



**CAIO MAXIMINO DE OLIVEIRA**

**PARÂMETROS DA ESCOTOTAXIA COMO MODELO COMPORTAMENTAL DE  
ANSIEDADE NO PAULISTINHA (*DANIO RERIO*, CYPRINIDAE, PISCES)**

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado em Neurociências e Biologia Celular da Universidade Federal do Pará, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Neurociências e Biologia Celular, área de concentração Neurociências.

Orientador: Prof. Dr. Amauri Gouveia Junior.

Belém/PA

2011

Oliveira, Caio Maximino.

Parâmetros da escototaxia como modelo comportamental de ansiedade no paulistinha (*Danio rerio*) / Caio Maximino de Oliveira. – Belém: UFPA / Universidade Federal do Pará, 2011

78f.

Dissertação (Programa de Pós-graduação em Neurociências e Biologia Celular) –

Instituto de Ciências Biológicas - UFPA

A Monica Gomes Lima, justinho voce.

## **AGRADECIMENTOS**

Ao Prof. Dr. Silvio Morato, pelas idéias, apoio, e co-orientação.

À equipe do Laboratório de Psicobiologia e Psicopatologia Experimental da UNESP/Bauru – Alvaro Antonio Assis Pontes (Maldito), Henrique Meira de Castro (Kpta), Rafael Colmanetti (Broz), Renata Inah Tavares de Lacerda – pelo esforço kubitschekiano colocado na concretização desse trabalho.

Ao Thiago Marques de Brito, grande amigo e companheiro de todas as horas, que desenvolve a dissertação-irmã no Laboratório de Comportamento Exploratório da USP/Ribeirão Preto.

Aos colegas do Laboratório de Neurociências e Comportamento.

Ao Bruno Rodrigues dos Santos, pelo apoio – sem o qual essa dissertação não existiria.

A Odair Gimenes Martins, responsável (ainda que indiretamente) por essa dissertação e pela carreira científica que (esperamos) se inicia.

"A ansiedade acerca do futuro nunca produz ganhos; não percebemos o mal até que esse ocorra, e, quando o percebemos, nenhum conselho é de ajuda; a sabedoria ou é precoce, ou é tardia" (Arthur Somers Roche).

## RESUMO

Determinados peixes teleósteos apresentam um caractere comportamental de escototaxia, a preferência por ambientes escuros a ambientes claros. O presente trabalho buscou avaliar alguns parâmetros do comportamento exploratório do paulistinha (*Danio rerio* Hamilton 1822) na caixa claro-escuro. A evitação do compartimento branco apresenta um padrão bifásico, com um aumento na evitação precedendo uma diminuição (Experimento 1). Essa mesma evitação não habitua frente à exposição repetida, independentemente do intervalo inter-sessões, ao contrário da locomoção total (Experimentos 2 e 3); a exposição forçada ao compartimento branco não altera a exploração subsequente nem a locomoção total (Experimento 4). Esses resultados sugerem que a novidade do aparato não é a dimensão controladora da escototaxia; além disso, esses resultados também sugerem que a preferência pelo compartimento preto não é causada simplesmente pela esquiva ao compartimento branco, ainda que essa certamente tenha um papel importante. O papel da aversividade do compartimento branco foi investigado na segunda série de experimentos. A iluminação sobre o compartimento branco é um fator ansiogênico, já que aumentá-la diminui o tempo que os animais passam sobre este sem afetar a locomoção total (Experimento 5). Esse fenômeno parece se dever a uma diminuição na capacidade de camuflagem com o substrato (cripse), já que alterar a cor do compartimento branco para cinza aumenta o tempo passado neste, enquanto alterar a cor do compartimento preto para cinza aumenta o tempo passado no compartimento branco, ambas as alterações não afetando a locomoção total (Experimento 6). Além disso, o aumento da proporção ocupada pelo compartimento branco no aparato (de 50% para 75%) diminui o tempo passado neste sem afetar a locomoção total (Experimento 7). Esses resultados sugerem que o compartimento branco é aversivo, e portanto a preferência pelo compartimento preto não é causada simplesmente por propriedades reforçadoras positivas desse ambiente. Tomados em conjunto, os resultados das duas séries de experimentos sugerem que a escototaxia resulta do conflito aproximação-evitação. O Experimento 8 representa uma manipulação ambiental comum que altera a ansiedade em roedores, o enriquecimento; aqui, animais criados em ambiente enriquecido por duas semanas apresentam menor evitação do compartimento branco. Conclui-se que a escototaxia apresenta bom valor preditivo.

## ABSTRACT

Certain teleost fishes present a behavioral trait of scototaxis, the preference for dark environments and not bright ones. The present work tried to evaluate some parameters of the exploratory behavior of the zebrafish (*Danio rerio* Hamilton 1822) in the black/white tank, aiming to establish the reliability of measures in different contexts. White compartment avoidance presents a biphasic pattern, with an increase in avoidance preceding a decrease (Experiment 1). This same avoidance does not habituate to repeated exposure, independently of the inter-session interval, on the contrary of total locomotion (Experiments 2 and 3); forced exposure to the white compartment does not alter the subsequent exploratory behavior (Experiment 4). These results suggest that novelty is not the controlling dimension of scototaxis; besides, these results also suggest that the preference for the Black compartment is not caused simply by avoidance of the white compartment, although this certainly has an important role. The role of the aversiveness of the white compartment was assessed in a second series of experiments. The illumination above the white compartment is an anxiogenic factor, since increasing it decreases the time spent in the white compartment without affecting total locomotion (Experiment 5). This phenomenon seems to be due to a decrease in the capacity to camouflage with the substrate (crypsis), since altering the color of the white compartment to grey increases its exploration, while altering the color of the black compartment to grey increases the time spent in the white compartment (Experiment 6). Besides, the increase in the proportion of the apparatus occupied by the white compartment (from 50% to 75%) decreases the time spent in it (Experiment 7). These results suggest that the white compartment is aversive, and therefore the preference for darkness is not caused simply by positive reinforcing properties of the black compartment. Taken together, the results of both series of experiments suggest that scototaxis results from an approach-avoidance conflict. Experiment 8 represents a common environmental manipulation which alters anxiety in rodents, environmental enrichment; here, animals raised in an enriched aquarium for two weeks present less white avoidance. It is concluded that scototaxis has good construct validity.

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b>	<b>1</b>
1.1	MODELOS ANIMAIS EM PSICOPATOLOGIA EXPERIMENTAL	2
1.2	MODELOS DE MEDO, ANSIEDADE E ESTRESSE EM PEIXES	5
1.2.1	Esquiva	6
1.2.2	Campo aberto	7
1.2.3	Distribuição vertical eliciada pela novidade	8
1.2.4	Preferência claro/escuro	9
<b>2</b>	<b>OBJETIVOS</b>	<b>12</b>
2.1	OBJETIVOS GERAIS	12
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	12
<b>3</b>	<b>MÉTODOS, RESULTADOS E DISCUSSÃO PRELIMINAR</b>	<b>13</b>
3.1	PROTOCOLOS PARA ESCOTOTAXIA	13
3.1.1	Materiais	13
3.1.2	Procedimento	15
3.2	EXPERIMENTO 1: HABITUAÇÃO INTRA-SESSÃO DA ESCOTOTAXIA	15
3.2.1	Métodos	17
3.2.2	Resultados	18
3.2.3	Discussão preliminar	19
3.3	EXPERIMENTO 2: HABITUAÇÃO INTER-SESSÃO (IIS = 24 HS.) DA ESCOTOTAXIA	20
3.3.1	Métodos	20
3.3.2	Resultados	22
3.3.3	Discussão preliminar	23
3.4	EXPERIMENTO 3: HABITUAÇÃO INTER-SESSÃO (IIS = 15 MIN.) DA ESCOTOTAXIA	23
3.4.1	Métodos	24
3.4.2	Resultados	25
3.4.3	Discussão preliminar	26
3.5	EXPERIMENTO 4: EFEITO DA EXPOSIÇÃO FORÇADA AO COMPARTIMENTO BRANCO NA ESCOTOTAXIA	26
3.5.1	Métodos	27
3.5.2	Resultados	28
3.5.3	Discussão preliminar	29
3.6	EXPERIMENTO 5: EFEITO DE DIFERENTES NÍVEIS DE ILUMINAÇÃO SOBRE O COMPARTIMENTO BRANCO NA ESCOTOTAXIA	29
3.6.1	Métodos	30
3.6.2	Resultados	31
3.6.3	Discussão	32
3.7	EXPERIMENTO 6: EFEITO DA COR DOS COMPARTIMENTOS NA ESCOTOTAXIA	33
3.7.1	Métodos	33
3.7.2	Resultados	35
3.7.3	Discussão	36
3.8	EXPERIMENTO 7: EFEITO DA PROPORÇÃO DOS COMPARTIMENTOS NA ESCOTOTAXIA	36
3.8.1	Métodos	37
3.8.2	Resultados	38
3.8.3	Discussão preliminar	39
3.9	EXPERIMENTO 8: EFEITO DO ENRIQUECIMENTO AMBIENTAL NA ESCOTOTAXIA	39
3.9.1	Métodos	41
3.9.2	Resultados	42

<b>3.9.3 Discussão preliminar</b> .....	<b>43</b>
<b>4 DISCUSSÃO</b> .....	<b>44</b>
<b>5 CONCLUSÕES</b> .....	<b>46</b>
<b>6 REFERÊNCIAS</b> .....	<b>47</b>
<b>ANEXOS</b> .....	<b>58</b>

## 1 INTRODUÇÃO

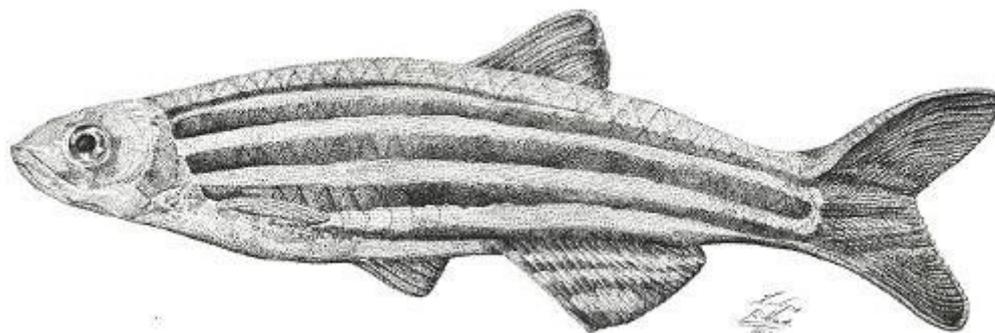


Figura 1 - Esboço do paulistinha (*Danio rerio* Hamilton 1822), variedade "blue shortfin".

O paulistinha (*Danio rerio* Hamilton 1822) (Figura 1) é um peixe teleósteo originário do sudeste asiático, onde vive em fios d'água e é predado, principalmente, por aves piscívoras (SPENCE, GERLACH *et al.*, 2008). Essa espécie de ciprinídeo ganhou intensa visibilidade nas ciências biológicas como “animal modelo” nas pesquisas de biologia do desenvolvimento (GRUNWALD & EISEN, 2002); essa visibilidade cresceu exponencialmente a partir do análise de seu genoma (WOODS, KELLY *et al.*, 2000; JEKOSCH, 2004), proteoma (LUCITT, PRICE *et al.*, 2008) e transcriptoma (LUCITT, PRICE *et al.*, 2008). Essa riqueza de informações moleculares e de desenvolvimento morfológico, no entanto, carece ainda de uma extensa contraparte funcional – seja em termos de estudos fisiológicos, seja em termos de estudos comportamentais. Nas neurociências – ou, ainda, na psicopatologia e na neuropatologia experimentais –, alguns trabalhos surgiram recentemente utilizando essa espécie (GUO, 2000; GRUNWALD & EISEN, 2002; GOLDSMITH & SOLARI, 2003; NICOLSON, 2006; PANULA, SALLINEN *et al.*, 2006; BEST & ALDERTON, 2008), mas poucos desses trabalhos apresentam um foco sobre o comportamento (GERLAI, 2003) que, conforme será argumentado nessa introdução, faz-se cada vez mais necessário no desenvolvimento de modelos comportamentais válidos de transtornos psiquiátricos. O presente trabalho buscará esmiuçar o modelo de preferência claro/escuro (SERRA, MEDALHA *et al.*, 1999; GOUVEIA, ZAMPIERI *et al.*, 2005;

MAXIMINO, BRITO *et al.*, 2007) a partir de uma perspectiva paramétrica – ou seja, através da manipulação de parâmetros do aparato de teste e de “estados motivacionais” dos animais de forma a verificar a *confiabilidade* do modelo em diferentes contextos e situações. Trata-se, ressaltamos, de um primeiro passo para o processo de validação desse modelo como teste comportamental de “ansiedade”; passos posteriores envolvem a validação farmacológica e experimentos apropriados à validação do construto (WILLNER, 1991).

## 1.1 MODELOS ANIMAIS EM PSICOPATOLOGIA EXPERIMENTAL

Em psicopatologia experimental, um *modelo* é uma simulação comportamental de um determinado fenômeno psicopatológico humano. Trata-se de uma estratégia de investigação em que o pesquisador identifica um sistema em uma espécie não-humana que seja similar em estrutura e função àquele encontrado em humanos, manipula o sistema de forma a clarificar o que ocorre quando a sua contraparte humana se danifica, e explora as possíveis estratégias de tratamento (WILLNER, 1991). A heurística do modelo comportamental tem sido extremamente útil tanto em suas aplicações (em especial em relação à investigação de novos compostos farmacológicos) quanto como instrumento de pesquisa para as bases biológicas dos transtornos mentais.

Idealmente, qualquer teste comportamental – inclusos aqui os modelos comportamentais da psicopatologia – deve passar por extensa validação, ao menos em três níveis (WILLNER, 1991): um modelo deve apresentar, em níveis satisfatórios, (a) valor de face (o teste comportamental têm uma “aparência” similar ao que pretende simular), (b) valor preditivo (o teste comportamental têm poder preditivo em relação ao fenômeno que tenta simular), e (c) valor de construto (os dados produzidos com o teste aderem-se à teoria sobre o fenômeno que tenta simular). Ao assumirmos a validade de um teste comportamental, tomamos um posicionamento ontológico de que o fenômeno sendo medido existe e afeta o resultado de um procedimento de medida (TROUT, 1999). Enquanto o conceito de validade é um conceito ontológico – concentrando-se, portanto, na referência, e na causalidade – o *procedimento* para garantir a validade (ou seja, a validação) é um conceito epistemológico – con-

centrando-se, portanto, no significado e na correlação. A validade é uma propriedade, enquanto a validação é uma atividade.

Deixadas de lado as questões epistemológicas e semânticas acerca da propriedade com que podemos atribuir estados psicológicos a animais não-humanos (KARIN-D'ARCY, 2005), existe considerável aceitação entre os pesquisadores de modelos comportamentais de ansiedade de que esse construto reflete diferentes estratégias de comportamento defensivo (BLANCHARD & BLANCHARD, 1988; BLANCHARD, YUDKO *et al.*, 1993; ABRAMS, 1994; KAVALIERS & CHOLERIS, 2001). Nesse sentido, a ansiedade humana é uma *exaptação* de um sistema de defesa que é primitivo para os mamíferos, e, possivelmente, para todos os vertebrados.

A *rationale* por trás dessa formulação é que os animais estão preparados para responder diferencialmente e de forma espécie-específica a situações de risco, e o fazem em função do estado atual de seus organismos (p. ex., seu *status* energético) e da probabilidade de risco no ambiente (i.e., distância defensiva; BLANCHARD, GRIEBEL *et al.*, 1997). “Porque a maioria das respostas de ansiedade é „barata” e protege contra danos potenciais enormes, um sistema ótimo irá expressar muitos alarmes que são desnecessários para uma situação específica, mas ainda assim perfeitamente normais (NESSE, 2005, pp. 912-913)”. A principal dimensão da ansiedade é a *evitação* de situações e contextos onde o risco é potencial (TOTH & ZUPAN, 2007), e a ansiedade difere do medo por sua direção para o futuro (sendo caracterizada pela “incontrolabilidade e imprevisibilidade de eventos potencialmente aversivos e por uma rápida mudança da atenção para o foco dos eventos potencialmente perigosos” (BARLOW, 2002, p. 104). Ainda, “a ansiedade implica algum modo de *impotência* do organismo ou pessoa em uma dada conjuntura, a instauração de uma condição *aversiva* ou *penosa* e algum grau de *incerteza* ou *dúvida*” (PESSOTTI, 1978, p. 98). Assim, a presença imediata de um risco (p. ex., um predador) elicia um conjunto de comportamentos que são identificáveis com um estado de medo, e que são sensíveis a drogas anti-pânico, mas não anti-ansiedade (BLANCHARD, GRIEBEL *et al.*, 1997); a presença potencial do risco (p. ex., o odor de um predador) produz um conjunto diferente de comportamentos (especialmente a “avaliação de risco”) que é identificado com um estado de ansiedade e sensível a drogas ansiolíticas (FANSELOW & LESTER, 1988; BLANCHARD, YUDKO *et al.*, 1993; GRAY & MCNAUGHTON, 2000; BARLOW, 2002; GODSIL, TINSLEY *et al.*, 2003; MCNAUGHTON & CORR, 2004; MCNAUGHTON & ZANGROSSI, 2008). Esse é o conceito de “distância defensiva”

(BLANCHARD, YUDKO *et al.*, 1993; BLANCHARD, GRIEBEL *et al.*, 1997) ou “contínuo de iminência predatória” (FANSELOW & LESTER, 1988; GODSIL, TINSLEY *et al.*, 2003), uma dimensão psicológica que define a topografia da resposta. Por outro lado, a “direção defensiva” parece ser o fator crítico na diferenciação entre medo e ansiedade (GRAY & MCNAUGHTON, 2000; MCNAUGHTON & CORR, 2004; MCNAUGHTON & ZANGROSSI, 2008): o medo opera permitindo que um animal retire-se de uma situação perigosa (fuga ou esquiva ativa); a ansiedade opera permitindo que um animal entre em uma situação potencialmente perigosa (avaliação de risco) ou contenha a entrada (esquiva passiva). Nessa situação, ocorre um *conflito aproximação-avoidância* (MILLER & KRAELING, 1952; MILLER & MURRAY, 1952; MONTGOMERY, 1955; ATTHOWE, 1960; HALLIDAY, 1966; LESTER, 1968; RUSSELL, 1973).

Os procedimentos de validação são inerentes ao desenvolvimento de modelos comportamentais mais robustos em psicopatologia experimental. Essa validação é tripla, envolvendo a definição operacional precisa dos comportamentos que modelam cada aspecto do transtorno em questão, assim como os possíveis efeitos diferenciais de fármacos utilizados na clínica deste transtorno sobre esses comportamentos; além disso, é preciso alcançar um nível aceitável de valor de construto, o fator que “amarra” todo o processo de validação (MCNAUGHTON & ZANGROSSI, 2008). O sucesso considerável dos principais modelos comportamentais de ansiedade em diferentes espécies envolve, principalmente, a extensa validação comportamental e farmacológica desses procedimentos (MAXIMINO, BRITO & GOUVEIA, 2010).

