



Programa aprovado pelo Conselho Superior de Ensino e Pesquisa da UFPA – Resolução 2545/98. Reconhecido nos termos das Portarias N°. 84 de 22.12.94 da Presidente da Fundação Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - CAPES e N°. 694 de 13.06.95 do Ministério da Educação e do Desporto. Doutorado autorizado em 1999.

Aspectos Paramétricos da Exposição do Zebrafish (*Danio rerio*) ao Tanque Novo

Ana Clara Almeida Silva

Belém/ PA

2024



Aspectos Paramétricos da Exposição do Zebrafish (*Danio rerio*) ao Tanque Novo

Ana Clara Almeida Silva

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

Orientador: Prof. Dr. Amauri Gouveia Jr.

Belém/ PA

2024

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)

UFPA/Núcleo de Teoria e Pesquisa do Comportamento/Biblioteca

S586a Silva, Ana Clara Almeida, 1987-
Aspectos paramétricos da exposição do Zebrafish (*Danio rerio*) ao
tanque novo / Ana Clara Almeida Silva. — 2024.
88 f.: il. color

Orientador: Amauri Gouveia Jr.

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

1. Análise do comportamento. 2. Ecoetologia. 3. Zebrafish:
peixe-zebra. 4. Tanque Novo (teste)- comportamento - ansiedade. 5.
Parametria. 6. Controle de estímulos. I. Título.

CDD - 23. ed. 150.77

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



Ana Clara Almeida Silva, Programa de Pós-Graduação em Teoria e Pesquisa do Comportamento, Universidade Federal do Pará, Belém-PA, Brasil.

Contato: Nome Completo.

Mail: aclara.psi@gmail.com

Defesa de Doutorado

“Aspectos Paramétricos da Exposição do Zebrafish (Danio rerio) ao Tanque Novo.”

Aluna: Ana Clara Almeida Silva.

Data da Defesa: 28 de junho de 2024.

Resultado: Aprovada.

Banca Examinadora:

Prof.º Dr.º Amauri Gouveia Júnior (orientador – UFPA).



Documento assinado digitalmente
AMAUURI GOUVEIA JUNIOR
Data: 01/07/2024 11:25:58-0300
Verifique em <https://validar.itl.gov.br>

Documento assinado digitalmente

ANDERSON MANOEL HERCULANO OLIVEIRA DA
Data: 01/07/2024 11:11:36-0300
Verifique em <https://validar.itl.gov.br>

Prc

no Oliveira da Silva (membro 1 – UFPA).

Documento assinado digitalmente

ANDRE LUIZ VIARD WALSH MONTEIRO
Data: 01/07/2024 10:55:28-0300
Verifique em <https://validar.itl.gov.br>

Prof.º Dr.º André Luiz Viard Walsh Monteiro (membro 2 – IFPA).

Documento assinado digitalmente

GABRIELA SOUZA DO NASCIMENTO
Data: 28/06/2024 18:16:51-0300
Verifique em <https://validar.itl.gov.br>

Prof.ª Dr.ª Gabriela de Souza Nascimento (membro 3 – UNINOVE).

Documento assinado digitalmente

DIANA MILENA CORTES PATINÔ
Data: 28/06/2024 18:55:52-0300
Verifique em <https://validar.itl.gov.br>

Prof.ª Dr.ª Diana Milena Cortés Patinô (membro 4 – UFPA).

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

IDENTIFICAÇÃO DO AUTOR E DA OBRA

Autor*: Ana Clara Almeida Silva

Vínculo com a UFPA: () Servidor; (x) Discente Unidade: Núcleo de Teoria e Pesquisa do Comportamento

Sub Unidade: Programa de Pós-Graduação em Teoria e Pesquisa do Comportamento

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

Título do Trabalho: Aspectos Paramétricos da Exposição do Zebrafish (Danio rerio) ao Tanque Novo

Data da Defesa: 28/06/2024 Área do Conhecimento: Ecoetologia de organismos infra-humanos

TERMO DE AUTORIZAÇÃO

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

Permitir o uso comercial da obra?

() Sim

(x) Não

Permitir modificações em sua obra?

