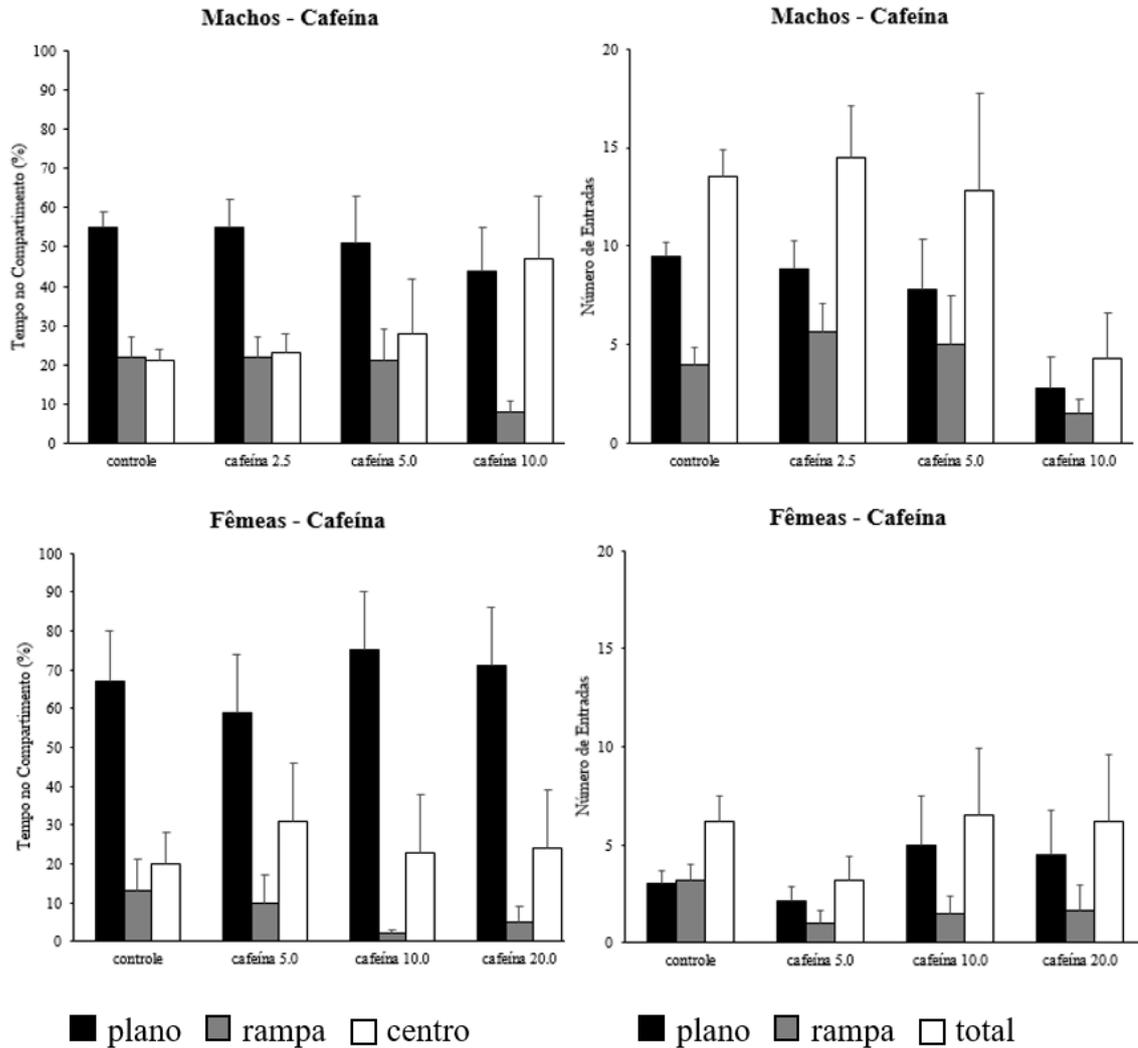
Quanto às entradas nos braços planos, foram encontradas diferenças para as variáveis: sexo [ $F(9,50) = 7,745$ ,  $p = 0,008$ ], doses [ $F(9,50) = 4,124$ ,  $p = 0,006$ ] e a interação entre sexo e dose [ $F(9,50) = 2,679$ ,  $p = 0,042$ ]. No pós-teste, apenas machos diferem, sendo entre controle e 1 ( $p = 0,004$ ) e 2mg/L ( $p = 0,002$ ), assim como entre 0,5 e 1 ( $p = 0,033$ ) e 2mg/L ( $p = 0,014$ ). Machos e fêmeas diferem no pós-teste quanto às entradas nos braços planos ( $p = 0,004$ ). Já nos braços com rampa, diferenças foram encontradas apenas para o sexo [ $F(9,50) = 7,304$ ,  $p = 0,009$ ]. Já quanto às entradas totais, diferenças foram encontradas para sexo [ $F(9,50) = 8,175$ ,  $p = 0,006$ ] e dose [ $F(9,50) = 2,546$ ,  $p = 0,049$ ].



**Figura 32.** Tempo no compartimento e número de entradas para os grupos de machos e fêmeas testados no labirinto em cruz com rampa em diferentes concentrações de imipramina. Legenda: \*,  $p \leq 0,01$ .

Os animais expostos à cafeína revelaram diferenças no tempo de permanência para os braços planos quanto ao sexo [ $F(7,40) = 7,823$ ,  $p = 0,008$ ] e as doses [ $F(7,40) = 2,935$ ,  $p = 0,045$ ]. Para os braços com rampa, diferenças foram encontradas apenas entre o sexo [ $F(7,40) = 5,818$ ,  $p = 0,021$ ]. Não foram encontradas diferenças quanto ao tempo de permanência na área central do labirinto aos animais expostos à cafeína (figura 33).

Para as entradas, apenas a variável sexo revelou diferenças, seja nos braços planos [ $F(7,40) = 10,725$ ,  $p = 0,002$ ], braços com rampa [ $F(7,40) = 5,985$ ,  $p = 0,019$ ] e entradas totais [ $F(7,40) = 9,511$ ,  $p = 0,004$ ], aos animais expostos à cafeína.



**Figura 33.** Tempo no compartimento e número de entradas para os grupos de machos e fêmeas testados no labirinto em cruz com rampa em diferentes concentrações de cafeína.

A tabela 8 abaixo apresenta uma síntese dos resultados obtidos através da exposição aguda a drogas com posterior realização do teste no labirinto em cruz com rampa.

**Tabela 8.** Síntese dos resultados obtidos após a aplicação do teste de labirinto em cruz com rampa aos animais expostos a drogas.

<b>Droga/Variável</b>	<b>Sexo</b>	<b>Dose</b>	<b>Comentários</b>
<b>Álcool</b>	tempo no plano tempo na rampa entrada no plano entrada na rampa entrada total	tempo no plano entrada no plano entrada na rampa entrada total	machos mais ativos que fêmeas com aumento da dose
<b>Clonazepam</b>	entrada no plano entrada na rampa entrada total	entrada no plano entrada na rampa entrada total	aumento motor sem efeito ansiolítico doses eficazes diferentes para os sexos
<b>Fluoxetina</b>		tempo na rampa tempo no centro entrada no plano entrada na rampa entrada total	efeito ansiogênico com freezing nas doses mais altas
<b>Imipramina</b>	tempo na rampa entrada no plano entrada na rampa entrada total	tempo no plano tempo na rampa entrada no plano entrada total	efeito ansiogênico com freezing nas doses mais altas
<b>Cafeína</b>	tempo no plano tempo na rampa entrada no plano entrada na rampa entrada total	tempo no plano	fêmeas se mostram mais sensíveis mas não há efeitos ansiogênicos ou motores claros

#### 4.5 Discussão

##### *Sensibilidade e Reexposição*

Assim como uma parcela significativa dos testes comportamentais para vertebrados em aparatos grandes, a atividade locomotora foi o parâmetro principal para análise do comportamento dos indivíduos expostos ao labirinto em cruz com rampa. Os dados permitiram a análise de duas variáveis: o tempo total em cada compartimento (braços planos, braços com rampa e centro do aparato) e o número de entradas nos braços (planos e com rampa).

Quando avaliadas as variáveis referentes ao tempo nos compartimentos e as entradas (todas em % para fins de equidade) do labirinto através da ANOVA para medidas repetidas, não foram encontradas diferenças entre os sexos, alturas de coluna d'água utilizadas e tempo de sessão aplicados. Estes resultados apontam para uma provável estabilidade no padrão de resposta desempenhada pela espécie no teste em questão. A aplicação de ANOVA de uma via por sua vez indicou tanto para machos quanto para fêmeas, clara preferência por permanecer nos braços planos em comparação aos braços com rampa e centro do aparato (figura 23), além de tender a entrar mais nestes braços planos do que nos braços com rampa (figura 24). Entendemos que os braços planos no labirinto em cruz com rampa equivalem aos braços fechados do labirinto em cruz elevado proposto por Handley e Mithiani (1984).

Desta maneira, este ambiente de braços planos representariam, em comparação aos demais do aparato, o de menor exposição e risco ao animal, uma vez que os braços com rampa seriam equivalentes aos braços abertos do labirinto em cruz elevado. Isto porque a progressão de nado do animal no sentido centro ou fundo do braço resulta em uma redução da altura da coluna d'água, deixando o animal assim cada vez mais próximo da superfície e, possivelmente exposto a um predador externo. Além disso, embora não exista equivalência no labirinto em cruz elevado, o centro do aparato do labirinto em cruz com rampa também se revela uma área de exposição por não apresentar paredes, como na relação área central e zonas periféricas no teste de campo aberto.