Ressaltamos aqui que os procedimentos de validação de um determinado modelo comportamental em psicopatologia experimental emprestam robustez a esses procedimentos, o que têm conseqüências tanto para a inserção da psicopatologia experimental em um contexto maior das neurociências (neurofarmacologia, neuroanatomia funcional, neurociência evolutiva, neurociência comportamental) quanto para a utilidade de um determinado modelo no desenvolvimento de novos fármacos que sejam efetivos no tratamento da psicopatologia modelada (WILLNER, 1991). Nesse sentido, a introdução de um novo modelo de ansiedade justifica-se tanto pelas suas aplicações (desenvolvimento de novos fármacos) quanto pelas possibilidades que um novo procedimento abre em termos da pesquisa neurocientífica. Especial interesse encontra-se no desenvolvimento de procedimentos em espécies não-mamíferas, uma tendência geral nas neurociências que busca definir não só aquilo que é espécie-específico, mas também princípios que são gerais a todos os sistemas nervosos (MARDER, 2002).

Nos últimos anos, algumas espécies de peixes teleósteos vêm atraindo o interesse de neurocientistas de diversos campos; dentre essas, o paulistinha *Danio rerio* é um teleósteo ciprinídeo largamente utilizado em pesquisas de desenvolvimento neural (cf. GUO, 2000; NICOLSON, 2006) e, cada vez mais, em pesquisas farmacológicas (GOLDSMITH & SOLARI, 2003; GOLDSMITH, 2004; NINKOVIC & BALLY-CUIF, 2006; BARROS, ALDERTON *et al.*, 2008; REDFERN, WALDRON *et al.*, 2008; GUO, 2009). As extensas homologias que essa espécie apresenta em relação ao sistema nervoso central de mamíferos (WULLIMANN & MUELLER, 2004) o tornam ideal para essa função. É uma espécie tropical que habita as porções bentopelágicas de córregos, canais, e lagos, sendo predada por peixes e aves piscívoras (ENGEZER, PATTERSON *et al.*, 2007; SPENCE, GERLACH *et al.*, 2008). Apresenta escototaxia, um comportamento de busca por ambientes escuros. Se esse comportamento de fato representa uma reação de defesa espécie-específica, correlata ao que vêm sendo chamado de “avaliação de risco” na literatura acerca da ansiedade (KAVALIERS & CHOLERIS, 2001), existe uma probabilidade considerável de que seja controlado por estruturas que são, no mínimo, análogos funcionalmente àquelas que se consideram estarem envolvidas na mesma função em mamíferos. A validação comportamental aqui proposta representa um primeiro passo para determinar se, de fato, a escototaxia pode ser utilizada como modelo de ansiedade.

## 1.2 MODELOS DE MEDO, ANSIEDADE E ESTRESSE EM PEIXES<sup>1</sup>

São poucas as atribuições experimentais do medo, da ansiedade e do estresse a animais não-mamíferos. A maior parte dessas atribuições permanece no campo teórico, modelando o comportamento de peixes em situação de forrageamento na presença de predadores, ou modelando o grau com o qual os animais “desistem” de alimento em face de um risco potencial (GUD, *giving-up density*). Entretanto, a última década viu o surgimento de alguns mo-

---

<sup>1</sup> Parte do texto dessa seção foi expandida no artigo “Measuring anxiety in zebrafish: A critical review” (Apêndice 1)

delos experimentais utilizando o paulistinha, e a aplicação de modelos anteriores nessa espécie.

### 1.2.1 Esquiva

Existem diversos procedimentos e aparatos experimentais que podem ser utilizados para condicionar esquiva (seja ela inibitória, de duas vias, ou de Sidman); todos eles, entretanto, compartilham o mesmo princípio: o condicionamento, por vezes contextual, do comportamento de esquiva e fuga por meio da aplicação de um estímulo aversivo, e, às vezes, um teste comportamental subsequente, no mesmo aparato, 24 hs após o estabelecimento do condicionamento. A esquiva inibitória, portanto, não lida diretamente com o comportamento emocional, e pode ser classificado como um procedimento para estudar a modulação emocional da memória. Dado que a maior parte dos modelos de ansiedade/medo podem ser classificados em condicionados ou não-condicionados (GREEN & HODGES, 1991), a esquiva inibitória pode ser utilizada, por exemplo, para o “*screening*” do efeito ansiolítico ou ansiogênico de um dado composto.

Existem diversos estímulos que podem ser utilizados no condicionamento da esquiva. Pode-se utilizar a liberação de um peso de metal para punir a entrada do animal em um dos compartimentos do aquário (SERRA, MEDALHA *et al.*, 2002). Além dessa aproximação simples, o uso de choques elétricos aplicados na água (HORNER, LONGO *et al.*, 1961; BEHREND & BITTERMAN, 1963; SCOBIE, 1970) ou diretamente no corpo dos peixes (DUNLOP, MILLSOPP *et al.*, 2006), também é comum na literatura.

Em linhas gerais, a literatura relata o envolvimento de receptores para glutamato (XU & DAVIS, 1992; XU, BOSHOVEN *et al.*, 1998; XU, RUSSELL *et al.*, 2001; XU, BAZNER *et al.*, 2003; XU, SCOTT-SCHEIERN *et al.*, 2007; BLANK, GUERIM *et al.*, 2009), histamina (COFIEL & MATTIOLI, 2006) e serotonina (BEULIG & FOWLER, 2008) na aquisição e memória do comportamento de esquiva. Ablações telencefálicas dificultam a aquisição da esquiva inibitória, além de eliminar os traços de memória anteriormente condicionados (HAINSWORTH, OVERMIER *et*

*al.*, 1967). A ablação telencefálica também produz déficits na esquiva de duas vias (HAINSWORTH, OVERMIER *et al.*, 1967; KAPLAN & ARONSON, 1967; SAVAGE, 1968; FUJITA & OI, 1969; SAVAGE, 1969), assim como na extinção desse procedimento (HAINSWORTH, OVERMIER *et al.*, 1967). Uma análise mais detalhada das funções do telencéfalo na esquiva de duas vias foi feita por Portavella e colegas (PORTAVELLA, VARGAS *et al.*, 2002; PORTAVELLA, TORRES *et al.*, 2004; PORTAVELLA & VARGAS, 2005) demonstrando que lesões do pálido medial (Dmd e Dmv), mas não do pálido lateral (Dld e Dlv), alteram a aquisição dessa resposta; esses resultados apontam para o pálido medial como um análogo da amígdala, ao passo que o pálido lateral seria um análogo do hipocampo.

### 1.2.2 Campo aberto

Em sua adaptação pisciana, o campo aberto nada mais é do que um novo aquário ao qual o animal é transferido e deve explorar. Dado que se trata de um ambiente novo, a tendência dos animais nessa exploração é semelhante àquela observada em outras espécies (KLEEREKOPER, TIMMS *et al.*, 1970; WARREN & CALLAGHAN, 1976; MIKHEEV & ANDREEV, 1993; MOK & MUNRO, 1998) – i.e., manter-se mais tempo na periferia do aparato do que no centro deste (tigmotaxia). Em um campo aberto, obtemos medidas de exploração que estão relacionadas à atividade locomotora e medidas que estão associadas à ansiedade; esse padrão de tigmotaxia é alterado por substâncias que produzem um efeito ansiolítico ou ansiogênico em roedores (PRUT & BELZUNG, 2003). Em peixes, entretanto, o campo aberto costuma ser utilizado para avaliar padrões motores – como, por exemplo, o efeito de drogas que alteram a função dopaminérgica (MOK & MUNRO, 1998; BJERKE, 2002; ANICHTCHIK, KASLIN *et al.*, 2004; LÓPEZ-PATIÑO, YU *et al.*, 2008) e histaminérgica (PEITSARO, KASLIN *et al.*, 2003).

### 1.2.3 Distribuição vertical eliciada pela novidade

O primeiro modelo a ser explicitamente chamado de “modelo de ansiedade” utilizando o paulistinha é aquele que chamaremos aqui de “modelo de distribuição vertical eliciada pela novidade” (LEVIN, BENCAN *et al.*, 2007; BENCAN & LEVIN, 2008; LÓPEZ-PATIÑO, YU *et al.*, 2008; SPEEDIE & GERLAI, 2008). Esse teste baseia-se na observação de que os paulistinhas, quando em um estado equivalente ao que poderíamos chamar de „medo”, tendem a afastar-se da superfície da água (PFEIFFER, 1977; GERLAI, 2010):

A escolha de posição (fundo vs. níveis superiores) foi considerada um índice de ansiedade, similar à escolha de posição entre braços fechados vs. braços abertos no labirinto em cruz elevado e posições próximas às paredes (tigmotaxia) vs. o centro de um campo aberto em roedores (LEVIN, BENCAN *et al.*, 2007, p. 55).

Manipulações que induzem um estado de ansiedade (e.g., antagonistas dos receptores nicotínicos) aumentam o tempo que o animal passa no fundo do aparato, enquanto manipulações que produzem ansiólise (e.g., agonistas dos receptores nicotínicos) diminuem esse tempo. Uma medida independente de atividade pode ser derivada avaliando-se o deslocamento horizontal do animal (DLUGOS & RABIN, 2003; LEVIN, BENCAN *et al.*, 2007; BENCAN, SLEDGE *et al.*, 2009; EGAN, BERGNER *et al.*, 2009; WONG, ELEGANTE *et al.*, 2010), e essa medida parece ser sensível a manipulações que induzem sedação, mas não ansiólise (BENCAN, SLEDGE *et al.*, 2009; EGAN, BERGNER *et al.*, 2009). Esse modelo foi utilizado para testar o efeito de substâncias que agem sobre o receptor nicotínico neuronal (LEVIN, BENCAN *et al.*, 2007; BENCAN & LEVIN, 2008) e, mais recentemente, para testar o efeito de drogas com efeitos clínicos sobre a ansiedade (BENCAN, SLEDGE *et al.*, 2009; EGAN, BERGNER *et al.*, 2009).

A medida principal desse teste – a proporção de tempo que o animal passa no fundo de um ambiente novo no primeiro minuto de exploração – não é inequívoca; pelo menos dois estudos (BLASER & GERLAI, 2006; GERLAI, R., FERNANDES, Y. *et al.*, 2009) não foram capazes de replicar essa medida. Além disso, esse comportamento não parece ser sensível a manipulações que produziram medo, como a exposição a predadores ou modelos de predadores. BLASER & GERLAI (2006) observaram uma redução no tempo despendido no fundo do aquário na apresentação de um modelo tridimensional de predador, enquanto GERLAI *et al.* (2009) não observaram alterações nesse parâmetro. Quando modelos computadorizados são utilizados, não houveram alterações no tempo despendido no fundo do aquário, ainda que

fossem observados aumentos no nado errático e na frequência de “saltos” para fora do aquário (GERLAI, R., FERNANDES, YOHAAN *et al.*, 2009; AHMED, SEGUIN *et al.*, 2011). A apresentação, por via hídrica, de uma substância de alarme sintética, derivada da substância de alarme naturalmente produzida por peixes ostarifisianos, parece produzir uma alteração consistente no padrão de nado errático, produzindo também cardumes mais coesos, mas não foi capaz de eliciar aumento no tempo despendido no fundo do aquário (SPEEDIE & GERLAI, 2008). Assim, “Predadores, e estímulos [sinalizadores de] predadores, falharam sistematicamente na indução da evitação relativa ao estímulo de controle, talvez o indicador mais fundamental de medo” (BLASER, CHADWICK *et al.*, 2010).

Em relação à dimensão controladora, somente dois trabalhos exploraram essa questão a fundo. Como nossa nomenclatura indica, o principal estímulo para a distribuição espaçotemporal da exploração em um aparato novo (com o animal inicialmente mantendo-se no fundo, e explorando a porção superior somente em pontos posteriores da sessão) parece ser a *novidade*. Animais que são testados em um aparato similar ao aquário de alojamento passam menos tempo no fundo deste e fazem mais incursões ao topo do que animais testados em um aparato diferente do aquário de alojamento (BENCAN, SLEDGE *et al.*, 2009). Além disso, o tempo despendido no fundo do aquário aumenta monotonicamente durante a sessão (WONG, ELEGANTE *et al.*, 2010), sugerindo um processo de habituação à novidade do ambiente (O'KEEFE & NADEL, 1978; LEUSSIS & BOLIVAR, 2006). Em geral, esses resultados sugerem que a dimensão controladora do comportamento dos paulistinhas nesse teste é a novidade.

#### **1.2.4 Preferência claro/escuro**

Talvez a forma mais fundamental de medir as propriedades aversivas e apetitivas de um estímulo seja examinarmos comportamentos de aproximação e evitação (CRAIG, 1917; MILLER & KRAELING, 1952; MILLER & MURRAY, 1952). Assim, ao invés de utilizarmos modelos de predadores ou estímulos que sinalizam predadores (como substâncias de alarme) – o que, sem dúvida, apresenta relevância etológica, mas não implica em evitação – ou usar um campo aberto horizontal ou vertical – que parece possuir pouca relevância etológica –, a apro-

ximação experimental utilizada no modelo de preferência por escuridão é investigar estímulos que sejam sistematicamente evitados por peixes criados em laboratório, e então medir os comportamentos eliciados por esses estímulos.

Diversas espécies de peixes, inclusive às pertencentes ao gênero *Danio* (MCCLURE, 1999), possuem uma distribuição desigual de melanóforos pelo corpo quando adultos. Foi sugerido (FUIMAN & MAGURRAN, 1994) que melanóforos dorsais e dorsalmente orientados (como os observados no paulistinha *Danio rerio*) minimizam a refração e reflexão da luz que impinge sobre o corpo do animal, reduzindo a efetividade do forrageamento visual feito pelos predadores do *D. rerio*. Naturalmente, a distribuição dos melanóforos por si só não é uma suficiente como estratégia anti-predatória:

Quando o pigmento está bem desenvolvido e distribuído de forma apropriada pelo corpo, pode ajudar na cripse, especialmente em peixes associados com um substrato ou habitat estruturado. (...) A coloração críptica efetiva requer substrato e comportamento apropriados. (FUIMAN & MAGURRAN, 1994, p. 148)

Em determinadas espécies de teleósteos, a cripse representa uma defesa anti-predatória que associa uma distribuição dorsal de melanóforos e a preferência por substratos escuros (SERRA, MEDALHA *et al.*, 1999). Esse comportamento é chamado de escototaxia. Nesse modelo – **que será utilizado ao longo de todo o presente trabalho** –, o animal é transferido do aquário de residência para um aquário de testes dividido em dois compartimentos, um claro e outro escuro. Após um período de habituação à transferência, permite-se que o animal explore livremente o aparato por 15 minutos, registrando-se o tempo total que o animal despende em cada compartimento, a duração média das entradas em cada compartimento, e o número de alternâncias. Paulistinhas adultos tendem a permanecer cerca de 80% do tempo do teste no compartimento escuro (SERRA, MEDALHA *et al.*, 1999; MAXIMINO, BRITO *et al.*, 2007).

No momento, os únicos estudos farmacológicos feitos com esse modelo utilizaram larvas de paulistinha como sujeitos (GERLAI, LAHAV *et al.*, 2000; BJERKE, 2002), avaliando os efeitos do etanol e de agentes dopaminérgicos. Entretanto, as larvas do paulistinha são transparentes, e os melanóforos dorsais só irão se desenvolver quando o animal alcança a fase juvenil (MCCLURE, 1999). Como seria de se prever nesse contexto (LANGSDALE, 1993; FUIMAN & MAGURRAN, 1994), larvas de paulistinha apresentam preferência pelo ambiente claro.

De um ponto de vista de validade de construto, existem duas questões que devem ser definidas ao avaliarmos a natureza da escototaxia em termos de possíveis influências da ansiedade. A primeira é se a escototaxia é uma aproximação ao compartimento preto, o que resultaria de um *drive* exploratório positivo e, portanto, não seria resultado da ansiedade que, especialmente na clínica, é caracterizada pela evitação (TOTH & ZUPAN, 2007) e é descrita como negativa (BARLOW, 2002). A segunda questão é se, assumindo que o comportamento medido resulta da evitação, se trata-se de um comportamento controlado somente pelos aspectos negativos (caso em que representaria uma instância de medo), ou se trata-se de um conflito aproximação-evitação (caso em que representaria uma instância de ansiedade).

No momento, um único estudo paramétrico foi publicado utilizando esse método. BLASER *et al.* (2010) escolheram animais com maior ou menor evitação do compartimento claro (definida pelo tempo de permanência nesse compartimento), dividindo-os em grupos, e os confinaram no compartimento preto ou no compartimento branco do aparato, registrando o comportamento dos animais; as categorias utilizadas foram “Distância média percorrida” (uma medida geral de atividade, definida pelo comprimento médio do percurso percorrido pelo animal), “Duração da movimentação” (uma medida adicional de atividade, definida pelo tempo que o animal passa movimentando-se a uma velocidade  $> 1,0$  cm/s), “Distância média das paredes” (uma medida de tigmotaxia, composta pela distância média do animal em relação à parede mais próxima durante a tentativa), “Duração do congelamento” (proporção da tentativa em que o animal passa imóvel), e “Velocidade angular” (uma medida de movimento errático, em termos de taxa de mudanças no percurso). O confinamento no compartimento branco produziu aumentos sistemáticos na taxa de congelamento nos animais que apresentavam forte preferência pelo lado claro, enquanto a tigmotaxia, o movimento errático, e a atividade locomotora são maus previsores da magnitude da preferência. Esses resultados sugerem que o compartimento branco é aversivo, já que os animais que apresentavam uma evitação marcada dessa porção do aparato exibiam comportamentos de medo quando confinados nele. Não é possível saber, a partir dos experimentos de BLASER *et al.* (2010), se esse comportamento é controlado somente pelos aspectos negativos, ou se trata-se de um conflito aproximação-evitação. Assim, os presentes experimentos buscaram responder a essa questão, através de manipulações do aparato e do procedimento que alterassem essas motivações.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVOS GERAIS

O presente trabalho pretende delinear a validação comportamental da exploração escototáxica para o paulistinha *Danio rerio* como modelo de ansiedade, procurando aproximar-se dos valores de face, preditivo, e de construto. Essa validação visa, fundamentalmente, dois objetivos gerais: 1) o desenvolvimento desse modelo em seus elementos comportamentais (incluindo variáveis internas, externas, e de procedimento), de forma a subsidiar a futura pesquisa psicofarmacológica nessa espécie; e 2) a descrição preliminar desses elementos comportamentais, de forma a subsidiar um entendimento posterior melhor acerca das bases neurobiológicas da ansiedade em seus aspectos comparados, ecológicos e evolutivos.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

A partir desses objetivos gerais, o presente projeto pretende:

Descrever o processo de habituação intra- e inter-sessões da escototaxia.

Descrever efeitos da exposição forçada ao compartimento branco sobre a escototaxia.

Investigar o papel da aversividade do compartimento branco na escototaxia.

