



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

BRUNO RODRIGUES DOS SANTOS

VALIDAÇÃO FARMACOLÓGICA DA ESQUIVA
INIBITÓRIA DO *DANIO RERIO*

BELÉM
2013

BRUNO RODRIGUES DOS SANTOS

**VALIDAÇÃO FARMACOLÓGICA DA ESQUIVA
INIBITÓRIA DO *DANIO RERIO***

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

Orientador: Prof. Dr. Amauri Gouveia Junior

BELÉM

2013

Dados para catalogação na fonte
Biblioteca UFPA - Campus Abaetetuba

S237v Santos, Bruno Rodrigues dos
Validação farmacológica da esquiva inibitória do *danio rerio* /
Bruno Rodrigues dos Santos; orientador, Prof. Dr. Amauri Gouveia
Junior, 2013.
69 f. : il.

Tese (Doutorado) — Universidade Federal do Pará, Núcleo de Teoria
e Pesquisa do Comportamento, Pós-graduação em Teoria e Pesquisa
do Comportamento – Belém /Pa, 2013.

1. Peixes - Comportamento 2. Zebra Danio. 3. Behaviorismo
(Psicologia) 4. Esquiva (Psicologia) I. Universidade Federal do
Pará. Núcleo de Teoria e Pesquisa do Comportamento. Pós-graduação
em Teoria e Pesquisa do Comportamento. II. Título.

CDD: 591.5



TESE DE DOUTORADO

“Validação Farmalógica da Esquiva Inibitória do Danio Rerio”

Candidato: BRUNO RODRIGUES DOS SANTOS

Data da Defesa: 12 DE JULHO DE 2013.

Resultado: APROVADO.

Banca examinadora:

Prof. Dr. Amauri Goveia Junior (UFPA), Orientador.

Prof. Dr. Denis Broock Rosemberg (UNOCHAPECÓ), Membro.

Prof. Dr. Silvio Morato de Carvalho (USP/RP), Membro.

Prof^ª. Dr^ª. Edna Cristina Santos Franco (IEC), Membro.

Prof. Dr. Paulo Roney Kilpp Goulart (UFPA), Membro.

Dedico este trabalho aos meus pais Gilda e Augusto, minha avó Clarinha e minha esposa Juliane. Por todo amor, apoio e carinho que me deram ao longo dessa jornada. Ter vocês na minha vida é um presente.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a minha esposa Juliane, por se manter sempre ao meu lado, me dando a força necessária nos meus momentos de cansaço, nervosismo, vermelhos e até preguiça. Eu te amo muito e espero que você tenha a paciência de me deixar sempre ao seu lado. Obrigado por acontecer na minha vida!

Agradeço aos meus pais Gilda e Augusto, por me ensinarem a sonhar certo. Esta conquista é o fruto de um planejamento modesto que começou ainda antes de eu nascer. Eu só tenho a agradecer pelos pais maravilhosos que tive. Se eu tivesse que eleger uma coisa que deu certo na minha vida, esta coisa foi vocês. O resto foram apenas ensinamentos.

Agradeço a minha querida avó Clarinha que se orgulha de mim desde que eu era analfabeto. Talvez nunca consiga te devolver tudo aquilo que um dia você me deu. Mas isso não importa, eu vou continuar tentando. Te amo.

Agradeço aos meus irmãos Cintia e Henrique. Sempre estarei ao lado de vocês, não importa o que acontecer. Amo os dois.

Agradeço ao meu orientador Amauri. Você acreditou em mim durante a graduação, me ensinou muito durante o mestrado e agora está me formando no doutorado. Tenho muito orgulho de tê-lo durante toda esta caminhada. Hoje, não é apenas um orientador, mas um amigo. Obrigado.

Agradeço aos meus amigos de república Daniel e Rafael. Vocês foram irmãos que a vida colocou para mim. Entre empregos, desempregos, mudanças, convicções teóricas e chatices, tê-los faz de mim uma pessoa melhor. Obrigado pelos conselhos, conversas, cervejas, louças, festas, limpezas e hospitais. Obrigado por sempre cuidarem tão bem de mim. Poder e glória a todos!

Agradeço a meus cunhados Ana e Mauro por toda ajuda que tem me dado durante esse período. Agora tenho família em Belém e não poderia ter sido mais perfeito. Agradeço pelo convívio quase que diário com meu sobrinho João e, a mais nova da família, Bia. Vocês são muito importantes para mim.

Agradeço ao Juan e a Lúcia por cuidarem tão bem de meus pais. Obrigado pela paciência que sempre tiveram na eterna luta da convivência familiar.

Agradeço a toda família Medeiros pela convivência familiar que eu tanto sinto falta aqui em Belém. Amo muito a todos com suas personalidades, maneiras, brigas e paixões. Se hoje sou uma pessoa apaixonada pela vida, devo isso a vocês. Sinto muitas saudades de cada um.

Agradeço ao Cláudio e ao Caio, amigos de Bauru que estou tendo o prazer de conviver aqui em Belém. Vocês foram fundamentais para minha sanidade durante todo o processo do doutorado. Mesmo agora distantes espero tê-los sempre por perto. Obrigado.

Agradeço a todos da minha turma de graduação, amigos do laboratório e companheiros de movimento estudantil de Bauru. Eu aprendi muito com todos e me recordo com orgulho e carinho dos momentos que passamos juntos.

Agradeço aos meus amigos e companheiros de trabalho da UFPA-Abaetetuba Adelino, Afonso, Eliomar, Mara e Lina. O apoio que vocês me deram durante esse doutorado foi fundamental para a sua conclusão. Não há agradecimentos que expressem o quanto eu gosto e me sinto sortudo por trabalhar com profissionais tão maravilhosos. Entrei muito novo na universidade e posso afirmar que minha formação profissional é reflexo de nossas relações cotidianas. Para muito além de amigos, vocês são meu espelho. Obrigado.

Agradeço aos amigos do Laboratório de Neurociências e Comportamento. Obrigado pelas discussões, conselhos e acolhidas. Foram muitos que entraram e saíram nesse período, todos únicos e fundamentais. O dia-a-dia do laboratório não seria tão prazeroso se não fossem por vocês.

Agradeço a Pós-Graduação em Teoria e Pesquisa do Comportamento e aos seus docentes, por ter me acolhido com tanto carinho. Para mim foi surpreendente a forma como pensam a psicologia e seus fenômenos. Aqui eu avancei muito em minhas discussões e pensamentos. Definitivamente, não poderia ter feito o doutorado em um lugar melhor. Obrigado.

Agradeço a UFPA. Tenho muito orgulho de trabalhar nesta instituição e ainda mais em um campus do interior. Sou grato pela acolhida e pelo respeito com que esta instituição, juntamente com seus profissionais, tem me tratado. Termino o doutorado, mas permaneço enquanto professor e espero um dia ser um profissional a altura de carregar seu nome.

Por fim, agradeço a todos que leram esses agradecimentos até o fim. Sei que é um pouco comprido, mas alicerces não são construídos por pessoas sozinhas. Este sonho foi sonhado junto de todas essas pessoas ao longo de minha vida e, devo a elas, esta realização.

Poderoso para mim não é aquele que descobre ouro.
Para mim poderoso é aquele que descobre as
insignificâncias (do mundo e as nossas).
Por essa pequena sentença me elogiaram de imbecil.
Fiquei emocionado e chorei.
Sou fraco para elogios.

(Manoel de Barros)

Santos, B.R. (2013). **Validação Farmacológica da Esquiva Inibitória do *Danio rerio***. Tese de Doutorado Belém: Universidade Federal do Pará, Programa de Pós-Graduação em Teoria e Pesquisa do Comportamento. 59 páginas.

RESUMO

O *Danio rerio* é uma espécie de peixe muito utilizada em modelos de ansiedade devido ao fato que seu comportamento, anatomia, neuroanatomia e bioquímica estarem bem descritos na literatura. O Teste de esquiva inibitória é um modelo de ansiedade ainda em desenvolvimento para esta espécie, o qual consiste na supressão de um comportamento exploratório com a finalidade de evitação de um estímulo aversivo. Este experimento realizou o teste do lado claro como aversivo e a validação farmacológica da esquiva inibitória utilizando as seguintes drogas: antidepressivos – fluoxetina (5, 10 e 20 mg/kg) e imipramina (4, 8 e 16 mg/kg); ansiolíticos – diazepam (0,06, 1,25 e 2,5 mg/kg) e clonazepam (0,02, 0,05 e 1,10 mg/kg); e estimulantes – dietilpropiona (2,5, 5 e 10 mg/kg) e cafeína (10, 20 e 40 mg/kg). Os resultados confirmam a aversividade do lado claro no teste de esquiva inibitória. A fluoxetina, imipramina, cafeína e dietilpropina possuem efeito ansiogênico, assim impedindo a aquisição da esquiva inibitória, com exceção da imipramina 8 mg/kg que facilitou a esquiva. O diazepam também facilitou a aquisição da esquiva, enquanto que o clonazepam, embora não tenha alterado a aquisição da esquiva, apresenta efeito ansiolítico. Conclui-se que o teste de esquiva inibitória em *Danio rerio* é um efetivo modelo para o estudo da ansiedade.

Palavras-Chave: *Danio rerio*, Ansiedade, Preferência Claro/Escuro, Esquiva Inibitória

Santos, B.R. (2013). **Farmacology Validation of Inhibitory Avoidance in *Danio rerio***. Belém, (pp. 71), Doctoral Dissertation. Belém: University of Pará, Programa de Pós-Graduação em Teoria e Pesquisa do Comportamento. 59 pages.

ABSTRACT

The *Danio rerio* is a fish species widely used in emerging models of anxiety due to well described behavior, anatomy, neuroanatomy and biochemistry. The inhibitory avoidance test is an anxiety-related parameters in the model development that described a suppressed behavior emitted to avoid an aversive stimulus. This experiment aimed to describe the inhibitory avoidance aversiveness of white side and the pharmacological validation of this test by using the following drugs: antidepressants - fluoxetine (5, 10 and 20 mg/kg) and imipramine (4, 8 and 16 mg/kg), anxiolytics - diazepam (0.06, 1.25 and 2, 5 mg/kg) and clonazepam (0.02, 0.05 and 1.10 mg/kg), and stimulants - diethylpropion (2.5, 5 and 10 mg/kg) and caffeine (10, 20 and 40 mg/kg). The data confirm the aversiveness of the white side in inhibitory avoidance test. Fluoxetine, imipramine, caffeine and diethylpropion have anxiogenic-like effect and impaired inhibitory avoidance, excluding imipramine 8 mg/kg who facilitates its acquisition. Diazepam also facilitates inhibitory avoidance acquisition and clonazepam show anxiolytic-like effect on this test. These data show the effectiveness of inhibitory avoidance test as a model to study anxiety.

Palavras-Chave: *Danio rerio*, Anxiety, Light/Dark Preference, Inhibitory Avoidance

SUMÁRIO

RESUMO	VI
ABSTRACT.....	VII
INTRODUÇÃO	1
Ansiedade.....	1
Modelos Animais de Ansiedade.....	6
<i>Danio rerio</i> como modelo animal de ansiedade.....	9
Esquiva Inibitória	13
OBJETIVOS	19
MÉTODO.....	20
Sujeitos	20
Aparato.....	20
Tratamento Farmacológico	20
Procedimento.....	21
Análise Estatística	22
RESULTADOS.....	23
Teste de Campo Aberto.....	23
Teste de Esquiva Inibitória.....	24
Validação do Estímulo Claro como Aversivo	24
Validação Controle Sem Tratamento versus Sham.....	26
Antidepressivos	28
Benzodiazepínicos.....	31
Estimulantes	33
DISCUSSÃO.....	36
CONCLUSÃO	44
REFERÊNCIAS	45
APÊNDICE	56

INTRODUÇÃO

1. Ansiedade

Os mecanismos relativos à reação de defesa dos organismos são muito estudados devido a sua importante função para a sobrevivência e o bem estar dos indivíduos (Markou, 2012). Evidências indicam que uma importante parte das patologias psiquiátricas, tais como Depressão, Transtorno de Ansiedade, Transtorno de Pânico, entre outros, estão de alguma forma vinculados a estes mecanismos (Graeff, 2007; Graeff & Guimarães, 2005).

A reação de defesa ocorre em situações em que um animal se vê defronte a um perigo intenso, produzindo assim uma sequência previsível de respostas fisiológicas, e comportamentais, os quais apresentam função de retirada ou diminuição da aversividade no ambiente, sendo ambas as sequências similares em todos os mamíferos (Blanchard, Yudko, Rodgers e Blanchard, 1993).

As respostas da reação de defesa ocorrem em três níveis, os quais dependem do valor de evitabilidade/proximidade da ameaça, ou seja, quando o perigo é (1) evitável ou distal, (2) evitável ou moderado e (3) inevitável ou proximal (Blanchard e Blanchard, 1988; Graeff, 1994). Os comportamentos estão ligados a basicamente quatro estratégias: congelamento, fuga, agressão defensiva ou submissão. De modo geral, o congelamento ocorre quando o sujeito apresenta paralisia frente à ameaça; fuga está ligada a comportamentos que permitem o aumento da distância entre o sujeito e a ameaça; agressão defensiva ocorre quando em situação de encurralamento o sujeito inicia luta; e submissão refere-se aos comportamentos que demonstram rendição (Blanchard e Blanchard, 1988; Paula, Torricelli, Lopreato, Nascimento, e Viana, 2012).

Observa-se que os níveis da reação de defesa estão diretamente relacionados à interação entre o organismo e os estímulos aversivos, sendo apresentadas respostas diferentes dependendo de seu valor e distância (Gouveia Jr., Maximino, e Brito, 2006). Dentre estes níveis podemos encontrar diversos mecanismos de defesa. Para diferenciá-los, é necessário primeiro o entendimento dos conceitos: (1) a distância defensiva e (2) a direção defensiva (Gray e McNaughton, 2003; McNaughton e Corr, 2004; McNaughton, 2011).

O conceito de distância defensiva corresponde ao espaço físico entre o sujeito e uma ameaça (McNaughton, 2011) e possui três níveis, cada qual correspondente a uma reação de defesa específica. O primeiro nível seria o de ameaça potencial, quando a ameaça não está presente, mas pode aparecer. O segundo nível é o de ameaça presente, mas ainda evitável. E o terceiro nível é o de ameaça presente e inevitável. Para estes níveis, existem comportamentos

respectivos que são os mais prováveis: exploração cautelosa/levantamento de risco, inibição comportamental/congelamento e fuga/luta (Graeff, 2003). Estruturas neurais específicas também foram observadas, as quais são do primeiro para o terceiro nível: amígdala, septo-hipocampal e matéria cinzenta pariaquedutal.

A Tabela 1 apresenta os modelos explicativos que apontam o papel da distância defensiva na reação de defesa.

Tabela 1. Nível de defesa, comportamento, mecanismo correlato e estrutura neural relacionada. Baseado na tabela de Graeff (2011).

Ameaça	Reação de Defesa	Mecanismo	Estrutura Neural
Conflito Incerto	Levantamento de Risco/ Inibição Comportamental	Ansiedade	Córtex Pré-Frontal/ Septo- Hipocampal/ Amígdala
Antecipação	Congelamento	Ansiedade	Amígdala/ vPAG
(CS)	Esquiva	Medo Condicionado	Amígdala
Distal (US)	Fuga	Medo Incondicionado	Hipotálamo Medial
Proximal (US)	Fuga/ Congelamento/ Luta	Pânico	dPAG

US – Estímulo Incondicionado; CS – Estímulo Condicionado; vPAG – Matéria Cinzenta Pariaquedutal Ventral; dPAG - Matéria Cinzenta Pariaquedutal Dorsal

Como observado na Tabela 1, quando o estímulo aversivo ou ameaça não está presente, pode-se observar dois tipos de situações (1) Conflito Incerto e (2) Antecipação. Neste caso para haver antecipação, o estímulo aversivo deve ser pareado a um estímulo neutro ou natural, por exemplo, cheiro correspondente, local específico e etc. Para cada um destes casos existe um comportamento relacionado à reação de defesa, este comportamento é mediado por uma estrutura específica. O mecanismo descrito corresponde à emoção mais próxima ao um padrão clínico e que compreende a junção entre os componentes neurais, proprioceptivos e comportamentais. Que no caso destas situações, é o mecanismo de ansiedade e de medo condicionada (Graeff, 2003).

Já quando a ameaça está presente e é distal, o comportamento mais provável é a fuga e o mecanismo correlato é o de medo incondicionado. Quando a distância é próxima o mecanismo é de pânico e os comportamentos mais prováveis são congelamento ou fuga. O que é interessante desta situação é que os comportamentos descritos embora apresentem a mesma topografia, função e nome, estes são mediados por estruturas neurais diferenciadas. Portanto, em um quadro clínico em que o congelamento ocorre, uma droga que age na

Matéria Cinzenta Pariaquedutal Dorsal (dPAG) poderá alterar o comportamento, mas o mesmo pode continuar caso este esteja sendo organizado por outra estrutura. O comportamento neste caso passa a ser considerado um sintoma que pode indicar diversos graus e tipos de transtornos (Graeff, 2011).

A partir deste modelo explicativo, observou-se o Duplo Papel da Serotonina (5-HT) nesses mecanismos de defesa (Graeff, Viana e Mora, 1997). A modulação serotoninérgica nas estruturas neurais tem importante papel para a construção dos mecanismos de defesa. O aumento de serotonina na amígdala facilita a reação de defesa relacionada ao mecanismo de ansiedade e medo, os quais estão relacionados respectivamente a distância potencial e distal. Enquanto isso, a diminuição serotoninérgica na dPAG facilita a defesa do mecanismo de pânico relacionada a distância proximal (Graeff 2007; Graeff, 2003; Graeff, 2002).

McNaughton (2011), McNaughton e Corr (2004) e Gray e McNaughton (2003), modificaram esse modelo explicativo acrescentando o conceito de direção defensiva e aprimorando a teoria do Duplo Papel da Serotonina no mecanismo de defesa. Neste caso, direção defensiva corresponde ao movimento de afastamento ou aproximação realizado pelo sujeito em relação a ameaça. A Tabela 2 apresenta como este modelo explicativo relaciona distância e direção defensiva, bem como o papel da serotonina na reação de defesa.

Tabela 2. Relação entre afastamento e aproximação defensiva e as respostas neurais e comportamentais do indivíduo em função da distância da ameaça. Tabela baseada nos trabalhos de McNaughton (2011), McNaughton & Corr (2004) e Gray & McNaughton (2003).

Distância	Afastamento Defensivo (Medo)			Aproximação Defensiva (Ansiedade)		
	Neural	5-HT	Patologia	Neural	5-HT	Patologia
6 (Distal)	Córtex Pré-frontal	+	TOC	Córtex Pré-frontal	+	Ansiedade Social
5	Cingulado Anterior	+	TOC	Cingulado Posterior	+	Agorafobia
4	Amígdala	+	Fobia	Septo-Hipocampal	+	Ansiedade Generalizada
3	Amígdala	+	Fobia	Amígdala	+	Ansiedade Generalizada
2	Hipotálamo Medial	+	Fobia	Hipotálamo Medial	?	Ansiedade Focada
1 (Proximal)	PAG	-	Pânico	PAG	?	Pânico Antecipatório

TOC = Transtorno Obsessivo Compulsivo; PAG = Matéria Cinzenta Periaquedutal; “+” = aumento; “-” = diminuição; “?” = não há informações.

