



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

**Efeito do tempo de alojamento em grupos de diferentes densidades sobre a
ansiedade em *Danio rerio***

Rodrigo dos Santos Pessoa

Belém - PA

2019



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

**Efeito do tempo de alojamento em grupos de diferentes densidades sobre a
ansiedade em *Danio rerio***

Rodrigo dos Santos Pessoa

Dissertação apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em
Teoria e Pesquisa do
Comportamento, como requisito
parcial para a obtenção do título de
Mestre em Teoria e Pesquisa do
Comportamento.

Orientador: Prof. Dr. Amauri
Gouveia Junior

Belém - Pará
2019

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)
UFPA/Núcleo de Teoria e Pesquisa do Comportamento/Biblioteca

P475e Pessoa, Rodrigo dos Santos, 1991-
Efeito do tempo de alojamento em grupos de diferentes densidades sobre a ansiedade em Danio rerio / Rodrigo dos Santos Pessoa. — 2019.
80f. il.

Orientador: Amauri Gouveia Jr.
Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do Pará, Núcleo de Teoria e Pesquisa do Comportamento, Programa de Pós-Graduação em Teoria e Pesquisa do Comportamento, Belém, 2019.

1. Análise do comportamento. 2. Psicologia: pesquisa experimental. 3. Zebrafish: peixe-zebra. 4. Labirinto em cruz (teste)-comportamento - ansiedade. 5. Alojamento. 6. Medo. I. Título.

CDD - 23. ed. 150.77

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

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.

Rodrigo dos Santos Pessoa, Programa de Pós-Graduação em Teoria e Pesquisa do Comportamento, Universidade Federal do Pará, Belém-PA, Brasil.

Rodrigo dos Santos Pessoa.

Mail: rodrigo.psoa-14@hotmail.com



PPGTPC

Programa de Pós-Graduação em
Teoria e Pesquisa do Comportamento UFPA



Universidade Federal do Pará
Núcleo de Teoria e Pesquisa do Comportamento - NTPC
Programa de Pós-Graduação em Teoria e Pesquisa do
Comportamento - PPGTPC
Mail: secretaria.ppgtpc@gmail.com
Site: ppgtpc.ufpa.br/index.php/pt
Rua Augusto Corrêa n.º 01
CEP: 66075-110, Guamá, Belém-PA
Fones: 32018542 / 32016478

Dissertação de Mestrado

“Efeito do Tempo de Alojamento Em Grupos de Diferentes Densidades Sobre a Ansiedade Em *Danio Rerio*”.

Aluno: Rodrigo dos Santos Pessoa.

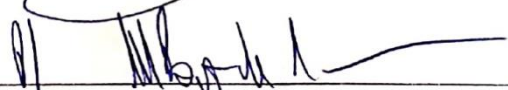
Data da Defesa: 08 de Agosto de 2019

Resultado: Aprovado.

Banca Examinadora:


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


Prof.º Dr.º Bruno Rodrigues dos Santos (Membro 1 – UFPA).


Prof.ª Dr.ª Silvia Botelho de Oliveira Conde (Membro 2 – UPB, via skype).

Agradecimentos

Primeira mente a Deus por toda paciência e perseverança que me proporcionou nos últimos anos de luta.

A minha família, que me apoiaram e suportaram junto comigo todas as dificuldades provenientes da distancia. Em especial a minha esposa Elen Andrade que não me faltou em nenhum momento, me apoiando e incentivando.

A meu orientador Amauri Gouveia Jr., por todo o conhecimento transmitido, pelas orientações e direcionamentos sempre pertinentes.

A meus colegas de laboratório, Gloria, Igor, Bruno, John, Emerson, Raissa e Aline, pela cooperação, compreensão e lições partilhadas no convívio do laboratório. Em especial a Carla Motta pelo auxílio na montagem e preparação dos aparatos de teste.

A prof. Andre Walsh e Ana Claudia pelos conselhos e apoio na preparação da defesa.

Essa dissertação de mestrado não teria sido possível sem o apoio de todos vocês.

Resumo

Pessoa, R. S. (2019). *Efeito do tempo de alojamento em grupos de diferentes densidades sobre a ansiedade em Danio rerio*. Dissertação de Mestrado. Programa de Pós Graduação em Teoria e Pesquisa do Comportamento, Universidade Federal do Pará, Belém, PA, Brasil, 79 páginas.

Os efeitos fisiológicos e comportamentais da aglomeração ou do isolamento de animais têm sido estudados extensivamente, seja em modelos para estudos psicopatológicos ou mesmo para identificar possíveis consequências sobre a coleta de dados em pesquisas científicas. Em espécies sociáveis como o *Danio rerio*, a variação na densidade de alojamento representa uma variável relevante que precisa ser considerada. Assim neste estudo nos avaliamos os efeitos do alojamento em diferentes densidades por litro, por diversos tempos de exposição, na resposta de ansiedade mensurada nos testes de preferência Claro/Escuro, Teste de Inspeção de Predador e Labirinto em Cruz com Rampa em peixes da espécie *Danio rerio*. Peixes da espécie *Danio rerio* (216) foram divididos em 3 grandes grupos de acordo como Tempo de alojamento (1, 7 e 30 dias), cada grupo foi dividido em 6 subgrupos de acordo com a Densidade de peixes (0,25, 0,5, 1, 2, 4, 6 peixe por litro – p/l) e alojados em aquário de 4 litros (n=8). Os grupos com 4 e 6 p/l foram preenchidos com *D. rerio* confederados que não foram testados, mas que permaneceram no aquário para perfazer a população. Após as condições de alojamento cada animal foi testado nos protocolos: Preferência Claro/Escuro (CE), Inspeção de Predador (IP) e Labirinto em Cruz com Rampa (LCR). As condições de alojamento alteraram o comportamento exploratório dos sujeitos nos três protocolos. No CE o Tempo de alojamento intensificou os efeitos da aglomeração e reduziu a atividade motora nos grupos alojados nas densidades de 2 e 6 peixes/litro. No testes de IP a Densidade reduziu o numero de cruzamentos entre os quadrantes no grupos alojado com 6 sujeitos, e aumentou o tempo dos animais inspecionando o predador. No LCR Tempo e Densidade alteraram o comportamento no aparato, os grupos alojados com 2 e 6 sujeitos reduziram a exploração dos braços com rampa e aumentaram nos braços planos, em contra partia o isolamento elevou a exploração dos braços com rampa. Neste estudo mostramos que condições de alojamento podem agir como estressores crônicos de baixa intensidade que alteram o comportamento do tipo ansiedade no zebrafish quando testados nos protocolos de preferência Claro/Escuro e no Labirinto em Cruz com Rampa e comportamento do tipo medo quando expostos ao teste de Inspeção de predador.

Palavras-Chave: Alojamento. Ansiedade. Labirinto em Cruz. Medo. Zebrafish.

Abstract

Pessoa, R. S. (2019). *Effect of lodging time in groups of different densities on anxiety in Danio rerio*. Masters dissertation. Postgraduate Program of Theory and Research of Behaviour, Federal University of Pará, Belém, PA, Brazil, 79 pages.

The physiological and behavioral effects of animal agglomeration or isolation have been studied extensively, either in models for psychopathological studies or even to identify possible consequences for data collection in scientific research. In sociable species such as *Danio rerio*, variation in lodging density represents a relevant variable that needs to be considered. Thus in this study we evaluated the effects of lodging at different densities per liter, for different exposure times, on the anxiety response measured in the Light/Dark preference test, Predator Inspection Test and Plus Maze with Ramp in *Danio* fish. Fishes of the species *Danio rerio* (216) were divided into 3 large groups according to Time of lodging (1, 7 and 30 days), each group was divided into 6 subgroups according to Density of fish (0,25, 0, 5, 1, 2, 4, 6 fish/liter) and housed in a 4 liter aquarium (n = 8). The 16 and 24 groups were filled with *D. rerio* confederates who were not tested but who remained in the aquarium to make up the population. After the lodging conditions each animal was tested in the protocols: Light/Dark Preference (CE), Predator Inspection (IP) and Plus Maze with Ramp (PMR). The lodging conditions altered the exploratory behavior of the subjects in the three protocols. In CE the time of lodging intensified the effects of agglomeration and reduced the motor activity in groups housed at densities of 2 and 6 fish/liter. In the IP tests Density reduced the number of crosses between quadrants in the 24-subject group, and increased the time of animals inspecting the predator. In the Plus Maze with Ramp Time and Density altered the behavior of the apparatus, the groups with 2 and 6 subjects reduced the exploration of the ramp arms and increased in the flat arms, in counterpart the isolation increased the exploration of the ramp arms. In this study we showed that conditions of lodging can act as low-intensity chronic stressors that alter anxiety-type behavior in zebrafish when tested in Light/Dark and Plus Maze with Ramp protocols and fear-type behavior when exposed to the Predator Inspection test.

Keywords: Lodging. Anxiety. Plus Maze. Fear. Zebrafish

SUMARIO

1. Introdução.....	10
a. Danio rerio (zebrafish).....	10
b. Efeito do estresse sobre o comportamento.....	11
c. Efeito da densidade sobre a ansiedade.....	15
d. Efeito da densidade sobre o comportamento.....	17
e. Testes para o estudo da ansiedade em zebrafish.....	19
2. Objetivos.....	26
3. Materiais e Métodos.....	26
a. Sujeitos.....	26
b. Alojamentos.....	27
c. Aparatos de Teste.....	28
4. Procedimentos.....	31
a. Procedimentos Gerais.....	31
b. Teste de Preferencia Claro/Escuro.....	33
c. Teste de Inspeção de Predador.....	33
d. Teste do Labirinto em Cruz com Rampa.....	33
5. Análises Estatísticas.....	33
6. Resultados.....	34
a. Preferência Claro/Escuro.....	34
b. Inspeção de Predador.....	38
c. Labirinto em Cruz com Rampa.....	45
7. Discussão.....	53
a. Preferência Claro/Escuro.....	54
b. Inspeção de Predador.....	56
c. Labirinto em Cruz com Rampa.....	59
8. Conclusão.....	62
9. Referências.....	64

1. Introdução

a. Zebrafish (*Danio rerio*)

Encontrado no sudeste asiático, o paulistinha ou zebrafish, (*Danio rerio* Hamilton, 1822) pertence à família ciprinídae, são peixes de pequeno porte, não excedendo 4 cm de comprimento, que habitam corpos de água lentos e rasos, particularmente próximos a campos de arroz (Spence, Gerlach, Lawrence, Smith, 2008), sendo animais onívoros, ovíparos, também utilizados como animais ornamentais, portanto, estando adaptados a viver em aquários (Houart, 2001).

Seu uso na pesquisa tem se tornado cada vez mais popular devido suas qualidades como modelo e também pela grande quantidade de conhecimento que já foi produzido para sua espécie (Grunwald, Eisen, 2002; Vascotto Beckham, Kelly, 1997).

Uma das características que tornaram o zebrafish uma importante ferramenta de estudo animal, está no fato de serem tão prolíficos, podendo uma única fêmea colocar até 200 ovos, seu desenvolvimento embrionário durar apenas cinco dias e as larvas serem transparentes (Gerlai, 2014a; Grunwald *et al.*, 2002). Outra característica da espécie que favorece sua utilização no campo científico é a sua preferência por formar cardumes, possibilitando o armazenamento de um grande número de indivíduos em um espaço reduzido. Essas características favoreceram inicialmente estudos de manipulação em desenvolvimento e genética, depois seu uso foi expandido para outras áreas nas biociências (Gerlai, 2014a; Grunwald *et al.*, 2002; Miller, Gerlai, 2012).

Diferentes estudos têm mostrado que as respostas neurológicas (Stewart, Braubach, Spitsbergen, Gerlai, Kalueff, 2014), endócrinas (Lohr, Hammerschmidt, 2011), farmacológicas (Bencan Z, Sledge D, Levin ED, 2009) e comportamentais

(Paull, Filby, Giddins, Coe, Hamilton, Tyler, 2010), como por exemplo, o de sistemas sociais que nesses animais são semelhantes ao encontrado em roedores e humanos (Gerlai, 2014b). Além dos campos da genética e do desenvolvimento, o zebrafish tem se mostrado útil no estudo de patologias psiquiátricas como a ansiedade (Stewart, Gaikwad, Kyzar, Green, Roth, Kalueff, 2012; Cachat, Stewart, Utterback, Hart, Gaikwad, Wong, Kalueff, 2011).

b. O efeito do estresse sobre o comportamento

Em 1925 o cientista canadense Hans Selye notou que pacientes que procuravam a clínica apresentavam sintomas similares (perda de peso, diminuição da força muscular), independente da ocupação. Ao promover experimentos em que submetia animais a diversas situações agressivas (frio, calor, infecções, traumas) observou que os organismos respondiam sempre de forma regular, como por exemplo, dilatação do córtex adrenal, atrofia timo linfática e úlceras intestinais (ver: Silva, Goulart, Guido, 2018). Selye referiu-se a esses achados como a Síndrome Adaptativa Geral (SAG) ou Estresse Biológico, definindo como uma reação defensiva fisiológica do organismo em resposta a qualquer estímulo nocivo (Silva *et al.*, 2018; Filgueiras, Hippert, 1999).

Os sintomas observados são consequência das respostas neuroendócrina do organismo ao estresse e envolve dois eixos: hipotálamo- hipófise- córtex das adrenais e hipotálamo- hipófise- sistema nervoso simpático- medula das adrenais (Tsigos, Kyrou, Kassi, Chrousos, 2016; Silva *et al.*, 2018). No primeiro eixo o hipotálamo libera o Hormônio de Liberação de Corticotrófica (CRH), que estimula o aumento da produção do Hormônio Adrenocorticotrófico (ACTH) pela Hipófise que age sobre o córtex das glândulas suprarrenais estimulando a síntese de corticoides (aldosteron e cortisol – corticosterona em ratos) (Tsigos, Kyrou, Kassi, Chrousos, 2016; Silva *et al.*, 2018). No

segundo eixo, a hipófise age sobre o sistema nervoso simpático que o leva a estimular a medula das suprarrenais a liberar catecolaminas na circulação (adrenalina e noradrenalina).

A liberação desses hormônios está intimamente ligada à resposta fisiológica do estresse, as catecolaminas são responsáveis por modular respostas ligadas ao comportamento de luta-fuga estimulando, entre outros, o aumento da frequência cardíaca, dilatação das vias aéreas, aumento do metabolismo basal e da musculatura esquelética (Paravati, Warrington, 2019). Dentre os hormônios ligados ao estresse o cortisol e o ACTH destacam-se, pois seus níveis modulam o sistema imunológico, influenciam a resposta inflamatória e elevam o metabolismo energético do organismo (Tsigos, Kyrou, Kassi, Chrousos, 2016; Paravati S, Warrington, 2019) e por isso a concentração plasmática desses hormônios são um importante indicador de estresse (Contarteze, Manchado, Gobatto, Mello, 2007).

O estresse ajuda os organismos a lidar com situações que desafiam sua sobrevivência e promove a adaptação em resposta a ameaças à homeostase. No entanto, o estresse sustentado por longos períodos pode ter efeitos adversos graves e duradouros na função e no comportamento do cérebro (Sandi, Haller, 2015). Em roedores o estresse pré-natal tem efeito negativo sobre o desenvolvimento provocando, na fase adulta, ansiedade aumentada (Brunton & Russell 2010), déficits cognitivos (Paris & Frye 2011) e comportamentos sociais anormais (Lee, Brady, Shapiro, Dorsa, Koenig, 2007). O efeito do estresse pré-natal pode ser considerado como um mecanismo adaptativo que prepara a prole para o ambiente pós-natal, aprimorando a vigilância a ameaças ambientais mesmo que isso tenha um custo a longo prazo (Gluckman & Hanson, 2004; McEwen, 2008).

A exposição crônica aos hormônios do estresse, independente do período da vida, tem impacto nas estruturas cerebrais envolvidas na cognição e na saúde mental (Lupien, McEwen, Gunnar & Heim 2009). Ratos Long Evans expostos a estresse crônico imprevisível por restrição ao longo de 4 semanas provocou a diminuição do volume total do hipocampo (Schoenfeld, McCausland, Morris, Padmanaban, Cameron, 2017). O estresse também age sobre o comportamento, a exposição forçada de ratos Wistar a um predador (gato) por 5 minutos teve um efeito ansiogênico, aumentando o comportamento tipo ansiedade em animais testados no labirinto em cruz elevado e campo aberto (Bulos, Pobbe, Zangrossi Jr, 2015).

E ainda o estresse social causado por aglomeração pode agir como estressor interferindo nos níveis basais de corticosterona (Brown, Grunberg, 1995). Analisando os níveis de hormonais, Brown e colaboradores (1995) compararam o efeito da aglomeração e do isolamento em ratos Wistar entre machos e fêmeas, e constataram que ambos são afetados, mas de modos diferentes pelas condições de habitação. Para as fêmeas o isolamento se mostrou um cenário mais estressante elevando os níveis corticosterona, enquanto que para os machos os níveis hormonais se mostraram elevados quando alojados em gaiolas superlotadas.

Assim como ocorre em mamíferos, no zebrafish quando um fator estressante interage com o organismo desencadeia uma reação defensiva modulada pelo eixo neuroendócrino similar ao observado em outros vertebrados (Barton, 2002). O eixo hipotálamo-hipófise-interrenal do *D. rerio* é análogo ao eixo HHA dos mamíferos, de modo que a análise dos efeitos do estresse no eixo neuroendócrinos no zebrafish se assemelha as respostas encontradas em mamíferos (Nesan & Vijayan, 2013).

Hartig e colaboradores (2016) trataram embriões do zebrafish com doses de cortisol exógeno de 0 a 5 dias após a fertilização (dpf) e geraram larvas morfológicamente normais, mas que apresentavam níveis elevados de cortisol no corpo inteiro. Aplicaram nestes sujeitos o ensaio de regeneração de cauda, amputaram a porção final da barbatana caudal e constataram que vários grupos tratados com cortisol produziram uma frequência significativamente maior de defeitos morfológicos quando comparados ao grupos controle. Esses defeitos na regeneração se devem a uma resposta inflamatória exagerada e reação prolongada a lesão, tanto neste trabalho quanto em outro foi observado uma elevação no número de macrófagos na barbatana em regeneração (Petrie *et al.*, 2014).

Assim, se torna de extrema relevância as condições de manejo e estocagem destes animais no trato laboratorial. O zebrafish é sensível a condições atípicas, sobre tudo aquelas que se mantem por longos períodos de tempo e eleve os níveis de hormônios ligados a resposta de estresse. Sabe-se que fêmeas do zebrafish em situações nocivas (5 dias em jejum), durante o período de produção dos gametas, podem incorporar níveis anormais de cortisol nos oócitos que podem dar origem a larvas ousadas (Best, 2015; Best, Kurrasch, & Vijayan, 2017), um mecanismos de programação da prole a fim de lidar com um ambiente estressante. No entanto, a elevação dos níveis de cortisol no desenvolvimento das larvas pode ter efeito sobre a diferenciação sexual que pode ser causado pela densidade de alojamento (Ribas, Valdivieso, Diaz, Piferrer, 2017) e em adultos, machos socialmente subordinados podem experimentar estresse crônico apresentando concentrações plasmáticas de cortisol significativamente mais altas que os dominantes e sofrem redução na proliferação celular na região telencefálica (Tea, Alderman, Gilmour, 2018)

c. O efeito da densidade sobre a ansiedade

Segundo McNaughton & Corr (2004) a ansiedade pode ser definida como um estado interno, fisiológico que se manifesta em um padrão de comportamentos defensivos que o organismo apresenta quando se encontra em uma situação potencialmente perigosa. Em alguns organismos podemos encontrar mecanismos de defesa como a camuflagem ou mimetismo, que tem como principal função reduzir as chances de serem detectados por um predador (Alcock, 2011) ou estabelecimento de grupos como estratégia defensiva, o que favorece uma condição de maior segurança para seus integrantes, aumentando as chances de evitarem possíveis ameaças ambientais (Kikusui, Winslow, Mori, 2006).

Contudo, o estabelecimento de grupos em grandes densidades, mantidos em um espaço reduzido e recluso pode representar um ambiente estressante levando os animais a demonstrarem padrões comportamentais anormais. Em ratos, quando alojados em condição de superlotação (10 sujeitos – Daniels, Pietersen, Carstens, Daya, Stein, 2000; 16 e 24 sujeitos – Botelho *et al.*, 2007; 17 sujeitos – Knyazeva, Loginova, Loseva, 2012) mostraram comportamento semelhante a ansiedade quando testados no labirinto em cruz elevado, esses animais passam significativamente mais tempo nos braços fechados do aparato quando comparado com seus controles. Em testes em que o tempo de exposição a superlotação foi avaliado, o aumento no período de habitação intensificou os efeitos ansiogênicos da aglomeração (Botelho *et al.*, 2007).

Da mesma forma em condições de sub-lotação ou isolamento produziu nos animais um efeito ansiogênico, sobretudo nos machos, que também apresentaram uma redução da atividade locomotora na exploração do labirinto em cruz elevado (Weiss, Pryce, Jongen-Relo, Nanz-Bahr, Feldon, 2004). Essa redução da atividade locomotora

para os sujeitos isolados é proposto como um indicativo de ansiedade no labirinto, já que os animais isolados não diferiram dos controles criados em grupo quanto a atividade geral na exploração do campo aberto (Weiss, *et al.*, 2004; Botelho *et al.*, 2007).

