

Programa aprovado pelo Conselho Superior de Ensino e Pesquisa da UFPA – Resolução 2545/98. Reconhecido nos termos das Portarias N°. 84 de 22.12.94 da Presidente da Fundação Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - CAPES e No. 694 de 13.06.95 do Ministério da Educação e do Desporto. Doutorado autorizado em 1999.

Aspectos Paramétricos do Comportamento Tipo-Ansiedade em Diferentes Estágios de Desenvolvimento de Guppies (*Poecilia reticulata*) no Labirinto em Cruz com Rampa

Ana Cláudia Costa de Carvalho

Belém – Pará
2024

Programa aprovado pelo Conselho Superior de Ensino e Pesquisa da UFPA – Resolução 2545/98. Reconhecido nos termos das Portarias N°. 84 de 22.12.94 da Presidente da Fundação Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - CAPES e No. 694 de 13.06.95 do Ministério da Educação e do Desporto. Doutorado autorizado em 1999.

Aspectos Paramétricos do Comportamento Tipo-Ansiedade em Diferentes Estágios de Desenvolvimento de Guppies (*Poecilia reticulata*) no Labirinto em Cruz com Rampa

Ana Cláudia Costa de Carvalho

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Teoria e Pesquisa do Comportamento como requisito parcial para a obtenção do Título de Doutora.

Orientador(a): Prof.º Dr. Amauri Gouveia Jr.

Belém – Pará

2024

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)

UFPA/Núcleo de Teoria e Pesquisa do Comportamento/Biblioteca

- C331a Carvalho, Ana Cláudia Costa de, 1996 -
Aspectos paramétricos do comportamento tipo-ansiedade em
diferentes estágios de desenvolvimento de Guppies (*Poecilia reticulata*) no
labirinto em cruz com rampa / Ana Cláudia Costa de Carvalho . — 2024.

97 f.: il.

Orientador: Amauri Gouveia Jr.

Tese (Doutorado) - Universidade Federal do Pará, Núcleo de Teoria
e Pesquisa do Comportamento, Programa de Pós- Graduação em Teoria
e Pesquisa do Comportamento, Belém, 2024.

1. Análise do comportamento. 2. Ecoetologia. 3. Comportamento
animal (ansiedade). 4. Guppies (peixes ornamentais). 5. Labirinto em cruz
com rampa. I. Título.

CDD - 23. ed. — 150.77

Catalogação na fonte: Maria Célia Santana da Silva – CRB2/780



Programa aprovado pelo Conselho Superior de Ensino e Pesquisa da UFPA – Resolução 2545/98. Reconhecido nos termos das Portarias Nº. 84 de 22.12.94 da Presidente da Fundação Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - CAPES e No. 694 de 13.06.95 do Ministério da Educação e do Desporto. Doutorado autorizado em 1999.

Defesa de Doutorado

“Aspectos Paramétricos no Comportamento Tipo-Ansiedade de Larvas e Juvenis de Guppy (Poecilia Reticulata) no Labirinto em Cruz com Rampa.”

Aluna: Ana Cláudia Costa de Carvalho.

Data da Defesa: 12 de dezembro de 2024.

Resultado: Aprovada.

Banca Examinadora:

Documento assinado digitalmente
gov.br AMAURI GOUVEIA JUNIOR
Data: 31/01/2025 15:25:13-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Profº Drº Amauri Gouveia Júnior (orientador – UFPA).

Documento assinado digitalmente
gov.br PAULO CESAR MORALES MAYER
Data: 12/12/2024 19:26:39-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Profº Drº Paulo César Morales Mayer (membro 1 – CEUMA-MA).

Documento assinado digitalmente
gov.br GUILHERME CHIRINEA
Data: 12/12/2024 19:49:44-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Profº Drº Guilherme Chirinea (membro 2 – UFBA).

Documento assinado digitalmente
gov.br EDNA CRISTINA SANTOS FRANCO
Data: 12/12/2024 18:12:44-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Profª Drª Edna Cristina Santos Franco (membro 3 – UEPA).

Documento assinado digitalmente
gov.br GABRIELA SOUZA DO NASCIMENTO
Data: 12/12/2024 21:12:28-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Profª Drª Gabriela Souza do Nascimento (membro 4 – UNINOVE).

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

This study was financed in part by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Finance Code 001.

Ana Cláudia Costa de Carvalho, Programa de Pós-Graduação em Teoria e Pesquisa do Comportamento, Universidade Federal do Pará, Belém-PA, Brasil.

Contato: Ana Cláudia Costa de Carvalho

Mail: anaclaudiac.carvalho@hotmail.com

**Termo de Autorização e Declaração de Distribuição não exclusiva para Publicação
Digital no Repositório institucional da UFPA**

IDENTIFICAÇÃO DO AUTOR E DA OBRA

Autora: Ana Cláudia Costa de Carvalho

Vínculo com a UFPA: () Servidor; (X) Discente Unidade: Núcleo de Teoria e Pesquisa do Comportamento
Subunidade: Programa de Pós-Graduação em Teoria e Pesquisa do Comportamento.

Tipo do documento: (X) Tese; () Dissertação; () Livro; () Capítulo de Livro; () Artigo de Periódico; ()
Trabalho de Evento; () Outro. Especifique:

Título do Trabalho: Aspectos Paramétricos do Comportamento Tipo-Ansiedade em Diferentes Estágios de
Desenvolvimento de Guppies (*Poecilia reticulata*) no Labirinto em Cruz com Rampa

Data da Defesa: Área do Conhecimento: ECOETOLOGIA

Agência de Fomento: Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - CAPES

**DECLARAÇÃO DE DISTRIBUIÇÃO NÃO
EXCLUSIVA**

A referida autora:

Declara que o documento entregue é seu trabalho original, e que detém o direito de conceder os direitos
contidos nesta licença. Declara também que a entrega do documento não infringe, tanto quanto lhe é possível
saber, os direitos de qualquer outra pessoa ou entidade.

Se o documento entregue contém material do qual não detém os direitos de autor, declara que obteve
autorização do detentor dos direitos de autor para conceder à Universidade Federal do Pará os direitos
requeridos por esta licença, e que esse material cujos direitos são de terceiros, está claramente identificado e
reconhecido no texto ou conteúdo entregue.

Se o documento entregue é baseado em trabalho financiado ou apoiado por outra instituição que não
a Universidade Federal do Pará, declara que cumpriu quaisquer obrigações exigidas pelo respectivo contrato
ou acordo.

TERMO DE AUTORIZAÇÃO

Na qualidade de titular dos direitos de autor da publicação, autorizo a UFPA a disponibilizar de acordo
com a licença pública *Creative Commons* Licença 3.0 *Unported*, e de acordo com a Lei nº 9610/98, o texto
integral da obra citada, conforme permissões abaixo por mim assinaladas, para fins de leitura, impressão e/ou
download, a partir desta data.

Permitir o uso comercial da obra?

() Sim

(X) Não

Permitir modificações em sua obra?

() Sim, contanto que compartilhem pela mesma licença

(X) Não

O documento está sujeito ao registro de patente?

() Sim

(X) Não

A obra continua protegida conforme a Lei

Direito Autoral.

Belém (PA),

Assinatura do Autor e/ou Detentor dos Direitos do Autor

Dedico ao meu pai, Manoel Garcia de Carvalho, in memoriam.
Sua memória e legado serão eternamente a base de tudo o que faço.

AGRADECIMENTOS

Ao meu marido, Tadeu Cerqueira Júnior, pelo apoio inabalável desde o início. Seu amor, paciência e capacidade de trazer leveza à minha vida foram fundamentais para a conclusão desta etapa. Sem você, nada disso seria possível.

À minha mãe, Cláudia Carvalho, e às minhas irmãs, Manuelle Carvalho e Flávia Carvalho, pelo apoio, parceria e compreensão que me acompanharam ao longo de minha trajetória acadêmica. Vocês são o meu Norte.

A todos que fazem ou fizeram parte do Laboratório de Neuroquímica e Comportamento do IFPA em Tucuruí, minha primeira casa e o lugar onde iniciei minha jornada acadêmica e científica. Agradeço especialmente a André Walsh-Monteiro, Fabiana Furtado e Gelson Alves. Sem o auxílio de vocês, o processo que envolveu a coleta de dados, o manejo dos animais no biotério e a condução dos experimentos teria sido bem mais difícil.

Ao meu orientador, Professor Amauri Gouveia, pela orientação precisa, paciência, valiosos puxões de orelha e constante incentivo ao longo do desenvolvimento desta pesquisa. Seu conhecimento e apoio foram essenciais para a realização deste trabalho.

Aos meus amigos Daniel Guasselli, Rodrigo Pessoa, Bethânia Tuma e Breno Ramos, pelo apoio, especialmente nas horas de desabafo, pelo incentivo, e por segurarem minha mão.

A todos os meus familiares, em especial minha tia Socorro Alves; meus primos Joane Alves e João Vitor Alves; meus sogros Aldair e Tadeu Cerqueira; e minhas cunhadas Gleice, Gláucia e Adrielle. Compartilhar vivências e contar com o apoio de cada um de vocês durante essa jornada fez toda a diferença.

E, por fim, ao Programa de Pós-Graduação em Teoria e Pesquisa do Comportamento da Universidade Federal do Pará e à CAPES, por todo o aprendizado adquirido durante esses quatro anos, pelo suporte e incentivo à prática científica.

Carvalho, A. C. C. (2024). *Aspectos Paramétricos do Comportamento Tipo-Ansiedade em Diferentes Estágios de Desenvolvimento de Guppies (Poecilia reticulata) no Labirinto em Cruz com Rampa*. Tese de Doutorado. Programa de Pós-Graduação em Teoria e Pesquisa do Comportamento. Universidade Federal do Pará, Belém, Pará, Brasil, 97 p.

Resumo

Estudos paramétricos do comportamento tipo-ansiedade em animais não humanos são essenciais para aumentar a validade e a eficácia desses modelos ao estabelecerem parâmetros determinantes da manifestação da resposta ansiosa. O Labirinto em Cruz com Rampa (LCR) foi desenvolvido como um modelo de ansiedade para peixes adultos, inspirado no Labirinto em Cruz Elevado (LCE) utilizado para roedores. Esta pesquisa, dividida em dois estudos, focou na adaptação do LCR de peixes adultos para guppies (*Poecilia reticulata*) nos primeiros estágios de desenvolvimento. No Estudo I, foi realizada a análise paramétrica do LCR para larvas e juvenis de guppies. Avaliou-se a sensibilidade dos animais a diferentes tempos de exposição ao aparato e níveis de água, com o objetivo de analisar a resposta dos guppies ao estímulo aversivo produzido pelo LCR e seus níveis de resposta tipo-ansiosa por meio da exploração do aparelho. As avaliações incluíram o tempo em cada braço do labirinto e o número de transposições, representando variáveis comportamentais. No Estudo II, com base nos parâmetros de tempo de sessão e coluna d'água estabelecidos no primeiro estudo, foram realizadas exposições hídricas a diferentes concentrações de álcool e cafeína. O objetivo foi examinar os efeitos dessas substâncias no comportamento semelhante à ansiedade em guppies, desde a fase larval até a fase adulta. Os resultados dos dois estudos indicaram que o LCR é um modelo válido para estudar a ansiedade em guppies desde os estágios iniciais do desenvolvimento. As variáveis medidas no aparelho, como o tempo, a coluna d'água e número de entradas, permitiram induzir respostas comportamentais semelhantes à ansiedade nestes animais larvais e juvenis. Além disso, os resultados mostraram que foi possível avaliar o efeito do álcool e da cafeína sobre o nível da resposta ansiosa, que varia conforme a dose, idade e sexo dos animais. Essas descobertas reforçam também a validade do Guppy como modelo animal para investigações sobre o comportamento ansioso desde os primeiros estágios de vida.

Palavras-chave: Comportamento, labirinto em cruz com rampa, modelos de ansiedade, guppy, *Poecilia reticulata*, psicologia comparada, modelos animais, álcool, cafeína, ansiedade.

Carvalho, A. C. (2024). *Parametric Aspects of Anxiety-Like Behavior at Different Developmental Stages of Guppies (Poecilia reticulata) in the Plus Maze with Ramp*. Doctoral Thesis. Postgraduate Program in Theory and Research of Behavior. Federal University of Pará, Belém, Pará, Brazil, 97 p.

Abstract

Parametric studies of anxiety-like behavior in non-human animals are essential for increasing the validity and efficacy of these models by establishing key parameters for the manifestation of anxious responses. The Plus Maze with Ramp (PMR) was adapted as an anxiety model for adult fish, inspired by the Elevated Plus-Maze used for rodents. This research, divided into two studies, focused on adapting the PMR for adult fish to guppies (*Poecilia reticulata*) in the early stages of development. In Study I, a parametric analysis of the PMR for guppy larvae and juveniles was conducted. The sensitivity of the animals to different exposure times to the apparatus and water levels was assessed, with the goal of analyzing the guppies' responses to the aversive stimulus produced by the PMR and their levels of anxiety-like response through exploration of the apparatus. Evaluations included time spent in each arm of the maze and the number of entries, representing behavioral variables. In Study II, based on the session time and water column parameters established in the first study, exposures to different concentrations of alcohol and caffeine were administered by water exposure. Was to examine the effects of these substances on anxiety-like behavior in guppies from the larval stage to adulthood. The results of both studies indicated that the PMR is a valid model for studying anxiety in guppies from the early stages of development. The variables measured in the device, such as time, water column and number of entries, allowed the induction of behavioral responses like-anxiety in these larval and juvenile animals. In addition, the results show that it was possible to evaluate the effect of alcohol and caffeine on the level of the anxiety response, which varies according to the dose, age and sex of the animals. These findings also reinforce the validity of the guppy as an animal model for investigations into anxiety behavior from the early stages of life.

Keywords: Behavior, plus maze with ramp, anxiety models, guppy, *Poecilia reticulata*, comparative psychology, animal models, alcohol, caffeine, anxiety.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.	Esquema ilustrativo dos estágios de desenvolvimento do guppy selvagem (<i>Poecilia reticulata</i>).	21
Figura 2.	Desenho esquemático do Labirinto em Cruz com Rampa para adultos e adaptado para larvas e juvenis de guppies.	26
Figura 3.	Divisão dos braços do Labirinto em Cruz com Rampa em terços para análise do nível de ansiedade	35
Figura 4.	Larvas sensibilidade. Percentual de tempo gasto em cada compartimento do LCR de acordo com a duração dos testes e a altura da camada de água e número de entradas de acordo com a duração dos testes e a altura da camada de água.	36
Figura 5.	Juvenis sensibilidade. Percentual de tempo gasto em cada compartimento de acordo com a duração dos testes e a altura da camada de água. Segundo gráfico: Número de entradas de acordo com a duração dos testes e a altura da camada de água	37
Figura 6.	Tempo de permanência em terços do LCR. (A) Larvas. (B) Juvenis.	38
Figura 7.	Número de entradas em terços do LCR. (A) Larvas. (B) Juvenis.	39
Figura 8.	Percentual de tempo e número de entradas de larvas de guppies expostas ao álcool.	52
Figura 9.	Percentual de tempo e número de entradas de guppies juvenis expostos ao álcool.	53
Figura 10.	Percentual de tempo e número de entradas de guppies machos expostos ao álcool.	54
Figura 11.	Percentual de tempo e número de entradas de guppies fêmeas expostas ao álcool.	55
Figura 12.	Percentual de tempo e número de entradas de larvas de guppies expostas à cafeína.	56
Figura 13.	Percentual de tempo e número de entradas de Guppies juvenis expostos à cafeína.	57
Figura 14.	Percentual de tempo e número de entradas de guppies machos expostos à cafeína.	58
Figura 15.	Percentual de tempo e número de entradas de guppies fêmeas expostas à cafeína.	60

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.	Esquema ilustrativo dos estágios de desenvolvimento do guppy selvagem (<i>Poecilia reticulata</i>).	34
Tabela 2.	Desenho esquemático do Labirinto em Cruz com Rampa para adultos e adaptado para larvas e juvenis de guppies.	35
Tabela 3.	Divisão dos braços do Labirinto em Cruz com Rampa em terços para análise do nível de ansiedade	50

SUMÁRIO

1 APRESENTAÇÃO	13
1.1 Validando um modelo	13
1.2 Modelos de ansiedade em peixes	15
1.3 Análises paramétricas e o labirinto em cruz com rampa	17
1.4 Larvas e juvenis de guppies (<i>Poecilia reticulata</i>)	20
1.5 Focos desta pesquisa	22
2 OBJETIVO GERAL	23
2.1 Objetivos específicos	23
3 MATERIAIS E MÉTODOS	24
3.1 Aspectos éticos	24
3.2 Manejo e bem-estar dos animais	24
3.3 Labirinto em cruz com rampa	25
3.4 Condições experimentais	26
3.5 Análise estatística	27
4 ESTUDO I	28
Resumo	28
Abstract	29
4.1 Introdução	30
4.2 Métodos	32
4.4 Resultados	45
4.5 Discussão	39
4.6 Conclusão	43
5 ESTUDO II	44
Resumo	44
Abstract	45
5.1 Introdução	46
5.2 Métodos	49
5.3 Resultados	51
5.4 Discussão	59
5.5 Conclusão	65
6 CONSIDERAÇÕES FINAIS	67
REFERÊNCIAS	69
ANEXOS	96

1 APRESENTAÇÃO

1.1 Validando um modelo

A ansiedade é um estado emocional complexo, caracterizada por reações de apreensão ou tensão como resposta a estímulos percebidos como ameaçadores, envolvendo alterações fisiológicas e comportamentais (Finn et al., 2003; Catatayud et al., 2004; Belovicova et al., 2017; Harro, 2023). Para o estudo do comportamento ansioso, pesquisas que utilizam modelos comportamentais produzem situações que são capazes de gerar respostas semelhantes do estado ansioso em um animal não-humano (espécie modelo ou modelo animal).

As respostas observadas nos modelos podem ser induzidas pela exposição da espécie em um ambiente novo e desconhecido (modelos não condicionados ou etológicos) exposição a níveis elevados de iluminação durante os experimentos, exposição a substâncias ansiolíticas ou ansiogênicas (Delgado et al., 2006; Harro, 2023; Zhao et al., 2023). Logo, as condições criadas nos experimentos esperam que os animais realizem avaliações sobre o seu ambiente, permitindo que eles evitem, se esquivem, de ameaças ou busquem por refúgio em áreas mais protegidas sem a necessidade de um treinamento prévio (como nos modelos condicionados) (Rushton et al., 1983).

Para que seja possível avaliar parâmetros válidos para a análise do comportamento ansioso, o estudo deve utilizar uma espécie que seja capaz de refletir os mecanismos biológicos reais que ocorrem no organismo ou na condição que está sendo estudada. Isso significa que as respostas observadas no modelo devem ser semelhantes às que ocorreriam em situações naturais no organismo de interesse (Steimer, 2011; Jones et al., 2019).

A validade do modelo depende de que os resultados obtidos sejam compatíveis com o fenômeno em sua escala mais ampla e de que possam ser mapeados e replicados em estudos

subsequentes (Silva, 2003; Gouveia & Brito, 2015). Para um modelo de ansiedade, essa validade também exige que as condições fisiológicas, ecológicas e comportamentais da espécie escolhida sejam ideais para o estudo, considerando que o nível de resposta ansiosa não deve ser tão baixo a ponto de dificultar a detecção de efeitos ansiolíticos, nem tão elevado que impeça a observação de aumentos adicionais na ansiedade (Rodgers & Dalvi, 1997; Menard & Treit, 1999; Holmes, 2001; Motta, 2020).

Na literatura encontram-se três critérios que estabelecem os aspectos que determinam o que um modelo precisa alcançar para que seja considerado válido em cumprir aquilo que se propõe: a validade de face, de construto e preditiva (Willner, 1986;1991; Olivier et al., 1994; Hijzen et al., 1995; Mc Daniel et al., 2007; van der Staay, 2009; Maximino et al., 2010; Belzung & Lemoine, 2011; Steimer, 2011; Goswami et al., 2013; Burrows & Hannan, 2013; Vervliet & Raes, 2013; Denayer et al., 2014; Réus et al., 2014; Raza, 2015; Jovanović et al., 2017; Kristensen et al., 2018; Gencturk & Unal, 2024).

A validade de face se refere à semelhança entre os sintomas observados no modelo e aqueles da condição clínica específica. Para que um modelo tenha validade de face, as respostas comportamentais dos animais devem refletir características reconhecíveis da ansiedade, como a evitação de espaços abertos, o aumento da frequência cardíaca ou o medo. Se um modelo animal manifesta esses comportamentos em resposta a condição estressora, ele pode ser considerado relevante para o estudo, pois permite avaliar o fenômeno em um contexto que é intuitivamente compreensível e reconhecível (Maximino et al., 2010; Belzung & Lemoine, 2011; Qi Xiaoli & Lin Wenjuan, 2005).

A validade de construto envolve a capacidade do modelo de reproduzir os processos fisiopatológicos da doença. Um modelo com validade de construto deve demonstrar, além do comportamento, outros mecanismos fisiológicos envolvidos na resposta ansiosa. Isso pode incluir alterações nos níveis de neurotransmissores, como serotonina ou norepinefrina, bem

como a ativação de circuitos neurais específicos associados à resposta ao estresse e à ansiedade. Se o modelo reproduz essas características, ele pode ser considerado útil para investigar a fisiopatologia da ansiedade e testar novas intervenções (Overall, 2000; Maximino et al., 2010; Haller & Alicki, 2011; Gencturk & Unal, 2024).

A validade preditiva está ligada à eficácia do modelo em responder aos tratamentos da mesma maneira que os humanos. Um modelo de ansiedade deve ser capaz de prever a eficácia de terapias conhecidas, como medicamentos ansiolíticos ou intervenções comportamentais. Se um determinado tratamento reduz os comportamentos ansiosos em um modelo animal da mesma forma que alivia os sintomas em humanos, ele possuirá validade preditiva (Bourin & Hascoët, 2001; Borsini et al., 2002; Bondi et al., 2007; Maximino et al., 2010; Haller & Alicki, 2011; Luyten et al., 2011; Gencturk & Unal, 2024).

1.2 Modelos de ansiedade em peixes

Assim como ratos e camundongos, outras espécies são utilizadas como modelos de pesquisa, incluindo peixes como o zebrafish (*Danio rerio*), o peixe dourado (*Carassius auratus*), a tilápia-do-Nilo (*Oreochromis niloticus*), o peixe-de-briga-do-Sião (*Betta splendens*) e o Guppy (*Poecilia reticulata*) (Olivier et al., 1994; Corrêa & Negrão, 2001; Mathur & Guo, 2010; Carvalho & Gouveia Jr, 2012; Scharl, 2014; Matsui, 2017; Fontana et al., 2018; Hong & Zha, 2019; Walsh-Monteiro et al., 2016;2021; Ogawa et al., 2021; Braga et al., 2024; Carvalho et al., 2024; Pessoa et al., 2024).

A utilização de peixes como modelos está relacionada não apenas às facilidades de manutenção e a manipulação, mas também à homologia genética e comportamental observada entre eles e animais mamíferos (Kalueff et al., 2014). Outras semelhanças fisiológicas são observadas, principalmente na neuroanatomia e na sinalização neural com os tetrápodes,

incluindo os seres humanos (Guo, 2009; Wang et al., 2006; Setini et al., 2006; Wullimann; Mueller, 2004; Kalueff et al., 2014). Apesar das diferenças anatômicas evidentes, as similaridades moleculares (neurotransmissores, hormônios) são suficientes para justificar o uso desses organismos na pesquisa (Schartl, 2014; Kalueff et al., 2014).

Para o estudo e análise do comportamento tipo-ansiedade em peixes, são utilizados modelos comportamentais (testes ou procedimentos) capazes de induzir as respostas típicas deste comportamento nestes animais ao representarem um ambiente novo (desconhecido, potencialmente aversivo) (Maximino et al., 2010; Blaser & Rosemberg, 2012; Walsh-Monteiro, 2016; Benvenuti et al., 2021; Cleal et al., 2021; Munson & DePasquale, 2024).

Em um estudo, Walsh-Monteiro (2016) destaca que alguns modelos comportamentais foram adaptados ao modelo piscino, como o teste de Campo Aberto (Riehl et al., 2011), o teste Claro/Escuro (Blaser & Peñalosa, 2011; Maximino et al., 2010; Serra et al., 1999) e o teste de Labirinto em Cruz com Rampa (inspirado no Labirinto em Cruz Elevado) (Walsh-Monteiro et al., 2016), e se apresentaram eficazes para medir comportamentos tipo-ansiedade em peixes.

Essa eficácia se explica pelo fato de que esses testes avaliam a evitação dos animais em ambientes mais aversivos (valor de face), permitindo também explorar os aspectos subjacentes ao comportamento, como o significado da evitação e a relação com a resposta ansiosa (valor de construto). Além disso, possuem capacidade preditiva, uma vez que demonstram que animais tratados com ansiolíticos tendem a passar mais tempo em ambientes aversivos (valor preditivo) (Willner, 1986; 1991; Silva, 2003; Gouveia & Brito, 2015).

Além dos modelos adultos, peixes em fases iniciais de desenvolvimento também são utilizados na pesquisa. Ao analisar o surgimento e a consolidação de respostas comportamentais ao longo das primeiras fases da vida, é possível compreender os processos pelos quais comportamentos específicos, como a ansiedade, se formam e se estabilizam (Saint-Amant & Drapeau, 1998; Rosa et al., 2022).