Este modelo explicativo, ao invés de comportamento provável, descreve a patologia clínica apresentada em situação de distância e direção específicas. Na Tabela 2, a coluna de distância corresponde a 6 graus, indo do mais distante para o mais próximo. O grau 6 sendo o distal ou evitável e o 1 proximal ou inevitável. Para cada grau, há sempre uma patologia clínica definida, bem como uma estrutura neural responsável.

O afastamento defensivo está diretamente relacionado ao mecanismo de medo, enquanto que a aproximação defensiva está relacionada ao mecanismo de ansiedade. Para ambos os casos o estímulo aversivo pode ser tanto potencial (condicionado), quanto real (incondicionado). A primeira situação se dá em momentos em que a ameaça está presente e encontra-se a determinada distância. Enquanto que a segunda corresponde a momentos em que há a concorrência entre um reforçador que controla o comportamento de seguir em frente e o estímulo aversivo, que controla a fuga/esquiva. No caso de aproximação defensiva, o comportamento é ser controlado pelo reforçador, mas sempre apresenta comportamentos de avaliação de risco ao longo da aproximação.

O papel duplo da serotonina implica em um aumento (+) ou diminuição (-) da mesma em áreas do sistema nervoso para o desenvolvimento destas patologias. Para os graus 1 e 2 de aproximação defensiva o papel da serotonina é desconhecido.

Os comportamentos mais prováveis descritos são mais claros para os graus 4, 3, 2, e 1 do afastamento defensivo, são respectivamente a esquiva, prontidão, fuga e congelamento/luta. E para os graus 4, 3, 2 e 1 da aproximação defensiva, são aversão, prontidão/susto, levantamento de risco e aquiescência defensiva.

McNaughton e Corr (2004) descreveram três sistemas principais que contribuem para a formulação dos conceitos de aproximação defensiva. Esses sistemas são o BAS (Sistema de Aproximação Comportamental), o FFFS (Sistema de Fuga, Luta e Congelamento) e o BIS (Sistema de Inibição Comportamental). Em uma situação hipotética em que o animal encontra-se em um dilema entre um reforço e um punidor duas opções são possíveis: (1) escapar do punidor, comportamento organizado pelo sistema FFFS, ou (2) ir em direção ao reforçador, organizado pelo sistema BAS. Para ambas opções o sistema BIS estará presente. Este sistema aumenta a atenção e levantamento de risco, assim possibilitando a detecção do conflito. A informação passada pelo BIS pode diminuir os comportamentos produzidos por FFFS e BAS. Segundo os autores, o mecanismo de ansiedade está envolvido nas ações do BIS e o de medo no FFFS. Desta maneira, a ansiedade passa a ser necessária em momentos de possibilidade de punição propiciando melhor levantamento de risco e aumentando a possibilidade de fuga ou esquiva. Enquanto que o medo é um sistema complexo de última instância que age na necessidade de fuga e esquiva.

Um dos testes comportamentais que tenta descrever esses mecanismos é o teste de Labirinto em T elevado. Este teste foi validado por Zangrossi Jr & Graeff (1997) e Torrejais, Rosa, Boerngen-Lacerda, & Andreatini (2008). O Labirinto em T elevado constitui-se de dois braços perpendiculares (formando um T) suspensos a 50 cm do chão, os quais possuem dimensões necessárias para um roedor caminhar. Um dos braços possui uma parede (braço fechado) e o outro não possui parede (braço aberto). Utiliza-se neste caso duas tendências naturais do rato, a de exploração e a de evitar a altura permanecendo no braço fechado. Para este teste, o estímulo aversivo utilizado é altura.

O animal é colocado no início do braço fechado. Mede-se o tempo entre sua colocação na caixa e sua entrada no braço aberto. São realizadas três tentativas (linha de base, esquiva 1 e esquiva 2). Após essas três tentativas o animal é colocado no início do braço aberto. Mede-

se o tempo de entrada do braço aberto para o braço fechado. Para este procedimento é realizado apenas uma tentativa (escapada).

No primeiro caso, a primeira tentativa (linha de base) tem função de medir a exploração, enquanto que as outras duas tentativas correspondem à medida da ansiedade, considerando o tempo que o animal leva para ir em direção (aproximação defensiva) da ameaça. O animal, neste caso, tende a aumentar o seu tempo de permanência no braço fechado ao longo das tentativas, portanto, drogas que possuem um efeito ansiolítico produzem a diminuição destas latências (facilitando a aproximação defensiva) e drogas que possuem efeito ansiogênico produzem um aumento destas latências (dificultando a aproximação defensiva). Drogas que possuem apenas efeito sobre o mecanismo de medo não produzem nenhuma alteração nesta primeira parte do teste (McNaughton & Corr, 2004). No segundo teste, o sujeito ao ser colocado diretamente no braço aberto, já se encontra em situação de ameaça, portanto, a saída do mesmo deste local corresponde ao afastamento defensivo.

Assim, construir novos modelos animais de ansiedade pode contribuir para um melhor desenvolvimento desses modelos explicativos.

2. Modelos Animais de Ansiedade

Assim como o estudo de diversas áreas, o entendimento dos mecanismos de ansiedade dependem da utilização de modelos. O termo modelo possui sua raiz no latim *modellus* que significa medida, o que por sua vez implica em uma construção teórica simplificada com função de explicar um determinado fenômeno. Assim, um modelo é um constructo teórico capaz de explicar e medir suas propriedades complexas. Mas, para tal, ele precisa possuir, necessariamente, essas três características: reatividade, pontualidade e *Zeitgeist* (Gouveia Jr., 1999).

Reatividade refere-se à propriedade do modelo de selecionar e analisar apenas os elementos representativos do fenômeno, que devem ser selecionados com um recorte específico. A este recorte específico dá-se o nome de pontualidade. Já o *zeitgeist*, caracteriza-se pelas influências teóricas as quais determinam a reatividade e a pontualidade do modelo (Wilner, 1991). Assim, pode-se observar que um modelo corresponde a um recorte de um fenômeno em seus aspectos essenciais com base em um todo teórico.

Um bom modelo é aquele que é capaz de confirmar hipótese e prever o fenômeno, possuir similaridade com o mesmo e ser de fácil uso, execução e replicação. Essas características são conhecidas respectivamente como valor preditivo, valor de face e valor de uso (Gouveia Jr., 1999).

Contudo, um modelo animal é aquele que usa de arranjos experimentais cujos sujeitos são animais, sendo que suas propriedades escolhidas para a análise mimetizam características humanas. Neste sentido, modelos animais de ansiedade são procedimentos que utilizam animais, os quais mimetizam sintomas ou comportamentos de ansiedade com a finalidade de predição e análise deste fenômeno (Sanger, 1991).

Os modelos animais de ansiedade podem utilizar em geral dois tipos de comportamentos: respostas incondicionadas e respostas condicionadas (Kalueff, Wheaton, & Murphy, 2007; Rodgers, Cao, Dalvi, & Holmes, 1997). Respostas incondicionadas correspondem a arranjos experimentais que utilizam estímulos aversivos naturais. Testes com arranjos experimentais vinculados a respostas incondicionadas são menos complexos, já que são respostas que não exigem treino. Também são muito utilizados devido ao grau de estabilidade da resposta. Já as respostas condicionadas correspondem ao arranjo em que há o pareamento de um estímulo aleatório ao estímulo aversivo natural, exigindo treino ao longo do procedimento experimental. Neste caso, os arranjos experimentais que utilizam respostas condicionadas precisam lidar com a variabilidade intersujeitos, mas possibilitam observar a ecologia do mecanismo de defesa em caso de ameaça potencial e adaptação deste mecanismo ao longo de novas situações (Gouveia Jr. et al., 2006; Rodgers, Cao, Dalvi, & Holmes, 1997).

São diversos os testes realizados que utilizam esses dois tipos de respostas. Na Tabela 3 encontram-se alguns dos testes que apresentam boa validade (Cryan & Sweeney, 2011) e que são bastante conhecidos no Brasil. Lembrando sempre que testes são técnicas ou procedimentos específicos que se utilizam do constructo do modelo com a finalidade de estudar e analisar o fenômeno (Gouveia Jr., 1999).

Tabela 3. Alguns dos modelos animais de ansiedade observados na literatura e uma breve descrição dos mesmos.

Teste*	Aversivo	Resposta	Breve Descrição	Referencias
Bateria de Teste de Reação Defensiva	Predador	Incondicionada	Roedores são expostos ao predador morto/anestesiado. Medidas Principais: comportamentos de fuga, <i>freezing</i> , ataque defensivo, levantamento de risco	(Blanchard, Griebel, & Blanchard, 2003; Griebel et al. 1995; Blanchard et al. 1990)
Campo Aberto	Ambiente desconhecido	Incondicionada	Observa-se a exploração livre do animal a uma arena. Medida Principal: padrão de exploração	(Lamprea, Cardenas, Setem, & Morato, 2008; Royce, 1977; Walsh & Cummins, 1976)
Conflito de Vogel	Choque	Condicionada	Roedores privados de água recebem choque ao lamber bebedouro. Medida principal: número de choques ou número de lambidas	Umezu, 1999
Escototaxia	Clareza	Incondicionada	Em um aparato retangular metade branco e metade preto. Medida Principal: o tempo de permanência em cada uma das metades	(Maximino, Brito, Dias, Gouveia Jr, & Morato, 2010; Costall et al., 1989; Wojcik, Mitros, Jastreboff, & Zielinski, 1975)
Esquiva Ativa ou Inibitória	Dano em Potencial	Condicionada	Em um aparato específico o animal deverá emitir ou suprimir um comportamento a fim de evitar um estímulo aversivo. Medidas Principais: latência de emissão do comportamento e número de tentativas para aquisição da esquiva	(Ahmed, Seguin, & Gerlai, 2010; Bammer, 1982)
Labirinto em Cruz	Altura	Incondicionada	Labirinto em cruz a uma altura específica contendo um braço fechado e um braço aberto. Medida Principal: tempo de permanência em cada um dos braços.	(Handley & McBlane, 1993; Hogg, 1996)
Labirinto em T	Altura	Incondicionada e Condicionada	Labirinto em T a uma altura específica contendo um braço fechado e um braço aberto. Medidas Principais: tempo de permanência ou saída dos braços e número de tentativas para aquisição do da esquiva ou da fuga	(Graeff, Netto, & Zangrossi Jr, 1998; Torrejais, Rosa, Boerngen-Lacerda, & Andreatini, 2008; Zangrossi Jr & Graeff, 1997)

* Retirados de: Cryan e Sweeney (2011); Tabach (2011); Forkman, Boissy, Meunier-Salaün, Canali, e Jones (2007); Kalueff et al. (2007); Kalueff e Tuohimaa (2004); Martin (1998); Cruz, Zangrossi Jr e Graeff (1997); Rodgers et al. (1997).

A Tabela 3 apresenta os modelos animais de ansiedade mais utilizados na literatura. Todos estes são melhores descritos no Apêndice. Todos os modelos descritos acima utilizam ratos. Apenas os testes de campo aberto, esQUIVA inibitória e escototaxia são também modelos que utilizam peixes.

A maioria dos modelos utilizam respostas incondicionadas pela facilidade do procedimento e pela consistência das respostas. Todos estes testes utilizam a tendência natural de exploração dos animais, colocando o animal em situação de conflito entre o explorar o ambiente e a ameaça. Por isso, parte de suas medidas principais são latência de tempo no ambiente aversivo e, quando em mamíferos, comportamentos que demonstram levantamento de risco do ambiente ou relaxamento (limpar-se, coçar e etc.).

Os modelos que utilizam respostas condicionadas utilizam tanto aversivos naturais, os quais ao longo da exposição contínua ao ambiente ou tratamento farmacológico passam a ter um maior ou menor controle sobre o comportamento exploratório. Ou fazem o pareamento de estímulos neutros arbitrários como campainha, lado do aquário/caixa, pressão a barra, etc., com um estímulo aversivo, sendo o choque o mais comumente utilizado.

3. *Danio rerio* como modelo animal de ansiedade

No geral, o estudo com peixe pode mostrar bastante vantajoso por ser barato, necessitar de pouco espaço e uma estrutura reduzida. Pode-se armazenar até 20 sujeitos em um espaço único, sendo que a sua alimentação e cuidados não exigem uma grande sofisticação (Gouveia Jr. et al., 2006; Müller, 2005).

Peixes são modelos, que apresentam padrões neurais, bioquímicos e comportamentais funcionalmente análogos aos mamíferos, incluindo humanos (Gouveia Jr., Maximino, e Brito, 2006). O telencéfalo do peixe é desenvolvido através da porção rostral do tubo neural embrionário, o qual forma-se com dois hemisférios. Além de telencéfalo, o Sistema Nervoso Central (SNC) também possui mesencéfalo e diencéfalo tegmentar, cerebelo e corpo e válvula cerebelar. Pesquisas envolvendo bases olfatórias, visuais e paladar são realizadas devido ao alto grau de especialização destas funções no sistema nervoso (Kotrschal, Van Staaden e Huber, 1998).

Galhardo e Oliveira (2005), em sua revisão de estudos sobre bem estar em peixes apontam que existem investigações, em diversas espécies que revelam comportamentos indicadores de atenção seletiva a estímulos, capacidade de respostas antecipatórias, capacidade de possuir expectativas e capacidade de direcionamento flexível e integrado das respostas comportamentais. São exemplos destas características cognitivas: o uso de

informações em interações sociais adquiridas a partir de observações entre co-específicos; reconhecimento individual com subsequente alteração do comportamento (estratégias de luta e mudança de cor); memória espacial complexa e flexível, com recursos a diversas estratégias adaptativas, incluindo formação de mapas cognitivos; e associação de estímulos distintos e não emparelhados, evidenciando comportamento antecipatório e predição das consequências dos seus atos.

Quando se trata do mecanismo de ansiedade em peixes, estudos indicam que existem estruturas telencefálicas homólogas entre mamíferos e peixes teleósteos. Existem indícios que o pallium medial e o pallium lateral, estruturas telencefálicas dos teleósteos, podem ser homólogas a amígdala e hipocampo dos mamíferos, respectivamente (Vargas *et al.*, 2006; Gomez *et al.*, 2006; Portavella e Vargas, 2005; Portavella, Torres e Salas, 2004; Portavella *et al.*, 2003; Portavella *et al.*, 2002).

O peixe Paulistinha, *Zebrafish* ou, nome científico, *Danio rerio*, é um dos peixes mais utilizados devido a apresentação de padrões de comportamento estáveis, de ter sua neuroanatomia bem descrita (Flinn, 2008) e sua ecologia conhecida (Subbiah e Kar, 2013; Bilotta, 2001; Houart, 2001). Desde 1970, este animal vem se desenvolvendo enquanto um grande modelo de processos comportamentais e fisiológicos, se estabelecendo e apresentando grande relevância nos dias atuais (Meunier, 2012). Contudo, para estudiosos do comportamento, o que torna o *Danio rerio* um excelente modelo animal de ansiedade é a sua consistência de respostas e similaridade dos roedores, os quais preserva a validade do modelo, bem como a validade de constructo e farmacológica (Subbiah e Kar, 2013; Stewart *et al.*, 2012). A Tabela 4 apresenta alguns modelos comportamentais desenvolvidos para *Danio rerio*.

Tabela 4. Testes desenvolvidos com *Danio rerio* para análise dos mecanismos de ansiedade e que apresentam validação.

Teste	Validação Modelo	Efeito Ansiolítico	Efeito Ansiogênico	Referência
Preferencia Claro-Escuro	E.L. Serra e Mattioli (1999); Maximino et al. (2010);	Fluoxetina (5 e 10mg/kg) Clorodiazepoxido (0,2 mg/kg) Clonazepam (0,5 mg/kg) diazepam (1,25 e 2,5 mg/kg) Buspirona (25 e 50 mg/kg) Etanol	Cafeína (100 mg/kg)	Maximino, Silva, Gouea Jr., e Herculano (2011);
		Clonazepam (0.3 mg/L) Bromazepam (1.5 mg/L) Diazepam (0.16 mg/L) Buspirone (1 and 3 mg/L) Propranolol (3 mg/L) Ethanol (0.25 and 0.5%)	---	Gebauer et al. (2011);
Campo Aberto	Stewart et al. (2010);	---	Cocaína (0.12, 0.17 e 0.23 mg/L)	Lopez-Patino, Yu, Cabral, e Zhdanova (2008); Lopez-Patino, Yu, Yamamoto, e Zhdanova (2008);
Esquiva Inibitória	Ahmed, Seguin e Gerlai (2010); Gerlai, Fernandes, e Pereira (2009); Huntingford e Wright (1989);	Ver Tabela 5	Ver Tabela 5	Ver Tabela 5

Pode-se observar que o Teste de Preferência Claro-Escuro é bem explorado, sendo o qual apresenta estudos que realizam a sua validação farmacológica. Maximino et al. (2011), indicou que doses agudas de fluoxetina aumentaram, enquanto que doses altas de clonazepam diminuiram a atividade locomotora no Teste de Preferência Claro-Escuro. Gebauer et al. (2011) identificou o aumento da atividade locomotora em sujeitos que foram submetidos a Buspirona (1mg/l).

Já os Testes de Campo Aberto e Esquiva Inibitória, apesar de serem validados e utilizados em *Danio rerio* como modelos animais ainda precisam de maiores estudos e, principalmente, de uma validação farmacológica. Outros testes como Teste de Cardumeamento, Teste de Preferência Social e o Teste de Coragem e Aproximação de Objetos Novos, também foram validados. Mas novamente, não há validação farmacológica para estes modelos (Stewart et al., 2012).

Outro teste bastante utilizado e que apresenta estudos que já indicam uma validação farmacológica é o *Novel Tank Test*. Neste teste, o animal é colocado em um aquário com profundidade aproximada de 60 cm, mede-se o tempo de permanência no centro, fundo e superfície. A medida ansiolítica é o aumento do tempo na superfície e a medida ansiogênia é o aumento do tempo no fundo (Stewart et al., 2012). Neste teste, as drogas que apresentaram efeito ansiolítico neste teste foram: Etanol em doses crônicas, Clordiazapoxido, Diazepam, Buspirona, Fluoxetina, Desimipramina e Nicotina. Já Cafeína, Etanol em doses agudas, apresentaram efeito ansiogênico (Mathur e Guo, 2011; Wong et al., 2010; Becan, Sledge e Levin, 2009).

Assim, observa-se que, apesar do *Danio rerio* apresentar grandes possibilidades de ser um excelente modelo animal para o estudo da ansiedade, grande parte dos modelos desenvolvidos são com estímulos aversivos incondicionados. Para estes testes, sua validação farmacológica apresenta resultados próximos aos encontrados na literatura de ratos (Maximo et al., 2011). Observa-se também que embora exista a validação da esquiva inibitória como modelo de ansiedade que possui aversivo condicionado, não há validação farmacológica deste modelo.

4. Esquiva Inibitória

A esquiva inibitória é um teste muito utilizado como modelo de ansiedade (Forkman, Boissy, Meunier-Salaün, Canali, & Jones, 2007; Martin, 1998; Rodgers et al., 1997). Esquiva consiste na prevenção de um estímulo aversivo por uma resposta (Catania, 1999), portanto o teste de esquiva reproduz um arranjo ambiental no qual uma resposta deve ser emitida (esquiva ativa) ou suprimida (esquiva passiva/inibitória) com função de evitação do estímulo aversivo (Nahas, 1999; Silva, Batistão e Castreghini, 1987). Sendo esta resposta correspondente a um comportamento de defesa que pode ser modificado de acordo com a exposição do organismo as contingências ambientais (Bolles, 1970; Dinsmoor, 1977; Herrnstein, 1969). Esta exposição contínua ao aversivo possibilita o aumento da emissão de comportamentos de evitação do mesmo antes mesmo de sua apresentação.