Para Blaser e Goldsteinholm (2012), *Zebrafish* em testes de mergulho vertical manifestam logo que expostos a este novo aquário a preferência pelo nado no fundo do aparato. Segundo os autores, esta pode ser uma resposta defensiva de fuga da superfície e não de preferência pelo fundo. Este princípio já era exposto por Gerlai e colaboradores (2000) que demonstraram que o *Zebrafish*, quando expostos ao teste de deslocamento vertical pela primeira vez, tende a permanecer no fundo do aquário e só começa a explorar as camadas superiores da coluna d'água após seis minutos de teste.

Se considerarmos que os braços planos do labirinto em cruz com rampa representam claramente o ambiente de menor exposição ao animal no aparato, sua preferência por este ambiente equivale ao comportamento tigmotático apresentado tanto por roedores nos braços fechados do labirinto em cruz elevado (Pellow & File, 1986), como por peixes nas paredes do campo aberto (Walsh-Monteiro, Pragana, Costa & Gouveia Jr, 2014), comportamento escototático de peixes no aquário claro-escuro (Maximino, Marques de Brito, Dias, Gouveia

Jr & Morato, 2010) ou mesmo, o maior tempo no fundo do aquário no teste de mergulho vertical (Gerlai, 2010). Como apresentado anteriormente, este tipo de comportamento representaria um conjunto de respostas defensivas associadas à exposição do animal a um novo ambiente (McNaughton & Corr, 2004; Gouveia Jr, Zampieri, Ramos, Silva, Mattioli & Morato, 2005; Graeff, 2010).

Nos experimentos realizados com variação de altura de coluna d'água e tempo de sessão de teste, para ambos os sexos o comportamento se revela estável a partir dos testes que utilizam 8cm de altura para a coluna d'água já em cinco minutos de sessão de teste. Tais considerações se mostram mais claras quando se percebe que no caso das fêmeas (figura 23), os grupos testados com a menor altura de coluna d'água apresentam um aumento no tempo nos braços planos com o aumento do tempo de sessão, porém isso se estabiliza em 8 e 10cm. Isto nas fêmeas à 7cm de coluna d'água, embora pareça contraditório, pode indicar um aumento no estado ansioso (maior tempo nos braços planos) com o aumento no tempo de sessão, uma vez que em comparação aos machos, elas tendem a ser menos forrageadoras (Killen, Croft, Salin & Darden, 2016). Considerando que esta altura de coluna d'água é a menor entre todas as testadas, o risco iminente de exposição a um possível predador externo, por exemplo, pode ser uma explicação ao fato de mesmo aumentando o tempo de exposição ao aparato, e conseqüente reconhecimento de sua estrutura, fêmeas passam mais tempo nos braços planos. Já para os machos a resposta é estável em todos os grupos para o tempo nos braços planos.

Comparados a *Zebrafish* de ambos os sexos testados sobre o mesmo protocolo de variação de colunas d'água e tempos de teste em nosso laboratório (Walsh-Monteiro et al., 2016 - submetido), machos de *Guppy* apresentaram maior permanência nos demais compartimentos (centro e braços com rampa), e conseqüente menor percentual de tempo nos braços planos. Este diferencial entre as espécies, embora não significativa, pode estar associada ao comportamento mais audacioso de *Guppy*. Este comportamento audacioso em *Guppy* pode estar associado a característica de que machos com maior sucesso no acasalamento são aqueles que mais enfrentam predadores e expõem-se ao risco (Godin & Dugatkin, 1996).

Esta variação de comportamentos entre machos e fêmeas de *Guppy* em colunas d'água de 7cm de altura parece estar associada ao mesmo tipo de heterogeneidade de grupo encontrada por Tran e Gerlai (2013) em *Zebrafish* onde, fêmeas revelaram atividade

locomotora mais expressiva no tanque de mergulho em comparação aos machos, enquanto que no campo aberto foram os machos os mais ativos em relação às fêmeas. Isto implica que machos e fêmeas podem se comportar de formas diferentes diante de determinadas tarefas, incluindo atividade exploratória, agressividade ou procura de parceiros, algo já enfatizado anteriormente.

Estes dados de avaliação da sensibilidade de machos e fêmeas de *Guppy* nos permitiram estabelecer a coluna d'água de 8cm de altura e o tempo de sessão de 5 minutos como aquele em que a resposta da espécie se estabiliza frente às características do labirinto. Desta maneira, estas condições foram utilizadas para os estudos de reexposição e farmacologia dos animais ao aparato. Estas condições foram igualmente encontradas para *Zebrafish* (Walsh-Monteiro et al., 2016 - submetido).

As análises referentes às reexposições dos indivíduos nos diferentes intervalos testados (30, 60 e 120 minutos e 24 horas) não revelaram diferenças para as variáveis isoladas (sexo, intervalos repetições) para os tempos nos compartimentos (figuras 25 e 26). Estes dados poderiam sugerir uma estabilidade no padrão comportamental dos indivíduos, caso apenas a análise de tempo fosse considerada. Apenas as interações entre as variáveis revelaram diferenças estatísticas.

Por outro lado, a análise do número de entradas nos braços permitiu esclarecimentos sobre o efeito da reexposição. Nos braços planos, a análise global mostrou que a reexposição resulta em uma redução no número de entradas nestes compartimentos. As diferenças são bastante claras quando se compara o primeiro com o quarto e o quinto teste, e o segundo como o quinto teste, indiferente do sexo para o intervalo de 120 minutos. Este mesmo padrão de respostas é encontrado para o número de entradas nos braços com rampa.

Este perfil de redução no número de entradas nos braços planos, com ênfase aos testes com intervalos de 120 minutos, não é indicativo de que o estado ansioso do animal reduziu e a exploração dos braços com rampa se elevaram. Mesmo porque os tempos de permanência nos compartimentos não variaram e as entradas nos braços com rampa também reduziram. O que se percebe é uma redução na atividade locomotora desempenhada pelos indivíduos que pode ser caracterizada por uma habituação fisiológica ao labirinto (Lent, 2010). A habituação intersessão também é descrita em outros testes comportamentais como a apresentada por *Zebrafish* no tanque claro-escuro (Maximino, da Silva, Gouveia Jr & Herculano, 2011).

Esta habituação, encontrada nos intervalos de testes com 120 minutos pode estar relacionada à formação de um mapa espacial cognitivo de memória, aonde uma representação interna do ambiente é construída conforme o ambiente é explorado, o que o torna com a repetição, cada vez mais elaborado (O'Keefe & Nadel, 1979; 1978).

Sendo assim, a reexposição do animal ao ambiente contribui para o estabelecimento da memória de trabalho, elevando o reconhecimento espacial e reduzindo o impacto ansioso pelo ambiente deixar de ser uma novidade e permitir ao animal estabelecer rotas confortáveis e seguras de exploração (O'Keefe & Nadel, 1979). Pergher e colaboradores (2006) revelam que o estado emocional dos indivíduos pode impactar de diferentes maneiras no reconhecimento e decodificação mnemônica. O menor estado ansioso aqui parece contribuir para este processo.

Contudo, o que se percebe é que com a repetição em intervalos de 120 minutos, mesmo com esta possível formação mais elaboração de memória espacial, a habituação se revela possivelmente pelo desinteresse do animal em continuar explorando um ambiente que não lhe oferece riscos e, ao mesmo tempo não apresenta benefícios como alimento ou parceiros (Kandel 2012), indicando habituação.

No intervalo seguinte utilizado, percebe-se que em 24 horas não ocorre habituação mas sim uma oscilação no número de entradas nos braços. Provavelmente este intervalo é extenso demais para a consolidação de memória espacial ao labirinto (Kandel, 2012) nesta espécie, permitindo assim a aprendizagem.

### *Efeito de drogas*

O abuso de álcool, na forma de etanol, tende a provocar intoxicação nos indivíduos podendo ocasionar na modificação de diferentes parâmetros neuroquímicos que levem a alterações na secreção de hormônios ou neurotransmissores, com impactos relevantes nos lobos frontais, sistema límbico e cerebelo (Oscar-Berman & Marinkovic, 2007). Estudo recente com uso de neuroimagem mostrou que o uso crônico e abusivo do álcool provoca disfunções que podem levar a comportamentos anormais de impulsividade (Wang et al, 2016).

Nossos resultados referentes à exposição de *Guppy* ao álcool mostram que ao comparar animais expostos com o grupo controle, há uma clara alteração na atividade motora, principalmente dos machos que, por sua vez, aumentam a atividade motora conforme a concentração de álcool aumenta (Figura 29).

Considerando que o álcool possui múltiplos alvos, são esperados por seu uso, múltiplos efeitos. Contudo, alguns estudos têm revelado importantes efeitos do álcool sobre os receptores GABA<sub>A</sub> e NMDA (Van Skike, Diaz-Granados & Matthews, 2015). Sobre estes alvos temos a potencialização do efeito inibitório gabaérgico e a inibição da via excitatória glutamatérgica.