() Sim, contanto que compartilhem pela mesma licença

(x) Não

O documento está sujeito ao registro de patente?

() Sim

(x) Não

A obra continua protegida conforme a Lei Direito Autoral.



Documento assinado digitalmente
ANA CLARA ALMEIDA SILVA
Data: 06/09/2024 14:16:53-0300
Verifique em <https://validar.it.gov.br>

Belém(PA), 16 /07/2024

Assinatura do Autor e/ou Detentor dos Direitos do Autor

Esse trabalho é dedicado ao meu Matias que me acompanhou no primeiro ano de doutorado, que me fez pensar onde, como e com quem eu gostaria de estar durante os próximos 4 anos e que infelizmente me deixou tão cedo, porém as lembranças do seu amor me deram forças para continuar e suportar a sua falta.

Agradecimentos

Primeiramente eu gostaria de agradecer a todos aqueles que contribuíram para que esse doutorado fosse possível. Obrigada Thiago que além de me apresentar o Amauri foi quem me iniciou na pesquisa, obrigada a minha banca de qualificação, principalmente ao André que fez contribuições que me ajudaram a compreender com mais clareza os meus próximos passos. Obrigada Silvio Morato pelas contribuições na minha qualificação e pelas andanças por Belém. Obrigada Silvio Vitor por ter estudado um meio de me ajudar a fazer essa coleta de dados acontecer. Um grande agradecimento a todos que “colocaram a mão na massa comigo”!

Aproveitando que eu falei sobre Belém, eu gostaria de agradecer a Paula, a Marlene, a Socorro e a Mia por terem me acolhido em casa mesmo sem me conhecer direito.

Eu gostaria de agradecer também meus sogros Cristina e Pedro por sempre tentarem facilitar a minha vida. Obrigada também ao Heitor, a Kizzy, ao Raul e agora a Laura que oportunizaram que eu amasse essas criaturinhas que eu sinto tanta falta. Obrigada Kizzy por dizer “duvido” quando eu disse que não ia fazer o doutorado, você sabia antes de mim!

Gostaria de agradecer ainda as minhas amigas de São Paulo que deixaram uma parte desse tempo mais leve! Obrigada principalmente a Laís que foi meu suporte e continua sendo mesmo que de longe.

Obrigada aos meus amigos de Cuiabá, principalmente Jonatan, Douglas e Anny, eu posso parecer pouco afetuosa, mas eu amo muito vocês.

Eu também quero agradecer imensamente a Mônica, minha terapeuta maravilhosa que nunca soltou a minha mão e ao Emmanuel que me deu tanto suporte (e continua dando) nesse momento da minha vida.

Eu também acho importante agradecer a todos e todas meus/minhas clientes, pois eu não parei de trabalhar, porém tive que fazer algumas pausas nos atendimentos para conseguir continuar o doutorado. Eu sei que vocês torcem por mim, eu sou agradecida por ter relações tão genuínas.

Eu não posso deixar de escrever um agradecimento especial para meu orientador Amauri e se alguém estiver lendo, já estou avisando de antemão que os três próximos parágrafos são longos. Eu conheci o Amauri e a “energia bateu”, eu não sei explicar, mas a gente se deu bem rapidamente. O Amauri se tornou meu orientador e um amigo que eu prezo muito. O Amauri como orientador faz o que todos os orientadores deveriam fazer: orientar! Digo isso porque eu soube bem mais tarde que eu fui sortuda por ter tido bons orientadores tanto no mestrado quanto no doutorado. Eu aprendi sobre ciência, sobre a vida, sobre a relação entre as diferentes abordagens da psicologia e regiões do Brasil, quase chorei, ri muito nas orientações, enfim, foi muito bom, no que dependeu dele, foi tudo muito mais fácil. Ele já ouviu tudo isso de mim, mas agora vai ficar registrado nessa tese. Obrigada por ser essa pessoa ótima que você é e por me deixar fazer parte da sua vida.