A maioria dos estudos concentra-se em modelos larvais e juvenis de *zebrafish* (paulistinha, *Danio rerio*), espécie preferida na pesquisa por sua homologia com mamíferos, fácil manejo, ciclo de vida curto, alta taxa de reprodução e baixo custo (Rosa et al., 2022). As larvas de *zebrafish* exibem respostas comportamentais de sobressalto frente a estímulos táteis, acústicos, visuais e tendem a evitar áreas escuras, objetos em movimento e espaços abertos. Reações como essas indicam nesses animais estados como o medo e a ansiedade (Beyer & Laurence, 1980; Osse et al., 1995; Fuiman et al., 1998; Finn, 2020; Burggren & Blank, 2009; Ali et al., 2011; Steenbergen et al., 2011; Schnörr et al., 2012; Voesenek et al., 2018; Varga et al., 2018; Basnet et al., 2019).

Para investigar o comportamento tipo-ansiedade em larvas e juvenis de peixes, assim como em modelos adultos, são utilizados modelos comportamentais adaptados às características específicas para essas fases do desenvolvimento, como o tamanho dos animais. A literatura descreve estudos com larvas de *zebrafish* em testes como o Claro/Escuro (Steenbergen et al., 2011; 2012; Chen et al., 2015; Zahid et al., 2018), o teste de mergulho em tanque novo (Fontana & Parker, 2022) e o labirinto em cruz (Varga et al., 2018; Carvalho et al., 2024).

1.3 Análises paramétricas e o labirinto em cruz com rampa

Os modelos comportamentais utilizados na pesquisa da ansiedade, especialmente na área da farmacologia, permitem avaliar comportamentos ansiolíticos ou ansiogênicos induzidos por substâncias psicotrópicas. Quanto mais o modelo reflete o efeito esperado, maior é seu valor para a pesquisa (Parmigiani et al., 1999; Menard & Treit, 1999; Levin et al., 2007). Desta forma, entende-se que, para medir o comportamento de forma precisa (se o modelo

reflete o fenômeno estudado), as pesquisas paramétricas são essenciais para a definição de parâmetros experimentais (Maximino et al., 2010).

A definição desses parâmetros é feita através do teste comportamental e controle de variáveis relacionadas ao modelo em estudo, como o aparato em si, o tempo do teste, a linhagem dos animais, idade, tamanho e outras condições experimentais (Espejo, 1997; Cooper et al., 2005; Boyda et al., 2010; Maximino et al., 2010; Sorregotti et al., 2013; Walsh-Monteiro, 2016; Motta, 2020; Silva, 2024).

O Labirinto em Cruz Elevado (LCE) é um dos principais modelos desenvolvidos para análise do comportamento tipo-ansiedade em roedores. Ele se baseia na escolha do animal por ambientes mais seguros e a aversão por ambientes mais expostos, como indicativo válido para observação do comportamento, onde seu formato em cruz permite avaliar o comportamento a partir da introdução dos animais no centro do aparato para início do teste (Pellow et al., 1985; Kraeuter et al., 2019).

Pellow et al. (1985) estabelece que o comportamento típico dos animais no LCE consiste em passar a maior parte da sessão de teste, cerca de 80% do tempo, nos braços fechados (ambiente seguro), também entrando um maior número de vezes nestes braços. Esse comportamento pode ser apontado como um índice confiável de ansiedade, no qual a exploração e tempo nos braços abertos (ambiente aversivo) seria inversamente correspondente ao estado ansioso.

Estudos paramétricos feitos com o LCE estabeleceram diferentes condições ao avaliarem fatores como o sexo dos animais testados, reexposição ao teste, o nível de luminosidade na hora do experimento, a hora do dia, a altura do aparato, exposição a substâncias ansiolíticas e ansiogênicas, dentre outros (Pellow et al, 1985; Lister, 1987; Anseloni & Brandão, 1997; Espejo, 1997; Wall & Messier, 2001; Doremus, 2006).

Para os peixes, Walsh-Monteiro et al. (2016) introduziu o teste de Labirinto em Cruz com Rampa (LCR), inspirado no LCE e no Teste de Tanque Novo (TTN). O LCR tem como objetivo induzir comportamento tipo-ansiedade em peixes ao medir a aversão dos animais nos braços com rampa (mais rasos) e sua preferência pelos braços planos (mais fundos). O princípio por trás desta adaptação é semelhante ao do TTN, que avalia a tendência natural do animal em evitar áreas mais próximas da superfície, preferindo a exploração em zonas mais profundas como medidas de ansiedade (Levin et al., 2007).

A disposição em cruz, com dois braços planos e dois braços com rampas, permite uma avaliação mais refinada das escolhas exploratórias dos peixes, refletindo melhor o comportamento de risco e segurança. Essa combinação de fatores faz do LCR um modelo útil para o estudo do comportamento ansioso com peixes (Walsh-Monteiro et al., 2016;2021).

Análises paramétricas foram feitas com o LCR desde o desenvolvimento da ferramenta. No primeiro estudo apresentado, Walsh-Monteiro (2016) determinou parâmetros a partir da análise de variáveis para análise do comportamento em guppies adultos (*Poecilia reticulata*). As análises feitas testaram os animais em diferentes níveis de água (1, 2 e 4 cm no topo da rampa), diferentes tempos de sessão (5, 10 e 15 minutos), sexo dos animais, reexposição ao aparato e efeito de substâncias (álcool, clonazepam, imipramina, fluoxetina e cafeína) (Walsh-Monteiro, 2016; Walsh-Monteiro et al., 2021).

Com *zebrafish* adultos foram feitas análises quanto a sensibilidade desses animais ao LCR utilizando as mesmas variáveis de tempo, níveis de água e efeito de duas substâncias (álcool e clonazepam) (Walsh-Monteiro et al., 2016). Outra análise paramétrica feita com a exposição do *zebrafish* no LCR avaliou outras variáveis do teste, como a inclinação da rampa, nível de luz e largura dos braços (Motta, 2020).

Esses estudos mostram que independentemente dos parâmetros utilizados, os peixes preferem os braços planos, seguidos pelo compartimento central, e evitam os braços com

rampas. Com uma altura na coluna d'água de 1 cm, observou-se que o tempo nos braços planos aumentou conforme a duração do teste, sugerindo um efeito oposto à habituação — quanto mais rasa a água, maior a aversão ao ambiente. Além disso, houve diferenças no tempo de permanência entre colunas d'água de 2 cm e 4 cm, destacando a importância do estabelecimento de parâmetros em modelos comportamentais, visto que pequenas alterações nos procedimentos podem implicar em resultados diferentes (Walsh-Monteiro et al., 2016; Motta, 2020).

1.4 Larvas e juvenis de guppies (*Poecilia reticulata*)

O Guppy (*Poecilia reticulata*) é uma espécie de peixe teleósteo nativa do noroeste da América do Sul e uma das mais utilizadas em aquarismo, sendo também utilizada como modelo animal em diferentes áreas como a genética, ecologia, desenvolvimento, neurociências, farmacologia, toxicologia e comportamento (Reznick & Bryga, 1987; Tripathi et al., 2009; Shahjahan et al., 2014; Walsh-Monteiro et al., 2014; Bovenkerk & Kaldewaij, 2015; Cabrera-Álvarez et al., 2017; Dick et al., 2018; Ziaei-nejad et al., 2020; Huang et al., 2020; Rezaie et al., 2020; Peláez Rodríguez et al., 2021; Walsh-Monteiro et al., 2021; Imai et al., 2022; Malafaia et al., 2022; Montalbano et al., 2023; Xu et al., 2023; Zhang et al., 2023).

Os guppies em laboratório apresentam vantagens quanto à sua fácil manutenção, rápida reprodução, sendo uma espécie prolífera e que apresenta dimorfismo sexual na fase adulta, além de alta resistência, inclusive em ambientes adversos, como aqueles contaminados ou com baixa oxigenação (Walsh-Monteiro et al., 2021).

Além disso, a escolha desta espécie como modelo se dá pela sua similaridade com mamíferos em padrões de neurodesenvolvimento e organização cerebral funcional (Rodd et al., 1997; Rétaux & Yamamoto, 2024).

Por serem ovovivíparos apresentam fertilização interna e produzem muitos filhotes por fêmea, o que os tornam ideais para estudos relacionados ao desenvolvimento. Os filhotes se desenvolvem no interior da mãe por 3 a 4 semanas antes do nascimento. Quando as larvas nascem, já são capazes de nadar, se alimentar e evitar predadores (Ladesma & McRoberts, 2008; Gruber, 2012; Miletto Petrazzini et al., 2022).

A idade juvenil de guppies se inicia após a fase larval, cerca de 2-3 semanas após o nascimento, nesta fase os juvenis exibem comportamentos mais parecidos com os animais adultos, sendo a fase adulta iniciada entre os 3- 4 meses de vida (Chapman et al., 2008; Savaşçı et al., 2021; Ladesma & McRoberts, 2008) (Figura 1).

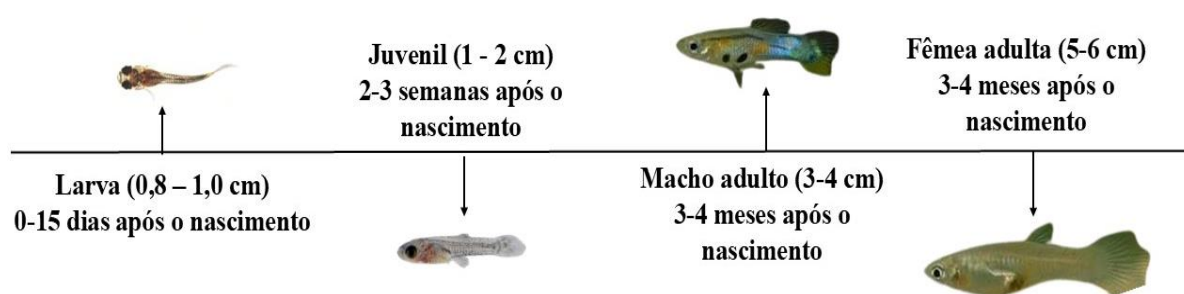


Figura 1. Esquema ilustrativo dos estágios de desenvolvimento do guppy selvagem (*Poecilia reticulata*), desde o nascimento até a fase adulta. Fonte: adaptado de imagens disponíveis no banco de dados do Google.

Os estudos que investigaram o comportamento de guppies durante as primeiras fases da vida indicam que, desde a fase larval, eles já apresentam a capacidade de manifestar comportamentos relacionados à fuga, forrageamento, além de respostas relacionadas a ansiedade (Rodd et al., 1997; Krause & Liesenjohann, 2012; Gruber, 2012; Savaşçı et al., 2021; Pelli & Connaughton, 2015; Carvalho et al., 2024).

Esses achados sugerem que guppies larvais e juvenis podem servir como modelos alternativos válidos, assim como o *zebrafish*, para se estudar o neurodesenvolvimento e a

manifestação precoce de comportamentos complexos, incluindo a resposta tipo-ansiosa, em estágios iniciais da vida.

1.5 Focos desta pesquisa

Ao considerar que guppies adultos exibem comportamentos tipo-ansiedade induzidos pelo teste de Labirinto em Cruz com Rampa (LCR), mas que este modelo não foi testado com guppies larvais e juvenis, esta pesquisa trouxe uma adaptação do LCR para larvas e juvenis de guppy, de forma a reforçar a validade do modelo para estudos sobre o comportamento semelhante a ansiedade durante as fases iniciais do desenvolvimento.

Para isso, esta pesquisa foi dividida em dois estudos que envolveram aspectos paramétricos do comportamento de larvas e juvenis no LCR. No primeiro estudo, foram feitas análises de parâmetros no LCR para larvas e juvenis de guppies, a fim de verificar a sensibilidade dos animais nestas faixas etárias ao teste. Os parâmetros avaliados envolveram a análise de variáveis como: o tempo (5 – 10 – 15min) e coluna d'água (1,1 – 1,2 – 1,5cm), considerando que o tempo de exposição e a profundidade da água podem afetar a exploração, o que é relevante para o comportamento natural dos guppies, como visto com os adultos.

No segundo estudo, após de estabelecidos os parâmetros experimentais, avaliou-se os efeitos de duas substâncias psicotrópicas, álcool (0,5 – 1 – 2%) e a cafeína (2,5 – 5 – 10mg), no comportamento dos guppies larvais, juvenis e adultos visando explorar os efeitos ansiolíticos e ansiogênicos dessas substâncias sobre o comportamento, e com ela a validade preditiva no teste de labirinto em cruz com rampa.

2 OBJETIVO GERAL

Avaliar o comportamento tipo-ansiedade de larvas, juvenis e adultos de guppies (*Poecilia reticulata*) no teste de Labirinto em Cruz com Rampa (LCR) por meio de análises paramétricas para definição de parâmetros experimentais e análise dos efeitos de substâncias.

2.1 Objetivos específicos do Estudo

- Avaliar a sensibilidade das larvas e juvenis de guppies ao estímulo aversivo induzido pelo LCR, adaptado ao tamanho físico desses animais, em diferentes tempos de sessão e altura da coluna d'água;
- Avaliar o nível do comportamento de evitação em áreas mais próximas do topo das rampas e identificar áreas de preferência em larvas e juvenis de guppies expostos no LCR;
- Avaliar os efeitos das exposições agudas ao álcool e à cafeína sobre o comportamento tipo-ansiedade em larvas, juvenis e adultos de guppies testados no LCR;
- Avaliar se ocorrem diferenças nas respostas comportamentais ao álcool e à cafeína entre os diferentes estágios de desenvolvimento dos guppies testados no LCR;
- Investigar se ocorre dimorfismo sexual nas respostas comportamentais entre guppies adultos testados no LCR.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Aspectos éticos

Todo o manejo animal foi conduzido de acordo com as diretrizes éticas para o cuidado e uso de animais em pesquisa, e o estudo recebeu aprovação do Comitê de Ética no Uso de Animais (Comitê de Ética no Uso de Animais do Instituto Federal do Pará, Protocolo nº 1444120521).

3.2 Manejo e bem-estar dos animais

Foram utilizados guppies do viveiro do Laboratório de Neuroquímica e Comportamento do Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Pará (IFPA), Campus Tucuruí. Uma parte dos guppies adultos do viveiro foram usados apenas como matrizes de reprodução, outra parte, composta por machos e fêmeas, foi utilizada apenas nos experimentos do Estudo II. Estes, foram separados em dois aquários viveiros de 50L, por sexo, considerando o dimorfismo sexual perceptível na fase adulta (Walsh-Monteiro et al., 2021).

Para obtenção dos guppies nos primeiros estágios de desenvolvimento, fêmeas adultas grávidas foram selecionadas a partir da identificação dos estágios finais da gravidez, com base em sinais como distensão abdominal e escurecimento da porção póstero-inferior do abdômen. Após o nascimento, as larvas recém-eclodidas foram removidas para outro local para evitar o risco de predação pelas mães. O manuseio foi realizado por um pesquisador treinado e envolveu a transferência das larvas para recipientes circulares transparentes com volume de 500mL de água.

Para todos os animais do biotério, incluindo guppies adultos e filhotes, a iluminação foi controlada com um fotoperíodo de 14 horas de luz e 10 horas de escuridão, iniciando a fase de luz às 6 da manhã. As condições físicas e químicas da água foram mantidas a 27 ± 1 °C; pH $7 \pm 0,2$, sem cloro, com níveis mínimos de amônia e nitrito, que foram medidos semanalmente e corrigidos conforme necessário.

Para alimentação, náuplios de artêmia e pellets triturados (TetraColor Tropical Flakes, Tetra, Alemanha) foram administrados duas vezes ao dia: uma vez pela manhã e outra à tarde. Qualquer excesso de alimento não consumido foi removido 2 horas após a alimentação.

3.3 Labirinto em cruz com rampa

Para analisar o comportamento tipo-ansiedade nos estágios iniciais de desenvolvimento dos guppies utilizamos o teste de Labirinto em Cruz com Rampa (LCR), adaptado para larvas e juvenis (Carvalho et al., 2024) e para os peixes adultos utilizamos o LCR desenvolvido por Walsh-Monteiro et. al. (2016;2021).

As dimensões do labirinto adaptado para larvas foram proporcionais ao design original o labirinto para peixes adultos conforme apresentado na figura 2. Essa adaptação preservou dois braços com rampas, dois braços planos e uma área central (Figura 2).

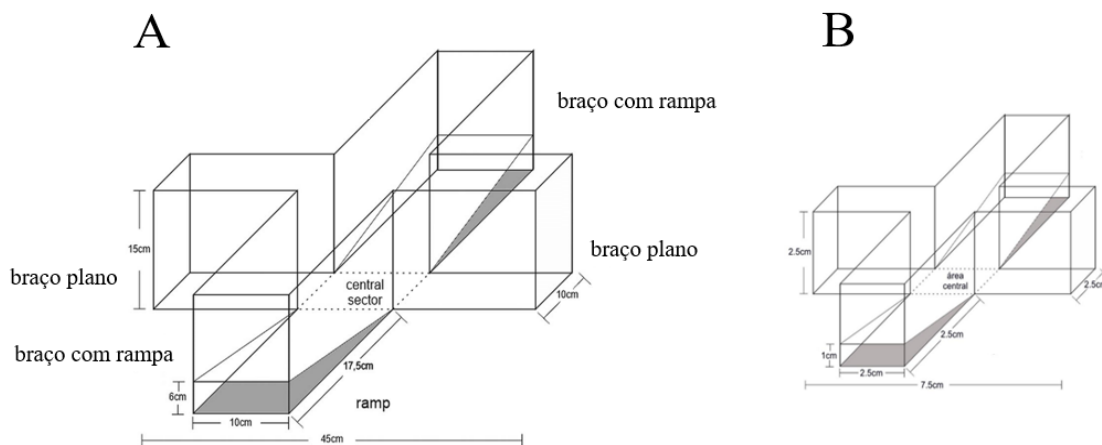


Figura 2. Desenho esquemático do Labirinto em Cruz com Rampa (LCR). (A) LCR para peixes adultos. (B) LCR adaptado para larvas e juvenis de guppies. Fonte: (Walsh-Monteiro et al., 2016; 2021; Carvalho et al. 2024).

3.4 Condições experimentais

Para início das sessões experimentais, iniciou-se o monitoramento do comportamento dos animais sob o labirinto durante 5, 10 e 15 minutos para cada sessão individual de larvas e juvenis na análise da sensibilidade, e 10 minutos para análise de nível de ansiedade no Estudo I.

No Estudo II, para larvas e juvenis, foi feito o monitoramento no LCR por 10 minutos, e por 5 minutos para os animais adultos. Após a exposição de cada animal ao labirinto, a água deste foi substituída a fim de evitar que substâncias sinalizadoras de estresse afetassem o próximo animal a ser testado (Walsh-Monteiro et al., 2021; Carvalho et al., 2024).

As análises sob o labirinto mediram o tempo gasto nos braços planos (ambiente considerado protegido), braços de rampa (aversivo) e centro, bem como o número de entradas nos braços. Para a análise do número de entradas, um animal foi considerado como tendo se movido de um compartimento para outro quando dois terços de seu corpo cruzavam de uma porção do aparelho para outra.

A sala experimental contava com baixos níveis de ruído e iluminação de 400 lux e as sessões experimentais foram gravadas com câmeras digitais de alta definição (GZ-EX210, JVC) posicionadas perpendicularmente ao LCR. A análise dos vídeos foi realizada usando o software X-plo-rat (Tejada et al., 2018). Logo após, os dados obtidos a partir da análise dos vídeos foram transcritos em planilhas do Excel 2021 (Microsoft Office 2021, Microsoft, Estados Unidos).

3.5 Análise estatística

Para a análise estatística foi utilizado o software SPSS Statistics versão 20.0 (IBM corp, 2010, EUA), e para produção dos gráficos, foi utilizado o GraphPad Prism Versão 5.03 (GraphPad Software Inc., 2010, Estados Unidos).

A determinação do perfil de normalidade das amostras foi realizada pelo teste de Shapiro-Wilk e a homogeneidade pelo teste de Levine. Com base nesses resultados, foi aplicado o teste de Kruskal-Wallis para dados não paramétricos e adotada a ANOVA unidirecional para dados paramétricos. O teste de Tukey foi aplicado como pós-teste.

O nível de significância adotado foi de 95% ($p \leq 0,05$). Nos gráficos, os asteriscos indicam diferenças estatísticas entre as porções do LCR, onde: * representa $p < 0,05$; ** representa $p < 0,01$; e *** representa $p < 0,001$.

4 ESTUDO I

ANÁLISE PARAMÉTRICA DO COMPORTAMENTO TIPO-ANSIEDADE DE LARVAS E JUVENIS DE GUPPY (*Poecilia reticulata*) NO LABIRINTO EM CRUZ COM RAMPA

Estudo publicado em agosto de 2024 na revista *Psychology & Neuroscience*

<https://doi.org/10.1037/pne0000343>

Resumo

Neste estudo, utilizamos larvas e juvenis de guppy no teste de labirinto em cruz com rampa (LCR) para obter dados sobre o comportamento. O objetivo foi avaliar a sensibilidade dos animais ao estímulo aversivo gerado pelo LCR em comportamentos semelhantes à ansiedade. Para realizar o estudo, um total de 240 guppies em estágio larval e juvenil foi utilizado. Os animais foram divididos em 20 grupos ($n = 12$): 10 grupos consistiram em larvas com 7 dias de idade e 10 grupos consistiram em juvenis com 28 dias de idade. Na primeira fase, aquários de teste com diferentes alturas de coluna de água (1,1, 1,3, 1,5 cm) foram testados por várias durações (5, 10, 15 min) para estabelecer parâmetros experimentais. As medições incluíram o tempo gasto nos compartimentos e as entradas nos braços. Na fase II, cada braço do LCR foi dividido em três partes iguais: proximal, medial e distal. As avaliações incluíram o tempo em cada parte e o número de transposições, representando variáveis comportamentais e locomotoras. Nossos resultados mostram que o LCR induz comportamento de evitação nos braços com rampa e aumento da exploração dos braços planos. Os dados ressaltam a validade do uso do aparelho para investigar comportamentos semelhantes à ansiedade em peixes durante a fase de desenvolvimento.

Palavras-chave: Modelos de ansiedade, guppy, estágios de desenvolvimento.

**PARAMETRIC ANALYSIS OF ANXIETY-LIKE BEHAVIOR IN GUPPY LARVAE
AND JUVENILES (*Poecilia reticulata*) IN THE PLUS MAZE WITH RAMP**

Study published in August 2024 in the journal Psychology & Neuroscience

<https://doi.org/10.1037/pne0000343>

Abstract

In this study, we utilized guppy larvae and juveniles in the cross maze with ramp (PMR) to obtain data on behavior during the early stages of their lives. The goal was to assess the animals' sensitivity to the aversive stimulus generated by the PMR on anxiety-like behaviors. To conduct the study, a total of 240 guppies in larval and juvenile stages were used. The animals were divided into 20 groups (n = 12): 10 groups consisted of 7-day-old larvae and 10 groups consisted of 28-day-old juveniles. In the first phase, test aquariums with different water column heights (1.1, 1.3, 1.5 cm) were tested for various durations (5, 10, 15 min) to establish experimental parameters. Measurements included time spent in compartments and arm entries. In phase II, each arm of the PMR was divided into three equal parts: proximal, medial, and distal. Assessments included time spent in each part and the number of transpositions, representing behavioral and locomotor variables. Our results show that the PMR induces avoidance behavior in ramped arms and increased exploration of flat arms. The data indicate the validity of using the apparatus to study anxiety-like behaviors in developing fish. The data underscore the validity of using the apparatus to investigate anxiety-like behaviors in fish during the developmental phase, presenting a valuable tool for exploring this phenomenon throughout the life cycle.

Keywords: Anxiety models, guppy, developmental stages.

4.1 Introdução

O uso de animais não humanos em pesquisas pré-clínicas para entender os mecanismos neurocomportamentais relacionados à psicopatologia da ansiedade nas últimas décadas se expandiu além dos tradicionais roedores ou mamíferos (Grillon et al., 2019; Kenwood et al., 2022). Animais de outros grupos taxonômicos, como planárias (Cho et al., 2019), nematoides (McDonough et al., 2021), caranguejos (Hamilton et al., 2016), camarões (Takahashi, 2022), moscas-das-frutas (Meichtry et al., 2020), anfíbios (Orford et al., 2022, 2023), aves (Boulay et al., 2013; Gastón et al., 2015), lagartos (Lima-Maximino et al., 2018) e peixes (Hamilton et al., 2021; Maximino et al., 2010), também estão ganhando espaço em pesquisas que exploram o comportamento semelhante à ansiedade sob diversas perspectivas.

Nesse contexto, para estudar comportamentos semelhantes à ansiedade e outros fenômenos relacionados, uma série de protocolos originalmente desenvolvidos para roedores foi adaptada para peixes. Estes incluem o teste claro-escuro (Maximino et al., 2010), teste de campo aberto (Lucon-Xiccato et al., 2022), desamparo aprendido (Nascimento et al., 2016), esquiva inibitória (Pinheiro-da-Silva et al., 2020) e agressão (Michelotti et al., 2022), entre outros.