Descrever possíveis alterações no comportamento exploratório desses animais no aparato em função do *rearing* em ambiente enriquecido vs. ambiente empobrecido;

### 3 MÉTODOS, RESULTADOS E DISCUSSÃO PRELIMINAR

#### 3.1 PROTOCOLOS PARA ESCOTOTAXIA

O protocolo utilizado para a definição da preferência por escuridão e para avaliar os efeitos das diferentes manipulações sobre a exploração do compartimento branco e a locomoção total foi uma modificação do descrito em Maximino (2007). Uma descrição completa do protocolo e suas variações pode ser encontrado em MAXIMINO *et al.* (2010) e STEWART *et al.* (2011)(Apêndices A e B).

##### 3.1.1 Materiais

**Alojamento.** Com exceção do alojamento descrito no Experimento 8, em todos os experimentos os animais foram alojados seguindo recomendações do Canadian Council in Animal Care (CANADIAN COUNCIL ON ANIMAL CARE, 2005). Os animais foram alojados em grupos (densidade 1 animal/2 l). As condições de qualidade da água dos aquários foram monitoradas conforme guias específicas para o paulistinha (LAWRENCE, 2007)(Tabela 1).

Parâmetro	Valores tolerados
Temperatura (° C)	18-24
Nitrito (mg/l)	<0,009
Nitrato (mg/l)	<0,16

<b>pH</b>	6,0-8,0
<b>Salinidade (%)</b>	<6

Tabela 1 - Parâmetros de qualidade de água para os alojamentos dos animais.

**Aparato.** Com exceção dos equipamentos diferenciados utilizados nos Experimentos 6 e 7, todos os experimentos utilizaram o mesmo aparato-padrão (Figura 2). Um aquário de acrílico opaco de 15 cm x 10 cm x 45 cm (altura x largura x comprimento), dividido ao meio em uma metade preta e uma metade branca, é utilizado. As paredes e o fundo do aquário foram feitas com o mesmo material, de forma a garantir um substrato uniforme para cada compartimento. A coluna d'água foi mantida em 10 cm de altura, produzindo um volume final de 4,5 litros. O aparato continha portinholas centrais móveis, apresentando a mesma cor do compartimento em que se localizavam (i.e., preto ou branco), definindo um compartimento central medindo 15 cm x 10 cm x 10 cm. Com exceção das tentativas da condição de alta iluminação do Experimento 6, o aparato era iluminado com iluminação ambiente (lâmpada de 60 W, localizada a cerca de 1.8 m acima do topo do aquário), produzindo aproximadamente 250 lux sobre o topo do aparato.

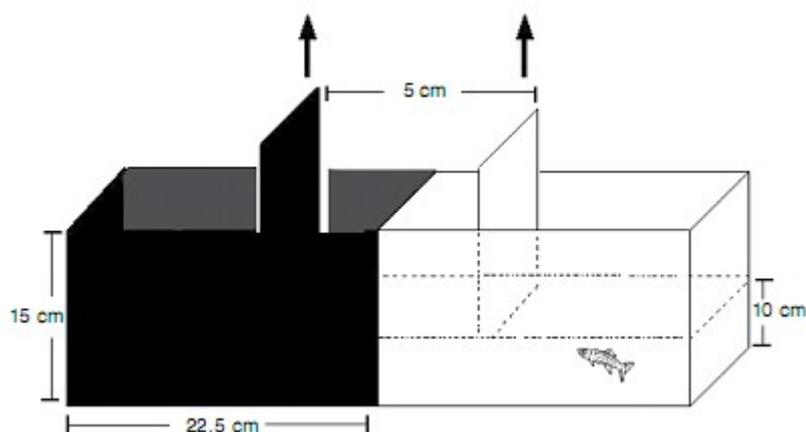


Figura 2 - Aparato de teste utilizado no protocolo proposto.

### 3.1.2 Procedimento

O animal foi colocado individualmente no compartimento central do aparato de preferência por um período de aclimatação de 3 minutos, após o qual as portinholas que delimitam o compartimento central foram removidas. O comportamento dos animais foi registrado por todo o período de 15 minutos do teste de preferência. Ainda que o confinamento no compartimento central para aclimatação permita o contato com ambos os lados do aquário, os dados provenientes de animais que não cruzaram a linha média em uma sessão de 900 s foram descartados, de forma a garantir que os animais “amostraram” ambas as alternativas (NOAKES, 1990). Foram analisados a porcentagem de tempo passada no compartimento branco (%) e o número de vezes em que o animal cruzou o centro do aquário (n).

## 3.2 EXPERIMENTO 1: HABITUAÇÃO INTRA-SESSÃO DA ESCOTOTAXIA<sup>2</sup>

O grau com que uma determinada medida do comportamento exploratório diminui conforme o tempo de aplicação do teste diminui pode ser compreendido como um índice de habituação intra-sessão. No caso do comportamento exploratório, a existência de habituação é evidência de um controle do comportamento pela novidade do ambiente, já que, conforme a novidade decai, também decai o “drive” exploratório (BERLYNE, 1950; HUGHES, 1997). Essa habituação é comumente interpretada como uma função da adaptação a um ambiente novo (O'KEEFE & NADEL, 1978; LEUSSIS & BOLIVAR, 2006), de acordo com a teoria do mapa cognitivo: quando um organismo explora um ambiente novo, uma representação interna é construída; conforme o mapa torna-se mais “completo”, a exploração reduz-se (O'KEEFE & NADEL, 1978). No entanto, a distribuição temporal do comportamento exploratório também pode indicar outras variáveis motivacionais, como o medo (HALLIDAY, 1966; LESTER, 1968), ou o conflito entre

motivações de aproximação (“drive” exploratório) e evitação (medo) (MONTGOMERY, 1955; RUSSELL, 1973). Assim, é possível que a novidade evoque estados concorrentes de medo e “curiosidade” (MONTGOMERY, 1955; RUSSELL, 1973); conseqüentemente, o grau com que a exploração ocorre depende do grau com que esta é inibida pelo medo: o contato inicial com o estímulo novo provoca um conflito aproximação-evitação, com a incidência relativa de cada componente dependendo do grau de novidade que caracteriza o estímulo (HUGHES, 1997). Logo, a extensão da aproximação deve assemelhar-se a uma função em “U” invertido da novidade declinante, com o medo energizando o comportamento na presença de novidade intensa, e a “curiosidade” tornando-se a motivação predominante quando a novidade é menos intensa.

Em teleósteos, a habituação intra-sessão a ambientes novos foi pouco estudada. Em lebistes (*Poecilia reticulata*), a novidade do ambiente elicia uma distribuição espaço-temporal da exploração que sugere um conflito aproximação-evitação, com o tempo em que o animal passa na periferia do aparato apresentando uma variação em forma de “U” invertido (MIKHEEV & ANDREEV, 1993). No teste de distribuição vertical eliciada pela novidade (“novel tank diving test”), o medaka (*Oryzias latipes*) apresenta o mesmo padrão em “U” invertido em relação à profundidade do aparato, passando mais tempo no fundo do aquário no início, seguido por incursões nas porções superiores, que por sua vez são seguidas por um período posterior de exploração da porção inferior (MATSUNAGA & WATANABE, 2010). No entanto, no mesmo teste, o paulistinha apresenta um aumento monotônico no número de incursões e tempo no topo do aquário novo com o passar do tempo (WONG, ELEGANTE *et al.*, 2010). Essa diferença entre espécies sugere que o comportamento exploratório no teste de distribuição vertical é controlado pela novidade, e não pela ansiedade, ou que a novidade do ambiente é suficiente para eliciar um estado tipo-medo no paulistinha.

No Experimento 1, analisamos a distribuição temporal da atividade total e da exploração do lado branco no teste de escototaxia no paulistinha, procurando analisar a se esse teste produz o mesmo padrão de comportamento exploratório observado no teste de distribuição vertical eliciada pela novidade.

---

<sup>2</sup> Os experimentos 1 a 4 foram incluídos no artigo “Parametric analyses of anxiety in zebrafish scototaxis” (Apêndice C)

### 3.2.1 2.2.1. Métodos

10 animais adultos, de sexo indeterminado, foram colocados individualmente no compartimento central do aparato de preferência (cf. *Protocolo básico para escototaxia*, acima) por um período de aclimatação de 3 minutos, após o qual as portinholas que delimitam o compartimento central foram removidas. O comportamento dos animais foi registrado por todo o período de 15 minutos do teste de preferência, e os registros foram posteriormente divididos em blocos de três minutos (i.e., 0-3 min., 3-6 min., 6-9 min., 9-12 min., e 12-15 min.). Ainda que o confinamento no compartimento central para aclimatação permita o contato com ambos os lados do aquário, os dados provenientes de animais que não cruzaram a linha média em uma sessão de 900 s foram descartados, de forma a garantir que os animais “amostraram” ambas as alternativas. Foram analisados a porcentagem de tempo passada no compartimento branco (%) e o número de vezes em que o animal cruzou o centro do aquário (n). A habituação foi verificada, para cada uma dessas variáveis, através de uma regressão linear seguida de um teste  $F$  contra a hipótese nula de que a inclinação da linha é igual a zero.

### 3.2.2 Resultados

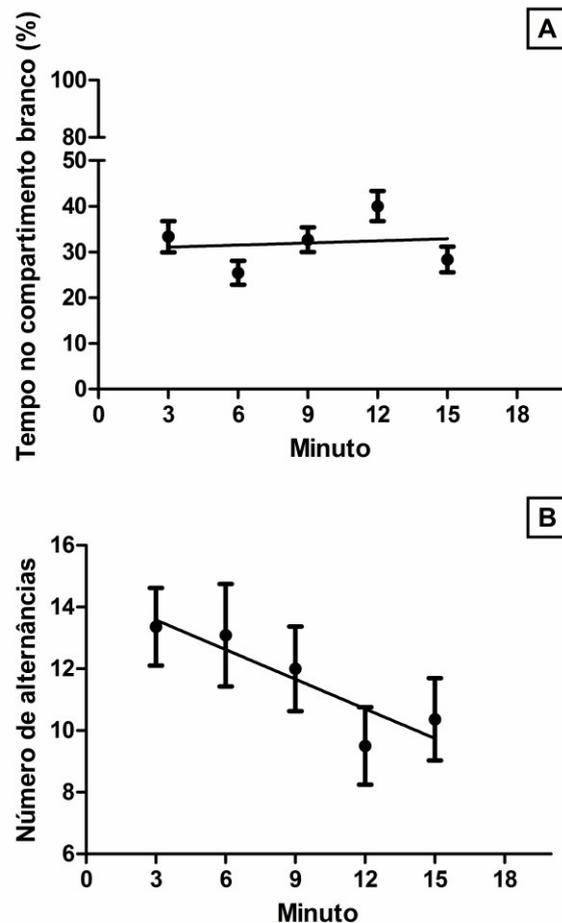


Figura 3 - a evitação do ambiente branco não habitua, apresentando um padrão bifásico (A). A movimentação total no aquário, no entanto, diminui monotonicamente (B). Os pontos representam a média dos valores, enquanto as barras representam erro médio.

A Figura 3 apresenta os resultados para o experimento de habituação intra-sessão. O tempo no compartimento branco apresentou uma variação bifásica em função do tempo, com um aumento da exploração nesse compartimento seguida de uma diminuição (Figura 3A). O ajuste linear não descreve coerentemente esses resultados ( $r^2 = 0,172$ , inclinação =  $0,1533 \pm 0,6691$ ,  $F_{[1,3]} = 0,05252$ ,  $p = 0,8335$ ). Em relação ao número de cruzamentos, observamos uma queda

monotônica (Figura 3B), descrita por uma equação linear ( $r^2 = 0,8061$ , inclinação =  $-0,3197 \pm 0,09053$ ,  $F_{[1, 3]} = 12,47$ ,  $p = 0,0386$ ).

### 3.2.3 Discussão preliminar

O padrão bifásico observado na evitação do compartimento branco é semelhante à distribuição espaço-temporal da exploração do lebiste na periferia VS. centro de um aquário novo (MIKHEEV & ANDREEV, 1993) e à distribuição da exploração do medaka no fundo VS. topo (MATSUNAGA & WATANABE, 2010). Entretanto, o paulistinha não apresenta um padrão bifásico, mas sim monotônico, da distribuição vertical em ambiente novo (WONG, ELEGANTE *et al.*, 2010). O aumento da “ansiedade” ou medo basal desses animais através da exposição a tratamentos ansiogênicos (substância de alarme, doses sub-convulsivantes de pentilenotetrazol ou cafeína) diminui ou abole a habituação ao ambiente novo, enquanto a diminuição da ansiedade basal através da exposição a tratamentos ansiolíticos (etanol agudo, morfina aguda, fluoxetina crônica) aumenta a habituação no aquário novo (WONG, ELEGANTE *et al.*, 2010). Nossos resultados sugerem que a evitação do ambiente claro é controlada por um conflito aproximação-evitação (MONTGOMERY, 1955; RUSSELL, 1973), ou pelo grau de incerteza acerca da novidade (HALLIDAY, 1966; LESTER, 1968). Ambas as hipóteses são igualmente plausíveis para um padrão bifásico (LESTER, 1968; RUSSELL, 1973). Entretanto, o decréscimo monotônico da exploração total (Figura 3B) sugere controle pela “curiosidade” (BERLYNE, 1950; HUGHES, 1997), o que favorece a hipótese de conflito motivacional. Além disso, a diferença dos resultados aqui apresentados com os resultados obtidos com o teste de distribuição vertical eliciada pela novidade (WONG, ELEGANTE *et al.*, 2010) sugerem que, no paulistinha, a novidade do ambiente *per se* (representada pelo teste de distribuição vertical) produz um padrão diferente de comportamento exploratório do que o conflito.

### 3.3 EXPERIMENTO 2: HABITUAÇÃO INTER-SESSÃO (IIS = 24 HS.) DA ESCOTOTAXIA

Além da habituação intra-sessão, a habituação inter-sessões também é comumente analisada como medida de memória de longo prazo (LEUSSIS & BOLIVAR, 2006). A exposição a estímulos novos costuma produzir uma resposta exploratória que habitua com a repetição (CARLTON & ADVOKAT, 1973; FILE & HYDE, 1978; BODNOFF, SURANYI-CADOTTE *et al.*, 1989). No entanto, em roedores expostos ao labirinto em cruz elevado e ao labirinto em zero elevado, um processo de habituação intra-sessão não é observado, um fenômeno referido como “tolerância de uma sessão” (FILE, MABBUITT *et al.*, 1990; TREIT, MENARD *et al.*, 1993; RODGERS, JOHNSON *et al.*, 1996; COOK, CROUNSE *et al.*, 2002). Sugeriu-se que esse fenômeno reflete a aquisição de uma resposta fóbica aos compartimentos abertos desses aparatos (RODGERS & SHEPHERD, 1993), e que a falta de habituação (observada quando os animais são expostos a ambientes ou estímulos novos) sugere que a novidade por si não é um estímulo ansiogênico importante nos labirintos elevados (TREIT, MENARD *et al.*, 1993).

Da mesma forma como apresenta um aumento monotônico nas entradas e tempo explorando a porção superior de um aquário novo conforme a sessão se estende, o paulistinha também apresenta um aumento monotônico a exposições repetidas (WONG, ELEGANTE *et al.*, 2010). No Experimento 2, analisamos a habituação inter-sessões no teste de escototaxia em animais expostos repetidamente ao aparato por cinco dias seguidos, com um intervalo intra-sessões (IIS) de 24 horas entre as exposições.

#### 3.3.1 Métodos

10 animais adultos, de sexo indeterminado, foram colocados individualmente no compartimento central do aparato de preferência (cf. *Protocolo básico para escototaxia*, acima) por um período de aclimação de 3 minutos, após o qual as portinholas que delimitam o compar-

timento central foram removidas. O comportamento dos animais foi registrado por todo o período de 15 minutos do teste de preferência. Após o final do teste, cada animal era transferido de volta ao aquário de alojamento, onde permaneciam por um intervalo de 24 horas. Após esse intervalo, os animais foram novamente testados no aparato de teste; a re-exposição foi iterada cinco vezes. Ainda que o confinamento no compartimento central para aclimatação permita o contato com ambos os lados do aquário, os dados provenientes de animais que não cruzaram a linha média em uma sessão de 900 s foram descartados, de forma a garantir que os animais “amostraram” ambas as alternativas. Foram analisados a porcentagem de tempo passada no compartimento branco (%) e o número de vezes em que o animal cruzou o centro do aquário (n). A habituação foi verificada, para cada uma dessas variáveis, através de uma regressão linear seguida de um teste  $F$  contra a hipótese nula de que a inclinação da linha é igual a zero.

### 3.3.2 Resultados

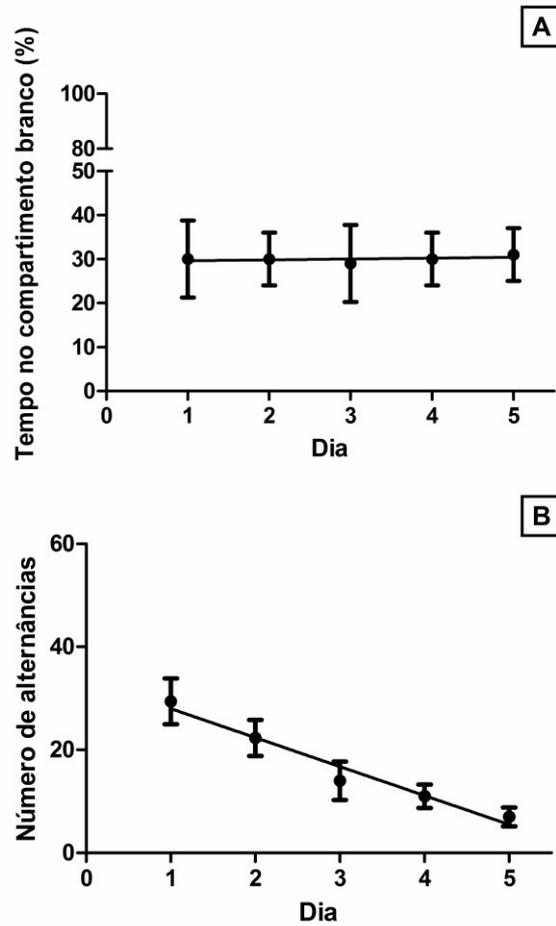


Figura 4 - o paulistinha apresenta habituação inter-sessões dos cruzamentos (B), mas não da evitação do compartimento branco (A), entre exposições repetidas ao aparato por cinco dias consecutivos, com um intervalo inter-sessões de 24 horas. Os pontos representam a média dos valores, e as barras representam o erro médio.

A Figura 4 apresenta os resultados para o experimento de habituação inter-sessões com intervalos inter-sessões (IIS) de 24 hs. Nenhuma habituação foi observada entre as sessões na evitação do compartimento branco ( $r^2 = 0,1951$ , inclinação =  $0,1975 \pm 0,2317$ ,  $F_{[1,3]} = 0,721$ ,  $p = 0,4565$ ; Figura 4A). O número de alternâncias entre os compartimentos apresentou declínio monotônico ( $r^2 = 0,9637$ , inclinação =  $-5,622 \pm 0,6302$ ,  $F_{[1,3]} = 79,58$ ,  $p = 0,003$ ; Figura 4B).