Eu sei que cães não podem ler, mas eu gostaria de deixar registrado o quanto eu sou grata por ter Davizinho me acompanhando nesses 3 últimos anos. Davizinho esteve comigo em diversas situações, boas e ruins. Ele sempre estava e está comigo com aquele olhar mais doce sendo o cachorro mais amável do mundo. Davi me deu forças para continuar quando as piores coisas aconteceram na minha vida. Obrigada meu menino por iluminar os meus dias, por me acompanhar em todos os processos desse doutorado e sigamos com você importunando seus irmãos demoncats Mandy, Billy e Pudim. Eu amo meus filhos (a tese é minha, eu os chamarei de filhos sim!) e de alguma forma, essa tese só tem algum sentido por causa deles.

Por fim, eu queria agradecer ao Pedro, amor da minha vida, minha estrela guia. Em 4 anos a gente viveu coisas muito boas, mas também vivenciamos as piores situações das nossas vidas. Você é tão importante que mesmo longe estava comigo, são muitos anos juntos e eu acho que o “destino” é ficarmos juntos. Em 2020 nós ganhamos nossa estrelinha Matias, em 07/09/2021 a vida nos tirou nosso amor. Para muitas pessoas um cachorro é só um cachorro, mas para mim, o Matias era minha vida, a nossa vida, né? Com a morte dele, tudo na minha vida ficou abalado, você bem sabe que eu me tornei outra pessoa, mais endurecida, mais fria, mais desligada de tudo e eu sei que você sofreu e sofre ainda com isso, mesmo assim você estava junto comigo segurando a outra mão para que eu continuasse esse doutorado e terminasse. Eu amo você e eu gostaria de deixar nesse último parágrafo esse agradecimento a você, pois sem você isso tudo aqui seria muito mais difícil.

**“Duas coisas são infinitas: o universo e a estupidez humana e eu não tenho certeza sobre
o universo.”**
(Albert Einstein)

Almeida Silva, A. C. (2024). Aspectos paramétricos da exposição do zebrafish (*danio rerio*) ao tanque novo. Tese de doutorado. Programa de Pós-Graduação em Teoria e Pesquisa do Comportamento, Universidade Federal do Pará, Brasil. Belém-PA, 68 p.

RESUMO

O teste do Tanque Novo (NTT) é um teste que avalia comportamentos do tipo ansiedade induzidos em peixes, permitindo analisar principalmente a exploração do peixe na superfície *versus* a exploração no fundo do tanque. O NTT foi introduzido pela primeira vez com o objetivo de mostrar uma preferência inicial do Zebrafish (*Danio rerio*) pelo fundo de um tanque novo (ambiente novo). Posteriormente a essa introdução, foi publicado um protocolo para medição de respostas comportamentais e endócrinas quando o zebrafish é colocado em novos ambientes. Apesar de ser utilizado no mundo todo, poucos foram os autores que se propuseram a analisar os parâmetros comportamentais basais deste teste. Desta forma, este trabalho teve como objetivo avaliar sete parâmetros: sexo dos animais, formato e tamanho do tanque, intensidade luminosa, período do dia para realização do teste, reexposição de 15 minutos e 24 horas, e tempo total de teste/habituação. De modo geral, não foram encontradas diferenças estatísticas na comparação entre o sexo dos animais, formato do tanque, reexposição de 15 minutos e 24 horas, em contrapartida, foi observado que o tamanho do tanque, o período do dia e o tempo total de teste podem alterar os comportamentos do tipo ansiedade no zebrafish.

Palavras-chave: Teste do Tanque Novo (NTT), Zebrafish, Parametria, ansiedade, controle de estímulos

Almeida Silva, A. C. (2024). Aspectos paramétricos da exposição do zebrafish (*danio rerio*) ao tanque novo. Tese de doutorado. Programa de Pós-Graduação em Teoria e Pesquisa do Comportamento, Universidade Federal do Pará, Brasil. Belém-PA, 68 p.