O Labirinto em Cruz Elevado (LCE) é uma das primeiras ferramentas usadas para avaliar o comportamento semelhante à ansiedade em roedores, desenvolvido por Pellow e File (1986). Seguindo a abordagem de adaptação de testes de roedores para peixes, nosso grupo desenvolveu uma nova versão do LCE chamada de labirinto em cruz com rampa (LCR), projetado para investigar comportamentos semelhantes à ansiedade em peixes.

Este refinamento melhorou significativamente a compreensão do fenômeno em uma investigação com peixes-zebra (*Danio rerio*; Walsh-Monteiro et al., 2016) e com guppies (*Poecilia reticulata*; Walsh-Monteiro et al., 2021). A eficácia do LCR em estudar

comportamentos semelhantes à ansiedade em peixes foi verificada atendendo a três critérios de validação: validade de face (grau de semelhança com o que se pretende simular), validade preditiva (capacidade de prever o que se espera simular) e validade de construto (se os dados obtidos do modelo estão relacionados ao foco pretendido de estudo; Willner, 1991).

O LCR consiste em um aquário em forma de cruz dividido em dois braços planos e profundos e dois braços com rampas que sobem de uma área central até o final do braço, onde a coluna de água é mais rasa. Os animais, quando testados no LCR, tendem a passar mais tempo e a entrar mais frequentemente nos braços planos, evitando os braços com rampa. Isso seria semelhante aos roedores que passam mais tempo e entram com mais frequência nos braços fechados do LCE em comparação com os braços abertos (Lister, 1990; Pellow et al., 1985; Pellow & File, 1986). Esses comportamentos de evitação em ambientes com maior exposição e risco são classificados como respostas defensivas semelhantes à ansiedade (Blanchard & Blanchard, 2008).

O uso de peixes em pesquisas neurocientíficas e comportamentais é um campo em constante expansão e a maioria dos estudos ainda utiliza apenas peixes adultos. Porém, dada a importância de avaliar os estágios iniciais da vida e a influência do desenvolvimento no comportamento das espécies, alguns estudos têm usado larvas de peixes-zebra para esse fim (Basnet et al., 2019; Richendrfer et al., 2012; Rosa et al., 2022; Varga et al., 2018), já que *Danio rerio* é possivelmente a espécie mais utilizada para esse tipo de estudo na comunidade científica.

Os guppies são ovovivíparos, ao contrário do *zebrafish*, e passam por fertilização interna (Reznick, 1990; Reznick & Bryga, 1987), o que potencialmente os torna ideais para estudar a influência das exposições materno-embrionárias no comportamento de sua prole. Apesar desse potencial, os guppies têm sido relativamente pouco explorados em pesquisas focadas em seu comportamento durante os estágios iniciais de desenvolvimento.

A maioria dos estudos que utilizaram guppies jovens se concentrou na fisiologia geral e no crescimento (Rezaie et al., 2020; Shahjahan et al., 2014; Tripathi et al., 2009), genética (Dick et al., 2018; Imai et al., 2022; Reznick & Bryga, 1987; Tripathi et al., 2009), ecotoxicologia (Huang et al., 2020; Malafaia et al., 2022; Ziaei-nejad et al., 2020) e análises morfológicas (Peláez Rodríguez et al., 2021).

Reconhecendo a lacuna na literatura e a falta de dados comportamentais, particularmente em relação à ansiedade em guppies durante os estágios iniciais da vida, esta pesquisa visou suprir essa necessidade. Para tanto, avaliamos a sensibilidade de larvas e juvenis de guppies ao estímulo aversivo induzido pelo LCR, que foi adaptado ao tamanho físico desses animais. Este estudo busca entender o comportamento tipo-ansiedade em guppies desde os primeiros estágios de vida, contribuindo assim para uma visão mais abrangente de sua neurobiologia.

4.2 Métodos

4.2.1 SUJEITOS

Considerando que nos estágios iniciais da vida de um guppy seu sexo ainda não está definido e seus órgãos sexuais ainda estão em desenvolvimento, o momento exato em que um guppy juvenil começa a manifestar seu sexo pode variar devido a fatores como temperatura da água, qualidade da água, genética e nutrição. Em condições ideais, os guppies geralmente começam a exibir características sexuais distintas por volta de 2 a 3 meses de idade (Shahjahan et al., 2014).

Diante desses fatores, este estudo foi conduzido sem separar os sexos. Essa abordagem foi necessária para garantir a validade dos resultados e refletir a condição natural dos guppies nessa fase inicial de desenvolvimento.

4.2.2 GRUPOS EXPERIMENTAIS

Para realizar o estudo, foram utilizados um total de 240 guppies em estágios larval e juvenil. Os animais foram divididos em 20 grupos ($n = 12$): 10 grupos consistiam em larvas de 7 dias de idade e 10 grupos consistiam em juvenis de 28 dias de idade.

No primeiro experimento, utilizamos nove grupos de larvas e nove grupos de juvenis, totalizando 216 animais. Para o segundo experimento, foram usados os dois grupos restantes: um grupo de larvas e um grupo de juvenis.

4.2.2.1 Sensibilidade ao aparato

Com o objetivo de verificar se larvas e juvenis de guppy também são sensíveis à exposição ao LCR, como encontrado em um estudo de Walsh-Monteiro et al. (2021) com guppies adultos, foi realizado um protocolo experimental do LCR adaptado para os guppies em fase larval e juvenil, aplicando variáveis de sensibilidade ao teste, de acordo com o protocolo conduzido com animais adultos (Walsh-Monteiro et al., 2021).

A escolha das variáveis— altura da coluna de água (1,1, 1,3, 1,5 cm) e tempo da sessão experimental (5, 10, 15 min) — baseia-se em seu potencial de influenciar a exposição e a resposta dos guppies ao LCR. Ao verificar esses parâmetros, o estudo visa simular diferentes condições ambientais e avaliar como elas afetam a sensibilidade dos guppies à exposição ao LCR (Walsh-Monteiro et al., 2021).

A combinação de altura da coluna de água e tempo de sessão resultou na formação de 18 grupos para cada faixa etária testada (Tabela 1).

Tabela 1. Distribuição dos grupos para análise da sensibilidade.

Coluna d'água	Tempo de sessão	Grupos	
		Larvas	Juvenis
1,1 cm	5 minutos	12	12
	10 minutos	12	12
	15 minutos	12	12
1,3 cm	5 minutos	12	12
	10 minutos	12	12
	15 minutos	12	12
1,5 cm	5 minutos	12	12
	10 minutos	12	12
	15 minutos	12	12

4.2.2.2 Nível de ansiedade

Após determinar a sensibilidade de larvas e juvenis ao LCR, foi realizado um segundo experimento para avaliar o nível de comportamento de evitação em áreas mais próximas ao topo das rampas e identificar áreas de preferência. Foram utilizados dois grupos para esta análise. Cada braço do LCR foi dividido em três seções iguais—proximal, medial e distal—em relação à área central (Figura 3). Os grupos de larvas e juvenis foram testados com a altura da coluna de água e a duração da sessão determinadas na fase de estudo de sensibilidade (Tabela 2).

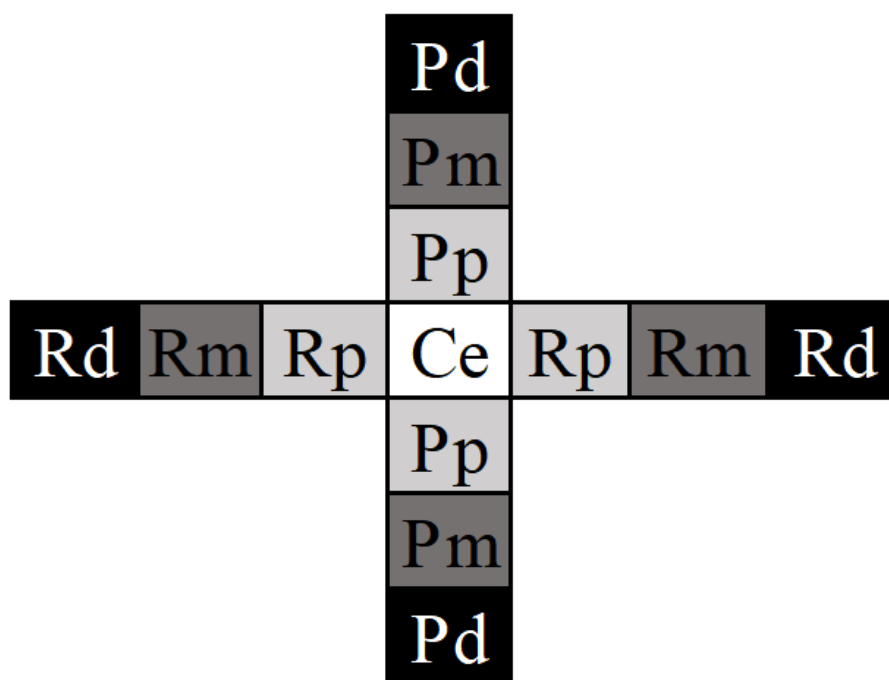


Figura 3. Divisão dos braços do Labirinto em Cruz com Rampa em terços para análise do nível de ansiedade. Legenda: Ce = Centro; R = Rampa; P= Plano; p = proximal; m = medial; d = distal. Fonte: Carvalho et al. (2024).

Tabela 2. Formação de um grupo de larvas e um grupo de juvenis (n=12) de acordo com os parâmetros experimentais determinados na sensibilidade.

Coluna d'água	Tempo de sessão	Grupos	
		Larvas	Juvenis
1,1 cm	10 minutos	12	12

4.4 Resultados

4.4.1 SENSIBILIDADE AO APARATO

Neste estudo, foi observado que em larvas, colunas de 1,1 e 1,3cm, para todos os tempos testados, foram encontradas diferenças nos tempos de permanência, com preferência pelos braços planos em relação aos braços com rampa ($p < 0,001$) ou área central ($p < 0,001$). Já as

entradas foram preferenciais nos braços planos apenas nos grupos 1,1cm para 5 [F(5,541) = 3,329; $p < 0,028$] e 10 minutos [F(5,541) = 3,329; $p < 0,028$] (Figura 4).

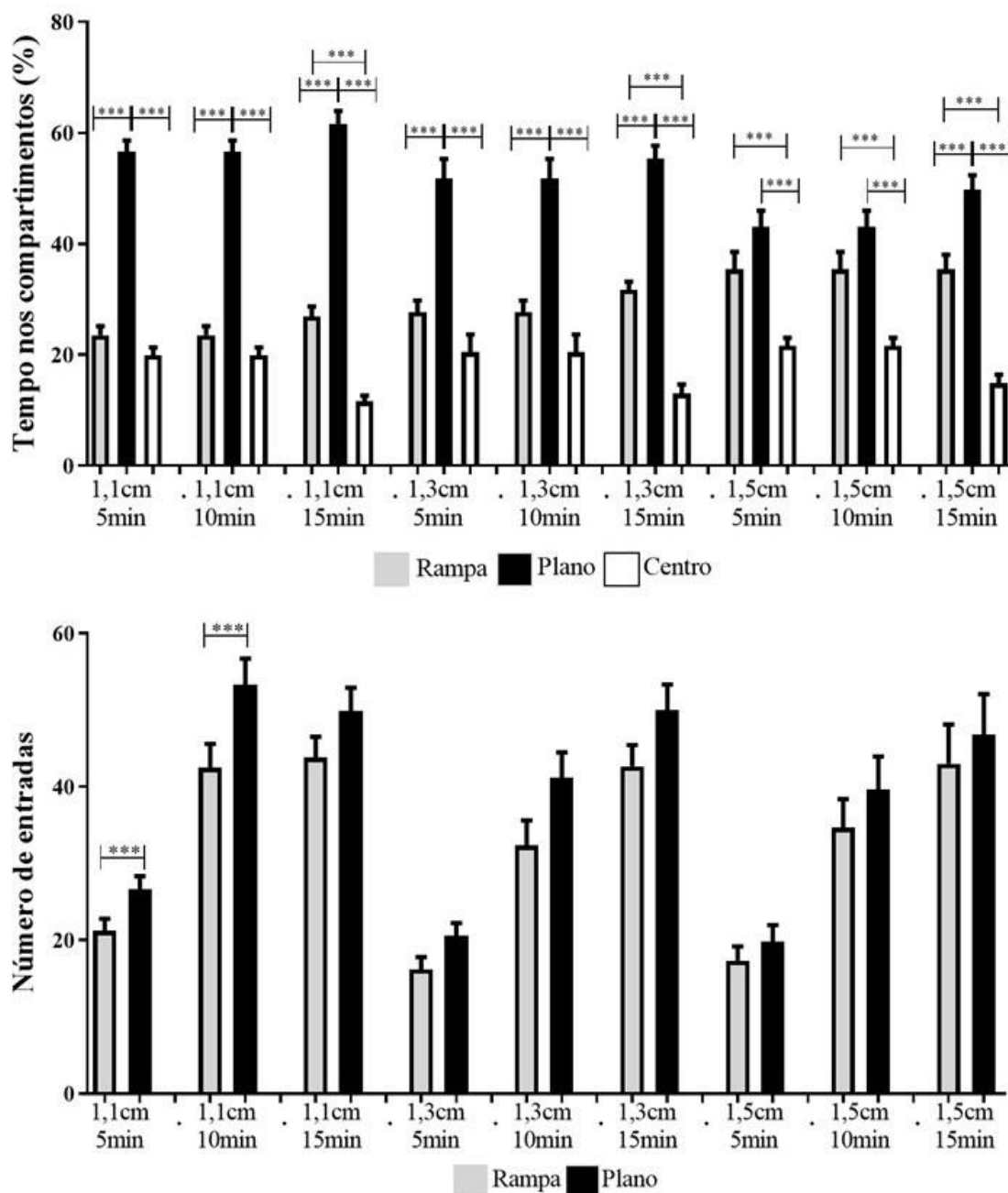


Figura 4. Larvas. Primeiro gráfico: percentual de tempo gasto em cada compartimento de acordo com a duração dos testes e a altura da camada de água. Segundo gráfico: Número de entradas de acordo com a duração dos testes e a altura da camada de água. Diferenças estatísticas significativas são apresentadas por símbolos entre os grupos (***) $p < 0,001$). Fonte: Carvalho et al. (2024).

Nos juvenis, exceto os grupos 1,3cm 5 e 10min ($p < 0,001$), para os demais o tempo de permanência maior nos braços planos foi significativo em relação aos demais ambientes ($p < 0,05$). Assim como nas larvas, juvenis revelaram maior entrada nos braços planos para 1,1cm e 5 [F(5,541) = 3,329; $p = 0,02$] ou 10min [F(5,541) = 3,329; $p = 0,02$] (figura 5).

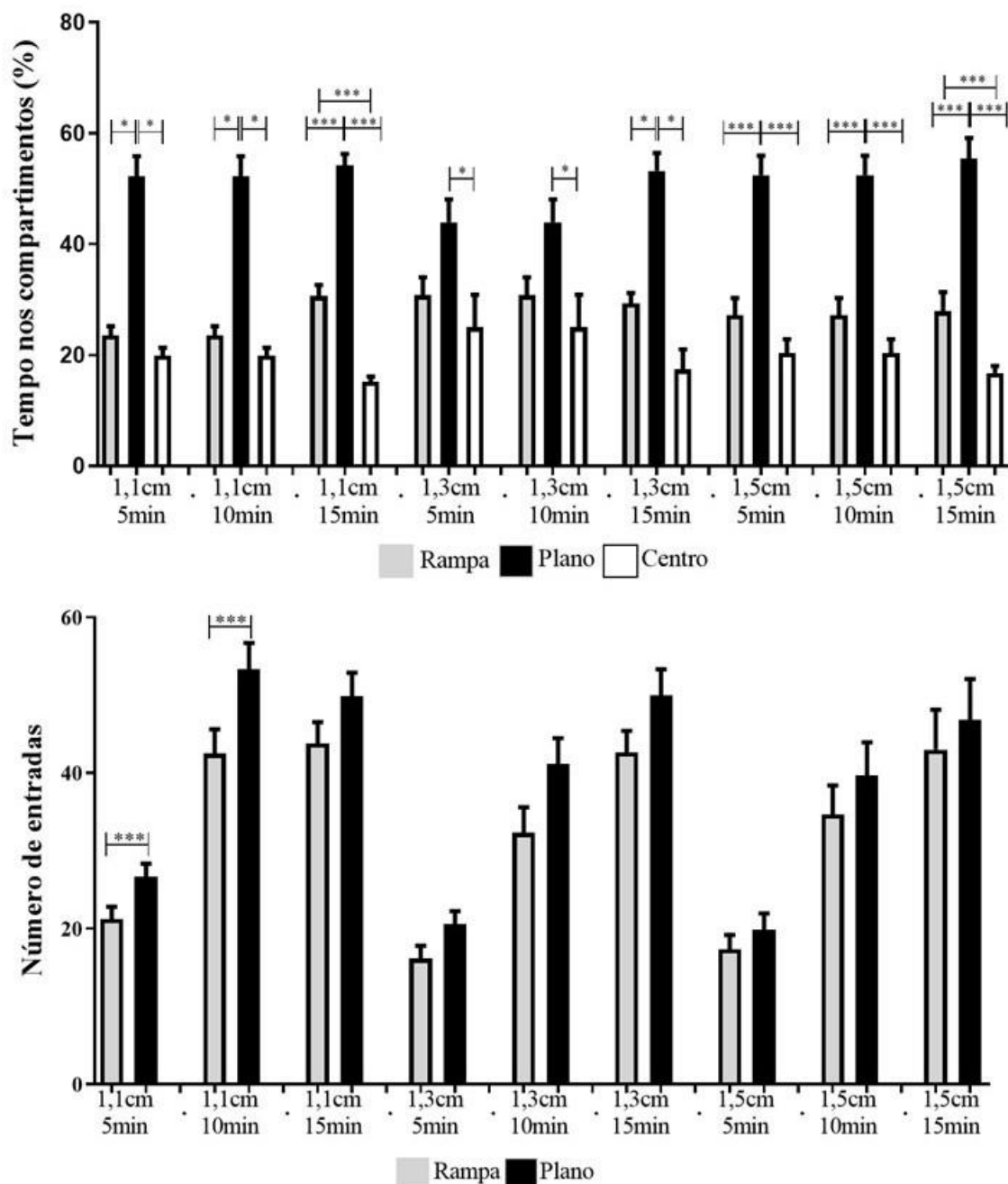


Figura 5. Juvenis. Primeiro gráfico: percentual de tempo gasto em cada compartimento de acordo com a duração dos testes e a altura da camada de água. Segundo gráfico: Número de entradas de acordo com a duração dos testes e a altura da camada de água. Diferenças estatísticas significativas são apresentadas por símbolos entre os grupos (* $p < 0,05$; *** $p < 0,001$). Fonte: Carvalho et al. (2024).

4.4.2 NÍVEL DE ANSIEDADE

Os resultados do grupo das larvas, foram observadas diferenças no tempo gasto nas porções distais dos braços planos em comparação com as outras seis porções dos terços do LCR, $[F(6,77) = 41,092, p < 0,001]$ (Figura 6A). O mesmo resultado foi encontrado ao analisar o grupo juvenil, $[F(6,77) = 48,361, p < 0,001]$ (Figura 6B).

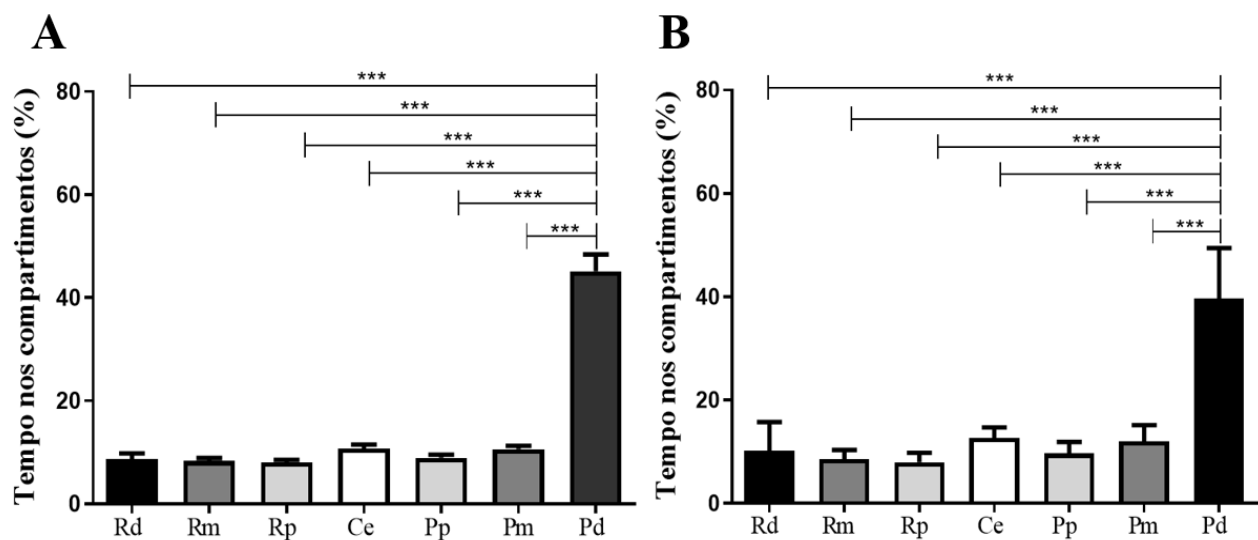


Figura 6. Tempo no LCR. (A) Larvas. (B) Juvenis. Legenda: Ce = centro; R = Rampa; P = Plano; p = proximal; m = medial; d = distal; * Indicação das diferenças estatísticas entre os segmentos do LCR, onde (***) $p < 0,001$. Fonte: Carvalho et al. (2024).

A avaliação das entradas nos braços revelou diferenças estatísticas entre os segmentos do LCR tanto para o grupo larval, $[H(6,77) = 34,980, p < 0,001]$, quanto para o grupo juvenil, $[H(6,77) = 58,990, p < 0,001]$. As diferenças pós-teste também foram consistentes, indicando que o número de entradas foi significativamente menor nas porções distais dos braços, sejam planos ou inclinados, em comparação com as outras porções do LCR, que não diferiram entre si (Figura 7A e 7B).

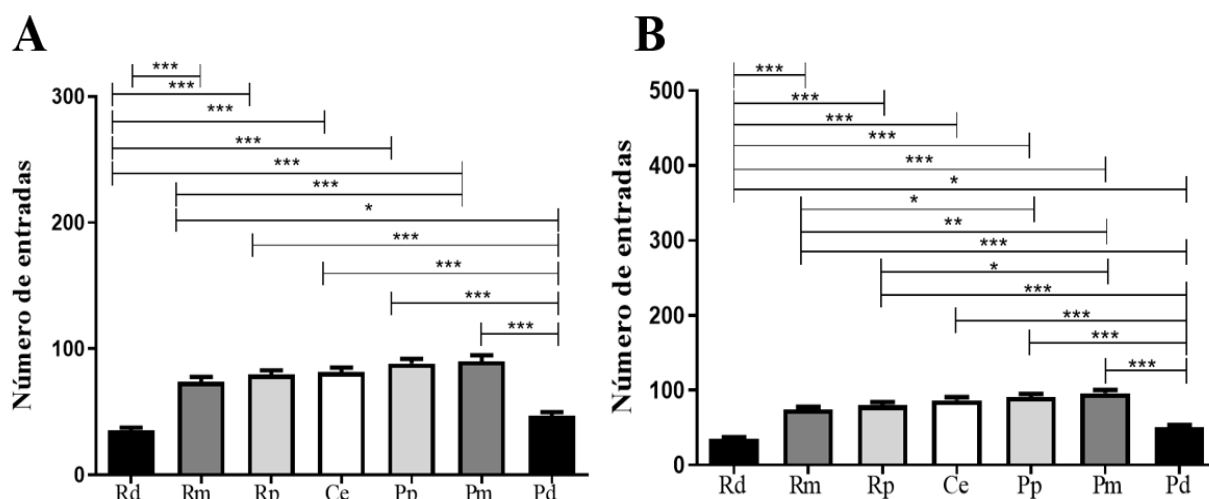


Figura 7. Entradas no LCR. (A) Larvas. (B) Juvenis. Legenda: Ce = centro; R = Rampa; P = Plano; p = proximal; m = medial; d = distal; * Indicação das diferenças estatísticas entre os segmentos do LCR, onde (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$). Fonte: Carvalho et al. (2024).

4.5 Discussão

Neste estudo, foi feita a adaptação do LCR, originalmente projetado para animais adultos, para uma escala adequada para larvas e juvenis, seguindo um protocolo semelhante ao descrito por Walsh-Monteiro e colaboradores (2021), levando em consideração a duração das sessões e a altura da coluna d'água. Os braços planos do LCR são reconhecidos como um ambiente menos aversivo e mais seguro para os animais (Walsh-Monteiro et al., 2016, 2021), semelhante ao comportamento observado nos braços fechados do LCE (Lister, 1990; Pellow et al., 1985; Pellow & File, 1986).

4.5.1 SENSIBILIDADE AO APARATO

A exposição de larvas e juvenis de guppy ao LCR revelou um padrão de resposta comportamental consistente com esses estudos em todos os grupos, independentemente da

duração das sessões e das alturas da coluna d'água, em comparação com os braços inclinados (ambiente aversivo) e a área central (ambiente de escolha; Figuras 4A e 5A).