### 3.3.3 Discussão preliminar

De maneira semelhante ao observado no Experimento 1, não há evidências de habituação da evitação do compartimento branco, mas a locomoção total declina monotonicamente após a re-exposição diária ao aparato. Esses resultados sugerem que, diferentemente do teste de distribuição vertical, a novidade do ambiente não é um fator relevante para a preferência por escuridão/evitação do claro para essa espécie. Esses resultados são semelhantes aos observados em camundongos expostos por três dias consecutivos ao labirinto em zero elevado (COOK, CROUNSE *et al.*, 2002). Entretanto, diferentemente do que é observado em roedores expostos repetidamente ao labirinto em cruz elevado (FILE, MABBUITT *et al.*, 1990; RODGERS & SHEPHERD, 1993; TREIT, MENARD *et al.*, 1993; RODGERS, JOHNSON *et al.*, 1996), os presentes resultados não sugerem a presença de “tolerância de uma sessão” no teste de escototaxia no paulistinha. Essa diferença pode ser devida a diferenças inter-específicas no comportamento exploratório, a diferenças na função modelada pelos dois testes (p. ex., ansiedade VS. medo, ou tipos diferentes de ansiedade), ou a uma limitação de memória de longo prazo. Com efeito, o intervalo utilizado (24 hs) pode ter sido longo demais para a retenção de uma memória aversiva nesses animais, o que levaria aos mesmos resultados observados aqui. Essa hipótese é improvável, dado que a diminuição na locomoção geral sugere uma habituação à novidade do aparato após exposições repetidas; além disso, exposições repetidas a um ambiente novo geram habituação no teste de distribuição vertical eliciada pela novidade (WONG, ELEGANTE *et al.*, 2010).

### 3.4 EXPERIMENTO 3: HABITUAÇÃO INTER-SESSÃO (IIS = 15 MIN.) DA ESCOTOTAXIA

No Experimento 2, observamos que a evitação do compartimento branco não habitua quando o animal é exposto repetidamente ao aparato, com um intervalo de 24 horas entre as exposi-

ções. A possibilidade de que esses resultados sejam devidos a uma limitação de memória de longo prazo, e não a uma manutenção da aversão ao claro ou à irrelevância da novidade para esse comportamento, leva logicamente à necessidade de manipularmos o intervalo entre as exposições. No presente experimento, os animais foram expostos repetidamente ao aparato por três tentativas, com um intervalo inter-sessões (IIS) de 15 minutos.

### 3.4.1 Métodos

10 animais adultos, de sexo indeterminado, foram colocados individualmente no compartimento central do aparato de preferência (cf. *Protocolo básico para escototaxia*, acima) por um período de aclimatação de 3 minutos, após o qual as portinholas que delimitam o compartimento central foram removidas. O comportamento dos animais foi registrado por todo o período de 15 minutos do teste de preferência. Após o final do teste, cada animal era transferido de volta ao aquário de alojamento, onde permaneciam por um intervalo de 15 minutos. Após esse intervalo, os animais foram novamente testados no aparato de teste; a re-exposição foi iterada cinco vezes. Ainda que o confinamento no compartimento central para aclimatação permita o contato com ambos os lados do aquário, os dados provenientes de animais que não cruzaram a linha média em uma sessão de 900 s foram descartados, de forma a garantir que os animais “amostraram” ambas as alternativas. Foram analisados a porcentagem de tempo passada no compartimento branco (%) e o número de vezes em que o animal cruzou o centro do aquário (n). A habituação foi verificada, para cada uma dessas variáveis, através de uma regressão linear seguida de um teste  $F$  contra a hipótese nula de que a inclinação da linha é igual a zero.

### 3.4.2 Resultados

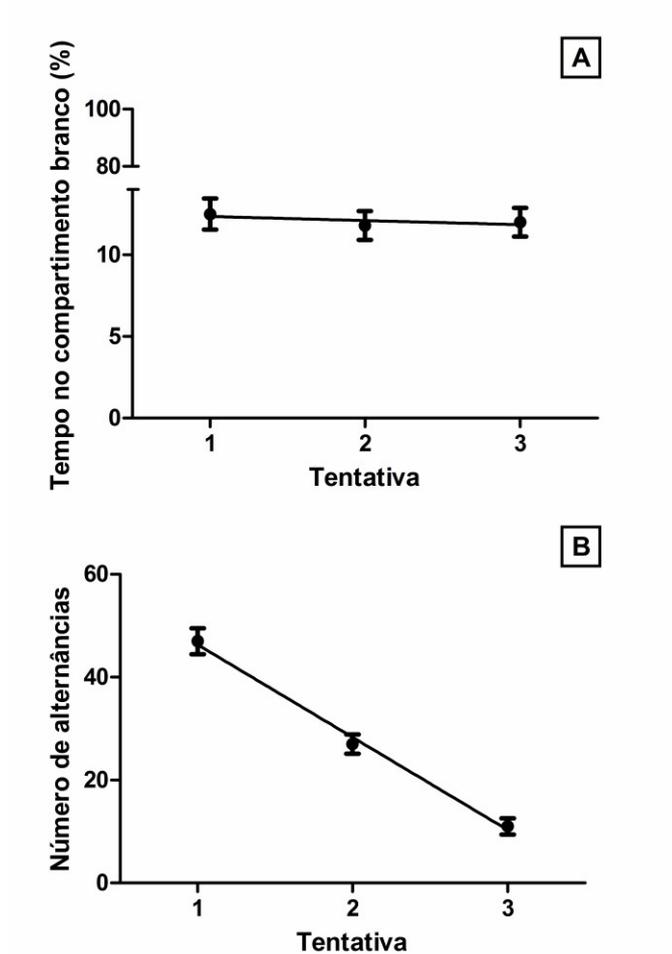


Figura 5 – o paulistinha apresenta habituação inter-sessões dos cruzamentos (B), mas não da evitação do compartimento branco (A), entre exposições repetidas ao aparato por cinco dias consecutivos, com um intervalo inter-sessões de 15 minutos. Os pontos representam a média dos valores, e as barras representam o erro médio.

A Figura 5 apresenta os resultados do experimento de habituação inter-sessões com intervalos inter-sessões (IIS) de 15 minutos. Não houve habituação da evitação do compartimento branco ( $r^2 = 0,48$ , inclinação =  $-0,2500 \pm 0,2598$ ,  $F_{[1,1]} = 0,9259$ ,  $p = 0,5122$ , Figura 5A), mas houve diminuição monotônica no número de alternâncias ( $r^2 = 0,95$ , inclinação =  $-18,00 \pm 1,155$ ,  $F_{[1,1]} = 232$ ,  $p = 0,0408$ , Figura 5B).

### 3.4.3 Discussão preliminar

Como nos Experimentos 1 e 2, não foi observada habituação da evitação quando os intervalos inter-sessão foram reduzidos para 15 minutos; a locomoção total, no entanto, parece habituar. Tomados em conjunto, os resultados dos experimentos de habituação sugerem que, ainda que a locomoção total seja controlada pela novidade do aparato, a evitação do compartimento branco não o é. Assim, diferentemente do teste de distribuição vertical, a novidade não é um fator relevante (ou o mais relevante) para a escototaxia. No entanto, pode-se argumentar que os animais não habituaram o suficiente ao compartimento branco porque não foram suficientemente expostos a este. Isso poderia ocorrer porque os animais podem facilmente evitar o compartimento branco, de forma que a habituação pode não ocorrer.

### 3.5 EXPERIMENTO 4: EFEITO DA EXPOSIÇÃO FORÇADA AO COMPARTIMENTO BRANCO NA ESCOTOTAXIA

A possibilidade de que a habituação ao compartimento branco não ocorreu por falta de exposição suficiente pode ser explorada utilizando-se de um método de exposição forçada (TREIT, MENARD *et al.*, 1993), confinando o animal no compartimento branco. No labirinto em cruz elevado, o confinamento ao braço aberto não aumenta as medidas posteriores de ansiedade (TREIT, MENARD *et al.*, 1993); no labirinto em T elevado, o confinamento ao braço aberto aumenta as medidas posteriores de pânico, mas não de ansiedade (TEIXEIRA, ZANGROSSI *et al.*, 2000). Em paulistinhas com forte preferência pelo compartimento preto, o confinamento no compartimento branco elicia um aumento na frequência de congelamento após re-exposição ao aparato (BLASER, CHADWICK *et al.*, 2010). No Experimento 4, os animais foram confinados por três vezes no compartimento branco antes de explorarem livremente o aparato.

### 3.5.1 Métodos

10 animais foram individualmente transferidos para o compartimento branco do aquário para a primeira tentativa de exposição forçada, e a saída desse compartimento foi barrada. Uma tentativa de exposição forçada durou 15 minutos, e as tentativas foram repetidas mais duas vezes, com um intervalo de 3 minutos entre as elas. Após três tentativas de exposição forçada para um único sujeito, este era transferido para o compartimento central do aparato (cf. *Protocolo básico para escototaxia*, acima) por um período de aclimação de 3 minutos, após o qual as portinholas que delimitam o compartimento central foram removidas. Um grupo-controle de 10 animais não foi confinado anteriormente no compartimento branco. O comportamento dos animais foi registrado por todo o período de 15 minutos do teste de preferência. Ainda que o confinamento no compartimento central para aclimação permita o contato com ambos os lados do aquário, os dados provenientes de animais que não cruzaram a linha média em uma sessão de 900 s foram descartados, de forma a garantir que os animais “amostraram” ambas as alternativas. Foram analisados a porcentagem de tempo passada no compartimento branco (%) e o número de vezes em que o animal cruzou o centro do aquário (n). Os resultados foram analisados através de testes *t* paramétricos (porcentagem de tempo no compartimento branco) ou não paramétricos (número de alternâncias).

### 3.5.2 Resultados

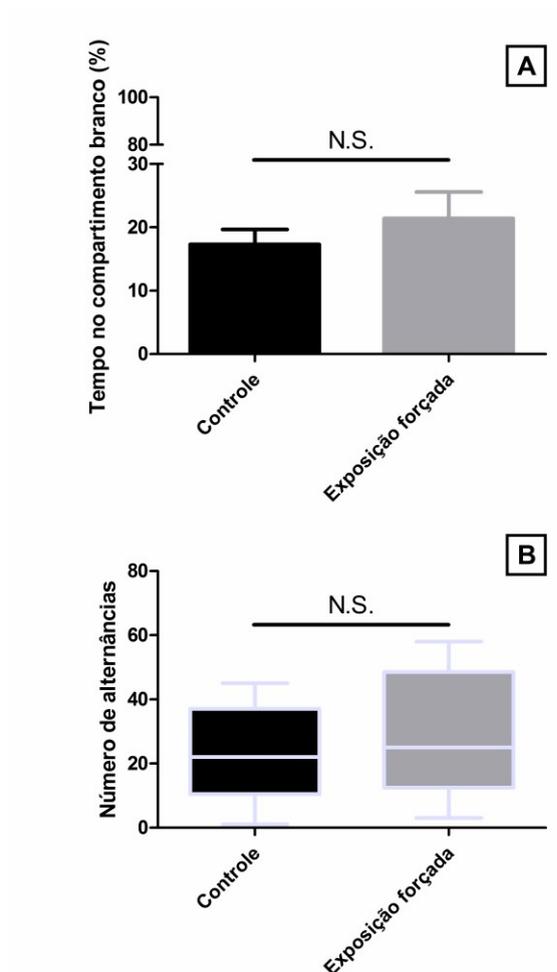


Figura 6 – Três tentativas de exposição forçada ao compartimento branco anteriormente ao teste não alteram (A) o tempo no compartimento branco, ou (B) o número de alternâncias. Em (A), as colunas indicam a média dos valores, e as barras indicam o erro médio. Em (B), os box-plots representam medianas e intervalo interquartil, e as barras representam os valores mais altos ou mais baixos localizados dentro de 1.5 intervalos inter-quartil dos quartis superior e inferior. n.s., não-significativo.

Conforme apresentado na Figura 6, a exposição forçada ao compartimento branco não produziu efeitos sobre o tempo no compartimento branco ( $t_{[g.l. = 18]} = 0,8493$ ,  $p = 0,4069$ ) ou sobre o número de alternâncias ( $U = 30,5$ ,  $p = 0,4011$ ).

### 3.5.3 Discussão preliminar

A exposição forçada ao ambiente aversivo (compartimento branco) não alterou a preferência pelo compartimento preto ou a locomoção geral no aparato. Isso sugere que, ainda que o compartimento branco aparentemente represente um reforçador negativo (BLASER, CHADWICK *et al.*, 2010), a escototaxia não pode ser atribuída somente a uma motivação de evitação. Esses resultados são compatíveis com o reportado na literatura em roedores (TREIT, MENARD *et al.*, 1993; TEIXEIRA, ZANGROSSI *et al.*, 2000) e na escototaxia em paulistinhas (BLASER, CHADWICK *et al.*, 2010), onde a exposição forçada à região aversiva do aparato aumenta medidas de medo, mas não ansiedade. Esses resultados também reforçam a hipótese de que a preferência pelo compartimento escuro não é devida a uma fuga do compartimento branco.

### 3.6 EXPERIMENTO 5: EFEITO DE DIFERENTES NÍVEIS DE ILUMINAÇÃO SOBRE O COMPARTIMENTO BRANCO NA ESCOTOTAXIA<sup>3</sup>

Os experimentos relativos à habituação intra- e inter-sessões e a exposição forçada sugerem que a novidade não é o principal fator que controla o comportamento do paulistinha no teste de escototaxia, e que a preferência pelo compartimento preto do aquário não é mais bem explicada somente por uma aversão ao ambiente claro. Entretanto, uma explicação alternativa para esses resultados é que o ambiente escuro é apetitivo, mas o ambiente claro não é aversivo – produzindo uma aproximação apetitiva ao ambiente escuro, mas não necessariamente uma evitação do ambiente claro. Se o ambiente claro é aversivo, entretanto, alterar a iluminação sobre ele deve diminuir o tempo que os animais passam explorando-o.

### 3.6.1 Métodos

10 animais foram individualmente transferidos para o compartimento central do aparato (cf. *Protocolo básico para escototaxia*, acima) por um período de aclimação de 3 minutos, após o qual as portinholas que delimitam o compartimento central foram removidas. Para esses animais (condição de baixa iluminação), o aparato era iluminado por luz ambiente (uma lâmpada de 60 W localizada a 1.8 m acima do topo do aquário de teste). Um segundo grupo (condição de alta iluminação) foi exposto a um aparato com uma fonte de luz extra (luz fluorescente de 100 W localizada a 1 m acima do topo do aquário). O comportamento dos animais foi registrado por todo o período de 15 minutos do teste de preferência. Ainda que o confinamento no compartimento central para aclimação permita o contato com ambos os lados do aquário, os dados provenientes de animais que não cruzaram a linha média em uma sessão de 900 s foram descartados, de forma a garantir que os animais “amostraram” ambas as alternativas. Foram analisados a porcentagem de tempo passada no compartimento branco (%) e o número de vezes em que o animal cruzou o centro do aquário (n). Os resultados foram analisados através de testes *t* paramétricos (porcentagem de tempo no compartimento branco) ou não paramétricos (número de alternâncias).

---

<sup>3</sup> Os experimentos 5 a 7 foram incluídos no artigo (submetido) “Parametric analyses of anxiety in zebrafish scototaxis: Effects of light levels, compartment color, and compartment proportion” (Apêndice D)

### 3.6.2 Resultados

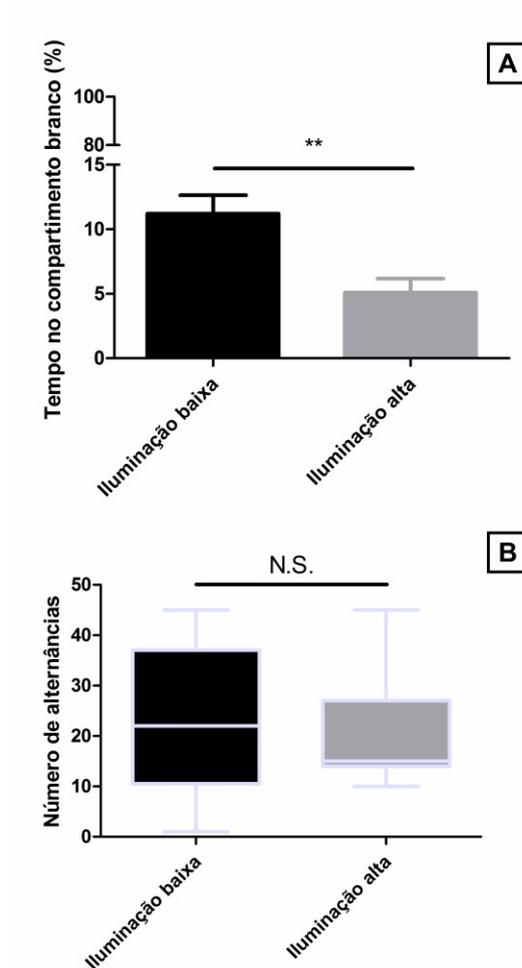


Figura 7 - O aumento da iluminação sobre o compartimento branco diminui a exploração deste (A), mas não o número de alternâncias (B). Em (A), as colunas indicam a média dos valores, e as barras indicam o erro médio. Em (B), os box-plots representam medianas e intervalo interquartil, e as barras representam os valores mais altos ou mais baixos localizados dentro de 1.5 intervalos inter-quartil dos quartis superior e inferior. \*\*,  $p < 0.01$ ; N.S., não-significativo.

Como podemos verificar na Figura 7, um aumento na iluminação sobre o compartimento branco diminuiu o tempo passado neste ( $t_{[g.l. = 18]} = 3,372$ ,  $p = 0,0034$ ), sem alterar o número de alternâncias entre os compartimentos ( $U = 40$ ,  $p = 0,99$ ).

### 3.6.3 Discussão

Os níveis de iluminação do aparato modulam o comportamento de fuga e esquiva de roedores em diferentes modelos. Na caixa claro/escuro murina, o aumento da iluminação no compartimento claro diminui o tempo que os animais passam explorando o compartimento claro (MISSLIN, BELZUNG *et al.*, 1989); esse efeito é parcialmente visual, já que a administração oftálmica de atropina (um agente dilatador pupilar) diminui ainda mais esse tempo, e animais que só apresentam melanopsinas (sem nenhum outro fotopigmento) não apresentam evitação sem dilatação pupilar (SEMO, GIAS *et al.*, 2010). A dilatação pupilar também produz ativação do córtex retrosplenial (uma porção do córtex cingulado) em camundongos tipo selvagem e camundongos que só apresentam melanopsinas, sugerindo que a evitação é guiada pela aversividade do ambiente (SEMO, GIAS *et al.*, 2010). A magnitude das respostas de sobressalto, em ratos, é monotonicamente aumentada pelo aumento nos níveis de iluminação (WALKER & DAVIS, 1997). No labirinto em cruz elevado, o aumento nos níveis de iluminação aumenta a evitação dos braços abertos (GARCIA, CARDENAS *et al.*, 2005), e altos níveis de iluminação aumentam a ansiedade e a imunoreatividade tipo-c-Fos em neurônios serotoninérgicos da rafe dorsal em ratos expostos ao campo aberto (BOUWKNECHT, SPIGA *et al.*, 2007). Devemos notar que, ainda que as ecologias sensoriais de roedores e paulistinhas sejam bastante diferentes – i.e., roedores noturnos derivam mais informação de comprimentos de onda curtos, enquanto os paulistinhas (diurnos) derivam mais informação de comprimentos de onda longos – os níveis de iluminância parecem aumentar a aversividade do ambiente para ambos os grupos. Essa evitação pode ser explicada pela hipótese críptica da escototaxia, na qual a preferência por ambientes escuros no paulistinha é uma adaptação comportamental para a busca de substratos apropriados para a camuflagem contra predadores aéreos (GERLAI, 2010).