Nossos resultados mostram que, o aumento da concentração de álcool tem efeito sobre o tempo de permanência dos animais nos braços, principalmente nos machos. Neles, o tempo de permanência nos braços planos tende a diminuir e o tempo nos outros compartimentos aumentar, especialmente na área central do aparato. Se somarmos este efeito de tempo de permanência com o aumento do número de entradas, podemos sugerir um efeito ansiolítico dose-dependente.

Estudos utilizando *Zebrafish* em outros modelos experimentais como teste de mergulho vertical (Mathur & Guo, 2011; Egan et al, 2009) e na preferência claro-escuro (Maximino et al., 2011), revelaram o efeito ansiolítico do álcool administrado em dose aguda. No labirinto em cruz elevado, Pellow e colaboradores (1985) sugeriram que o aumento da exploração dos ratos nos braços abertos do aparato estaria relacionado com uma redução do nível de ansiedade dos animais.

Quando se observa os efeitos do clonazepam sobre os indivíduos testados, obteve-se que apenas os números de entradas nos braços apresentaram diferenças. As doses de clonazepam utilizadas não afetaram o tempo de permanência dos animais nos compartimentos do labirinto.

O clonazepam, benzodiazepínico de efeito seletivo sobre receptores GABA<sub>A</sub>, potencializa a resposta de hiperpolarização neural (Rudolph & Knoflach, 2011). O efeito ansiolítico encontrado, tanto em machos quanto em fêmeas através do aumento da atividade locomotora em praticamente todas as doses, pode estar relacionado à inibição do sistema límbico que possui grande quantidade de receptores GABA<sub>A</sub> e é um importante regulador do

comportamento emocional dos vertebrados (Golan, 2009), caracterizando assim um efeito ansiolítico.

Esta inibição emocional parece aumentar a exploração do animal no labirinto, o que caracteriza um efeito ansiolítico similar ao que é observado com ratos, onde ocorre aumento da atividade locomotora para entrar nos braços fechados e abertos, assim como descrito por Hogg (1996) e Pellow & File (1986). Por outro lado, Maximino e colaboradores (2011) também encontraram efeito ansiolítico do clonazepam em *Zebrafish* testados em aquários claro-escuro, onde os animais reduziram a aversividade passando mais tempo no aquário branco, porém tiveram redução da atividade locomotora.

O aumento da atividade locomotora revelou efeito ansiolítico eficaz para os machos em todas as doses, enquanto que para as fêmeas este efeito só foi observado nas doses de concentração menor (0,001mg/L) e maior (0,006mg/L). A dose intermediária (0,003mg/L) indicou redução locomotora para níveis equivalentes ao grupo controle. Isto pode ser sugerido como feito de heterogeneidade da amostra, que segundo Tran e Gerlai (2013) pode interferir o desempenho e o comportamento dos indivíduos. No caso do labirinto, estas fêmeas de doses intermediárias de clonazepam apresentaram redução da atividade locomotora em comparação às doses das extremidades, porém isto não impactou em modificações no tempo de permanência nos compartimentos.

Para os grupos testados com fluoxetina, não foram encontradas diferenças de efeito entre os sexos, tais diferenças foram encontradas apenas para as doses aplicadas. A observação dos gráficos de tempo nos compartimentos poderia sugerir um efeito do tipo ansiolítico, principalmente na observação do grupo das fêmeas (figura 31), no qual com o aumento na concentração de drogas há redução de tempo nos braços planos e aumento nos braços com rampa. Contudo, tanto machos quanto fêmeas apresentaram redução na atividade locomotora, potencializada com o aumento na concentração de fluoxetina (análise considerando ambos os sexos).

Embora não tenha sido um parâmetro de análise neste estudo, tanto machos quanto fêmeas nas duas doses mais altas manifestaram comportamento do tipo freezing, o que caracteriza um efeito ansiogênico e explica a redução locomotora e o aumento no tempo de permanência nos braços com rampa. Muito provavelmente, o animal após inserido na área central do aparato desloca-se para um dos braços (ambiente menos aberto) e ali fica parado

por longo tempo, seguido por uma ou outra exploração acompanhado de novo freezing ou baixa locomoção no compartimento.

A fluoxetina, inibidor seletivo da recaptção de serotonina é amplamente prescrita para diferentes doenças psiquiátricas (depressão, transtorno bipolar, ansiedade e distúrbio obsessivo-compulsivo) (Mirhashemi et al., 2015). Contudo, o efeito dito ansiolítico só tem sido relatado em estudos com animais para a administração crônica de fluoxetina. Maximino e colaboradores (2011) relatam que *Zebrafish* só desprenderam maior tempo na área clara do aquário claro-escuro em administração crônica. Na administração aguda tal efeito ansiolítico não foi observado.

O aumento da disponibilidade de serotonina na fenda sináptica está diretamente relacionado a respostas ansiogênicas tanto em vertebrados quanto em invertebrados (Hamilton, Kwan, Gallup & Tresquerres, 2016). O aumento da disponibilidade de serotonina, que pode ocorrer pelo uso de inibidores seletivos da recaptção ou pela própria injeção de serotonina eleva, o comportamento ansioso de lagostas expostas ao teste claro-escuro (Fossat, Bacqué-Cazenave, De Deurwaerdère, Delbecque & Cattaert, 2014) e também a agressividade em lagostas (Huber, Smith, Delago, Isaksson & Kravitz, 1997) e lagostim (Tricarico & Gherardi, 2007). Este relato do efeito da serotonina sobre ansiedade e agressividade em invertebrados é indicativo de que a via serotoninérgica é antiga e evolutivamente conservada (Fong & Ford, 2014).

Além dos relatos para invertebrados e *Zebrafish*, a exposição aguda de fluoxetina também revela efeitos ansiogênicos para camundongos (Birkett, Shinday, Kessler, Meyer, Ritchie & Rowlett, 2011) e ratos testados no labirinto em cruz elevado (Robert, Drapier, Bentué-Ferrer, Renault & Reymann, 2011; Drapier et al., 2007) ou no labirinto em T elevado (Gomes, de Carvalho-Netto, Monte, Acco, Nogueira & Nunes-de-Souza, 2009).

Os grupos de animais expostos à imipramina apresentaram, de maneira geral, efeito ansiogênico semelhante ao encontrado naqueles expostos à fluoxetina. Tal fato pode se dever ao mecanismo de ação desta droga, similar, porém menos específico que o da fluoxetina. Machos e fêmeas diferiram quanto às variáveis relacionadas à locomoção e também quanto ao tempo de permanência nos braços com rampa. Já nas doses de menores concentrações os machos apresentaram aumento no tempo de permanência nos braços com rampa enquanto que para as fêmeas isto só aconteceu nas doses de maiores concentrações.

Nas doses menores, a atividade locomotora dos machos não apresentou variação significativa em comparação ao grupo controle, o que só aconteceu nas doses maiores. Para as fêmeas, a atividade locomotora sofreu pequenas oscilações não significativas em relação ao controle.

A imipramina é um antidepressivo tricíclico que tem por característica inibir a recaptação de serotonina e noradrenalina (Golan, 2009). A preservação do perfil de machos em relação ao controle nas doses de 0,25 e 0,50mg/L com aumento nos tempos de permanência nos braços com rampa, pode ser indicativo de maior sensibilidade dos machos em relação às fêmeas à imipramina, uma vez que, elas conservaram o perfil de maior tempo de permanência nos braços planos. Assim, machos para as doses de menores concentrações poderiam apresentar efeito ansiolítico no tempo de permanência, sem efeito motor, embora não se possa afirmar com precisão.

Esta variação de sensibilidade de imipramina para machos e fêmeas já foi descrita em estudos com outros animais, inclusive humanos (Roth, Adler & Bobrow, 1999), ratos (Pitychoutis, Pallis, Mikail & Papadopoulou-Daifoti, 2011; Gouveia Jr, 1999) e camundongos (Renoir et al, 2011), inclusive indicando que a terapia combinada de testosterona e imipramina, em uso crônico, potencializa o efeito antidepressivo e a neurogênese hipocampal em machos de ratos socialmente isolados (Carrier & Kabbaj, 2012).

Por outro lado, considerando que mais uma vez foi identificado comportamento de freezing nas duas doses de concentrações mais altas para machos e fêmeas, podemos supor que assim como para a fluoxetina, a exposição às concentrações mais elevadas de imipramina provocam efeitos ansiogênicos nos indivíduos. Em machos a sensibilidade é mais facilmente detectada ao se observar que nas doses de 1 e 2mg/L a atividade locomotora reduz de maneira significativa, bem como o tempo de permanência nos braços com rampa aumenta, não por exploração, mas por freezing (figura 32). Nas fêmeas o comportamento nas doses de 2 e 4mg/L é o mesmo, aonde o tempo de permanência nos braços com rampa aumentam abruptamente, em comparação às doses inferiores, porém como o freezing é observado, não se pode sugerir efeito ansiolítico, mas sim ansiogênico.

A administração aguda de imipramina em roedores no labirinto em cruz elevado não revela efeito ansiolítico (Lister, 1987; Pellow, Chopin, File & Briley, 1985), mas doses agudas indicam efeito ansiogênico no labirinto em T elevado e no campo aberto (Teixeira,

Zangrossi Jr., & Graeff, 2000). Já na administração aguda de imipramina em peixes, *Zebrafish* também apresentaram efeitos ansiogênicos quando testados no aquário claro-escuro com redução no número de cruzamentos e aumento no tempo de primeira latência e permanência no lado escuro do aquário (Magno, Fontes, Gonçalves & Gouveia Jr, 2015).