No que diz respeito à análise do número de entradas, que considera apenas o número total de entradas nos braços do LCR, foi observado um maior número de transições nos braços planos do que nos braços com rampas. Esse padrão foi observado apenas em grupos expostos a uma coluna d'água mais rasa (1,1 cm) e sujeitos a sessões de 5 ou 10 minutos, tanto para larvas quanto para juvenis (Figuras 4B e 5B). Sessões com duração de 15 minutos ou com colunas d'água mais profundas (1,3 ou 1,5 cm) não resultaram em diferenças significativas no número de entradas.

Esses resultados indicam que, apesar de seu curto tempo de vida e desenvolvimento contínuo, os animais exibiram comportamento de evitação de riscos em relação ao novo ambiente (neofobia) e uma tendência à autopreservação. Esses elementos podem indicar vantagens para a sobrevivência da espécie, especialmente nas fases iniciais do desenvolvimento, o que parece ser conservado em vertebrados (Carola et al., 2002; Carvalho et al., 2015; File, 2001; Martin et al., 2007; Nakagawa et al., 2020; Prut & Belzung, 2003; Riehl et al., 2011).

Nossos resultados são consistentes com o modelo de deslocamento vertical de peixes, um procedimento experimental semelhante ao LCR, que avalia níveis de ansiedade e medo com base na escolha do animal pelas camadas mais rasas ou mais profundas da coluna d'água, conforme proposto por Gerlai et al. (2000). Nesse estudo, os autores observaram uma tendência dos zebrafish em escolher o fundo, classificado como uma resposta semelhante à ansiedade. Escolher o fundo no teste de deslocamento vertical é equivalente a preferir os braços planos no LCR, sugerindo que pode ser um bom indicador para medir a ansiedade nesses animais.

É importante notar que os braços com rampa são considerados os ambientes mais aversivos, especialmente nas áreas mais distantes da zona central, onde a coluna d'água é mais

rasa. Estudos com outros modelos de peixes mostraram que os indivíduos demonstram preferência por ambientes menos aversivos, evitando áreas mais rasas (Haghani et al., 2019; Maximino et al., 2010).

Os resultados observados neste estudo indicam que tanto as larvas quanto os juvenis de guppy são sensíveis ao LCR, mantendo a estabilidade da resposta comportamental na coluna de 1,1cm e 10 minutos de tempo de sessão, além de exibirem comportamentos semelhantes aos observados em estudos anteriores com peixes adultos desta espécie e do *zebrafish* (Walsh-Monteiro et al., 2016; 2021). Além disso, essas respostas comportamentais das larvas e dos juvenis apresentaram grande similaridade.

4.5.2 NÍVEL DE ANSIEDADE

Uma vez estabelecida a sensibilidade dos animais ao LCR com uma coluna d'água de 1,1 cm em sessões experimentais de 10 minutos no estudo anterior, esta nova análise que divide os braços do aparato em terços revelou que tanto as larvas (o segundo estágio de desenvolvimento e o primeiro da vida) quanto os juvenis (estágio intermediário de desenvolvimento) apresentaram uma clara resposta ansiogênica.

Em ambos os grupos, o maior tempo foi gasto no terço distal dos braços planos (Figura 6). Considerando os braços planos como os mais seguros e sua porção distal como a menos exposta, o comportamento semelhante à ansiedade manifestado por larvas e juvenis é evidente. Esses resultados são equivalentes aos observados por Walsh-Monteiro et al. (2021) para guppies adultos.

Já a análise da atividade motora de larvas e juvenis também revelou evitação nas porções distais dos braços em quantidade numérica (Figura 7). Para os braços com rampas, associados a um menor tempo gasto, observa-se o efeito de evitar esses ambientes de maior

risco. Já para os braços planos, ocorreram menos entradas, justificado pelo maior tempo gasto neles, indicando resposta de autopreservação.

As manifestações comportamentais nesses estágios iniciais de desenvolvimento levantam questões sobre a origem e a base neurobiológica desse comportamento, bem como suas implicações para a adaptação e sobrevivência da espécie em ambientes diversos. No estudo de Colwill & Creton (2011), os autores exploram como larvas de zebrafish respondem a estímulos aversivos ou estressantes e como escolhem nadar em diferentes camadas de água para evitar ou escapar de situações desafiadoras.

Além disso, neste estudo, é importante considerar a possibilidade de que a menor exploração das porções mais extremas do LCR por larvas e juvenis possa estar relacionada a uma menor capacidade de confrontar situações potencialmente aversivas. Isso considerando que, nos estágios iniciais de desenvolvimento, as mudanças fisiológicas na bexiga natatória podem influenciar nos primeiros comportamentos coordenados exibidos por esses animais após o nascimento.

Na ausência da bexiga natatória ou durante os estágios anteriores à sua maturação, como nas larvas, o desempenho de comportamentos como alimentação, flutuação, evasão de predadores e a inclinação para buscar ambientes familiares e seguros pode desempenhar um papel fundamental na sobrevivência dos organismos em um ambiente potencialmente hostil (Colwill & Creton, 2011; Lindsey et al., 2010).

A comparação das entradas nos braços com os adultos em estudos anteriores, como zebrafish (Walsh-Monteiro et al., 2016) e guppies machos e fêmeas (Walsh-Monteiro et al., 2021), mostra que larvas e juvenis são aproximadamente cinco vezes mais ativos no LCR. Essa atividade aumentada pode indicar um estágio de desenvolvimento mais energético e exploratório, característico dos primeiros estágios de vida em muitos grupos taxonômicos superiores (Achterberg & Vanderschuren, 2023; Hacques et al., 2021).

4.6 Conclusão

Este estudo enfatiza a necessidade de investigações futuras para explorar os mecanismos subjacentes ao comportamento semelhante à ansiedade em larvas e juvenis de guppy. Ele demonstra que os guppies exibem respostas semelhantes ao LCR ao longo de suas vidas, desde o estágio larval até o estágio juvenil. Essas informações podem também ser complementadas pelas respostas dos guppies na fase adulta, de acordo com um estudo anterior de Walsh-Monteiro e colaboradores (2021).

Com base nesses dados, podemos sugerir um padrão comportamental consistente durante o desenvolvimento desses animais, levantando a possibilidade de que o comportamento semelhante à ansiedade possa ter uma origem inata. É importante notar que as diferenças encontradas no comportamento ansioso entre larvas e juvenis neste estudo podem estar relacionadas a fatores hormonais, neurobiológicos e ambientais.

Naturalmente, ocorrem mudanças nos sistemas nervoso e endócrino durante o desenvolvimento, influenciando o desenvolvimento geral do animal. Além disso, diferenças nas condições do habitat e nas interações sociais também podem desempenhar um papel significativo na variação do comportamento ansioso ao longo dos estágios de vida desses peixes (Shahjahan et al., 2014).

Finalmente, este trabalho propôs o uso de guppies mais jovens expostos ao LCR para trazer novas perspectivas sobre a gênese das manifestações comportamentais semelhantes à ansiedade em um novo modelo animal durante os estágios de desenvolvimento.

5 ESTUDO II

AVALIAÇÃO DO IMPACTO DIFERENCIAL DO ÁLCOOL E DA CAFEÍNA NO COMPORTAMENTO TIPO-ANSIEDADE EM DIFERENTES ESTÁGIOS DA VIDA EM GUPPIES (*Poecilia reticulata*) USANDO O LABIRINTO EM CRUZ COM RAMPA

¹Estudo submetido em Outubro de 2024 na revista *Psychology & Neuroscience*.

Resumo

Este estudo investigou o efeito de diferentes concentrações de álcool e cafeína no comportamento de guppies larvais, juvenis e adultos usando o labirinto em cruz com rampa (LCR), um aquário em forma de cruz projetado para induzir comportamento semelhante à ansiedade em peixes. Os animais testados neste aparelho mostram uma preferência pelos braços planos em vez da área central e braços rampeados. Neste experimento, 336 guppies foram expostos a concentrações de 0,5, 1 e 2% de álcool e 2,5, 5 e 10 mg de cafeína por exposição de 5 minutos à água, formando grupos de $n = 12$ para cada dose e um grupo controle. Imediatamente após as exposições, cada animal foi testado no LCR por 10 minutos, registrando o tempo gasto em cada área (medição de ansiedade) e o número de entradas de braço (atividade locomotora). Considerando o padrão de amostragem, os testes de Kruskal-Wallis, ANOVA de uma via foram usados, e o teste de Tukey foi adotado como pós-teste. O nível de significância adotado foi de 95% ($p \leq 0,05$). Nossos resultados mostram como essas substâncias foram capazes de modular o comportamento do tipo ansiedade em guppies nos três estágios de vida, dependendo da dose e do sexo. Esses resultados reforçam o uso de guppies e validam seu uso para pesquisas relacionadas ao efeito de substâncias na resposta do tipo ansiedade.

Palavras-chave: Ansiedade; Modelo animal; Guppy; Labirinto em cruz com rampa.

¹ Comprovante de submissão anexado ao final do documento.

**ASSESSING THE DIFFERENTIAL IMPACT OF ALCOHOL AND CAFFEINE ON
ANXIETY-LIKE BEHAVIOR ACROSS LIFE STAGES IN GUPPIES (*Poecilia
reticulata*) USING THE PLUS MAZE WITH RAMP**

¹Study submitted in October 2024 in the journal Psychology & Neuroscience¹

Abstract

This study investigated the effect of different concentrations of Alcohol and caffeine on the behavior of larval, juvenile, and adult guppies using the plus maze with ramp (PMR), a cross-shaped aquarium designed to induce anxiety-like behavior in fish. Animals tested in this apparatus show a preference for the flat arms rather than the central area and ramped arms. In this experiment, 336 guppies were exposed to concentrations of 0.5, 1, and 2% alcohol and 2.5, 5, and 2.5, 5, and 10 mg caffeine per 5-minute water exposure, forming groups of $n = 12$ for each dose and a control group. Immediately after the exposures, each animal was tested in the PMR for 10 minutes, recording the time spent in each area (anxiety measurement) and the number of arm entries (locomotor activity). Considering the sampling pattern, the Kruskal-Wallis and one-way ANOVA tests were used, and the Tukey test was adopted as a post-test. The significance level adopted was 95% ($p \leq 0.05$). Our results show how these substances were able to modulate anxiety-like behavior in guppies in the three life stages, depending on the dose and sex. These results reinforce the use of guppies and validate their use for research related to the effect of substances on the anxiety-like response.

Keywords: Anxiety; Animal model; Guppy; Plus-maze with ramp.

¹ Submission confirmation attached at the end of the document.

5.1 Introdução

Os transtornos de ansiedade estão entre as psicopatologias mais prevalentes no mundo, afetando milhões de pessoas e prejudicando significativamente a qualidade de vida (Spytska, 2024; Kikas et al., 2024). Nos últimos anos, houve um aumento considerável no número de crianças e adolescentes diagnosticados com estes transtornos, destacando esses grupos como aqueles mais afetados por problemas de saúde mental (Kowalchuk et al., 2022; Salari et al., 2024).

Esse aumento reflete não apenas mudanças no estilo de vida e pressões sociais, mas também o crescente impacto de fatores como o uso excessivo de tecnologia, mídia social e as crescentes demandas da escola e do trabalho (Kowalchuk et al., 2022; Chao et al., 2023; Salari et al., 2024; Weigle & Shafi, 2024). O aumento da conscientização sobre saúde mental contribuiu para a identificação mais precoce dos sintomas, embora abordar o transtorno em faixas etárias mais vulneráveis continue sendo um desafio significativo (Dickson et al., 2022; Spytska, 2024).

O uso de substâncias psicotrópicas é particularmente preocupante no surgimento de transtornos de ansiedade entre adolescentes, devido à maior vulnerabilidade nessa faixa etária, pois seu sistema nervoso ainda está em desenvolvimento (Lees et al., 2020; Albaugh et al., 2021; Scattolin et al., 2022). Essas substâncias podem causar alterações neurofisiológicas simultâneas, afetando tanto os estados emocionais quanto o comportamento (Carlezon & Korandi, 2004; Lowry et al., 2005; Abrams et al., 2005; Lawther et al., 2015). Este cenário ressalta a necessidade urgente de estratégias específicas de prevenção e tratamento, adaptadas às características e necessidades desses jovens.

Álcool e cafeína estão entre as substâncias que afetam o sistema nervoso central (SNC) e produzem efeitos na ansiedade. Além disso, dependendo da idade do indivíduo, podem causar

alterações permanentes no neurodesenvolvimento dessa resposta emocional (Gulick & Gould, 2009; Clayman & Connaughton, 2022; D'Urso et al., 2024).

O álcool é classificado como um psicotrópico depressivo, e sua relação com o comportamento ansioso pode ocorrer devido à sua ação nos neurotransmissores GABA e glutamato (Van Skike et al., 2015). Inicialmente, ele induz relaxamento, comportamento desinibido com efeito ansiolítico, e em concentrações mais elevadas, observa-se efeito depressivo (Blanchard et al., 1993; Ipser et al., 2015; Aquino et al., 2024).

A cafeína, um psicotrópico estimulante, aumenta o estado de alerta e melhora o desempenho físico e mental. Sua ação primária é bloquear os receptores de adenosina, que normalmente reduzem a atividade neuronal e promovem a sonolência. Ao inibir esses receptores, a cafeína aumenta a atividade excitatória (Fiani et al., 2021). No entanto, em doses mais altas, a cafeína pode intensificar a resposta ansiosa, levando ao nervosismo, aumento da frequência cardíaca e sensações como medo (Maeda et al., 2021; Fiani et al., 2021; Klevebrant & Frick, 2022).

Na pesquisa, o uso de modelos animais é essencial para investigar como o uso dessas substâncias durante a infância ou adolescência influenciam no desenvolvimento de transtornos de ansiedade, fornecendo avaliações pré-clínicas essenciais que replicam alterações neuroquímicas e comportamentais como aquelas observadas com humanos.

O comportamento semelhante à ansiedade observado em modelos animais é baseado na hipótese de que outros animais possuem uma resposta adaptativa a situações perigosas, consistente com os traços de ansiedade humana (Layng et al., 1999; Pawlak et al., 2008; Bovenkerk & Kaldewaij, 2015).

Desta forma, o uso de peixes como modelos tem ganhado destaque no campo da pesquisa, expandindo significativamente abordagens experimentais e possibilitando estudos eficientes, como a investigação dos efeitos de substâncias farmacológicas no desenvolvimento.

Tais estudos têm fornecido dados consistentes, em linha com achados de modelos clássicos de roedores e humanos (Gouveia Jr., 2006; Gerlai, 2011; 2014; Maximino et al., 2010; 2015; Matsui, 2017).

O guppy (*Poecilia reticulata*) surgiu como uma espécie promissora na neurociência comportamental. Sua similaridade com mamíferos em termos de neurodesenvolvimento e organização funcional cerebral (Bovenkerk & Kaldewaij, 2015; Cabrera-Álvarez et al., 2017; Montalbano et al., 2023; Rétaux & Yamamoto, 2024) o torna um modelo valioso. Além disso, estudos mostraram que os guppies exibem comportamentos semelhantes à ansiedade desde os estágios larval e juvenil (Carvalho et al., 2024), persistindo na idade adulta (Walsh-Monteiro et al., 2014; 2021; Xu et al., 2023; Zhang et al., 2023).

A maioria dos estudos que investigam os efeitos de substâncias psicotrópicas em guppies concentra-se em aspectos comportamentais, como comportamentos antipredatórios, locomotores ou reprodutivos (Olsén et al., 2014; Pelli & Connaughton, 2015; Calvo, 2016; Saaristo et al., 2017; Mohan & Arasi, 2023). No entanto, poucos exploraram diretamente o impacto de substâncias no desenvolvimento do comportamento tipo-ansiedade em guppies desde as primeiras fases da vida.

Dada esta lacuna, e com o objetivo de reforçar a validade dos guppies em estudos de desenvolvimento, esta pesquisa tem como objetivo avaliar os efeitos agudos do álcool e da cafeína no comportamento ansioso em guppies nos estágios larval, juvenil e adulto usando o teste do labirinto em cruz com rampa (LCR) validado para peixes adultos (Walsh-Monteiro et al., 2016; 2021) e o LRC adaptado para larvas e juvenis (Carvalho et al., 2024).

Este estudo busca contribuir ao trazer uma visão a mais de possíveis mecanismos do neurodesenvolvimento envolvidos na manifestação do comportamento tipo-ansiedade desde os primeiros momentos da vida, estabelecendo o guppy como uma espécie modelo alternativa para futuras investigações sobre os transtornos de ansiedade.

5.2 Métodos

5.2.1 SUJEITOS

Para este estudo, foram utilizados um total de 336 guppies, incluindo larvas de 7 dias de idade, juvenis de 28 dias de idade e adultos de aproximadamente 1 ano de idade, sendo esses últimos separados por sexo. Considerando que nos estágios iniciais de vida (larval e juvenil), o sexo dos guppies ainda não está definido, e seus órgãos sexuais ainda estão em desenvolvimento, este estudo foi conduzido sem separar os sexos dos animais nos estágios larval e juvenil (Carvalho et al., 2024).

5.2.2 GRUPOS EXPERIMENTAIS

Foram formados sete grupos para cada faixa etária e sexo. Os sete grupos foram divididos da seguinte forma: três grupos para cada dose de álcool (Ethyl Alcohol P.A. Synth, Brasil; 0,5%, 1% e 2%); três grupos para cada dose de cafeína (Merck, EUA; 2,5, 5 e 10 mg); e um grupo controle. Cada grupo foi composto por 12 animais, totalizando 84 larvas de 7 dias de idade, 84 juvenis de 28 dias de idade, 84 adultos machos e 84 adultos fêmeas (Tabela 3).

Tabela 3. Distribuição dos grupos para análise dos efeitos de álcool e cafeína em guppies.

Grupos	Exposição farmacológica hídrica	Coluna d'água e Tempo de sessão
Larvas controle (n=12)	5 minutos	1,1cm-10minutos
Larvas Álcool 0,5% (n=12)		
Larvas Álcool 1% (n=12)		
Larvas Álcool 2% (n=12)		
Larvas Cafeína 2,5mg (n=12)		
Larvas Cafeína 5mg (n=12)		
Larvas Cafeína 10mg (n=12)		
Juvenis controle (n=12)		
Juvenis Álcool 0,5% (n=12)		
Juvenis Álcool 1% (n=12)	5 minutos	1,1cm-10minutos
Juvenis Álcool 2% (n=12)		
Juvenis Cafeína 2,5mg (n=12)		
Juvenis Cafeína 5mg (n=12)		
Juvenis Cafeína 10mg (n=12)		
Machos controle (n=12)	5 minutos	8cm-5minutos
Machos Álcool 0,5% (n=12)		
Machos Álcool 1% (n=12)		
Machos Álcool 2% (n=12)		
Machos Cafeína 2,5mg (n=12)		
Machos Cafeína 5mg (n=12)		
Machos Cafeína 10mg (n=12)		
Fêmeas controle (n=12)	5 minutos	8cm-5minutos
Fêmeas Álcool 0,5% (n=12)		
Fêmeas Álcool 1% (n=12)		
Fêmeas Álcool 2% (n=12)		
Fêmeas Cafeína 2,5mg (n=12)		
Fêmeas Cafeína 5mg (n=12)		
Fêmeas Cafeína 10mg (n=12)		

5.2.2.1 Exposições farmacológicas

Os grupos foram expostos ao álcool ou cafeína diluídos em água (Magno et al., 2015).

As três concentrações de cada substância foram diluídas individualmente em 500 mL de água previamente tratada e filtrada em laboratório, utilizando um frasco reagente de vidro incolor.

O pH de cada solução foi então ajustado para $7 \pm 0,2$, e a temperatura foi mantida em 27 ± 1 °C. Posteriormente, 200 mL de cada solução diluída foram transferidos para béqueres de vidro, onde os animais dos respectivos grupos foram colocados e expostos por 5 minutos.

As doses de álcool e cafeína foram ajustadas de acordo com o peso e tamanho dos animais, garantindo que as concentrações utilizadas em cada faixa etária fossem proporcionais às suas características físicas. Isso permitiu uma comparação adequada dos efeitos das substâncias em diferentes estágios de desenvolvimento, considerando as variações no tamanho corporal entre as fases.

5.3 Resultados

5.3.1 EFEITOS DO ÁLCOOL

As exposições alcoólicas nas larvas apresentaram diferenças quanto ao tempo de permanência nos braços planos [$H(3,44)=20,398$; $p<0,001$] e com rampas [$H(3,44)=27,942$; $p<0,001$] entre os diferentes grupos tratados. O pós-teste indicou diferenças para o grupo tratado com 2% de álcool, mostrando que os animais que receberam essa dose passaram significativamente menos tempo nos braços planos e braços com rampa em comparação a todos os grupos para o tempo no plano ($p<0,05$) e para os grupos 0.5% e 1% nas rampas ($p<0,05$). Nenhuma diferença foi encontrada no tempo de permanência no centro (Figura 8A).

Para o número de entradas nos braços, os resultados mostraram diferenças entre os grupos de tratamento para as entradas nos planos [$H(3,44)=30,693$; $p<0,001$] e com rampas [$H(3,44)=33,802$; $p<0,001$]. O pós-teste indicou que o grupo tratado com 2% teve um menor número de entradas nos braços planos e braços com rampa comparado aos demais grupos de tratamento e com o grupo controle ($p<0,05$). O grupo tratado com 1% entrou mais vezes nas

rampas comparado o grupo tratado com a dose de 2%, e com o grupo controle ($p<0,05$) (Figura 8B).

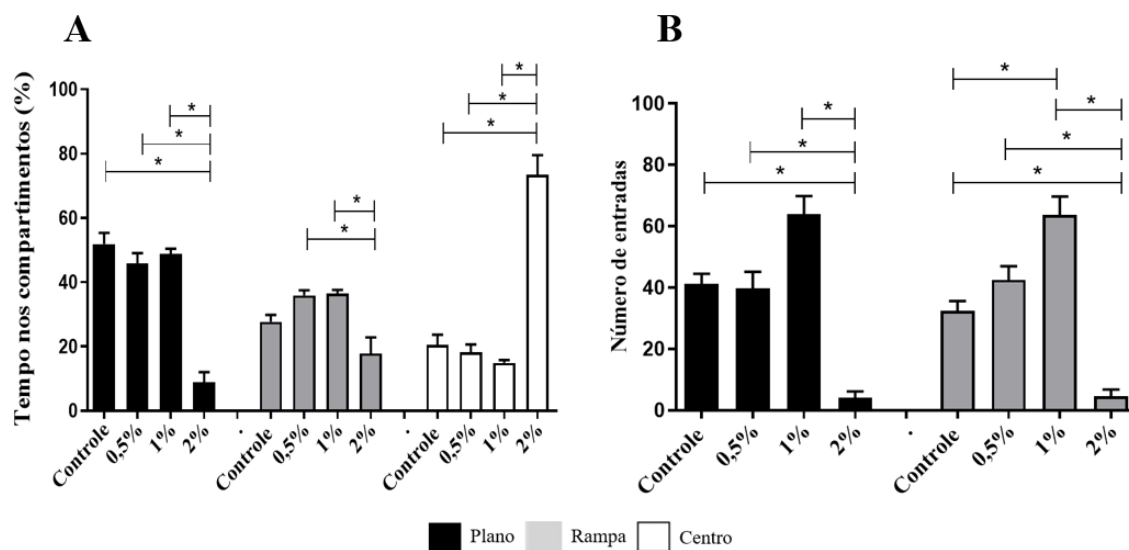


Figura 8. Larvas de guppies expostas ao álcool (A) porcentagem de tempo gasto em cada compartimento. (B) Número de entradas em cada compartimento. Diferenças estatísticas significativas são apresentadas por símbolos entre os grupos (* $p<0,05$).

As exposições alcoólicas nos juvenis revelaram diferenças quanto ao tempo de permanência nos braços planos [$F(3,44)=226,941$; $p<0,001$], com rampas [$H(3,44)=29,674$; $p<0,001$] e compartimento central [$H(3,44)=26,600$; $p<0,001$] entre os diferentes grupos tratados com álcool. O resultado do pós-teste revelou um menor tempo de permanência no plano para o grupo tratado com 2% comparado com os grupos 0,5%, 1% e grupo controle ($p<0,001$), além de também indicar para 2% um menor tempo gasto na rampa com relação ao grupo 1% e controle ($p<0,05$). Ainda, o pós-teste relevou que o grupo que recebeu o tratamento com a dose de 0.5% passou mais tempo nos braços planos ($p=0,042$) e menos tempo nos braços com rampa ($p<0,05$) comparado com o grupo controle (Figura 9A).

Quanto ao tempo de permanência no centro, o pós-teste indicou um maior tempo gasto para o grupo que recebeu o tratamento com a dose de 2% comparada com todos os outros grupos ($p<0,05$) (Figura 9A).

Com relação ao número de entradas nos braços, os juvenis tratados com o álcool apresentaram diferenças para as entradas nos braços planos [$H(3,44)=30,663$; $p<0,001$] e braços com rampas [$H(3,44)=28,790$; $p<0,001$]. O pós-teste indicou uma redução significativa no número de transposições, tanto nos braços planos quanto nas rampas, para o grupo que recebeu o tratamento com a dose de 2% comparado com os demais grupos de tratamento e grupo controle ($p<0,05$) (Figura 9B).