Faganello e Mattioli (2007), pesquisou o efeito da clorferinamina (16 mg/kg) na esquiva inibitória em peixes *Carassius auratus* que sofreram e não sofreram ablação do Telencéfalo. Para tal, os testes foram realizados em um aquário (15 altura x 15 largura x 25 comprimento cm) sendo metade preto e metade branco. Acima do compartimento preto havia um peso de 45 g. O teste era iniciado colocando-se o animal no compartimento branco, separado do preto por uma barreira. Após 10 min a barreira era retirada e o animal era exposto a todo aquário. Toda vez que o animal entrava no compartimento preto, o peso de 45 g era liberado, caindo na água e induzindo o animal a voltar para o compartimento branco. Neste ponto o teste encerrava-se. Foram realizados 3 tentativas para cada animal, sendo medidas a latência de tempo entre a retirada da barreira e a liberação do peso. A aquisição da esquiva corresponde desta latência ao longo dessas três tentativas. Neste caso, o comportamento explorar o compartimento preto foi suprimido a fim de evitar o peso (estímulo aversivo).

Neste experimento, os resultados indicam que a clorferinamina (16 mg/kg), que age sobre o sistema histaminérgico, possui um efeito idêntico ao diazepam (1 mg/kg), droga que age sobre o sistema GABAérgico, assim produzindo uma diminuição na latência de entrada no compartimento preto. Portanto, a autora conclui que a clorferinamina dificultou a aquisição da esquiva inibitória ao longo das três tentativas.

O estudo de Faganello e Mattioli (2007), portanto, encontra-se como exemplo de uma esquiva inibitória. Já os pesquisadores Portavella e Vargas (2005) realizaram um experimento com esquiva ativa, no qual identificavam a função o *Pallium Medial* do peixe *Carassius auratus* como a área telencefálica responsável por essa aprendizagem.

Para tal, Portavella e Vargas (2005), utilizaram uma *Shuttle Box*, ou seja, um aquário com as dimensões (50 x 25 x 14 cm), contendo dois eletrodos em cada ponta, uma barreira central em formato de trapézio com sensor o qual possibilitava identificar a movimentação do peixe entre os compartimentos esquerdo e direito, bem como uma lâmpada verde. O teste consistia em 20 sessões de 10 tentativas cada, distribuídas ao longo de 20 dias de experimento. Cada tentativa era separada por um intervalo de tempo variável de 1 a 2 minutos.

O animal era exposto ao aquário por um período de 2 min. Após este tempo, uma luz verde era acesa e o animal tinha até 10 segundos para trocar de compartimento, independentemente ao qual compartimento ele se encontrava ao acender a luz. A troca de compartimento neste período de 10 segundos era seguida apenas pelo desligamento da luz, já a não troca era seguida por um choque. Assim, pode-se observar uma esquiva ativa, na qual houve a evitação do estímulo aversivo pela emissão da resposta de mudar de compartimento. Neste experimento, os animais que sofreram ablação do *Pallium Medial* apresentaram maior dificuldade para adquirir esta resposta.

Desta forma, o teste de esquiva possui uma grande abrangência e pode ser utilizado de maneira adequada para o estudo dos mecanismos de medo e ansiedade. Observa-se em ambos os casos de esquiva inibitória ou ativa, o pareamento de estímulos neutros (lado do aquário e luz) ao estímulo aversivo, possibilitando assim que o controle do comportamento de evitação ocorresse a partir de um estímulo condicionado que indicava a potencialidade do aversivo.

A Tabela 5 apresenta a validação farmacológica do teste de esquiva.

Tabela 5. Efeito de drogas encontradas na literatura no teste de esquiva inibitória em roedores ou peixes

Droga	Ação	Teste (Animal)	Esquiva	Referencia
Amitriptilina	Inibição da Captura de NA/5- HT	Esquiva Inibitória (Roedores)	0	Arenas et al. (2006)
Fluoxetina	Inibidor Seletivo de Recaptação de 5-HT	Esquiva Inibitória (Roedores)	0	Arenas et al. (2006)
		Esquiva Inibitória (Roedores)	–	Monleón et al. (2002)
		Esquiva Inibitória (LTE - Roedores)	0	Gomes et al. (2009)
Imipramina	Inibição da Captura de NA/5- HT	Esquiva Inibitória (LTE - Roedores)	Crônico: – Agudo: +	Gomes et al. (2009)
		Esquiva Inibitória (LTE - Roedores)	Crônico: –	Dombrowski e Andreatini (2006)
		Esquiva Inibitória (LTE - Roedores)	Crônico: – Agudo: –	Teixeira, Zangrossi Jr., e Graeff (2000)
Maprotilina	Inibidor Seletivo de Recaptação de Noradrenalina	Esquiva Inibitória (Roedores)	0	Arenas et al. (2006)
Paroxetina	Inibidor Seletivo de Recaptação de 5-HT	Esquiva Inibitória (LTE - Roedores)	0	Sela et al. (2011)
8-OH-DPAT	Impede Liberação de 5-HT	Esquiva Inibitória (LTE - Roedores)	+	Viana, Zangrossi Jr., e Onusic (2008)
		Esquiva Inibitória (LTE - Roedores)	–	F.G. Graeff, Guimarães, Andrade, e Deakins (1996)
Midazolam	Liga-se ao receptor GABA/ Benzodiazepínicos	Esquiva Inibitória (LTE - Roedores)	–	Bueno, Zangrossi Jr, e Viana (2007)
		Esquiva Inibitória (LTE - Roedores)	–	Viana et al. (2008)
Diazepam	Liga-se ao receptor GABA/	Esquiva Inibitória (LTE - Roedores)	–	Echeverry et al.(2001)

	Benzodiazepínicos	Esquiva Ativa (Roedores)	–	Jung, Depoortere, e Oglesby (2001)
		Esquiva Inibitória (Roedores)	–	Faganello e Mattioli (2007)
Buspirona	Agonista 5-HT1A	Esquiva Ativa (Roedores)	–	Jung et al. (2001)
		Esquiva Inibitória (LTE - Roedores)	–	Graeff et al. (1998)
Clorferinamina	Inibidor Histaminérgico	Esquiva Inibitória (<i>Goldfish</i>)	–	Faganello e Mattioli (2007)
DOI	Agonista 5-HT2A	Esquiva Inibitória (LTE - Roedores)	+	Paula et al. (2012)
Ketanserina	Antagonista 5- HT2A	Esquiva Inibitória (LTE - Roedores)	0	Paula et al. (2012)
MK-212	Agonista 5-HT2C	Esquiva Inibitória (LTE - Roedores)	0	Paula et al. (2012)
Sibutramina	Inibidor da Recaptação de 5- HT, DA e NA	Esquiva Inibitória (LTE - Roedores)	–	Jorge et al. (2004)

Legenda: 5-HT = Serotonina; NA= Noradrenalina; DA = Dopamina; Esquiva Inibitória (LTE) = teste de esquiva inibitória realizado no teste de Labirinto em T Elevado; “+” = facilitou; “–” = impediu; “0” = sem efeito.

Pode-se observar na Tabela 5 que a maioria dos testes farmacológicos foram realizados com esquiva inibitória, sendo grande parte destas pesquisas vinculadas ao Teste de Labirinto em T Elevado com roedores. Estas pesquisas resumem-se em descrever as funções serotoninérgica e GABAérgica para o mecanismo de ansiedade.

Em peixes grande parte dos estudos ocorreram com *Carassius auratus*, sendo parte deles vinculados a validação do modelo e organização das estruturas neurais que coordenam a esquiva em peixes (Vargas *et al.*, 2006; Gomez *et al.*, 2006; Portavella e Vargas, 2005; Portavella, Torres e Salas, 2004; Portavella *et al.*, 2003; Portavella *et al.*, 2002). Apenas os estudos de Faganello e Mattioli (2007) buscou validar a esquiva inibitória em *Carassius auratus* para a clorferinamina, um inibidor histaminérgico. Não há outros estudos em peixes que indiquem a validação farmacológica da esquiva inibitória, implicando assim em um modelo de ansiedade peixes que não apresenta dados acerca do efeito de drogas serotoninérgicas e GABAérgicas. Implicando assim na impossibilidade da comparação entre este modelo em peixes e roedores.

Deve-se lembrar de que os Benzodiazepínicos (midazolam, diazepam e clonazepam) são fármacos que atuam seletivamente sobre os receptores de GABA_A, assim intensificando a resposta do GABA e, conseqüentemente, facilitando a abertura de canais de cloreto, os quais possuem um efeito inibitório do sistema nervoso central. Seus efeitos são: diminuição da ansiedade e agressividade, perda de tônus muscular e aumento de sono (Rang, Dale, Ritter, & Flower, 2007). Enquanto que os inibidores seletivos de serotonina (fluoxetina e paroxetina) e os inibidores de captação de dopamina e noradrenalina (imipramina, amitriptilina e maprotilina) produzem o aumento destes neurotransmissores na fenda sináptica. (Rang et al., 2007).

Os dados acima indicam que no teste de esquiva inibitória em roedores, drogas benzodiazepínicas e buspirona, apresentam efeito ansiolítico, assim impedindo ou dificultando a aquisição da esquiva inibitória, com exceção do diazepam em dose alta. Os antidepressivos também apresentam efeitos ansiolíticos, a imipramina (antidepressivo tricíclico) em doses crônicas e a fluoxetina (Monleón et al., 2002) apresenta um impedimento na aquisição deste comportamento. Apenas a imipramina em dose aguda apresenta efeito ansiogênico, facilitando a aquisição da esquiva inibitória.

Poucos são os estudos acerca do efeito de estimulantes, inibidores de captação de dopamina ou noradrenalina, com exceção daqueles fármacos conhecidos como antidepressivos tricíclicos (imipramina, amitriptilina e maprotilina). Observa-se que, com relação a estas drogas, os dados encontrados ainda não apresentam consistência que permitem a afirmação acerca das funções dopaminérgicas e noradrenérgicas no teste de esquiva inibitória. Embora dados encontrados na literatura indiquem que ambos neurotransmissores produzam efeitos ansiogênicos em doses elevadas (Rodgers et al., 1997).

Desta maneira, esse trabalho pretende identificar e realizar a validação farmacológica da do teste de esquiva inibitória utilizando o *Danio rerio* como modelo animal. A tabela 6 apresenta as drogas que serão utilizadas e seus mecanismos de ação

Tabela 6. Drogas que serão avaliadas neste trabalho, com seu uso clínico mais comum e tipo de mecanismo de ação. Baseado em Rang e Dale (2011).

Droga	Uso clínico	Mecanismo de Ação
Fluoxetina	Antidepressivo	Inibidor Seletivo de Recaptação de Serotonina
Imipramina	Antidepressivo Tricíclico	Inibidor da Captura de Serotonina e Noradrenalina
Clonazepam	Calmanes/ Ansiolíticos	Benzodiazepínicos que potencializam a ação do GABA
Diazepam	Calmanes/ Ansiolíticos	Benzodiazepínicos que potencializam a ação do GABA
Dietilpropiona	Estimulante anoréxico	Anoréxico que atua na liberação de Noradrenalina
Cafeína	Estimulante	Metil-xantina antagonista de receptores de adenosina. Aumenta ligeiramente a ação de noradrenalina e dopamina

Portanto, esta validação será realizada utilizando antidepressivos, benzodiazepínicos e estimulantes.

OBJETIVOS

Objetivo Geral

Realizar a Validação Farmacológica do Teste de Esquiva Inibitória para *Danio rerio* com antidepressivos (imipramina e fluoxetina), benzodiazepínicos (diazepam e clonazepam) e estimulantes (cafeína e dietilpropiona).

Objetivos específicos

- Verificar a aversividade do compartimento branco no Teste de Esquiva Inibitória para *Danio rerio*.

- Descrever os efeitos de antidepressivos (imipramina e fluoxetina), benzodiazepínicos (diazepam e clonazepam) e estimulantes (dietilpropiona e cafeína) no teste de esquiva esquiva inibitória para *Danio rerio*.

- Compreender a relação entre esquiva inibitória e os mecanismos de ansiedade. Bem como a sua interação com antidepressivos, benzodiazepínicos e estimulantes.

MÉTODO

Sujeitos

Foram utilizados *Danio rerio* (N= 184), sexo indeterminado, com peso médio de 0,33 g, mantidos em aquários coletivos (N= 60). Todos os animais foram comprados em Pet Shops Locais (Belém-PA) e sofreram aclimatação por 15 dias antes do início dos experimentos com iluminação de 14/10h (início 6:00 h), Ph $7,0\pm 1$ e temperatura média de $24^{\circ}\pm 2$ °C.

Aparato

Para o Teste de Aversividade do Claro, utilizou-se outros 4 aquários, todos de mesma dimensão (45x10x15 cm) e com uma porta guilhotina separando o aparato em dois compartimentos sendo um menor com 10 cm e outro maior com 35 cm. No primeiro aquário o compartimento menor é preto e o maior branco, já no segundo aquário há a inversão destes com o menor branco e o maior preto. Nos terceiro e quarto aquários os compartimentos possuíam as mesmas cores, sendo respectivamente, todo preto e todo branco. A coluna de água foi mantida em 7 cm.

Para o Teste de Esquiva Inibitória foi utilizado apenas o primeiro aquário branco e preto (45x10x15 cm) dividido por uma porta guilhotina, a qual separava o aparato em dois compartimentos, sendo o menor da cor preta (10 cm) e o maior da cor branca (35 cm). Neste experimento também era realizado com uma coluna de água de 7 cm.

Para o Teste de Campo Aberto foi utilizado um aquário redondo ($r = 8\text{cm}$) com uma coluna de água de 3 cm.

Tratamento Farmacológico

Todas as drogas foram injetadas intraperitonealmente, no volume de 10 μl com o auxílio de uma seringa Hamilton. Todas as drogas foram dissolvidas em água destilada. A tabela 7 indica as drogas utilizadas, com seu uso clínico e as doses administradas.

Tabela 7. Drogas utilizadas, seu uso clínico e as doses¹ (mg/kg) administradas.

Uso Clínico	Droga	Dose	Dose	Dose
Antidepressivos	Fluoxetina	5 mg/kg	10 mg/kg	20 mg/kg
	Imipramina	4 mg/kg	8 mg/kg	16 mg/kg
Ansiolíticos	Diazepam	0,06 mg/kg	1,25 mg/kg	2,5 mg/kg
	Clonazepam	0,02 mg/kg	0,05 mg/kg	0,10 mg/kg
Estimulantes	Dietilpropiona	2,5 mg/kg	5 mg/kg	10 mg/kg
	Cafeína	5 mg/kg	10 mg/kg	20 mg/kg

O Teste de Campo Aberto foi iniciado 5 minutos após a administração das respectivas drogas. Este era seguido pelo Teste de Esquiva Inibitória, portanto, 10 minutos após a administração.

Procedimento

Os grupos foram submetidos aos seguintes testes:

- Teste de Aversividade do Claro: Para este teste foram utilizados 32 animais, segundo o aquário usado (os quatro aquários descritos anteriormente foram utilizados). Cada grupo (N=8) foi exposto a um aquário diferente. Primeiramente, o sujeito era colocado no compartimento menor, isolado pela porta guilhotina, a qual impedia o acesso ao compartimento maior. Após 300s de habituação a porta guilhotina era aberta. Foi medido o tempo de permanência no compartimento menor em segundos, que corresponde a latência de tempo entre abertura da guilhotina e a entrada do sujeito no compartimento maior. O teste é composto em 5 tentativas, sendo que cada uma terminava quando o sujeito entrava no compartimento maior ou permanecia 300 s ininterruptos no compartimento menor. Em ambas as opções, o animal era retirado do aquário com uma rede própria e reinserido no compartimento menor já isolado pela guilhotina. Entendeu-se que a entrada ao compartimento

¹ Para cada dose foi produzida uma solução maior de 25 ml, a qual era retirada a quantidade de 10 µl contendo a quantidade da dose descrita na Tabela 6. A quantidade de droga dissolvida na solução maior de 25 ml é, portanto, a dose descrita acima multiplicada pela quantidade de solução (25 ml), dividido pela quantidade que seria retirada (10 µl). O resultado deste cálculo seria o valor da droga dissolvida para um sujeito de um quilograma, o valor corrigido para um animal de aproximadamente 0,33 g era exatamente o total que seria dissolvido na solução maior.

maior ocorria quando todo o corpo do animal estava neste compartimento. O teste encerrava-se ao final das 5 tentativas.

- Teste de Esquiva Inibitória: Para este estudo foram utilizados 160 animais, segundo dose da droga e tipo da droga descritos acima. Os sujeitos de cada grupo (N=8) eram expostos apenas ao aquário cujo compartimento menor é preto e o compartimento maior é branco. O teste consistia em 5 tentativas, as quais possuíam o mesmo procedimentos das tentativas na validação do teste de esquiva inibitória. Foi medido o tempo de permanência no compartimento preto. O experimento era encerrando ao final das cinco tentativas.
- Teste de Campo Aberto: Os sujeitos eram os mesmo do experimento de Teste de esquiva Inibitória. Os sujeitos de cada grupo (N=8) foram expostos individualmente ao aparato de campo aberto. Os sujeitos eram colocados ao centro do aparato, permanecendo por 300 s em nado livre para exploração do mesmo. Foram medidas a ambulação total e o tempo de permanência no centro durante os 300 s de nado livre. Cada teste foi filmado e suas imagens foram transcritas com o software X-Plot-Rat. Os animais expostos a ao Teste de Aversidade do Claro não foram submetidos ao teste de campo aberto, os demais grupos foram.

Cada dose descrita na Tabela 6 constituiu um grupo experimental (N=8), o qual foi exposto aos testes de esquiva inibitória e campo aberto. Com a finalidade de controle, dois grupo, um Sem Tratamento (N=8) e outro Sham (N=8), foram expostos aos mesmos testes, sendo respectivamente, o primeiro sem injeção e o segundo com administração intraperitonal de 10µg de salina.

Análise Estatística

Os dados foram submetidos a análise de normalidade pelo teste de Komorovv-Sminoff, sendo que, em caso de normalidade, a análise estatística foi realizadas com ANOVA com Pós-Teste de Tukey, quando necessário, em caso de não apresentarem normalidade, foi utilizado o teste de Kruskal-Wallis, seguido de teste de Dunn quando necessário.

RESULTADOS

Teste de Campo Aberto

A Tabela 8 descreve o resultado do Tempo de Permanência no Centro (Média \pm Erro Padrão) em segundos e Ambulação Total (Média \pm Erro Padrão) de todos os Tratamentos, em suas respectivas doses, para o Teste de Campo Aberto.

Tabela 8. Média (\pm Erro Padrão) das medidas de Tempo de Permanência (segundos) no Centro e Ambulação Total para cada tratamento no Teste de Campo Aberto.