Para aqueles animais expostos à cafeína, machos e fêmeas diferiram nos tempos de permanência nos braços planos e nos braços com rampa. Percebe-se que nas fêmeas o percentual de tempo nos braços planos acentua e nos com rampa, decrescem, com o aumento da concentração de cafeína. Entretanto, esta maior sensibilidade das fêmeas não permite caracterizar efeito ansiogênico, uma vez que, a variação de doses não revelou efeito motor (figura 33).

Com relação ao efeito motor, machos e fêmeas também diferiram, sendo eles mais ativos, contudo, sem diferença ao grupo controle, isto pode estar mais relacionado ao próprio comportamento exploratório superior dos machos em relação às fêmeas para *Guppy*, como já exposto previamente (Godin & Dugatkin, 1996).

A cafeína, junto ao álcool e a nicotina representam as drogas psicoativas mais consumidas no mundo (Rezvani, Sexton, Johnson, Wells, Gordon & Levin, 2013). No caso da cafeína, sua estrutura tridimensional é similar à adenosina, o que a faz um antagonista competitivo aos receptores de adenosina A1 e A2A (Basheer, Strecker, Thakkar & McCarley, 2004). Naturalmente a ativação destes receptores leva ao bloqueio da liberação de monoaminas (dopamina, noradrenalina e serotonina) e de acetilcolina (Fisone, Borgkvist & Usiello, 2004). Na presença de cafeína, os receptores de adenosina são bloqueados e a transmissão de dopamina, por exemplo, é potencializada (Shook & Jackson, 2011). Este efeito de elevação dos níveis dopaminérgicos é encontrado no córtex pré-frontal de ratos (De Luca, Bassareo, Bauer & Di Chiara, 2007) e humanos (Kaasinen, Aalto, Någren & Rinne, 2004).

A elevação nos níveis de cafeína está associada a efeitos estimulantes que podem levar a comportamentos aversivos e agressivos, porém nem sempre com alteração do perfil motor em ratos (Rezvani, Sexton, Johnson, Wells, Gordon & Levin, 2013). No labirinto em cruz elevado, a cafeína reduziu o tempo gasto nos braços abertos por ratos (Lister, 1987). Este mesmo princípio ansiogênico é observado em *Zebrafish* expostos no teste de mergulho vertical (Cachat et al, 2011).

Neste estudo, as evidências mais fortes de efeitos ansiogênicos estão na diferença global (considerando ambos os sexos) para o tempo de permanência nos braços planos, que aumentam com a dose administrada e o fato da dose de maior concentração reduzir a atividade locomotora nos machos, com observação de freezing na área central do labirinto. Entretanto, este último efeito não foi observado nas fêmeas.

#### **4.6 Conclusões**

A sensibilidade ao aparato permitiu o uso de uma coluna d'água com 8cm de altura em 5 minutos de sessão, com diferenças entre sexos e habituação ao longo das reexposições. O efeito das drogas indicam que o aparato aqui apresentado é sensível a substâncias ansiolíticas e ansiogênicas, podendo se constituir num possível modelo alternativo ao estudo farmacológico para peixes desta espécie.

O conjunto de dados aqui apresentados indica que o *Guppy* pode ser uma alternativa viável para estudos comportamentais e farmacológicos com peixes, como o *Zebrafish*. Os resultados expostos mostram que *Guppy* possui comportamento similar e respostas a drogas compatível com os dados descritos para *Zebrafish*. Estas similaridades reforçam o uso de peixes como uma alternativa ao uso de mamíferos na experimentação animal.

## REFERÊNCIAS

- Agrillo, C., Piffer, L., Bisazza, A. & Butterworth, B. (2012). Evidence for two numerical systems that are similar in humans and guppies. *PLoS ONE*, 7(2), e31923. [DOI: 10.1371/journal.pone.0031923].
- Andrade, R. L. B., Andrade, L. S., Boscolo, W. R. & Soares, C. M. (2005). Comportamento, sobrevivência e desenvolvimento de lebistes, *Poecilia reticulata*, submetidos a agentes utilizados na profilaxia de doenças. *Acta Sci Anim Sci*, 27(4),523-528. [DOI: 10.4025/actascianimsci.v27i4.1183].
- Andrade, T. G., Zangrossi, H. & Graeff, F. G. (2013). The median raphe nucleus in anxiety revisited. *J Psychopharmacol*, 27(12),1107-15. [DOI: 10.1177/0269881113499208].
- Anichtchik, O., Sallinen, V., Peitsaro, N. & Panula, P. (2006). Distinct structure and activity of MAO in the brain of *Zebrafish* (*Danio rerio*). *J Comp Neurol*, 498,593-610. [DOI: 10.1002/cne.21057].
- APHA – American Public Health Association. (2012). *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater* (22a ed.). Washington D.C: American Public Health Association.
- Baddeley, D. A. (1972). Selective attention and performance in dangerous environments. *Br J Psychol*, 63(4),537-546. [DOI: 10.1111/j.2044-8295.1972.tb01304.x]
- Baumans, V. (2007). The welfare of laboratory mice. In E. Kaliste. *The Welfare of Laboratory Animals* (v.2,pp.119-152). Dordrecht: Springer. [DOI: 10.1007/978-1-4020-2271-5\_7].
- Basheer, R., Strecker, R. E., Thakkar, M. M. & McCarley, R. W. (2004). Adenosine and sleep-wake regulation. *Prog Neurobiol*, 73(6),379-96.
- Bear, M. F., Connors, B. W., Paradiso, M. A. (2008). *Neurociências – desvendando o sistema nervoso* (3a ed.). Porto Alegre: Artmed.
- Bell-Pedersen, D., Cassone, V. M., Earnest, D. J., Golden, S. S., Hardin, P. E., Thomas, T. L. & Zoran, M. J. (2005). Circadian rhythms from multiple oscillators: lessons from diverse organisms. *Nat Rev Genet*, 6(7),544-556. [DOI:10.1038/nrg1633].
- Bencan, Z., Sledge, D. & Levin, E. D. (2009). Buspirone, chlordiazepoxide and diazepam effects in a *Zebrafish* model of anxiety. *Pharmacol Biochem Behav*, 94(1),75-80. [DOI: 10.1016/j.pbb.2009.07.009].
- Berridge, K. C. (2004). Motivation concepts in behavioral neuroscience. *Physiol Behav*, 81, 179-209. [DOI: 10.1016/j.physbeh.2004.02.004].
- Beulig, A. & Fowler, J. (2008). Fish on Prozac: effect of serotonin reuptake inhibitors on cognition in goldfish. *Behav Neurosci*, 122(2),426-432. [DOI: 10.1037/0735-7044.122.2.426].
- Birkett, M. A., Shinday, N. M., Kessler, E. J, Meyer, J. S, Ritchie, S., & Rowlett, J. K. (2011). Acute anxiogenic-like effects of selective serotonin reuptake inhibitors are

- attenuated by the benzodiazepine diazepam in BALB/c mice. *Pharmacol Biochem Behav*, 98(4),544–551. [DOI: 10.1016/j.pbb.2011.03.006].
- Bjerke, S. (2002). *Developing behavioral assays to study dopamine-related disorders in Zebrafish (Danio rerio)*. Oslo: University of Oslo.
- Blaser, R. E.; Goldsteinholm J. (2012). Depth preference in *Zebrafish*, *Danio rerio*: control by surface and substrate cues. *Animal Behav*. 83(4),953-959.
- Blaser, R. E. & Peñalosa, Y. M. (2011). Stimuli affecting *Zebrafish* (*Danio rerio*) behavior in the light/dark preference test. *Physiol Behav*, 104(5),831-837. [DOI: 10.1016/j.physbeh.2011.07.029].
- Bretau, S., Li, Q., Lockwood, B. L., Kobayashi, K., Lin, E. & Guo, S. (2007). A choice behavior for morphine reveals experience-dependent drug preference and underlying neural substrates in developing larval *Zebrafish*. *Neuroscience*, 146(3),1109-1116. [DOI: 10.1016/j.neuroscience.2006.12.073].
- Brito, T. M. (2011) *Validação da preferência claro/escuro como modelo comportamental de ansiedade no Carassius auratus (peixe dourado)*. Dissertação de Mestrado, Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, SP, Brasil.
- Carrier, N., & Kabbaj, M. (2012). Testosterone and imipramine have antidepressant effects in socially isolated male but not female rats. *Hormones and Behavior*, 61(5), 678–685. [DOI: 10.1016/j.yhbeh.2012.03.001].
- Carvalho, P. C. P., Mayer, P. C. M., Walsh-Monteiro, A. & Gouveia Jr., A. (2015). Effects of menthol on aggressive behavior in Siamese fighting fish (*Betta splendens*). *Psychol Neurosci*, 8(2),290-296. [DOI: 10.1037/h0101056].
- Christianson, S. A. & Loftus, E. F. (1987). Memory for traumatic events. *Appl Cognit Psychol*, 1(4),225-239. [DOI: 10.1002/acp.2350010402].
- Clarke, J. R., Cammarota, M., Gruart, A., Izquierdo, I. & Delgado-García, J. M. (2010). Plastic modifications induced by object recognition memory processing. *Proc Natl Acad Sci USA*, 107(6),2652-2657. [DOI: 10.1073/pnas.0915059107]
- Cofiel, L. P. V. (2008) *Aprendizagem, memória e estresse em Danio rerio*. Tese de Doutorado, Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, SP, Brasil.
- Chuard, P. J. C., Brown, G. E. & Grant, J. W. A. (2016). The effects of adult sex ratio on mating competition in male and female guppies (*Poecilia reticulata*) in two wild populations. *Behav Process*. 129, 1-10. [DOI: 10.1016/j.beproc.2016.05.001]
- De Castro, M. R., Lima, J. V., De Freitas, D. P., Valente, R. S., Dummer, N. S., De Aguiar, R. B., Dos Santos, L. C., Marins, L. F., Geracitano, L. A., Monserrat, J. M. & Barros, D. M. (2009). Behavioral and neurotoxic effects of arsenic exposure in *Zebrafish* (*Danio rerio*, Teleostei: Cyprinidae). *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol*, 150(3),337-342. [DOI: 10.1016/j.cbpc.2009.05.017].
- De Luca, M.A., Bassareo, V., Bauer, A. & Di Chiara, G. (2007). Caffeine and accumbens shell dopamine. *J Neurochem*, 103(1),157-163.