ABSTRACT

The Novel Tank Test (NTT) is a test that evaluates anxiety-like behaviors induced in fish, allowing to analyze mainly the exploration of the fish on the surface *versus* the exploration at the bottom of the tank. The NTT was first introduced with the aim of showing an initial preference of the Zebrafish (*Danio rerio*) for the bottom of a novel tank (new environment). After this introduction, a protocol was published for measuring behavioral and endocrine responses when zebrafish are placed in novel environments. Despite being used all over the world, there were few authors who proposed to analyze the baseline behavioral parameters of this test. Therefore, this work aimed to evaluate seven parameters: sex of the animals, shape and size of the tank, light intensity, time of day for carrying out the test, re-exposure of 15 minutes and 24 hours, and total time test/habituation. In general, no statistical differences were found when comparing the sex of the animals, the format of the tank, 15-minute and 24-hour re-exposure. On the other hand, it was observed that the size of the tank, the period of the day and the total test time may alter anxiety-like behaviors in zebrafish.

Keywords: New Tank Test (NTT), Zebrafish, Parametrics.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1	Tanque trapezoidal	27
Figura 2	Tanque retangular	28
Figura 3	Tanque retangular reduzido pela metade das medidas do tanque retangular regular	28
Figura 4	Tanque retangular com o dobro das medidas do tanque retangular regular	29
Figura 5	Zebrafish macho e zebrafish fêmea	30
Figura 6	X-Plorat	45
Figura 7	Comparação entre os sexos: frequência, tempo despendido no topo e latência para entrar no topo do tanque	48
Figura 8	Comparação entre os sexos: frequência e tempo despendido em movimentos erráticos no topo e no fundo do tanque	48
Figura 9	Comparação entre os sexos: frequência e tempo despendido em <i>freezing</i> no fundo do tanque e frequência e tempo despendido em geotaxia	49
Figura 10	Comparação entre os formatos: frequência, tempo despendido no topo e latência para entrar no topo do tanque	51
Figura 11	Comparação entre os formatos: frequência e tempo despendido em movimentos erráticos no topo e no fundo do tanque	51
Figura 12	Comparação entre os formatos: frequência e tempo despendido em <i>freezing</i> no fundo do tanque e frequência e tempo despendido em geotaxia	52
Figura 13	Comparação entre três intensidades luminosas: frequência, tempo	53

	despendido no topo e latência para entrar no topo do tanque	
Figura 14	Comparação entre três intensidades luminosas: frequência e tempo despendido em movimentos erráticos no topo e no fundo do tanque	54
Figura 15	Comparação entre três intensidades luminosas: frequência e tempo despendido em <i>freezing</i> no fundo do tanque e frequência e tempo despendido em geotaxia	55
Figura 16	Comparação entre três períodos do dia: frequência, tempo despendido no topo e latência para entrar no topo do tanque	56
Figura 17	Comparação entre três períodos do dia: frequência e tempo despendido em movimentos erráticos no topo e no fundo do tanque	57
Figura 18	Comparação entre três períodos do dia: frequência e tempo despendido em <i>freezing</i> no fundo do tanque e frequência e tempo despendido em geotaxia	58
Figura 19	Comparação entre três tamanhos de tanque: frequência, tempo despendido no topo e latência para entrar no topo do tanque	59
Figura 20	Comparação entre três tamanhos de tanque: frequência e tempo Despendido em movimentos erráticos no topo e no fundo do tanque	59
Figura 21	Comparação entre três tamanhos de tanque: frequência e tempo despendido em <i>freezing</i> no fundo do tanque e frequência e tempo despendido em geotaxia	60
Figura 22	Comparação entre três exposições de 15 minutos: frequência, tempo despendido no topo e latência para entrar no topo do tanque	61
Figura 23	Comparação entre três exposições de 15 minutos: frequência e tempo despendido em movimentos erráticos no topo e no fundo do tanque	62
Figura 24	Comparação entre três exposições de 15 minutos: frequência e tempo	63

despendido em *freezing* no fundo do tanque e frequência e tempo
despendido em geotaxia

Figura 25	Comparação entre três exposições de 24 horas: frequência, tempo despendido no topo e latência para entrar no topo do tanque	64
Figura 26	Comparação entre três exposições de 24 horas: frequência e tempo despendido em movimentos erráticos no topo e no fundo do tanque	64
Figura 27	Comparação entre três exposições de 24 horas: frequência e tempo despendido em <i>freezing</i> no fundo do tanque	65
Figura 28	Comparação entre três exposições de 24 horas: frequência e tempo despendido em geotaxia	66
Figura 29	Comparação entre 3, 6, 12 e 30 minutos de teste: frequência, tempo despendido no topo e latência para entrar no topo do tanque	67
Figura 30	Comparação entre 3, 6, 12 e 30 minutos de teste: frequência e tempo despendido em movimentos erráticos no topo e no fundo do tanque	68
Figura 31	Comparação entre 3, 6, 12 e 30 minutos de teste: frequência e tempo despendido em <i>freezing</i> no fundo do tanque e frequência e tempo despendido em geotaxia	69