Em peixes, a formação de cardumes representa uma vantagem quando se fala em alojamento, pois algumas espécies suportam uma grande quantidade de sujeitos em um espaço menor. Em condições ameaçadoras, por exemplo, existe uma maior coesão do grupo (Rehnberg, Smith, 1988), o que parece ter propriedades de reforço reduzindo a ansiedade e o estresse (Al-Imari, Gerlai, 2008). Quando o zebrafish (*Danio rerio*) é exposto ao teste de Preferência Claro/Escuro a sua tendência natural é de evitar a porção clara e bem iluminada, contudo, quando 8 sujeitos são colocados simultaneamente no aparato a preferência se altera e os animais exploraram mais o compartimento claro, indicando que a formação de cardume tem um efeito ansiolítico (Maximino, Marques, Dias, Gouveia, Morato, 2010c; Mansur, *et al.*, 2014).

Curiosamente, quando o *Danio rerio* foi mantido isolado foi produzindo um efeito ansiolítico, Shams e colaboradores (2015), testaram os efeitos do isolamento social sobre a capacidade de locomoção, tigmotaxia (nado próximo à parede) e congelamento no teste do campo aberto e constataram que os sujeitos mantidos nessa condição por 90 dias exploraram mais o centro do aparato e não apresentaram redução na capacidade de locomoção, indicando que o isolamento só agiu sobre o parâmetro afetivo. Os seus resultados em conjunto com outros disponíveis na literatura (Parker, Millington, Combe, Brennan, 2012; Giacomini *et al.*, 2015) sugerem que o isolamento social tem efeitos ansiolíticos sobre o zebrafish.

Embora outros estudos já tenham testado o efeito da densidade no zebrafish sobre a preferência por claro/escuro, não foram avaliados os efeitos que a variação na densidade de alojamento provoca nestes animais no mesmo protocolo de teste. Da mesma forma, assim como Shams (2015), outros trabalhos estudam o efeito do isolamento e/ou da super-lotação sobre o estado comportamental dos sujeitos, mas poucas investigações avaliam esses efeitos sob uma maior variação da densidade que compõem cada grupo.

d. O efeito da densidade sobre o comportamento

Os efeitos fisiológicos e comportamentais da aglomeração ou do isolamento de animais tem sido extensivamente estudados, seja como um modelo de comparação para estudos em humano ou mesmo para identificar possíveis consequências sobre a coleta de dados em pesquisas científicas (Yildiz, Hayirli, Okumus, Kaynar, Kisa, 2007). Tipicamente o alojamento desses animais tem o objetivo de manter o controle experimental, reduzindo os efeitos ambientais e de variáveis que podem interferir no estado interno do sujeito durante a coleta de dados. Botelho e colaboradores (2007) ao alojar ratos Wistar em gaiolas com diferentes densidades (1, 2, 3, 4, 6, 8, 12, 16 e 24 sujeitos por gaiola) pelos períodos de 1 e 14 dias relataram um efeito ansiogênico. Após o tempo de exposição às respectivas condições de alojamento, os ratos foram testados no Labirinto em Cruz Elevado (Handley & Mithani, 1984) para a medição dos níveis de ansiedade, onde foi possível constatar que o animais que haviam sido armazenados em condição de sub-lotação (com até dois sujeitos por gaiola) e de super-lotação (16 e 24 sujeitos por gaiola), apresentaram o tempo gasto e o número de entradas nos braços abertos do aparato significativamente menor quando comparados com o grupo controle (seis sujeitos por gaiola).

Já em peixes o efeito da superlotação vem sendo bem estudado nas piscicultura, principalmente graças a atenção dada ao bem-estar de peixes criados para a alimentação (Baldwin, 2010). Sabe-se que em espécies como a Tilapia (Sánchez-Murosa, Sánchez, Barroso, García-Mesa, Rufino-Palomares, Lupiáñez, 2016), Truta (Ellis, 2002) e Salmão (Turnbull, Adams, Richards, Robertson, 2006), as altas densidades de estocagem podem prejudicar o bem-estar levando a altos níveis de estresse, reduzindo o desempenho imunológico e diminuindo a capacidade de luta contra patógenos (Di Marco, Priori, Finoia, Massari, Mandich, Marino, 2008; FSBI, 2002; Baldwin, 2010). Além disso, em espécies onde a agressão é comum, o estresse pode aumentar o número de interações entre os indivíduos, por sua vez, intensificando a ocorrência de danos e lesões causadas por confrontos (Baldwin, 2010). Em situação de sub-locação algumas espécies com a tendência a se agruparem podem apresentar mudanças significativas nas concentrações de cortisol no sangue, indicando que este cenário é aversivo para esses organismos (Serra, Sanna, Mostallino, Biggio, 2007; Giacomini, Abreu, Koakoski, Idalencio, Kalichak, Oliveira, 2015)

No *D. rerio*, uma espécie altamente sociável, a formação de cardumes tem uma função defensiva na evitação de predadores em um ambiente natural, aumentando a percepção do grupo quanto à aproximação de um predador e diluindo as chances de que qualquer indivíduo seja alvo (Mansur, Santos, Dias, Pinheiro, Gouveia Jr., 2014; Engeszer, Ryan, Parichy, 2012; Paull, 2010). Contudo, a aglomeração em grandes densidades pode constituir um estressor crônico que interfere no bem-estar do animal (Ramsay, Feist, Varga, Westerfield, Kent, Schreck, 2006).

Conhecer as consequências das condições de alojamento sobre a fisiologia e o desenvolvimento dos animais é importante não só para a produção alimentar, mas sobre

tudo na aplicação desses animais como modelos de estudo no âmbito científico. O uso de modelos animais e a criação de protocolos de testes para o estudo de psicopatologias em humanos visa o estabelecimento de síndromes em animais mais simples que possuam características biológicas semelhantes aos transtornos em humanos (McKinney, 1984). Protocolos que expõem os sujeitos a condições atípicas como ambientes novos e a inserção de objetos diferentes, estão interessados em respostas naturais inatas que o organismo possa apresentar diante de condições adversas e que evoque uma resposta fisiológica/comportamental que se assemelhe a condições biológicas do transtorno psicológico humano (Micale, Kucerova, Sulcova, 2013).

e. Testes para o estudo da ansiedade em zebrafish

Modelos de ansiedade são construídos sobre o pressuposto de que o comportamento semelhante à ansiedade foi selecionado evolutivamente por aumentar as chances do indivíduo de evitar situações perigosas (Nesse, 1999; Brown, Kotler & Bouskila, 2001). Em uma condição natural, animais como ratos, camundongos e peixes de pequeno porte que geralmente são presas, precisam manter um estado basal de apreensão anti-predatória, revezando sua atenção entre a demanda alimentar e a segurança (Brown *et al.*, 2001). Muito provavelmente essa situação de conflito entre busca por recursos vs manter-se seguro, foi um substrato de ação da seleção natural favorecendo os organismos que evitaram o risco de serem predados mesmo que isso levasse a perda temporária de recursos (Kavaliers & Choleris, 2001; Brown *et al.*, 2001).

O zebrafish é reconhecidamente modelo eficaz em pesquisas neurocomportamentais e farmacológicas graças à compatibilidade com paradigmas experimentais já existentes e sua resposta eficiente a fármacos psicoativos

administrados em seres humanos (Maximino, Marques, Dias, Gouveia & Morato, 2010c; Cachat, Canavello, 2010; Mezzomo, Silveira, Giuliane, Quadros & Rosemberg, 2015). Seu potencial como modelo está baseado em homologias fisiológicas e comportamentais, em respostas a estímulos que são similares aos encontrados em modelos animais já existentes (Speedie & Gerlai 2008; Champagne, Hoefnagels, 2010). Consequentemente vários testes comportamentais foram criados e adaptados (de testes inicialmente desenvolvidos para roedores) para a condição piscino e são empregados na exploração de mecanismos neurais e em resposta farmacológica sobre comportamentos semelhantes à ansiedade (Stewart *et al.*, 2012; Maximino *et al.*, 2010c).

Dentre os principais protocolos empregados em investigações sobre a ansiedade que utilizam o *D. rerio* como modelo temos: O teste de preferência claro/escuro (CE) para o *D. rerio* foi descrito por Serra, Medalha e Mattioli (1999) e esta embasado em dois pontos fundamentais: na preferência natural do animal a ambientes escuros em detrimento de ambientes bem iluminados (escototaxia); e em um estado de conflito interno – manter-se em um local seguro (compartimento escuro) ou explorar novos ambientes em busca de recursos (Serra, Medalha & Mattioli, 1999; Maximino, Brito, Gouveia, 2010a). No CE as respostas comportamentais observadas são consequência do estímulo aversivo provocado pelo efeito do ambiente novo e pelo espaço iluminado, inclusive, comportamentos ligados à ansiedade são mais observados quando o sujeito se encontra no compartimento branco (tigmotaxia, nado errático, congelamento e avaliação de risco) (Maximino, 2010c).

A predição do CE é demonstrada na resposta do *D. rerio* quando exposto a compostos ansiolíticos e ansiogênicos. A administração de drogas ansiolíticas como buspirona e clonazepam, reduzem o tempo que o animal passa no compartimento escuro

e aumentam a exploração do compartimento branco, já drogas como efeito ansiogênico como fluoxetina, imipramina e cafeína (em altas doses) aumentam o tempo de permanência no compartimento escuro (Magno, Fontes, Gonçalves, Gouveia, 2015; Maximino, Silva, Araujo, Lima, Miranda, Puty, Benzecry, 2014; Maximino *et al.* 2007). A construção do modelo para o protocolo claro/escuro esta baseada na reação defensiva específica das espécies, no caso do zebrafish que possuem melanoforos dorsais a preferência por ambientes escuros está relacionado com o comportamento críptico (camuflagem) (Kavaliers, Choleris, 2001).

Ainda se valendo do conflito exploração/segurança, outro teste comumente aplicado em peixes é o teste de exploração do campo aberto (TCA), que foi descrito inicialmente para estudos da emocionalidade em roedores e adaptado para o contexto piscino em que o peixe é transferido para um tanque novo, normalmente circular e branco. O procedimento avalia o comportamento emocional medindo o tempo gasto na borda e no centro do aparelho, atividade locomotora, bem como comportamentos ligados a ansiedade (tigmotaxia, congelamento, natação errática e nado explosivo) (Pruet & Belzung, 2003; Cachat *et al.*, 2010; Peitsaro, Kaslin, Anichtchik, Panula, 2003). A exposição ao novo ambiente é seguindo de uma maior atividade do peixe na região periférica e da evitação da região central. Tal padrão comportamental só é modificado quando o animal se habitua ao aparato (Warren & Callaghan, 1976; Maximino *et al.*, 2010c).

Estudos farmacológicos em peixes testados no TCA alteram o estado motivacional. Fármacos com efeito ansiolítico, aumento na locomoção central ou o tempo gasto na parte central do dispositivo, sem modificação da locomoção total (Peitsaro *et al.*, 2003; Walsh-Monteiro, Pragana, Costa & Gouveia, 2014), enquanto

que, drogas com ação ansiogênica tendem a reduzir essas variáveis (Maximino *et al.*, 2010c; Prut & Belzung, 2003).

Outro teste bastante utilizado para estudar a ansiedade em peixes é o Teste de Mergulho no Tanque Novo (TMTN). Trata-se de um tanque, normalmente retangular, em que a escolha do animal entre a camada mais superficial ou profunda da coluna d'água, e o tempo de permanência nessas regiões, serve como medida de medo e ansiedade (Gerlai *et al.*, 2000). O protocolo TMTN explora o comportamento instintivo do zebrafish para buscar proteção em um ambiente novos e desconhecidos, permanecendo no fundo do tanque até que se sinta seguro para explorar (Levin, Bencan, Cerutti, 2007). Em muitas espécies de peixes que são predadas por aves, a tendência do animal é de evadir para o fundo do tanque como estratégia antipredatória (CsaÅnyi, 1986). Registrando a latência para entrada na metade superior do aquário, o tempo gasto no topo, bem como a intensidade dos ataques de congelamento e nado errático é possível inferir o estado ansioso em que o animal se encontra (Barcellos, Ritter, Kreutz, Quevedo, Bolognesi, Bedin, 2007; Egan, Bergner, Hart, Cachat, Canavello, Elegante, 2009).

A permanência do *D.rerio* na porção inferior do aparato é sensível a etanol (Gerlai *et al.*, 2000), fluoxetina crônica (Egan *et al.*, 2009), nicotina (Levin *et al.*, 2007), diazepam (Lopez-Patino, Yu, Cabra, Zhdanova, 2008) e buspirona (Bencan, Sledge, Levin, 2009) que produziu respostas ansiolíticas, reduziram a habitação no fundo e aumentou a exploração da metade superior do tanque. Do mesmo modo, a administração de drogas como a cafeína (Egan *et al.*, 2009) e feromônios de alarme (Cachat *et al.*, 2010) produziram um efeito ansiogênico, aumentaram significativamente

o tempo de habitação no fundo e uma latência maior para explorar a porção superior do aquário.

É importante ressaltar que seja preferindo ambientes escuros, permanecendo próximo a parede do aparato, ou ainda, buscando a porção mais profunda do aquário, são estratégias preventivas que visam evitar a exposição do animal a ameaças em potencial. Contudo, quando um predador é apresentado (seja através de pistas olfativas ou a exposição visual) é induzido no sujeito um estado semelhante ao medo, já que a ameaça se mostra real e concreta (Bass, Gerlai, 2008).

O Teste de Inspeção de Predador (IP) tem sido aplicado como modelo para estudo de medo e ansiedade (Gerlai, Fernandes, Pereira, 2009; Kavaliers *et al.*, 2001). De modo geral os animais podem responder de maneiras diferentes aos estímulos aversivos, adaptando suas estratégias defensivas com base na distância entre o sujeito e a fonte do perigo (Maximino, 2010b). Foi postulado (McNaughton & Corr, 2004) que o comportamento defensivo é resultante do entrelaçamento entre duas dimensões: a primeira é a Direção defensiva (motivação em abordar versus evitar - definido por Craig, 1917) e a segunda dimensão é a da Distância defensiva (localização da ameaça, entre proximal versus potencial – definido por Blanchard & Blanchard, 1997) uma construção cognitiva de intensidade da ameaça percebida, assim essencialmente uma organização hierárquica dos sistemas que controlam o medo e a ansiedade. Em uma situação potencialmente aversiva em que exista uma maior inclinação do sujeito a evitar o estímulo seja predominante, a emergência da ameaça vai ser controlada pela sua proximidade percebida sendo que quanto mais próximo o estímulo maior a sua aversividade.

Quando exposto a uma substancia de alarme (liberadas por células da epiderme quando lesionadas), o *D. rerio* mostrou um aumento no número de vezes que entreva em estado de congelamento, comportamento usado como uma medida de medo. As sessões de congelamento reduziram quando foi oferecido a visão e/ou pistas olfativas de coespecíficos (Faustino, Tacão-Monteiro, Oliveira, 2017)

Bass e Gerlai (2008), colocaram o zebrafish em contato com dois peixes estímulos, o seu predador natural *Nandus nandus* e o ciclídeo *Nimbochromis compressiceps* (potencial predador não-natural) e constataram uma resposta de medo significativa, com maior número de saltos, para o seu predador natural (*N. nandus*), sem que se alterasse as demais medidas de ansiedade. Um resultado similar foi encontrado quando um imagem virtual foi utilizada no lugar do predador (Gerlai, 2009).

Baseado nas respostas citadas ate o momento que utilizam o comportamento antipredatorio no *D. rerio*, pode-se perceber que o IP se mostra mais útil como um modelo de medo do que como um modelo de ansiedade. O que foi encontrado por Bass e Gerlai (2008) pode ser interpretado como uma evitação ativa ao perigo de predação e não um comportamento cauteloso ou de avaliação de risco, que indicaria um estado semelhante a ansiedade (McNaughton *et al.*, 2004).

Uma nova proposta de modelo para o estudo da ansiedade é o Labirinto em Cruz com Rampa (LCR) (Walsh-Monteiro, Pessoa, Sanches, Carvalho, Silva, Chirinéa, *et al.*, 2016) inspirada no labirinto em cruz elevada para roedores (Pellow, Chopin, File & Briley, 1985) e no teste de mergulho do tanque novo para peixes. O teste consiste em um aquário em forma de cruz com dois braços planos e dois braços com rampas, onde o peixe ao explorar o aparato tende a preferir os braços planos e mais profundos. Como observado no teste de mergulho no tanque novo, a exposição a novos ambientes provoca

o comportamento de mergulho para o fundo do tanque, para então, gradativamente o peixe explorar as camadas mais superiores do aquário (Levin, Bencan & Cerutti, 2007; Gerlai, Lahav, Guo, Rosenthal, 2000). Mergulhar na parte inferior do dispositivo representa uma medida de ansiedade (Blaser & Goldsteinholm, 2012), esse comportamento é equivalente a escototaxia Tingmotaxia no teste de preferência claro/escuro de cambo aberto e representa um conjunto de ações defensivas associadas à exposição do animal a um novo ambiente (McNaughton & Corr, 2004).

No labirinto em cruz elevado, quando roedores são expostos ao aparato a sua tendência é de entrar nos braços fechados e permanecer a maior parte do tempo, já que, possuem paredes laterais e são menos aversivas ao roedor do que os braços abertos. A entrada e permanência nos braços fechados é considerado como uma medida de ansiedade (Pellow *et al.*, 1985). A administração de drogas ansiolíticas como os benzodiazepínicos tende a aumentar significativamente o número de entradas e o tempo de exploração dos braços abertos, enquanto que fármacos ansiogênicos como anfetaminas reduzem as entradas e a exploração dos braços abertos (Pellow & File, 1986; Hogg, 1996).

Esse mesmo princípio é percebido no LCR, os braços planos representam ambientes mais seguros, por permitir a fuga para as porções mais profundas (Blaser, Goldsteinholm, 2012) e por esse motivo o *D. rerio* passa mais tempo nessa região, fazendo pequenas incursões para sondar os braços com rampa (Walsh-Monteiro *et al.*, 2016). O LCR possui um região central na intercessão dos quatro braços que deve ser levado em consideração quanto a coleta de dados devido ao seu tamanho e a proporção dos animais testados. A aplicação de fármacos ansiolíticos altera a preferência pelos

braços planos, fazendo com que os peixes entrem mais vezes e permaneçam por mais tempo nos braços com rampa (Walsh-Monteiro *et al.*, 2016).

Neste estudo serão utilizados: o teste de preferência claro/escuro, um protocolo já bem definido como modelo de ansiedade; o teste de inspeção de predador para avaliar a sensibilidade dos sujeitos ao medo após as condições de alojamento; e o labirinto em cruz com rampa como um protocolo misto de medo e ansiedade, onde a preferência pelos braços planos em detrimento aos braços com rampa configura um comportamento defensivo, e a exploração dos braços com rampa como um índice da percepção do sujeito da distância defensiva, em que, as porções mais altas da rampa representam um ambiente perigoso.

2. Objetivo

Avaliar os efeitos do alojamento em diferentes densidades por litro, por diversos tempos de exposição, na resposta de ansiedade mensurada nos testes de preferência Claro/Escuro, Teste de Inspeção de Predador e Labirinto em Cruz com Rampa em peixes da espécie *Danio rerio*.

3. Materiais e Métodos

a. Sujeitos

Peixes *Danio rerio* (216 sujeitos) experimentalmente ingênuos, adquiridos em petshops locais de sexo e idade indeterminados, divididos em 18 grupos (n=8) segundo o tempo de alojamento (1, 7 ou 30 dias) e densidade de alojamento variada (1 sujeito por aquário; 2 sujeito/aquário; 4 sujeitos/aquário; 8 sujeito/aquário, 16 sujeito/aquário e 24 sujeito/ aquário) .Nos grupos de 16 e 24 sujeitos apenas 8 foram testados, sendo que

os demais peixes são os confederados, permanecendo no aquário para perfazer a população do grupo (total de 72 confederados). Cada grupo contou com um conjunto de confederados diferentes não havendo reutilização destes animais.

b. Alojamento

Os animais foram habituados por duas semanas em aquários coletivos de 4 Litros (n=10) em aparato próprio (ZebTEC rack - Tecniplast), sob condições de luz (10/14h início da luz as 6h) e temperatura estáveis ($28^{\circ} \pm 2^{\circ}\text{C}$), alimentados com ração comercial (Tetra Colors, Tetra Alemanha) 1 vez ao dia, pH mantido em 7 ± 2 Ph e condutividade 586 S. E depois separados segundo condições experimentais descritas. (Tabela 1)

Tabela 1: Distribuição dos grupos de sujeitos, conforme densidades e tempos de alojamento, indicando o número de sujeitos em cada aquário e o número de sujeitos testados de cada grupo, bem como número de confederados (alojados, mas não testados).