- Dias, C. A. G. de M., dos Santos, B. R., Mansur, B. de M., Pinheiro, M. de S., Fecury, A. A., Sá-Oliveira, J. C., Matayoshi-Calixto, P. H., de Oliveira, E., Gouveia Jr, A. (2014). Light / dark preference in *Danio rerio*: effects of light exposure duration and day period. *Biota Amazônia*, 4(3),106-111. [DOI: 10.18561/2179-5746/biotaamazonia.v4n3p106-111].
- Drapier, D., Bentué-Ferrer, D., Laviolle, B., Millet, B., Allain, H., Bourin, M., & Reyman, M. N. (2007). Effects of acute fluoxetine, paroxetine and desipramine on rats tested on the elevated plus-maze. *Behav Brain Res*, 176(2),202–209. [DOI: 10.1016/j.bbr.2006.10.002].
- Dugatkin, L. A. & Alfieri, M. (1991). Guppies and the TIT FOR TAT strategy: preference based on past interaction. *Behav Ecol Sociobiol*, 28,243-246.
- Dunlap, J. C. (1999). Molecular bases for circadian clocks. *Cell*, 96(2),271-290. [DOI:10.1016/S0092-8674(00)80566-8].
- Egan, R. J., Bergner, C. L., Hart, P. C., Cachat, J. M., Canavello, P. R., Elegante, M. F., Elkhayat, S. I., Bartels, B. K., Tien, A. K., Tien, D. H., Mohnot, S., Beeson, E., Glasgow, E., Amri, H., Zukowska, Z., & Kalueff, A. V. (2009). Understanding behavioral and physiological phenotypes of stress and anxiety in *Zebrafish*. *Behav Brain Res*, 205(1),38–44. [DOI: 10.1016/j.bbr.2009.06.022].
- Elbaz, I., Foulkes, N. S., Gothilf, Y. & Appelbaum, L. (2013). Circadian clocks, rhythmic synaptic plasticity and the sleep-wake cycle in *Zebrafish*. *Front Neural Circuits*, 1(7),9. [DOI:10.3389/fncir.2013.00009].
- Evans, D. H., Claiborne, J. B. & Currie, S. (2013). *The Physiology of Fishes* (4<sup>a</sup> ed.). Boca Raton: CRC Press.
- Faganello, F. R., Medalha, C. C. & Mattioli, R. (2003). Haloperidol and chlorpheniramine interaction in inhibitory avoidance in goldfish. *Behav Brain Res*, 147(1-2),83-88.[PMID: 14659573].
- Faraco, J. H., Appelbaum, L., Marin, W., Gaus, S. E., Mourrain, P. & Mignot, E. (2006). Regulation of hypocretin (orexin) expression in embryonic *Zebrafish*. *J Biol Chem*, 281(40),29753–29761. [DOI:10.1074/jbc.M605811200].
- Fischer, E. K., Harris, R. M., Hofmann, H. A. & Hoke, K. L. (2013). Predator exposure alters stress physiology in guppies across timescales. *Horm Behav*, 65(2),165-172. [DOI: 10.1016/j.yhbeh.2013.12.010].
- Fisone, G., Borgkvist, A. & Usiello, A. (2004). Caffeine as a psychomotor stimulant: mechanism of action. *Cell Mol Life Sci*, 61(7-8),857-872.
- Fong, P. P., & Ford A. T. (2014). The biological effects of antidepressants on the molluscs and crustaceans: a review. *Aquat Toxicol*, 151,4–13. [DOI: 10.1016/j.aquatox.2013.12.003].
- Fonken, L. K., Finy, M. S., Walton, J. C., Weil, Z. M., Workman, J. L., Ross, J. & Nelson, R. J. (2009). Influence of light at night on murine anxiety- and depressive-like responses. *Behav Brain Res*. 205(2),349–354. [DOI: 10.1016/j.bbr.2009.07.001].

- Fossat, P., Bacqué-Cazenave, J., De Deurwaerdère, P., Delbecque, J.-P., & Cattaert D. (2014). Comparative behavior. Anxiety-like behavior in crayfish is controlled by serotonin. *Science* 344(6189),1293–1297. [DOI: 10.1126/science.1248811].
- Franco, N. H. (2013). Animal experiments in biomedical research: a historical perspective. *Animals (Basel)*, 3(1),238-273. [DOI: 10.3390/ani3010238].
- Garção, D. C. & Mattioli, R. (2009). L-histidine reduces inhibitory avoidance in *Carassius auratus* submitted to cerebellar ablation. *Braz J Med Biol Res*, 42(1),135-40. [PubMed PMID: 19219307].
- Gerlai, R. (2010). Zebrafish antipredatory responses: a future for translational research? *Behav Brain Res*. 207,223–231.
- Gerlai, R., Lahav, M., Guo, S. & Rosenthal, A. (2000). Drinks like a fish: zebra fish (*Danio rerio*) as a behavior genetic model to study alcohol effects. *Pharmacol Biochem Behav*. 67(4),773-782. [DOI: 10.1016/S0091-3057(00)00422-6].
- Golan, D. E. (2009). *Princípios de farmacologia: a base fisiopatológica da farmacoterapia* (2a ed.). Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan.
- Godin, J-G. J., Dugatkin, L. A. (1996). Female mating preference for bold males in the *Guppy*, *Poecilia reticulata*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 93,10262-10267.
- Gomes, K. S., de Carvalho-Netto, E. F., Monte, K. C., Acco, B., Nogueira, P. J., & Nunes-de-Souza, R. L. (2009). Contrasting effects of acute and chronic treatment with imipramine and fluoxetine on inhibitory avoidance and escape responses in mice exposed to the elevated T-maze. *Brain Res Bull*, 78(6),323–327 [DOI: 10.1016/j.brainresbull.2008.11.003].
- Gouveia Jr, A. (1999). Modelos animais em psicopatologia: breves notas introdutórias. *Estudos de Psicologia*, 16(1), 13-16.
- Gouveia Jr, A., Maximino, C., Brito, T. M. (2006). *Comportamento de peixes: Vantagens e utilidades nas neurociências*. Bauru: Faculdade de Ciências/UNESP.
- 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. *Rev Etol*, 7(2),63-66.
- Graeff, F. G. (2010). Human fear and anxiety. In G. Koob, R. F. Thompson & M. Lemoal (Eds.). *Encyclopedia of Behavioral Neuroscience*. 2,70-75. Amsterdam: Elsevier Science Publishers.
- Granados-Fuentes, D. & Herzog, E. D. (2012). The clock shop: coupled circadian oscillators. *Exp Neurol*. 243,21-27. [DOI: 10.1016/j.expneurol.2012.10.011].
- Gray, J. A. & McNaughton, N. (2003). *The Neuropsychology of Anxiety: An Enquiry into the Functions of the Septo-Hippocampal System*. 2. ed. Oxford: Oxford University Press.
- Greek, C. R. & Greek, J. S. (2000). *Sacred cows and golden geese: the human cost of experiments on animals*. New York: Bloomsbury Academic.
- Guo, S. (2009). Using *Zebrafish* to assess the impact of drugs on neural development function. *Expert Opin Drug Discov*, 4(7),715-726. [DOI: 10.1517/17460440902988464].