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Parâmetros avaliados, parâmetros citados na literatura e parâmetros que foram testados.	42
----------	---	----

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

LCE	Labirinto em Cruz Elevado
LCR	Labirinto em Cruz com Rampa
LEPPEX	Laboratório de Ensino e Psicologia em Psicologia Experimental
NTT	Teste do Tanque Novo
SPA	Serviço Aplicado de Psicologia
UFMT	Universidade Federal de Mato Grosso
UFPA	Universidade Federal do Pará

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	18
1.1	OBJETIVO GERAL	23
2	MÉTODO	24
2.1	SUJEITOS	24
2.2	MANUTENÇÃO DOS ANIMAIS	24
2.3	EQUIPAMENTOS	27
2.4	PROCEDIMENTOS	30
2.5	ANÁLISE DE DADOS	44
3	RESULTADOS	47
3.1	SEXO	47
3.2	FORMATO	50
3.3	LUMINOSIDADE	53
3.4	PERÍODO DO DIA	55
3.5	TAMANHO	58
3.6	REEXPOSIÇÃO 15 MINUTOS	61
3.7	REEXPOSIÇÃO 24 HORAS	63
3.8	TEMPO E HABITUAÇÃO	66
4	DISCUSSÃO	70
5	CONCLUSÃO	78
6	REFERÊNCIAS	80

1 INTRODUÇÃO

O teste do Tanque Novo (NTT) é um teste que mede a locomoção e exploração do peixe pela superfície do Tanque *versus* a exploração do mesmo pelo fundo do tanque. É um teste que analisa respostas de estresse e avalia comportamentos do tipo ansiedade induzidos em peixes (Alia & Petrunich-Rutherford, 2019; Chin et al., 2019; Hong & Zha, 2019; Kysil et al., 2017; Abreu et al., 2016; Mezzomo et al., 2016; Walsh-Monteiro et al., 2016; Parker, 2015; Maximino et al., 2013; Blaser & Rosemberg, 2012; Stewart et al., 2012; Cachat et al., 2011).

O NTT foi introduzido pela primeira vez por Levin et al. (2007), tendo sido utilizado para mostrar uma preferência inicial do Zebrafish (*Danio rerio*) pelo fundo de um tanque novo (ambiente novo). Posteriormente, Cachat et al. (2010a) publicaram um protocolo para medição de respostas comportamentais e endócrinas relacionadas ao estresse quando o Zebrafish é colocado em novos ambientes.

O NTT é um teste utilizado para avaliar comportamentos do tipo ansiedade no Zebrafish, já que essa espécie comumente vive em córregos, canais, valas, riachos e lagoas, em águas estagnadas, particularmente em arrozais da Ásia, ou seja, ambientes nos quais o sujeito, em função da sua ecologia tende a explorar mais a parte profunda da coluna d'água em detrimento do topo tanto do seu habitat natural quanto do NTT (Talwar & Jhingran, 1991; Tran & Gerlai, 2013).

O tanque utilizado no NTT consiste principalmente em um tanque trapezoidal (Levin, et al., 2007¹), podendo apresentar variações em seu formato, tamanho, cor e material (Haghani et al., 2019; Kalueff et al., 2017; Mezzomo et al., 2016; Giacomini et al., 2016; Blaser & Rosemberg, 2012; Parker et al., 2012; Stewart et al., 2010). De qualquer forma, independentemente de suas variações, o tanque geralmente é dividido em duas metades (topo

¹ O tanque utilizado inicialmente era o mesmo em que os peixes ficavam alocados em uma estante e o formato era trapezoidal.

e fundo) (Cachat et al., 2010a), contudo ele também pode apresentar variações nessas divisões (ex.: topo, meio e fundo) (Levin et al., 2007; Bencan et al. , 2009; Sackerman et al., 2010).