TRATAMENTO	DOSE (MG/KG)	TEMPO CENTRO (S)	AMBULAÇÃO TOTAL
CONTROLE	0	148,29 (\pm 38,86)	142,38 (\pm 32,09)
SHAM	Salina	91,80 (\pm 19,18)	122,38 (\pm 10,98)
FLOXETINA	5	93,86 (\pm 16,43)	150,50 (\pm 15,21)
	10	93,68 (\pm 20,30)	156,13 (\pm 23,13)
	20	68,23 (\pm 11,76)	113,00 (\pm 17,96)
IMIPRAMINA	4	62,03 (\pm 20,26)	48,75 (\pm 11,57)
	8	99,59 (\pm 15,66)	140,50 (\pm 32,93)
	12	74,18 (\pm 16,62)	121,25 (\pm 18,11)
CLONAZEPAM	0,1	77,02 (\pm 20,56)	131,63 (\pm 18,97)
	0,05	66,66 (\pm 9,75)	113,25 (\pm 19,39)
	0,25	67,16 (\pm 17,56)	156,00 (\pm 18,47)
DIAZEPAM	0,06	98,85 (\pm 26,78)	201,50 (\pm 23,08)
	1,25	97,31 (\pm 20,59)	143,13 (\pm 38,62)
	2,5	98,03 (\pm 16,50)	142,00 (\pm 20,03)

	2,5	52,09 (\pm 14,72)	133,63 (\pm 19,94)
DIETILPROPIONA	5	77,58 (\pm 12,60)	160,50 (\pm 26,38)
	10	69,89 (\pm 20,97)	114,38 (\pm 17,79)
CAFEÍNA	5	96,71 (\pm 14,72)	136,25 (\pm 16,58)
	10	92,85 (\pm 20,17)	146,75 (\pm 13,74)
	20	95,18 (\pm 23,88)	146,75 (\pm 32,70)

A análise estatística indica que não há diferenças significativas nem no Tempo de Permanência no Centro [$H_7=9,067$, $p=0,248$], nem para Ambulação Total [$F_{7,159}=1,507$, $p=0,169$]. Assim indicando que no Teste de Campo Aberto, ambos os comportamentos, quando comparamos aos grupos controle e sham com os demais, mantiveram-se equivalentes, não sofrendo alteração de injeção salina ou da administração de drogas em todas as suas dosagens.

Teste de Esquiva Inibitória

Para melhor análise do Teste de Esquiva Inibitória, os resultados serão apresentados em duas partes principais, sendo a primeira referente à validação do estímulo claro com aversivo no Teste de Esquiva Inibitória. E na segunda, serão apresentados os resultados dos tratamentos: Sham, Fluoxetina, Imipramina, Clonazepam, Diazepam, Cafeína e Dietilpropiona.

Validação do Estímulo Claro como Aversivo

Abaixo está o resultado da Validação do estímulo claro com aversivo no Teste de Esquiva Inibitória para os aquários Preto/Branco (PB), Preto/Preto (PP), Branco/Branco (BB) e Branco/Preto (BP). Cada aquário possui dois compartimentos, um menor e outro maior (verificar medidas em método), sendo o compartimento menor correspondente a primeira cor descrita no nome do aquário. Assim, para o aquário PB, o compartimento menor corresponde

a cor preta. Para os demais aquários PP, BB e BP, o compartimento menor corresponde respectivamente às cores preto, branco e branco.

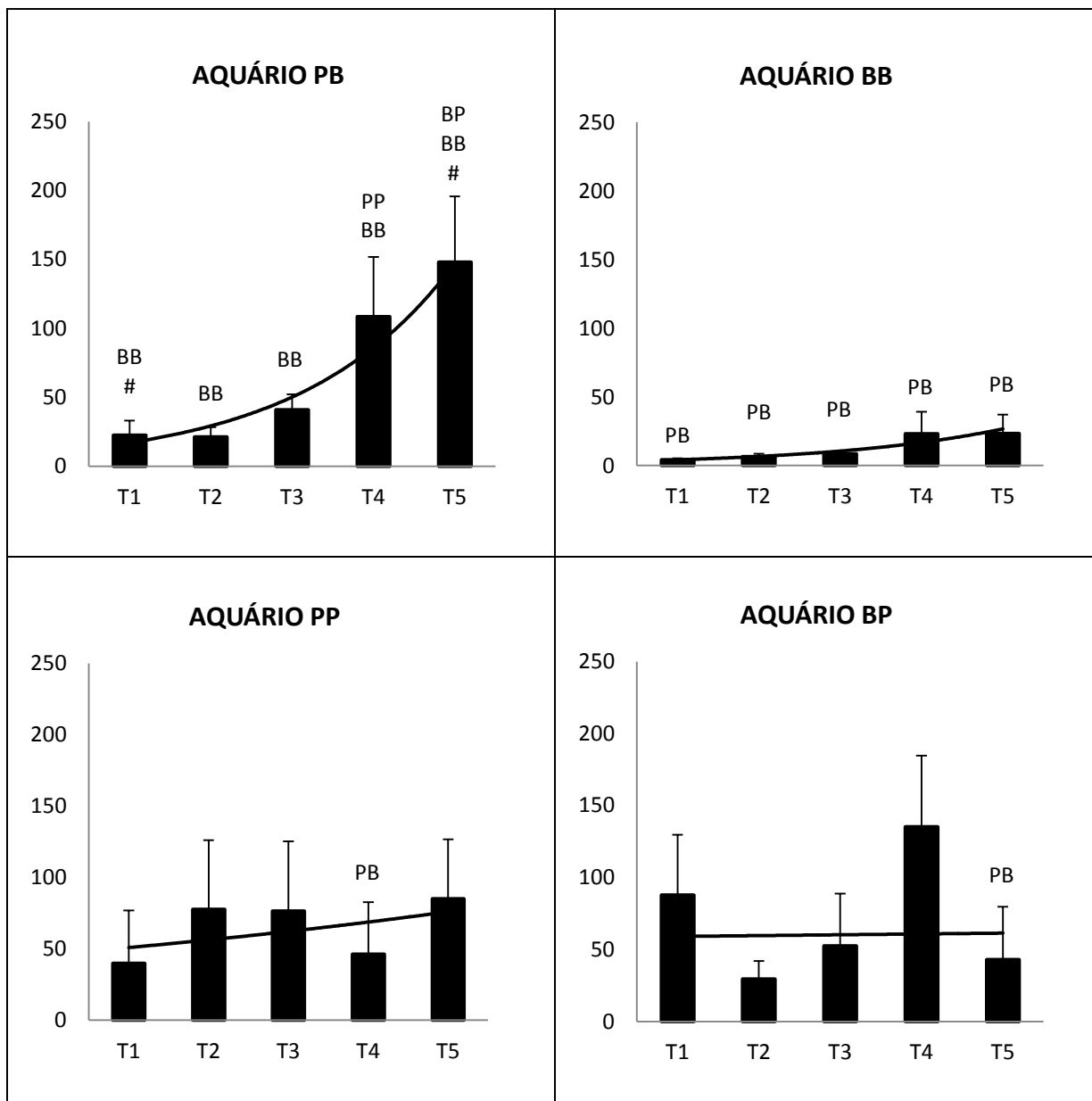


GRÁFICO 1. Tempo de Permanência (Média ± EP) no compartimento menor (segundos) ao longo das cinco tentativas. PB = Preto e Branco; BB = Branco e Branco; BP = Branco e Preto; e PP = Preto e Preto. Quando colocado sobre as barras, indica diferença entre o dado observado e o dado obtido no aquário citado. “#” indica diferenças entre tentativas T1 e T5.

No GRÁFICO 1, os fatores analisados são ao tempo de permanência (média ± erro padrão) no compartimento menor em segundos em relação a cada tentativa realizada nos aquários PB, BB, PP e BP. Como se pode observar na linha de tendência do aquário PB, o

tempo de permanência no compartimento menor aumenta ao longo das tentativas, chegando a apresentar diferença estatisticamente significativa entre as tentativas [$H_1=4,438$, $p=0,038$], indicando diferenças entre T1 e T5 no pós-teste. Já para os outros aquários, a linha de tendência não indica um aumento gradual do tempo de permanência ao longo das tentativas. A análise estatística confirma este dado, apresentando que não há diferenças significativas entre as tentativas nos aquários BB [$H_4=3,541$, $p=0,472$], PP [$H_4=4,290$, $p=0,368$] e BP [$H_4=7,501$, $p=0,112$].

Quando comparadas cada uma das tentativas do aquário PB com as respectivas tentativas dos demais aquários, encontrou-se diferenças significantes entre todas as tentativas dos aquários BB e PB, T1 [$H_1=5,625$, $p=0,015$], T2 [$H_1=3,980$, $p=0,05$], T3 [$H_1=8,136$, $p<0,01$], T4 [$H_1=4,711$, $p=0,028$], T5 [$H_1=6,689$, $p<0,01$]. O aquário PP apresentou diferença em T4 dos demais [$H_1=4,029$, $p=0,05$], enquanto que o aquário BP apresentou diferença em T5 dos demais [$H_1=6,20$, $p=0,01$]. Todas as diferenças apresentadas são decorrentes um menor do tempo de permanência no compartimento menor em relação a PB.

Validação Controle Sem Tratamento versus Sham

Abaixo estão os resultados dos grupos Controle: Sem Tratamento (ST) e Sham (injeção com salina).

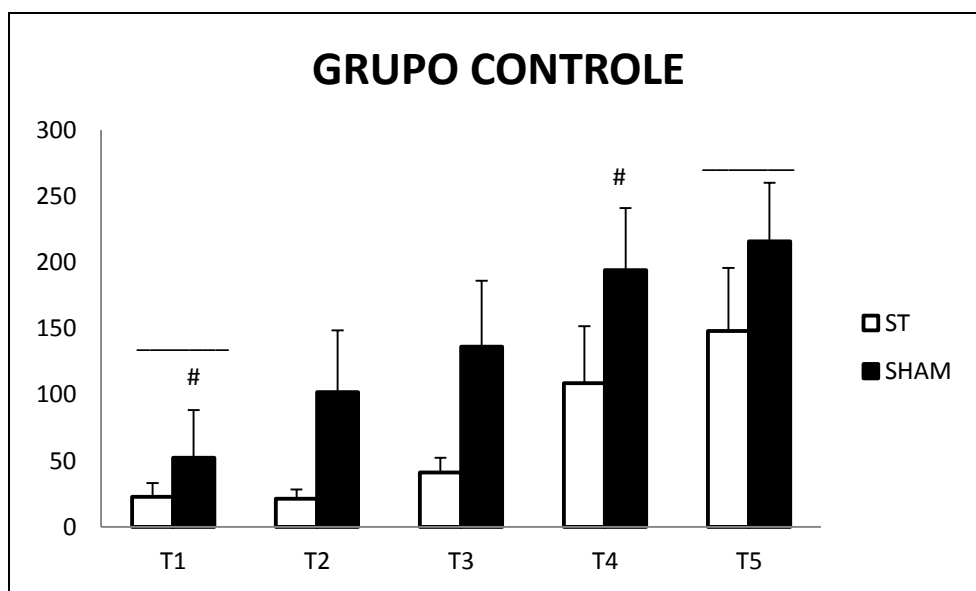


GRÁFICO 2. Tempo de Permanência (Média ± EP) no Compartimento Preto em segundos para cada uma das tentativas realizadas nos grupos Sem Tratamento (ST) e Sham. “#” indica diferença entre T1 e T4 no grupo SHAM; “----” indica diferenças entre T1 e T5 para o grupo ST e T1 e T5 para o grupo SHAM.

No GRÁFICO 2, são analisados dois fatores o primeiro correspondente aos fatores Tempo de Permanência no Compartimento Preto em segundos e a Tentativas realizadas em cada um dos grupos ST e Sham (análise intragrupos). A segunda análise corresponde aos fatores tempo médio de permanência nas tentativas e os grupos (análise intergrupos).

Embora o tempo de permanência médio para o Grupo Sham é maior que para o Grupo ST, a análise estatística não apresentou diferenças significativas intergrupos [$H_1=0,011$, $p=0,959$]. Já a análise intragrupos apresentou diferenças no Grupo ST [$H_1=4,438$, $p=0,038$], o pós-teste indicou diferença entre T1 e T5. Enquanto para o Grupo Sham [$H_4=14,44$, $p<0,01$], o pós-teste indicou diferenças entre T1 e as tentativas T4 e T5, não há diferenças entre T4 e T5. Para ambos os grupos, a média do tempo de permanência aumenta ao longo das tentativas.

A partir destes dados e com a finalidade de comparar os sujeitos do Grupo ST e do Grupo Sham, formou-se um novo grupo, agora apenas denominada Grupo Controle (CTL), que é o resultado da média (\pm erro padrão) do tempo de permanência no compartimento preto destes 16 sujeitos em relação ao número de tentativas. Abaixo encontram-se os resultados.

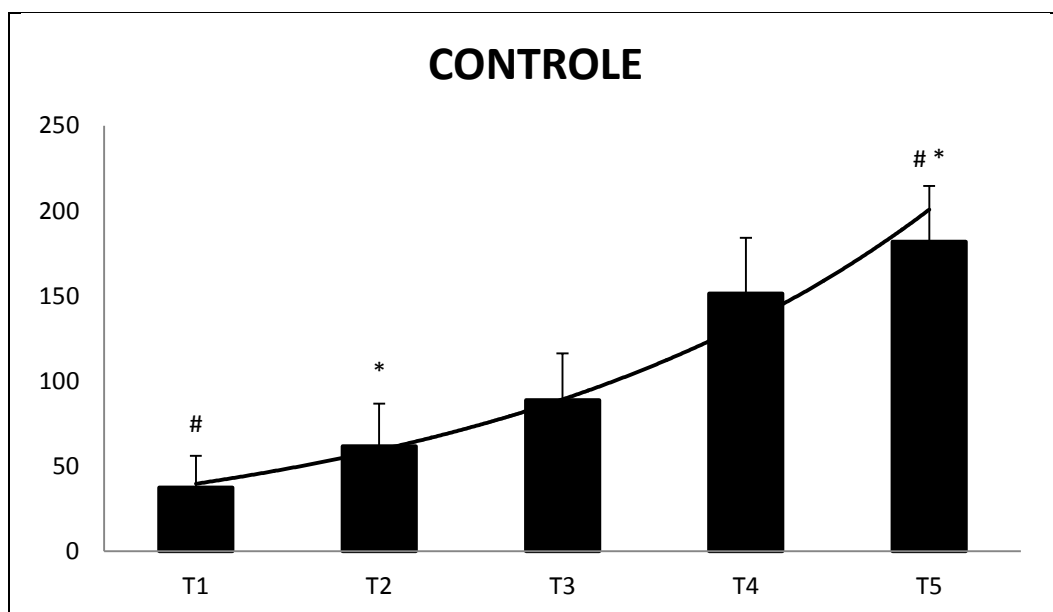


GRÁFICO 3. Tempo de Permanência (Média \pm EP) no Compartimento Preto em segundos para cada uma das tentativas realizadas no novo Grupo Controle. “#” e “*” indicam diferenças entre tentativas.

No GRÁFICO 3, os fatores analisados foram Tempo de Permanência no Compartimento Preto e Tentativas realizadas do Grupo Controle. Observa-se pela linha de tendência um aumento no tempo de permanência ao longo das tentativas. A análise estatística indicou diferenças significativas entre os fatores analisados [$H_4=18,551$, $p<0,01$], indicando

no pós-teste a ausência de diferença entre T1 e T2, mas a diferença significativa entre T1/T2 e T5.

Antidepressivos

Abaixo estão descritos os resultados dos tratamentos dos grupos Fluoxetina 5 (FL 5) mg/kg, Fluoxetina 10 mg/kg (FL 10) e Fluoxetina 20 mg/kg (FL 20).

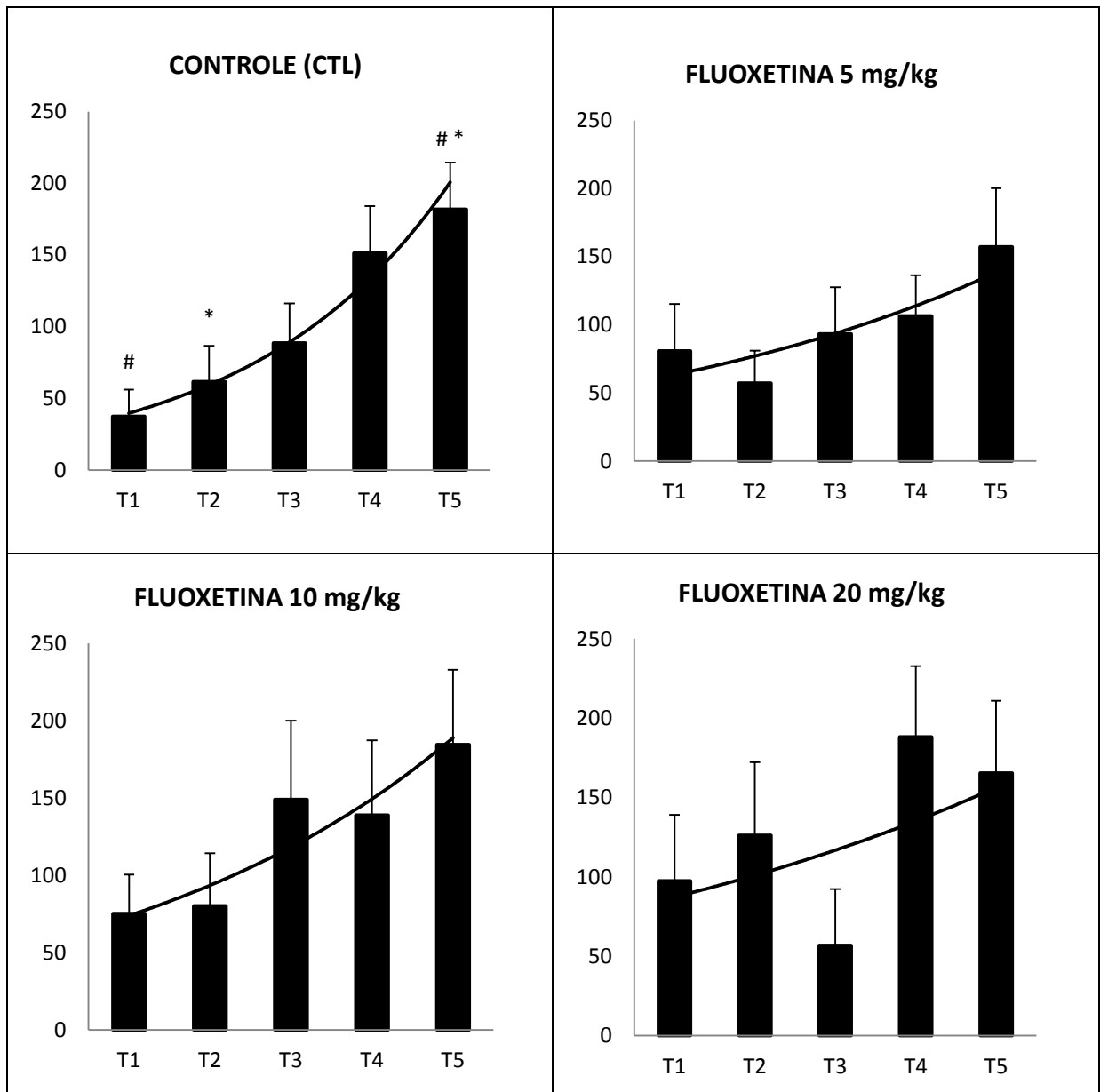
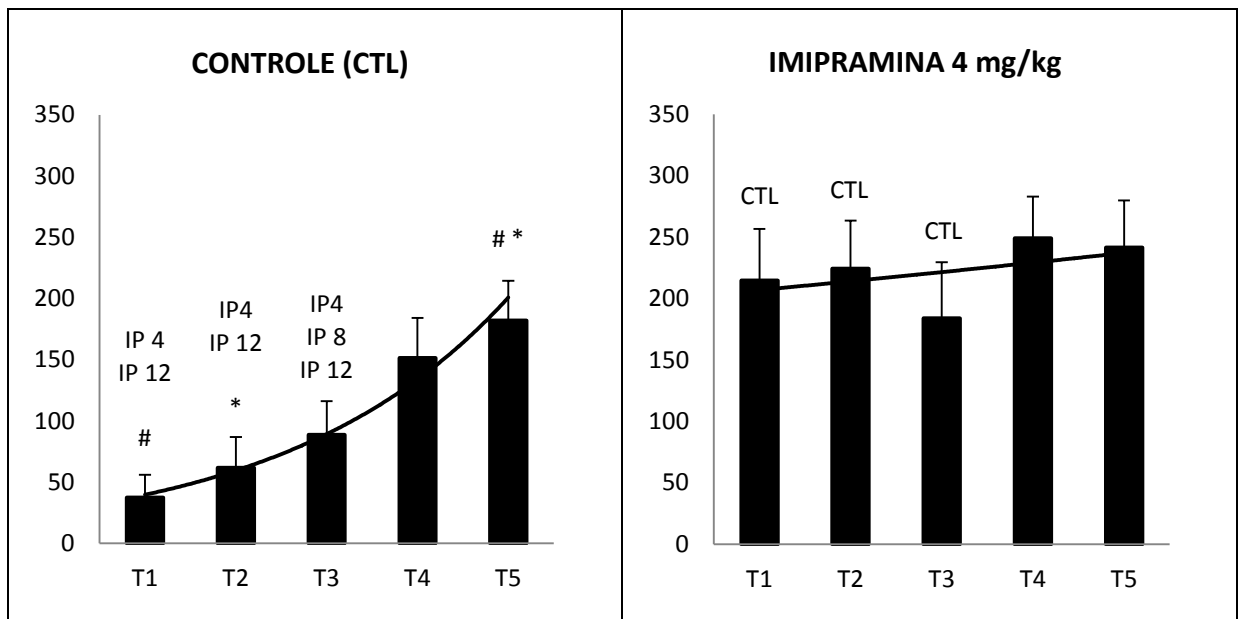


GRÁFICO 4. Tempo de Permanência (Média ± EP) no compartimento menor (segundos) ao longo das cinco tentativas nos grupos que foram tratados com fluoxetina.