### 3.7 EXPERIMENTO 6: EFEITO DA COR DOS COMPARTIMENTOS NA ESCOTOTAXIA

A preferência por escuridão têm se mostrado um comportamento consistente, mas existem relatos na literatura de procedimentos que produzem aversão pelo compartimento escuro (GERLAI, LAHAV *et al.*, 2000; CHAMPAGNE, HOEFNAGELS *et al.*, 2010). Nesses relatos, o aparato utilizado é diferente do descrito aqui, com o aparato *branco* sendo substituído por um aparato *transparente*, e o aparato preto sendo protegido por uma cobertura; aqui, o animal prefere o compartimento transparente ao compartimento preto. Somados ao resultado do Experimento 5, esses experimentos sugerem que a cor ou a iluminação do compartimento branco são essenciais para estabelecer a preferência. Nesse caso, a preferência pelo compartimento preto pode ser entendida como uma adaptação comportamental para a busca de substratos apropriados para a camuflagem contra predadores aéreos (GERLAI, 2010). Uma explicação alternativa para esses resultados, no entanto, é que a própria luz é aversiva para esses animais, e um mecanismo de eclipse não faz parte do comportamento observado. Para testar essa hipótese alternativa, no Experimento 6 diferentes cores de substrato (preto, branco e cinza) foram combinadas.

#### 3.7.1 Métodos

10 animais foram individualmente transferidos para o compartimento central do aparato (cf. *Protocolo básico para escototaxia*, acima) por um período de aclimação de 3 minutos, após o qual as portinholas que delimitam o compartimento central foram removidas. Um segundo grupo (condição preto-cinza;  $n = 10$ ) foi exposto a um aparato no qual o compartimento branco era substituído por um compartimento cinza. Um terceiro grupo (condição branco-cinza;  $n = 10$ ) foi exposto a um aparato no qual o compartimento preto era substituído por um compartimento cinza. O comportamento dos animais foi registrado por todo o período de 15 minutos

do teste de preferência. Ainda que o confinamento no compartimento central para aclimatação permita o contato com ambos os lados do aquário, os dados provenientes de animais que não cruzaram a linha média em uma sessão de 900 s foram descartados, de forma a garantir que os animais “amostraram” ambas as alternativas. Foram analisados a porcentagem de tempo passada no compartimento branco (%) e o número de vezes em que o animal cruzou o centro do aquário (n). Os resultados foram analisados através de testes ANOVAs de uma via paramétricas (porcentagem de tempo no compartimento branco) ou não paramétricas (número de alternâncias).

### 3.7.2 Resultados

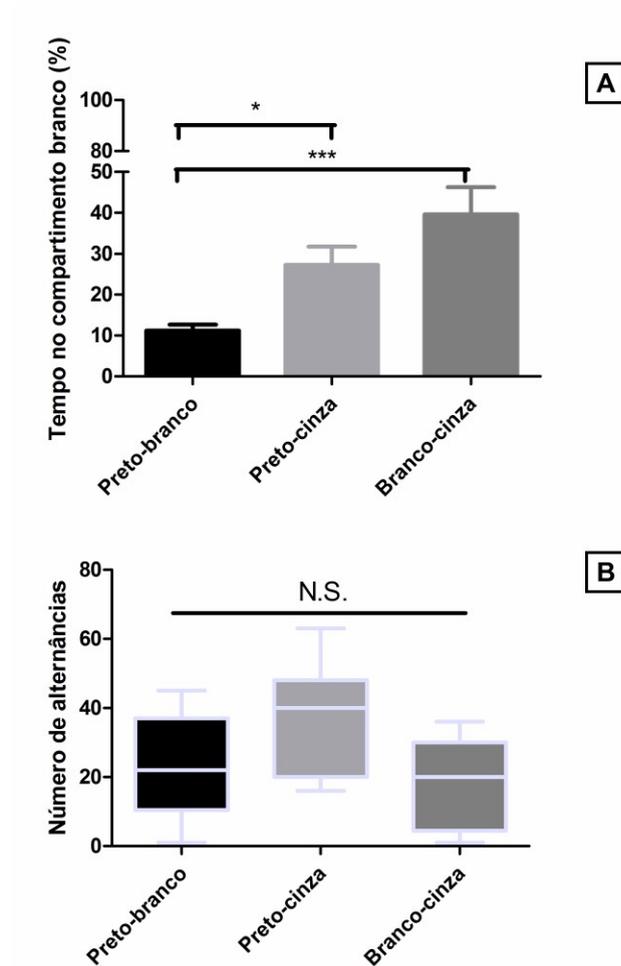


Figura 8 – a troca do compartimento branco por um compartimento cinza (aquário preto-cinza) ou do compartimento preto por um compartimento cinza (aquário branco-cinza) aumenta a exploração da porção mais clara do aparato (A), mas não o número de alternâncias (B). Em (A), as colunas indicam a média dos valores, e as barras indicam o erro médio. Em (B), os box-plots representam medianas e intervalo interquartil, e as barras representam os valores mais altos ou mais baixos localizados dentro de 1.5 intervalos inter-quartil dos quartis superior e inferior. \*\*\*,  $p < 0.005$ ; \*,  $P < 0.05$ ; N.S., não-significativo.

Como mostrado na Figura 8A, os aquários preto-cinza e branco-cinza produziram maior exploração do compartimento cinza (preto-cinza) ou branco (branco-cinza) do que o aquário preto-branco ( $F_{[2, 23]} = 12,46$ ,  $p = 0,0003$ ). Não houve, no entanto, diferença entre os aquários no seu efeito sobre a locomoção total (Figura 8B;  $H_{[g.l. = 3]} = 4,919$ ,  $p = 0,0855$ ).

### 3.7.3 Discussão

De acordo com a hipótese críptica, a preferência por escuridão representa, no paulistinha, uma adaptação comportamental para a camuflagem com o substrato (GERLAI, 2010). Em peixes, a efetividade da cripse como defesa contra predadores aéreos depende da distribuição dos melanóforos na superfície do animal; a presença de melanóforos dorsais ou dorsalmente orientados minimiza a refração e a reflexão da luz incidente sobre o peixe, reduzindo a efetividade da informação visual recebida por predadores (FUIMAN & MAGURRAN, 1994). Além disso, o habitat de origem do *D. rerio* é composto por água límpida com pouca turbidez e aluviões como substrato (ENGEZER, PATTERSON *et al.*, 2007), sugerindo uma adaptação para a evitação de predadores nesses ambientes. Tomados em conjunto com os resultados dos experimentos anteriores, dos experimentos relatados por BLASER *et al.* (2010) e a preferência pelo compartimento transparente relatada por GERLAI *et al.* (2000) e CHAMPAGNE *et al.* (2010), esses resultados sugerem que a preferência por escuridão, no paulistinha, não é resultado somente da aproximação ao compartimento escuro ou da evitação do compartimento claro, e nem se deve somente à aversão à luz.

## 3.8 EXPERIMENTO 7: EFEITO DA PROPORÇÃO DOS COMPARTIMENTOS NA ESCOTOTAXIA

Nos experimentos anteriores, verificou-se que a preferência por escuridão parece resultar de um conflito aproximação-evitação, controlado principalmente por uma dimensão de “risco”. O risco pode ser entendido com a magnitude relativa das conseqüências previstas para a apro-

ximação e para a evitação (ATTHOWE, 1960); conforme o risco aumenta, o conflito também aumenta (MILLER & KRAELING, 1952; MILLER & MURRAY, 1952; ATTHOWE, 1960), enviando a decisão na direção da evitação (GRAY & MCNAUGHTON, 2000; MCNAUGHTON & CORR, 2004). Assim, ao aumentarmos a aversividade do compartimento branco (aumentando a iluminação sobre ele), verificamos uma diminuição da exploração deste. O fator principal dessa aversividade parece ser o aumento na dificuldade de cripse, já que a substituição do compartimento branco por um compartimento cinza aumenta a exploração deste. Além disso, a substituição do compartimento *preto* por um compartimento cinza aumenta a exploração do compartimento branco, possivelmente por uma diminuição do conflito. No Experimento 7, essa hipótese foi avaliada alterando-se a proporção que os compartimentos branco e preto ocupam no aparato.

### 3.8.1 Métodos

10 animais foram individualmente transferidos para o compartimento central do aparato (cf. *Protocolo básico para escototaxia*, acima) por um período de aclimação de 3 minutos, após o qual as portinholas que delimitam o compartimento central foram removidas. Um segundo grupo (condição 75% branco;  $n = 10$ ) foi exposto a um aparato no qual o compartimento branco ocupava 75% do aparato. Um terceiro grupo (condição 75% preto;  $n = 10$ ) foi exposto a um aparato no qual o compartimento preto ocupava 75% do aparato. O comportamento dos animais foi registrado por todo o período de 15 minutos do teste de preferência. Ainda que o confinamento no compartimento central para aclimação permita o contato com ambos os lados do aquário, os dados provenientes de animais que não cruzaram a linha média em uma sessão de 900 s foram descartados, de forma a garantir que os animais “amostraram” ambas as alternativas. Foram analisados a porcentagem de tempo passada no compartimento branco (%) e o número de vezes em que o animal cruzou o centro do aquário ( $n$ ). Os resultados foram analisados através de ANOVAs de uma via paramétricas (porcentagem de tempo no compartimento branco) ou não paramétricas (número de alternâncias).

### 3.8.2 Resultados

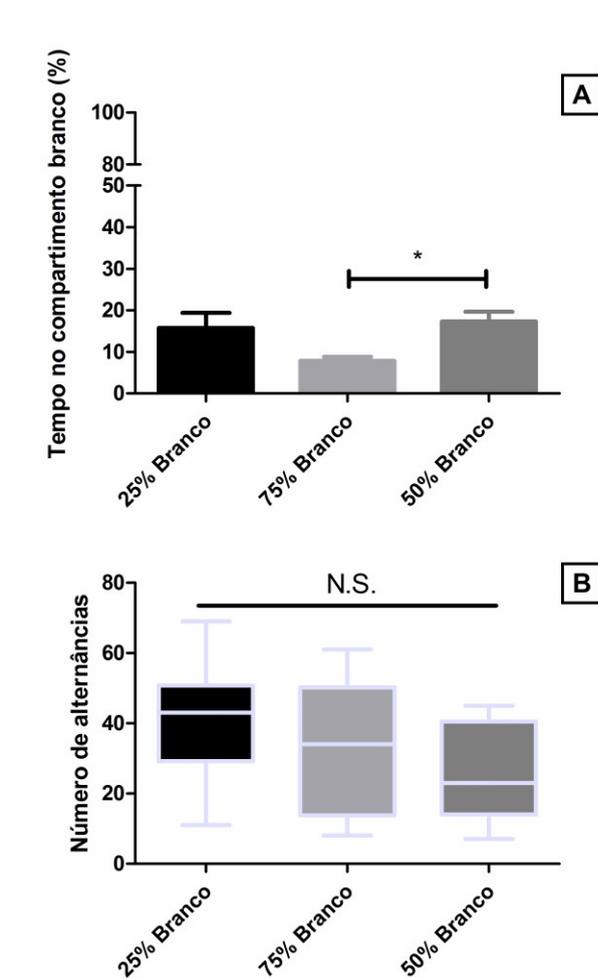


Figura 9 – O aumento da proporção do aparato ocupada pelo compartimento branco diminui a exploração deste (A), mas não o número de alternâncias (B). A diminuição dessa proporção, no entanto, não produz efeitos (A, B). Em (A), as colunas indicam a média dos valores, e as barras indicam o erro médio. Em (B), os box-plots representam medianas e intervalo interquartil, e as barras representam os valores mais altos ou mais baixos localizados dentro de 1.5 intervalos inter-quartil dos quartis superior e inferior. \*,  $P < 0.05$ ; N.S., não-significativo.

Como podemos depreender da Figura 9A, o aumento do espaço ocupado pelo compartimento branco de 50% para 75% do aparato diminui o tempo que os animais passam neste ( $F_{[2, 29]} = 3,899$ ,  $p = 0,0326$ ); o efeito inverso não foi observado quando o compartimento branco ocupava somente 25% do aparato ( $q = 3.074$ ,  $p > 0,05$ , teste HSD de Tukey). Não houve diferenças no número de alternâncias produzidas pelos aquários (Figura 9B;  $H_{[g.l. = 3]} = 3,430$ ,  $p = 0,1799$ ).

### 3.8.3 Discussão preliminar

Da mesma forma como o aumento da iluminação, o aumento da proporção do aparato que é ocupada pelo compartimento branco também diminui o tempo que os animais passam explorando este, sem alterar a locomoção total. Tomados em conjunto, os três últimos experimentos sugerem a importância da evitação do compartimento branco na definição da escototaxia.

## 3.9 EXPERIMENTO 8: EFEITO DO ENRIQUECIMENTO AMBIENTAL NA ESCOTOTAXIA<sup>4</sup>

Dentre as diversas manipulações que afetam respostas tipo-ansiedade em mamíferos, o enriquecimento ambiental vem sendo extensamente estudado (VAN PRAAG, KEMPERMANN *et al.*, 2000). O enriquecimento ambiental produz importantes efeitos sobre o comportamento emocional e a cognição em roedores. O alojamento de ratos adultos em um ambiente enriquecido diminui os índices de ansiedade no labirinto em cruz elevado, diminui as respostas compor-

---

<sup>4</sup> O experimento descrito em 3.9 (Experimento 8) faz parte do artigo (submetido) “Environmental „enrichment“, anxiety and habituation in zebrafish and goldfish: A comparative study using the scototaxis test”. (Apêndice E)

tamentais e neuroendócrinas à novidade e a estressores (DALY, 1973; DENENBERG, 1975; ESCORIHUELA, TOBENA *et al.*, 1994; KLEIN, LAMBERT *et al.*, 1994), aumenta a atividade em ambientes novos (RENNER, 1987; RENNER & ROSENZWEIG, 1987; WIDMAN & ROSELLINI, 1990; ESCORIHUELA, TOBENA *et al.*, 1994), acelera a habituação em ambientes novos e melhora a aprendizagem espacial (VARTY, PAULUS *et al.*, 2000; SCHRIJVER, BAHR *et al.*, 2002; ELLIOT & GRUNBERG, 2005; MESHI, DREW *et al.*, 2006; DEL ARCO, SEGOVIA *et al.*, 2007; AMARAL, VARGAS *et al.*, 2008; BRENES, PADILLA *et al.*, 2009). Em peixes, no entanto, existem poucos relatos dos efeitos neurocomportamentais do enriquecimento ambiental. Em lebis-tes (*Poecilia reticulata*), o aquário “padrão” de laboratório (supostamente empobrecido em relação ao ambiente natural) produz animais com cérebros menores do que os capturados no ambiente natural (BURNS, SARAVANAN *et al.*, 2009). Em diversas espécies de caraciformes, ciprinodontiformes e perciformes, o enriquecimento ambiental aumenta a capacidade dos residentes em estabelecer dominância em relação a intrusos (NIJMAN & HEUTS, 2000). Em salmões e paulistinhas, o enriquecimento ambiental aumenta a taxa de proliferação celular no prosencéfalo (LEMA, HODGES *et al.*, 2005; VON KROGH, SØRENSEN *et al.*, 2010); no paulistinha, esse efeito é acompanhado de uma diminuição na atividade locomotora (VON KROGH, SØRENSEN *et al.*, 2010). No Experimento 8, testamos o efeito do enriquecimento ambiental sobre a escototaxia no paulistinha.

### 3.9.1 Métodos



Figura 10 - (A) Visão superior do aquário de alojamento "enriquecido". (B) Visão lateral do mesmo aquário.

O grupo-controle ( $n = 10$ ) consistiu de animais retirados aleatoriamente do aquário de criação “padrão”, mantido nas condições descritas 2.1.1, acima. O grupo experimental foi criado em um aquário “enriquecido” por duas semanas; esse aquário apresentava substrato naturalístico (pedriscos de basalto ou quartzo), rochas maiores (granito) espalhadas pelo substrato, plantas calcífugas, e tocas para proteção (Figura 10). O comportamento dos animais foi registrado por todo o período de 15 minutos do teste de preferência. Ainda que o confinamento no compartimento central para aclimatação permita o contato com ambos os lados do aquário, os dados provenientes de animais que não cruzaram a linha média em uma sessão de 900 s foram descartados, de forma a garantir que os animais “amostraram” ambas as alternativas. Foram analisados a porcentagem de tempo passada no compartimento branco (%) e o número de vezes

em que o animal cruzou o centro do aquário (n). Os resultados foram analisados através de testes *t* paramétricos (porcentagem de tempo no compartimento branco) ou não paramétricos (número de alternâncias).

### 3.9.2 Resultados

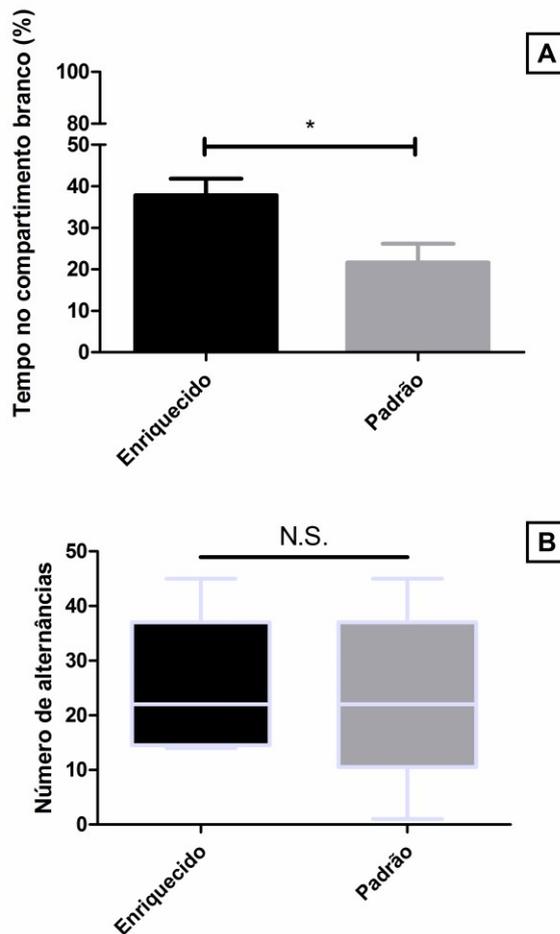


Figura 11 – Paulistinhas criados por duas semanas em um aquário enriquecido exploram o compartimento branco por mais tempo (A), mas não há efeito no número de alternâncias (B). A diminuição dessa proporção, no entanto, não produz efeitos (A, B). Em (A), as colunas indicam a média dos valores, e as barras indicam o erro

médio. Em (B), os box-plots representam medianas e intervalo interquartis, e as barras representam os valores mais altos ou mais baixos localizados dentro de 1.5 intervalos inter-quartil dos quartis superior e inferior. \*,  $P < 0.05$ ; N.S., não-significativo.