Densidade Peixes/Litro	Peixes por Aquário	Tempo de Alojamento		
		1 dia	7 dias	30 dias
		(nº de testados)	(nº de testados)	(nº de testados)
0,25 Peixes/Litro	1	8 testados	8 testados	8 testados
0,5 Peixes/Litro	2	8 testados	8 testados	8 testados
1 Peixes/Litro	4	8 testados	8 testados	8 testados
2 Peixes/Litro	8	8 testados	8 testados	8 testados
4 Peixes/Litro	16	8 test. + 8 confederados	8 test. + 8 confederados	8 test. + 8 confederados
6 Peixes/Litro	24	8 test. + 16 confederados	8 test. + 16 confederados	8 test. + 16 confederados

c. Aparatos de teste

Teste de preferência Claro escuro: um aquário retangular medido 15 cm x 10 cm x 45 cm, onde metade do tanque constituía o compartimento branco e a outra

metade o compartimento preto. O aparato contém duas portinholas centrais deslizantes com a cor de cada lado (15cm × 10cm × 10 cm). Os tanques foram iluminados por spots de luz, evitando o reflexo sobre a água e sombras. A coluna de água foi mantida a 10 cm durante todos os testes.

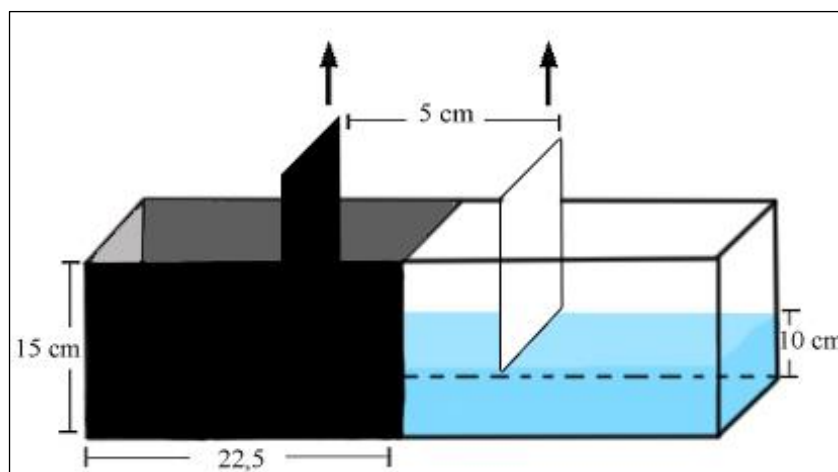


Imagem 1: Imagem ilustrativa do aquário de teste de preferência Claro/Escuro, consiste em um aquário retangular dividido em dois compartimentos, um preto e um branco, possuindo ainda um compartimento central (área de início de sessão) onde animal é mantido por 5 minutos antes do teste se iniciar. Fonte de autor.

Teste de Inspeção de predador: O Teste de Inspeção de Predador (Imagem 2) foi realizado em um aquário triangular com vértices 30x30x24 cm e 23 cm de profundidade, contendo uma portinhola separando 1/3 do aquário, este compartimento será o Compartimento de Início. Na base do aparato foram marcadas três linhas paralelas entre si em relação ao predador, delimitando quatro pontos de distância utilizado para registrar os níveis de aproximação ao estímulo. No lado de fora do aparato foi posto um aquário contendo um predador.

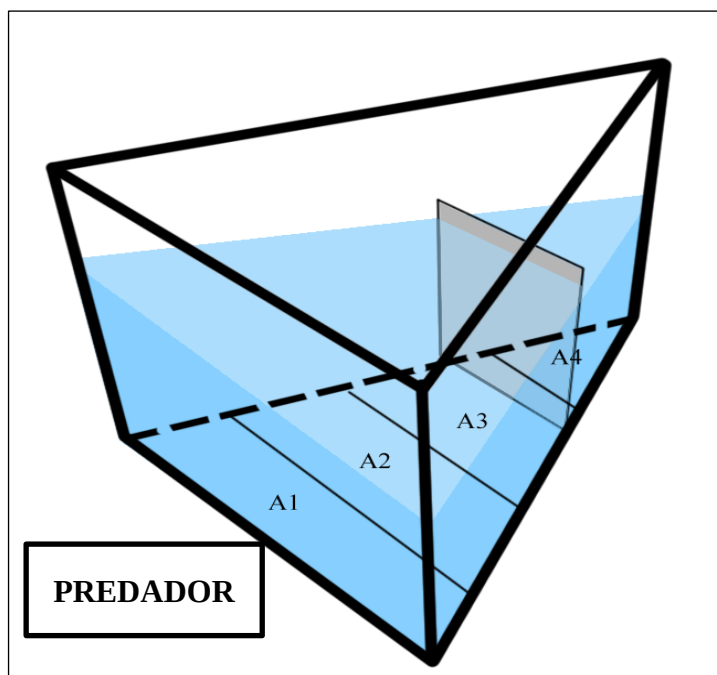


Imagem 2: Imagem ilustrativa do aquário de teste de inspeção de predador. O aquário possui um formato triangular apresentando marcações no fundo dividindo-o em quatro quadrantes. O teste dura 10 minutos sendo que nos primeiros 5 minutos o animal passa dentro do compartimento de início que se encontra na porção final do aparato, após esse período a portinhola será retirada e o sujeito poderá explorar todo o aquário. Fonte de autor.

Labirinto em cruz com rampa: Trata-se de um aparato com forma de cruz medindo 45 cm de comprimento total por 10 cm de largura em cada braço e 15cm de altura. Cada um dos quatro braços possui 17,5cm de comprimento, de maneira que exista um compartimento central de interseção entre os braços medindo 10x10cm. Dois braços opostos possuem rampas partindo do início do braço, partindo do fim da zona de interseção e terminando na parede de fundo do referido braço. A inclinação da rampa é de $18^{\circ}66'$, estando assim a uma altura de 6cm em relação ao piso na parede de fundo do

braço. Os outros dois braços opostos não apresentam rampas, sendo classificados como braços de fundo plano. E a coluna de água foi mantida a 10 cm durante todo o teste.

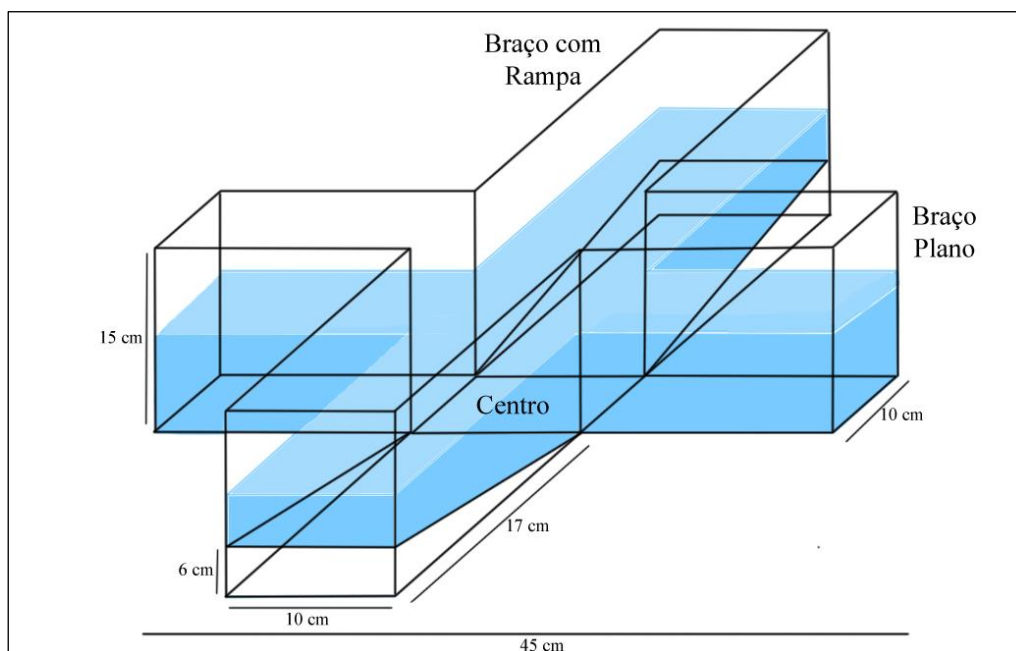


Imagem 3: Imagem ilustrativa do aquário de teste do labirinto em cruz com rampa. O aparato consiste basicamente em um aquário em forma de (+) que possui uma região central, dois braços planos e dois braços com rampa que se iniciam na entrada do braço e sobe a uma altura de 6 cm em relação ao fundo do aquário. Fonte de autor.

4. Procedimentos

a. Procedimentos gerais

Após período de exposição às condições de agrupamento os animais foram submetidos individualmente à cada um dos testes de maneira balanceada em cada grupo. Os animais tiveram um intervalo de dez minutos isolados entre um teste e outro para evitar efeitos de teste sobre teste (Tabela 2). Durante o intervalo os animais permaneceram isolados em um aquário similar ao que estiveram alojados. Todas as sessões foram registradas em vídeo para posterior análise.

Tabela 2: Sequencia de Testes e intervalos aplicados no experimento. Todos os animais passaram por três testes, havendo um intervalo de 10 minutos entre cada um deles para evitar efeito de um teste sobre o outro. (CE) Claro/Escuro; (IP) Inspeção de Predador; (LCR) Labirinto em Cruz com Rampa.

Animais		Sequencia de testes e intervalos			
Sujeito 1	CE (20min)	Intervalo (10min)	LCR (5min)	Intervalo (10min)	IP (10min)
Sujeito 2	CE (20min)	Intervalo (10min)	LCR (5min)	Intervalo (10min)	IP (10min)
Sujeito 3	LCR (5min)	Intervalo (10min)	IP (10min)	Intervalo (10min)	CE (20min)
Sujeito 4	CE (20min)	Intervalo (10min)	IP (10min)	Intervalo (10min)	LCR (5min)
Sujeito 5	LCR (5min)	Intervalo (10min)	CE (20min)	Intervalo (10min)	IP (10min)
Sujeito 6	IP (10min)	Intervalo (10min)	CE (20min)	Intervalo (10min)	LCR (5min)
Sujeito 7	CE (20min)	Intervalo (10min)	LCR (5min)	Intervalo (10min)	IP (10min)
Sujeito 8	CE (20min)	Intervalo (10min)	LCR (5min)	Intervalo (10min)	IP (10min)

b. Teste de preferência claro/escuro

Cada peixe foi colocado no compartimento central por um período de habituação de 5 minutos. Após esse tempo as portinholas foram levantadas e o animal pode explorar o aquário por 15 minutos. Toda sessão foi filmada para posterior análise e foi contabilizado o tempo de permanência em cada compartimento e o número de cruzamentos da linha central.

c. Teste de inspeção de predador

O sujeito foi colocado no Compartimento de início com a portinhola fechada permanecendo pelo período de 5 minutos, após esse tempo a porta foi retirada e o animal teve 5 minutos para explorar o tanque. Foram analisados 10min de teste (5min no compartimento de início e mais os 5min de teste com estímulo) e a contagem dos níveis de aproximação contabilizada a partir do segundo momento (5min com estímulo) registrando sempre com passagem de 2/3 do animal.

d. Teste do labirinto em cruz com rampa

O peixe foi depositado no centro do labirinto e puderam explorar o aparato pelo tempo de 5 minutos. Foram contabilizados o número de entrar em cada um dos compartimentos Braços Planos, Braços com Rampa e o Centro, e o tempo de permanência em cada um deles.

5. Análises estatística

As amostras formaram testadas para normalidade (teste de Kolmogorov-Smirnov), como a condição foi atendida, os grupos foram comparados segundo Tempo, Densidade de alojamento e a sua interação Densidade X Tempo por ANOVA de duas vias, seguido de teste pos-hoc (Teste de Tukey).

6. Resultados

Os resultados foram agrupados em 4 condições para análise: Tempo, Densidade Geral, Densidades e Densidade X Tempo. Nas comparações entre Tempo todos os grupos de um mesmo período foram agrupados independentemente das condições de densidade para avaliarmos somente o efeito do tempo. Nas condições de Densidade Geral, todos os grupos de uma mesma densidade foram agrupados independentemente do tempo de alojamento (ex.: todos os grupos alojados em densidade de 2 peixes/litro foram tratado em um mesmo grupo). Na condição de Densidade foi avaliado o efeito da densidade de alojamento sobre os grupos alojados por um mesmo período de tempo (ex.: comparação entre os as densidades 0,25 peixes/litro e 6 peixes/litro alojados pelo período de 7 dias). E a condição Densidade X Tempo, foi comparado o efeito do tempo entre grupos alojados na mesma densidade (ex.: a comparação feita entre os grupos alojados por 1 e 7 dias na densidade de 2 peixes/litro).

a. Preferência Claro/Escuro

O alojamento dos animais em diferentes densidades e a variação do tempo de exposição a essas condições não alteraram a variável Tempo de Permanência no compartimento escuro para as variáveis: Tempo (T), Densidade Geral (D) e sua interação (Densidade X Tempo – I) T: [F(2,124)=0,788, p=0,450], D: [F(5, 124)=1.905, p=0,09], I: [F(10, 124)=0,690, p=0,730] (Figura 1-A, B e C).

Contudo, foram encontradas diferenças estatísticas na atividade locomotora para as comparações entre Tempos [F(2, 124)=4.746, p=0,010] entre os dias 1 e 30 (Figura 2-A). Também foram encontradas diferenças no número de cruzamentos para a relação Densidade X Tempo [F(10, 124)=2.333, p=0,015], entre os grupos alojados por 1 dia em densidade de 2 p/l (peixes/litro) e 30 dias em densidade de 2 p/l e ainda entre os

grupos alojados por 1 dia em densidade de 2 p/l e 7 dias em densidade de 2 p/l em que o grupo alojados por 1 dia em densidade de 2 p/l apresentou um maior número de entradas que os grupos com maior tempo de exposição (7 e 30 dias). Do mesmo modo a análise mostrou diferenças entre os grupos 1 dias em densidade de 6 p/l e 30 dias em densidade de 6 p/l e entre os grupos 7 Dias em densidade de 6 p/l e 30 Dias em densidade de 6 p/l onde os grupo de 30 Dias em densidade de 6 p/l mostrou redução na taxa de cruzamentos (Figura 2-C). Não foram encontradas diferenças entre Densidades [F(5, 124)=1.463, p=0,20] (Figura 2-B).

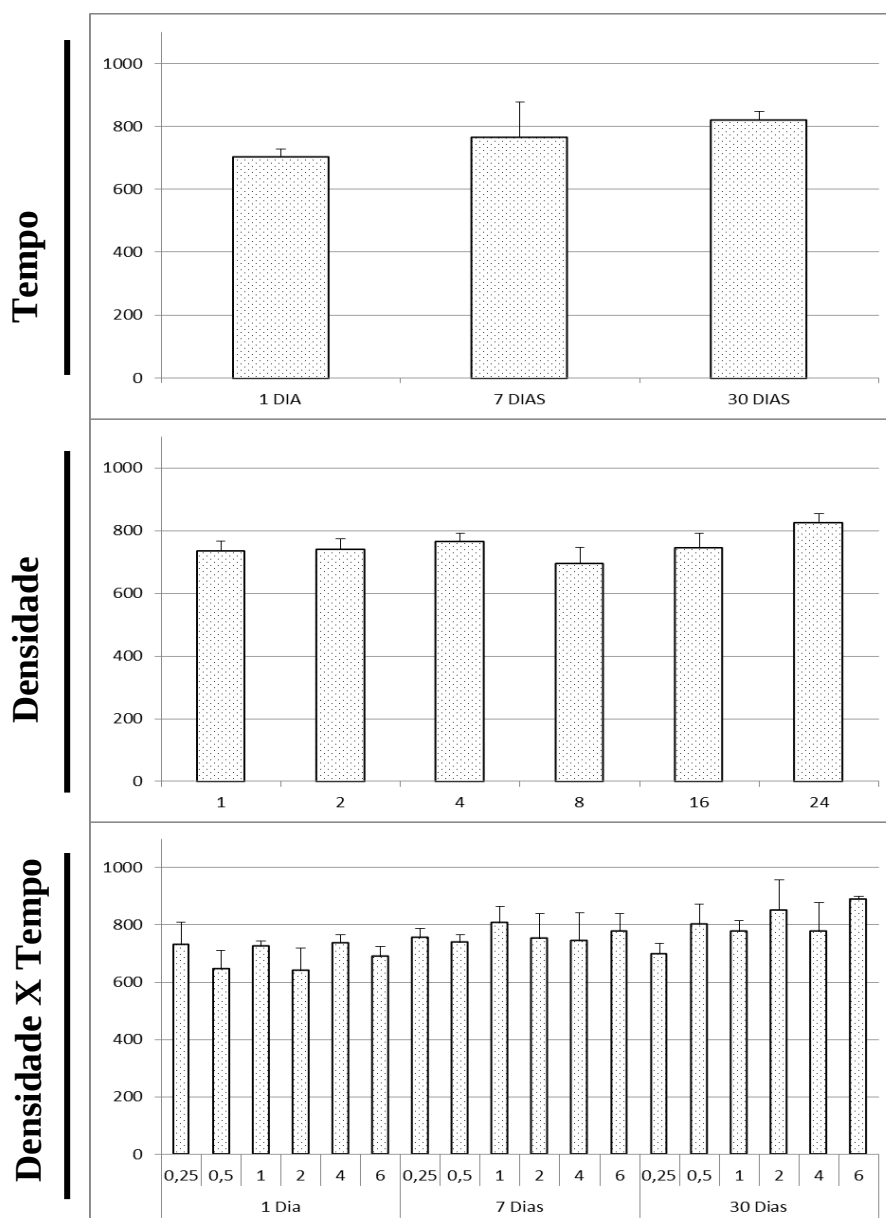


Figura 1: Resultados obtidos no teste de Preferência Claro/Escuro. O aparato consiste em um aquário dividido em dois compartimentos (um branco e um preto) de modo que optamos por utilizar somente os dados de exploração no compartimento escuro. (A) Tempo de permanência no compartimento escuro entre os grupos alojados por diferentes períodos de tempo – 1, 7 e 30 dias. (B) Tempo de permanência no compartimento escuro entre grupos alojados por diferentes densidades de alojamento (1, 2, 4, 8, 16, 24). (C) Tempo de permanência no compartimento escuro na interação Densidade X Tempo. (*) Significância $p \leq 0,05$ – Teste de Tukey.

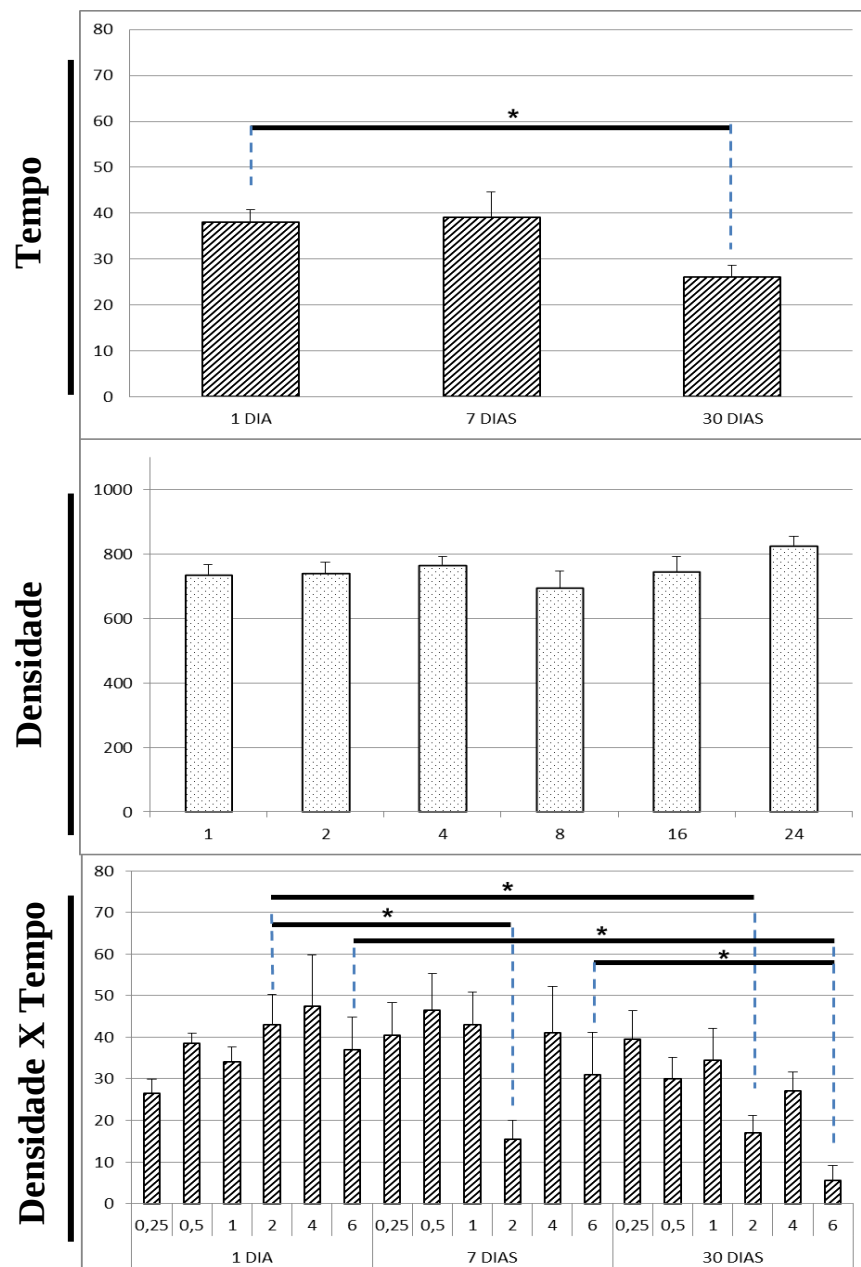


Figura 2: Resultados da atividade motora no teste de preferência claro/escuro, obtidos a partir do número de cruzamentos da linha central do aparato. (A) Número de cruzamentos da metade central do aparato entre grupos alojados por diferentes períodos de tempo – 1 7 e 30 dias; (B) Número de cruzamentos da metade central do aparato entre grupos alojados em diferentes densidades de alojamento – 1, 2, 4, 8, 16 e 24 sujeitos por aquário; (C) Número de cruzamentos da metade central do aparato na interação Densidade X Tempo. (*) Significância $p \leq 0,05$ – Teste de Tukey.

b. Inspeção de Predador

O tratamento não alterou o Tempo de Permanência no teste de Inspeção de Predador, na análise entre Tempos [$F(2,123)=0,109$, $p=0,890$] (Figura 3-A) nem sobre Densidades Geral [$F(5, 123)= 1,114$, $p=0,350$] (Figura 3-B).