O GRÁFICO 4 apresenta novamente duas análises, a primeira correspondente aos fatores Tempo de Permanência no Compartimento Preto em segundos e a Tentativas realizadas nos grupos FL5, FL10 e FL20 (análise intragrupos). A segunda análise corresponde aos fatores tempo médio de permanência nas tentativas e os grupos (análise intergrupos).

A análise estatística não indicou diferenças entre a tentativas intragrupos FL 5 [$H_4=7,501$, $p=0,112$], FL 10 [$F_{4,39}=1,214$, $p=0,322$]e FL 20 [$F_{4,39}=1,505$, $p=0,222$], embora a linha de tendência indique um aumento na média do tempo de permanência ao longo das tentativas. Não houveram também diferenças entre as tentativas T1 [$H_3=5,082$, $p=0,166$], T2 [$H_3=3,938$, $p=0,268$], T3 [$H_3=2,10$, $p=0,552$], T4 [$H_3=0,572$, $p=0,903$] e T5 [$H_3=0,178$, $p=0,981$] na comparação intergrupos, incluindo o Controle.

A seguir serão descritos os resultados encontrados para os grupos Imipramina 4 mg/kg (IP 4), Imipramina 8 mg/kg (IP 8) e Imipramina 12 mg/kg (IP 12).



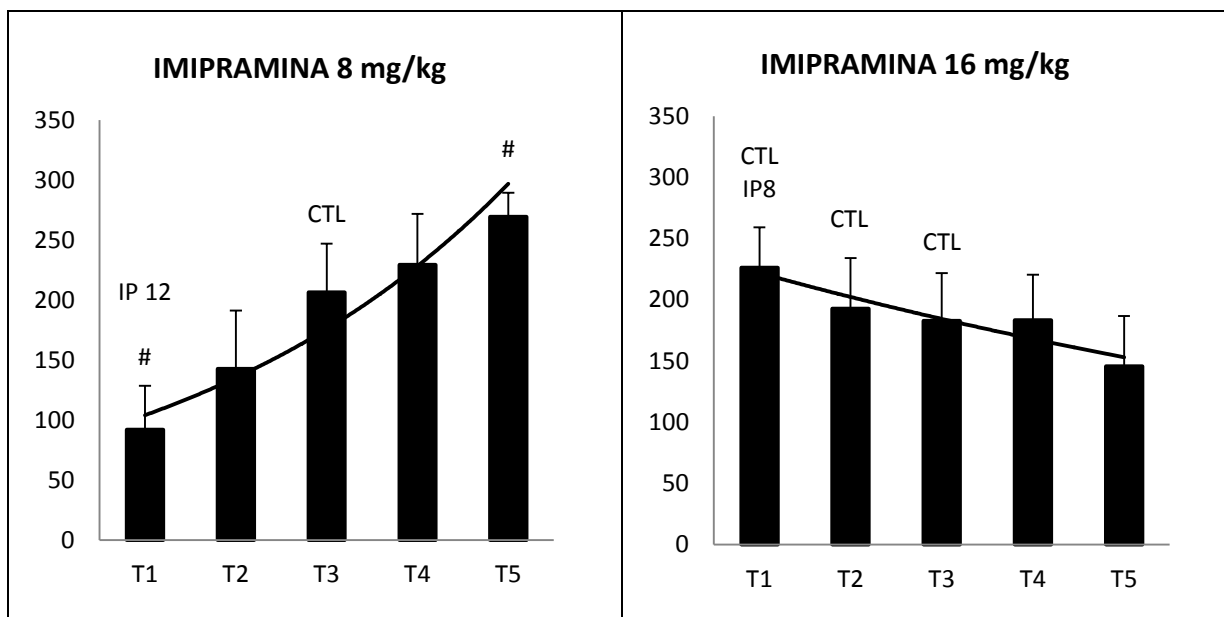


GRÁFICO 5. Tempo de Permanência (Média \pm EP) no compartimento menor (segundos) ao longo das cinco tentativas nos grupos que foram tratados com imipramina.

No GRÁFICO 5, novamente foram realizadas análises intra e intergrupos entre os fatores Tempo de Permanência no Compartimento Preto em segundos e a Tentativas realizadas para IP 4, IP 8 e IP 16. Observa-se, de acordo com a linha de tendência que apenas o grupo IP 8 apresenta ascensão das médias de permanência no compartimento preto ao longo das tentativas. Enquanto que IP 4 não há alteração e IP 16 apresenta diminuição deste tempo. A análise estatística apresenta indica que IP 4 [$H_4=1,642$, $p=0,801$] e IP 16 [$H_4=2,598$, $p=0,627$] não apresentam diferenças significativas ao longo das tentativas, enquanto que IP 8 apresenta [$F_{4,39}=3,306$, $p=0,021$] diferenças indicada nos pós teste ente T1 e T5.

Quando analisados as tentativas intergrupos, encontrou-se diferenças entre estas tentativas T1 [$F_{3,39}=10,49$, $p<0,01$], T2 [$H_3=13,907$, $p<0,01$], T3 [$H_3=8,587$, $p=0,035$]. Em T1, as diferenças se deram entre o Grupo CTL e IP 4/IP 16, há diferença também entre IP 8 e IP 12. Para T2, as diferenças estão entre o Grupo CTL e IP 4/IP 16. Já em T3 a diferença está entre o Grupo CTL e os demais grupos.

De acordo com a análise estatística, não foram encontradas diferenças intergrupos para T4 [$H_3=3,614$, $p=0,306$] e T5 [$H_3=6,006$, $p=0,111$].

Benzodiazepínicos

Abaixo estão descritos os resultados dos sujeitos dos grupos tratados com Diazepam 0,6 mg/kg (DZ 0,6), Diazepam 1,25 mg/kg (DZ 1,25) e Diazepam 2,5 mg/kg (DZ 2,5).

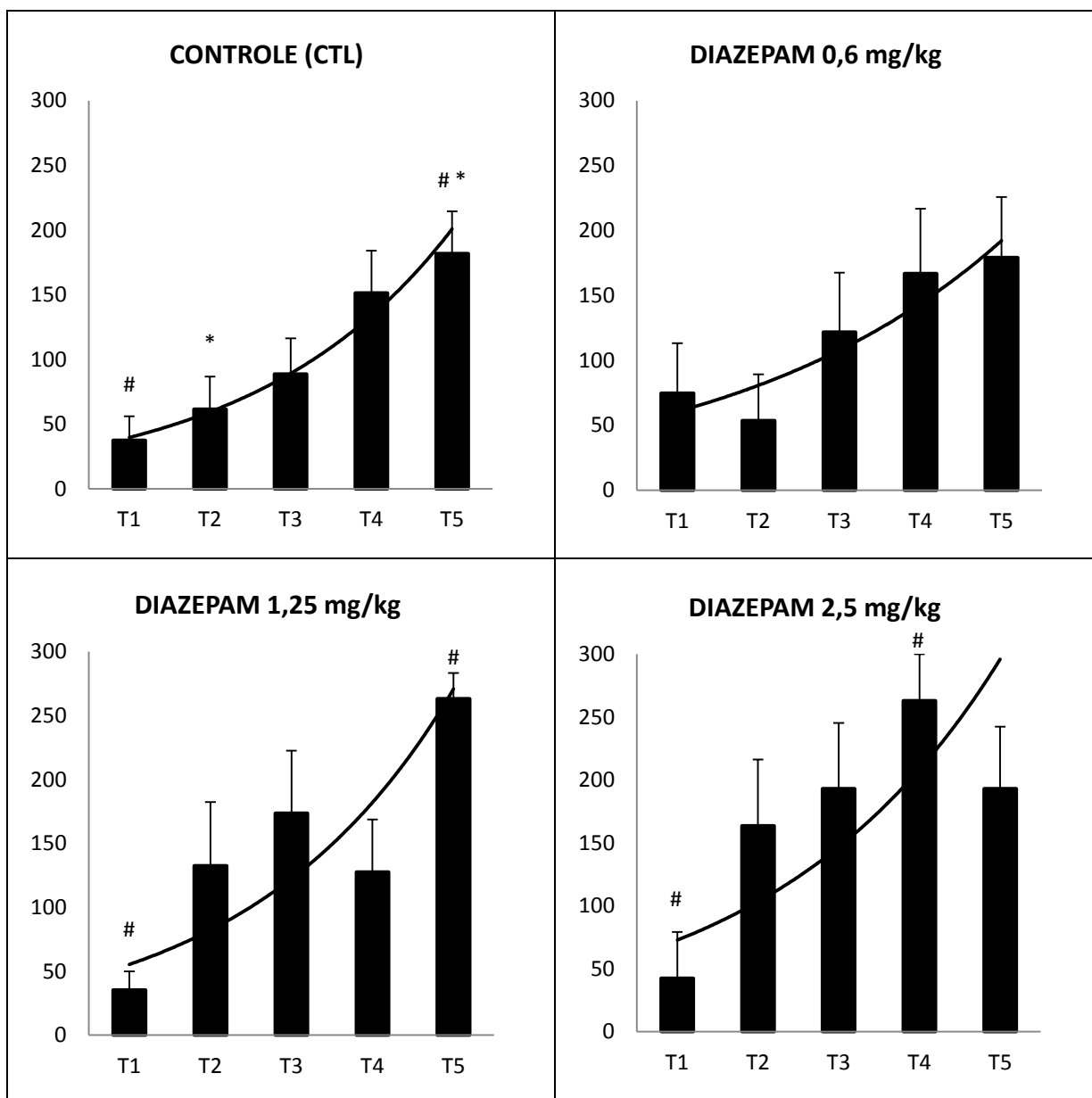


GRÁFICO 6. Tempo de Permanência (Média \pm EP) no compartimento menor (segundos) ao longo das cinco tentativas nos grupos que foram tratados com diazepam.

O GRÁFICO 6 apresenta a análise intra e intergrupos dos fatores Tempo de Permanência no Compartimento Preto em segundos e a Tentativas realizadas para DZ 0,6, DZ 1,25 e DZ 2,5. A análise estatística não apresentou diferenças intergrupos em T1 [$H_3=4,621$,

p=0,202], T2 [$H_3=4,00$, p=0,261], T3 [$H_3=3,187$, p=0,364], T4 [$H_3=4,425$, p=0,219] e T5 [$H_3=1,641$, p=0,650]. Mas apresentou diferença entre as tentativas nos grupos DZ 1,25 [$H_4=12,23$, p=0,016] e DZ 2,5 [$H_4=9,678$, p=0,046]. Para o grupo DZ 1,25 o pós-teste indicou diferença ente T1 e T5, enquanto que para DZ 2,5 houve diferença entre T1 e T4. Enquanto que o grupo DZ 0,6 [$H_4=7,354$, p=0,118] não apresentou diferença entre as tentativas intragrupo.

A figura abaixo demonstra o resultado dos sujeitos dos grupos Clonazepam 0,05 mg/kg (CL 0,05), Clonazepam 0,1 mg/kg (CL 0,1) e Clonazepam 0,25 mg/kg (CL 0,25).

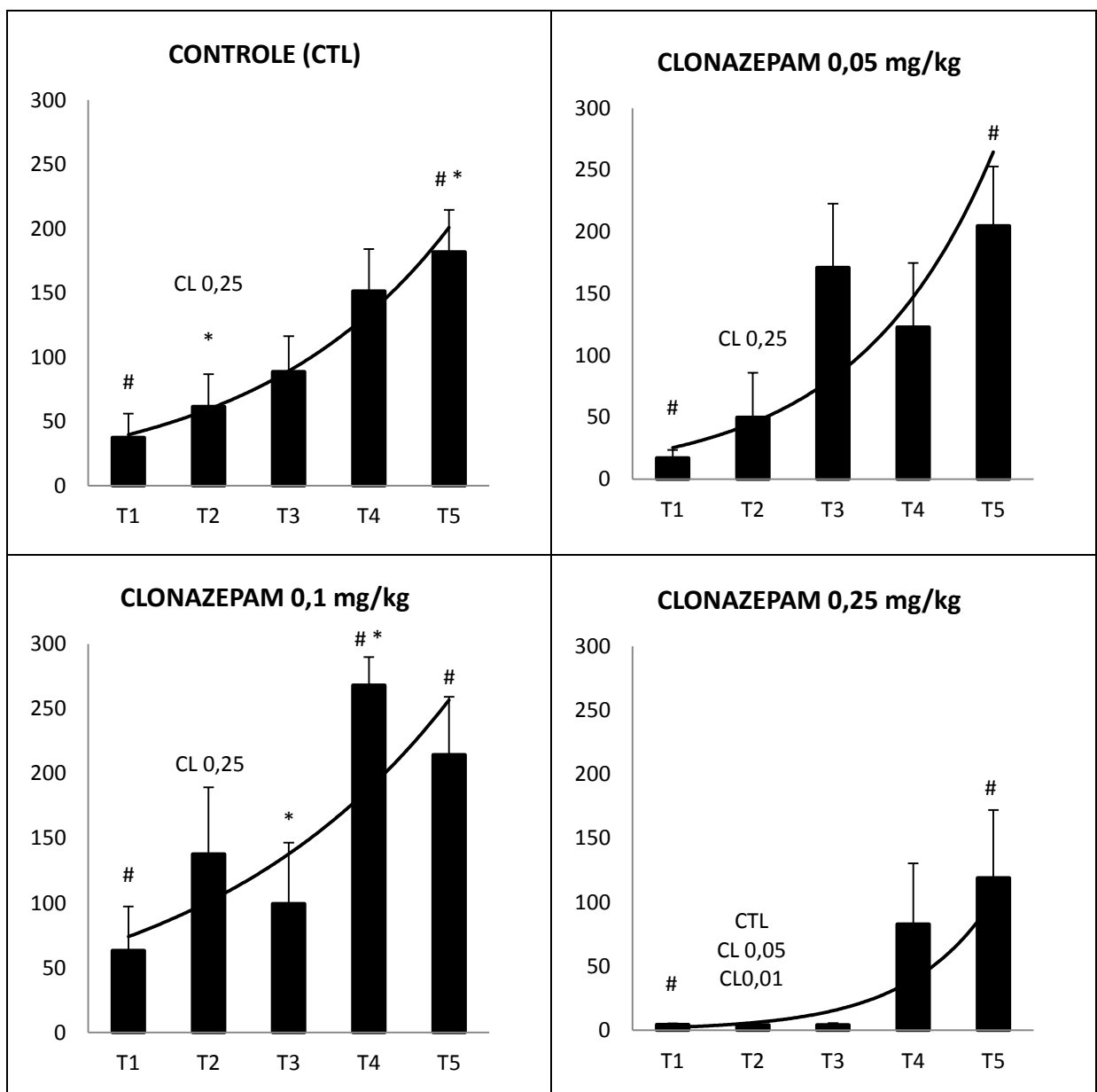


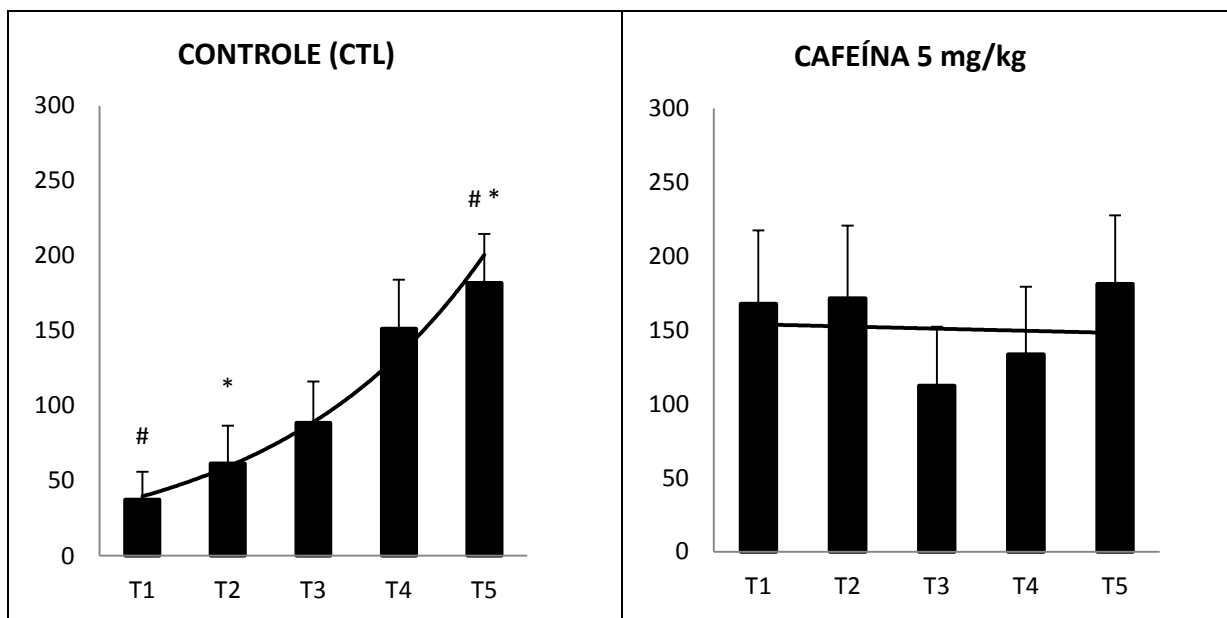
GRÁFICO 7. Tempo de Permanência (Média ± EP) no compartimento menor (segundos) ao longo das cinco tentativas nos grupos que foram tratados com clonazepam.