Como podemos depreender da Figura 11A, os animais criados no ambiente enriquecido passaram mais tempo no compartimento branco ( $t_{[g.l. = 16]} = 2,664$ ,  $p = 0,017$ ). Não houve efeito do ambiente enriquecido sobre a locomoção ( $U = 34,5$ ,  $p = 0,6245$ , Figura 11B).

### 3.9.3 Discussão preliminar

A criação em ambiente enriquecido é uma manipulação ambiental que produz efeitos comportamentais bem definidos sobre a ansiedade e o processamento da novidade. Paulistinhas criados em ambiente enriquecido apresentam maior proliferação celular no prosencéfalo e menor locomoção no alojamento (VON KROGH, SØRENSEN *et al.*, 2010); no presente experimento, o enriquecimento ambiental promoveu um efeito ansiolítico seletivo, mas não alterou a locomoção total no aparato de teste. Esses resultados são comparáveis ao observado em roedores (DALY, 1973; DENENBERG, 1975; ESCORIHUELA, TOBENA *ET AL.*, 1994; KLEIN, LAMBERT *ET AL.*, 1994).

## 4 DISCUSSÃO

Nos experimentos descritos nessa dissertação, observamos que a preferência por escuridão parece representar um comportamento robusto de evitação de predadores, sendo controlada por uma dimensão de conflito aproximação-evitação. A evitação do compartimento branco apresenta um padrão bifásico, com um aumento na evitação precedendo uma diminuição (Experimento 1). Essa mesma evitação não habitua frente à exposição repetida, independentemente do intervalo inter-sessões, ao contrário da locomoção total (Experimentos 2 e 3); a exposição forçada ao compartimento branco não altera a exploração subsequente nem a locomoção total (Experimento 4). Esses resultados sugerem que a novidade do aparato não é a dimensão controladora da escototaxia; além disso, esses resultados também sugerem que a preferência pelo compartimento preto não é causada simplesmente pela esquiva ao compartimento branco, ainda que essa certamente tenha um papel importante. O papel da aversividade do compartimento branco foi investigado na segunda série de experimentos. A iluminação sobre o compartimento branco é um fator ansiogênico, já que aumentá-la diminui o tempo que os animais passam sobre este sem afetar a locomoção total (Experimento 5). Esse fenômeno parece se dever a uma diminuição na capacidade de camuflagem com o substrato (cripse), já que alterar a cor do compartimento branco para cinza aumenta o tempo passado neste, enquanto alterar a cor do compartimento preto para cinza aumenta o tempo passado no compartimento branco, ambas as alterações não afetando a locomoção total (Experimento 6). Além disso, o aumento da proporção ocupada pelo compartimento branco no aparato (de 50% para 75%) diminui o tempo passado neste sem afetar a locomoção total (Experimento 7). Esses resultados sugerem que o compartimento branco é aversivo, e portanto a preferência pelo compartimento preto não é causada simplesmente por propriedades reforçadoras positivas desse ambiente. Tomados em conjunto, os resultados das duas séries de experimentos sugerem que a escototaxia resulta do conflito aproximação-evitação. O Experimento 8 representa uma manipulação ambiental comum que altera a ansiedade em roedores, o enriquecimento; aqui, animais criados em ambiente enriquecido por duas semanas apresentam menor evitação do compartimento branco.

Tomados em conjunto, os resultados aqui descritos sugerem que há uma importante dimensão de evitação na escototaxia e, portanto, esse comportamento não resulta somente de um *drive*

exploratório positivo. Assim, os animais não passam mais tempo no compartimento escuro porque esse é um reforçador positivo, mas porque evitam o compartimento claro. Além disso, essa evitação é proporcional à aversividade da porção clara do aparato; se essa porção é cinza, a evitação diminui e, se aumentamos a iluminação sobre ela, a evitação aumenta. O padrão bifásico de exploração, e o fato de os animais fazerem incursões no compartimento branco, sugere que a novidade do ambiente produz uma motivação positiva (ainda que mista) que leva à exploração do aparato como um todo. Essa motivação, por outro lado, é contrabalançada pela motivação negativa que leva à evitação do compartimento branco.

Esses resultados sugerem que o teste proposto apresenta boa validade de construto – ou seja, o comportamento observado conforma-se à racional teórica da ansiedade (MCNAUGHTON & ZANGROSSI, 2008). A ansiedade é controlada por um sistema que inibe o comportamento corrente, aumentando a atenção (análise do ambiente, avaliação de risco, e buscas na memória) e ativação. A saída comportamental prototípica desse sistema é a avaliação de risco, que

pode ser vista como apoiando as funções de um mecanismo de decisão que normalmente selecionaria entre os comportamentos de aproximação ou evitação, mas que é incapaz de fazê-lo durante o conflito quando (por definição) a aproximação e a evitação estão balanceadas. Ele busca a informação necessária para direcionar o balanço na direção da aproximação (se a ameaça prova-se menor do que inicialmente percebida) ou evitação (se a ameaça prova-se maior)(MCNAUGHTON & CORR, 2004).

Em relação ao comportamento exploratório, esse modelo baseia-se na asserção de MONTGOMERY & MONKMAN (1955) de que a exploração não é motivada pelo medo, mas o medo induzido pela novidade tende a invocar estados competitivos de medo e “curiosidade”. Assim, quando um ambiente é potencialmente aversivo (como o compartimento branco do aparato de escototaxia), o medo tende a inibir a atividade exploratória em proporção à intensidade da aversividade do ambiente. Conseqüentemente, a extensão da exploração depende do quanto esta é inibida pelo medo. Em nossos experimentos, observamos que o aumento da aversividade do compartimento claro diminui o tempo que os animais passam neste, enquanto a diminuição da aversividade aumenta esse tempo.

Uma conseqüência dessas formulações (MILLER & KRAELING, 1952; MILLER & MURRAY, 1952; MONTGOMERY, 1955; MONTGOMERY & MONKMAN, 1955; HALLIDAY, 1966; RUSSELL, 1973) é que a extensão da aproximação a um ambiente novo deve apresentar um padrão bifásico; o medo energiza o comportamento na presença da novidade intensa e do risco, e então a “curiosidade” (BERLYNE, 1950) torna-se a motivação dominante quando a novidade diminui. Em situações de alta novidade, assim como em situações de baixa novidade, a tendência para

aproximar-se de um estímulo novo aversivo é baixa por causa do medo (alta novidade) e do desinteresse (baixa novidade)(HUGHES, 1997). Em nossos experimentos, o decréscimo da novidade diminui monotonicamente o número de alternâncias e produz um padrão bifásico no tempo no compartimento branco.

Ainda que a novidade seja um componente importante nas formulações teóricas da ansiedade, o aspecto central é a evitação (PESSOTTI, 1978; BARLOW, 2002; TOTH & ZUPAN, 2007). Em nossos experimentos, verificamos que a novidade tem um papel importante na escototaxia, mas não é determinante na evitação. Assim, o decréscimo da novidade através da habituação intra- ou inter-sessões ou através do confinamento no compartimento branco, diminui o número de alternâncias, mas não altera o tempo no compartimento branco.

Nossos resultados sugerem que a caixa de preferência claro/escuro produz comportamentos tipo-ansiedade no paulistinha *Danio rerio*, possibilitando a introdução de um novo modelo para o estudo da neurobiologia da ansiedade, sua genética, seu desenvolvimento e sua evolução.

## 5 CONCLUSÕES

A exploração do compartimento branco não habitua, mas o número de alternâncias sim. A exploração do compartimento branco varia bidirecionalmente com a aversividade desta porção do aparato.

Sugerimos que esses resultados demonstram o papel do conflito motivacional na escototaxia; portanto, essa não representa mera evitação do compartimento branco ou aproximação do compartimento preto. A novidade do ambiente é um fator considerável (produzindo a motivação de aproximação), mas a aversividade do compartimento branco parece ser mais importante.

A criação em ambiente enriquecido diminui a ansiedade dos animais quando testados na caixa de preferência claro/escuro.

## 6 REFERÊNCIAS

- ABRAMS, P. A. Should prey overestimate the risk of predation? *American Naturalist*, v. 144, p. 317-328, 1994.
- AHMED, O. *et al.* An automated predator avoidance task in zebrafish. *Behavioural Brain Research*, v. 216, p. 166-171, 2011.
- AMARAL, O. B. *et al.* Duration of environmental enrichment influences the magnitude and persistence of its behavioral effects on mice. *Physiol Behav*, v. 93, p. 388-394, 2008.
- ANICHTCHIK, O. V. *et al.* Neurochemical and behavioural changes in zebrafish *Danio rerio* after systemic administration of 6-hydroxydopamine and 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine. *Journal of Neurochemistry*, v. 88, p. 443-453, 2004.
- ATTHOWE, J. M., JR. Types of conflict and their resolution: A reinterpretation. *Journal of Experimental Psychology*, v. 59, p. 1-9, 1960.
- BARLOW, D. H. *Anxiety and its disorders: The nature and treatment of anxiety and panic*. 2a. ed. Nova Iorque: The Guilford Press, 2002.
- BARROS, T. B. *et al.* Zebrafish: An emerging technology for *in vivo* pharmacological assessment to identify potential safety liabilities in early drug discovery. *British Journal of Pharmacology*, v. 154, p. 1400-1413, 2008.
- BEHREND, E. R.; BITTERMAN, M. E. Sidman avoidance in the fish. *Journal of the Experimental Analysis of Behavior*, v. 6, p. 47-52, 1963.
- BENCAN, Z.; LEVIN, E. D. The role of  $\alpha 7$  and  $\alpha 5$  nicotinic receptors in the nicotine-induced anxiolytic effect in zebrafish. *Physiology and Behavior*, v. 95, p. 408-412, 2008.
- BENCAN, Z. *et al.* Buspirone, chlordiazepoxide and diazepam effects in a zebrafish model of anxiety. *Pharmacol Biochem Behav*, v. 94, p. 75-80, 2009.
- BERLYNE, D. E. Novelty and curiosity as determinants of exploratory behaviour. *British Journal of Psychology*, v. 41, p. 68-80, 1950.
- BEST, J. D.; ALDERTON, W. K. Zebrafish: An *in vivo* model for the study of neurological diseases. *Neuropsychiatric Disease and Treatment*, v. 4, p. 567-576, 2008.
- BEULIG, A.; FOWLER, J. Fish on Prozac: Effect of serotonin reuptake inhibitors on cognition in goldfish. *Behavioral Neuroscience*, v. 122, p. 426-432, 2008.

BJERKE, S. *Developing behavioral assays to study dopamine-related disorders in zebrafish (Danio rerio)*. (2002). 104 f., The University of Oslo, Oslo, 2002. Disponível em: <<http://urn.nb.no/URN:NBN:no-5136>>.

BLANCHARD, D. C.; BLANCHARD, R. J. Ethoexperimental approaches to the biology of emotion. *Annual Review of Psychology*, v. 39, p. 43-68, 1988.

BLANCHARD, R. J. *et al.* Differentiation of anxiolytic and panicolytic drugs by effects on rat and mouse defense test batteries. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, v. 21, p. 783-789, 1997.

\_\_\_\_\_. Defense system psychopharmacology: An ethological approach to the pharmacology of fear and anxiety. *Behavioral Brain Research*, v. 58, p. 155-165, 1993.

BLANK, M. *et al.* A one-trial inhibitory avoidance task to zebrafish: Rapid acquisition of an NMDA-dependent long-term memory. *Neurobiology of Learning and Memory*, v. 92, p. 529-534, 2009.

BLASER, R. E. *et al.* Behavioral measures of anxiety in zebrafish (*Danio rerio*). *Behavioural Brain Research*, v. 208, p. 56-62, 2010.

BLASER, R. E.; GERLAI, R. Behavioral phenotyping in zebrafish: Comparison of three behavioral quantification methods. *Behavior Research Methods*, v. 38, p. 456-469, 2006.

BODNOFF, S. R. *et al.* Role of the central benzodiazepine receptor system in behavioural habituation to novelty. *Behavioral Neuroscience*, v. 103, p. 209-212, 1989.

BOUWKNECHT, J. A. *et al.* Differential effects of exposure to low-light or high-light open-field on anxiety-related behaviors: Relationship to c-Fos expression in serotonergic and non-serotonergic neurons in the dorsal raphe nucleus. *Brain Research Bulletin*, v. 72, p. 32-43, 2007.

BRENES, J. C. *et al.* A detailed analysis of open-field habituation and behavioral and neurochemical antidepressant-like effects in postweaning enriched rats. *Behav Brain Res*, v. 197, p. 125-137, 2009.

BURNS, J. G. *et al.* Rearing environment affects the brain size of guppies: Lab-reared guppies have smaller brains than wild-caught guppies. *Ethology*, v. 115, p. 122-133, 2009.

CANADIAN COUNCIL ON ANIMAL CARE. CCAC guidelines on: The care and use of fish in research, teaching and testing.

[http://www.ccac.ca/en/CCAC\\_Programs/Guidelines\\_Policies/GDLINES/Fish/Fish\\_Guidelines\\_English.pdf](http://www.ccac.ca/en/CCAC_Programs/Guidelines_Policies/GDLINES/Fish/Fish_Guidelines_English.pdf); Canadian Council on Animal Care, 2005. p. 42-46.

CARLTON, P. L.; ADVOKAT, C. Attenuated habituation due to para-chlorophenylalanine. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*, v. 1, p. 657-663, 1973.

- CHAMPAGNE, D. L. *et al.* Translating rodent behavioral repertoire to zebrafish (*Danio rerio*): Relevance for stress research. *Behavioural Brain Research*, 2010.
- COFIEL, L. P. D. V.; MATTIOLI, R. Involvement of histamine receptors in the acquisition of inhibitory avoidance in *Carassius auratus*. *Progress in Neuro-psychopharmacology and Biological Psychiatry*, v. 30, p. 1246-1250, 2006.
- COOK, M. N. *et al.* Anxiety in the elevated zero-maze is augmented in mice after repeated daily exposure. *Behavior Genetics*, v. 32, p. 113-118, 2002.
- CRAIG, W. Appetites and aversions as constituents of instincts. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, v. 3, p. 685-688, 1917.
- DALY, M. Early stimulation of rodents: A critical review of present interpretations. *Br J Psychol*, v. 64, p. 435-460, 1973.
- DEL ARCO, A. *et al.* Stress, prefrontal cortex and environmental enrichment: Studies on dopamine and acetylcholine release and working memory performance in rats. *Behav Brain Res*, v. 176, p. 267-273, 2007.
- DENENBERG, V. H. Effects of exposure to stressors in early life upon later behavioural and biological processes. In: LEVI, L. (Ed.). *Society, stress and disease: Childhood and adolescence*. New York: Oxford University Press, 1975. p. 269-281.
- DLUGOS, C. A.; RABIN, R. A. Ethanol effects on three strains of zebrafish: Model system for genetic investigations. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*, v. 74, p. 471-480, 2003.
- DUNLOP, R. *et al.* Avoidance learning in goldfish (*Carassius auratus*) and trout (*Oncorhynchus mykiss*) and implications for pain perception. *Applied Animal Behaviour Science*, v. 97, p. 255-271, 2006.
- EGAN, R. J. *et al.* Understanding behavioral and physiological phenotypes of stress and anxiety in zebrafish. *Behavioural Brain Research*, v. 205, p. 38-44, 2009.
- ELLIOT, B.; GRUNBERG, N. Effects of social and physical enrichment on open field activity differ in male and female Sprague-Dawley rats. *Behav Brain Res*, v. 165, p. 187-196, 2005.
- ENGEZER, R. E. *et al.* Zebrafish in the wild: A review of natural history and new notes from the field. *Zebrafish*, v. 4, p. 21-38, 2007.
- ESCORIHUELA, R. M. *et al.* Environmental enrichment reverses the detrimental actions of early inconsistent stimulation and increases the beneficial effects of postnatal handling on shuttlebox learning in adult rats. *Behav Brain Res*, v. 61, p. 169-173, 1994.
- FANSELOW, M. S.; LESTER, L. A functional behavioristic approach to aversively motivated behavior: Predatory imminence as a determinant of the topography of defensive behavior. In:

BOLLES, R. C.; BEECHER, M. D. (Ed.). *Evolution and learning*. Hillsdale: Erlbaum, 1988. p. 185-211.

FILE, S. E.; HYDE, J. R. G. Can social interaction be used to measure anxiety? *British Journal of Pharmacology*, v. 62, p. 19-24, 1978.

FILE, S. E. *et al.* Characterization of the phenomenon of "one trial tolerance" to the anxiolytic effect of chlordiazepoxide in the elevated plus-maze. *Psychopharmacology*, v. 102, p. 98-101, 1990.

FUIMAN, L. A.; MAGURRAN, A. E. Development of predator defences in fishes. *Reviews in Fish Biology and Fisheries*, v. 4, p. 145-183, 1994.

FUJITA, O.; OI, S. Effects of forebrain ablation and inter-trial intervals upon conditioned avoidance responses in the goldfish. *Annals of Animal Psychology*, v. 19, p. 39-47, 1969.

GARCIA, A. M. B. *et al.* Effect of different illumination levels on rat behavior in the elevated plus-maze. *Physiology and Behavior*, v. 85, p. 265-270, 2005.

GERLAI, R. Zebra fish: An uncharted behavior genetic model. *Behavior Genetics*, v. 33, p. 461-468, 2003.

\_\_\_\_\_. Zebrafish antipredatory responses: A future for translational research? *Behavioural Brain Research*, v. 207, p. 223-231, 2010.

GERLAI, R. *et al.* Zebrafish (*Danio rerio*) responds to the animated image of a predator: Towards the development of an automated aversive task. *Behavioural Brain Research*, v. 201, p. 318-324, 2009.

\_\_\_\_\_. Zebrafish (*Danio rerio*) responds to the animated image of a predator: Towards the development of an automated aversive task *Behavioural Brain Research*, v. 201, p. 318-324, 2009.

\_\_\_\_\_. Drinks like a fish: Zebra fish (*Danio rerio*) as a behavior genetic model to study alcohol effects. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*, v. 67, p. 773-782, 2000.

GODSIL, B. P. *et al.* Motivation. In: HEALY, A. F.; PROCTOR, R. W. (Ed.). *Handbook of Psychology*. Hoboken: John Wiley & Sons, 2003. p. 33-60. (Handbook of Psychology).

GOLDSMITH, P. Zebrafish as a pharmacological tool: The how, why and when. *Current Opinion in Pharmacology*, v. 4, p. 504-512, 2004.

GOLDSMITH, P.; SOLARI, R. The role of zebrafish in drug discovery. *Drug Discovery World*, v. Primavera 2003, p. 74-78, 2003.

GOUVEIA, A., JR. *et al.* Preference of goldfish (*Carassius auratus*) for dark places. *Revista de Etologia*, v. 7, p. 63-66, 2005.