Do mesmo modo não foram registradas diferenças na interação Densidade X Tempo para o tempo de permanência entre os quadrantes do Teste de IP [$F(10, 123)= 1,468$, $p=0,150$] (Figura 4-A, B, C e D). Tampouco, foi observado diferenças significativas no tempo gasto em cada quadrante entre as Densidades de um mesmo período de tempo, no entanto, é possível observar um padrão de exploração maior no quadrante A3 em todos os três grupos (Figura 5- A, B, C).

Para a atividade locomotora no Teste de Inspeção de Predador os dados indicam ausência do efeito do Tempo de alojamento [$F(2, 123)= 0,290$, $p= 0,740$] (Figura 6-A), havendo um efeito da Densidade Geral [$F(5, 123) = 3.807$, $p=0,003$] (Figura 6-B) e sem interação Densidade X Tempo [$F(10, 123)= 1,124$, $p= 0,170$] (Figura 7-A, B, C e D). O pós teste indica diferenças na Densidade Geral nos grupos com densidade de 0,25 p/l entrando mais vezes nos quadrantes A2 e A3 que o grupo com densidade de 6 p/l (Figura 6-B).

Não foram observadas diferenças significativas entre os grupos alojados em Densidades diferentes de um mesmo período de tempo (1, 7 e 30 dias) (Figura 8- A, B e C)

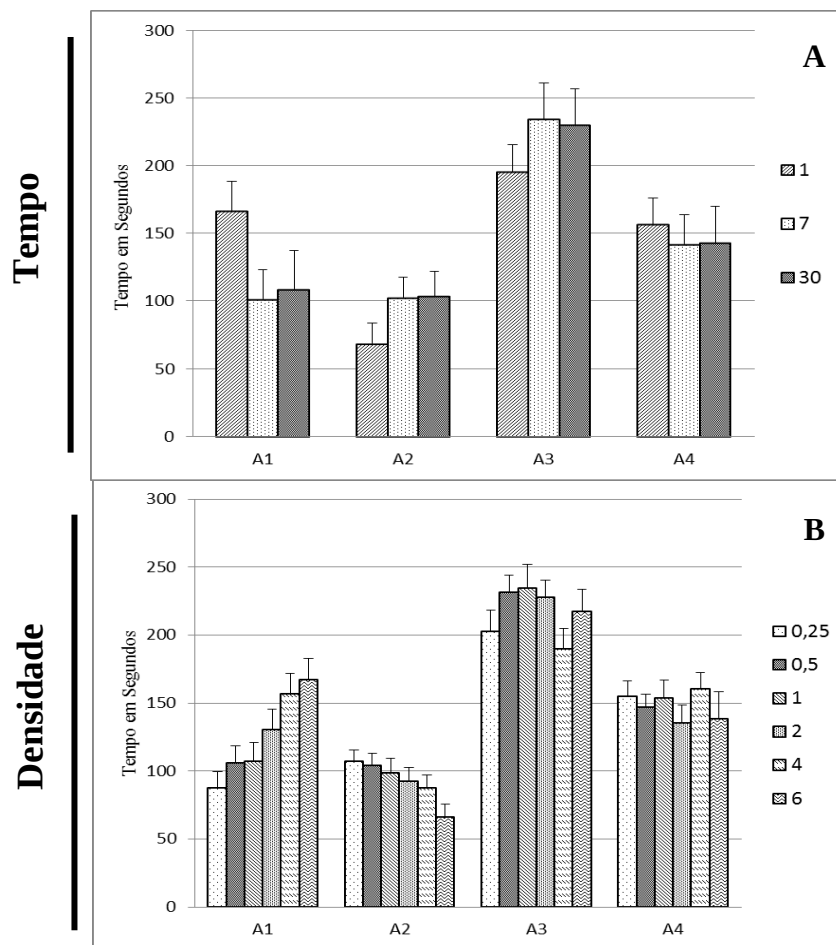


Figura 3: Resultados para o tempo de permanência no teste de inspeção de predador. O aparato é dividido em quatro quadrantes sendo A1 o mais próximo ao predador e A4 o mais distante. (A) Tempo de permanência em cada uns dos quatro quadrantes entre grupos alojados por diferentes períodos de tempo – 1 7 e 30 dias; (B) Tempo de permanência em cada um dos quatro quadrantes entre grupos alojados em diferentes densidades – 1, 2, 4, 8, 16 e 24 sujeitos por aquário. (*) Significância $p \leq 0,05$ – Teste de Tukey.

Densidade X Tempo

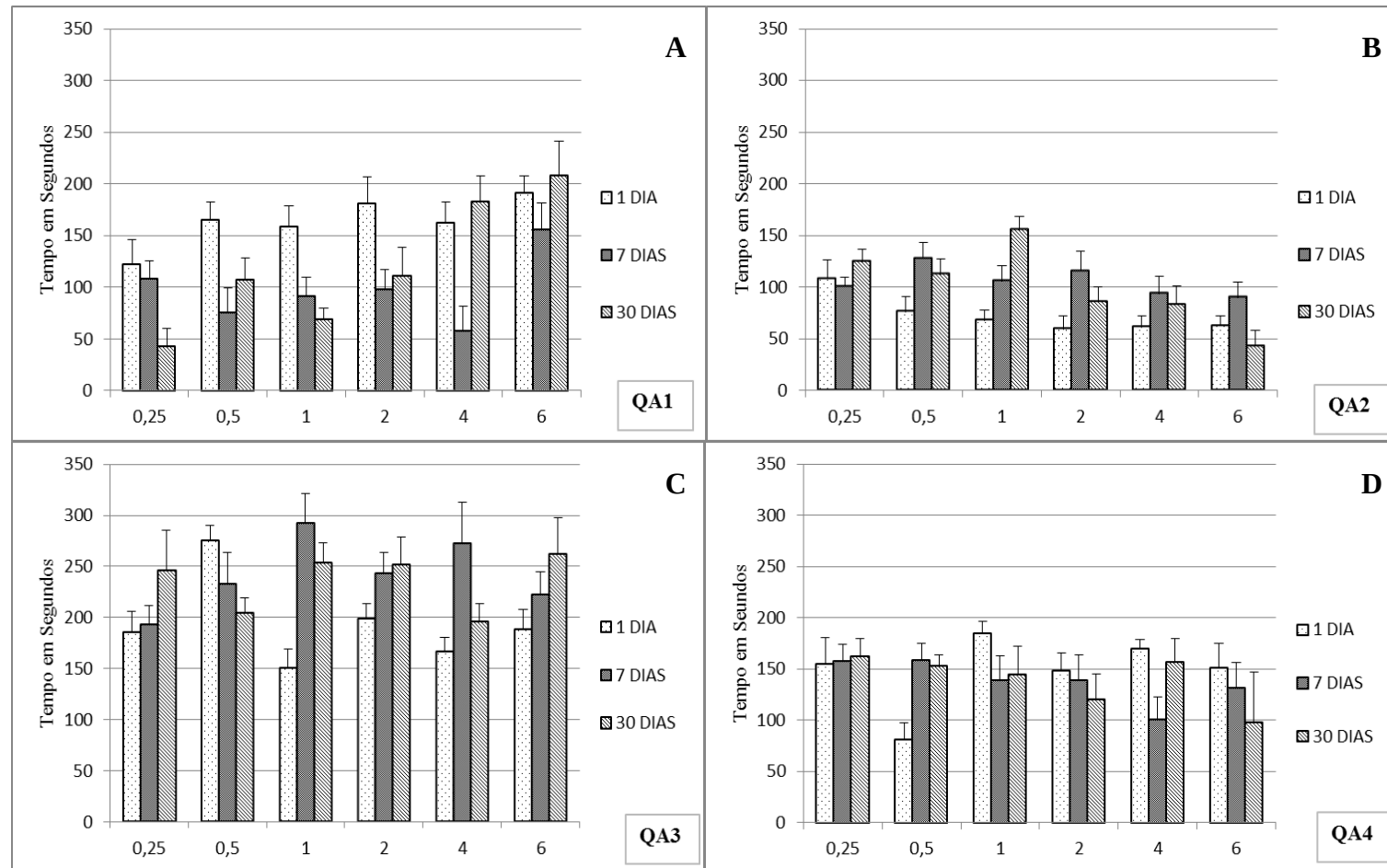


Figura 4: Resultados para o tempo de permanência no teste de inspeção de predador na interação Densidade X Tempo. O aparato é dividido em quatro quadrantes sendo QA1 o mais próximo ao predador e QA4 o mais distante. Cada gráfico apresentam os dados obtidos em um dos quatro quadrantes. (*) Significância $p \leq 0,05$ – Teste de Tukey.

Densidade

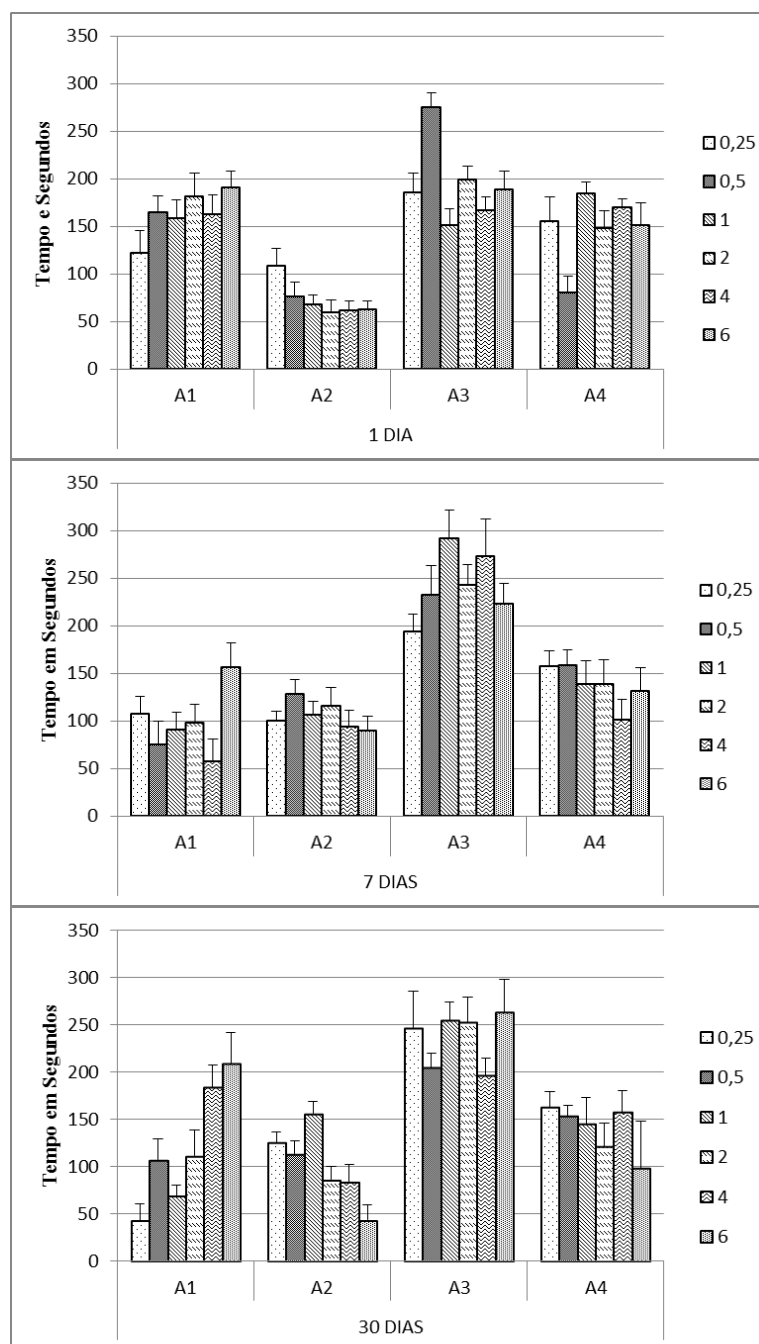


Figura 5: Resultados para o tempo de permanência no teste de inspeção de predador. O aparato é dividido em quatro quadrantes sendo A1 o mais próximo ao predador e A4 o mais distante. Cada gráfico representa um grupo que foi alojado por períodos de tempo diferentes e dividido em seis subgrupos que variaram nas densidades de alojamento. (A) Tempo de permanência para os grupos alojados por diversas densidades pelo período de 1 dia; (B) Tempo de permanência para os grupos alojados por diversas densidades pelo período de 7 dia; (C) Tempo de permanência para os grupos alojados por diversas densidades pelo período de 30 dias. (*) Significância $p \leq 0,05$ – Teste de Tukey.

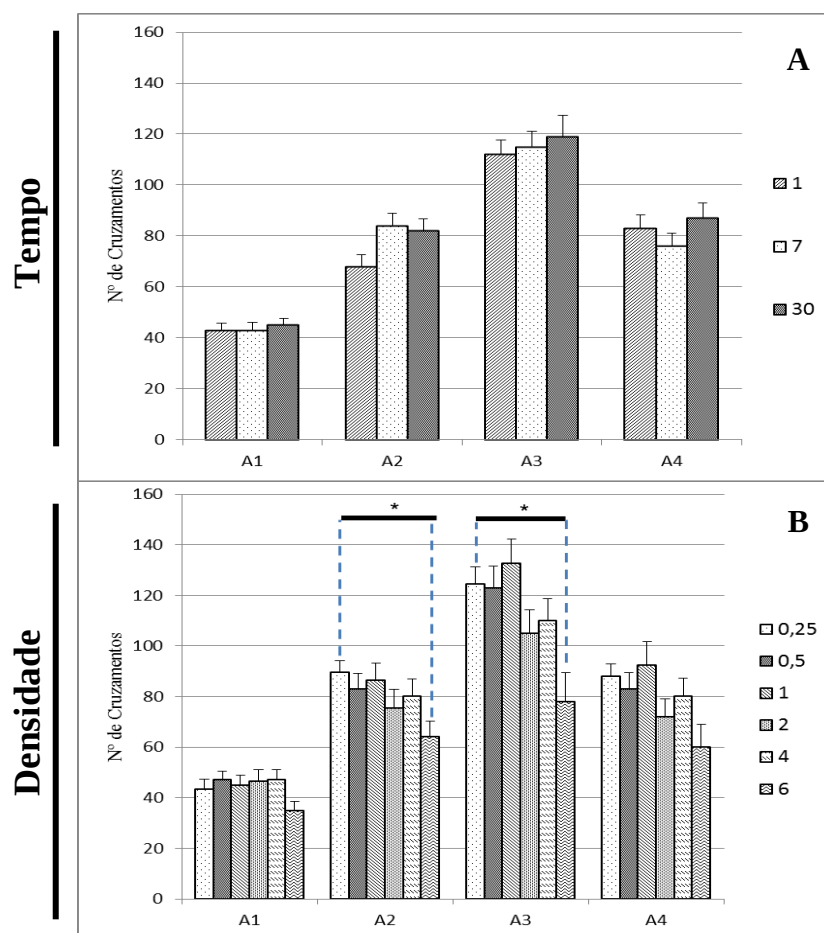


Figura 6: Resultados da atividade motora no teste de inspeção de predador. O aparato é dividido em quatro quadrantes sendo A1 o mais próximo ao predador e A4 o mais distante. A atividade motora foi registrada considerando uma entrada sempre quando 2/3 do corpo do animal cruzou a linha que define o limite de cada quadrante. (A) Resultados para o número de entradas em cada quadrante em grupos alojados por diferentes períodos de tempo – 1, 7 e 30 dias; (B) Resultados para o número de entradas em cada quadrante em grupos alojados em diferentes densidades – 1, 2, 4, 8, 16 e 24 sujeitos por aquário. (*) Significância $p \leq 0,05$ – Teste de Tukey.

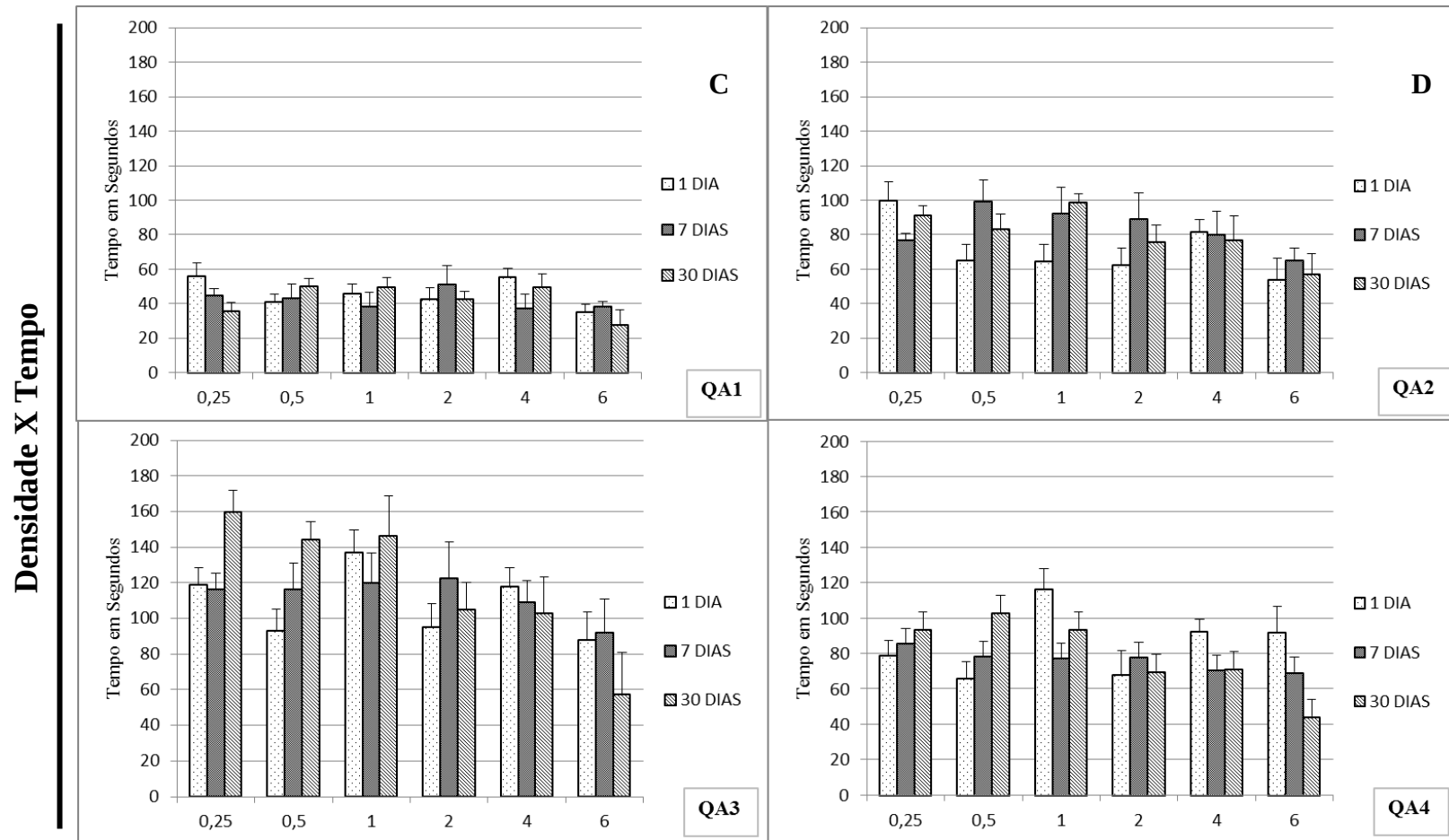


Figura 7: Resultados da atividade motora no teste de inspeção de predador na interação Densidade X Tempo. O aparato é dividido em quatro quadrantes sendo QA1 o mais próximo ao predador e QA4 o mais distante. A atividade motora foi registrada considerando uma entrada sempre quando 2/3 do corpo do animal cruzou a linha que define o limite de cada quadrante. Cada gráfico apresentam os dados obtidos em um dos quatro quadrantes. (*) Significância $p \leq 0,05$ – Teste de Tukey.