O GRÁFICO 7 apresenta a análise intra e intergrupos dos fatores Tempo de Permanência no Compartimento Preto em segundos e a Tentativas para CL 0,05, CL 0,1 e CL 0,25. Observa-se nesta figura através da linha de tendência a ascensão das médias de tempo de permanência ao longo em todos os grupos. Isto também é detectado pela análise estatística a qual apresenta diferenças estatisticamente significativas entre as tentativas nos grupos CL 0,05 [F_{4,39}=3,478, p=0,017], CL 0,1 [F_{4,39}=4,118, p<0,01] e CL 0,25 [H₄=9,843, p=0,043]. Sendo que o pós-teste indicou diferenças entre T1 e T5 no grupo CL 0,05, T1 e T5 para o grupo CL 0,25. Já o grupo CL 0,1 apresentou diferença entre T1 e T4/T5, bem como T3 e T4.

Na análise destes fatores intergrupos, não houveram diferenças entre T1 [H₃=6,872, p=0,076], T3 [H₃=1,183, p=0,757], T4 [H₃=6,704, p=0,082] e T5 [H₃=0,417, p=0,937]. Enquanto que a T2 [H₃=8,556, p=0,036] do grupo CL 0,25 apresentou diferença em relação aos demais grupos.

Estimulantes

Segue abaixo os resultados dos grupos tratados com Cafeína 5 mg/kg (CF 5), Cafeína 10 mg/kg (CF 10) e Cafeína 20 mg/kg (CF 20).



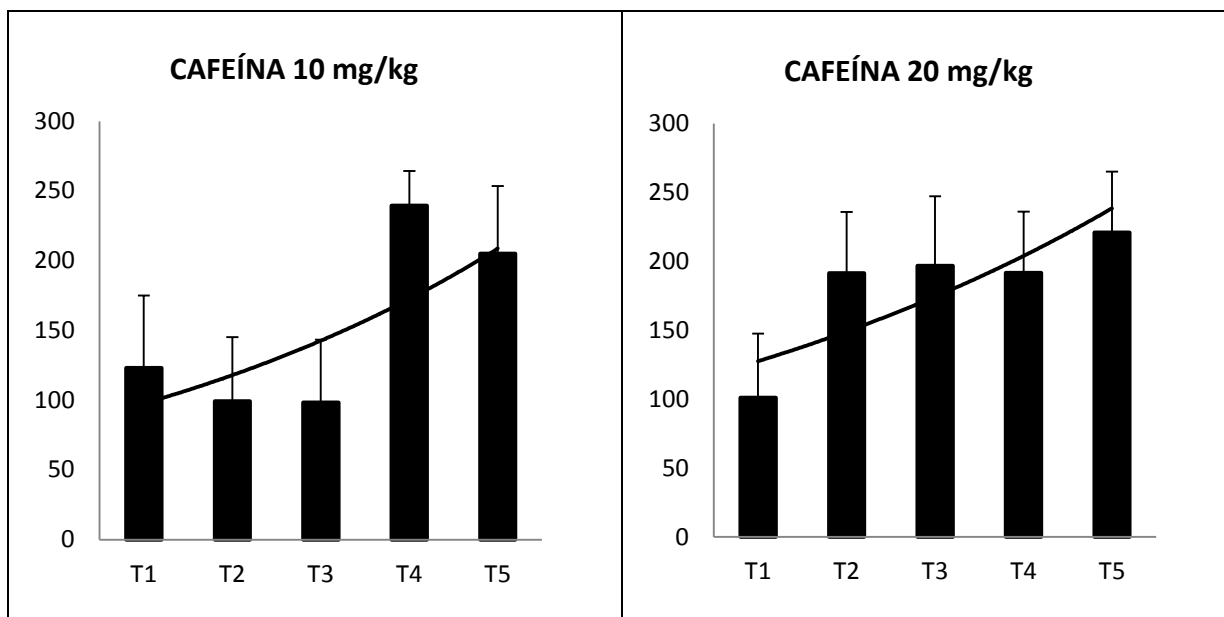


GRÁFICO 8. Tempo de Permanência (Média \pm EP) no compartimento menor (segundos) ao longo das cinco tentativas nos grupos que foram tratados com cafeína.

O GRÁFICO 8 apresenta a análise intra e intergrupos dos fatores Tempo de Permanência no Compartimento Preto em segundos e a Tentativas para CF 5, CF 10 e CF 20. Embora a linha de tendência indique um aumento no tempo de permanência para CF 10 e CF 20, a análise estatística não apresentou diferenças significativas entre este tempo ao longo das tentativas para CF 5 [$H_4=2,238$, $p=0,692$], CF 10 [$H_4=6,334$, $p=0,176$] e CF 20 [$H_4=6,039$, $p=0,196$]. Também não foram encontradas diferenças na análise intergrupos em T1 [$H_3=3,451$, $p=0,327$], T2 [$H_3=4,964$, $p=0,174$], T3 [$H_3=2,896$, $p=0,408$], T4 [$F_{3,39}=1,852$, $p=0,155$] e T5 [$H_3=0,947$, $p=0,814$].

A figura abaixo descreve os resultados dos sujeitos tratados com Dietilpropiona 2,5 mg/kg (DP 2,5), Dietilpropiona 5 mg/kg (DP 5) e Dietilpropiona 10 mg/kg (DP 10).

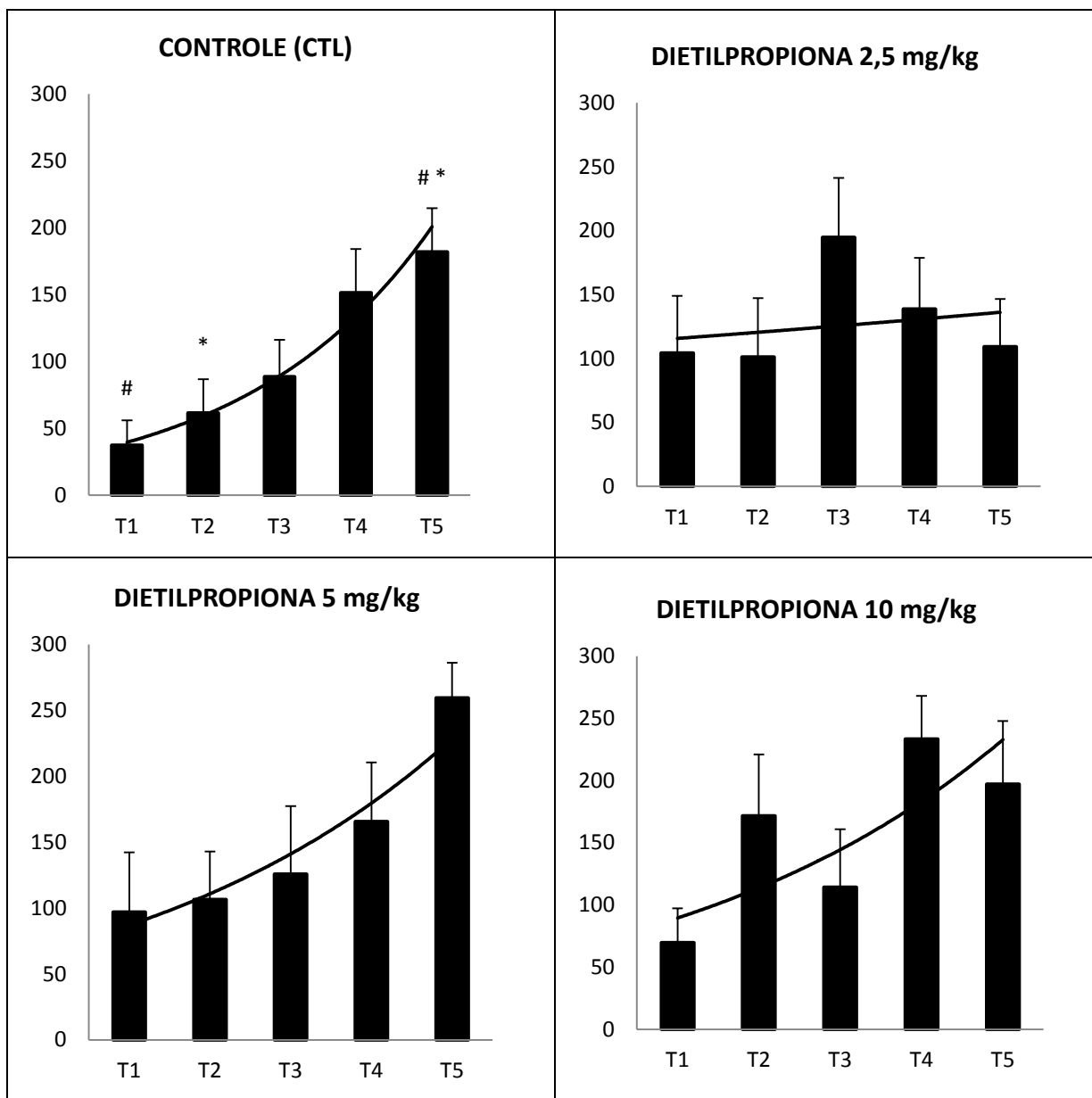


GRÁFICO 9. Tempo de Permanência (Média ± EP) no compartimento menor (segundos) ao longo das cinco tentativas nos grupos que foram tratados com dietilpropiona.

O GRÁFICO 9 apresenta a análise intra e intergrupos dos fatores Tempo de Permanência no Compartimento Preto em segundos e a Tentativas para DP 2,5, DP 5 e DP 10. Assim como na figura anterior, a linha de tendência dos grupos DP 5 e DP 10 indica um aumento no tempo de permanência, mas análise estatística não apresentou diferenças significativas entre este tempo ao longo das tentativas para DP 2,5 [$H_4=3,171$, $p=0,530$], DP 5 [$H_4=8,961$, $p=0,0062$] e DP 10 [$H_4=8,109$, $p=0,088$]. Também não foram encontradas diferenças na análise intergrupos em T1 [$H_3=3,009$, $p=0,390$], T2 [$H_3=3,549$, $p=0,314$], T3 [$H_3=2,226$, $p=0,519$], T4 [$H_3=3,769$, $p=0,287$] e T5 [$H_3=5,556$, $p=0,135$].

DISCUSSÃO

Como apontado anteriormente, a ansiedade e o medo não podem ser estudados apenas como um conjunto de reações do corpo que controlam o aumento ou diminuição da frequência de determinados comportamentos de defesa, mas sim enquanto um conjunto de mecanismos complexos que formam uma rede interdependente entre o ambiente, o valor da ameaça, mecanismos químicos, neurológicos, motores e comportamentais (Gray e McNaughton, 2003; McNaughton e Corr, 2004).

Para esse conjunto de elementos complexos dá-se o nome de reação de defesa (Blanchard e Blanchard, 1988). Assim, um bom modelo animal de ansiedade deve ser aquele capaz de mimetizar elementos reduzidos das propriedades que compõe esta reação de defesa (Gouveia Jr., 1999). A esQUIVA INIBITÓRIA apresenta esta característica. Neste teste, o compartimento branco apresenta-se com caráter aversivo, mimetizando assim a situação de um ambiente aberto em que existe uma ameaça potencial do predador (Maximino et al., 2010).

Quando exposto a um novo ambiente, o *Danio rerio* apresenta instintivamente o comportamento de exploração deste ambiente, assim ativando o sistema de aproximação BAS. Mas, juntamente com este comportamento, o sistema inibição BIS é ativo, com a finalidade de inibir essa aproximação em caso de apresentação de alguma ameaça. O mecanismo de ansiedade está vinculado a ação do sistema de inibição BIS no sistema de aproximação BAS (McNaughton e Corr, 2004). Portanto, o teste de esQUIVA INIBITÓRIA mimetiza um ambiente novo que pode apresentar reforçadores (fonte de alimento, fêmeas, etc.), mas que possui um grau de aversividade. Assim, a primeira tentativa representa uma linha de base, na qual o animal é controlado pelo sistema de aproximação, mas quando o mesmo não é reforçado ao entrar neste novo ambiente o sistema de inibição passa gradualmente a substituir o sistema de aproximação.

Pode-se verificar esta hipótese quando observa-se os dados apresentados pelo Experimento de Aversividade do Claro. Os dados apontam que houve aquisição da esQUIVA INIBITÓRIA ao longo das 5 tentativas no Aquário PB. A aquisição do comportamento de esQUIVA INIBITÓRIA para este teste ocorre com sucessivas re-exposições a possibilidade de entradas no novo ambiente branco, que, devido a sua aversividade, gera um aumento de latências de entrada que reforça a inibição do comportamento exploratório. Esta aversividade passa então a controlar o comportamento.

Quando observa-se as tentativas realizadas no Aquário BB e PP, observa-se a não aquisição da esQUIVA inibitória, com uma diminuição da média de tempo de permanência no compartimento menor estatisticamente ao longo de todas as tentativas, quando comparado ao grupo do aquário PB. Bem como a manutenção do tempo de permanência ao longo de todas as tentativas do aquário PP, implicando apenas na diferença entre a tentativa 4 entre os grupos PB e PP. Tanto para BB, quanto para PP, não há diferenças entre T1 (linha de base) e T5.

Todos estes dados apontam que a aversividade do lado claro possui um papel importante para a aquisição da esQUIVA inibitória neste teste. Indicando assim, a substituição do sistema de aproximação BAS, vinculado ao comportamento de exploração, pelo sistema de inibição comportamental BIS, vinculado ao comportamento de esQUIVA. Neste sentido, tendo o efeito ansiolítico impedirá a aquisição da esQUIVA, diminuindo o tempo de permanência no compartimento escuro nas últimas tentativas, quanto o efeito ansiogênico, o qual aumentará o tempo de permanência neste compartimento já na linha de base.

Sendo o mecanismo de defesa de ansiedade vinculado à dinâmica de aproximação e inibição comportamental (Mcnaughton, 2011), pode-se apontar que a esQUIVA inibitória descrita apresenta a mimetização de uma situação conflitante, vinculado a aproximação defensiva e consequência aversiva, o que torna este teste um modelo animal efetivo para o estudo de ansiedade.

Mas ao pensar na possibilidade de utilização da esQUIVA inibitória em peixes como modelo para estudo farmacológico, há a necessidade, sendo este um teste que utiliza elementos motores dependentes a inibição do comportamento de exploração, de verificar se as drogas utilizadas no teste possuem efeito sobre ansiedade, sobre atividade motora ou sobre ambos. Para isso, antes de cada um dos testes de esQUIVA inibitória, os animais foram expostos ao teste de campo aberto.

O teste de campo aberto é um procedimento de exploração livre em um tanque, sendo que dependendo dos objetivos dos experimentos, pode utilizar diversas medidas (Royce, 1977; Walsh & Cummins, 1976). Para este experimento, utilizou-se apenas tempo de permanência no centro do aparato (medida de ansiedade) e ambulação total (medida de atividade locomotora).

Os resultados apontam que não houveram diferenças em nenhuma dessas medidas entre o grupo controle e os demais grupos experimentais. Para o teste de campo aberto, o grupo Controle Sem Tratamento e o Grupo Sham não apresentaram diferenças, indicando assim que a injeção não é um fator capaz de alterar o desempenho dos sujeitos para este teste.

Em testes de campo aberto em roedores, antidepressivos, tanto moduladores de recaptação de serotonina (fluoxetina), quanto tricíclicos (imipramina), possuem efeito ansiolítico em doses crônicas, mas não em doses agudas (Dulawa et al., 2004; Prut e Belzung, 2003; Bodnoff et al., 1998; Crawley, 1985; Kulkarni e Dandiya, 1973). Antidepressivos não apresentam diminuição na atividade locomotora (Dulawa et al., 2004; Kulkarni e Dandiya, 1973). Porsolt et al., 1978, indica o efeito de antidepressivos tricíclicos e IMAO na diminuição da atividade locomotora em ratos, mas isso após teste de nado forçado. Estes trabalhos indicam que, em *Zebrafish*, os resultados acerca do efeito da fluoxetina e da imipramina em dose aguda no teste de campo aberto, tanto no que se refere a medidas de ansiedade, quanto de atividade locomotora, apresentam os mesmos resultados encontrados na literatura de roedores.

O mesmo ocorre com relação aos benzodiazepínicos, os quais não apresentam alteração nas medidas de ansiedade e de atividade locomotora em roedores (Rex, Stephend e Fink, 1996; Stefanski et al.1992). Para Hard et. al (1985), o o diazepam apresentou penas um pequeno efeito na atividade locomotora na dose de 0,1 mg/kg. Já Prut e Belzung (2003) indicam efeito ansiolítico no campo aberto quando administrados diazepam e clonazepam em doses crônicas. De acordo com esta literatura, os dados de campo aberto em *Zebrafish* obtidos nesse trabalho com benzodiazepínicos, os quais apontam que estas drogas não produziram efeito, em nenhuma das doses, no teste de campo aberto, estão equivalentes aos dados apresentados em roedores.

Já dados com cafeína e dietilpropiona são mais raros na literatura. A cafeína, metilxantina, diminui a atividade locomotora (Bhattacharya, Satyan, & Chakrabarti, 1997; Shi et al.,1994; Synder et al., 1981) e também apresenta efeito ansiogênico (Bhattacharya, S.K., Satyan, K.S. & Chakrabarti,1997) no teste de campo aberto em roedores. Estes dados são contrários aos resultados apresentados, nos quais o campo aberto em *Zebrafish* não apresenta efeitos sobre a atividade locomotora ou ansiedade.

Já a dietilpropiona, assim como a anfetamina, atua na liberação de noradrenalina. Testes de campo aberto em roedores com anfetamina indicam que esta substância altera o padrão de locomoção centro/periferia, indicando assim um efeito ansiogênico, mas sem alteração da ambulação (Mueller et al.,1989; Schiorring, 1979).

Como observado em roedores, apenas a cafeína apresentou alteração na atividade locomotora, enquanto que as outras substâncias não modificam esta medida. A atividade locomotora do teste de campo aberto no *Danio rerio*, não sofreu alteração de nenhuma das

substâncias e doses administradas. Estes dados indicam que o campo aberto apresenta uma boa congruência com os dados da literatura em roedores, sendo necessários mais estudos acerca das metil-xantinas e seus respectivos efeitos na atividade locomotora no teste de campo aberto em *Zebrafish*.

Com relação às medidas de ansiedade apresentadas, a literatura de ratos apresenta diversas outras medidas que não o tempo de permanência no centro e periferia, os quais podem ser frequência de levantamento de risco, coçar, limpar-se, defecar, entre outros. Na literatura apresentada acima acerca das medidas de ansiedade no teste de campo aberto, apenas Mueller et al. (1989) e Schiorring (1979), que estavam medindo o padrão de locomoção destes animais utilizaram tempo no centro/periferia para indicar medida de ansiedade, os demais autores utilizaram levantamento de risco e número de fezes encontradas no aparato.

Mesmo assim, o teste de campo aberto desenvolvido neste experimento indica que o mesmo ainda possui pouca sensibilidade ao efeito de drogas quando realizado em *Danio rerio*. Pode-se observar esta pouca sensibilidade, quando compara-se seus resultados aos da esQUIVA inibitória, o qual diversas drogas apresentam efeitos dose-dependente respectivos sobre o mecanismo de ansiedade.

Com relação aos resultados da esQUIVA inibitória, observa-se primeiramente que a injeção não possui efeito sobre o mesmo, possibilitando assim a agregação do grupo Sem Tratamento com o grupo SHAM.