GRAY, J. A.; MCNAUGHTON, N. *Neuropsychology of anxiety: An enquiry into the functions of the septo-hippocampal system*. 2a. ed. Oxford: Oxford University Press, 2000.

GREEN, S.; HODGES, H. Animal models of anxiety. In: WILLNER, P. (Ed.). *Behavioural models in psychopathology: Theoretical, industrial and clinical perspectives*. Cambridge: Cambridge University Press, 1991. p. 21-49.

GRUNWALD, D. J.; EISEN, J. S. Headwaters of the zebrafish - Emergence of a new model vertebrate. *Nature Reviews Genetics*, v. 3, p. 717-724, 2002.

GUO, S. Linking genes to brain, behavior and neurological diseases: What can we learn from zebrafish? *Genes, Brain and Behavior*, v. 3, p. 63-74, 2000.

\_\_\_\_\_. Using zebrafish to assess the impact of drugs on neural development and function. *Expert Opinion in Drug Discovery*, v. 4, p. 712-726, 2009.

HAINSWORTH, F. R. *et al.* Specific and permanent deficits in instrumental avoidance responding following forebrain ablation in the goldfish. *Journal of Comparative and Physiological Psychology*, v. 63, p. 111-116, 1967.

HALLIDAY, M. S. Exploration and fear in the rat. *Symposia of the Zoological Society of London*, v. 18, p. 45-59, 1966.

HORNER, J. L. *et al.* A shuttle box for fish and a control circuit of general applicability. *American Journal of Physiology*, v. 74, p. 114-120, 1961.

HUGHES, R. N. Intrinsic exploration in animals: Motives and measurement. *Behavioural Processes*, v. 41, p. 213-226, 1997.

JEKOSCH, K. The zebrafish genome project: Sequence analysis and annotation. In: DETRICH, H. W. *et al.* (Ed.). *The zebrafish: Genetics, genomics and informatics*. St. Louis: Academic Press, 2004. p. 686. (Methods in Cell Biology).

KAPLAN, H.; ARONSON, L. R. Effect of forebrain ablation on the performance of conditioned avoidance response in the teleost fish, *Tilapia h. macrocephala*. *Animal Behaviour*, v. 15, p. 438-488, 1967.

KARIN-D'ARCY, M. R. The modern role of Morgan's Canon in comparative psychology. *International Journal of Comparative Psychology*, v. 18, p. 179-201, 2005.

KAVALIERS, M.; CHOLERIS, E. Antipredator responses and defensive behavior: Ecological and ethological approaches for the neurosciences. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, v. 25, p. 577-586, 2001.

KLEEREKOPER, H. *et al.* An analysis of locomotor behaviour of goldfish (*Carassius auratus*). *Animal Behaviour*, v. 18, p. 317-330, 1970.

- KLEIN, S. L. *et al.* Influence of environmental enrichment and sex on predator stress response in rats. *Physiol Behav*, v. 56, p. 291-297, 1994.
- LANGSDALE, J. R. M. Developmental changes in the opacity of larval herring, *Clupea harengus*, and their implications for vulnerability to predation. *Journal of Marine Biological Assessment*, v. 73, p. 225-232, 1993.
- LAWRENCE, C. The husbandry of zebrafish (*Danio rerio*): A review. *Aquaculture*, v. 269, p. 1-20, 2007.
- LEMA, S. C. *et al.* Proliferation zones in the salmon telencephalon and evidence for environmental influence on proliferation rate *Comparative Biochemistry and Physiology A*, v. 141, p. 327-335, 2005.
- LESTER, D. The effect of fear and anxiety on exploration and curiosity: Toward a theory of exploration. *Journal of General Psychology*, v. 79, p. 105-120, 1968.
- LEUSSIS, M. P.; BOLIVAR, V. J. Habituation in rodents: A review of behavior, neurobiology, and genetics. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, v. 30, p. 1045-1064, 2006.
- LEVIN, E. D. *et al.* Anxiolytic effects of nicotine in zebrafish. *Physiology and Behavior*, v. 90, p. 54-58, 2007.
- LÓPEZ-PATIÑO, M. A. *et al.* Anxiogenic effects of cocaine withdrawal in zebrafish. *Physiology and Behavior*, v. 93, p. 160-171, 2008.
- LUCITT, M. B. *et al.* Analysis of the zebrafish proteome during embryonic development. *Molecular & Cellular Proteomics*, v. 7, p. 981-994, 2008.
- MARDER, E. Non-mammalian models for studying neural development and function. *Nature*, v. 417, p. 318-321, 2002.
- MATSUNAGA, W.; WATANABE, E. Habituation of medaka (*Oryzias latipes*) demonstrated by open-field testing. *Behavioural Processes*, v. 85, p. 142-150, 2010.
- MAXIMINO, C. *et al.* Scototaxis as anxiety-like behavior in fish. *Nature Protocols*, v. 5, p. 209-216, 2010.
- \_\_\_\_\_. Construct validity of behavioral models of anxiety: Where experimental psychopathology meets ecology and evolution. *Psychology and Neuroscience*, v. 3, p. 117-123, 2010.
- \_\_\_\_\_. A comparative analysis of the preference for dark environments in five teleosts. *International Journal of Comparative Psychology*, v. 20, p. 351-367, 2007.

- MCCLURE, M. Development and evolution of melanophore patterns in fishes of the genus *Danio*. *Journal of Morphology*, v. 241, p. 83-105, 1999.
- MCNAUGHTON, N.; CORR, P. J. A two-dimensional neuropsychology of defense: Fear/anxiety and defensive distance. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, v. 28, p. 285-305, 2004.
- MCNAUGHTON, N.; ZANGROSSI, H., JR. Theoretical approaches to the modeling of anxiety in animals. In: BLANCHARD, R. J. *et al* (Ed.). *Handbook of anxiety and fear*. Amsterdam: Elsevier B. V., 2008. p. 11-27.
- MESHI, D. *et al*. Hippocampal neurogenesis is not required for behavioral effects of environmental enrichment. *Nat Neurosci*, v. 9, p. 729-731, 2006.
- MIKHEEV, V. N.; ANDREEV, O. A. Two-phase exploration of a novel environment in the guppy, *Poecilia reticulata*. *Journal of Fish Biology*, v. 42, p. 375-383, 1993.
- MILLER, N. E.; KRAELING, D. Displacement: Greater generalization of approach than avoidance in a generalized approach-avoidance conflict. *Journal of Experimental Psychology*, v. 43, p. 217-221, 1952.
- MILLER, N. E.; MURRAY, E. J. Displacement and conflict; learnable drive as a basis for the steeper gradient of avoidance than of approach. *Journal of Experimental Psychology*, v. 43, p. 227-231, 1952.
- MISSLIN, R. *et al*. Behavioural validation of a light/dark choice procedure for testing anti-anxiety agents. *Behavioural Processes*, v. 18, p. 119-132, 1989.
- MOK, E. Y.; MUNRO, A. D. Effects of dopaminergic drugs on locomotor activity in teleost fish of the genus *Oreochromis* (Cichlidae): Involvement of the telencephalon. *Physiology and Behavior*, v. 64, p. 227-234, 1998.
- MONTGOMERY, K. C. The relation between fear induced by novel stimulation and exploratory behavior. *Journal of Comparative and Physiological Psychology*, v. 48, p. 254-260, 1955.
- MONTGOMERY, K. C.; MONKMAN, J. A. The relation between fear and exploratory behavior. *Journal of Comparative and Physiological Psychology*, v. 48, p. 132-136, 1955.
- NESSE, R. M. Evolutionary psychology and mental health. In: BUSS, D. (Ed.). *Handbook of evolutionary psychology*. Hoboken: John Wiley & Sons, Inc., 2005. p. 903-927.
- NICOLSON, T. *Using zebrafish to study neuroscience*. Society for Neuroscience. Atlanta, p.60. 2006
- NIJMAN, V.; HEUTS, B. A. Effect of environmental enrichment upon resource holding power in fish in prior residence situations. *Behavioural Processes*, v. 49, p. 77-83, 2000.

- NINKOVIC, J.; BALLY-CUIF, L. The zebrafish as a model system for assessing the reinforcing properties of drugs of abuse. *Methods*, v. 39, p. 262-274, 2006.
- NOAKES, D. L. G. Behavior. In: SCHRECK, C. B.; MOYLE, P. B. (Ed.). *Methods for fish biology*. Bethesda: American Fisheries Society, 1990. p. 555-574.
- O'KEEFE, J.; NADEL, L. *Hippocampus as a cognitive map*. Londres: Oxford University Press, 1978.
- PANULA, P. *et al.* Modulatory neurotransmitter systems and behavior: Towards zebrafish models of neurodegenerative diseases. *Zebrafish*, v. 3, p. 235-247, 2006.
- PEITSARO, N. *et al.* Modulation of the histaminergic system and behaviour by - fluoromethylhistidine in zebrafish. *Journal of Neurochemistry*, v. 86, p. 432-441, 2003.
- PESSOTTI, I. *Ansiedade*. São Paulo: E. P. U., 1978.
- PFEIFFER, W. The distribution of fright reaction and alarm substance cells in fishes. *Copeia*, v. 4, p. 653-665, 1977.
- PORTAVELLA, M. *et al.* Lesions of the medial pallium, but not of the lateral pallium, disrupt spaced-trial avoidance learning in goldfish (*Carassius auratus*). *Neuroscience Letters*, v. 362, p. 75-78, 2004.
- PORTAVELLA, M.; VARGAS, J. P. Emotional and spatial learning in goldfish is dependent on different telencephalic pallial systems. *European Journal of Neuroscience*, v. 21, p. 2800-2806, 2005.
- PORTAVELLA, M. *et al.* The effects of telencephalic pallial lesions on spatial, temporal, and emotional learning in goldfish. *Brain Research Bulletin*, v. 57, p. 397-399, 2002.
- PRUT, L.; BELZUNG, C. The open field as a paradigm to measure the effects of drugs on anxiety-like behaviors: A review. *European Journal of Pharmacology*, v. 463, p. 3-33, 2003.
- REDFERN, W. S. *et al.* Zebrafish assays as early safety pharmacology screens: Paradigm shift or red herring? *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods*, v. 58, p. 110-117, 2008.
- RENNER, M. J. Experience-dependent changes in exploratory behavior in the adult rat (*Rattus norvegicus*): Overall activity level and interactions with objects. *J Comp Psychol*, v. 101, p. 94-100, 1987.
- RENNER, M. J.; ROSENZWEIG, M. R. *Enriched and impoverished environments. Effects on brain and behavior*. New York: Springer-Verlag, 1987.

RODGERS, R. J. *et al.* Plus-maze retest profile in mice: Importance of initial stages of trial 1 and response to post-trial cholinergic receptor blockade. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*, v. 54, p. 41-50, 1996.

RODGERS, R. J.; SHEPHERD, J. K. Influence of prior maze experience on behaviour and response of diazepam in the elevated plus maze and light/dark tests. *Psychopharmacology*, v. 113, p. 237-242, 1993.

RUSSELL, P. A. Relationships between exploratory behaviour and fear: A review. *British Journal of Psychology*, v. 64, p. 417-433, 1973.

SAVAGE, G. E. Temporal factors in avoidance learning in normal and forebrainless goldfish (*Carassius auratus*). *Nature*, v. 218, p. 1168-1169, 1968.

\_\_\_\_\_. Telencephalic lesions and avoidance behaviour in the goldfish (*Carassius auratus*). *Animal Behaviour*, v. 17, p. 362-373, 1969.

SCHRIJVER, N. C. *et al.* Dissociable effects of isolation rearing and environmental enrichment on exploration, spatial learning and HPA activity in adult rats. *Pharmacol Biochem Behav*, v. 73, p. 209-224, 2002.

SCOBIE, S. R. The response-shock - shock-shock interval and unsignalled avoidance in goldfish. *Journal of the Experimental Analysis of Behavior*, v. 14, p. 219-224, 1970.

SEMO, M. A. *et al.* Dissecting a role for melanopsin in behavioural light aversion reveals a response independent of conventional photoreception. *PLoS ONE*, v. 5, p. e15009, 2010. doi:10.1371/journal.pone.0015009.

SERRA, E. L. *et al.* The role of chlorpheniramine in inhibitory avoidance in *Danio rerio*. *Journal of Fish Biology*, v. 60, p. 1342-1345, 2002.

\_\_\_\_\_. Natural preference of zebrafish (*Danio rerio*) for a dark environment. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, v. 32, p. 1551-1553, 1999.

SPEEDIE, N.; GERLAI, R. Alarm substance induced behavioral responses in zebrafish (*Danio rerio*). *Behavioural Brain Research*, v. 188, p. 168-177, 2008.

SPENCE, R. *et al.* The behaviour and ecology of the zebrafish, *Danio rerio*. *Biological Review*, v. 83, p. 13-34, 2008.

STEWART, A. *et al.* Neurophenotyping of adult zebrafish using the light/dark box paradigm. In: KALUEFF, A. V.; CACHAT, J. M. (Ed.). *Zebrafish neurobehavioral protocols*. Nova Iorque: Humana Press, 2011. p. 157-167.

TEIXEIRA, R. C. *et al.* Behavioral effects of acute and chronic imipramine in the elevated T-maze model of anxiety. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*, v. 65, p. 571-576, 2000.

- TOTH, M.; ZUPAN, B. Neurobiology of anxiety. In: SIBLEY, D. R. *et al* (Ed.). *Handbook of contemporary neuropharmacology*. Nova Iorque: John Wiley & Sons, 2007. p. 3-58.
- TREIT, D. *et al*. Anxiogenic stimuli in the elevated plus maze. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*, v. 44, p. 463-469, 1993.
- TROUT, J. D. Measurement. In: NEWTON-SMITH, W. H. (Ed.). *A companion to the philosophy of science*. Oxford: Blackwell Publishing, 1999. p. 265-276.
- VAN PRAAG, H. *et al*. Neural consequences of environmental enrichment. *Nature Reviews Neuroscience*, v. 1, p. 191-198, 2000.
- VARTY, G. B. *et al*. Environmental enrichment and isolation rearing in the rat: Effects on locomotor behavior and startle response plasticity. *Biol Psych*, v. 47, p. 864-873, 2000.
- VON KROGH, K. *et al*. Forebrain cell proliferation, behavior, and physiology of zebrafish, *Danio rerio*, kept in enriched or barren environments. *Physiology and Behavior*, v. 101, p. 32-39, 2010.
- WALKER, D. L.; DAVIS, M. Anxiogenic effects of high illumination levels assessed with the acoustic startle response in rats. *Biological Psychiatry*, v. 42, p. 461-471, 1997.
- WALLACE, K. J.; ROSEN, J. B. Predator odor as an unconditioned fear stimulus in rats: elicitation of freezing by trimethylthiazoline, a component of fox feces. *Behavioral Neuroscience*, v. 114, p. 912-922, 2000.
- WARREN, E. W.; CALLAGHAN, S. Individual differences in response to an open field test by the guppy *Poecilia reticulata* (Peters). *Journal of Fish Biology*, v. 7, p. 105-113, 1976.
- WIDMAN, D. R.; ROSELLINI, R. A. Restricted daily exposure to environmental enrichment increases the diversity of exploration. *Physiol Behav*, v. 47, p. 57-62, 1990.
- WILLNER, P. Introduction. In: WILLNER, P. (Ed.). *Behavioral models in psychopathology: Theoretical, industrial and clinical perspectives*. Cambridge: Cambridge University Press, 1991.
- WONG, K. *et al*. Analyzing habituation responses to novelty in zebrafish (*Danio rerio*). *Behav Brain Res*, v. 208, p. 450-457, 2010.
- WOODS, I. G. *et al*. A comparative map of the zebrafish genome. *Genome Research*, v. 10, p. 1903-1914, 2000.
- WULLIMANN, M. F.; MUELLER, T. Teleostean and mammalian forebrains contrasted: Evidence from genes to behavior. *Journal of Comparative Neurology*, v. 475, p. 143-162, 2004.
- XU, X. *et al*. The role of telencephalic NMDA receptors in avoidance learning in goldfish (*Carassius auratus*). *Behavioral Neuroscience*, v. 117, p. 548-554, 2003.

\_\_\_\_\_. Comparison of the amnestic effects of NMDA receptor antagonist MK-801 and nitric oxide synthase inhibitors: L-NAME and L-NOARG. *Behavioral Neuroscience*, v. 112, p. 892-899, 1998.

XU, X.; DAVIS, R. E. NMDA receptor antagonist MK-801 impairs learning but not memory fixation or expression of classical fear conditioning in goldfish. *Behavioral Neuroscience*, v. 106, p. 307-314, 1992.

XU, X. *et al.* NMDA receptor antagonist AP5 and nitric oxide synthase inhibitor 7-NI affect different phases of learning and memory in goldfish. *Brain Research*, v. 889, p. 274-277, 2001.

\_\_\_\_\_. Active avoidance conditioning in zebrafish (*Danio rerio*). *Neurobiology of Learning and Memory*, v. 87, p. 72-77, 2007.

## ANEXOS



## Review

## Measuring anxiety in zebrafish: A critical review

Caio Maximino<sup>a,b,\*</sup>, Thiago Marques de Brito<sup>c,d</sup>, Annanda Waneza da Silva Batista<sup>a</sup>,  
Anderson Manoel Herculano<sup>a</sup>, Silvio Morato<sup>c</sup>, Amauri Gouveia Jr.<sup>e,f</sup>

<sup>a</sup> Laboratório de Neuroendocrinologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Pará, Belém/PA, Brazil

<sup>b</sup> Programa de Pós-graduação em Neurociências e Biologia Celular, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Pará, Belém/PA, Brazil

<sup>c</sup> Laboratório de Comportamento Exploratório, Faculdade de Filosofia, Letras e Ciências Humanas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto/SP, Brazil

<sup>d</sup> Programa de Pós-graduação em Psicobiologia, Faculdade de Filosofia, Letras e Ciências Humanas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto/SP, Brazil

<sup>e</sup> Laboratório de Neurociências e Comportamento, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Pará, Belém/PA, Brazil

<sup>f</sup> Núcleo de Pesquisa e Teoria do Comportamento, Instituto de Psicologia, Universidade Federal do Pará, Belém/PA, Brazil

## a r t i c l e i n f o

## Article history:

Received 19 February 2010

Received in revised form 12 May 2010

Accepted 19 May 2010

Available online 25 May 2010

## Keywords:

Anxiety

Zebrafish

Behavioral model

Stress

Fear

## a b s t r a c t

Zebrafish are increasingly being used in behavioral neuroscience, neuropsychopharmacology and neurotoxicology. Recently, behavioral screens used to model anxiety in rodents were adapted to this species, and novel models which tap on zebrafish behavioral ecology have emerged. However, model building is an arduous task in experimental psychopathology, and a continuous effort to assess the validity of these measurements is being chased among some researchers. To consider a model as valid, it must possess face, predictive and/or construct validity. In this article, we first review some notions of validity, arguing that, at its limit, face and predictive validity reduce to construct validity. Then we review some procedures which have been used to study anxiety, fear or related processes in zebrafish, using the validity framework. We conclude that, although the predictive validity of some of these models is increasingly being met, there is still a long way in reaching the desired level of construct validity. The refinement of models is an ongoing activity, and behavioral validation and parametric research ought to advance that objective.