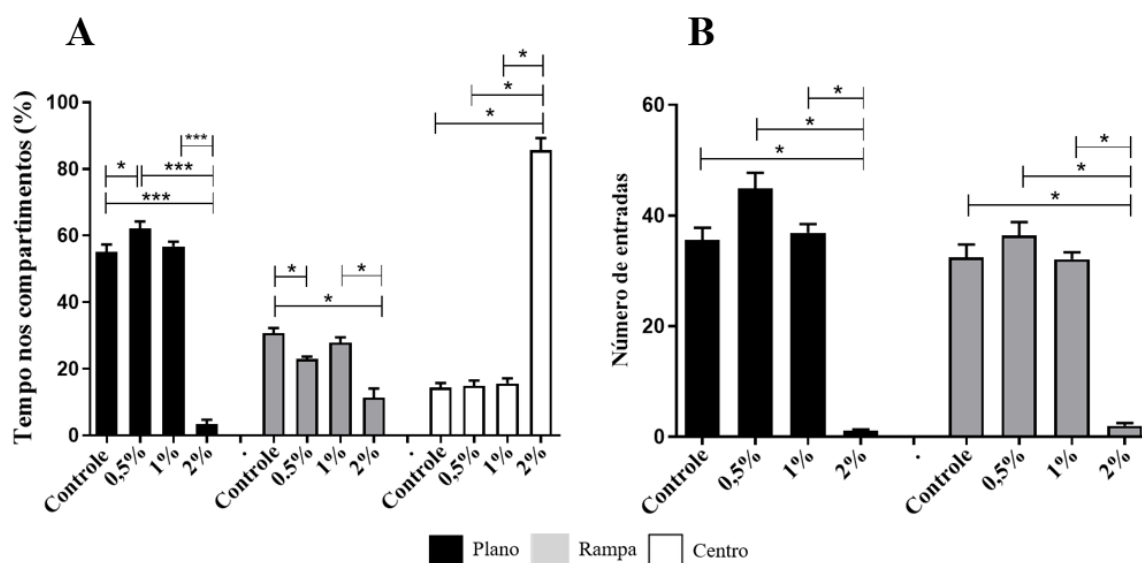


Figura 9. Guppies juvenis expostos ao álcool (A) porcentagem de tempo gasto em cada compartimento. (B) Número de entradas em cada compartimento. Diferenças estatísticas significativas são apresentadas por símbolos entre os grupos (* $p<0,05$, *** $p<0,001$).

As exposições ao álcool em guppies machos adultos não revelaram diferenças quanto ao tempo gasto nos braços planos, braços com rampa e centro (Figura 10A). Entretanto, quanto ao número de entradas, foram encontradas diferenças para o número de transposições nos braços planos [$H(3,44)=18,725$; $p<0,001$] e braços com rampa [$H(3,44)=18,354$; $p<0,001$]. O pós-teste indicou redução no número das entradas nos braços planos e com rampas dos grupos 0,5% e 1% comparados com o grupo controle ($p<0,05$). O grupo que recebeu a dose de 2% apresentou um maior número de transposições nos planos e rampas apenas com relação ao grupo que recebeu a dose de 0,5% ($p<0,05$) (Figura 10B).

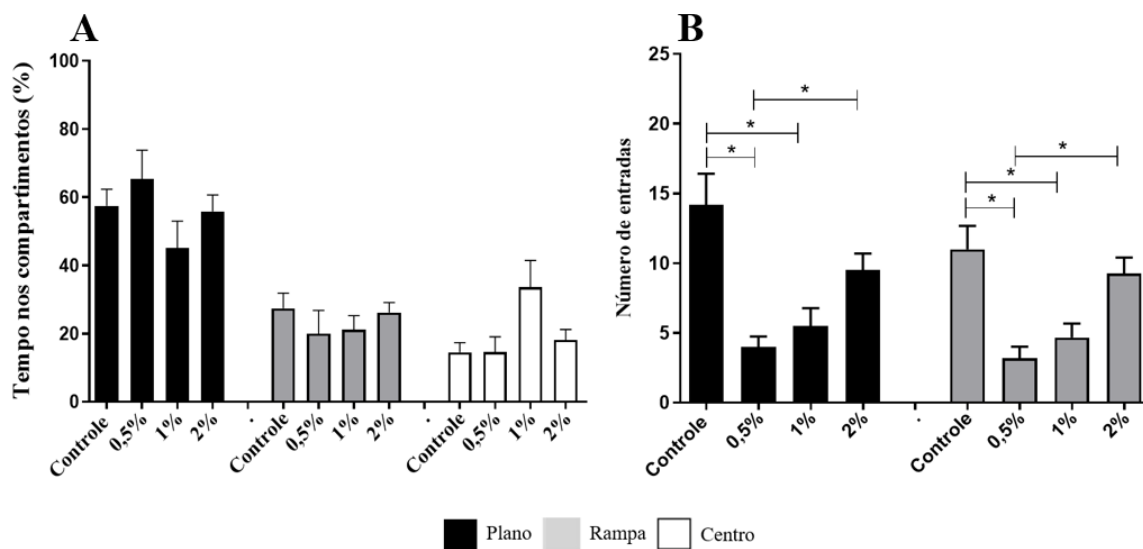


Figura 10. Guppies machos expostos ao álcool (A) porcentagem de tempo gasto em cada compartimento. (B) Número de entradas em cada compartimento. Diferenças estatísticas significativas são representadas por símbolos entre os grupos (* $p < 0,05$).

As fêmeas de guppies tratadas com álcool também não apresentaram diferenças quanto ao tempo de permanência nos braços planos, braços com rampa e centro (Figura 11A). Entretanto, para o número de entradas nos braços foram encontradas diferenças quanto ao número de passagens para os braços planos [$F(3,44) = 15,688$; $p < 0,001$] e braços com rampa [$H(3,44) = 9,607$; $p = 0,022$] (Figura 11B).

O pós-teste indicou que, comparado ao grupo controle, os grupos que receberam as diferentes concentrações alcoólicas apresentaram redução quanto ao número de entradas nos braços planos, respectivamente: controle e 0,5% ($p = 0,034$), controle e 1% ($p < 0,001$) e controle e 2% ($p < 0,001$). Comparados também a dose de 0,5% os grupos 1% ($p = 0,011$) e 2% ($p = 0,046$) apresentaram um menor número de entradas. Quanto as entradas nos braços com rampa, apenas uma redução no número de entradas para o grupo 1% comparado ao grupo controle foi observada ($p < 0,05$) (Figura 11B).

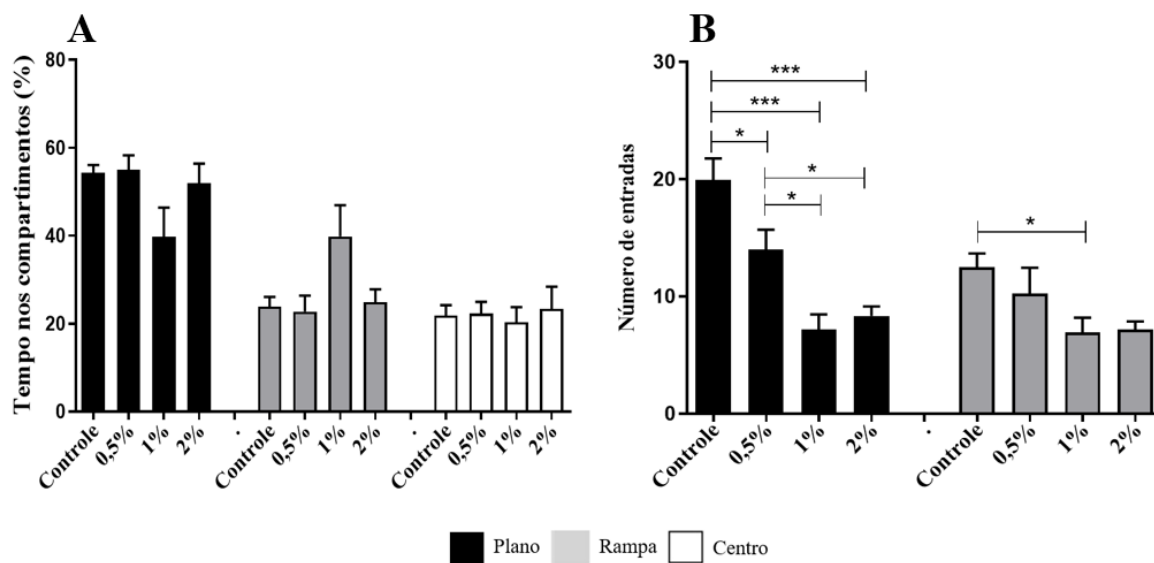


Figura 11. Guppies fêmeas expostas ao álcool (A) porcentagem de tempo gasto em cada compartimento. (B) Número de entradas em cada compartimento. Diferenças estatísticas significativas são representadas por símbolos entre os grupos (* $p<0,05$, *** $p<0,001$).

5.3.2 EFEITOS DA CAFEÍNA

Os resultados do tratamento das larvas a cafeína não mostraram diferenças quanto ao tempo gasto nos braços planos e braços com rampa do labirinto. Contudo, foram encontradas diferenças quanto ao tempo gasto no compartimento central [$H(3,44)=20,453$; $p<0,001$], indicando no pós-teste uma redução do tempo gasto no centro para o grupo que recebeu a dose de 5mg comparada com o grupo de 2,5mg, 10mg e grupo controle ($p<0,05$) (Figura 12A).

Não houve diferenças quanto ao número de entradas nos braços para as larvas expostas a cafeína (Figura 12B).

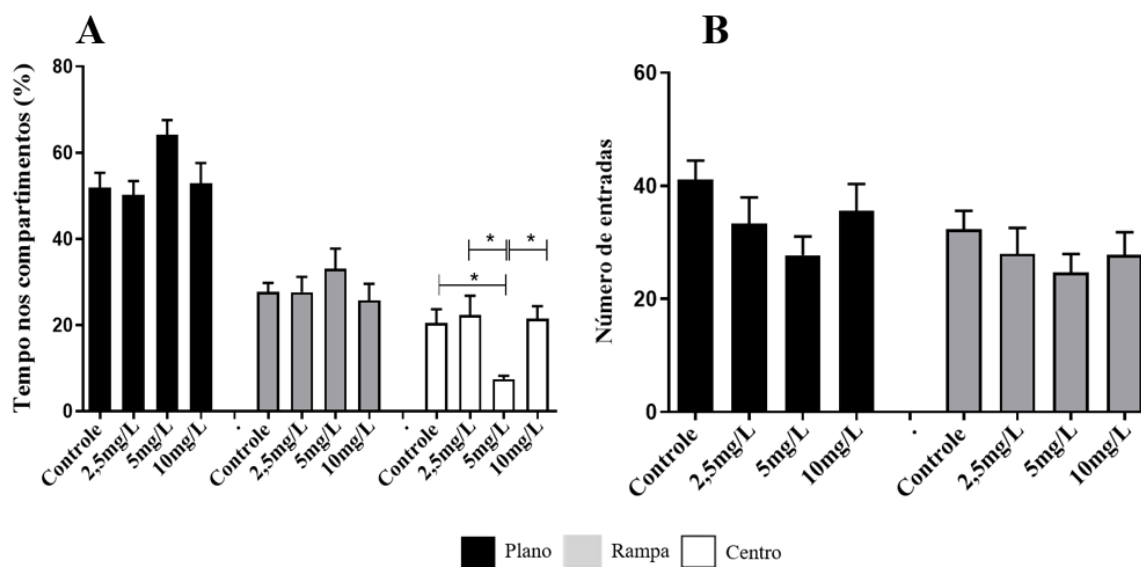


Figura 12. Larvas de guppies expostas à cafeína (A) porcentagem de tempo gasto em cada compartimento. (B) Número de entradas em cada compartimento. Diferenças estatísticas significativas são apresentadas por símbolos entre os grupos (* $p < 0,05$).

Os resultados dos juvenis expostos a cafeína apresentaram diferenças quanto ao tempo de permanência nos braços planos [$H(3,44)=36,571$; $p < 0,001$], braços com rampa [$H(3,44)=37,076$; $p < 0,001$] e centro [$H(3,44)=11,716$; $p = 0,008$]. No pós-teste foi observado um maior tempo de permanência nos braços planos para o grupo que recebeu o tratamento da dose de 10mg comparado com o grupo controle ($p < 0,05$) e o grupo que recebeu a dose de 2,5mg ($p < 0,05$). O grupo tratado com 5mg apresentou um maior tempo de permanência nos braços planos apenas comparado com o grupo 2,5mg ($p < 0,05$) (Figura 13A).

Quanto ao tempo de permanência nos braços com rampa, o pós-teste mostrou que os juvenis tratados com a dose de 10mg apresentaram um menor tempo nesses quando comparadas com o grupo controle ($p < 0,05$) e com o grupo que recebeu a dose de 2,5mg ($p < 0,05$), esse último também apresentou um maior tempo gasto nas rampas com relação ao grupo 5mg ($p < 0,05$). Já o tempo gasto no compartimento central, foi observado um menor tempo gasto para os juvenis tratados com 10mg comparados com o grupo controle e com o grupo tratado com 5mg ($p < 0,05$) (Figura 13A).

Para o número de entradas nos braços, o pós-teste mostrou um maior número de transposições nos braços planos e braços com rampa para os juvenis que receberam a dose de 2,5mg comparados com todos os grupos de tratamento e controle ($p<0,05$). O aumento no número de entradas nos braços observado para a dose de 2.5mg foi seguido de uma diminuição para o grupo controle, para o grupo de 5mg e um número ainda menor para o grupo de 10mg ($p<0,05$). Em ambos os braços, o grupo que recebeu o tratamento com a dose de 10mg de cafeína apresentou um menor número de passagens comparado com o grupo controle ($p<0,05$) (Figura 13B).

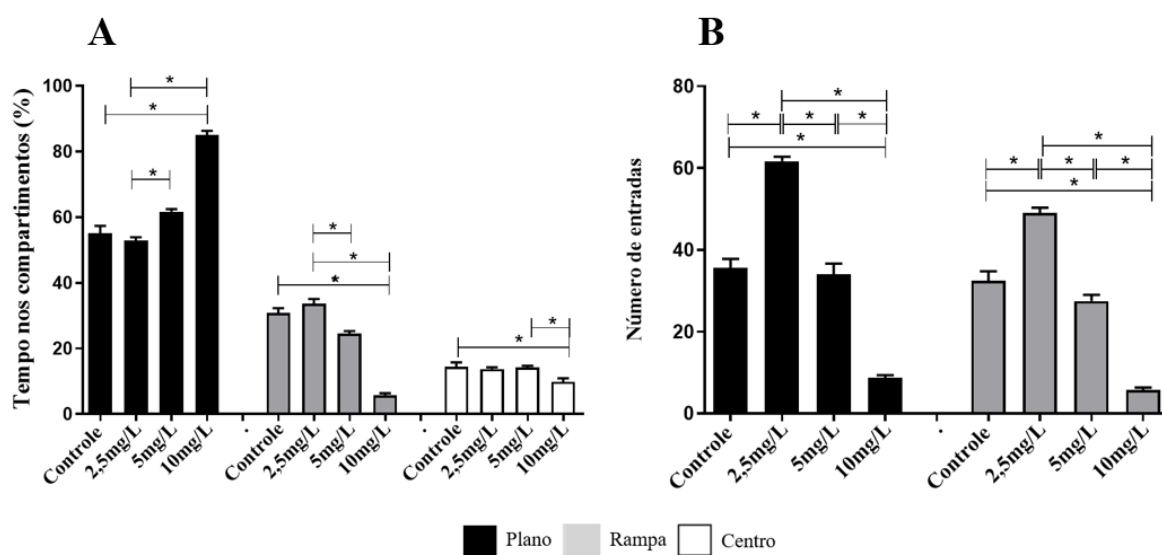


Figura 13. Guppies juvenis expostos à cafeína. (A) porcentagem de tempo gasto em cada compartimento. (B) Número de entradas em cada compartimento. Diferenças estatísticas significativas são representadas por símbolos entre os grupos (* $p<0,05$).

Os resultados referentes ao tempo de permanência dos compartimentos do PMR para machos adultos não apresentaram diferenças significantes (Figura 14A). Contudo, quanto ao número de entradas, somente nas entradas nos braços planos foram encontradas diferenças [$H(3,44)=13,224$; $p=0,004$]. O pós-teste indicou que apenas os grupos tratados com cafeína nas doses de 5mg e 10mg apresentaram redução no número de entradas nos braços planos quando

comparados com o grupo controle ($p < 0,05$). Não foram encontradas diferenças com relação ao número de entradas nas rampas (Figura 14B).

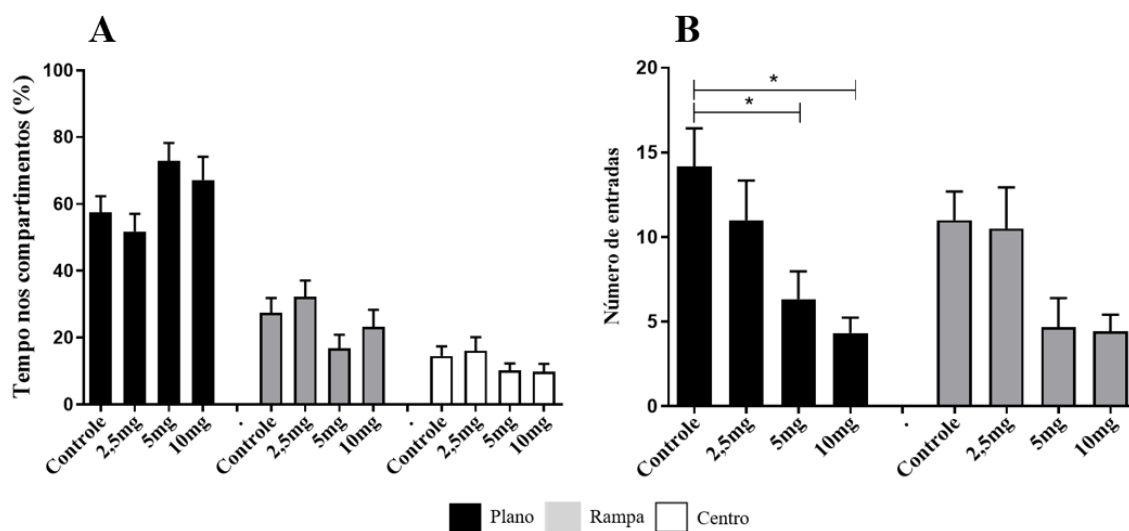


Figura 14. Guppies machos expostos à cafeína. (A) porcentagem de tempo gasto em cada compartimento. (B) Número de entradas em cada compartimento. Diferenças estatísticas significativas são representadas por símbolos entre os grupos (* $p < 0,05$).

Paras as fêmeas, as diferenças encontradas no tempo de permanência nos compartimentos foram apenas em relação ao tempo gasto nos braços planos [$H(3,44)=10,607$; $p=0,014$], e no centro [$F(3,44)=4,631$; $p < 0,007$]. Nas rampas não foram encontradas diferenças significativas. O pós-teste indicou um aumento no tempo de permanência nos braços planos para os grupos tratados com as doses de 2,5mg e 5mg comparadas com o grupo controle ($p=0,013$). Para o tempo no centro, foram observadas apenas para esses mesmos grupos tratados, uma redução no tempo de permanência comparado com o grupo controle ($p=0,016$) (Figura 15A).

Quanto ao número de entradas, as fêmeas tratadas com cafeína apresentaram diferenças para número de passagens nos braços planos [$F(3,44)=8,172$; $p < 0,001$] e nos braços com rampa [$F(3,44)=3,85$; $p < 0,016$]. O pós teste mostrou que comparados ao grupo controle, os grupos tratados com cafeína apresentaram redução no número de transposições, respectivamente:

controle e 2,5mg ($p<0,001$), controle e 5mg ($p=0,004$) e controle e 10mg ($p<0,001$). Para as entradas nas rampas, foram observadas comparadas ao grupo controle, redução no número de entradas para os grupos 2,5mg ($p=0,028$) e 10mg ($p=0,038$) (Figura 15B).

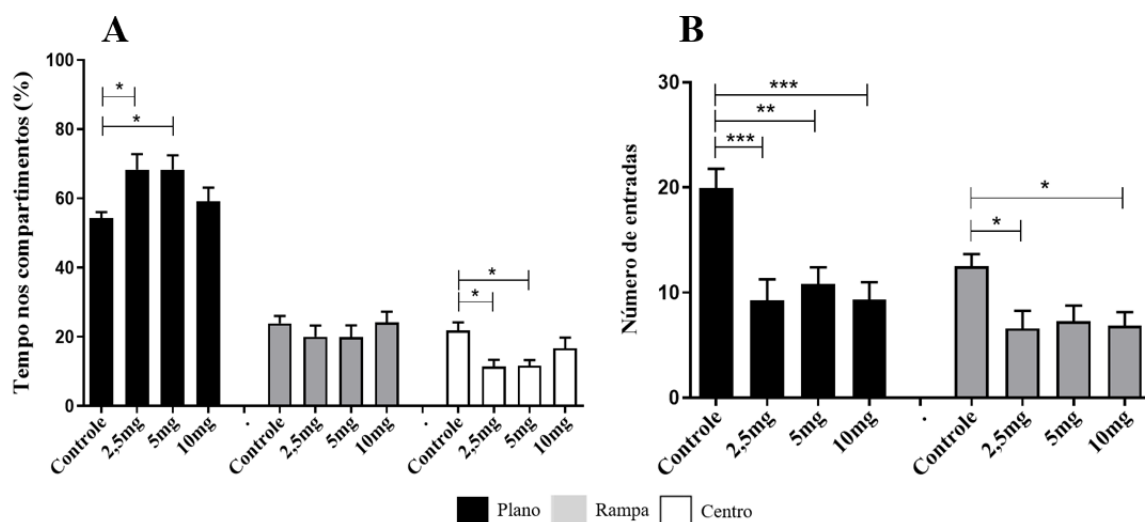


Figura 15. Guppies fêmeas expostas à cafeína. (A) porcentagem de tempo gasto em cada compartimento. (B) Número de entradas em cada compartimento. Diferenças estatísticas significativas são representadas por símbolos entre os grupos (* $p<0,05$; ** $p<0,01$; *** $p<0,001$).

5.4 Discussão

5.4.1 EFEITOS DO ÁLCOOL

Nossos resultados mostraram que doses menores de álcool induziram uma resposta desinibida em larvas e juvenis no LCR, demonstrada pelo aumento do tempo gasto em braços de rampa em comparação aos braços planos. Esse padrão comportamental exibido no labirinto sugere que em doses menores, o álcool tem um efeito estimulante na exploração ambiental, com um efeito ansiolítico aparente (Zhang et al., 2007).

Especificamente em larvas, observamos que a dose de 1% teve a influência mais significativa na atividade locomotora, com um maior número de transições entre os braços, favorecendo as rampas. Em juvenis, a dose de 0,5% resultou em um maior número de cruzamentos entre os braços e, à medida que as doses aumentaram, o número dessas transições diminuiu. Esses resultados são como estudos que mostram que em roedores, o efeito inicial do álcool causa uma maior propensão à exploração e menos aversão no teste do labirinto em cruz elevado (LCE) (Prediger et al., 2004; Zhang et al., 2007; Bahi, 2013).

Pellow et al. (1985) indicam que o aumento da exploração nos braços mais aversivos do LCE estaria associado à redução dos níveis de ansiedade em roedores. Comparando os resultados obtidos em larvas e guppies juvenis quanto ao tempo e número de entradas nas rampas do LCR, nota-se que o álcool causou um efeito desinibido em concentrações mais baixas, enquanto em concentrações mais altas resultou em uma redução no tempo gasto e nas entradas em geral.

O efeito desinibido causado pelo álcool em concentrações mais baixas observado em larvas e juvenis, sugere que as vias GABAérgicas podem estar se desenvolvendo nessas idades. Considerando que o álcool atua como um agonista do receptor GABAA, intensificando a atividade inibitória, resultando em uma diminuição do comportamento ansioso. Em contraste, com o aumento das doses, a função glutamatérgica pode ter sido suprimida, potencializando os efeitos inibitórios em animais, levando a um efeito depressor na dose de 2% (Araujo-Silva et al., 2018; Clayman & Connaughton, 2022).

Os grupos expostos a 2% passaram a maior parte do experimento no centro do labirinto, sugerindo perda de percepção ambiental, indicando um efeito como intoxicação. Esses efeitos observados são característicos de exposições ao álcool em animais submetidos a estudos comportamentais relacionados à ansiedade: o comportamento exploratório aumenta até uma

dose intermediária e depois diminui, indicando intoxicação (Rico et al., 2007; Araújo-Silva et al., 2018).

Em guppies adultos, não foram encontradas diferenças no tempo gasto nos compartimentos LCR para as doses administradas, possivelmente devido à maturidade dos animais e maior tolerância ao álcool (Walsh-Monteiro et al., 2021). No entanto, machos e fêmeas exibiram apenas respostas locomotoras, evidenciadas pelo número de entradas nos braços (Figuras 4 e 5).