Antidepressivos

A fluoxetina é um antidepressivo e que atua na inibição da recaptação seletiva de serotonina, assim aumentando a quantidade de serotonina na fenda sináptica. No teste de esQUIVA inibitória, esta substância nas 3 dosagens impediu a aquisição. O aumento serotoninérgico pode ter produzido uma maior ação do mecanismo de inibição comportamental no *Danio rerio*, assim aumentando o tempo de permanência deste no compartimento preto na primeira tentativa. Este resultado indica um efeito ansiogênico da fluoxetina nas dosagens de 5, 10 e 20 mg/kg.

Contudo esse efeito ansiogênico da fluoxetina ocorre de maneira bem sutil, pois não são encontradas diferenças estatísticas entre a primeira tentativa das doses com o grupo controle. O que indica um comportamento não muito diferente em relação aos grupos

experimentais administrados com fluoxetina (FL5, FL 10 e FL20) e grupo controle. Além disso, não há diferenças entre as primeiras e últimas tentativas, indicando assim um efeito ansiogênico sutil capaz de alterar a aquisição da esquiwa. Este efeito sutil da fluoxetina no teste de esquiwa inibitória pode ser observado na literatura em roedores, o qual apresenta tanto efeito ansiogênico da fluoxetina (Monl on et al., 2002), quando o não efeito da mesma (Gomes et al, 2009; Arenas et al, 2006).

Já a imipramina, inibidor da recapta o de serotonina e noradrenalina, apresentou um resultado diferente entre os tratamentos. Na dose de 4 mg/kg (IP4) e 12 mg/kg (IP 12), a imipramina apresenta efeito ansiogênico, pode-se observar isso pelas diferenças entre as tentativas 1 (linha de base), 2 e 3 destes grupos e do grupo controle. Este dado indica um maior controle do sistema de inibi o comportamental tanto na linha de base (T1), quanto nas demais tentativas, as quais não apresentam diferença com rela o a T1. Indicando assim, a apresenta o do mesmo comportamento de permanecer no compartimento preto ao longo das tentativas e, conseqüentemente, impedindo a aquisi o da tarefa de esquiwa.

Já na dose de 8 mg/kg (IP 8), a imipramina não impediu a aquisi o da esquiwa inibitória, observa-se isso na diferença entre a linha de base (T1) e a quinta tentativa. Mesmo assim, existe indica o de um sutil efeito ansiogênico já que há um aumento do tempo de permanência a partir da terceira tentativa, apontada pela diferença entre esta tentativa do grupo IP 8 e do grupo controle. Possivelmente, o sistema de inibi o passa a controlar o comportamento de esquiwa mais rapidamente para este grupo.

A literatura de roedores que descreve o efeito da imipramina na esquiwa inibitória ainda indicam que esta substância apresenta efeito ansiogênico principalmente quando ministrado de maneira cr nica (Gomes et al., 2009, Dombrowski e Andreatini, 2006; Teixeira, Zagrossi Jr. E Graeff, 2000) e aguda (Teixeira, Zagrossi Jr. E Graeff, 2000). Assim como apresentado pelos grupos IP 4 e IP 12 que apresentam efeito ansiogênico em tratamento agudo. Enquanto que os dados apresentados pelo grupo IP 8 apontam para uma possível facilita o da aquisi o da esquiwa, mas isto devido ao efeito ansiogênico da imipramina, os quais estão de acordo com os dados de facilita o da esquiwa inibitória pelo tratamento agudo de imipramina apresentados por Gomes et al. (2009). Para estes pesquisadores, as doses agudas de imipramina não impediu a aquisi o da esquiwa, sendo este comportamento apresentado a partir da terceira dentre cinco tentativas.

Os resultados com antidepressivos apontam para o efeito ansiog ncio tanto da imipramina, quanto da fluoxetina, possivelmente vinculado ao aumento de serotonina na

fenda sináptica. Sendo que para o teste de esQUIVA inibitória, a fluoxetina em suas três doses e a imipramina em doses baixa e alta impediram a aquisição da esQUIVA inibitória, enquanto que a imipramina em dose intermediária facilitou esta aquisição.

Benzodiazepínicos

Os dois benzodiazepínicos utilizados neste experimento foram o diazepam e o clonazepam. Ambos potencializam a ação do GABA, neurotransmissor responsável pela inibição sináptica do sistema nervoso, sendo utilizado clinicamente como ansiolítico ou calmante (Rang e Dale, 2011).

Como não se encontrou estudos acerca da ação do clonazepam no teste de esQUIVA inibitória, seus resultados serão discutidos juntamente com a literatura de midazolam e diazepam. Para tal, a análise de todos os grupos tratados com benzodiazepínicos será realizada conjuntamente.

Os resultados com clonazepam indicam que todos os tratamentos (CL 0,05, CL 0,1 e CL 0,25) não alteraram a aquisição da esQUIVA inibitória, quando comparada ao grupo controle. Todas as doses apresentam curva de aprendizagem. Dois resultados diferentes ocorreram com o tratamento CL 0,1 e CL 0,25. O tratamento CL 0,1 apresentou uma facilitação da aquisição do comportamento de esQUIVA inibitória, indicando diferenças entre a linha de base (T1) e as últimas tentativas T4 e T5. Esses dados indicam um sutil efeito ansiogênico deste tratamento neste teste. Este efeito não é confirmado, pois as tentativas T4 e T5 deste grupo não apresentam diferenças entre as mesmas tentativas do grupo controle.

Já o grupo CL 0,25, apresenta a aquisição do comportamento de esQUIVA inibitória, mas desta vez observa-se um leve efeito ansiolítico indicado na diferença de T2 deste grupo em relação ao grupo controle. Verifica-se também a diminuição das últimas tentativas T4 e T5, mas estas não apresentam diferenças com o grupo controle.

Os grupos tratados com diazepam (DZ 0,6, DZ 1,25 e DZ 2,5) apresentaram resultados diferentes de acordo com seus tratamentos. O grupo DZ 0,6 não apresentou aquisição da esQUIVA inibitória devido ao leve aumento do tempo de permanência no compartimento preto na linha de base (T1). Este resultado indica um possível efeito ansiogênico, mas este efeito é tão sutil que a T1 do grupo DZ 0,6 não apresenta diferença quando comparado ao T1 do grupo controle.

O grupo DZ 1,25 não indica nenhum efeito do tratamento de diazepam em dose de 1,25 mg/kg na aquisição do comportamento de esQUIVA inibitória. Seus resultados indicam diferença no tempo de permanência no compartimento escuro entre linha de base (T1) e a

ultima tentativa (T5), o qual aumenta ao longo das tentativas. Além disso, não há diferença entre a curva de aquisição de esquiva entre este grupo e o grupo controle. Já para o grupo DZ 1,25, ocorre o processo de aquisição da esquiva já na tentativa T4, indicando assim um efeito ansiogênico facilitador desta aquisição, nas mesmas condições apresentadas pelo grupo CL 0,1. Um dado interessante para este grupo é a diminuição do tempo de permanência no compartimento escuro na ultima tentativa (T5), a qual não possui diferença estatística com a linha de base (T1).

Embora os dados dos grupos clonazepam 0,01 mg/kg, diazepam 0,6 mg/kg e diazepam 2,5 mg/kg, quando comparados ao grupo controle, não confirmem a ação ansiogênica desses tratamentos, alguns detalhes indicam esta ação de maneira sutil no comportamento do *Danio rerio* neste teste. Mas pode-se observar o efeito ansiolítico do tratamento de clonazepam 0,25 mg/kg, o qual é confirmado pela diminuição no tempo de permanência no compartimento preto na segunda tentativa (T2), quando comparada ao grupo controle e, embora não apresente diferença estatisticamente significativa, há uma diminuição neste tempo de permanência nas tentativas T4 e T5.

Na literatura, todos os resultados encontrados indicam ação ansiolítica no teste de esquiva inibitória tanto com diazepam (Echeverry et al., 2001; Faganello e Mattioli, 2001 e Jung, Depoortere e Oglesby, 2001), quanto com midazolam (Viana et al., 2008; Bueno, Zangrossi Jr. E Viana, 2007). Não é possível uma explicação acurada acerca do possível efeito ansiogênico apresentados pelos tratamentos de diazepam e clonazepam, principalmente por estes serem inibidores do sistema nervoso, mas pode-se talvez indicar o tempo de ação da droga, o qual pode ter sido curto para o efetivo efeito das drogas durante o tratamento. Essa hipótese pode ser observada no grupo DZ 2,5, no qual a ultima tentativa apresenta uma queda do tempo de permanência no compartimento escuro, indicando que talvez a droga estivesse iniciando seu efeito sobre o comportamento de esquiva.

Estimulantes

As duas drogas estimulantes utilizadas foram a cafeína – metil-xantina antagonista de receptores de adenosina, a qual aumenta ligeiramente a ação de noradrenalina e dopamina – e dietilpropiona – anoréxico que atua na liberação de noradrenalina.

Os grupos administrados com cafeína foram CF 5, CF 10 e CF 20 e com dietilpropiona foram DP2,5, DP 5 e DP 10. Em todos os seis grupos não houve a curva de aquisição da esquiva inibitória, não apresentando diferenças entre a linha de base (T1) e as demais

tentativas, bem como não há diferenças entre nenhuma das tentativas destes grupos em relação ao grupo controle. Nos grupos tratados com cafeína observa-se um efeito ansiogênico decorrente do aumento de permanência no compartimento escuro nas tentativas 1 de todos os grupos e tentativas 2 e 3 para CF 20. Já os grupos tratados com dietilpropiona apresentaram aumento do tempo de permanência na linha de base (T1), ficando esta medida praticamente estável ao longo das demais tentativas em DP 2,5. Para os grupos DP 5 e DP 10 é a indicação de um sutil efeito ansiogênico indicado pelo aumento no tempo de permanência nas demais tentativas.

Não há estudos de cafeína ou outras metil-xantinas no teste de esquiva inibitória em roedores ou peixes, sendo estes dos primeiros indícios do seu efeito no teste de esquiva inibitória. Também não foram encontrados estudos com dietilpropiona, mas pode-se comparar seus resultados com o estudo de Jorge et al. (2004), os quais encontraram um efeito ansiogênico da sibutramina, que também é um anoréxico que atua na liberação de noradrenalina, o qual impediu a aquisição do comportamento de esquiva inibitória.

Tanto a cafeína, quando a dietilpropiona aumenta a noradrenalina em suas respectivas proporções. A noradrenalina é responsável pela ativação do sistema simpático (Rang e Dale, 2011), o qual é o sistema de alerta para luta do organismo e que, possivelmente, está ligado à ativação do sistema de inibição comportamental, implicando assim em um efeito ansiogênico de ambas as substâncias.

Para concluir, observa-se que o teste de esquiva inibitória possui sensibilidade a drogas que possuem efeito sobre o mecanismo de ansiedade relacionadas a serotonina, mas não ao sistema GABAérgico. O *Danio rerio*, no geral, é um bom modelo animal de ansiedade, apresentando as reações de defesa estáveis capazes de desenvolver testes de ansiedade adequados ao seu modelo.

CONCLUSÃO

A partir dos resultados descritos acima, pode-se concluir, portanto que:

1. O compartimento branco é aversivo para o *Danio rerio* no teste de esquiva inibitória;
2. A injeção IP não altera de forma significativa o desempenho do animal na Esquiva inibitória;
3. As drogas e dosagens utilizadas neste experimento não alteram a atividade locomotora do *Danio rerio*, mas sim possuem efeito sobre o mecanismo de ansiedade;
4. Fluoxetina em todas as doses impede a curva de aquisição da esquiva inibitória, indicando um possível efeito ansiogênico;
5. Imipramina em dose baixa e alta apresentam efeito ansiogênico e impedem a curva de aquisição da esquiva inibitória, enquanto que em dose moderada há a facilitação da aquisição da esquiva.
6. O diazepam em dose alta facilita a aquisição da esquiva inibitória, e apresenta um possível efeito ansiogênico;
7. O clonazepam em dose alta apresenta efeito ansiolítico no teste de esquiva inibitória, não apresentando efeito na curva de aquisição deste comportamento;
8. A cafeína e a dietilpropiona em todas as doses impedem a curva de aquisição da esquiva inibitória, apresentando um possível efeito ansiogênico;

REFERÊNCIAS

- Ahmed, O., Seguin, D., & Gerlai, R. (2010). An automated predator avoidance task in zebrafish. *Behavioural Brain Research*, 1-6. Retirado de doi:10.1016/j.bbr.2010.07.028
- Arenas, M. C., Vinader-Caerols, C., Monleón, S., Ana J. Martos, Everss, E., Ferrer-Añó, A., & Parra, A. (2006). Are the effects of the antidepressants amitriptyline, maprotiline, and fluoxetine on inhibitory avoidance state-dependent? *Behavioural Brain Research* 166, 150–158.
- Bammer, G. (1982). Pharmacological investigations of neurotransmitter involvement in passive avoidance responding: A review and some new results. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, 6(3), 247–296.
- Bhattacharya, S.K., Satyan, K.S. & Chakrabarti (1997). Anxiogenic action of caffeine: an experimental study in rats. *Journal of Pharmacology*, 11, 3, 219-224.
- Bencan, Z., Sledge, D., & Levin (2009). Buspirone, chlodiazeposide and diazepam effects in a zebrefish model of anxiety. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*, 94, 75-80.
- Bilotta, J., Saszik, S. (2001). The zebrafish as a model visual system. *Int. J. Devl Neuroscience*, 19, 621–629.
- Blanchard, D. C., & Blanchard, R. J. (1988). Ethoexperimental approaches to the biology of emotion. *Ann. Rev. Psychol*, 39, 43-68.
- Blanchard, D. C., Griebel, G., & Blanchard, R. J. (2003). The Mouse Defense Test Battery: pharmacological and behavioral assays for anxiety and panic. *European Journal of Pharmacology*, 463(1–3), 97–116.
- Blanchard, D.C., Blanchard J.B., Tom, P., & Rodgers, R.J (1990). Diazepam changes risk assessment in an anxiety/defense test battery. *Psychopharmacology*, 101, 511-518
- Blanchard, R. J., Yudko, E. B., Rodgers, R. J., & Blanchard, D. C. (1993). Defense system psychopharmacology: an ethological approach to the pharmacology of fear and anxiety. *Behavioral Brain Research*, 58(1-2), 155-165.

- Bodnoff, S.R., Suranyi-Cadotte, B., Aitken D.H., Quirion, R. & Meaney, M.J. (1998). The effect of chronic antidepressant treatment in an animal model of anxiety. *Psychopharmacology*, 95, 298-302.
- Bolles, R. C. (1970). Species-specific defense reactions and avoidance learning. *Psychological Review*, 77(1), 32-48. Retirado de doi:10.1037/h0028589
- Bueno, C. H., Zangrossi Jr, H., & Viana, M. d. B. (2007). GABA/benzodiazepine receptors in the ventromedial hypothalamic nucleus regulate both anxiety and panic-related defensive responses in the elevated T-maze. *Brain Research Bulletin*, 74, 134–141.
- Catania, A. C. (1999). *Aprendizagem: comportamento, linguagem e cognição* (4ª ed.). Porto Alegre - RS.
- Costall, B., Jones, B.J., Kelly, M.E., Naylor, R.J. & Tomkins, D.M (1989). Exploration of mice in a black and white test box: validation as a model of anxiety. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*, 32, 3, 777-785.
- Crawley, J.N. (1985). Exploratory behavior models of anxiety in mice. *Neuroscience and Behavioral Reviews*, 9, 37-44.
- Cruz, A.P.M., Zangrossi Jr., H. & Graeff, F.G. (1997). Animal Model of Anxiety: implications of the screening of the anxiolytic drugs. *Psicologia:Teoria e Pesquisa*, 13, 3, 269-278.
- Cryan, J. F., & Sweeney, F. F. (2011). The age of anxiety: Role of animal models of anxiolytic action in drug discovery. *British Journal of Pharmacology*, 164(4), 1129-1161
- Dinsmoor, J. A. (1977). Escape, avoidance, punishment: where do we stand? *Journal of the Experimental Analysis of Behavior*(28), 83-95.
- Dombrowski, P. A., & Andreatini, R. (2006). Reversible inactivation of the dorsal raphe nucleus blocked the antipanic-like effect of chronic imipramine in the elevated T-maze. *Neuroscience Letters*, 407, 80–85.
- Dulawa, C.S., Holick, K.A., Gudersen, B. & Hen, R. (2004). Effects of chronic fluoxetine in animal models of anxiety. *Neuropsychopharmacology*, 29, 1321-1330.

- E.L. Serra, C. C. M., & Mattioli, R. (1999). Natural preference of zebrafish (*Danio rerio*) for a dark environment. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, *32*, 1551-1553.
- Echeverry, M. B., Hasenöhrl, R. U., Huston, J. P., & Tomaz, C. (2001). Comparison of neurokinin SP with diazepam in effects on memory and fear parameters in the elevated T-maze free exploration paradigm. *Peptides*, *22*, 1031–1036
- Faganello, F. R., & Mattioli, R. (2007). Anxiolytic-like effect of Chlorpheniramine in inhibitory avoidance in goldfish submitted to telencephalic ablation. *Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry*, *31*, 269–274.
- Flinn, L., Bretaud, S., Lo, C., Ingham, P., Bandmann, O. (2008). Zebrafish as a new animal model for movement disorders. *J. Neurochem.*, *106*, 1991–1997.
- Forkman, B., Boissy, A., Meunier-Salaün, C., Canali, E., & Jones, R. B. (2007). A critical review of fear tests used on cattle, pigs, sheep, poultry and horses. *Physiology & Behavior*, *92*, 340–374.
- Galhardo, L., & Oliveira, R. (2005). *Dos peixes e dos homens: o estudo do bem-estar animal aplicado à piscicultura*. Paper presented at the Anais do ZOOTEC, Campo Grande.
- Gebauer, D. L., Pagnussat, N., Piato, Â. L., Schaefer, I. C., Bonan, C. D., & Lara, D. R. (2011). Effects of anxiolytics in zebrafish: Similarities and differences between benzodiazepines, buspirone and ethanol. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*. Retirado de doi:10.1016/j.pbb.2011.04.021
- Gerlai, R., Fernandes, Y., & Pereira, T. (2009). Zebrafish (*Danio rerio*) responds to the animated image of a predator: Towards the development of an automated aversive task. *Behavioural Brain Research*, *201*, 318–324.
- Gomes, K. S., Carvalho-Netto, E. F. d., Monte, K. C. D. S., Acco, B., Nogueira, P. J. d. C., & 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 Research Bulletin*, *78*, 323–327.

- Gómez, Y., Vargas, J.P., Portavella, M., López, J.C (2006). Spatial learning and goldfish telencephalon NMDA receptors. *Neurobiology of Learning and Memory*, 85, 252-262.
- Gouveia Jr., A. (1999). O conceito de modelo e sua utilização nas ciências do comportamento: breves notas introdutórias. *Rev. Estudos de Psicologia*, 16, 13-16.
- Gouveia Jr., A., Maximino, C., & Brito, T. M. (2006). *Comportamento de Peixes: vantagens e utilidades na neurociências*. Bauru: [s.n.].
- Gouveia Jr, A. & Morato, S (2002). Effects of estrous cycle on the behavior in the elevated plus maze. *Interação em Psicologia*, 6(2), 141-148.
- Graeff, F.G. (2011). Defense-related emotions in humans. *Psychology & Neuroscience*, 4, 2, 183-189.
- Graeff, F. G. (2007). Ansiedade experimental humana. *Rev. Psiq. Clín*, 34(5), 251-253.
- Graeff, F.G. (2007). Anxiety, panic and hypothalamic-pituitary-adrenal axis. *Rev. Bras. Psiquiatr.*, 29, 1 S3-S6.
- Graeff, F.G. (2003) Serotonin, paraventricular gray matter and panic disorder. *Rev. bras. Psiquiatr*, 25, 2, 42-45.
- Graeff, F.G.(2002). On serotonin and experimental anxiety. *Psychopharmacology*, 163, 467-476.
- Graeff, F. G. (1994). Neuroanatomy and neurotransmitter regulation of defensive behaviors and related emotions in mammals. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 27, 811-819.
- Graeff, F. G., & Guimarães, F. S. (2005). *Fundamentos da Psicofarmacologia*. Rio de Janeiro - RJ: Editora Atheneu.
- Graeff, F. G., Guimarães, F. S., Andrade, T. G. C. S. D., & Deakin, J. F. W. (1996). Role of 5-HT in Stress, Anxiety, and Depression. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 54(1), 129-141.