- Hamilton, T. J., Kwan, G. T., Gallup, J., & Tresguerres, M. (2016). Acute fluoxetine exposure alters crab anxiety-like behaviour, but not aggressiveness. *Sci Rep*, 6,19850. [DOI: 10.1038/srep19850].
- Handley, S. L. & Mithani S. (1984). Effects of alpha-adrenoceptor agonists and antagonists in a maze-exploration model of “fear”-motivated behaviour. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*. 327(1),1-5. [PMID: 6149466].
- Hauptmann, G., Söll, L. & Gerster, T. (2002). The early embryonic *Zebrafish* forebrain is subdivided into molecularly distinct transverse and longitudinal domains. *Brain Res Bull*, 57(3-4),371-375. [PMID: 11922991].
- Heinrich, H. J. (2000). The history and development of the rat as a laboratory animal model. In G. Krinke (Ed.). *The Laboratory Rat*. 3-16. London: Academic Press.
- Hockley, F. A., Wilson, C. A. M. E., Brew, A. & Cable, J. (2014). Fish responses to flow velocity and turbulence in relation to size, sex and parasite load. *J R Soc Interface*, 11(91),20130814. [DOI: 10.1098/rsif.2013.0814].
- Hogg, S. A. (1996). Review of the validity and variability of the elevated plus-maze as an animal model of anxiety. *Pharmacol Biochem Behav*, 54(1),21-30. [DOI: 10.1016/0091-3057(95)02126-4].
- Howe, K., Clark, M. D., Torroja, C. F., Torrance, J., Berthelot, C., Muffato, M. et al. (2013). The *Zebrafish* reference genome sequence and its relationship to the human genome. *Nature*. 496(7446),498–503. [DOI: 10.1038/nature12111].
- Huber, R., Smith, K., Delago, A., Isaksson, K., & Kravitz, E. A. (1997). Serotonin and aggressive motivation in crustaceans: Altering the decision to retreat. *Proc Nat Acad Sci U S A*, 94(11), 5939–5942. [PMID: 9159179].
- Hughes, R. N. (1997). Intrinsic exploration in animals: Motives and measurement. *Behav Processes*. 41, 213-226. [PMID: 24896854].
- Hurd, M. W. & Cahill, G. M. (2002). Entraining signals initiate behavioral circadian rhythmicity in larval *Zebrafish*. *J Biol Rhythms*, 17(4),307–314. [DOI: 10.1177/074873002129002618].
- IBM Corp. (2011). *IBM SPSS Statistics for Windows, Version 20.0*. New York: IBM Corp.
- Kaasinen, V., Aalto, S., Någren, K. & Rinne, J. O. (2004). Dopaminergic effects of caffeine in the human striatum and thalamus. *Neuroreport*, 15(2),281-285.
- Kaliste, E. & Mering, S. (2007). The welfare of laboratory rats. In E. Kaliste. *The Welfare of Laboratory Animals*. 2,153-180. Dordrecht: Springer. [DOI: 10.1007/978-1-4020-2271-5\_7].
- Kalueff, A. V., Stewart, A. M. & Gerlai, R. (2014). *Zebrafish* as an emerging model for studying complex brain disorders. *Trends Pharmacol Sci*. 35(2),63–75. [DOI: 10.1016/j.tips.2013.12.002].
- Kandel, E. R. (2012) The molecular biology of memory: cAMP, PKA, CRE, CREB-1, CREB-2, and CPEB. *Mol Brain*. 5(14),1-12.

- Kaslin, J. & Panula, P. (2001). Comparative anatomy of the histaminergic and other aminergic systems in *Zebrafish (Danio rerio)*. *J Com Neurol*, 440(4),342-377. [PMID: 11745628].
- Kavaliers, M. & Chorelis, E. (2001). Antipredator responses and defensive behavior: ecological and ethological approaches for the neurosciences. *Neurosci Biobehav Rev*, 25(7-8),577-586. [PMID: 11801283].
- Kent, M. & Ojanguren, A. F. (2015). The effect of water temperature on routine swimming behaviour of new born guppies (*Poecilia reticulata*). *Biol Open*, 4(4),547-552. [DOI: 10.1242/bio.20149829].
- Killen, S. S., Croft, D. P., Salin, K., & Darden, S. K. (2016). Male sexually coercive behaviour drives increased swimming efficiency in female guppies. *Functional Ecology*, 30(4), 576–583. [DOI: 10.1111/1365-2435.12527].
- Knowlton, B. J., Shapiro, M. L. & Olton, D. S. (1989). Hippocampal seizures disrupt working memory performance but not reference memory acquisition. *Behav Neurosci*, 103(5),144-1147. [DOI: 10.1037/0735-7044.103.5.1144].
- Kolluru, G. R.; Grether, G. F., Dunlop, E. & South, S. H. (2009). Food availability and parasite infection influence mating tactics in guppies (*Poecilia reticulata*). *Behav Ecol*, 20(1),131-137. [DOI: 10.1093/beheco/arn124].
- Kong, X. F., Li, J. T. & Sun, X. W. (2014). Complete mitochondrial genome of the *Guppy (Poecilia reticulata)*. *Mitochondrial DNA*, 1-2. [DOI: 10.3109/19401736.2014.880902].
- Kwan, L., Cheng, Y. Y., Rodd, F. H. & Rowe, L. (2013). Sexual conflict and the function of genitalic claws in guppies (*Poecilia reticulata*). *Biol Lett*, 9(5),1-4. [DOI: 10.1098/rsbl.2013.0267].
- Lazzari, M., Bettini, S. & Franceschini, V. (2013). Immunocytochemical characterization of olfactory ensheathing cells in fish. *Brain Struct Funct*, 218(2),539-549. [DOI: 10.1007/s00429-012-0414-5].
- Lent, R. (2010). *Cem bilhões de neurônios – conceitos fundamentais de neurociência (2a ed.)*. São Paulo: Atheneu.
- Levin, E. D., Bencan, Z. & Cerutti, D. T. (2007). Anxiolytic effects of nicotine in *Zebrafish*. *Physiol Behav*, 90(1),54-58.[DOI: 10.1016/j.physbeh.2006.08.026]
- Lindholm, A. K., Head, M. L., Brooks, R. C., Rollins, L. A., Ingleby, F. C. & Zajitschek, S. R. (2014). Causes of male sexual trait divergence in introduced populations of guppies. *J Evol Biol*, 27(2),437-448. [DOI: 10.1111/jeb.12313].
- Lister RG. (1990). Ethologically-based animal models of anxiety disorders. *Pharmacol Ther*, 46(3),321-340. [DOI: 10.1016/j.physbeh.2006.08.026].
- Liu, L. & Lee, K. Y. (2014). Studies of In Vitro Embryo Culture of *Guppy (Poecilia reticulata)*. *Balsaenggwa Saengsiq*, 18(3),139-143. [DOI: 10.12717/DR.2014.18.3.139].
- López-Olmeda, J. F., Madrid, J. A. & Sánchez-Vásquez, F. J. (2006). Melatonin effects on food intake and activity rhythms in two fish species with different activity patterns:

- Diurnal (goldfish) and nocturnal (tench). *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol*, 44(2),180–187. [DOI: 10.1016/j.cbpa.2006.02.031].
- López-Patiño, M. A., Yu, L., Cabral, H. & Zhdanova, I. V. (2008). Anxiogenic effects of cocaine withdrawal in *Zebrafish*. *Physiol Behav*, 93(1-2),160-171. [DOI: 10.1016/j.physbeh.2007.08.013].
- Maehle, A. H. & Tröhler, U. (1987). Animal experimentation from antiquity to the end of the eighteenth century: Attitudes and arguments. In N. A. Rupke. *Vivisection in historical perspective*. 14-17. London: Croom Helm.
- Magno, L. D., Fontes, A., Gonçalves, B. M. & Gouveia Jr, A. (2015). Pharmacological study of the light/dark preference test in *Zebrafish* (*Danio rerio*): Waterborne administration. *Pharmacol Biochem Behav*, 135,169-176. [DOI: 10.1016/j.pbb.2015.05.014].
- Magurran, A. E. & Seghers, B. H. (1994a) A cost of sexual harassment in the *Guppy*, *Poecilia reticulata*. *Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences*, 258,89–92.
- Magurran, A. E. & Seghers, B. H. (1994b) Sexual conflict as a consequence of ecology – evidence from *Guppy*, *Poecilia reticulata*, populations in Trinidad. *Proceedings of the Royal Society of London Series B-Biological Sciences*, 255, 31–36.
- Magurran, A. E. (2005). *Evolutionary ecology: the Trinidadian Guppy*. Oxford Univ. Press, New York.
- Manns, J. R, Hopkins, R. O. & Squire, L. R. (2003). Semantic memory and the human hippocampus. *Neuron*, 38(1),127-133. [DOI: 10.1016/S0896-6273(03)00146-6].
- Mathur, P. & Guo, S. (2010). Use of *Zebrafish* as a model to understand mechanisms of addiction and complex neurobehavioral phenotypes. *Neurobiol Dis*, 40(1),66-72. [DOI: 10.1016/j.nbd.2010,05.016].
- Mathur, P., & Guo, S. (2011). Differences of acute versus chronic ethanol exposure on anxiety-like behavioral responses in *Zebrafish*. *Behav Brain Res*, 219(2),234-239. [DOI: 10.1016/j.bbr.2011.01.019].
- Maximino, C., Brito, T. M., Moraes, F. D., Oliveira, F. V., Taccolini, I. B., Pereira, P. M., Colmanetti, R., Lozano, R., Gazolla, R. A., Tenório, R., de Lacerda, R. I. T., Koshikene, R. S. T., de Oliveira Coelho Lameirão, V. S., Assis Pontes, A. A., Romão, C. F., Prado, V. M. & Gouveia Jr, A. (2007) A comparative analysis of the preference for dark environments in five teleosts. *International Journal of Comparative Psychology*, 20,351–67.
- Maximino, C., da Silva, A. W., Gouveia Jr, A. & Herculano, A. M. (2011). Pharmacological analysis of *Zebrafish* (*Danio rerio*) scototaxis. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*, 35(2),624-31. [DOI: 10.1016/j.pnpbp.2011.01.006].
- Maximino, C., Marques de Brito, T., Dias, C. A., Gouveia Jr, A. & Morato, S. (2010). Scotaxis as anxiety-like behavior in fish. *Nat Protoc*, 5(2),209-216. [DOI: 10.1038/nprot.2009.225].