Densidade

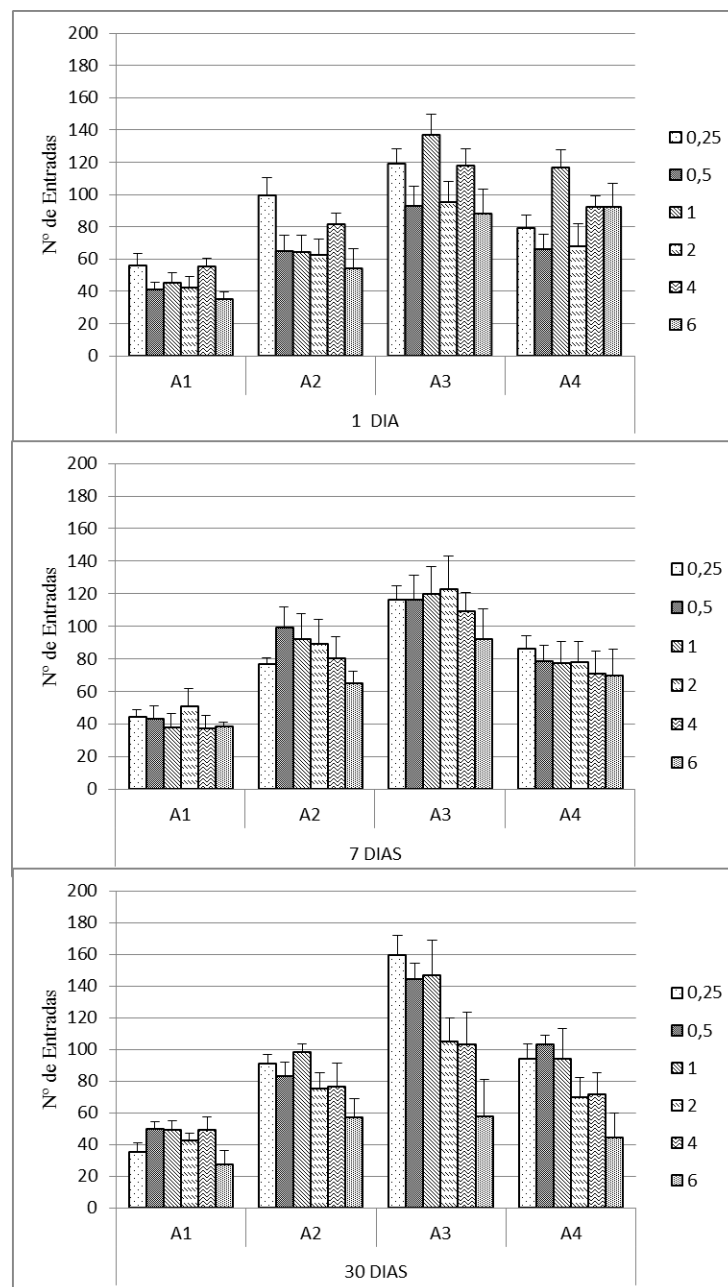


Figura 8: Resultados da atividade motora no teste de inspeção de predador. O aparato é dividido em quatro quadrantes sendo QA1 o mais próximo ao predador e QA4 o mais distante. A atividade motora foi registrada considerando uma entrada sempre quando 2/3 do corpo do animal cruzou a linha que define o limite de cada quadrante. Cada gráfico representa um grupo que foi alojado por períodos de tempo diferentes e dividido em seis subgrupos que variaram nas densidades de alojamento. (A) Número de cruzamentos para os grupos alojados por diversas densidades pelo período de 1 dia; (B) Número de cruzamentos para os grupos alojados por diversas densidades pelo período de 7 dia; (C) Número de cruzamentos para os grupos alojados por diversas densidades pelo período de 30 dias. (*) Significância $p \leq 0,05$ – Teste de Tukey.

c. Labirinto em Cruz com Rampa

Foram encontradas alterações no tempo gasto na Rampa para o parâmetro Tempo [$F(2, 124) = 4.537$, $p = 0,010$] onde os grupos alojados por 1 dia exploraram este compartimento e diferindo de forma significativa dos grupos de 7 dias e 30 dias (**Figura 9- A**). O tratamento alterou também o tempo nos compartimentos na análise da Densidade Geral com significância no tempo gasto na Rampa [$F(5, 124) = 3.649$, $p = 0,004$] entre os grupos com densidade de 0,25 p/l e 6 p/l, e também entre os grupos com densidade de 0,25 p/l e 2 p/l onde os grupos de maior densidade passaram menos tempo explorando a Rampa e de modo complementar estes mesmos grupos gastaram mais tempo nos braços Planos [$F(5, 124) = 2.916$, $p = 0,010$] com diferenças significativas entre as densidades 0,25 p/l e 6 p/l e entre as densidades 0,5 p/l e 6 p/l (**Figura 9-B**). Contudo não foi observado interação entre Densidade X Tempo para o tempo na Rampa e no Plano – respectivamente [$F(10, 124) = 0,507$, $p = 0,88$], [$F(10, 124) = 0,943$, $p = 0,490$] (**Figura 10-A, B e C**).

No compartimento Central não foi encontradas diferenças significativas para nenhuma das análises; Tempo, Densidade Geral, e Densidade X Tempo – T: [$F(2, 124) = 1.418$, $p = 0,240$], D: [$F(5, 124) = 0,228$, $p = 0,950$], I: [$F(10, 124) = 1.290$, $p = 0,240$] (**Figura 9, 10 e 11**).

Para a atividade locomotora a relação entre os grupos alojados em diferentes períodos de Tempo foi encontrada diferença no número de entradas no Centro [$F(2, 124) = 5.763$, $p = 0,004$], com os grupos alojados por 1 dia cruzando significativamente mais vezes que o grupo alojados por 7 dias (**Figura 12-A**). No compartimento Plano foi observado aumento no número de entradas nos grupos alojados por 1 e 30 dias com relação ao alojado 7 dias [$F(2, 124) = 4.534$, $p = 0,010$] (**Figura 12-A**). Não foi observado

diferença significativa no número de entradas para os grupos de diferentes períodos de alojamento na Rampa.

Também foram encontradas diferenças estatísticas na Densidade no quesito entradas na: Rampa, $F(5, 124) = 2.649$, $p=0,02$] para o grupo de 7 Dias em que o grupo alojado em densidade de 0,25 p/l entrou significativamente mais vezes neste compartimento que os grupos alojados em densidade de 2 p/l e 6 p/l (Figura 14-B). Não foi encontrado diferenças significativas para entradas no Centro e Plano – respectivamente: $[F(5, 124)=1.848, p=0,100]$, $[F(5, 124)=1.430, p=0,210]$ (Figura 14-B), nem foi encontrado significância entre as densidades nos grupos de 1 Dia e 30 Dias (Figura 14-A e C).

Os dados mostraram interação entre Densidade X Tempo no número de entradas na Rampa $[F(10, 124)=2.035, p=0,030]$ o pós teste mostrou significância entre os grupos alojados em densidade de 2 p/l nos períodos 1 dia e 7 dias e nos grupos alojados em densidade de 6 p/l para os períodos de 1 dia e 30 dias e 1 um dia e 7 dias. Os grupos mantidos em densidades de 2 p/l e 6 p/l apresentaram aumento no número de entradas na Rampa quando comparados com os grupos de mesma densidade mas mantidos assim por mais tempo (Figura 13-A). Para os compartimentos Centro e Plano não foram encontradas diferenças (respectivamente: $[F(10, 124)=1.787, p=0,070]$, $[F(10, 124)=1.265, p=0,260]$).

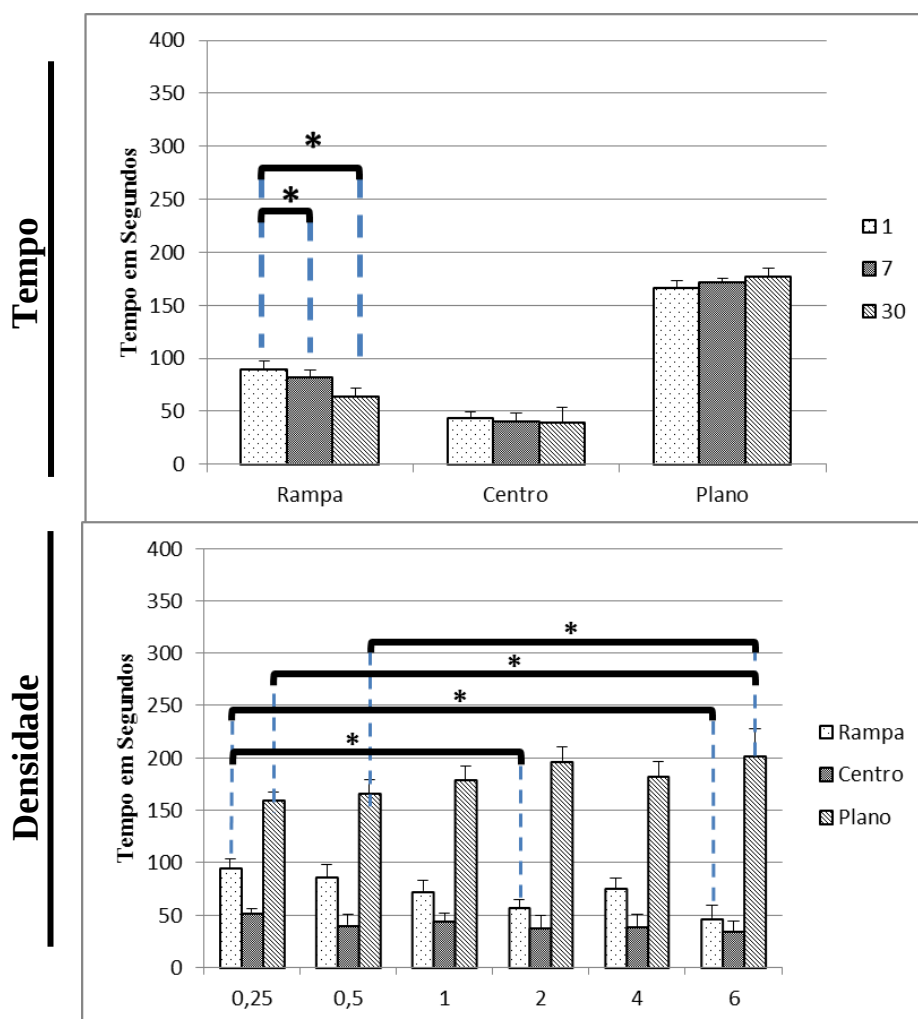


Figura 9: Resultados para o tempo de permanência no teste de labirinto em cruz com rampa. O *D. rerio*, e outras espécies que ocupam o mesmo nicho ecológico, tem aversão à superfície, pois em condições naturais podem ser atacados por predadores aéreos, por esse motivo os braços com rampa representam uma região de auto risco por forçar os peixes a superfície. (A) Tempo de permanência nos braços planos, braços com rampa e centro entre grupos alojados por diferentes períodos de tempo – 1 7 e 30 dias; (B) Tempo de permanência nos braços planos, braços com rampa e centro entre grupos alojados em diferentes densidades – 1, 2, 4, 8, 16 e 24 sujeitos por aquário. (*) Significância $p \leq 0,05$ – Teste de Tukey.

Densidade X Tempo

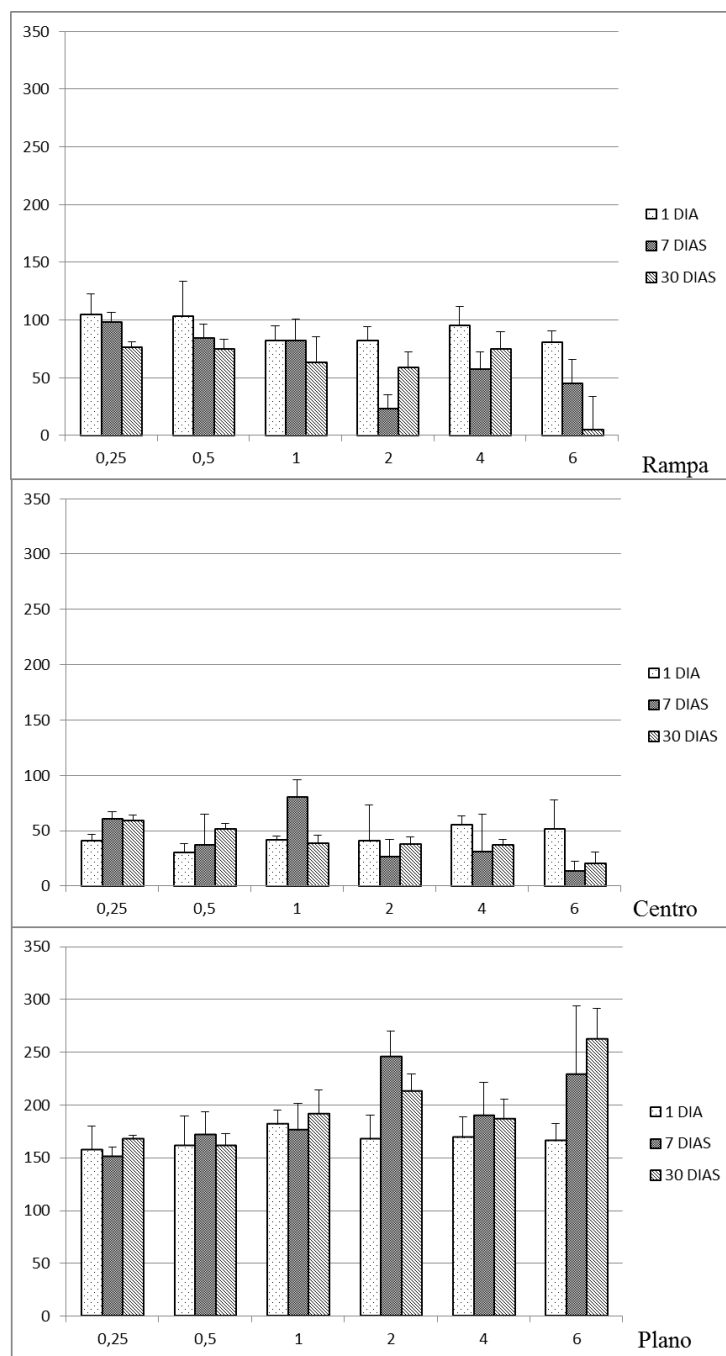


Figura 10: Resultados para o tempo de permanência no teste de labirinto em cruz com rampa na interação Densidade X Tempo. O *D. rerio*, e outras espécies que ocupam o mesmo nicho ecológico, tem aversão à superfície, pois em condições naturais podem ser atacados por predadores aéreos, por esse motivo os braços com rampa representam uma região de auto risco por forçar os peixes a superfície. Cada gráfico apresentam os dados obtidos em um dos compartimentos. (*) Significância $p \leq 0,05$ – Teste de Tukey.

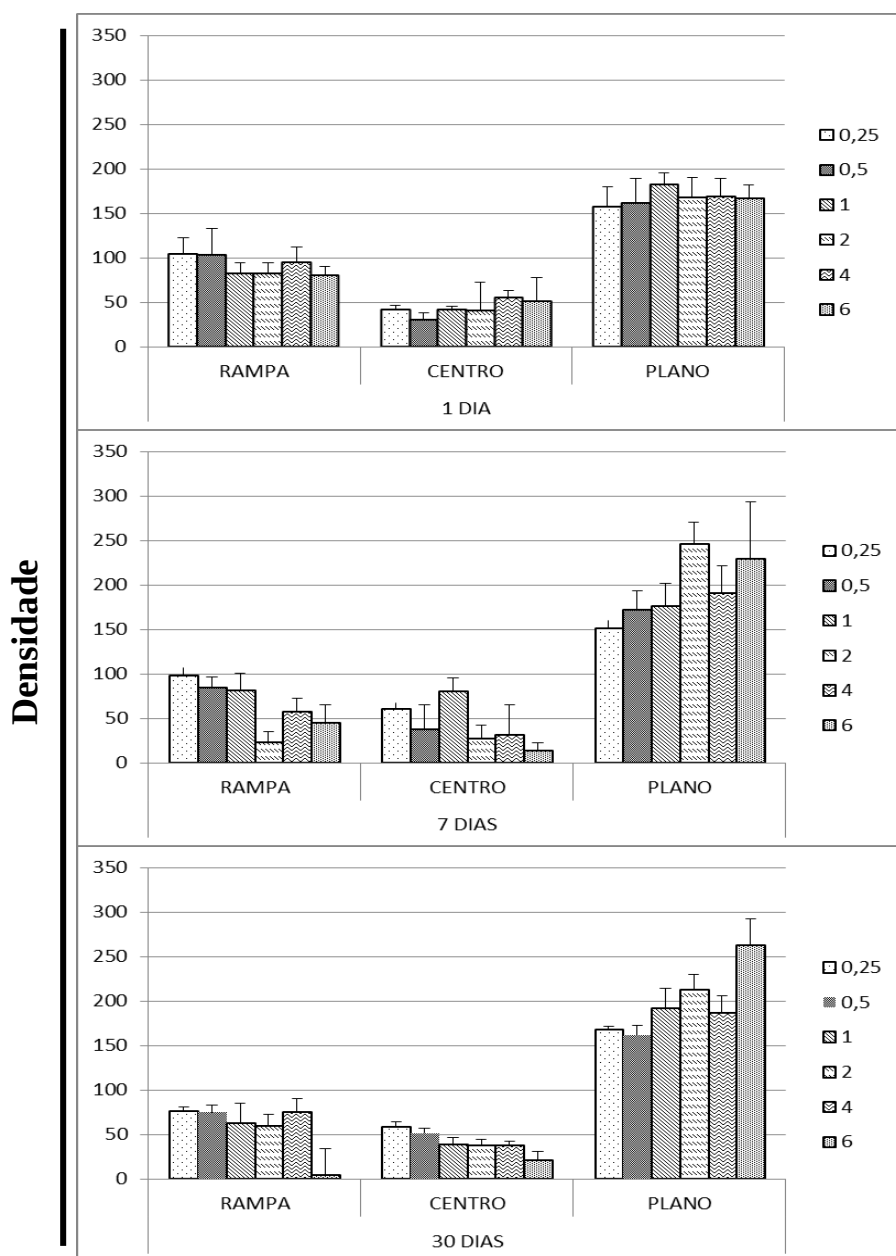


Figura 11: Resultados para o tempo de permanência no teste de labirinto em cruz com rampa. O *D. rerio* e outras espécies que ocupam o mesmo nicho ecológico tem aversão à superfície, pois em condições naturais podem ser atacados por predadores aéreos, por esse motivo os braços com rampa representam uma região de auto risco por forçar os peixes a essa região. Cada gráfico representa um grupo que foi alojado por períodos de tempo diferentes e dividido em seis subgrupos que variaram nas densidades de alojamento. (A) Tempo de permanência para os grupos alojados por diversas densidades pelo período de 1 dia; (B) Tempo de permanência para os grupos alojados por diversas densidades pelo período de 7 dia; (C) Tempo de permanência para os grupos alojados por diversas densidades pelo período de 30 dias. (*) Significância $p \leq 0,05$ – Teste de Tukey.

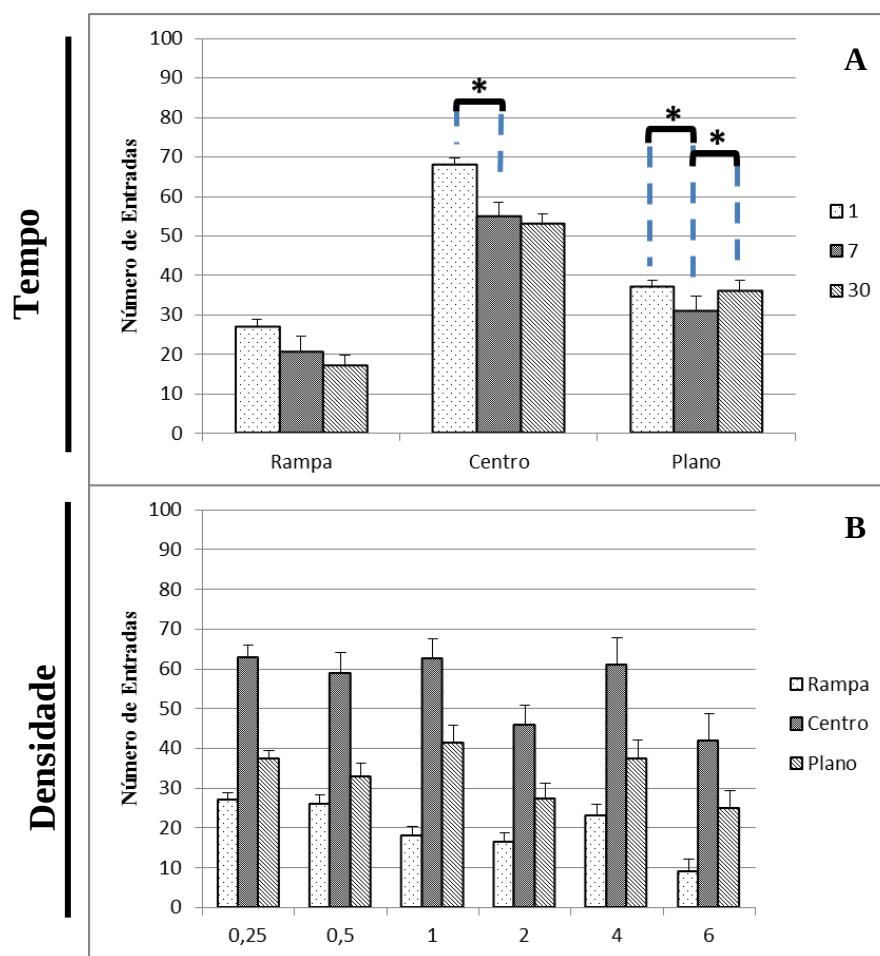


Figura 12: Resultados da atividade motora no teste labirinto em cruz com rampa. O aparato consiste em um aquário em forma de (+) contendo dois braços planos, dois braços com rampa e o centro. A atividade motora foi registrada considerando uma entrada sempre quando 2/3 do corpo do animal cruzou a linha que define o limite de cada compartimento. (A) Resultados para o número de entradas em cada quadrante em grupos alojados por diferentes períodos de tempo – 1, 7 e 30 dias; (B) Resultados para o número de entradas em cada quadrante em grupos alojados em diferentes densidades – 1, 2, 4, 8, 16 e 24 sujeitos por aquário. (*) Significância $p \leq 0,05$ – Teste de Tukey.