Observamos que para os machos, o número de entradas aumentou conforme a concentração de álcool aumentou, enquanto para as fêmeas, ocorreu o oposto, com menos cruzamentos em doses mais altas. Esse dimorfismo comportamental sugere que a resposta ao álcool também é dependente do sexo, onde o aumento da concentração de álcool resultou em maior deambulação nos machos, enquanto nas fêmeas, a resposta motora foi inversamente afetada, diminuindo com o aumento da dose.

Essa diferença sexual no comportamento é justificada pela ecologia dos guppies, onde os machos assumem o papel de exploradores enquanto as fêmeas permanecem mais associadas ao fundo e ao habitat. Assim, os machos são mais propensos a explorar o ambiente em busca de parceiros e recursos, incluindo áreas próximas à superfície (Walsh-Monteiro et al., 2021).

Estudos que investigam os efeitos específicos do álcool no comportamento em modelos de peixes e roedores sugerem que em cada via, o mecanismo de ação pode depender da idade, linhagem, sexo, concentração administrada e tempo (Clayman & Connaughton, 2022; Montalbano et al., 2023). Apesar do curto tempo de vida e desenvolvimento contínuo, os guppies naturalmente apresentam comportamentos de evitação de risco em relação ao novo ambiente (neofobia), manifestando uma tendência à autopreservação (Walsh-Monteiro et al., 2021; Carvalho et al., 2024).

Esses comportamentos proporcionam vantagens adaptativas para a sobrevivência de uma espécie, principalmente durante os estágios iniciais de desenvolvimento, apresentando-se como um mecanismo conservado entre os vertebrados (Clayman & Connaughton, 2022; Montalbano et al., 2023). Esses dados sugerem que o álcool foi capaz de interferir nos mecanismos de avaliação de risco e autopreservação de guppies larvais e juvenis, comprometendo sua capacidade de responder adequadamente ao estímulo aversivo induzido pelo LCR (Carvalho et al., 2024), indicando que nessas fases o sistema nervoso é mais sensível à substância.

Esses dados corroboram o entendimento de como o uso/abuso de bebidas alcoólicas por crianças ou adolescentes pode ser prejudicial ao desenvolvimento e maturação do sistema nervoso, uma vez que nessas fases da vida o cérebro ainda está em processo de maturação, principalmente nas regiões envolvidas no controle de impulsos, tomada de decisão e processamento de recompensas, como o córtex pré-frontal (Károly et al., 2024).

Essa imaturidade torna esses indivíduos mais vulneráveis aos efeitos do álcool, pois apresentam menor capacidade de regular comportamentos impulsivos e resistir às pressões sociais para consumir essas substâncias (Lees et al., 2020).

5.4.2 EFEITOS DA CAFEÍNA

Em larvas, os grupos tratados com diferentes doses de cafeína não apresentaram diferenças no tempo gasto nos braços planos ou nos braços de rampa. As diferenças observadas foram limitadas ao tempo gasto no centro do labirinto, sem impacto no número de entradas e sem efeitos aparentes no comportamento do tipo ansiedade (Figura 6). Em guppies juvenis, no entanto, encontramos diferenças quanto ao tempo gasto nos braços e no compartimento central (Figura 7A).

Os juvenis expostos a doses maiores de cafeína mostraram preferência pelos braços planos, enquanto aqueles expostos a doses menores preferiram os braços de rampa. Esses resultados indicam um efeito ansiogênico dose-dependente da cafeína manifestado no LCR, onde sob o efeito estimulante, esses animais passam mais tempo no ambiente considerado mais aversivo (rampas). Com o aumento da dose, o comportamento ansiogênico foi manifestado, onde eles tenderam a evitar esses espaços (Figura 7A).

Combinados com a análise do número de entradas nos braços, nossos resultados revelaram que os juvenis que receberam a maior dose de cafeína (10 mg) tiveram sua atividade locomotora significativamente reduzida, permanecendo principalmente nos braços planos. Em contraste, nos grupos que receberam doses intermediárias (5 mg) e menores (2,5 mg), os animais não apenas passaram mais tempo nas rampas, mas também exploraram mais (Figuras 7AB).

Como antagonista da adenosina, a cafeína impede que o neurotransmissor se ligue aos seus receptores (A1 e A2A, principalmente) e, assim, o efeito sedativo típico não ocorre, levando o animal a ficar mais estimulado (Ruiz-Medina et al., 2013; Neri et al., 2019). Esse bloqueio adenosinérgico induzido pela cafeína aumenta a liberação de dopamina no córtex pré-frontal de humanos e ratos (Clayman & Connaughton, 2022; Harada et al., 2022; Li et al., 2024), o que causa o efeito estimulante da droga.

Em altas doses, a cafeína exibe um aumento na resposta ansiosa, observada no aumento do tempo gasto nos braços planos do labirinto, como o que ocorre em ratos que passam mais tempo nos braços fechados do LCE (Lister, 1990). Essa resposta ansiogênica também é identificada em *zebrafish* testados no aquário claro-escuro (Maximino et al., 2011) e no teste de tanque novo (Egan et al., 2009).

Embora o comportamento de "*freezing*" não tenha sido um parâmetro analisado neste estudo, o efeito observado para a dose mais alta se assemelha a esse fenômeno, comum em

peixes que permanecem parados no fundo do aquário ou em áreas mais escuras quando estão em um estado semelhante ao medo (Sourisse et al., 2023; Pintos et al., 2023). Roedores expostos ao LCE também apresentam uma resposta semelhante, passando mais tempo nos braços fechados e mostrando atividade locomotora reduzida (Hilton et al., 2023). Esses achados corroboram nossos resultados, onde os juvenis expostos à dose de 10 mg exibiram uma resposta mais pronunciada do tipo ansiedade

Em animais adultos (Figuras 8 e 9), a exposição à cafeína resultou em uma redução significativa na atividade locomotora em machos e fêmeas, independentemente da dose administrada. No entanto, um aumento no tempo gasto nos braços planos do labirinto foi observado em fêmeas, sugerindo uma possível diferença na sensibilidade ao estímulo entre os sexos, como o que foi observado nos resultados encontrados com álcool.

Essas descobertas indicam que a cafeína exerce efeitos complexos e dependentes da dose em comportamentos locomotores e de ansiedade em guppies, com respostas variando de acordo com o estágio de desenvolvimento e sexo dos animais. Enquanto as larvas não exibiram modulação específica do comportamento tipo-ansiedade, os juvenis exibiram o comportamento de forma mais proeminente nas doses usadas neste estudo. Em adultos, uma redução na atividade locomotora foi observada, particularmente em fêmeas, que mostraram maior sensibilidade ao estímulo em termos de tempo gasto nos braços abertos.

Esses resultados destacam a importância de considerar o estágio de desenvolvimento e o sexo ao avaliar os efeitos de substâncias psicoativas e sugerem que os circuitos neurais associados ao comportamento semelhante à ansiedade podem ser funcionalmente imaturos durante os primeiros estágios da vida (Trindade et al., 2024).

A dependência da dose dos efeitos ressalta a relevância de parâmetros experimentais precisos em estudos farmacológicos. Finalmente, a validação de guppies como um modelo

animal para investigar diferenças inter-idade e intersexo no comportamento semelhante à ansiedade aumenta seu potencial para pesquisa neurobiológica e translacional.

5.5 Conclusão

Este estudo investigou os efeitos do álcool e da cafeína no comportamento ansioso em diferentes estágios de desenvolvimento de guppies usando o teste do labirinto em cruz com rampa. Nossos resultados complementam a validade preditiva do modelo na avaliação dos efeitos farmacológicos dessas duas substâncias sobre comportamento ansioso (Carvalho et al., 2024).

O uso de guppies em pesquisas oferece vantagens não apenas pelo fácil manuseio e baixo custo, mas também porque, ao longo do desenvolvimento — da fase larval até a fase adulta — os guppies apresentam mudanças significativas na organização do circuito neural, como a maturação das vias GABAérgica e dopaminérgica, que estão envolvidas na modulação de respostas comportamentais associadas à ansiedade, conservadas entre mamíferos, incluindo humanos (Araujo-Silva et al., 2018; Clayman & Connaughton, 2022).

Essas características permitiram explorar o impacto de substâncias psicotrópicas, como álcool e cafeína, em diferentes estágios de maturação do sistema nervoso em uma espécie modelo de fácil manuseio e rápido desenvolvimento, ao mesmo tempo em que examinam potenciais diferenças relacionadas ao sexo na idade adulta.

Tanto o álcool quanto a cafeína modularam respostas comportamentais associadas ao comportamento tipo-ansiedade em guppies dentro do teste LCR, destacando a importância de considerar a dose e o estágio de desenvolvimento ao avaliar seus efeitos, uma vez que os efeitos variam de acordo com a idade. O álcool causou um efeito inicial sugestivo de propriedades ansiolíticas, causando maior desinibição e em altas doses causou um estado depressivo como

embriaguez em larvas e juvenis. A cafeína em baixas doses causou um efeito estimulante e em altas doses um efeito ansiogênico foi observado mais evidente apenas em juvenis.

Esses achados fornecem novos dados para o estudo do desenvolvimento usando guppies, mostrando que durante o estágio larval, os guppies apresentam respostas menos definidas aos efeitos da cafeína, sugerindo que os circuitos neurais associados ao mecanismo de ação da substância ainda são funcionalmente imaturos.

Por outro lado, entre 2-3 semanas após o nascimento, quando os guppies são juvenis, já é possível observar comportamentos mais complexos, como a escolha de locais mais seguros (Savaşçı et al., 2021), mesmo sob o efeito da cafeína, o que indica progresso na maturação do sistema nervoso e respostas comportamentais mais evidentes aos efeitos das concentrações desta substância.

Na fase adulta, os animais apresentam um sistema nervoso maduro, e o álcool e a cafeína não apresentam efeitos significativos na resposta de ansiedade, apenas na locomoção, sugerindo que a sensibilidade dos guppies a essas substâncias pode mudar com a maturação completa do sistema nervoso, exigindo novas abordagens experimentais, como ajustes nas concentrações testadas, para elucidar completamente os mecanismos envolvidos.

Em resumo, este estudo forneceu novas evidências que reforçam e ampliam a validação dos guppies como um modelo translacional para estudos de farmacologia neurodesenvolvimental e comportamental, destacando sua utilidade na investigação de alterações comportamentais induzidas por substâncias psicoativas em diferentes estágios de maturação neural.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Nos dois estudos desta pesquisa, as análises paramétricas no Labirinto em Cruz com Rampa (LCR) de larvas e juvenis de guppies e análise do efeito de drogas indicam a espécie como um modelo alternativo válido para a pesquisa sobre o desenvolvimento e comportamento durante os primeiros estágios de vida.

A metodologia ajustada, baseou-se nos protocolos de Walsh-Monteiro et al. (2016; 2021) para *zebrafish* e guppies adultos, essenciais para garantir a precisão dos dados, considerando as adaptações no tamanho do aparato, altura da coluna d'água e duração das sessões de teste. Essas adequações permitiram a mensuração das características comportamentais associadas à ansiedade em larvas e juvenis de guppies.

Os resultados mostraram que as larvas e juvenis expostos ao LCR manifestaram preferência pelos braços planos, em comparação aos braços com rampas, os quais representaram o ambiente mais aversivo. A escolha por áreas mais seguras sugere que os guppies apresentam comportamentos compatíveis com os de estudos anteriores com larvas de *zebrafish* (Colwill & Creton, 2011; Richendrfer et al., 2012; Lopez-Luna et al., 2017; Varga et al., 2018), indicando que comportamentos relacionados à segurança e à evasão de áreas aversivas podem ser usados para estudar o desenvolvimento e a manifestação precoce de respostas comportamentais semelhantes à ansiedade.

A consistência desses achados, com os estudos de Walsh-Monteiro et al. (2016; 2021), indica que o LCR adaptado para larvas e juvenis é uma ferramenta válida para indução e análise de comportamentos relacionados à ansiedade em modelos de peixes em estágios iniciais de desenvolvimento. Além disso, a resposta semelhante à ansiedade observada em larvas e juvenis de Guppy é comparável aos comportamentos dos peixes adultos, sugerindo que o desenvolvimento precoce não altera significativamente o padrão de resposta ansiosa, mantendo

uma tendência inata para a escolha de ambientes mais seguros desde as fases iniciais, o que sugere a conservação dos mecanismos fisiológicos e comportamentais até a idade adulta.

Em síntese, os resultados desta pesquisa apontam que larvas e juvenis de guppies apresentam respostas comportamentais consistentes com o comportamento ansioso, e que podem ser moduladas por fatores ambientais e substâncias químicas de maneira similar a outros modelos de desenvolvimento. O LCR se mostrou uma ferramenta válida para análise do comportamento tipo-ansioso nas diferentes etapas de vida em guppies, contribuindo para novos achados sobre a conservação e a gênese dessa resposta.

REFERÊNCIAS

- Abrams, J. K., Johnson, P. L., Hay-Schmidt, A., Mikkelsen, J. D., Shekhar, A., & Lowry, C. A. (2005). Serotonergic systems associated with arousal and vigilance behaviors following administration of anxiogenic drugs. *Neuroscience*, 133(4), 983–997. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2005.03.025>
- Achterberg, E. J. M., & Vanderschuren, L. J. M. J. (2023). The neurobiology of social play behaviour: Past, present and future. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 152, Article 105319. <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2023.105319>
- Ali, S., Champagne, D. L., Spalink, H. P., & Richardson, M. K. (2011). Zebrafish embryos and larvae: a new generation of disease models and drug screens. *Birth Defects Research Part C: Embryo Today: Reviews*, 93(2), 115-133.
- Alia, A. O., & Petrunich-Rutherford, M. L. (2019). Anxiety-like behavior and whole-body cortisol responses to components of energy drinks in zebrafish (*Danio rerio*). *PeerJ*, 7, e7546. <https://doi.org/10.7717/peerj.7546>
- Anseloni, V. Z., & Brandão, M. L. (1997). Ethopharmacological analysis of behaviour of rats using variations of the elevated plus-maze. *Behavioural pharmacology*, 8(6-7), 533–540. <https://doi.org/10.1097/00008877-19971000-00011>
- Aquino, S., Kumar, A., Riordan, B., & Callinan, S. (2024). Long-term effects of alcohol consumption on anxiety in adults: A systematic review. *Addictive Behaviors*, 155, 108047. <https://doi.org/10.1016/j.addbeh.2024.108047>
- Araujo-Silva, H., Pinheiro-da-Silva, J., Silva, P. F., & Luchiari, A. C. (2018). Individual differences in response to alcohol exposure in zebrafish (*Danio rerio*). *PLOS ONE*, 13(6), e0198856. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0198856>

- Bahi, A. (2013). Individual differences in elevated plus-maze exploration predicted higher ethanol consumption and preference in outbred mice. *Pharmacology, Biochemistry, and Behavior*, 105, 83–88. <https://doi.org/10.1016/j.pbb.2013.01.023>
- Basnet, R. M., Zizioli, D., Taweedet, S., Finazzi, D., & Memo, M. (2019). Zebrafish Larvae as Behavioral Model in Neuropharmacology. *Biomedicines*, 7(1), Article 23. <https://doi.org/10.3390/biomedicines7010023>
- Belovicova, K., Bogi, E., Csatosova, K., & Dubovicky, M. (2017). Animal tests for anxiety-like and depression-like behavior in rats. *Interdisciplinary toxicology*, 10(1), 40–43. <https://doi.org/10.1515/intox-2017-0006>
- Belzung, C., & Lemoine, M. (2011). Criteria of validity for animal models of psychiatric disorders: focus on anxiety disorders and depression. *Biology of mood & anxiety disorders*, 1(1), 9. <https://doi.org/10.1186/2045-5380-1-9>
- Benistand, P., Vorilhon, P., Laporte, C., Bouillon-Minois, J. B., Brousse, G., Bagheri, R., Ugbohue, U. C., Baker, J. S., Flaudias, V., Mulliez, A., & Dutheil, F. (2022). Effect of the COVID-19 pandemic on the psychotropic drug consumption. *Frontiers in psychiatry*, 13, 1020023. <https://doi.org/10.3389/fpsy.2022.1020023>
- Benvenuti, R., Marcon, M., Gallas-Lopes, M., de Mello, A. J., Herrmann, A. P., & Piato, A. (2021). Swimming in the maze: An overview of maze apparatuses and protocols to assess zebrafish behavior. *Neuroscience and biobehavioral reviews*, 127, 761–778. <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2021.05.027>
- Beyer, J. E., & Laurence, G. C. (1980). A stochastic model of larval fish growth. *Ecological Modelling*, 8, 109-132.
- Blanchard, D. C., & Blanchard, R. J. (2008). Defensive behaviors, fear, and anxiety. In R. J. Blanchard, D. C. Blanchard, G. Griebel, & D. Nutt (Eds.), *Handbook of anxiety and fear* (pp. 63–79). *Elsevier Academic Press*. [https://doi.org/10.1016/S1569-7339\(07\)00005-7](https://doi.org/10.1016/S1569-7339(07)00005-7)

- Blanchard, R. J., Magee, L., Veniegas, R., & Blanchard, D. C. (1993). Alcohol and anxiety: Ethopharmacological approaches. *Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry*, 17(2), 171–182. [https://doi.org/10.1016/0278-5846\(93\)90041-p](https://doi.org/10.1016/0278-5846(93)90041-p)
- Blaser, R. E., & Rosemberg, D. B. (2012). Measures of anxiety in zebrafish (*Danio rerio*): dissociation of black/white preference and novel tank test. *PloS one*, 7(5), e36931. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0036931>
- Bondi, C. O., Barrera, G., Lapis, M. D., Bedard, T., Mahan, A., & Morilak, D. A. (2007). Noradrenergic facilitation of shock-probe defensive burying in lateral septum of rats, and modulation by chronic treatment with desipramine. *Progress in neuro-psychopharmacology & biological psychiatry*, 31(2), 482–495. <https://doi.org/10.1016/j.pnpbp.2006.11.015>
- Borsini, F., Podhorna, J., & Marazziti, D. (2002). Do animal models of anxiety predict anxiolytic-like effects of antidepressants?. *Psychopharmacology*, 163(2), 121–141. <https://doi.org/10.1007/s00213-002-1155-6>
- Boulay, J., Chaillou, E., Bertin, A., Constantin, P., Arnould, C., Leterrier, C., & Calandreau, L. (2013). A higher inherent trait for fearfulness is associated with increased anxiety-like behaviours and diazepam sensitivity in Japanese quail. *Behavioural Brain Research*, 237, 124–128. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2012.09.026>
- Bourin, M., & Hascoët, M. (2001). Drug mechanisms in anxiety. *Current opinion in investigational drugs* (London, England : 2000), 2(2), 259–265.
- Bovenkerk, B., & Kaldewaij, F. (2015). The use of animal models in behavioural neuroscience research. *Current Topics in Behavioral Neurosciences*, 19, 17–46. https://doi.org/10.1007/7854_2014_329
- Boyda, H. N., Tse, L., Procyshyn, R. M., Wong, D., Wu, T. K., Pang, C. C., & Barr, A. M. (2010). A parametric study of the acute effects of antipsychotic drugs on glucose sensitivity in an

- animal model. *Progress in neuro-psychopharmacology & biological psychiatry*, 34(6), 945–954. <https://doi.org/10.1016/j.pnpbp.2010.04.024>
- Braga, A. P. A., Souza, L. R. D., Lima, M. G. F., Cruz, J. M., Souza, A. C. Z. D., Costa, M. S., ... & Marin-Morales, M. A. (2024). The Zebrafish as an Alternative Animal Model for Ecotoxicological Research and Testing. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 67, e24220968. <https://doi.org/10.1590/1678-4324-2024220968>
- Brockway, D. F., & Crowley, N. A. (2024). Emerging pharmacological targets for alcohol use disorder. *Alcohol* (Fayetteville, N.Y.), S0741-8329(24)00101-0. Advance online publication. <https://doi.org/10.1016/j.alcohol.2024.07.00>
- Burggren, W., & Blank, T. (2009). Physiological study of larval fishes: challenges and opportunities. *Scientia Marina*, 3(S1), 99-110.
- Burrows, E. L., & Hannan, A. J. (2013). Towards environmental construct validity in animal models of CNS disorders: optimizing translation of preclinical studies. *CNS & neurological disorders drug targets*, 12(5), 587–592. <https://doi.org/10.2174/1871527311312050007>
- Cabrera-Álvarez, M. J., Swaney, W. T., & Reader, S. M. (2017). Forebrain activation during social exposure in wild-type guppies. *Physiology & Behavior*, 182, 107–113. <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2017.10.012>
- Calatayud, F., Belzung, C., & Aubert, A. (2004). Ethological validation and the assessment of anxiety-like behaviours: methodological comparison of classical analyses and structural approaches. *Behavioural processes*, 67(2), 195–206. <https://doi.org/10.1016/j.beproc.2004.04.002>
- Calvo, E. (2016). Effects of pharmaceuticals on fish behavior: Oxazepam impact on social preferences and responses on predation risk (olfactory cue mixture) in guppies (*Dissertation*). Retrieved from <https://urn.kb.se/resolve?urn=urn:nbn:se:umu:diva-26098>

- Carlezon, W. A., Jr, & Konradi, C. (2004). Understanding the neurobiological consequences of arly exposure to psychotropic drugs: linking behavior with molecules. *Neuropharmacology*, 47 Suppl 1(0 1), 47–60. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2004.06.021>
- Carola, V., D'Olimpio, F., Brunamonti, E., Mangia, F., & Renzi, P. (2002). Evaluation of the elevated plusmaze and open-field tests for the assessment of anxiety-related behaviour in inbredmice. *Behavioural Brain Research*, 134(1–2), 49–57. [https://doi.org/10.1016/S0166-4328\(01\)00452-1](https://doi.org/10.1016/S0166-4328(01)00452-1)
- Carvalho, A. C. C., Bugarim, R., Furtado, F., Alves, G., Walsh-Monteiro, A., & Gouveia Jr., A. (2024). Parametric analysis of anxiety-like behavior in guppy (*Poecilia reticulata*) larvae and juveniles using the plus maze with ramp. *Psychology & Neuroscience*. <https://doi.org/10.1037/pne0000343>
- Carvalho, P. D. P., Mayer, P. C. M., Walsh-Monteiro, A., & Gouveia, A., Jr. (2015). Effects of menthol on aggressive behavior in Siamese fighting fish (*Betta splendens*). *Psychology & Neuroscience*, 8(2), 290– 296. <https://doi.org/10.1037/h0101056>
- Carvalho, P., & Gouveia Jr, A. (2012). efeitos do clonazepam na esquivia inibitória no peixe-dourado (*carassius auratus*). *Revista Brasileira de Análise do Comportamento*, 6(1), 1-8. doi:<http://dx.doi.org/10.18542/rebac.v6i1.989>
- Chapman, B. B., Morrell, L. J., Benton, T. G., & Krause, J. (2008). Early interactions with adults mediate the development of predator defenses in guppies. *Behavioral Ecology*, 19(1), 87–93. <https://doi.org/10.1093/beheco/arm111>
- Chen, F., Chen, S., Liu, S., Zhang, C., & Peng, G. (2015). Effects of lorazepam and WAY-200070 in larval zebrafish light/dark choice test. *Neuropharmacology*, 95, 226–233. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2015.03.022>

- Cho, M., Nayak, S. U., Jennings, T., Tallarida, C. S., & Rawls, S. M. (2019). Predator odor produces anxiety-like behavioral phenotype in planarians that is counteracted by fluoxetine. *Physiology & Behavior*, 206, 181–184. <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2019.04.003>
- Clayman, C. L., & Connaughton, V. P. (2022). Neurochemical and behavioral consequences of ethanol and/or caffeine exposure: Effects in zebrafish and rodents. *Current Neuropsychopharmacology*, 20(3), 560–578. <https://doi.org/10.2174/1570159X1966621111142027>
- Cleal, M., Fontana, B. D., Ranson, D. C., McBride, S. D., Swinny, J. D., Redhead, E. S., & Parker, M. O. (2021). The Free-movement pattern Y-maze: A cross-species measure of working memory and executive function. *Behavior research methods*, 53(2), 536–557. <https://doi.org/10.3758/s13428-020-01452-x>
- Colwill, R. M., & Creton, R. (2011). Imaging escape and avoidance behavior in zebrafish larvae. *Reviews in the Neurosciences*, 22(1), 63–73. <https://doi.org/10.1515/rns.2011.008>
- Cooper, G. D., Pickavance, L. C., Wilding, J. P., Halford, J. C., & Goudie, A. J. (2005). A parametric analysis of olanzapine-induced weight gain in female rats. *Psychopharmacology*, 181(1), 80–89. <https://doi.org/10.1007/s00213-005-2224-4>
- Dadras O. (2024). Prevalence and correlates of sexual intercourse under influence of alcohol among Thai adolescents: lessons from a nationwide school-based survey. *International journal of adolescent medicine and health*, 10.1515/ijamh-2024-0045. Advance online publication. <https://doi.org/10.1515/ijamh-2024-0045>
- Delgado, M. R., Olsson, A., & Phelps, E. A. (2006). Extending animal models of fear conditioning to humans. *Biological psychology*, 73(1), 39–48. <https://doi.org/10.1016/j.biopsycho.2006.01.006>
- Denayer, T., Stöhr, T., & Van Roy, M. (2014). Animal models in translational medicine: Validation and prediction. *New Horizons in Translational Medicine*, 2(1), 5-11.