- Maximino, C. (2011) *Parâmetros da escototaxia como modelo comportamental de ansiedade no paulistinha (Danio rerio, Cyprinidae, pisces)*. Dissertação (Mestrado em Neurociências e Biologia Celular)- Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Pará, Pará, Brasil.
- McIntyre, C. K., Power, A. E., Roozendaal, B. & McGaugh, J. L. (2003). Role of the basolateral amygdala in memory consolidation. *Ann N Y Acad Sci*, 985,273-293. [DOI: 10.1111/j.1749-6632.2003.tb07088.x].
- McNaughton, N. & Corr, P. J. (2004) A two-dimensional neuropsychology of defense: fear/anxiety and defensive distance. *Neurosci Biobehav Rev.* 28,285-305. [DOI: 10.1016/j.neubiorev.2004.03.005].
- Menelaou, E. & Svoboda, K. R. (2009). Secondary motoneurons in juvenile and adult *Zebrafish*: axonal pathfinding errors caused by embryonic nicotine exposure. *J Comp Neurol*, 512(3),305-322. [DOI: 10.1002/cne.21903].
- Mirhashemi, A. H., Ahmad Akhoundi, M. S., Sheikhzadeh, S., Momeni, N., Dehpour, A., Alaeddini, M., Kheirandish, Y., Farhadifard, H., & Ansari, E. (2015). Effect of Fluoxetine Consumption on Orthodontic Tooth Movement in Rats. *J Dent (Tehran, Iran)*, 12(12), 882–889. [PMID: 27559347].
- Miletto Petrazzini, M. E., Agrillo, C., Piffer, L., Dadda, M. & Bisazza, A. (2012). Development and application of a new method to investigate cognition in newborn guppies. *Behav Brain Res*, 233(2),443-449. [DOI: 10.1016/j.bbr.2012.05.044].
- Miller, B. H. & Takahashi, J. S. (2014). Central circadian control of female reproductive function. *Front Endocrinol (Lausanne)*, 22(4),195. [DOI: 10.3389/fendo.2013.00195].
- Moncada, D., Ballarini, F., Martinez, M. C., Frey, J. U. & Viola, H. (2011). Identification of transmitter systems and learning tag molecules involved in behavioral tagging during memory formation. *Proc Natl Acad Sci USA*, 108(31),12931-12936. [DOI: 10.1073/pnas.1104495108].
- Morris, C. J., Aeschbach, D. & Scheer, F. A. (2012). Circadian system, sleep and endocrinology. *Mol Cell Endocrinol*, 349(1),91–104. [DOI: 10.1016/j.mce.2011.09.003].
- Murty, A. S. (1988). *Toxicology of pesticide to fish*. Boca Raton: CRC Press.
- Ninkovic, J., Folchert, A., Makhankov, Y. V., Neuhaus, S. C., Sillabert, I., Straehle, U. & Bally-Cuif, L. (2006). Genetic identification of AChE as a positive modulator of addiction to the psychostimulant D-amphetamine in *Zebrafish*. *J Neurobiol*, 66(5),463-475. [DOI: 10.1002/neu.20231].
- NRC - National Research Council, Institute for Laboratory Animal Research (2004). *The development of science-based guidelines for laboratory animal care: Proceedings of the November 2003 International*. Washington DC: National Academies Press. [DOI:10.17226/11138].
- O'Keefe, J. & Nadel, L. (1978). *Hippocampus as a cognitive map*. Londres: Oxford University Press.
- O'Keefe, J. & Nadel, L. (1979). Précis of O'Keefe and Nadel's the Hippocampus as a Cognitive Map. *Behav Brain Sci*, 2,487-494. [DOI: 10.1017/S0140525X00063949].

- O'Steen, S., Cullum, A. J., Bennet, A. F. (2002). Rapid evolution of escape ability in Trinidadian guppies (*Poecilia reticulata*). *Evolution*, 56(4),776-784. [PMID: 12038535].
- Olton, D. S. (1990). Mnemonic Functions of the Hippocampus: Past, Present and Future. In L. R. Squire, E. Lindenlaub (Eds.). *The Biology of Memory: Symposium Bernried, Germany October 15th – 19th, 1989*. 427-443. Stuttgart: Schattauer Verlag.
- Oscar-Berman, M., & Marinkovic, K. (2007) Alcohol: effects on neurobehavioral functions and the brain. *Neuropsychol Rev*, 17(3):239–57. [DOI: 10.1007/s11065-007-9038-6].
- Pellow, S. & File, S. E. (1986). Anxiolytic and anxiogenic drug effects on exploratory activity in elevated plus-maze: a novel test of anxiety in the rat. *Pharmacol Biochem Behav*, 24(3),525-529. [DOI: 10.1016/0091-3057(86)90552-6].
- Pellow, S., Chopin, P., File, S. E. & Briley, M. (1985). Validation of open:closed arm entries in an elevated plus-maze as a measure of anxiety in the rat. *J Neurosci Methods*, 14(3),149-67. [DOI: 10.1016/0165-0270(85)90031-7].
- Pergher, G. K., Grassi-Oliveira, R., Ávila, L. M. de & Stein, L. M. (2006). Memória, humor e emoção. *Rev. Psiquiatria do Rio Grande do Sul*. 28(1),61-68.
- Pitychoutis, P. M., Pallis, E. G., Mikail, H. G., & Papadopoulou-Daifoti, Z. (2011). Individual differences in novelty-seeking predict differential responses to chronic antidepressant treatment through sex- and phenotype-dependent neurochemical signatures. *Behav Brain Res*, 223(1),154-168. [DOI: 10.1016/j.bbr.2011.04.036].
- Portavella, M. & Vargas, J. P. (2005). Emotional and spatial learning in goldfish is dependent on different telencephalic pallial systems. *Eur J Neurosci*, 21(10),2800-2806. [DOI: 10.1111/j.1460-9568.2005.04114.x].
- Reich, W. T. (1995). *Encyclopedia of Bioethics* (2a ed.). New York: Macmillan.
- Renoir, T., Zajac, M. S., Du, X., Pang, T. Y., Leang, L., Chevarin, C., Lanfumey, L., & Hannan, A. J. (2011). Sexually Dimorphic Serotonergic Dysfunction in a Mouse Model of Huntington's Disease and Depression. *PLoS ONE*, 6(7), e22133. [DOI: 10.1371/journal.pone.0022133].
- Rezvani, A. H., Sexton, H. G., Johnson, J., Wells, C., Gordon, K., & Levin, E. D. (2013). Effects of Caffeine on Alcohol Consumption and Nicotine Self-Administration in Rats. *Alcohol Clin Exp Res*. 37(9),1609–1617. [DOI: 10.1111/acer.12127].
- Richter-Levin, G. (2004). The amygdala, the hippocampus, and emotional modulation of memory. *Neuroscientist*, 10(1),31-39. [DOI: 10.1177/1073858403259955].
- Riehl, R., Kyzar, E., Allain, A., Green, J., Hook, M., Monnig, L. et al. (2011) Behavioral and physiological effects of acute ketamine exposure in adult Zebrafish. *Neurotoxicol Teratol*, 33(6),658-667. [DOI: 10.1016/j.ntt.2011.05.011].
- Robert, G., Drapier, D., Bentué-Ferrer, D., Renault, A., & Reymann, J. M. (2011). Acute and chronic anxiogenic-like response to fluoxetine in rats in the elevated plus-maze: modulation by stressful handling. *Behav Brain Res*, 220(2),344–348. [DOI: 10.1016/j.bbr.2011.01.051].