Densidade X Tempo

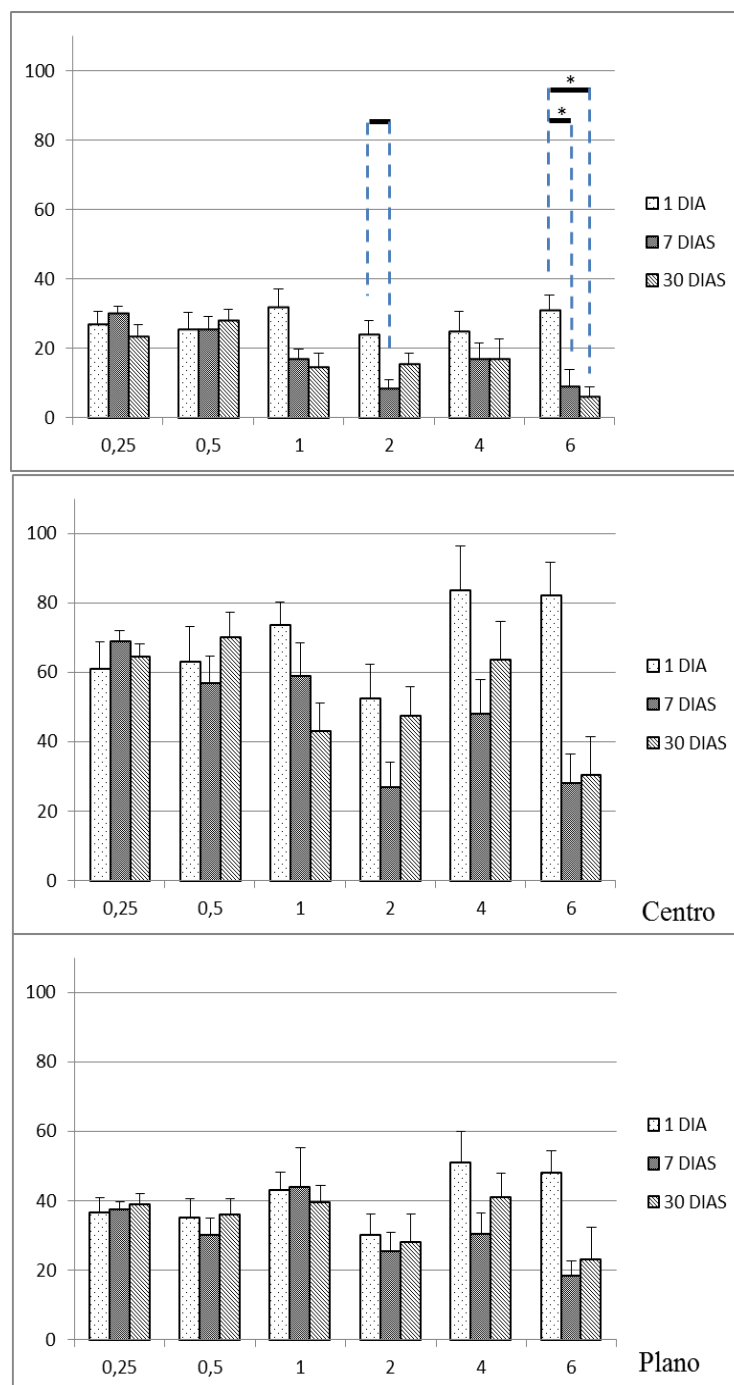


Figura 13: Resultados da atividade motora no teste labirinto em cruz com rampa na interação Densidade X Tempo. O aparato consiste em um aquário em forma de (+) contendo dois braços planos, dois braços com rampa e o centro. A atividade motora foi registrada considerando uma entrada sempre quando 2/3 do corpo do animal cruzou a linha que define o limite de cada compartimento. . Cada gráfico apresentam os dados obtidos em um dos compartimentos. (*) Significância $p \leq 0,05$ – Teste de Tukey.

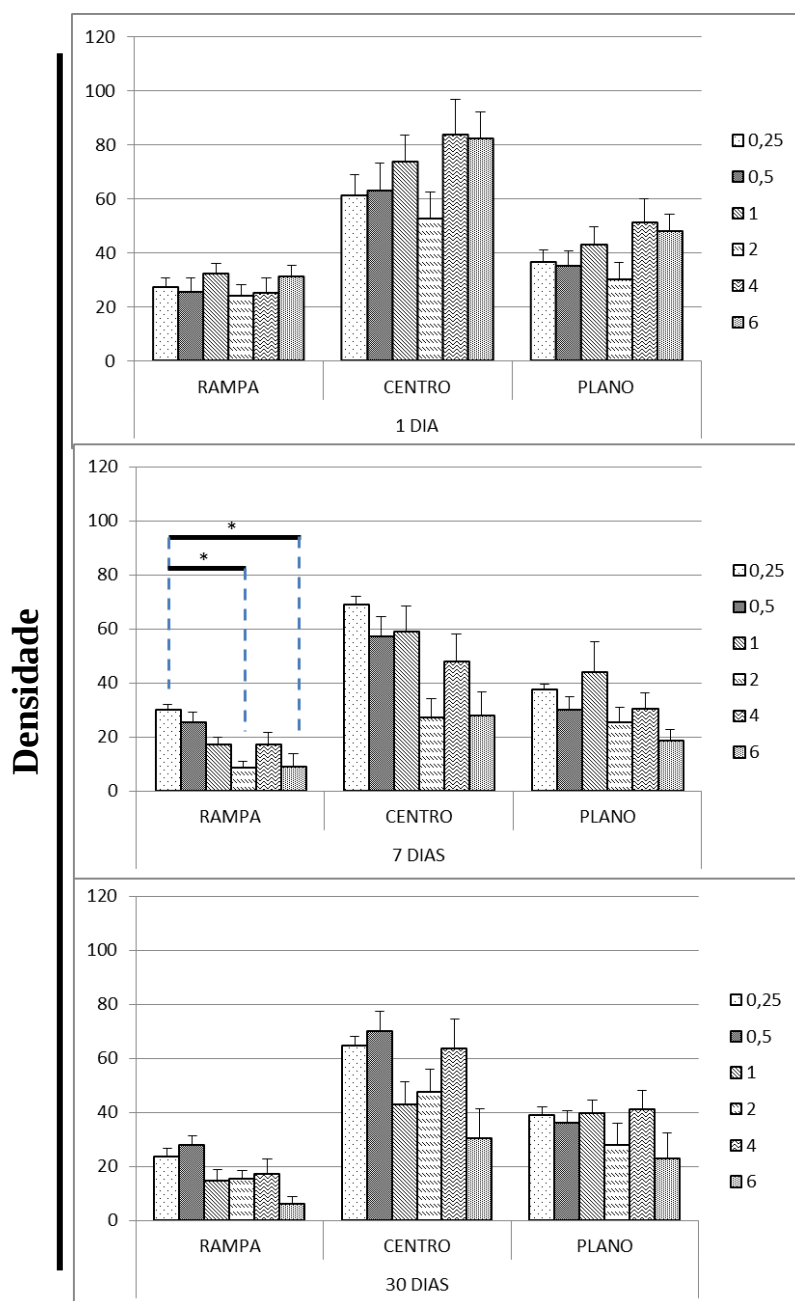


Figura 14: Resultados da atividade motora no teste labirinto em cruz com rampa. O aparato consiste em um aquário em forma de (+) contendo dois braços planos, dois braços com rampa e o centro. A atividade motora foi registrada considerando uma entrada sempre quando 2/3 do corpo do animal cruzou a linha que define o limite de cada compartimento. Cada gráfico representa um grupo que foi alojado por períodos de tempo diferentes e dividido em seis subgrupos que variaram nas densidades de alojamento. (A) Número de cruzamentos para os grupos alojados por diversas densidades pelo período de 1 dia; (B) Número de cruzamentos para os grupos alojados por diversas densidades pelo período de 7 dia; (C) Número de cruzamentos para os grupos alojados por diversas densidades pelo período de 30 dias. (*) Significância $p \leq 0,05$ – Teste de Tukey.

7. Discussão

O objetivo do nosso trabalho foi avaliar o efeito das condições de alojamento sobre o comportamento no *D. rerio*, ampliando o conhecimento sobre possíveis efeitos ambientais que reduzam o bem-estar dos animais criados em laboratório e possam alterar padrões comportamentais durante a coleta de dados. Visto que em alguns trabalhos o zebrafish é mantido isolado antes de serem expostos as condições experimentais (Tran, Chatterjee, Gerlai, 2014).

Os testes utilizados nesse estudo possuem duas dimensões: uma motora (número de cruzamentos e entradas) e outra afetiva (tempo gasto em cada compartimento); que nos permitem quantificar diferentes emoções (medo e ansiedade) já que cada um dos protocolos evoca uma parte da resposta defensiva (Micale, Kucerovala, Sulcova, 2013). A Tabela 2 sumariza os efeitos encontrados em nosso trabalho.

Tabela 2 Apresenta de forma simplificada as alterações que as variáveis: Tempo e Densidade, provocaram sobre os comportamentos observados em cada um dos testes. (X) alteração, (-) sem alteração.

		DENSIDADE	TEMPO
MOTOR	CE	-	X
	IP	X	-
	LCR	X	X
AFETO	CE	-	-
	IP	-	-
	LCR	X	X

a. Preferência Claro/Escuro

Nossos resultados no CE mostram que os aumentos na Densidade e do Tempo de alojamento não alteram a percepção da ameaça potencial e por isso não altera o tempo gasto pelos animais no compartimento escuro (Tabela 2).

A falta de efeito sobre a preferência pode indicar que o estresse causado pela condição de superlotação, aplicada nesse estudo (24 sujeitos – 6 peixes/l), foi de baixa intensidade. Um estudo anterior avaliou o efeito do alojamento sobre os níveis de cortisol no zebrafish mostrando uma elevação de até 4 vezes nos níveis hormonais para sujeitos alojados em condições aguda (3h) e crônica (5 dias) em densidade de 41 peixes/L (Ramsay *et al.*, 2016).

Contudo, em nosso estudo não tivemos a medida bioquímica, mas as condições de Tempo afetaram a atividade locomotora. O grupo alojado por 1 dia cruzou mais vezes entre os compartimentos em comparação ao grupo alojado por 30 dias. O mesmo foi observado na interação Densidade X Tempo, em que os grupos com densidade de 2 p/l alojados por 1 dia transitou mais vezes entre os compartimentos em relação os grupos de mesma densidade mantidos por 7 e 30 dias. Foi observado também que para a densidade de 6 p/l, alojados por 30 dias, reduziu significativamente o número de cruzamentos quando comparado aos grupos de mesma densidade, porém armazenados por 1 e 7 dias.

A análise dos dados em relação ao tempo de permanência (Figura 1-A e C) em conjunto com a redução da atividade motora pode estar relacionado ao comportamento semelhante à ansiedade de modo que alojar grupos em grandes densidades mostrou ter um efeito estressor que foi intensificado pelo tempo. Animais expostos a um ambiente novo tendem a elevar o comportamento de avaliação de risco, revezando sua atenção

entre explorar o ambiente novo e evitar se expor a possíveis predadores (McNaughton & Corr, 2004).

No modelo clássico em que a ansiedade resulta do conflito – abordar VS evitar – McNaughton & Corr (2004), postulam que os comportamentos ligados à ansiedade são controlados por um Sistema de Inibição Comportamental que é um circuito responsável por intermediar as respostas do tipo aproximação ou evitação, inibindo o comportamento contínuo, aumenta a apreensão anti-predatória e a excitação. Associado ao Sistema de Inibição Comportamental tem-se o Sistema de Abordagem Comportamental que está ligado à busca por recursos e o Sistema de Luta-Fuga-Congelamento que está relacionado com a evitação defensiva sendo ativado sempre que o organismo se encontra diante de uma ameaça (McNaughton & Corr, 2004).

Assim, em uma situação de conflito é possível observar o comportamento de avaliação de risco que participa do mecanismo de tomada de decisão coletando informações sobre a ameaça em um estado que os comportamentos de abordagem e evitação estão em equilíbrio e ainda o mecanismo de excitação mediado pelo Sistema de Inibição Comportamental é potencializado para que a condição de conflito seja superada (McNaughton & Corr, 2004).

Em nosso estudo o tempo intensificou o efeito estressor da aglomeração por conta do aumento no número de relações nocivas entre os sujeitos no cardume nas disputas por espaço e dominância (Baldwin, 2010; Jorgensen, 1993; Spence, 2005), esse efeito pode ter promovido uma maior ativação do Sistema de Inibição Comportamental, com sobreposição do comportamento de evitação (Gray & McNaughton, 2003). De modo que, já foi relatado em estudo anterior que a exposição forçada do zebrafish a

estresse crônico tende a ter um efeito ansiogênico, reduzindo a atividade locomotora e aumenta os níveis de cortisol (Piato, *et al.*, 2011)

No trabalho de Mansur e colaboradores (2014) em que foi avaliado o efeito que múltiplos peixes (2, 4 e 8) testados simultaneamente no CE, foi observado que em densidades de 8 sujeitos a preferência se altera e os animais passam mais tempo no compartimento claro, sinalizando que o cardume tem um efeito ansiolítico, que reduz o estresse e a ansiedade. Contudo, nossos dados mostraram que o tratamento prévio com a exposição forçada a altas densidades por um período mínimo de 7 dias age como um estressor leve e crônico tendo um efeito ansiogênico reduzindo a exploração do CE, sem interferir na preferência pelo compartimento escuro.

b. Inspeção de Predador

Nossos resultados para a Inspeção de Predador revelaram que o Tempo e a Densidade Geral não alteraram de forma significativa a sensibilidade dos animais em relação à presença de um predador, na análise do parâmetro tempo de permanência (Tabela 2). Contudo é possível notar a repetição de um padrão com os animais explorando de forma relativamente homogênea o quadrante A3 (Figura 3- A, B), e ainda é possível notar que os grupos alojados em diferentes densidades (Figura 3- B) exploraram de forma densidade-depende os quadrantes próximos ao predador, embora não tenha havido diferenças significativas.

O aumento na densidade intensificou o tempo gasto em A1 próximo ao predador e reduziu o tempo em A2, especialmente nos grupos alojados em densidade de 6 p/l, isso pode indicar que a densidade de alojamento agiu como um estressor intensificando a apreensão anti-predatória levando os sujeitos aglomerados gastarem mais tempo próximo ao predador em busca de informações. No zebrafish e em outras espécies que

tem afinidade por viverem em grupos, um ou mais sujeitos se afastam do grupo para inspecionar o predador (Maximino, *et al* 2010).

O comportamento de inspeção de predador já foi relatado no ambiente natural em mamíferos, aves e peixes, sugerindo que esse comportamento possui um valor adaptativo anti-predatório (Giles, *et al.*, 1984; Murphy, *et al.*, 1991). Godin e colaboradores (1995) avaliaram o comportamento de inspeção de predador em guppies (*Poecilia reticulata*) em dois testes: em um os peixes tinham visão do predador (*Aequidens pulcher*) posicionado em um aquário vizinho; e em outro teste onde somente o predador tinha visão dos guppies. Eles demonstraram que o predador era menos propenso a atacar os sujeitos que os inspecionavam do que os que não adotavam essa estratégia. A inspeção apesar de ser uma abordagem arriscada possibilita aos inspecionadores coletar informações preciosas sobre as intenções do predador (Murphy, 1991).

No entanto os nossos resultados para a atividade locomotora encontraram diferenças estatísticas na Densidade Geral entre os grupos alojados nas densidades de 0,25 p/l e 6 p/l, em que o grupo de maior densidade entrou menos vezes nos quadrantes A2 e A3, que também pode ser notada nos demais quadrantes, embora não tenha alcançado significância estatística.

Sabe-se que condições estressoras prolongadas tem efeito prejudicial sobre o desenvolvimento do organismo (Ribas, *et al.*, 2017). Embora não tenhamos dados bioquímicos neste trabalho, níveis elevados de cortisol foram associados a prejuízos no crescimento e no desempenho físico por alocação das reservas de energia para manter as respostas ligadas ao estresse (Barton. 2002; Clinchy *et al.*, 2011; Archard *et al.*, 2012)

Em salmonídeos foi encontrado uma correlação negativa entre densidade de estocagem e crescimento, possivelmente resultante do aumento de atividades nociva provenientes de interações sociais intensas (Jorgensen, 1993). E em um estudo realizado com a truta do ártico (*Salvelinus alpinus*) foi constatado que peixes sob estresse social apresentavam uma taxa de consumo de oxigênio semelhante às dos peixes forçados a nadar em velocidades moderadas (Christiansen *et al.*, 1991).

Por outro lado, embora o estresse crônico tende a ter um efeito nocivo e maior sobre o organismo (Ramsay *et al.*, 2016; Piato, *et al.*, 2011; Schoenfeld, *et al.*, 2017), em nossos resultados no teste de IP não observamos efeito do tempo de alojamento sobre a exploração do aparato, mas encontramos diferenças com relação a densidade de alojamento.

Essa redução na atividade locomotora pode estar ligada a um comportamento semelhante ao medo proveniente do estresse social da aglomeração, que possivelmente levou a ativação do Sistema de Inibição Comportamental com sobreposição do Sistema de Luta-Fuga-Congelamento (Gray & McNaughton, 2003). Sujeitos nessas condições podem superestimar o risco, de modo que memórias punitivas como, por exemplo, o alto nível de interações dentro do cardume com disputas por dominância e espaço, os torna mais sensíveis ao perigo (McNaughton & Corr 2004; McEwen, Eiland, Hunter, & Miller, 2012). Esse raciocínio pode ser corroborado pelos os dados da Inspeção de Predador em que o aumento na densidade elevou o tempo gasto próximo ao predador (mesmo que não significativo), possivelmente uma estratégia anti-predatória de inspeção e provocou uma redução da atividade locomotora, sobretudo no grupo de maior densidade.

c. Labirinto em Cruz com Rampa

Este trabalho faz parte de um esforço conjunto para padronizar o Labirinto em Cruz com Rampa, como ele foi fortemente baseado no Labirinto em Cruz Elevado tentamos reproduzir os dados encontrados no LCE em roedores investigando o grau de homologias entre esses modelos.

Assim, os nossos dados para o LCR mostram que o Tempo e a Densidade de alojamento agiram como estressores intensificando o comportamento defensivo reduzindo o tempo nos braços com rampa e aumentando a permanência nos braços planos (Tabela 2). Esses resultados são consistentes com a literatura encontrada para roedores onde a aglomeração tem um efeito ansiogênico (Botelho *et al.*, 2007; Knyazeva, Loginova, Loseva, 2012; Lin, Meng, Choi, Magee, Stets, During, 2015; Lee, Obora, Bondonny, Toniolo, Mivielle, Yamaguchi, 2018). Botelho e colaboradores (2007) testaram ratos Wistar no Labirinto em Cruz Elevado após mantê-los alojados em diferentes densidades (1, 2, 3, 4, 6, 8, 12, 16 e 24 sujeitos por gaiola) pelos períodos de 1 e 14 dias e constataram que os animais mantidos na condição de superlotação entraram menos vezes nos braços abertos que o grupo controle (6 sujeito por gaiola), havendo uma intensificação da resposta nos grupos que passaram 14 dias aglomerados.

O mesmo pôde ser observado em camundongos alojados em condição superlotação (7 animais por gaiola) pelo período de 13 semanas e testados no teste de campo aberto e labirinto em cruz elevado (Reiss, Wolter-Sutter, Krezel, Ouagazzal, 2007). Reiss e colaboradores (2007) revelaram que a aglomeração reduziu a atividade motora no teste do campo aberto e da mesma forma o tempo e o número de entradas nos braços aberto do LCE, reforçando a ideia de que essa configuração representa um ambiente agressivo e estressante para os animais.

Os grupos alojados em condição de isolamento passaram mais tempo nos braços com rampa revelando que essa configuração tem um efeito ansiolítico sobre o *D. rerio*. Dados similares foram encontrados por Shams e colaboradores (2015) que isolaram o zebrafish por 90 dias e testaram os efeitos sobre a ansiedade no teste do campo aberto e registraram uma redução do comportamento de tigmotaxia. O mesmo foi observado em outros trabalhos que investigaram os efeitos do isolamento social no zebrafish por vários períodos (14, 15 e 30 dias), sugerindo que o isolamento tem um efeito ansiolítico sobre o *D. rerio* (Lapiz, 2003; Giacomini, 2015).