- Dick, C., Arendt, J., Reznick, D. N., & Hayashi, C. Y. (2018). The developmental and genetic trajectory of coloration in the guppy (*Poecilia reticulata*). *Evolution and Development*, 20(6), 207–218. <https://doi.org/10.1111/ede.12268>
- Doremus, T. L., Varlinskaya, E. I., & Spear, L. P. (2006). Factor analysis of elevated plus-maze behavior in adolescent and adult rats. *Pharmacology, biochemistry, and behavior*, 83(4), 570–577. <https://doi.org/10.1016/j.pbb.2006.03.019>
- Egan, R. J., Bergner, C. L., Hart, P. C., Cachat, J. M., Canavello, P. R., Elegante, M. F., Elkhayat, S. I., Bartels, B. K., Tien, A. K., Tien, D. H., Mohnot, S., Beeson, E., Glasgow, E., Amri, H., Zukowska, Z., & Kalueff, A. V. (2009). Understanding behavioral and physiological phenotypes of stress and anxiety in zebrafish. *Behavioural Brain Research*, 205(1), 38–44. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2009.06.022>
- Espejo, E. F. (1997). Structure of the mouse behaviour on the elevated plus-maze test of anxiety. *Behavioural Brain Research*, 86(1), 105–112. [https://doi.org/10.1016/S0166-4328\(96\)02245-0](https://doi.org/10.1016/S0166-4328(96)02245-0)
- Fiani, B., Zhu, L., Musch, B. L., Briceno, S., Andel, R., Sadeq, N., & Ansari, A. Z. (2021). The neurophysiology of caffeine as a central nervous system stimulant and the resultant effects on cognitive function. *Cureus*, 13(5), e15032. <https://doi.org/10.7759/cureus.15032>
- File, S. E. (2001). Factors controlling measures of anxiety and responses to novelty in the mouse. *Behavioural Brain Research*, 125(1–2), 151–157. [https://doi.org/10.1016/S0166-4328\(01\)00292-3](https://doi.org/10.1016/S0166-4328(01)00292-3)
- Finn, D. A., Rutledge-Gorman, M. T., & Crabbe, J. C. (2003). Genetic animal models of anxiety. *Neurogenetics*, 4(3), 109–135. <https://doi.org/10.1007/s10048-003-0143-2>
- Finn, R. N. (Ed.). (2020). *Fish larval physiology*. CRC Press.
- Fontana, B. D., & Parker, M. O. (2022). The larval diving response (LDR): Validation of an automated, high-throughput, ecologically relevant measure of anxiety-related behavior in

- larval zebrafish (*Danio rerio*). *Journal of neuroscience methods*, 381, 109706.
<https://doi.org/10.1016/j.jneumeth.2022.109706>
- Fontana, B. D., Mezzomo, N. J., Kalueff, A. V., & Rosemberg, D. B. (2018). The developing utility of zebrafish models of neurological and neuropsychiatric disorders: A critical review. *Experimental neurology*, 299(Pt A), 157–171.
<https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2017.10.004>
- Forsatkar, M. N., Nematollahi, M. A., Amiri, B. M., & Huang, W. B. (2014). Fluoxetine inhibits aggressive behaviour during parental care in male fighting fish (*Betta splendens*, Regan). *Ecotoxicology*, 23, 1794-1802.
- Fuiman, L. A., Poling, K. R., & Higgs, D. M. (1998). Quantifying developmental progress for comparative studies of larval fishes. *Copeia*, 602-611.
- Gasto'n, M. S., Schiöth, H. B., De Barioglio, S. R., & Salvatierra, N. A. (2015). Gabaergic control of anxiety-like behavior, but not food intake, induced by ghrelin in the intermediate medial mesopallium of the neonatal chick. *Hormones and Behavior*, 67, 66–72.
<https://doi.org/10.1016/j.yhbeh.2014.11.015>
- Gencturk, S., & Unal, G. (2024). Rodent tests of depression and anxiety: Construct validity and translational relevance. *Cognitive, Affective, & Behavioral Neuroscience*, 24(2), 191-224.
- Gerlai R. (2011). A small fish with a big future: zebrafish in behavioral neuroscience. *Reviews in the neurosciences*, 22(1), 3–4. <https://doi.org/10.1515/RNS.2011.002>
- Gerlai R. (2014). Fish in behavior research: unique tools with a great promise!. *Journal of neuroscience methods*, 234, 54–58. <https://doi.org/10.1016/j.jneumeth.2014.04.015>
- Gerlai, R., Lahav, M., Guo, S., & Rosenthal, A. (2000). Drinks like a fish: Zebra fish (*Danio rerio*) as a behavior genetic model to study alcohol effects. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*, 67(4), 773–782. [https://doi.org/10.1016/S0091-3057\(00\)00422-6](https://doi.org/10.1016/S0091-3057(00)00422-6)

- Goswami, S., Rodríguez-Sierra, O., Cascardi, M., & Paré, D. (2013). Animal models of post-traumatic stress disorder: face validity. *Frontiers in neuroscience*, 7, 89. <https://doi.org/10.3389/fnins.2013.00089>
- Gouveia Jr, A., Maximino, C., & Brito, T. M. (2006). Comportamento de peixes: Vantagens e utilidades nas neurociências. *Faculdade de ciências/UNESP*. Bauru: SP, 80.
- Gouveia, A., & de Brito, T. M. (2015). Animal models of psychopathology and its relation to clinical practice. In P. Á. Gargiulo & H. L. Mesones-Arroyo (Eds.), *Psychiatry and neuroscience update: Bridging the divide* (pp. 305–309). *Springer International Publishing/Springer Nature*. https://doi.org/10.1007/978-3-319-17103-6_22
- Grillon, C., Robinson, O. J., Cornwell, B., & Ernst, M. (2019). Modeling anxiety in healthy humans: A key intermediate bridge between basic and clinical sciences. *Neuropsychopharmacology*, 44(12), 1999–2010. <https://doi.org/10.1038/s41386-019-0445-1>
- Gruber, A. (2012). Combined influence of different feed on body development of larvae, fry and young of the species *Poecilia reticulata* (Guppy). *University of Agricultural Sciences and Veterinary Medicine Iasi, Romania*. 10.13140/RG.2.1.3259.9207
- Gulick, D., & Gould, T. J. (2009). Effects of ethanol and caffeine on behavior in C57BL/6 mice in the plus-maze discriminative avoidance task. *Behavioral Neuroscience*, 123(6), 1271–1278. <https://doi.org/10.1037/a0017610>
- Hacques, G., Komar, J., Dicks, M., & Seifert, L. (2021). Exploring to learn and learning to explore. *Psychological Research*, 85(4), 1367–1379. <https://doi.org/10.1007/s00426-020-01352-x>
- Haghani, S., Karia, M., Cheng, R. K., & Mathuru, A. S. (2019). An automated assay system to study novel tank induced anxiety. *Frontiers in Behavioral Neuroscience*, 13, Article 180. <https://doi.org/10.3389/fnbeh.2019.00180>

- Haller, J., & Alicki, M. (2012). Current animal models of anxiety, anxiety disorders, and anxiolytic drugs. *Current opinion in psychiatry*, 25(1), 59–64. <https://doi.org/10.1097/YCO.0b013e32834de34f>
- Hallgren, S., Volkova, K., Reyhanian, N., Olsén, K. H., & Hällström, I. P. (2011). Anxiogenic behaviour induced by 17 α -ethynylestradiol in male guppies (*Poecilia reticulata*). *Fish physiology and biochemistry*, 37(4), 911–918. <https://doi.org/10.1007/s10695-011-9488-x>
- Hamilton, T. J., Krook, J., Szaszkievicz, J., & Burggren, W. (2021). Shoaling, boldness, anxiety-like behavior and locomotion in zebrafish (*Danio rerio*) are altered by acute benzo[a]pyrene exposure. *The Science of the Total Environment*, 774, Article 145702. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.145702>
- Hamilton, T. J., Kwan, G. T., Gallup, J., & Tresguerres, M. (2016). Acute fluoxetine exposure alters crab anxiety-like behaviour, but not aggressiveness. *Scientific Reports*, 6(1), Article 19850. <https://doi.org/10.1038/srep19850>
- Harada, Y., Soh, Z., Wakitani, S., Yoshida, M., & Tsuji, T. (2022). Pharmacological effects of caffeine on ventilation in adult zebrafish under free-swimming conditions. *Scientific Reports*, 12(1), 17649. <https://doi.org/10.1038/s41598-022-22681-4>
- Harmata, G. I. S., Chan, A. C., Merfeld, M. J., Taugher-Hebl, R. J., Harijan, A. K., Hardie, J. B., Fan, R., Long, J. D., Wang, G. Z., Dlouhy, B. J., Bera, A. K., Narayanan, N. S., & Wemmie, J. A. (2023). Intoxicating effects of alcohol depend on acid-sensing ion channels. *Neuropsychopharmacology : official publication of the American College of Neuropsychopharmacology*, 48(5), 806–815. <https://doi.org/10.1038/s41386-022-01473-4>
- Harro, J. (2023). Animal Models of Mood and Anxiety Disorders: The Pursuit of Standardization and Recognition of the Complex Neurobiology of Human Mental Health. In: Harro, J. (eds) Psychiatric Vulnerability, Mood, and Anxiety Disorders. *Neuromethods*, vol 190. Humana, New York, NY. https://doi.org/10.1007/978-1-0716-2748-8_1

- Hijzen, T. H., Houtzager, S. W. J., Joordens, R. J. E., Olivier, B., & Slangen, J. L. (1995). Predictive validity of the potentiated startle response as a behavioral model for anxiolytic drugs. *Psychopharmacology*, 118, 150-154.
- Hilton, J. R., Simpson, S. R., Sherman, E. R., Raby-Smith, W., Azvine, K., Arribas, M., Zou, J., Deiana, S., Hengerer, B., & Cahill, E. N. (2023). Reactivity to conditioned threat cues is distinct from exploratory drive in the elevated plus maze. *The European Journal of Neuroscience*, 57(1), 54–63. <https://doi.org/10.1111/ejn.15870>
- Holmes A. (2001). Targeted gene mutation approaches to the study of anxiety-like behavior in mice. *Neuroscience and biobehavioral reviews*, 25(3), 261–273. [https://doi.org/10.1016/s0149-7634\(01\)00012-4](https://doi.org/10.1016/s0149-7634(01)00012-4)
- Hong, X., & Zha, J. (2019). Fish behavior: A promising model for aquatic toxicology research. *The Science of the total environment*, 686, 311–321. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.06.028>
- Huang, J. N., Wen, B., Zhu, J. G., Zhang, Y. S., Gao, J. Z., & Chen, Z. Z. (2020). Exposure to microplastics impairs digestive performance, stimulates immune response and induces microbiota dysbiosis in the gut of juvenile guppy (*Poecilia reticulata*). *The Science of the Total Environment*, 733, Article 138929. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.138929>
- Imai, M., Mizoguchi, T., Wang, M., Li, Y., Hasegawa, Y., Tonoki, A., & Itoh, M. (2022). The guppy (*Poecilia reticulata*) is a useful model for analyzing age-dependent changes in metabolism, motor function, and gene expression. *Experimental Gerontology*, 160, Article 111708. <https://doi.org/10.1016/j.exger.2022.111708>
- Ipser, J. C., Wilson, D., Akindipe, T. O., Sager, C., & Stein, D. J. (2015). Pharmacotherapy for anxiety and comorbid alcohol use disorders. *The Cochrane Database of Systematic Reviews*, 1(1), CD007505. <https://doi.org/10.1002/14651858.CD007505.pub2>

- Jones, E. S., Mullen, R., & Hardy, L. (2019). Measurement and validation of a three factor hierarchical model of competitive anxiety. *Psychology of Sport and Exercise*, 43, 34–44. <https://doi.org/10.1016/j.psychsport.2018.12.011>
- Jovanović, D., Šraml, M., Matović, B., & Mičić, S. (2017). An examination of the construct and predictive validity of the self-reported speeding behavior model. *Accident Analysis & Prevention*, 99, 66-76.
- Kalafateli, A. L., Aranäs, C., & Jerlhag, E. (2020). Effects of sub-chronic amylin receptor activation on alcohol-induced locomotor stimulation and monoamine levels in mice. *Psychopharmacology*, 237(11), 3249–3257. <https://doi.org/10.1007/s00213-020-05607-8>
- Kalueff, A. V., Keisala, T., Minasyan, A., & Tuohimaa, P. (2007). Pharmacological modulation of anxiety-related behaviors in the murine Suok test. *Brain research bulletin*, 74(1-3), 45–50. <https://doi.org/10.1016/j.brainresbull.2007.05.002>
- Karoly, H. C., Kirk-Provencher, K. T., Schacht, J. P., & Gowin, J. L. (2024). Alcohol and brain structure across the lifespan: A systematic review of large-scale neuroimaging studies. *Addiction biology*, 29(9), e13439. <https://doi.org/10.1111/adb.13439>
- Kenwood, M. M., Kalin, N. H., & Barbas, H. (2022). The prefrontal cortex, pathological anxiety, and anxiety disorders. *Neuropsychopharmacology*, 47(1), 260–275. <https://doi.org/10.1038/s41386-021-01109-z>
- Klevebrant, L., & Frick, A. (2022). Effects of caffeine on anxiety and panic attacks in patients with panic disorder: A systematic review and meta-analysis. *General Hospital Psychiatry*, 74, 22–31. <https://doi.org/10.1016/j.genhosppsych.2021.11.005>
- Kong, X. F., Li, J. T. & Sun, X. W. (2014). Complete mitochondrial genome of the Guppy (*Poecilia reticulata*). *Mitochondrial DNA*, 1-2. Doi: 10.3109/19401736.2014.880902

- Kraeuter, A. K., Guest, P. C., & Sarnyai, Z. (2019). The Elevated Plus Maze Test for Measuring Anxiety-Like Behavior in Rodents. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*, 1916, 69–74. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-8994-2_4
- Krause, E. T., & Liesenjohann, T. (2012). Predation pressure and food abundance during early life alter risk-taking behaviour and growth of guppies (*Poecilia reticulata*). *Behaviour*, 149(1), 1-14. <https://doi.org/10.1163/156853912X623748>
- Kristensen, M., Nierenberg, A. A., & Østergaard, S. D. (2018). Face and predictive validity of the Clock Δ 19 mouse as an animal model for bipolar disorder: a systematic review. *Molecular psychiatry*, 23(1), 70–80. <https://doi.org/10.1038/mp.2017.192>
- Laden, G., & Mathew, B. (2024). Drinker driver flyer diver. *Diving and hyperbaric medicine*, 54(2), 137–139. <https://doi.org/10.28920/dhm54.2.137-139>
- Lawther, A. J., Clissold, M. L., Ma, S., Kent, S., Lowry, C. A., Gundlach, A. L., & Hale, M. W. (2015). Anxiogenic drug administration and elevated plus-maze exposure in rats activate populations of relaxin-3 neurons in the nucleus incertus and serotonergic neurons in the dorsal raphe nucleus. *Neuroscience*, 303, 270–284. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2015.06.052>
- Layng, T. V., Andronis, P. T., & Goldiamond, I. (1999). Animal models of psychopathology: The establishment, maintenance, attenuation, and persistence of head-banging by pigeons. *Journal of Behavior Therapy and Experimental Psychiatry*, 30(1), 45–61. [https://doi.org/10.1016/s0005-7916\(99\)00003-8](https://doi.org/10.1016/s0005-7916(99)00003-8)
- Ledesma, J. M., & McRobert, S. P. (2008). Shoaling in juvenile guppies: the effects of body size and shoal size. *Behavioural processes*, 77(3), 384–388. <https://doi.org/10.1016/j.beproc.2007.10.006>

- Lees, B., Meredith, L. R., Kirkland, A. E., Bryant, B. E., & Squeglia, L. M. (2020). Effect of alcohol use on the adolescent brain and behavior. *Pharmacology, biochemistry, and behavior*, 192, 172906. <https://doi.org/10.1016/j.pbb.2020.172906>
- Levin, E. D., Bencan, Z., & Cerutti, D. T. (2007). Anxiolytic effects of nicotine in zebrafish. *Physiology & behavior*, 90(1), 54–58. <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2006.08.026>
- Li, Y., Yan, Z., Lu, Z., & Li, K. (2024). Zebrafish gender-specific anxiety-like behavioral and physiological reactions elicited by caffeine. *Behavioural Brain Research*, 115151. Advance online publication. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2024.115151>
- Lima-Maximino, M. G., Cueto-Escobedo, J., Rodríguez-Landa, J. F., & Maximino, C. (2018). FGIN-1-27, an agonist at translocator protein 18 kDa (TSPO), produces anti-anxiety and anti-panic effects in non-mammalian models. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*, 171, 66–73. <https://doi.org/10.1016/j.pbb.2018.04.007>
- Lindsey, B. W., Smith, F. M., & Croll, R. P. (2010). From inflation to flotation: Contribution of the swimbladder to whole-body density and swimming depth during development of the zebrafish (*Danio rerio*). *Zebrafish*, 7(1), 85–96. <https://doi.org/10.1089/zeb.2009.0616>
- Lister, R. G. (1990). Ethologically-based animal models of anxiety disorders. *Pharmacology & Therapeutics*, 46(3), 321–340. [https://doi.org/10.1016/0163-7258\(90\)90021-S](https://doi.org/10.1016/0163-7258(90)90021-S)
- Lowry, C. A., Johnson, P. L., Hay-Schmidt, A., Mikkelsen, J., & Shekhar, A. (2005). Modulation of anxiety circuits by serotonergic systems. *Stress (Amsterdam, Netherlands)*, 8(4), 233–246. <https://doi.org/10.1080/10253890500492787>
- Lucon-Xiccato, T., Loosli, F., Conti, F., Foulkes, N. S., & Bertolucci, C. (2022). Comparison of anxiety-like and social behaviour in medaka and zebrafish. *Scientific Reports*, 12(1), Article 10926. <https://doi.org/10.1038/s41598-022-14978-1>

- Luyten, L., Vansteenwegen, D., van Kuyck, K., Gabriëls, L., & Nuttin, B. (2011). Contextual conditioning in rats as an animal model for generalized anxiety disorder. *Cognitive, affective & behavioral neuroscience*, 11(2), 228–244. <https://doi.org/10.3758/s13415-011-0021-6>
- Maeda, H., Hasumi, A., & Yoshida, K. (2021). Caffeine-induced bradycardia, death, and anxiety-like behavior in zebrafish larvae. *Forensic Toxicology*, 39, 427–436. <https://doi.org/10.1007/s11419-021-00577-8>
- Magno, L. D., Fontes, A., Gonçalves, B. M., & Gouveia, A., Jr. (2015). Pharmacological study of the light/dark preference test in zebrafish (*Danio rerio*): Waterborne administration. *Pharmacology, Biochemistry, and Behavior*, 135, 169–176. <https://doi.org/10.1016/j.pbb.2015.05.014>
- Malafaia, G., Ahmed, M. A. I., Souza, S. S., Rezende, F. N. E., Freitas, Í. N., da Luz, T. M., da Silva, A. M., Charlie-Silva, I., Braz, H. L. B., Jorge, R. J. B., Sanches, P. R. S., Mendonça-Gomes, J. M., Cilli, E. M., & Araújo, A. P. D. C. (2022). Toxicological impact of SARS-CoV-2 on the health of the neotropical fish, *Poecilia reticulata*. *Aquatic Toxicology*, 245, Article 106104. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2022.106104>
- Martin, L. B., Trainor, B. C., Finy, M. S., & Nelson, R. J. (2007). HPA activity and neotic and anxiety-like behavior vary among *Peromyscus* species. *General and Comparative Endocrinology*, 151(3), 342–350. <https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2007.02.001>
- Mathur, P. & Guo, S. (2010). Use of Zebrafish as a model to understand mechanisms of addiction and complex neurobehavioral phenotypes. *Neurobiol Dis*, 40(1), 66–72. DOI: 10.1016/j.nbd.2010.05.016.
- Matsui H. (2017). The use of fish models to study human neurological disorders. *Neuroscience research*, 120, 1–7. <https://doi.org/10.1016/j.neures.2017.02.004>

- Maximino, C., Marques de Brito, T., Dias, C. A., Gouveia, A., Jr., & Morato, S. (2010). Scototaxis as anxiety-like behavior in fish. *Nature Protocols*, 5(2), 209–216. <https://doi.org/10.1038/nprot.2009.225>
- Maximino, C., Silva, R. X., da Silva, S. de N., Rodrigues, L. do S., Barbosa, H., de Carvalho, T. S., Leão, L. K., Lima, M. G., Oliveira, K. R., & Herculano, A. M. (2015). Non-mammalian models in behavioral neuroscience: consequences for biological psychiatry. *Frontiers in Behavioral Neuroscience*, 9, 233. <https://doi.org/10.3389/fnbeh.2015.00233>
- May, A. C., Stephens, L. H., Kraybill, E. P., Meyerhoff, D. J., & Durazzo, T. C. (2024). Frontal Brain N-Acetylaspartate at Treatment Entry is Related to Future WHO Risk Drinking Levels in Individuals with Alcohol Use Disorder. *Journal of studies on alcohol and drugs*, 10.15288/jsad.24-00168. Advance online publication. <https://doi.org/10.15288/jsad.24-00168>
- McDaniel, M. A., Hartman, N. S., Whetzel, D. L., & GRUBB III, W. L. (2007). Situational judgment tests, response instructions, and validity: A meta-analysis. *Personnel psychology*, 60(1), 63–91.
- McDonough, C. M., Guo, D. J., & Guo, T. L. (2021). Developmental toxicity of bisphenol S in *Caenorhabditis elegans* and NODEF mice. *Neurotoxicology*, 87, 156–166. <https://doi.org/10.1016/j.neuro.2021.09.006>
- Meichtry, L. B., Poetini, M. R., Dahleh, M. M. M., Araujo, S. M., Musachio, E. A. S., Bortolotto, V. C., de Freitas Couto, S., Somacal, S., Emanuelli, T., Gayer, M. C., Roehrs, R., Guerra, G. P., & Prigol, M. (2020). Addition of saturated and trans-fatty acids to the diet induces depressive and anxiety-like behaviors in *drosophila melanogaster*. *Neuroscience*, 443, 164–175. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2020.07.042>

- Menard, J., & Treit, D. (1999). Effects of centrally administered anxiolytic compounds in animal models of anxiety. *Neuroscience and biobehavioral reviews*, 23(4), 591–613. [https://doi.org/10.1016/s0149-7634\(98\)00056-6](https://doi.org/10.1016/s0149-7634(98)00056-6)
- Michelotti, P., Franscescon, F., Müller, T. E., Rosemberg, D. B., & Pereira, M. E. (2022). Ketamine acutely impairs memory consolidation and repeated exposure promotes stereotyped behavior without changing anxiety- and aggression-like parameters in adult zebrafish. *Physiology & Behavior*, 247, Article 113708. <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2022.113708>
- Miletto Petrazzini, M. E., Agrillo, C., Piffer, L., Dadda, M., & Bisazza, A. (2012). Development and application of a new method to investigate cognition in newborn guppies. *Behavioural brain research*, 233(2), 443–449. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2012.05.044>
- Mohan, B., & Arasi, T. (2023). Comparison of hypnotic effect in fresh petal aqueous extract of lotus (*Nelumbo nucifera* Gaertn) and diazepam powder on ornamental guppy fish (*Poecilia reticulata*). *Arabian Journal of Medicinal and Aromatic Plants*, 9(1), 46–60. <https://doi.org/10.48347/IMIST.PRSM/ajmap-v9i1.36687>
- Montalbano, G., Bertolucci, C., Bisazza, A., & Lucon-Xiccato, T. (2023). Interspecific differences in developmental mode determine early cognitive abilities in teleost fish. *Animal Cognition*, 26(6), 1893–1903. <https://doi.org/10.1007/s10071-023-01828-4>
- Motta, C. M. (2020). Análise paramétrica do comportamento do zebrafish no labirinto em cruz com rampa. Dissertação de mestrado, *Universidade Federal do Pará*. Repositório Institucional da UFPA. <https://repositorio.ufpa.br/jspui/handle/2011/13812>
- Munson, A., & DePasquale, C. (2024). Lessons in cognition: A review of maze designs and procedures used to measure spatial learning in fish. *Journal of fish biology*, 10.1111/jfb.15918. Advance online publication. <https://doi.org/10.1111/jfb.15918>