- Graeff, F. G., Netto, C. F., & Zangrossi Jr, H. (1998). The elevated T-maze as an experimental model of anxiety. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 23, 237–246.
- Graeff, F.G., Viana, M.B. & Mora, P.O. (1997). Dual role of 5-HT in defense and anxiety. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 21, 6, 791-799.
- Gray, J. A., & McNaughton, N. (2003). *The Neuropsychology of Anxiety: An Enquiry into the Functions of the Septo-Hippocampal System* (2 ed.). Oxford-UK: Oxford University Press.
- Griebel, G., Blanchard, D.C., Jung, A., Lee, J.C., Masuda, C.K., & Blanchard, R.J. (1995). Further evidence that mouse defense test battery is useful for screening anxiolytic and panicolytic drugs: effects of acute and chronic treatment with alprazolam. *Neuropharmacology*, 34, 12, 1625-1633.
- Handley, S. L., & McBlane, J. W. (1993). An assessment of the elevated X-maze for studying anxiety and anxiety-modulating drugs. *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods*, 29(3), 129–138.
- Rang, H.P. & Dale, M.M (2011). *Farmacologia*. 7 ed, Rio de Janeiro: Elsevier.
- Hard, E., Engel, J., Larsson, K. & Musi, B (1985). Effect of diazepam, apomorphine and haloperidol on the audiogenic immobility reaction and on the open field behavior. *Psychopharmacology*, 85, 106-110.
- Herrstein, R. J. (1969). Method and theory in the study of avoidance *Psychological Review*, 76(1), 49-69.
- Hogg, S. (1996). A review of the validity and variability of the Elevated Plus-Maze as an animal model of anxiety. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 54(1), 21-30.
- Houart, C. (2001). Zebrafish as an Experimental Organism. *Encyclopedia of Life Sciences*, 1 - 5.
- Huntingford, F. A., & Wright, P. J. (1989). How sticklebacks learn to avoid dangerous feeding patches. *Behavioural Processes*, 19, 181 - 189.

- Jorge, S. D., Pobbe, R. L. H., Soares, V. d. P., Oliveira, A. M. d., & Zangrossi Jr, H. (2004). Effects of sibutramine on anxiety-related behaviours in rats. *Pharmacological Research*, *50*, 517–522.
- Jung, M. E., Depoortere, R., & Oglesby, M. W. (2001). Use of negatively reinforcing electrical brain stimulation to detect conventional and nonconventional anxiolytics as well as an anxiogenic drug. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior* (*)* *68*, 33-42.
- Kalueff, A. V., & Tuohimaa, P. (2004). Experimental modeling of anxiety and depression. *Acta Neurobiol Exp (Wars)*, *64*(4), 439-448.
- Kalueff, A. V., Wheaton, M., & Murphy, D. L. (2007). What's wrong with my mouse model? Advances and strategies in animal modeling of anxiety and depression. *Behavioural Brain Research*, *179*, 1–18.
- Kotrschal, K., Van-Staaden, M.J., Huber, R (1998). Fish brains: evolution and environmental relationships. *Reviews in Fish Biology and Fisheries*, *8*, 373-408.
- Kulkarni, S.K. & Dandiya, P.C. (1973). Effects of antidepressant agents on open field behaviour in rats. *Psychopharmacology*, *33*, 333-338.
- Lamprea, M. R., Cardenas, F. P., Setem, J., & Morato, S. (2008). Thigmotactic responses in an open-field. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*(41), 135-140.
- Lopez-Patino, M. A., Yu, L., Cabral, H., & Zhdanova, I. V. (2008). Anxiogenic effects of cocaine withdrawal in zebrafish. *Physiol. Behav.*, *93*, 160–171.
- Lopez-Patino, M. A., Yu, L., Yamamoto, B. K., & Zhdanova, I. V. (2008). Gender differences in zebrafish responses to cocaine withdrawal. *Physiol. Behav.*, *95*, 36–47.
- Markou, A. (2012). Stress, anxiety and depression: Toward new treatment strategi. *Neuropharmacology*, *62*(1-2).
- Martin, P. (1998). Animal models sensitive to anti-anxiety agents. *Acta Psychiatr Scand*, *98*(393), 74-80.
- Mathur, P., Guo, S. (2011). Differences of acute versus chronic ethanol exposure on anxiety-like behavioral responses in zebrefish. *Behavioural Brain Research*, *219*, 234-239.

- Maximino, C., Brito, T. M. d., Dias, C. A. G. d. M., Jr, A. G., & Morato, S. (2010). Scototaxis as anxiety-like behavior in fish. *Nature Protocols*, 5, 209 - 216.
- Maximino, C., Silva, A. W. B. d., Gouveia Jr., A., & Herculano, A. M. (2011). Pharmacological analysis of zebrafish (*Danio rerio*) scototaxis. *Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry*, 35, 624–631.
- McNaughton, N. (2011). Fear, anxiety and their disorders: Past, present and future neural theories. *Psychology and Neuroscience*, 4(2), 173-181
- McNaughton, N., & Corr, P. J. (2004). A two-dimensional neuropsychology of defense: fear/anxiety and defensive distance. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 28, 285–305.
- McNaughton, N. (2011). Fear, anxiety and their disorders: past, present and future neural theories. *Psychology & Neuroscience*, 4, 2, 173-181.
- Meunier, R. (2012). Stages in the development of a model organism as a platform for mechanistic model in developmental biology: Zebrafish, 1970-2000. *Studies in History and Philosophy of Biological Science*. Retirado de doi:10.1016/j.shpsc.2011.11.013.
- Monleón, S., Urquiza, A., Arenas, M. C., Vinader-Caerols, C., & Parra, A. (2002). Chronic administration of fluoxetine impairs inhibitory avoidance in male but not female mice. *Behavioural Brain Research*, 136, 483-488.
- Mueller, K., Kunko, P.M., Whiteside, D. & Haskett (1989). Time course of amphetamine-induced locomotor stereotypy in an open field. *Psychopharmacology*, 99, 501-507.
- Müller, F. (2005). Comparative Aspects of Alternative Laboratory Fish Models. *Zebrafish*, 2(1), 47-54.
- N.Walsh, R., & Cummins, R. A. (1976). The open-field test: A critical review. *Psychological Bulletin*, 83(3), 482-504.
- Nahas, T. R. (1999). A aprendizagem da esquivas *Técnicas para o estudo do sistema nervoso*. São Paulo: Plêiade.

- Paula, D. C., Torricelli, A. S., Lopreato, M. R., Nascimento, J. O. G., & Viana, M. B. (2012). 5HT_{2A} receptor activation in the dorsolateral septum facilitates inhibitory avoidance in the elevated T-maze. *Behavioural Brain Research*, 226, 50–55.
- Porsolt, R.D., Anton, G., Blavet, N. & Jalfre, M. (1978). Behavioural despair in rats: a new model sensitive to antidepressant treatments. *European Journal of Pharmacology*, 47, 379-391.
- Portavella, M., & Vargas, J. P. (2005). Emotional and spatial learning in goldfish is dependent on different telencephalic pallial systems. *European Journal of Neuroscience*, 21, 2800–2806.
- Portavella, M., Torres, B., Salas, C (2004). Avoidance responses in goldfish: emotional and temporal involvement of medial and lateral telencephalic pallium. *The Journal of Neuroscience*, 24, 9, 2335-2342.
- Portavella, M., Salas, C., Vargas, J.P., Papini, M.R (2003). Involvement of the telencephalon in spaced-trial avoidance learning in goldfish (*arautus*). *Physiology & Behavior*, 80, 49-56.
- Portavella, M., Vargas, J.P., Torres, B., Salas, C (2002). The effects of telencephalic pallial lesions on spatial, temporal, and emotional learning in goldfish. *Brain research Bulletin*, 57, 3(4), 397-399.
- Prut, L. & Belzung, C. (2003). The open field as a paradigm to measure the effects of drugs on anxiety-like behavior: a review. *European Journal of Pharmacology*, 463, 3-33.
- Rang, H. P., Dale, M. M., Ritter, J. M., & Flower, R. J. (2007). *Farmacologia* (6^a ed.). Rio de Janeiro: Elsevier Editora.
- Rex, A., Stephend, D.N. & Fink, H. (1996). "Anxiolytic" action of diazepam and abecarnil in the modified open field test. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 53, 4, 1005-1011.
- Rodgers, R. J., Cao, B. J., Dalvi, A., & Holmes, A. (1997). Animal models of anxiety: an ethological perspective. *Braz J Med Biol Res*, 30(3), 298-304.

- Royce, J.R. (1977). On the construct validity of open-field measures. *Psychological Bulletin*, 84(6), 1098-1106.
- Sanger, D. J. (1991). Animal Models of Anxiety and the Screening and Development of Novel Anxiolytic Drugs. *Neuromethods*, 19.
- Sela, V. R., Biesdorf, C., Ramos, D. H., Zangrossi Jr, H., Graeff, F. G., & Audi, E. A. (2011). Serotonin-1A receptors in the dorsal periaqueductal gray matter mediate the panicolytic-like effect of pindolol and paroxetine combination in the elevated T-maze. *Neuroscience Letters*, 495, 63–66.
- Schierring, E. (1979). An open field study stereotype locomotor activity in amphetamine-treated rats. *Psychopharmacology*, 66, 281-287.
- Shi, D. Nikodijevic, O. jacobson, K.A. & Daly, J.W (1994). Effect of chronic caffeine on adenosine, dopamine and acetylcholine systems in mice. *Arch. Int. Pharmacodyn. Ther.*, 328, 3, 261-287.
- Snyder, S.H., Katims, J.J., Annau, Z. Bruns, R.F. & Daly, J.W. (1981). Adenosine receptors and behavioral actions of methylantines. *Proc. Nat. Acad. Sci.*, 78, 5, 3260-3264.
- Stefanski, R., Palejko, W., Kostowski, W. & Plaznik, A. (1992). The comparison of benzodiazepine derivatives and serotonergic agonists and antagonists in the animal models ak anxiety. *Neuropharmacology*, 12, 1251-1258.
- Stewart, A., Cachat, J., Wong, K., Gaikwad, S., Thomas Gilder, DiLeo, J., . . . Kalueff, A. V. (2010). Homebase behavior of zebrafish in noveltybased paradigms. *Behavioural Processes*, 85, 198–203.
- Stewart, A., Gaikwad, S., Kyzar, E., Green, J., Roth, A., & Kalueff, A. V. (2012). Modeling anxiety using adult zebrafish: A conceptual review. *Neuropharmacology*, 62, 135-143.
- Stewart, A., Wu, N., Cachat, J., Hart, P., Gaikwad, S., Wong, K., . . . Kalueff, A. V. (2011). Pharmacological modulation of anxiety-like phenotypes in adult zebrafish behavioral models. *Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry*, 35, 1421–1431.

- Subbiah, S., & Kar, B. (2013). Adult zebrafish as a new model to study anxiety. *Asian J. Exp. Biol. Sci*, 4, 2, 167-171.
- Tabach, R (2011). Modelos Animais para Estudo de Drogas Ansiolíticas. In: Carlini, E.A. & Mendes, F.R. *Protocolos em Psicopatologia Comportamental: um guia para a pesquisa de drogas com ação sobre o SNC*, São Paulo: Editora Fap-Unifesp, 159-182.
- 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. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 65(4), 571–576.
- Tomaz, C., Silva, A.L., Batistão, O. & Castreghini (1987). A simple device to measure three types of inhibitory avoidance. *Psicologia: Teoria e Pesquisa*, 3, 1, 64-71.
- Torrejais, J. C. M., Rosa, C. C. M., Boerngen-Lacerda, R., & Andreatini, R. (2008). The elevated T-maze as a measure of two types of defensive reactions:A factor analysis. *Brain Research Bulletin*, 76, 376–379.
- Umezu, T (1999). Effects of psychoactive drugs un the Vogel Conflict Test in mice. *Japan Journal of Pharmacology*, 80, 111-118.
- Vargas, J.P., Bingman, V.P., Portavella, M., López, J.C (2006). Telencephalon and geometric space in goldfish. *European Journal of Neuroscience*, 24, 2870-2878.
- Viana, M. d. B., Zangrossi Jr., H., & Onusic, G. M. (2008). 5-HT1A receptors of the lateral septum regulate inhibitory avoidance but not escape behavior in rats. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*, 89, 360–366.
- Wilner, P. (1991). *Behavioral models ins psychopharmacology: theoretical, industrial and clinical perspectives*. Cambridge: Cambridge University.
- Wojcik, M., Mitros, K., Jastreboff, P. J., & Zielinski, K. (1975). The variability of innate darkness preference in mica: an evaluation od Ungar's design *Acta Neurobiol. Exp.* , 35, 285-298.
- Wong, K., Elegante, M., Bartels, B., Elkhayat, S., Tien, D., Roy, S., . . . Kalueff, A. V. (2010). Analyzing habituation responses to novelty in zebrafish (*Danio rerio*). *Behavioural Brain Research*, 208, 450–457.

Zangrossi Jr, H., & Graeff, F. G. (1997). Behavioral Validation of the Elevated T-Maze, a New Animal Model of Anxiety. *Brain Research Bulletin*, 44(1), 1–5.

ANEXO

MODELOS EXPERIMENTAIS DE ANSIEDADE

Bateria de Teste de Reação de Defesa

- **Animal utilizado:** Roedores.
- **N mínimo recomendado:** 8 a 10 animais por grupo.
- **Equipamento:** Uma caixa de aproximadamente 6 metros de comprimento, 40 cm de largura e 30 cm de altura.
- **Procedimento:** Aproxima-se uma ameaça em direção ao animal observando-se velocidade de aproximação e distância de aproximação.
- **Parâmetros Analisados:** Fuga, esquiva, congelamento, levantamento de risco e luta defensiva.
- **Referências:** Griebel et al. 1995.

Campo Aberto

- **Animal utilizado:** Roedores e Peixes.
- **N mínimo recomendado:** 8 a 10 animais por grupo.
- **Equipamento:** Uma arena quadrada ou redonda que permita exploração livre.
- **Procedimento:** O animal é colocado no centro da arena e mede-se exploração livre do animal neste aparato ao longo de um período de tempo determinado, geralmente de 5 a 15 minutos, dependendo do objetivo do experimento.
- **Parâmetros Analisados:** Tempo de permanência no centro ou na periferia, ambulação total, ambulação no centro. Apenas para roedores também são analisados, limpeza, congelamento, defecação e levantamento de risco.
- **Referências:** Tabach, 2011.

Escototaxia ou Preferência Claro-Escuro

- **Animal utilizado:** Roedores e Peixes.
- **N mínimo recomendado:** 8 a 10 animais por grupo
- **Equipamento:** Caixa de Claro-Escuro adaptada para roedores ou peixes.

- **Procedimento:** Após 300 segundos de habituação no centro, o animal é exposto a todo o aparato para exploração livre por 900 segundos.
- **Parâmetros Analisados:** Tempo de latência do primeiro movimento, número total de cruzamentos, tempo de permanência em cada lado. Apenas para roedores, são analisados levantamento de risco e limpeza nos dois compartimentos.
- **Referências:** Tabach, 2011; Maximino, et al., 2010.

Labirinto em Cruz Elevado

- **Animal utilizado:** Roedores.
- **N mínimo recomendado:** 8 a 10 animais por grupo
- **Equipamento:** Labirinto em Cruz Elevado.
- **Procedimento:** O animal é colocado na parte central do aparato com o focinho voltado para o braço fechado. Permite-se exploração livre por 5 minutos.
- **Parâmetros Analisados:** Entradas no braço aberto e fechado, tempo de permanência nos braços aberto e fechado.
- **Referências:** Tabach, 2011; Gouveia Jr. e Morato, 2002.

Labirinto em T Elevado

- **Animal utilizado:** Roedores.
- **N mínimo recomendado:** 8 a 10 animais por grupo
- **Equipamento:** Labirinto em T.
- **Procedimento:** O animal é colocado no início do braço fechado. Observa-se o animal até ele entrar no braço aberto. São realizadas 3 tentativas (linha de base, esquiva 1 e esquiva 2). Após essas 3 tentativas o animal é colocado no início do braço aberto. Observa-se a passagem dele do braço aberto para o braço fechado. Para este procedimento é realizado apenas uma tentativa (escapada).
- **Parâmetros Analisados:** Latência de saída do braço fechado para o braço aberto, latência de saída do braço aberto para o braço fechado, frequência de comportamentos como levantamento de risco, coçar, limpar e fezes.
- **Referências:** Zangrossi e Graeff, 1997.

Novel Tank Test

- **Animal utilizado:** Peixes.
- **N mínimo recomendado:** 8 a 10 animais por grupo
- **Equipamento:** Um tanque de 1,5 litros.
- **Procedimento:** O tanque é dividido em 2 ou 3 compartimentos iguais indicando profundidade. A animal fica por 5 minutos em exploração livre.
- **Parâmetros Analisados:** tempo no compartimento de cima, do meio e de baixo, número de cruzamentos entre compartimentos.
- **Referências:** Stwert et al., 2012.

Teste de Preferência Social e Cardumeamento

- **Animal utilizado:** Peixes.
- **N mínimo recomendado:** 8 a 10 animais por grupo
- **Equipamento:** Tanque de 40 litros.
- **Procedimento:** Um grupo de animais são colocados no tanque e é observado o padrão de cardumeamento destes.
- **Parâmetros Analisados:** Padrões de cardumeamento, comportamento individual no cardumeamento, tempo de cardumeamento, cor do animal e cor do animal ao lado.
- **Referências:** Stwert et al., 2012.

Teste de Preferência Social e Cardumeamento

- **Animal utilizado:** Peixes.
- **N mínimo recomendado:** 8 a 10 animais por grupo
- **Equipamento:** Tanque de 40 litros.
- **Procedimento:** Um grupo de animais são colocados no tanque e é observado o padrão de cardumeamento destes.
- **Parâmetros Analisados:** Padrões de cardumeamento, comportamento individual no cardumeamento, tempo de cardumeamento, cor do animal e cor do animal ao lado.
- **Referências:** Stwert et al., 2012.

Teste de Conflito de Vogel

- **Animal utilizado:** Roedores.
- **N mínimo recomendado:** 8 a 10 animais por grupo
- **Equipamento:** Shuttle Box.
- **Procedimento:** O roedor privado de água será exposto a um aparato no qual lambidas ao bebedouro libera água. Na primeira sessão o animal permanecerá 40 minutos no aparato podendo consumir a quantidade de água que desejar. Após essa primeira exposição o animal será re-exposto ao aparato, mas desta vez será emitido um choque a cada 20 lambidas.
- **Parâmetros Analisados:** Número de choques levado ou número de lambidas;
- **Referências:** Umezu, 1999.