Os dados de isolamento no zebrafish são inconsistentes com os achados sobre isolamento social em roedores que foi relatado como ansiogênico (Botelho, *et al.*, 2007; Santos, *et al.*, 2010). O efeito ansiolítico no zebrafish mantidos isolados pode estar relacionado ao contexto ecológico da espécie, assim como roedores (Kiyokawa, Shimozuru, Kikusui, Takeuchi, Mori, 2006; Bind, Minney, Rosenfeld, & Hallock, 2013), peixes se comunicam através da liberação de feromônios no ambiente que podem sinalizar a presença de uma ameaça (Speedie, 2008; Mezzomo, Fontana, Müller, Duarte, Quadros, Canzian, 2019), mas por estarem em um contexto hídrico estes sinais químicos podem se manter por mais tempo em contato com os sujeitos, mesmo estando em um sistema que possui circulação de água constante. O que pode nos levar a supor que as condições empregadas na estocagem do *D. rerio* possam ter um efeito estressor.

Assim em condição de isolamento o estresse depende somente da sua própria percepção, enquanto que em grupo a resposta ao estresse pode ser aumentada por sinais químicos/comportamentais dos outros membros do cardume (Giacomini, 2015), essa hipótese se mostra verdadeira quando notamos que o efeito ansiolítico não se apresenta quando um co-específico está presente, como é observado nos grupos com dois sujeitos por aquário (densidade de 0,5 p/l). Esse resultado é relevante para experimentos futuros

que pretendem manter o zebrafish isolado antes de serem expostos as condições de estudo.

O Tempo e a Densidade de alojamento também alterou a atividade locomotora no LCR. O grupo alojado por 1 dia cruzou significativamente mais vezes o compartimento central que o grupo de 7 dias. O compartimento central representa uma região de potencial ameaça, visto que é a única região do aquário que não possui paredes laterais e, portanto uma área de exposição (Walsh-Monteiro *et al.*, 2016b). Os nossos dados para o tempo de permanência nessa região do aparato mostram que os animais gastaram menos tempo nela do que nos demais braços, e que o alto índice de cruzamentos pode representar um índice de exploração geral do aquário.

No compartimento plano grupo de 7 dias mostrou um menor número de entradas quando comparado aos demais tempo de alojamento. Esses resultados são similares aos encontrados na literatura para roedores (Botelho *et al.*, 2007) em que um grupo com a mesma densidade foi alojado por 1-14 dias e mostrou uma redução na atividade locomotora.

A Densidade (Figura 14 – B) de alojamento e a interação Densidade X Tempo (Figura 13- A) mostrou ter um efeito maior sobre os cruzamentos na Rampa de forma densidade-dependente, os grupos de maior densidade reduziram significativamente a atividade motora. Podemos inferir com base nos nossos resultados que em todos os grupos testados no LCR a aglomeração agiu sobre o zebrafish como um estressor social, e que possivelmente foi intensificada pela sinalização química liberada pelos co-específicos no alojamento (Piato, 2011; Giacomini, 2015; Shafiei, 2012; Baldwin, 2010) reduzindo o número de entradas nos braços com rampa.

Curiosamente, encontramos efeito do alojamento sobre as densidades 2p/l e 6p/l, mas não encontramos nenhuma alteração para a densidade 4p/l (16 peixes por aquário) em nenhum dos protocolos aplicados neste trabalho. Levantamos a possibilidade de que a densidade de 4 p/l represente uma configuração menos agressiva para o zebrafish. Estudos futuros podem abordar de forma complementar as densidades entre 2p/l e 6p/l buscando de forma mais precisa uma configuração otimizada para o alojamento.

8. Conclusão

Dado o exposto no presente estudo, podemos concluir que as condições de alojamento aplicadas aqui podem agir como estressores crônicos de baixa intensidade que alteram o comportamento do tipo ansiedade no zebrafish quando testados nos protocolos de preferência Claro/Escuro e no Labirinto em Cruz com Rampa e comportamento do tipo medo quando expostos ao teste de Inspeção de predador. Mostramos que o Tempo de alojamento teve efeito sobre a exploração do CE e que a Densidade Geral influenciou o padrão de exploração na IP. No LCR tanto Tempo como Densidade tiveram efeito sobre a exploração, o aumento nesses parâmetros intensificou o comportamento do tipo ansiedade no zebrafish.

Os dados obtidos aqui mostram uma replicação parcial dos resultados encontrados em roedores, sobretudo os efeitos da aglomeração. Contudo, o mesmo não se aplica ao efeito do isolamento social, que tanto nos nossos resultados como os dados encontrados na literatura mostram ter um efeito ansiolítico sobre o zebrafish. Isso possivelmente pode estar relacionado ao contexto em que estas espécies vivem, sendo que no contexto do zebrafish o alojamento hídrico pode reter por mais tempo as sinalização químicas dos coespecíficos e o mesmo não ocorre em sujeitos isolados. O

que pode nos levar a supor que as condições, comumente, empregadas na estocagem do *D. rerio* possam ter um efeito estressor.

A comparação entre os resultados de estudos que investigam a superlotação no zebrafish sofre do mesmo problema observado em trabalhos com roedores, a grande variedade de sujeitos por alojamento, o tempo que são mantidos alojados e os tipos de testes aplicados. Mais estudos serão necessários para entender os efeitos da densidade de alojamento sobre o comportamento do *D. rerio*, uma vez que existem variáveis que não foram investigadas neste estudo, como o efeito da estocagem sobre características bioquímica.

Desse modo, podemos concluir que as condições de alojamento tem forte influencia sobre o comportamento do *D. rerio* levando a varrições nas repostas com relação as densidades de alojamento se fazendo necessário uma maior atenção em trabalhos futuros quanto a estocagem desses animais. Aqui a densidade de 4 p/l não levou a alterações no comportamento por isso sugerimos como sendo a melhor opção.

9. Referências

- Adamec, R.E., Shallow, T. (1993). Lasting effects on rodent anxiety of a single exposure to a cat. *Physiol Behav* ;54:101–9. [https://doi.org/10.1016/0031-9384\(93\)90050-P](https://doi.org/10.1016/0031-9384(93)90050-P)
- ALCOCK, J. (2011.). *Comportamento animal: uma abordagem evolutiva*. 9. Ed.
- Al-Imari, L., Gerlai R. (2008). Sight of conspecifics as reward in associative learning in zebrafish (*Danio rerio*). *Behav Brain Res*;189:216–219. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2007.12.007>
- Aponte, A., & Petrunich-Rutherford, M. L. (2019). Acute net stress of young adult zebrafish (*Danio rerio*) is not sufficient to increase anxiety-like behavior and whole-body cortisol. *PeerJ*, 7, e7469. <https://doi.org/10.7717/peerj.7469>
- Archard GA, Earley RL, Hanninen AF, Braithwaite VA. 2012. Correlated behavior and stress physiology in fish exposed to different levels of predation pressure. *Functional Ecology* 26:637-645
- Baldwin, L. (2010). The effects of stocking density on fish welfare. *The Plymouth Student Scientist*, v.4, n.1, p.372-383.
- Barcellos, L.J.G., Ritter F., Kreutz L.C., Quevedo R.M., Bolognesi da Silva L., Bedin A.C. (2007). Whole-body cortisol increases after direct and visual contact with a predator in zebrafish *Danio rerio*. *Aquaculture*;272:774–8. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2007.09.002>
- Barton BA. 2002. Stress in fishes: a diversity of responses with particular references to changes in circulating corticosteroids. *Integrative and Comparative Biology* 42:517-525. <https://doi.org/10.1093/icb/42.3.517>
- Barton, B.A., Stress in Fishes: A Diversity of Responses with Particular Reference to Changes in Circulating Corticosteroids, *Integr. Comp. Biol.*, 2002, vol. 42, no. 3, pp. 517–525.

- Bass, S.L.S., Gerlai, R. (2008). Zebrafish (*Danio rerio*) responds differentially to stimulus fish: the effects of sympatric and allopatric predators and harmless fish. *Behav Brain Res*;186:107–17. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2007.07.037>
- Bencan Z., Sledge D., Levin E.D. (2009). Buspirone, chlordiazepoxide and diazepam effects in a zebrafish model of anxiety. *Pharmacol Biochem Behav*;94:75–80. <https://doi.org/10.1016/j.pbb.2009.07.009>
- Best, C. Developmental Effects of Cortisol on the Stress Response and Behaviour in Zebrafish. (University of Calgary, 2015).
- Best, C., Kurrasch, D. M., & Vijayan, M. M. (2017). Maternal cortisol stimulates neurogenesis and affects larval behaviour in zebrafish. *Scientific reports*, 7, 40905. doi:10.1038/srep40905
- Bind, R. H., Minney, S. M., Rosenfeld, S., & Hallock, R. M. (2013). The role of pheromonal responses in rodent behavior: future directions for the development of laboratory protocols. *Journal of the American Association for Laboratory Animal Science*, 52(2), 124–129. PMID: 23562094
- Blanchard, D.C., Blanchard, R.J. (1988). Ethoexperimental approaches to the biology of emotion. *Ann Rev Psychol* ;39:43–68. <https://doi.org/10.1146/annurev.ps.39.020188.000355>
- Blanchard, D.C., Blanchard, R.J. (2008). Defensive behaviors, fear, and anxiety. In: Blanchard RJ, Blanchard DC, Griebel R, Nutt D, editors. *Handbook of anxiety and fear*. Amsterdam: Elsevier B.V. [https://doi.org/10.1016/S1569-7339\(07\)00005-7](https://doi.org/10.1016/S1569-7339(07)00005-7)
- Blaser, R. E., & Goldsteinholm, J. (2012). Depth preference in zebrafish, *Danio rerio*: Control by surface and substrate cues. *Animal Behaviour*, 83, 953–959. <https://doi.org/10.1016/j.anbehav.2012.01.014>
- Bleakley BH, Martell CM, Brodie III ED. Variation in anti-predator behavior among five strains of inbred guppies, *Poecilia reticulata*. *Behav Genet* 2005;36:783–91

- Botelho, S., Estanislau, C., Morato, S. (2007). Effects of under- and overcrowding on exploratory behavior in the elevated plus-maze. *Behav. Process.*, 74, pp. 357-362. <https://doi.org/10.1016/j.beproc.2006.12.006>
- Brasil. Decreto n. 6.899, de 16 de julho de 2009. Dispõe sobre a composição do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal – CONCEA, estabelece as normas para o seu funcionamento e de sua Secretaria-Executiva, cria o Cadastro das Instituições de Uso Científico de Animais – CIUCA, mediante a regulamentação da Lei n. 11.794, de 8 de outubro de 2008, que dispõe sobre procedimentos para o uso científico de animais, e dá outras providências. Diário Oficial da União, Brasília; 2009; Seção 1.
- Brown, K.J., Grunberg, N.E. (1995). Effects of housing on male and female rats: crowding stresses males but calm females. *Physiol. Behav.* 58. [https://doi.org/10.1016/0031-9384\(95\)02043-8](https://doi.org/10.1016/0031-9384(95)02043-8)
- Brunton, P.J., Russell, J.A. (2010). Prenatal social stress in the rat programmes neuroendocrine and behavioural responses to stress in the adult offspring: sex specific effects. *Journal of Neuroendocrinology*, 22258–271. <http://doi.org/doi:10.1111/j.1365-2826.2010.01969.x>
- Bulos, E.M., Pobbe, R.L., Zangrossi-Jr, H. (2015). Behavioral consequences of predator stress in the rat elevated T-maze. *Physiol Behav.*, 14620152835. <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2015.04.019>
- Cachat, J., Stewart, A., Utterback, E., Hart, P., Gaikwad, S., Wong, K., Kalueff, A. V. (2011). Three-Dimensional Neurophenotyping of Adult Zebrafish Behavior. *PLoS ONE*, 6(3), e17597. <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0017597>
- Cachat, JM.; Canavello, PR.,(2010). Modeling Stress and Anxiety in Zebrafish. In: Kalueff, AV.; Cachat, J., editors. *Zebrafish Models in Neurobehavioral Research*. New York: Humana Press. https://doi.org/10.1007/978-1-60761-922-2_3
- Chambel, J., Severiano, V., Baptista, T., Mendes S., Pedrosa R., (2015). Effect of stocking density and different diets on growth of *Percula Clownfish*, *Amphiprion percula*. *Springer Plus*. 4, 183-190. <https://doi.org/10.1186/s40064-015-0967-x>

- Champagne, D.L., Hoefnagels, C.C. (2010). Translating rodent behavioral repertoire to zebrafish (*Danio rerio*): Relevance for stress research. *Behav Brain Res.* 214(2):332–42. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2010.06.001>
- Christiansen, J.S., Jorgensen, E.H. and Jobling, M., 199 1. Oxygen consumption in relation to sustained exercise and social stress in Arctic charr (*Salvelinus alpinus* L.). *J. Exp. Zool.*, 260: 149-156. <https://doi.org/10.1002/jez.1402600203>
- Clinchy M, Charlier TD, Newman AE, Schmidt KL, Boonstra R, Soma KK. 2011. Multiple measures elucidate glucocorticoid responses to environmental variation in predation threat. *Oecologia* 166:607-614
- Contarteze, R.V.L., Manchado, F.B., Gobatto, C.A., Mello, M.A.R. (2007). Biomarkers of stress in rats exercised in swimming at intensities equal and superior to the maximal estable lactate phase. *Revista Brasileira de Medicina do Esporte*, 13:150–54. <http://dx.doi.org/10.1590/S1517-86922007000300008>
- CsaÂnyi, V. (1986) Ethological analysis of predator avoidance by the paradise fish (*Macropodus opercularis* L.): II. Key stimuli in avoidance learning. *Anim Learn Behav.* <https://doi.org/10.3758/BF03200044>
- Daniels, W.M., Pietersen, C.Y., Carstens, M.E., Daya, S., Stein, D. (2000). Overcrowding Induces Anxiety and Causes Loss of Serotonin 5HT-1a Receptors in Rats. *Metab Brain Dis* 15: 287. <https://doi.org/10.1023/A:1011123208674>
- Di Marco, P., Priori, A., Finoia, M.G., Massari, A., Mandich, A. & Marino, G. (2008). Physiological responses of European sea bass *Dicentrarchus labrax* to different stocking densities and acute stress challenge. *Aquaculture* 275, 319-328. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2007.12.012>
- Efrizal E. (2017). Effects of stocking density on survival rate and larval development of blue swimming crab, *Portunus pelagicus* (Linnaeus, 1758) under laboratory conditions. *AACL Bioflux.* 10(2): 217–226.
- Egan R.J., Bergner C.L., Hart P.C., Cachat J.M., Canavello P.R., Elegante M.F., *et al.* (2009). Understanding behavioral and physiological phenotypes of stress and

- anxiety in zebrafish. *Behav Brain Res*;205:38–44.
<https://doi.org/10.1016/j.bbr.2009.06.022>
- Engeszer, R.E., Patterson, L.B., Rao, A.A., Parichy, D.M. (2007). Zebrafish in the wild: a review of natural history and new notes from the field. *Zebrafish*. *Zebrafish* Vol. 4, No. 1. <https://doi.org/10.1089/zeb.2006.9997>
- Engeszer, R.E., Ryan M.J., Parichy D.M. (2004). Learned social preference in zebrafish. *Curr Biol*. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2004.04.042>
- Faustino AI, Tacão-Monteiro A, Oliveira RF (2017) Mechanisms of social buffering of fear in zebrafish. *Sci Rep* 7:44329. <https://doi.org/10.1038/srep44329>
- Figueiras, J.C.; Hipper, M.I. (1999). A polêmica em torno do conceito de estresse. *Psicologia, ciência e profissão*, ano 19, n.3, p.40-51.
- FSBI (2002). Fish Welfare. Briefing Paper. Fisheries Society of the British Isles, Grant Information Systems, A High Street, Sawston, Cambridge.
- Gamallo, A., Villanua, A., Trancho, G., Fraile. A. (1986). Stress adaptation and adrenal activity in isolated and crowded rats. *Physiol. & Behav.*, 36:217-221.
- Gerlai, R. (2014a). Fish in behavior research: unique tools with a great promise! *Journal of Neuroscience Methods*, v.234, p. 54-8.
<https://doi.org/10.1016/j.jneumeth.2014.04.015>
- Gerlai, R. (2014b). Social behavior of zebrafish: from synthetic images to biological mechanisms of shoaling. *Journal of Neuroscience Methods* 234:59–65.
<https://doi.org/10.1016/j.jneumeth.2014.04.028>
- Gerlai, R., Fernandes, Y., Pereira, T. (2009). Zebrafish (*Danio rerio*) responds to the animated image of a predator: towards the development of an automated aversive task. *Behav Brain Res*;201:318–24. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2009.03.003>
- Gerlai, R., Lahav, M., Guo, S., Rosenthal, A. (2000). Drinks like a fish: Zebra fish (*Danio rerio*) as a behavior genetic model to study alcohol effects. *Pharmacol Biochem Behav*;67:773–82. [https://doi.org/10.1016/S0091-3057\(00\)00422-6](https://doi.org/10.1016/S0091-3057(00)00422-6)

- Giacomini, A.C.V.V., Abreu, M.S., Koakoski, G., Idalencio, R., Kalichak, F., Oliveira, T.A. (2015). My stress, our stress: blunted cortisol response to stress in isolated housed zebrafish. *Physiol. Behav.* 182–187.
<https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2014.11.035>
- Giles, N. & Huntingford, F. A. (1984). Predation risk and interpopulational variation in antipredator behaviour in the three-spined stickleback, *Gasterosteus aculeatus* L. *Anim. Behav.* 32, 264-275. [https://doi.org/10.1016/S0003-3472\(84\)80346-2](https://doi.org/10.1016/S0003-3472(84)80346-2)
- Gluckman, P.D., Hanson, M.A. (2004). Origens do desenvolvimento do paradigma da doença: uma perspectiva mecanicista e evolutiva. *Pesquisa Pediátrica* 56311-317. (doi: 10.1203 / 01.PDR.0000135998.08025.FB)
- Godin J-GJ, Davis SA. Who dares, benefits: predator approach behaviour in the guppy (*Poecilia reticulata*) deters predator pursuit, *Proc R Soc Lond B Biol Sci* , 1995, vol. 259 (pg. 193-200) <https://doi.org/10.1098/rspb.1995.0028>
- Gray, J. A. & McNaughton, N. (2003). *The Neuropsychology of Anxiety: An Enquiry into the Functions of the Septo-Hippocampal System*. 2. ed. Oxford: Oxford University Press.
- Grunwald, D. J., Eisen, J. S. (2002). Timeline: Headwaters of the zebrafish—emergence of a new model vertebrate. *Nat Rev Genet.* v.3, p.717–24.
<https://doi.org/10.1038/nrg892>
- Handley, S. L., & Mithani, S. (1984). Effects of alpha-adrenoceptor agonists and antagonists in a maze-exploration model of ‘fear’-motivated behaviour. *Naunyn-Schmiedeberg’s Archives of Pharmacology*, 327, 1–5.
<https://doi.org/10.1007/BF00504983>
- Hartig, E. I., Zhu, S., King, B. L., & Coffman, J. A. (2016). Cortisol-treated zebrafish embryos develop into pro-inflammatory adults with aberrant immune gene regulation. *Biology open*, 5(8), 1134–1141. <https://doi.gov/10.1242/bio.020065>
- Hawkins LA, Magurran AE, Armstrong JD. Innate predator recognition in newly-hatched atlantic salmon. *Behaviour* 2004;141:1249–62.