- Nakagawa, H., Matsunaga, D., & Ishiwata, T. (2020). Effect of heat acclimation on anxiety-like behavior of rats in an open field. *Journal of Thermal Biology*, 87, Article 102458. <https://doi.org/10.1016/j.jtherbio.2019.102458>
- Nascimento, G. S., Walsh-Monteiro, A., & Gouveia, A., Jr. (2016). A reliable depression-like model in zebrafish (*Danio rerio*): Learned helplessness. *Psychology & Neuroscience*, 9(3), 390–397. <https://doi.org/10.1037/pne0000057>
- Neri, D., Ruberto, T., Mwaffo, V., Bartolini, T., & Porfiri, M. (2019). Social environment modulates anxiogenic effects of caffeine in zebrafish. *Behavioural Pharmacology*, 30(1), 45–58. <https://doi.org/10.1097/FBP.0000000000000415>
- Ogawa, S., Pfaff, D. W., & Parhar, I. S. (2021). Fish as a model in social neuroscience: conservation and diversity in the social brain network. *Biological reviews of the Cambridge Philosophical Society*, 96(3), 999–1020. <https://doi.org/10.1111/brv.12689>
- Olivier, B., Molewijk, E., van Oorschot, R., van der Poel, G., Zethof, T., van der Heyden, J., & Mos, J. (1994). New animal models of anxiety. *European neuropsychopharmacology : the journal of the European College of Neuropsychopharmacology*, 4(2), 93–102. [https://doi.org/10.1016/0924-977x\(94\)90002-7](https://doi.org/10.1016/0924-977x(94)90002-7)
- Olsén, K. H., Ask, K., Olsén, H., Porsch-Hällström, I., & Hallgren, S. (2014). Reprint of "Effects of the SSRI citalopram on behaviours connected to stress and reproduction in Endler guppy, *Poecilia wingei*". *Aquatic Toxicology (Amsterdam, Netherlands)*, 151, 97–104. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2014.02.011>
- Orford, J. T., Ozeki, S., Brand, J. A., Henry, J., Wlodkowic, D., Alton, L.A., Martin, J.M., & Wong, B. B. M. (2022). Effects of the agricultural pollutant 17 β -trenbolone on morphology and behaviour of tadpoles (*Limnodynastes tasmaniensis*). *Aquatic Toxicology*, 251, Article 106289. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2022.106289>

- Orford, J. T., Tan, H., Tingley, R., Alton, L. A., Wong, B. B. M., & Martin, J. M. (2023). Bigger and bolder: Widespread agricultural pollutant 17 β -trenbolone increases growth and alters behaviour in tadpoles (*Litoria ewingii*). *Aquatic Toxicology*, 260, Article 106577. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2023.106577>
- Osse, J. W. M., & Van den Boogaart, J. G. M. (1995). Fish larvae, development, allometric growth, and the aquatic environment.
- Overall, K. L. (2000). Natural animal models of human psychiatric conditions: Assessment of mechanism and validity. *Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry*, 24(5), 727–776. [https://doi.org/10.1016/S0278-5846\(00\)00104-4](https://doi.org/10.1016/S0278-5846(00)00104-4)
- Parmigiani, S., Palanza, P., Rogers, J., & Ferrari, P. F. (1999). Selection, evolution of behavior and animal models in behavioral neuroscience. *Neuroscience and biobehavioral reviews*, 23(7), 957–969. [https://doi.org/10.1016/s0149-7634\(99\)00029-9](https://doi.org/10.1016/s0149-7634(99)00029-9)
- Patel, T. A., Cole, S. L., & Cogle, J. R. (2024). Correlates of alcohol use and alcohol use disorder among individuals with DSM-5 social anxiety disorder: A population based study. *Journal of affective disorders*, 360, 55–61. <https://doi.org/10.1016/j.jad.2024.05.163>
- Pawlak, C. R., Ho, Y. J., & Schwarting, R. K. (2008). Animal models of human psychopathology based on individual differences in novelty-seeking and anxiety. *Neuroscience and biobehavioral reviews*, 32(8), 1544–1568. <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2008.06.007>
- Peláez Rodríguez, E., Sarma, S. S. S., & Nandini, S. (2021). Morphotype-dependent feeding responses in the guppy (*Poecilia reticulata* Peters, 1859; Class: Actinopterygii) fed zooplankton. *Aquaculture Research*, 52(2), 666–677. <https://doi.org/10.1111/are.14924>
- Pelli, M., & Connaughton, V. P. (2015). Chronic exposure to environmentally relevant concentrations of fluoxetine (Prozac) decreases survival, increases abnormal behaviors, and delays predator escape responses in guppies. *Chemosphere*, 139, 202–209. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2015.06.033>

- Pellow, S., & File, S. E. (1986). Anxiolytic and anxiogenic drug effects on exploratory activity in an elevated plus-maze: A novel test of anxiety in the rat. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*, 24(3), 525–529. [https://doi.org/10.1016/0091-3057\(86\)90552-6](https://doi.org/10.1016/0091-3057(86)90552-6)
- Pellow, S., Chopin, P., File, S. E., & Briley, M. (1985). Validation of open: Closed arm entries in an elevated plus-maze as a measure of anxiety in the rat. *Journal of Neuroscience Methods*, 14(3), 149–167. [https://doi.org/10.1016/0165-0270\(85\)90031-7](https://doi.org/10.1016/0165-0270(85)90031-7)
- Pinheiro-da-Silva, J., Agues-Barbosa, T., & Luchiari, A. C. (2020). Embryonic exposure to ethanol increases anxiety-like behavior in fry zebrafish. *Alcohol and Alcoholism*, 55(6), 581–590. <https://doi.org/10.1093/alcalc/agaa087>
- Pintos, S., Lucon-Xiccato, T., Vera, L. M., & Bertolucci, C. (2023). Daily rhythms in the behavioural stress response of the zebrafish *Danio rerio*. *Physiology & Behavior*, 268, 114241. <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2023.114241>
- Prediger, R. D., Batista, L. C., & Takahashi, R. N. (2004). Adenosine A1 receptors modulate the anxiolytic-like effect of ethanol in the elevated plus-maze in mice. *European Journal of Pharmacology*, 499(1-2), 147–154. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2004.07.106>
- Prut, L., & Belzung, C. (2003). The open field as a paradigm to measure the effects of drugs on anxiety-like behaviors: A review. *European Journal of Pharmacology*, 463(1–3), 3–33. [https://doi.org/10.1016/S0014-2999\(03\)01272-X](https://doi.org/10.1016/S0014-2999(03)01272-X)
- Qi Xiaoli & Lin Wenjuan (2005). *Methods and Strategies of Anxiety and Depression Animal Models Study*[J], 13(03): 327-332. <https://journal.psych.ac.cn/adps/EN/Y2005/V13/I03/327>
- Raza, S. (2015). *The effect of prenatal valproic acid exposure on the developing brain: face, construct, and predictive validity of an animal model of autism*. University of Lethbridge (Canada). Rétaux, S., & Yamamoto, K. (2024). Evolution of fish brains and behaviors: How many ways to generate the same outcomes? *Current Opinion in Behavioral Sciences*, 59, 101440. <https://doi.org/10.1016/j.cobeha.2024.101440>

- Rétaux, S., & Yamamoto, K. (2024). Evolution of fish brains and behaviors: how many ways to generate the same outcomes?. *Current Opinion in Behavioral Sciences*, 59, 101440.
- Réus, G. Z., Dos Santos, M. A., Abelaira, H. M., & Quevedo, J. (2014). Animal models of social anxiety disorder and their validity criteria. *Life sciences*, 114(1), 1–3. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2014.08.002>
- Rezaie, A., Sajjadi, M. M., Mohsenpour, S. R., & Farkhonde, R. (2020). The effect of different photoperiod on growth and survival in guppy larvae (*Poecilia reticulata*). *Journal of Ornamental Aquatics*, 7(1), 27–32. <https://dorl.net/dor/20.1001.1.24234575.1399.7.1.3.0>
- Reznick, D. N. (1990). Plasticity in age and size at maturity in male guppies (*Poecilia reticulata*): An experimental evaluation of alternative models of development. *Journal of Evolutionary Biology*, 3(3–4), 185–203. <https://doi.org/10.1046/j.1420-9101.1990.3030185.x>
- Reznick, D. N., & Bryga, H. (1987). Life-history evolution in guppies (*poecilia reticulata*): 1. Phenotypic and genetic changes in an introduction experiment. *Evolution; International Journal of Organic Evolution*, 41(6), 1370–1385. <https://doi.org/10.1111/j.1558-5646.1987.tb02474.x>
- Richendrfer, H., Pelkowski, S. D., Colwill, R. M., & Creton, R. (2012). On the edge: Pharmacological evidence for anxiety-related behavior in zebrafish larvae. *Behavioural Brain Research*, 228(1), 99–106. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2011.11.041>
- Rico, E. P., Rosemberg, D. B., Dias, R. D., Bogo, M. R., & Bonan, C. D. (2007). Ethanol alters acetylcholinesterase activity and gene expression in zebrafish brain. *Toxicology Letters*, 174(1–3), 25–30. <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2007.08.005>
- Riehl, R., Kyzar, E., Allain, A., Green, J., Hook, M., Monnig, L., Rhymes, K., Roth, A., Pham, M., Razavi, R., Dileo, J., Gaikwad, S., Hart, P., & Kalueff, A. V. (2011). Behavioral and physiological effects of acute ketamine exposure in adult zebrafish. *Neurotoxicology and Teratology*, 33(6), 658–667. <https://doi.org/10.1016/j.ntt.2011.05.011>

- Rodd, F. H., Reznick, D. N., & Sokolowski, M. B. (1997). Phenotypic Plasticity in the Life History Traits of Guppies: Responses to Social Environment. *Ecology*, 78(2), 419–433. <https://doi.org/10.2307/2266018>
- Rodgers, R. J., & Dalvi, A. (1997). Anxiety, defence and the elevated plus-maze. *Neuroscience and biobehavioral reviews*, 21(6), 801–810. [https://doi.org/10.1016/s0149-7634\(96\)00058-9](https://doi.org/10.1016/s0149-7634(96)00058-9)
- Rosa, J. G. S., Lima, C., & Lopes-Ferreira, M. (2022). Zebrafish larvae behavior models as a tool for drug screenings and pre-clinical trials: A review. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(12), Article 6647. <https://doi.org/10.3390/ijms23126647>
- Ruiz-Medina, J., Pinto-Xavier, A., Rodríguez-Arias, M., Miñarro, J., & Valverde, O. (2013). Influence of chronic caffeine on MDMA-induced behavioral and neuroinflammatory response in mice. *Psychopharmacology*, 226(2), 433–444. <https://doi.org/10.1007/s00213-012-2918-3>
- Rushton, J. P., Brainerd, C. J., & Pressley, M. (1983). Behavioral development and construct validity: The principle of aggregation. *Psychological Bulletin*, 94(1), 18–38. <https://doi.org/10.1037/0033-2909.94.1.18>
- Saaristo, M., McLennan, A., Johnstone, C. P., Clarke, B. O., & Wong, B. B. M. (2017). Impacts of the antidepressant fluoxetine on the anti-predator behaviours of wild guppies (*Poecilia reticulata*). *Aquatic Toxicology (Amsterdam, Netherlands)*, 183, 38–45. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2016.12.007>
- Savaşçı, B. B., Lucon-Xiccato, T., & Bisazza, A. (2021). Ontogeny and personality affect inhibitory control in guppies, *Poecilia reticulata*. *Animal Behaviour*, 180, 111–121. <https://doi.org/10.1016/j.anbehav.2021.08.013>
- Schartl, M. (2014). Beyond the Zebrafish: diverse fish species for modeling human disease. *Dis Model Mech*, 7(2), 181–192. Doi: 10.1242/dmm.012245.

- Schnörr, S. J., Steenbergen, P. J., Richardson, M. K., & Champagne, D. L. (2012). Measuring thigmotaxis in larval zebrafish. *Behavioural brain research*, 228(2), 367–374. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2011.12.016>
- Shahjahan, R. M., Ahmed, M. J., Begum, R. A., & Rashid, M. A. (2014). Breeding biology of guppy fish, *Poecilia reticulata* (Peters, 1859) in the laboratory. *Journal of the Asiatic Society of Bangladesh, Science*, 39(2), 259–267. <https://doi.org/10.3329/jasbs.v39i2.17866>
- Shri, R. (2012). Anxiety: Causes and Management. *The Journal of Behavioral Science*, 5(1), 100–118. Retrieved from <https://so06.tci-thaijo.org/index.php/IJBS/article/view/2205>
- Silva, M. T. A. (2003). Modelos comportamentais em neurociências. Tese de doutorado, *Instituto de Psicologia da Universidade de São Paulo*, São Paulo, SP, Brasil.
- Sorregotti, T., Mendes-Gomes, J., Rico, J. L., Rodgers, R. J., & Nunes-de-Souza, R. L. (2013). Ethopharmacological analysis of the open elevated plus-maze in mice. *Behavioural brain research*, 246, 76–85. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2013.02.035>
- Sourisse, J. M., Bonzi, L. C., Semmelhack, J., & Schunter, C. (2023). Warming affects routine swimming activity and novel odour response in larval zebrafish. *Scientific Reports*, 13(1), 21075. <https://doi.org/10.1038/s41598-023-48287-y>
- Steenbergen, P. J., Richardson, M. K., & Champagne, D. L. (2011). Patterns of avoidance behaviours in the light/dark preference test in young juvenile zebrafish: a pharmacological study. *Behavioural brain research*, 222(1), 15–25. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2011.03.025>
- Steimer T. (2011). Animal models of anxiety disorders in rats and mice: some conceptual issues. *Dialogues in clinical neuroscience*, 13(4), 495–506. <https://doi.org/10.31887/DCNS.2011.13.4/>
- Szuhany, K. L., & Simon, N. M. (2022). Anxiety Disorders: A Review. *JAMA*, 328(24), 2431–445. <https://doi.org/10.1001/jama.2022.22744>

- Takahashi, K. (2022). Changes in the anxiety-like and fearful behavior of shrimp following daily threatening experiences. *Animal Cognition*, 25(2), 319–327. <https://doi.org/10.1007/s10071-21-01555-8>
- Tejada, J., Chaim, K. T., & Morato, S. (2018). X-PloRat: A software for scoring animal behavior in enclosed spaces. *Psicologia: Teoria e Pesquisa*, 33, Article e3322. <https://doi.org/10.1590/0102.3772e3322>
- Trindade, G. S., Procianoy, R. S., Dos Santos, V. B., Dornelles, A. D., & Silveira, R. C. (2024). Administration time of caffeine in preterm infants: systematic review and meta-analysis. *Journal of perinatology : official journal of the California Perinatal Association*, 10.1038/s41372-024-02042-x. Advance online publication. <https://doi.org/10.1038/s41372-024-02042-x>
- Tripathi, N., Hoffmann, M., Willing, E. M., Lanz, C., Weigel, D., & Dreyer, C. (2009). Genetic linkage map of the guppy, *Poecilia reticulata*, and quantitative trait loci analysis of male size and colour variation. *Proceedings: Biological sciences*, 276(1665), 2195–2208. <https://doi.org/10.1098/rspb.2008.1930>
- van der Staay, F. J., Arndt, S. S., & Nordquist, R. E. (2009). Evaluation of animal models of neurobehavioral disorders. *Behavioral and brain functions : BBF*, 5, 11. <https://doi.org/10.1186/1744-9081-5-11>
- Van Skike, C. E., Diaz-Granados, J. L., & Matthews, D. B. (2015). Chronic intermittent ethanol exposure produces persistent anxiety in adolescent and adult rats. *Alcoholism, Clinical and Experimental Research*, 39(2), 262–271. <https://doi.org/10.1111/acer.12617>
- Varga, Z. K., Zsigmond, Á., Pejtsik, D., Varga, M., Demeter, K., Mikics, É., Haller, J., & Aliczki, M. (2018). The swimming plus-maze test: A novel highthroughput model for assessment of anxiety-related behaviour in larval and juvenile zebrafish (*Danio rerio*). *Scientific Reports*, 8(1), Article 16590. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-34989-1>

- Vervliet, B., & Raes, F. (2013). Criteria of validity in experimental psychopathology: application to models of anxiety and depression. *Psychological medicine*, 43(11), 2241-2244.
- Voosenek, C. J., Muijres, F. T., & Van Leeuwen, J. L. (2018). Biomechanics of swimming in developing larval fish. *Journal of Experimental Biology*, 221(1), jeb149583.
- Volkova, K., Caspillo, N. R., Porseryd, T., Hallgren, S., Dinnetz, P., Olsén, H., & Hällström, I. P. (2015). Transgenerational effects of 17 α -ethinyl estradiol on anxiety behavior in the guppy, *Poecilia reticulata*. *General and Comparative Endocrinology*, 223, 66-72.
- Volkova, K., Reyhanian, N., Kot-Wasik, A., Olsén, H., Porsch-Hällström, I., & Hallgren, S. (2012). Brain circuit imprints of developmental 17 α -Ethinylestradiol exposure in guppies (*Poecilia reticulata*): persistent effects on anxiety but not on reproductive behaviour. *General and comparative endocrinology*, 178(2), 282–290. <https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2012.05.010>
- Wall, P. M., & Messier, C. (2001). Methodological and conceptual issues in the use of the elevated plus-maze as a psychological measurement instrument of animal anxiety-like behavior. *Neuroscience and biobehavioral reviews*, 25(3), 275–286. [https://doi.org/10.1016/s0149-7634\(01\)00013-6](https://doi.org/10.1016/s0149-7634(01)00013-6)
- Walsh-Monteiro, A. (2016). Desempenho do Guppy (*Poecilia reticulata*) em modelos de ansiedade: campo aberto, preferência claro-escuro e labirinto em cruz com rampa. Tese de doutorado. *Universidade Federal do Pará*. Repositório Institucional da UFPA. <https://repositorio.ufpa.br/jspui/handle/2011/9041>
- Walsh-Monteiro, A., Carvalho, A. C. C., Carvalho, A. G. V. L., Sarmiento, L. F., & Gouveia, A., Jr. (2021). Effects of re-exposure to plus maze with ramp in guppies: Habituation and sexual differences. *Psychology & Neuroscience*, 14(2), 145–155. <https://doi.org/10.1037/pne0000250>
- Walsh-Monteiro, A., Pessoa, R. S., Sanches, É. M., Carvalho, A. C. C., Silva, Y. C. B., Chirinéa, G., & Gouveia, A. (2016). A new anxiety test for zebrafish: Plus maze with ramp. *Psychology & Neuroscience*, 9(4), 457–464. <https://doi.org/10.1037/pne0000067>

- Walsh-Monteiro, A., Pragana, W., Costa, E. T., & Gouveia, A., Jr. (2014). Behavioral and histological effects of rotenone in fish (Guppy, *Poecilia reticulata*). *Psychology & Neuroscience*, 7(4), 619–623. <https://doi.org/10.3922/j.psns.2014.4.22>
- Willner P. (1986). Validation criteria for animal models of human mental disorders: learned helplessness as a paradigm case. *Progress in neuro-psychopharmacology & biological psychiatry*, 10(6), 677–690. [https://doi.org/10.1016/0278-5846\(86\)90051-5](https://doi.org/10.1016/0278-5846(86)90051-5)
- Willner, P. (1991). Behavioural models in psychopharmacology. In P. Willner (Ed.), *Behavioural models in psychopharmacology: Theoretical, industrial and clinical perspectives* (pp. 3–18). Cambridge University Press.
- Xu, M., Zhang, C., Qi, Q., Wang, R., Zhang, S., Yan, R., Li, B., & Li, S. (2023). Effects of salinity stress on anxiety behavior and antioxidant capability of guppy (*Poecilia reticulata*). *Ecotoxicology (London, England)*, 32(5), 598–605. <https://doi.org/10.1007/s10646-023-02667-2>
- Zahid, H., Tsang, B., Ahmed, H., Lee, R. C. Y., Tran, S., & Gerlai, R. (2018). Diazepam fails to alter anxiety-like responses but affects motor function in a white-black test paradigm in larval zebrafish (*Danio rerio*). *Progress in neuro-psychopharmacology & biological Psychiatry*, 83, 127–136. <https://doi.org/10.1016/j.pnpbp.2018.01.012>
- Zhang, C., Ma, J., Qi, Q., Xu, M., & Xu, R. (2023). Effects of ammonia exposure on anxiety behavior, oxidative stress and inflammation in guppy (*Poecilia reticulata*). *Comparative Biochemistry and Physiology. Toxicology & Pharmacology*, 265, 109539. <https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2022.109539>
- Zhang, Z., Morse, A. C., Koob, G. F., & Schulteis, G. (2007). Dose- and time-dependent expression of anxiety-like behavior in the elevated plus-maze during withdrawal from acute and repeated intermittent ethanol intoxication in rats. *Alcoholism, Clinical and Experimental Research*, 31(11), 1811–1819. <https://doi.org/10.1111/j.1530-0277.2007.00483.x>

- Zhao, H., Zhou, M., Liu, Y., Jiang, J., & Wang, Y. (2023). Recent advances in anxiety disorders: Focus on animal models and pathological mechanisms. *Animal models and experimental medicine*, 6(6), 559–572. <https://doi.org/10.1002/ame2.12360>
- Zhou, Y., & Kreek, M. J. (2014). Alcohol: a stimulant activating brain stress responsive systems with persistent neuroadaptation. *Neuropharmacology*, 87, 51–58. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2014.05.04>
- Ziaei-nejad, S., Shojaei, S. S., & Amini Chermahini, M. (2020). Effects of enriched artemia with selenium nanoparticles on growth, survival and biochemical factors of guppy (*Poecilia reticulata*). *Iranian Journal of Fisheries Science*, 19(5), 2593–2607. <https://doi.org/10.22092/ijfs.2020.122554>

ANEXOS

ARTIGO PUBLICADO: ESTUDO I



Psychology & Neuroscience

© 2024 American Psychological Association
ISSN: 1983-3288

<https://doi.org/10.1037/pne0000343>

Parametric Analysis of Anxiety-Like Behavior in Guppy (*Poecilia reticulata*) Larvae and Juveniles Using the Plus Maze With Ramp

Ana Claudia Costa de Carvalho¹, Ranielle Bugarim², Fabiana Furtado², Gelson Alves², André Walsh-Monteiro^{1, 2}, and Amauri Gouveia Jr.¹

¹ Laboratory of Neuroscience and Behavior, Center for Theory and Behavior Research, Federal University of Pará

² Laboratory of Neurochemistry and Behavior, Federal Institute of Pará

Objective: In this study, we utilized guppy larvae and juveniles using the plus maze with ramp (PMR) to obtain data on behavior during the early stages of their lives. The goal was to assess the animals' sensitivity to the aversive stimulus generated by the PMR on anxiety-like behavior. **Method:** To carry out the study, a total of 240 guppies in larval and juvenile stages were used. The animals were divided into 20 groups ($n = 12$): 10 groups consisted of 7-day-old larvae and 10 groups consisted of 28-day-old juveniles. In the first phase, test aquariums with different water column heights (1.1, 1.3, 1.5 cm) were tested for various durations (5, 10, 15 min) to establish experimental parameters. Measurements included time spent in compartments and arm entries. In phase II, each arm of the PMR was divided into three equal parts: proximal, medial, and distal. Assessments included time in each part and the number of transpositions, representing behavioral and locomotor variables. **Results:** Our results show that the PMR induces avoidance behavior in ramped arms and increased exploration of flat arms. The data indicate the validity of using the apparatus to study anxiety-like behavior in developing fish. **Conclusions:** The data underscore the validity of using the apparatus to investigate anxiety-like behavior in fish during the developmental phase, presenting a valuable tool for exploring this phenomenon throughout the life cycle.

Public Significance Statement

Guppies, in the early stages of development, exhibit anxiety-like when exposed to plus maze with ramp (PMR). Guppy larvae and juveniles provide new insights into the genesis of anxiety-like behavioral manifestation in a novel animal model during developmental stages. A behavioral pattern in response to the PMR is suggested from the larval stage, indicating a potential innate origin of anxiety-like behavior in this species.

Keywords: anxiety models, comparative psychology, fish behavior, *Poecilia reticulata*, development stages

Supplemental materials: <https://doi.org/10.1037/pne0000343.sup>

Ana Claudia Costa de Carvalho <https://orcid.org/0000-0002-3556-7440>

André Walsh-Monteiro <https://orcid.org/0000-0002-2686-2982>

Amauri Gouveia Jr. <https://orcid.org/0000-0003-1710-9662>

Part of this research was supported by grants from Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior CAPES cod. 001.

Ana Claudia Costa de Carvalho played a lead role in formal analysis, investigation, methodology, writing—original draft, and writing—review and editing. Ranielle Bugarim played an equal role in formal analysis, investigation, methodology, validation, and writing—review

continued

ESTUDO II SUBMETIDO PARA PUBLICAÇÃO

06/11/2024, 10:19

[View Letter](#)

Date: 10/30/2024
To: "Ana Claudia Costa de Carvalho" anaclaudiac.carvalho@hotmail.com
From: "Psychology and Neuroscience" khamilton@apa.org
Subject: Submission Confirmation for Assessing the Differential Impact of Alcohol and Caffeine on Anxiety-Like Behavior Across Life Stages in Guppies (*Poecilia reticulata*) using The Plus Maze with Ramp

Dear Mrs., Carvalho,

Your submission "Assessing the Differential Impact of Alcohol and Caffeine on Anxiety-Like Behavior Across Life Stages in Guppies (*Poecilia reticulata*) using The Plus Maze with Ramp" has been received by Psychology & Neuroscience.

You will be able to check on the progress of your submission by logging on to Editorial Manager as an author. The URL is <https://www.editorialmanager.com/pne/>.

Your manuscript will be given a reference number once an Editor has been assigned.

Please note that you may also confirm or Authenticate your ORCID ID by clicking here [*****](#).

Best regards,
Editorial Office
Psychology & Neuroscience

APA asks that you please take a moment to give us your feedback on the submission process, by completing a short survey, available at <http://goo.gl/forms/vKXxocF4Jk>.

In compliance with data protection regulations, you may request that we remove your personal registration details at any time. (Use the following URL: <https://www.editorialmanager.com/pne/login.asp?a=r>). Please contact the publication office if you have any questions.