© 2010 Elsevier B.V. All rights reserved.

## Contents

1. Introduction .....	158
2. Behavioral models in neuropsychopharmacology: validity issues .....	158
3. A taxonomy of anxiety models in rodents and their equivalents in fish .....	159
3.1. Learned behavior .....	159
3.1.1. Pavlovian fear conditioning .....	159
3.1.2. Avoidance conditioning .....	159
3.1.3. Habituation of startle responses .....	161
3.2. Innate behavior .....	161
3.2.1. Response to predators .....	163
3.2.2. Alarm reaction (“Schrecksreaktion”) .....	164
3.2.3. Open-field .....	164
3.2.4. Novel tank diving test .....	164
3.2.5. Scototaxis .....	165
3.2.6. Inspection of a novel object .....	166
3.2.7. Shoaling .....	166
3.3. Analysis of neurovegetative responses in zebrafish .....	166
4. Conclusions .....	167
Acknowledgments .....	167
References .....	167

\* Corresponding author at: Laboratório de Neuroendocrinologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Pará, Belém/PA, Brazil. Tel.: +55 91 8180 2446; fax: +55 91 3201 7568.

E-mail address: [caio@ufpa.br](mailto:caio@ufpa.br) (C. Maximino).



# Scototaxis as anxiety-like behavior in fish

Caio Maximino<sup>1</sup>, Thiago Marques de Brito<sup>2</sup>, Claudio Alberto Gellis de Mattos Dias<sup>1</sup>, Amauri Gouveia Jr<sup>1,3</sup> & Silvio Morato<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Laboratório de Neurociências e Comportamento, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Para, Belém, Brazil. <sup>2</sup>Laboratório de Comportamento Exploratório, Departamento de Psicologia e Educação, FFCLRP, Ribeirão Preto, Brazil. <sup>3</sup>Núcleo de Estudos e Pesquisa em Comportamento, Departamento de Psicologia, Universidade Federal do Para, Belém, Brazil. Correspondence should be addressed to C.M. (caio@ufpa.br).

Published online 14 January 2010; doi:10.1038/nprot.2009.225

the scototaxis (dark/light preference) protocol is a behavioral model for fish that is being validated to assess the antianxiety effects of pharmacological agents and the behavioral effects of toxic substances, and to investigate the (epi)genetic bases of anxiety-related behavior. Briefly, a fish is placed in a central compartment of a half-black, half-white tank; following habituation, the fish is allowed to explore the tank for 15 min; the number and duration of entries in each compartment (white or black) are recorded by the observer for the whole session. Zebrafish, goldfish, guppies and tilapias (all species that are important in behavioral neurosciences and neuroethology) have been shown to demonstrate a marked preference for the dark compartment. An increase in white compartment activity (duration and/or entries) should reflect antianxiety behavior, whereas an increase in dark compartment activity should reflect anxiety-promoting behavior. When individual animals are exposed to the apparatus on only one occasion, results can be obtained in 20 min per fish.

## Introduction

The dark/light preference model is already established as an 'ethoexperimental' anxiety model in rodents<sup>1</sup>. It is based on the natural aversive quality of brightly lit environments for mice, shaping a conflict situation in which the animal must deal with its natural tendency to explore in the face of an unpleasant environment. The rodent dark/light preference model is an exploration model, in the context that it measures locomotor activity in both environments as an index of anxiety<sup>2–5</sup>. The proposed actinopterygian dark/light preference task is a modification of an experimental manipulation used by Edward Thorndike<sup>6</sup> during the beginning of the twentieth century to study motivation and learning in fish, and afterward by Satake and Morton<sup>7</sup> in the 1970s to establish the effects of noradrenergic substances on the scotophobic (i.e., dark-avoiding) behavior of pinealectomized or scotophobin-injected goldfish. Recently, the proposed model was used to establish dark/light preference in zebrafish *Danio rerio*<sup>8</sup>, bluegill *Lepomis macrochirus*, crucian carp *Carassius langsdorffii*<sup>9</sup>, goldfish *Carassius auratus*<sup>9–12</sup>, guppy *Poecilia reticulata*<sup>12</sup>, Nile tilapia *Oreochromis niloticus*<sup>12</sup>, lambari *Astyanax altiparanae*, cardinal tetra *Paracheirodon axelrodi*<sup>12</sup> and banded knifefish *Gymnotus carapo*<sup>12</sup>, and to screen for the neurobehavioral effects of ethanol<sup>13</sup> and dopaminergic drugs<sup>14</sup> in zebrafish. The main advantage of this protocol is the presentation of a clear conflict situation for the fish; however, most models that investigate innate 'fear'- and 'anxiety'-like behavior in fish do not use such conflict. With the exception of predator inspection tests<sup>15–17</sup>, most innate anxiety tests use either the exploration of an open field or the vertical distribution of the animal in the water column to measure this variable<sup>14,18–32</sup> and aim to describe individual variability across a 'shyness–boldness' continua<sup>15,33–37</sup>. This continuum can be mapped to Budaev's<sup>15,34,35</sup> two dimensions of 'temperament' in fish (activity-exploration and fear-avoidance), which in turn are trait instantiations of approach–avoidance state dimensions<sup>38–40</sup>. *Ex hypothesi*, these dimensions are best analyzed using conflict models<sup>41,42</sup>. This protocol will focus on the cyprinids zebrafish and goldfish; however, it has been successfully applied to non-cyprinids without alterations to it<sup>12</sup> (with the exception

of the gymnotid *G. carapo*, for which different dimensions of the test tank were needed).

Behavioral responses in the dark/light preference protocol are readily assessable and quantifiable by an observer, without the need for extensive training. Briefly, animals are placed in an intersection compartment, located between one white and one dark compartment; these spectra can be discriminated by both zebrafish<sup>43</sup> and goldfish<sup>44</sup>, and even though the authors are unaware of behavioral spectral sensitivity experiments in the other species in which scototaxis has been observed, the very existence of this trait is indirect evidence for this sensitivity. This intersection compartment is enclosed by two sliding doors, which are removed following a habituation interval of 5 min. The animal is then allowed to explore the apparatus freely, and the observer records its behavior (number and/or duration of entries in either the black or white compartments) for 15 min. This procedure is based on the work of Mattioli's group<sup>8</sup>, which observed the natural preference zebrafish for the black compartment. The duration of the session was increased to 15 min, which is 5 min more than the original experiment described by Serra *et al.*<sup>8</sup>, because the time course of exploration in this apparatus reveals significant changes after the tenth minute of observation. Behavior in this task (i.e., activity in the white compartment) reflects a conflict between the preference of the animal for protected areas (e.g., black substrata, in a process of crypsis) and an innate motivation to explore novel environments. Crypsis in fish depends on the dorsal distribution of melanophores in the fish surface; the presence of dorsal and dorsally oriented melanophores tends to minimize refraction and reflection of light incident on the fish, reducing the effectiveness of visual information for predators<sup>45</sup>. Appropriate cryptic coloration requires the appropriate background and behavior (in the present task, preference for dark substrata). Antianxiety effects (i.e., increased time in the white compartment) can be determined simultaneously with a measure of increased or decreased swimming activity (i.e., total number of entries in both compartments). Other measures that can be observed are thigmotaxis (i.e., the tendency for the animals to stay nearer to the walls of the apparatus, especially

# Chapter 13

## Neurophenotyping of Adult Zebrafish Using the Light/Dark Box Paradigm

Adam Stewart, Caio Maximino, Thiago Marques de Brito,  
Anderson Manoel Herculano, Amauri Gouveia, Silvio Morato,  
Jonathan M. Cachat, Siddharth Gaikwad, Marco F. Elegante,  
Peter C. Hart, and Allan V. Kalueff

### Abstract

The light/dark box test, traditionally used to quantify rodent anxiety-like behavior, has recently been applied to the adult zebrafish (*Danio rerio*). Utilizing the fish's scototaxis – aversion to bright areas and natural preference for the dark – this paradigm can be used to assess levels of anxiety in adult zebrafish. The light/dark box is a simple and time-efficient one-trial test that does not require pre-training the animals. Importantly, this novelty-based paradigm may also represent a useful tool for studying the pharmacological modulation of zebrafish behavior. Summarizing the experience with this model in several laboratories, here we outline a protocol for the neurophenotyping of zebrafish anxiety-like behavior using the light/dark paradigm.

**Key words:** Zebrafish, Light/Dark box, Scototaxis, Anxiety, Novelty-based paradigm.

---

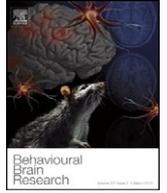
### 1. Introduction

Various novelty-based paradigms, some of which are comprehensively covered in this book, have been developed to quantify zebrafish behavior (1–7). The light/dark paradigm, traditionally used in animal (rodent) behavioral research (8–11), has only recently been applied to zebrafish (12–15). Nevertheless, this test, based on the innate fish preference for the dark (scotophilia or scototaxis), is receiving a growing popularity in neurobehavioral laboratories (2, 14, 16, 17).



Contents lists available at ScienceDirect

## Behavioural Brain Research

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/bbr](http://www.elsevier.com/locate/bbr)

## Research report

## Parametric analyses of anxiety in zebrafish scototaxis

Caio Maximino <sup>a,b,c,\*</sup>, Thiago Marques de Brito <sup>d,e</sup>, Rafael Colmanetti <sup>f</sup>, Alvaro Antonio Assis Pontes <sup>g</sup>, Henrique Meira de Castro <sup>f</sup>, Renata Inah Tavares de Lacerda <sup>f</sup>, Silvio Morato <sup>d</sup>, Amauri Gouveia Jr. <sup>h</sup>

<sup>a</sup> Laboratório de Neurociências e Comportamento, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Pará, Belém/PA, Brazil

<sup>b</sup> Programa de Pós-Graduação em Neurociências e Biologia Celular, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Pará, Belém/PA, Brazil

<sup>c</sup> Laboratório de Neuroendocrinologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Pará, Belém/PA, Brazil

<sup>d</sup> Laboratório de Comportamento Exploratório, Departamento de Psicologia & Educação, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto/SP, Brazil

<sup>e</sup> Programa de Pós-Graduação em Psicobiologia, Departamento de Psicologia & Educação, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto/SP, Brazil

<sup>f</sup> Departamento de Psicologia, Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Bauri/SP, Brazil

<sup>g</sup> Faculdade de Artes, Arquitetura e Comunicação Social, Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Bauri/SP, Brazil

<sup>h</sup> Núcleo de Teoria e Pesquisa do Comportamento, Instituto de Psicologia, Universidade Federal do Pará, Belém/PA, Brazil

## ARTICLE INFO

## Article history:

Received 22 December 2009

Received in revised form 18 January 2010

Accepted 22 January 2010

Available online 29 January 2010

## Keywords:

Zebrafish

Fear

Anxiety

Behavior

Avoidance

Scototaxis

Motivation

Drive

## A B S T R A C T

Scototaxis, the preference for dark environments in detriment of bright ones, is an index of anxiety in zebrafish. In this work, we analyzed avoidance of the white compartment by analysis of the spatiotemporal pattern of exploratory behavior (time spent in the white compartment of the apparatus and shuttle frequency between compartments) and swimming ethogram (thigmotaxis, freezing and burst swimming in the white compartment) in four experiments. In Experiment 1, we demonstrate that spatiotemporal measures of white avoidance and locomotion do not habituate during a single 15-min session. In Experiments 2 and 3, we demonstrate that locomotor activity habituates to repeated exposures to the apparatus, regardless of whether inter-trial interval is 15-min or 24-h; however, no habituation of white avoidance was observed in either experiment. In Experiment 4, we confined animals for three 15-min sessions in the white compartment prior to recording spatiotemporal and ethogram measures in a standard preference test. After these forced exposures, white avoidance and locomotor activity showed no differences in relation to non-confined animals, but burst swimming, thigmotaxis and freezing in the white compartment were all decreased. These results suggest that neither avoidance of the white compartment nor approach to the black compartment account for the behavior of zebrafish in the scototaxis test.

© 2010 Elsevier B.V. All rights reserved.

## 1. Introduction

Scototaxis, a preference for dark environments in detriment of brightly lit ones, is a behavioral trait that is present in many species of teleost fishes [1–6], and it has been suggested that it represents a species-specific defense pattern that exploits crypsis with the substratum as a strategy for avoiding predators [4–6]. As such, scototaxis can represent "anxiety" or "fear"-like behavior in these species, including the zebra fish [5,7–10].

All procedures described so far to the establishment of dark preference use free exploration of a black and white tank, measuring time spent in both compartments as a proxy for preference, and using diverse measures of total locomotion as a control for activity effects [3–7,9–13]. As it happens with unconditioned models in

rodents [14], the definition of what are the controlling stimuli in the scototaxis task is still needed [10]. Without extensive analyses, it is not clear what are the reinforcers which are involved in scototaxis – whether a particular behavior observed in this model is driven by positive (approach the dark compartment) or negative (avoid the light compartment) drives.

An approach to determining the underlying motivations which control behavior in a given task is "behavioral validation" [15,16], a strategy in which analysis of the organization of the ethogram of the animal in the test situation reveals ethologically relevant dimensions of defensive behavior. This approach was taken by Blaser et al. [10], using the dark–light tank in zebra fish. The authors established preference for a dark environment in this species, and proceeded to confine subjects to each compartment and record their behavior while confined. After confinement, animals were then exposed to the preference test once again. Animals were separated in "high-avoidant" and "low-avoidant" using a median split of their combined pre- and post-test scores for time spent in the white compartment. Confinement to the white compartment elicited freezing in high avoidance animals, but not in low-avoidance subjects;

\* Corresponding author at: Laboratório de Neurociências e Comportamento, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Pará, r. Augusto Correa 01, 66075-110 Belém/PA, Brazil. Tel.: +55 91 8180 2446; fax: +55 91 3201 7568.

E-mail address: [caio.maximino@gmail.com](mailto:caio.maximino@gmail.com) (C. Maximino).



1 **Parametric analyses of anxiety in zebrafish scototaxis: Effects of light le-**  
2 **vels, compartment color, and compartment proportion.**

3 Caio Maximino<sup>1,2\*</sup>, Thiago Marques de Brito<sup>3</sup>, Rafael Colmanetti<sup>4</sup>, Alvaro Anto-  
4 nio Assis Pontes<sup>5</sup>, Henrique Meira de Castro<sup>6</sup>, Renata Inah Tavares de Lacer-  
5 da<sup>4</sup>, Silvio Morato<sup>3</sup>, Amauri Gouveia Jr.<sup>7</sup>

6 <sup>1</sup> Laboratório de Neuroendocrinologia, Instituto de Ciências Biológicas, Univer-  
7 sidade Federal do Pará – UFPa, Belém/PA, Brazil

8 <sup>2</sup> Zebrafish Neuroscience Research Consortium

9 <sup>3</sup> Laboratório de Comportamento Exploratório, Departamento de Psicologia e  
10 Educação, Universidade de São Paulo – USP, Ribeirão Preto/SP, Brazil

11 <sup>4</sup> Departamento de Psicologia, Universidade Estadual Paulista – Unesp, Bau-  
12 ru/SP, Brazil

13 <sup>5</sup> Departamento de Design, Universidade Estadual Paulista – Unesp, Bauru/SP,  
14 Brazil

15 <sup>6</sup> Departamento de Psicologia da Educação, Pontifícia Universidade Católica –  
16 PUC, São Paulo/SP

17 <sup>7</sup> Laboratório de Neurociências e Comportamento, Núcleo de Pesquisas e Teo-  
18 ria do Comportamento, Universidade Federal do Pará – UFPa, Belém/PA, Bra-  
19 zil

20

21 **Word count:**

1 **Introduction:** 427

2 **Discussion:** 597

3 **Number of pages:** 19

4 **Number of figures:** 3

5

6 \* Corresponding author: Caio Maximino, Laboratório de Neuroendocrinologia,  
7 Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Pará – UFPa. R. Au-  
8 gusto Corrêa, 01, 66075-110 Belém/PA, Brazil. Phone: +55-91-3201-7742. E-  
9 mail: caio@ufpa.br

1 **Abstract**

2 Scototaxis has been proposed as a test of anxiety in zebrafish. Previous experiments (Behav. Brain Res. 210: 1-7; 2010) have suggested that preference for  
3 the dark compartment is not solely controlled by approach to it, nor by avoidance of the white compartment. In this article, we analyze aversiveness of the  
4 white compartment. Increasing light levels above the white compartment decrease the time spent in it, and increases thigmotaxis and freezing in the white  
5 compartment. Substituting the white compartment by a gray one increases time spent in it, while substituting the black compartment by a gray one increases the  
6 time spent in the white compartment and locomotion, while decreasing frequency events. Increasing the proportion that is occupied by the white compartment  
7 decreases the time spent in it and increases thigmotaxis, while increasing the proportion that is occupied by the black compartment increases total locomotion. Taken together, these results suggest that the white compartment is indeed aversive, and reinforce the hypothesis that scototaxis is controlled by a  
8 approach-avoidance conflict.

9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17 **Keywords:** Zebrafish; Fear; Anxiety; Behavior; Avoidance; Scototaxis; Motivation; Drive  
18

Environmental “enrichment”, anxiety and habituation in zebrafish and goldfish: A comparative study using the scototaxis test

Thiago Marques de Brito<sup>\*1</sup>, Caio Maximino<sup>†</sup>, Rafael Colmanetti<sup>‡</sup>, Henrique Meira de Castro<sup>‡</sup>, Renata Inah Tavares de Lacerda<sup>‡</sup>, Alvaro Antonio Assis Pontes<sup>§</sup>, Silvio Morato<sup>\*</sup>, Amauri Gouveia Jr<sup>†</sup>

\* Laboratório de Comportamento Exploratório, Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo – USP, Ribeirão Preto/SP, Brazil

† Laboratório de Neurociências e Comportamento, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Pará – UFPA, Belém/PA, Brazil

‡ Departamento de Psicologia, Faculdade de Ciências, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – Unesp, Bauru/SP, Brazil

§ Faculdade de Artes, Arquitetura e Comunicação, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – Unesp, Bauru/SP, Brazil

---

<sup>1</sup> Corresponding author: Laboratório de Comportamento Exploratório, Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Av. Bandeirantes 3900, 14040-901, Ribeirão Preto/SP, Brazil. Email: thiagombrito@gmail.com

The scototaxis test has been proposed as a test of anxiety in some species of fish, and relies on the effects of an approach-avoidance motivational conflict on the exploratory behavior of the animal. At least in rodents, housing animals in an enriched environment results in decreased anxiety, faster habituation and increased novelty seeking. In this article, we report that housing zebrafish and goldfish in an enriched environment for 2 weeks increases the time that animals spend in the aversive white compartment of the scototaxis tank and enhances intrasession habituation of locomotor activity in goldfish only, but does not promote intrasession habituation of white avoidance. These results are consistent with decreased emotional reactivity and/or increased novelty seeking in both species. Thus, as is the case with rodents, environmental enrichment can significantly alter emotional behavior in both zebrafish and goldfish.

Keywords: Environmental enrichment, welfare, housing, anxiety, fish, scototaxis