- Hogg S. (1996). A review of the validity and variability of the elevated plus-maze as an animal model of anxiety. *Pharmacol Biochem Behav.* 54:21–30.
[https://doi.org/10.1016/0091-3057\(95\)02126-4](https://doi.org/10.1016/0091-3057(95)02126-4)
- Houart, C. (2001). Zebrafish as an Experimental Organism. *Encyclopedia of Life Sciences*, 1 - 5. <https://doi.org/10.1002/9780470015902.a0002094.pub2>
- Howe K, Clark MD, Torroja CF, Torrance J, Berthelot C, Muffato M, et al. The zebrafish reference genome sequence and its relationship to the human genome. *Nature* 2013;496:498–503.
- Jorgensen, E.H., Christiansen, J.S., Jobling, M., (1993). Effects of stocking density on food intake, growth performance and oxygen consumption in Arctic charr (*Salvelinus alpinus*). *Aquaculture* 110, 191–204. [https://doi.org/10.1016/0044-8486\(93\)90272-Z](https://doi.org/10.1016/0044-8486(93)90272-Z)
- Judge PG, de Wall FBM (1997) Rhesus monkey behaviour under diverse population densities: Coping with long-term crowding. *Anim Behav* 54: 643–662.
<https://doi.org/10.1006/anbe.1997.0469>
- Katz, R.J., Roth, K.A., Carroll, B.J., 1981. Acute and chronic stress effects on open field activity in the rat: implications for a model of depression. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 5, 247–251.
- Kavaliers, M., & Choleris, E. (2001). Antipredator responses and defensive behavior: Ecological and ethological approaches for the neurosciences. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 25(7-8), 577-586. [https://doi.org/10.1016/S0149-7634\(01\)00042-2](https://doi.org/10.1016/S0149-7634(01)00042-2)
- Kikusui, T., Winslow, J. T., & Mori, Y. (2006). Social buffering: Relief from stress and anxiety. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London Series B Biological Sciences*, 361(1476), 2215–2228. <https://doi.org/10.1098/rstb.2006.1941>
- Kiyokawa Y, Shimozuru M, Kikusui T, Takeuchi Y, Mori Y (2006) Alarm pheromone increases defensive and risk assessment behaviors in male rats. *Physiol Behav* 87: 383–387. <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2005.11.003>

- Knyazeva, S.I., Loginova, N.A., Loseva, E.V., (2012). Anxiety Level and Body Weight Changes in Rats Living in Overpopulated Cages. *Bulletin of Experimental Biology and Medicine*, Vol. 154, No. 1.
- Lapiz, M.D.S., Fulford, A., Muchimapura, S., Mason, Parker, T., Marsden, C.A. (2003). Influence of postweaning social isolation in the rat on brain development, conditioned behavior, and neurotransmission, *Neurosci. Behav. Physiol.* 33 (1) 13–29. <https://doi.org/10.1023/A:1021171129766>
- Lee, Y. A., Obora, T., Bondonny, L., Toniolo, A., Mivielles, J., Yamaguchi, Y., ... Goto, Y. (2018). The Effects of Housing Density on Social Interactions and Their Correlations with Serotonin in Rodents and Primates. *Scientific reports*, 8(1), 3497. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-21353-6>
- Lee, Y. A., Obora, T., Bondonny, L., Toniolo, A., Mivielles, J., Yamaguchi, Y., ... Goto, Y. (2018). The Effects of Housing Density on Social Interactions and Their Correlations with Serotonin in Rodents and Primates. *Scientific reports*, 8(1), 3497. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-21353-6>
- LeePRBradyDLShapiroRADorsaDMKoenigJI. (2007). Prenatal stress generates deficits in rat social behavior: reversal by oxytocin. *Brain Research*, 1156152–167. <https://doi.gov/10.1016/j.brainres.2007.04.042>
- Levin, E. D., Bencan, Z., & Cerutti, D. T. (2007). Anxiolytic effects of nicotine in zebrafish. *Physiology & Behavior*, 90, 54–58. <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2006.08.026>
- Lin, E. J. Meng, S., Choi, E.Y., Magee, D., Stets, C.W., During, M.J. (2015). Social overcrowding as a chronic stress model that increases adiposity in mice. *Psychoneuroendocrinology* 51, 318–330. <https://doi:10.1016/j.psyneuen.2014.10.007>
- Lohr H, Hammerschmidt M (2011) Zebrafish in endocrine systems: recent advances and implications for human disease. *Annu Rev Physiol* 73: 183–211. <https://doi.org/10.1146/annurev-physiol-012110-142320>

- Lopez-Patino, M.A., Yu, L., Cabral H., Zhdanova, I.V. (2008). Anxiogenic effects of cocaine withdrawal in zebrafish. *Physiol Behav*;93:160–71.
<https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2007.08.013>
- Lupien, S. J., McEwen, B. S., Gunnar, M. R. & Heim, C. Effects of stress throughout the lifespan on brain, behaviour and cognition. *Nature Rev. Neurosci.* 29 Apr 2009
<https://doi.org/10.1038/nrn2639>
- 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. *Pharmacol Biochem Behav* 135:169–176.
<https://doi.org/10.1016/j.pbb.2015.05.014>
- Mansur, B., Santos B., Dias C.A., Pinheiro S., Gouveia Jr. (2014). Effects of the number of subjects on the dark/light preference of Zebrafish (*Danio rerio*). *Dec*;11(6):560-6. <https://doi.org/10.1089/zeb.2014.0977>
- Maule, A.G., Tripp, R.A., Kaattari, S.L., Schreck, C.B., 1989. Stress alters immune function and disease resistance in Chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*). *J. Endocrinol.* 120, 135–142. <https://doi.org/10.1677/joe.0.1200135>
- Maximino, C. Marques, T., Dias, F., Cortes, F.V., Taccolini, I.B., Pereira, P.M., Colmanetti, R., Gazolla, R.A., Tavares, R.I., Rodrigues, S.T. K., Valéria, S., Pontes, A.A.A., Romão, C.F., Prado, V.M.Jr., Gouveia-Jr, A. (2007). A comparative analysis of the preference for dark environments in five teleosts. *Int. J. Comp. Psychol.* 20, 351–367.
- Maximino, C., Brito, T.M. & Gouveia Jr., A. (2010a). Construct validity of behavioral models of anxiety: where experimental psychopathology meets ecology and evolution. — *Psychol. Neurosci.* 3: 117-123.
<http://dx.doi.org/10.3922/j.psns.2010.1.015>
- Maximino, C., da Silva, A.W., Araujo, J., Lima, M.G., Miranda, V., Puty, B., Benzecry, R., Picanco-Diniz, D.L., Gouveia, A., Jr., Oliveira, K.R., Herculano, A.M., (2014). Fingerprinting of psychoactive drugs in zebrafish anxietylike behaviors. *PloS one* 9.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0103943>

- Maximino, C., de Brito T.M., *et al.* (2010b). Measuring anxiety in zebrafish: a critical review. *Behav Brain Res.* 214(2):157–71. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2010.05.031>
- Maximino, C., Marques de Brito, T., Dias, C.A., Gouveia, A., Jr. & Morato, S. (2010c). Scototaxis as anxiety-like behavior in fish. *Nat. Protoc.* 5, 209–216. <https://doi.org/10.1038/nprot.2009.225>
- McEwen B. S. (2008). Central effects of stress hormones in health and disease: Understanding the protective and damaging effects of stress and stress mediators. *European journal of pharmacology*, 583(2-3), 174–185. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2007.11.071>
- McEwen, B.S., Eiland, L., Hunter, R.G. & Miller, M.M. (2012). Stress and anxiety: structural plasticity and epigenetic regulation as a consequence of stress. *Neuropharmacology* 62, 3–12.
- McGonnell IM, Fowkes RC (2006). Fishing for gene function–endocrine modelling in the zebrafish. *J Endocrinol.* 189:425–439. <https://doi.org/10.1677/joe.1.06683>
- McKinney, W.T. (1984). Animal models of depression: An overview. *Psychiatric Development*, 2, 77-96.
- McNaughton, N., & Corr, P. J. (2004). A two-dimensional neuropsychology of defense: Fear/ anxiety and defensive distance. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 28, 285–305. <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2004.03.005>
- Mezzomo NJ, Fontana BD, Müller TE, Duarte T, Quadros VA, Canzian J, Pompermaier A, Soares SM, Koakoski G, Loro VL, Rosemberg DB, Barcellos LJG. Taurine modulates the stress response in zebrafish. *Hormones and Behavior*. 2019;109:44–52. <https://doi.org/10.1016/j.yhbeh.2019.02.006>
- Micale, V., Kucerovala, J., Sulcova, A. (2013). Leading compounds for the validation of animal models of psychopathology. *Cell and Tissue Research*, vol. 354, no. 1, pp. 309–330. <https://doi.org/10.1007/s00441-013-1692-9>

- Mikics, É., Barsy, B., Barsvári, B. & Haller, J. (2005) Behavioral specificity of non-genomic glucocorticoid effects in rats: effects on risk assessment in the elevated plus-maze and the open-field. *Horm Behav* **48**, 152– 162.
- Miller, N, Gerlai R (2007) Quantification of shoaling behaviour in zebrafish (*Danio rerio*). *Behav Brain Res* 184(2):157–166. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2007.07.007>
- Miller, N, Gerlai R. (2012). From schooling to shoaling: patterns of collective motion in zebrafish (*Danio rerio*). *PLoS ONE*. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0048865>
- Mitchell, G. D., Raymond, E. J., Ruppenthal, G. C., Harlow, H. F. (1966). Long-Term Effects of Total Social Isolation Upon Behavior of Rhesus Monkeys. *Psychological Reports*. Vol: 18 issue: 2, page(s): 567-580. <http://dx.doi.org/10.2466/pr0.1966.18.2.567>
- Murphy, K. E. & Pitcher, T.J. 1991: Individual behavioural strategies associated with predator inspection in minnow shoals. *Ethology* 88, 307-319.
- Bernier, N.J., Flik, G., Klaren, P.H.M. (2009). Regulation and contribution of the corticotrophic melanotrophic and thyrotrophic axes to the stress response in fishes, in: N.J. Bernier, G. Van der Kraak, A.P. Farrell, C.J. Brauner (Eds.), *Fish Neuroendocrinology*, vol. 28, Academic Press, pp. 235–311.
- Nelson, J. S. (1994). *Fishes of the world*. 3rd edn. Wiley, New York.
- Nesan & Vijayan (2013) Nesan D, Vijayan MM. Role of glucocorticoid in developmental programming: evidence from zebrafish. *General and Comparative Endocrinology*. 2013;181:35–44. <https://doi:10.1016/j.ygcen.2012.10.006>
- Nesse, R.M. (1999). Proximate and evolutionary studies of anxiety, stress and depression: synergy at the interface. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 23, 895-903. [https://doi.org/10.1016/S0149-7634\(99\)00023-8](https://doi.org/10.1016/S0149-7634(99)00023-8)
- Nieuwenhuijsen, K., & de Waal, F. B. (1982). Effects of spatial crowding on social behavior in a chimpanzee colony. *Zoo Biology*, 1(1), 5-28. <http://dx.doi.org/10.1002/zoo.1430010103>

- North, B.P. (2004). Effects of stocking density on the welfare of farmed rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). PhD thesis, Institute Of Aquaculture, University of Stirling. Recuperado em: <http://www.phdportal.ugent.be/partners/stirling/stirling.html>
- Paravati S, Warrington SJ. (2019). Physiology, Catecholamines. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): *StatPearls Publishing*; Recuperado em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK507716/>
- Paris, J.J., Frye, C.A. (2011) Juvenile offspring of rats exposed to restraint stress in late gestation have impaired cognitive performance and dysregulated progesterone formation. *Stress* 14:23–32. <https://doi.org/10.3109/10253890.2010.512375>
- Parker, M.O., Millington, M.E., Combe, F.J., Brennan, C.H. (2012). Housing conditions differentially affect physiological and behavioural stress responses of zebrafish, as well as the response to anxiolytics. *PLoS One* 7. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0034992>
- Paull, G., Filby A., Giddins H., Coe T., Hamilton P., Tyler C. (2010). Dominance hierarchies in zebrafish (*Danio rerio*) and their relationship with reproductive success. *Zebrafish*; 7: 109–117. <https://doi.org/10.1089/zeb.2009.0618>
- Peitsaro, N, Kaslin J, Anichtchik OV, Panula P. (2003). Modulation of the histaminergic system and behaviour by alpha-fluoromethylhistidine in zebrafish. *J Neurochem*. 86:432–41. <https://doi.org/10.1089/zeb.2009.0618>
- 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, 149 –167.
- Petrie T. A., Strand N. S., Tsung-Yang C., Rabinowitz J. S. and Moon R. T. (2014). Macrophages modulate adult zebrafish tail fin regeneration. *Development* 141, 2581-2591. 10.1242/dev.098459. <https://doi.org/10.1242/dev.098459>
- Pham, M., Raymond J., Hester J., Kyzar E., Gaikwad S., Bruce I. (2012). Assessing social behavior phenotypes in adult zebrafish: shoaling, social preference and

mirror biting tests. Zebrafish Protoc Neurobehav Res. https://doi.org/10.1007/978-1-61779-597-8_17

- Piato, A.L. (2011). Unpredictable chronic stress model in zebrafish (*Danio rerio*): behavioral and physiological responses. *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry* 35, 561–567. <https://doi.org/10.1016/j.pnpbp.2010.12.018>
- Pitcher, T.J. (1992). Who dares wins: the function and evolution of predator inspection behaviour in shoaling fish. *Neth J Zool* 42:371–91.
- Prut, L., Belzung, C. (2003). The open field as a paradigm to measure the effects of drugs on anxiety-like behaviors: a review. *Eur J Pharmacol*;463:3–33. [https://doi.org/10.1016/S0014-2999\(03\)01272-X](https://doi.org/10.1016/S0014-2999(03)01272-X)
- Ramsay, J. M., Feist, G. W., Varga, Z. M., Westerfield, M., Kent, M. L. and Schreck, C. B. (2006). Whole-body cortisol is an indicator of crowding stress in adult zebrafish, *Danio rerio*. *Aquaculture* 258, 565–574
- Ramsay, J. M., Feist, G. W., Varga, Z. M., Westerfield, M., Kent, M. L. & Schreck, C. B. (2006). Whole-body cortisol is an indicator of crowding stress in adult zebrafish. *Danio rerio*. *Aquaculture* 258, 565–574. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2006.04.020>
- Rehnberg, B.G., Smith RJF. (1988). The influence of alarm substance and shoal size on the behaviour of zebra danios, *Brachydanio rerio* (Cyprinidae). *J Fish Biol*;33: 155–163. <https://doi.org/10.1111/j.1095-8649.1988.tb05457.x>
- Reiss D, Wolter-Sutter A, Krezel W, Ouagazzal AM. (2007). Effects of social crowding on emotionality and expression of hippocampal nociceptin/orphanin FQ system transcripts in mice. *Behav. Brain Res.* 184(2), 167–173. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2007.07.010>
- Ribas, L., Valdivieso, A., Diaz, N., Piferrer F. (2017). Appropriate rearing density in domesticated zebrafish to avoid masculinization: links with the stress response. *J Exp Biol*, 220:1056–1064. <https://doi.org/10.1242/jeb.144980>

- Sánchez-Murosa, M., Sánchez, B., Barroso, F., García-Mesa, S., Rufino-Palomares, E., Lupiáñez, J., Sanz, A. (2016). Effects of culture densities on feed demand, behavioural tests and on the hepatic and cerebral oxidative status in tilapia (*Oreochromis* sp.). *Applied Animal Behaviour Science*.
<https://doi.org/10.1016/j.applanim.2016.10.009>
- Sandi C, Haller J (2015). Stress and the social brain: behavioural effects and neurobiological mechanisms. *Nat Rev Neurosci* **16**: 290–304.
- Sandi C, Haller J (2015). Stress and the social brain: behavioural effects and neurobiological mechanisms. *Nat Rev Neurosci* **16**: 290–304.
<https://doi.org/10.1038/nrn3918>
- Santos, L., Andrade, T.G.C.S., Graeff, F.G. 2010. Social separation and diazepam withdrawal increase anxiety in the elevated plus-maze and serotonin turnover in the median raphe and hippocampus, *J. Psychopharmacol.* 24 (5) 725–731.
<https://doi.org/10.1177/0269881109106954>
- Schoenfeld, T.J., McCausland, H.C., Morris, H.D., Padmanaban, V., Cameron, H.A., 25 2017. Stress and Loss of Adult Neurogenesis Differentially Reduce Hippocampal Volume. *Biol Psychiatry*. <https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2017.05.013>
- Schreck, C.B., Contreras-Sanchez, W., Fitzpatrick, M.S., 2001. Effects of stress on fish reproduction, gamete quality, and progeny. *Aquaculture* 197, 3–24
[https://doi.org/10.1016/S0044-8486\(01\)00580-4](https://doi.org/10.1016/S0044-8486(01)00580-4)
- Serra, E.L., Medalha, C.C. & Mattioli, R. (1999). Natural preference of zebrafish (*Danio rerio*) for a dark environment. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 32, 1551–1553.
<http://dx.doi.org/10.1590/S0100-879X1999001200016>
- Serra, M., Sanna E., Mostallino, M.C., Biggio, G.(2007). Social isolation stress and neuroactive steroids. *Eur Neuropsychopharmacol.*
<https://doi.org/10.1016/j.euroneuro.2006.03.004>
- Shafiei, N., Gray, M., Viau, V., & Floresco, S. B. (2012). Acute stress induces selective alterations in cost/benefit decision-making. *Neuropsychopharmacology : official*

publication of the American College of Neuropsychopharmacology, 37(10), 2194–2209. <https://doi.org/10.1038/npp.2012.69>

Shams, S., Chatterjee, D. & Gerlai, R. (2015). *Chronic social isolation affects thigmotaxis and whole-brain serotonin levels in adult zebrafish*. *Behav Brain Res* 292, 283–287. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2015.05.061>

Silva RM, Goulart CT, Guido LA. Evolução histórica do conceito de estresse. *Rev. Cient. Sena Aires*. 2018; 7(2): 148-56.

Speedie, N., Gerlai, R. (2008). Alarm substance induced behavioral responses in zebrafish (*Danio rerio*). *Behav Brain Res*;188:168–177. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2007.10.031>

Spence, R. and Smith, C. (2005). Male territoriality mediates density and sex ratio effects on oviposition in the zebrafish, *Danio rerio*. *Anim. Behav.* 69, 1317–1323.

Spence, R., Gerlach, G., Lawrence, C., Smith, C.. (2008). The behaviour and ecology of the zebrafish, *Danio rerio*. *Biological Review*. v.83, p.13-34. <https://doi.org/10.1111/j.1469-185X.2007.00030.x>

Stewart, A. M., Braubach, O., Spitsbergen, J., Gerlai, R., & Kalueff, A. V. (2014). Zebrafish models for translational neuroscience research: from tank to bedside. *Trends in neurosciences*, 37(5), 264–278. <https://doi.org/10.1016/j.tins.2014.02.011>

Stewart, A., Gaikwad, S., Kyzar, E., Green, J., Roth, A., Kalueff, A.V. (2012). Modeling anxiety using adult zebrafish: a conceptual review. *Neuropharmacology* 62, 135–143. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2011.07.037>

Tea, J., Alderman, S.L., Gilmour, K.M. (2018). Social stress increases plasma cortisol and reduces forebrain cell proliferation in subordinate male zebrafish (*Danio rerio*) *J. Exp. Biol.* 10.1242/jeb.194894

Thiebot, M.H., Soubrie, P., Chermat, R., Boissier, J.R., (1977). Caractéristiques comportementales et psychopharmacologiques de rats élevés en haute densité de population. *Psychopharmacology* 54, 283–288 <https://doi.org/10.1007/BF00426577>

- Tran, S., Chatterjee, D., & Gerlai, R. (2014). Acute net stressor increases whole-body cortisol levels without altering whole-brain monoamines in zebrafish. *Behavioral Neuroscience*, 128(5), 621-624. <http://dx.doi.org/10.1037/bne0000005>
- Tsigos, C., Kyrou, I., Kassi, E., & Chrousos, G. P. (2016). Stress, endocrine physiology and pathophysiology. In L. J. De Groot, G. Chrousos, K. Dungan, K. R. Fienfold, & A. Grossman (Eds), *A Vinik endotext* [internet]. South Dartmouth, MA: MDText.com, Inc. Recuperado em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK278995/>
- Turnbull, J.F., Adams, C.E., Richards, R.H., Robertson, D.A. (1998). Attack site and resultant damage during aggressive encounters in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) parr. *Aquaculture* 159, 345–353. [https://doi.org/10.1016/S0044-8486\(97\)00233-0](https://doi.org/10.1016/S0044-8486(97)00233-0)
- Vascotto, S. G., Beckham, Y.; Kelly, G. M. (1997). The zebrafish's swim to fame as an experimental model in biology. *Biochem Cell Biol.* v.75, n.5, p. 479-485.
- Vyas, A., & Chattarji, S. (2004). Modulation of Different States of Anxiety-Like Behavior by Chronic Stress. *Behavioral Neuroscience*, 118(6), 1450-1454. <http://dx.doi.org/10.1037/0735-7044.118.6.1450>
- Walsh-Monteiro, A., Pessoa, R. d. S., Sanches, E. M., Costa de Carvalho, A. C., Silva, Y. C. d. B. e, Chirinéa, G., & Gouveia, A., Jr. (2016a). A New Anxiety Test for Zebrafish: Plus Maze With Ramp. *Psychology & Neuroscience*. <https://doi.org/10.1037/pne0000067>
- Walsh-Monteiro, A., Pragana, W., Costa, E.T. & Gouveia Jr, A. (2014). Behavioral and histological effects of rotenone in fish (Guppy, *Poecilia reticulata*). *Psycho Neurosci*, 7(4),619-623. <https://doi.org/10.3922/j.psns.2014.4.22>
- Walsh-Monteiro, A.L.V., Gouveia, Jr. A. (2016b). Desempenho do Guppy (*Poecilia reticulata*) em modelos de ansiedade: campo aberto, preferência claro-escuro e labirinto em cruz com rampa. (Tese de Doutorado). Programa de Pós Graduação em Teoria de Pesquisa do Comportamento. Universidade Federal do Pará. Belem, PA. Brasil. Recuperado de: <http://repositorio.ufpa.br/jspui/handle/2011/9041>

- Warren, E. W. & Callaghan, S. (1976). The response of male guppies (*Poecilia reticulata*, Peters) to repeated exposure to an open field. *Behavioral Biology*, 18(4), 499-513. [https://doi.org/10.1016/S0091-6773\(76\)92524-4](https://doi.org/10.1016/S0091-6773(76)92524-4)
- Weiss, I.C., Pryce, C.R., Jongen-Relo, A.L., Nanz-Bahr, N.I., Feldon, J., 2004. Effect of social isolation on stress-related behavioural and neuroendocrine state in the rat. *Behav. Brain Res.* 152, 279–295. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2003.10.015>
- Yildiz, A., Hayirli, A., Okumus, Z., Kaynar, O., Kisa, F. (2007). Physiological profile of juvenile rats: effects of cage size and cage density. *Lab. Anim.* (N.Y.) 36, 28–38. <https://doi.org/10.1038/labani0207-28>