- Rodd, H. F., & Reznick, D. N. (1997). Variation in the demography of *Guppy* populations: the importance of predation and life histories. *Ecology* 78,405-418. [DOI: 10.2307/2266017].
- Roth, K. A., Adler, K., & Bobrow, M. N. (1999). 9 enhanced tyramide signal amplification immunohistochemical detection. *J Histochem Cytochem*,47(12),1644D-1645. [PMID: 10567456].
- Rudolph, U., & Knoflach, F. (2011). Beyond classical benzodiazepines: Novel therapeutic potential of GABA<sub>A</sub> receptor subtypes. *Nat Rev Drug Discov*, 10(9),685–697. [DOI: 10.1038/nrd3502].
- Ruell, E. W., Haldelsman, C. A., Hawkins, C. L., Sofaer, H. R., Ghalambor, C. K. & Angeloni, L. (2013). Fear, food and sexual ornamentation: plasticity of colour development in Trinidadian guppies. *Proc Biol Sci*, 280(1758),20122019. [DOI: 10.1098/rspb.2012.2019].
- Santangelo, E. M., Morato, S. & Mattioli, R. (2001). Facilitatory effect of substance P on learning and memory in the inhibitory avoidance test for goldfish. *Neurosci Lett*, 303(2),137-139. [PMID: 11311511].
- Schartl, M. (2014). Beyond the *Zebrafish*: diverse fish species for modeling human disease. *Dis Model Mech*, 7(2),181-192. [DOI: 10.1242/dmm.012245].
- Serra, E. L., Medalha, C. C. & Mattioli, R. (1999) Natural preference of *Zebrafish* (*Danio rerio*) for a dark environment. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 32,1551-1553, 1999. [DOI: 10.1590/S0100-879X1999001200016].
- Setini, A., Pierucci, F., Senatori, O., Nicotra, A. (2006). Molecular characterization of monoamine oxidase in *Zebrafish* (*Danio rerio*). *CBP:B*, 140,153-161. [DOI: 10.1016/j.cbpc.2004.10.002].
- Shook, B. C. & Jackson, P. F. (2011). Adenosine A(2A) Receptor Antagonists and Parkinson's Disease. *ACS Chem Neurosci*, 2(10),555-567.
- Shufeldt, R. W. (1900). Notes on the Psychology of fishes. *The American Naturalist*, 34(400),275-281.
- Squire, R. S. & Kandel, E. R. (2003). *Memória - da mente às moléculas*. Porto Alegre: Artmed.
- Stewart, A. M. & Kalueff, A. V. (2014). Anxiolytic drug discovery: what are the novel approaches and how can we improve them? *Expert Opin Drug Discov*, 9(1),15–26. [DOI: 10.1517/17460441.2014.857309].
- Swain, H. A., Sigstad, C. & Scalzo, M. (2004). Effect of dizocilpine (MK-801) on circling behavior, swimming activity, and place preference in *Zebrafish* (*Danio rerio*). *Neurotoxicol Teratol*, 26(6),725-729. [DOI: 10.1016/j.ntt.2004.06.009].
- Teixeira, R. C., Zangrossi Jr., H., & Graeff, F. G. (2000). Behavioral Effects of Acute and Chronic Imipramine in the Elevated T-Maze Model of Anxiety. *Pharmacol Biochem Behav*, 65(4),571–576. [PMID: 10764908].

- Temple, S. (2011). Why different regions of the retina have different spectral sensitivities: a review of mechanisms and functional significance of intraretinal variability in spectral sensitivity in vertebrates. *Vis Neurosci*, 28,281-293. [DOI: 10.1017/S0952523811000113].
- Teraoka, H., Russel, C., Regan, J., Chandrasekhar, A., Concha, M. L., Yokoyama, R., Higashi, K., Take-Uchi, M., Dong, W., Hiraga, T., Holder, N. & Wilson, S. W. (2004). Hedgehog and Fgf signaling pathways regulate the development of tphR-expressing serotonergic raphe neurons in *Zebrafish* embryos. *J Neurobiol*, 60,275-288. [DOI: 10.1002/neu.20023].
- Tovin, A., Alon, S., Ben-Moshe, Z., Mracek, P., Vatine, G., Foulkes, N. S. et al. (2012). Systematic identification of rhythmic genes reveals *camk1gb* as a new element in the circadian clockwork. *PLoS Genet*. 8(2),e1003116. [DOI: 10.1371/journal.pgen.1003116].
- Tran, S. & Gerlai, R. (2013). Individual differences in activity levels in *Zebrafish* (*Danio rerio*). *Behav Brain Res*, 257,224-229. [DOI: 10.1016/j.bbr.2013.09.040].
- Tricarico, E. & Gherardi F. (2007). Biogenic amines influence aggressiveness in crayfish but not their force or hierarchical rank. *Anim. Behav*, 74,1715–1724.
- Van Skike, C. E., Diaz-Granados, J. L., & Matthews, D. B. (2015). Chronic intermittent ethanol exposure produces persistent anxiety in adolescent and adult rats. *Alcohol Clin Exp Res*, 39(2):262-271. [DOI: 10.1111/acer.12617].
- Vatine, G., Vallone, D., Gothilf, Y., Foulkes, N. S. (2011). It's time to swim! *Zebrafish* and the circadian clock. *FEBS Lett*, 585(10),485–1494. [DOI: 10.1016/j.febslet.2011.04.007].
- Volkova, K., Reyhanian Caspillo, N., Porseryd, T., Hallgren, S., Dinnetz, P., Olsén, H. & Porsch Hällström, I. (2015). Transgenerational effects of 17 $\alpha$ -ethinyl estradiol on anxiety behavior in the *Guppy*, *Poecilia reticulata*. *Gen Comp Endocrinol*, 223,66-72. [DOI: 10.1016/j.ygcen.2015.09.027].
- Walsh-Monteiro, A., Pragana, W., Costa, E.T. & Gouveia Jr, A. (2014). Behavioral and histological effects of rotenone in fish (*Guppy*, *Poecilia reticulata*). *Psycho Neurosci*, 7(4),619-623. [DOI: 10.3922/j.psns.2014.4.22].
- Walsh-Monteiro, A., Pessoa, R. S.; Sanches, E. M., Carvalho, A. C. C., Silva, Y. C. B., Chirinéa, G., & Gouveia Jr, A. (2016). A new anxiety test for *Zebrafish*: plus-maze with ramp. *Psycho Neurosci*, submetido.
- Wang, J., Fan, Y., Dong, Y., Ma, M., Ma, Y., Dong, Y., Niu, Y., Jiang, Y., Wang, H., Wang, Z., Wu, L., Sun, H., & Cui, C. (2016). Alterations in Brain Structure and Functional Connectivity in Alcohol Dependent Patients and Possible Association with Impulsivity. *PLoS One*, 11(8),e0161956. [DOI: 10.1371/journal.pone.0161956].
- Wang, Y., Takai, R., Yoshioka, H. & Shirabe, K. (2006). Characterization and expression of serotonin transporter genes in *Zebrafish*. *Tohoku J Exp Med*, 208,267-274. [PMID: 16498236].
- Watson, C. T., Gray, S. M., Hoffmann, M., Lubieniecki, K. P., Joy, J. B., Sandkam, B. A., Weigel, D., Loew, E., Dreyer, C., Davidson, W. S. et al. (2010). Gene duplication and

divergence of long wavelength-sensitive opsin genes in the *Guppy*, *Poecilia reticulata*. *J Mol Evol*, 72,240-252. [DOI: 10.1007/s00239-010-9426-z].

Willner, P. & Mitchell, P. J. (2002). The validity of animal models of predisposition to depression. *Behav Pharmacol*, 13(3),169-188. [PMID: 12122308].

Willner, P. (1991). Behavioral models in psychopharmacology. In P. Willner (Org.). *Behavioral Models in Psychopharmacology: theoretical, industrial and clinical perspectives*. Cambridge: Cambridge University Press.

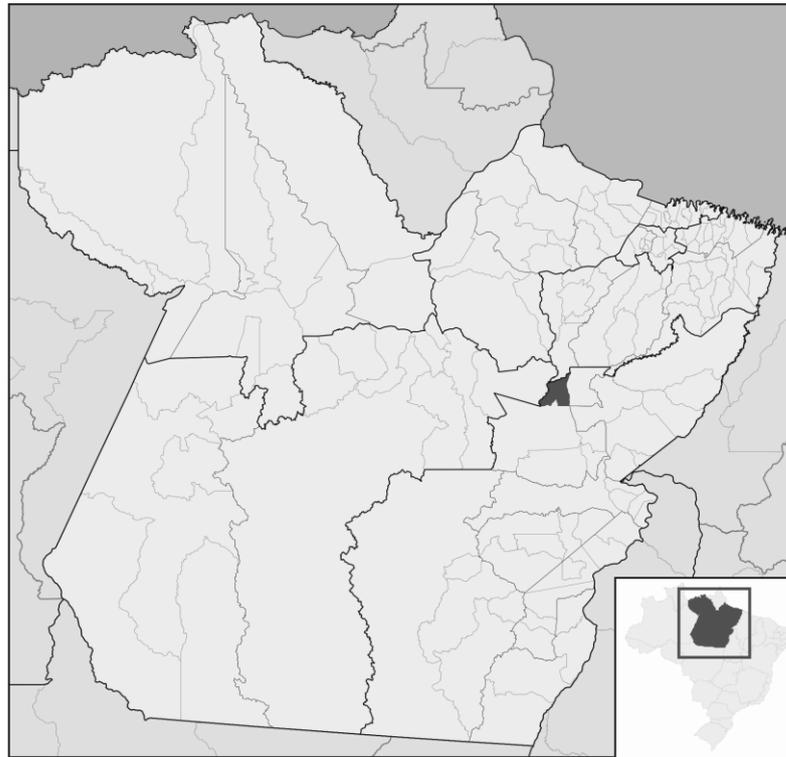
Wullimann, M. F. & Mueller, T. (2004). Teleostean and mammalian forebrains contrasted: evidence from genes to behavior. *J Comp Neurol*, 475,143-162. [DOI: 10.1002/cne.20183].

Wullimann, M. F. (1998). The central nervous system. In D. H. Evans (Ed.). *The physiology of fishes*. Boca Raton: CRC Press.

Yerkes, R. M. & Dodson, J. D. (1988). The relation of strength of stimulus to rapidity of habit-formation. *J Comp Neur Psychol*, 18(5),459-482. [DOI: 10.1002/cne.920180503].

## ANEXO

A



B



**Local de coleta dos animais experimentais utilizados no estudo.** Em A, mapa do estado do Pará com destaque em escuro para o município de Tucuruí. No plano inferior direito o mapa do Brasil com destaque ao estado do Pará. Em B, o ponto de coleta dos peixes no Igarapé Santana, município de Tucuruí (Latitude: 3°44'43.89"S; Longitude: 49°41'8.75"O)