Desta forma, o NTT permite também avaliar outros comportamentos do tipo ansiedade além da frequência e tempo total no topo e fundo, tais como: latência para entrar no topo do tanque, número e tempo despendidos em movimentos erráticos, frequência e tempo total de geotaxia (tempo total em que os animais ficaram posicionados no fundo mais próximo ao substrato do tanque), número de ciclos de congelamento (ausência total de movimento, exceto pelas guelras e olhos, por 1 segundo ou mais) e duração total dos congelamentos em ambos os compartimentos do tanque teste (Aponte & Petrunich-Rutherford, 2019; Kysil et al., 2017; Mezzomo et al., 2016; Raymond et al. , 2012; Egan et al., 2009).

Para além dessas medidas, o NTT também vem sendo utilizado para analisar comportamentos de habituação e atividade motora em peixes avaliando a distância total geral e a velocidade média dos sujeitos experimentais dentro do tanque (Alia & Petrunich-Rutherford, 2019; Aponte & Petrunich-Rutherford, 2019; Giacomini et al., 2016; Raymond et al., 2012; Ahmad & Richardson, 2012; Wong et al., 2010).

Com relação aos estudos farmacológicos, o NTT demonstrou que tanto as substâncias ansiolíticas quanto as ansiogênicas podem influenciar nas respostas de habituação e induzir mudanças em certos comportamentos dos peixes, tais como: congelamento, movimentos erráticos, hiperatividade e geotaxia (Rosemberg et al., 2011). Sendo assim, o uso desse teste indicou alta sensibilidade a drogas ansiolíticas e ansiogênicas (Tabela 1) (Alia & Petrunich-Rutherford, 2019; Macri et al., 2019; Jat et al., 2018; Marcon et al., 2018; Kalueff et al., 2017; Giacomini et al., 2016; Stewart et al., 2015; Parker et al., 2012; Stewart et al., 2012; Cachat et al., 2010; Levin et al., 2007).

O NTT, se configura como um simples e importante modelo de estudo dos comportamentos do tipo ansiedade em peixes, já foi utilizado em diversas publicações para

avaliação desses comportamentos, tendo sido utilizado em diversos outros trabalhos científicos (Fontana et al., 2022; Bozi et al., 2021; Anwer et al., 2021; Aponte & Petrunich-Rutherford, 2019; Chin et al., 2019; Haghani et al., 2019; Jat et al., 2018; Kalueff et al., 2017; Kysil et al., 2017; Mezzomo et al., 2016; Giacomini et al., 2016; Parker, 2015; Gerlai, 2013; Tran & Gerlai, 2013; Blaser & Rosemberg, 2012; Parker et al., 2012; Raymond et al., 2012; Sloman & McNeil, 2012; Cachat et al., 2011; Cachat et al., 2010; Stewart et al., 2010; Wisenden, 2010; Wong et al., 2010; Bencan et al., 2009; Egan et al., 2009; Parra et al., 2009; Speedie & Gerlai, 2008; Levin et al., 2007). Porém apesar da vasta utilização do NTT, até o momento, o teste não tinha passado por um estudo consistente de suas propriedades paramétricas, ou seja, não tinha sido realizada uma testagem dos diversos parâmetros para determinar quais destes são relevantes para a evocação de comportamentos do tipo ansiedade no organismo testado (Parker et al., 2012; Parker, 2015; Marcon et al., 2018).

Uma análise paramétrica consistente de um teste incide em manipular e em controlar diferentes parâmetros. No caso do NTT, é necessário avaliar diversas propriedades, tais como: formato (trapezoidal e retangular), medidas do tanque, luminosidade, período do dia em que o teste é realizado, tempo de teste, linhagem dos animais, sexo, idade, condições laboratoriais da aplicação do teste, condições do biotério e se possível a utilização de drogas ansiolíticas e ansiogênicas (Maximino et al., 2010b).

Em 2016, Walsh-Monteiro et al. realizaram uma análise farmacológica do Labirinto em Cruz com Rampa (LCR) que revelou a importância de uma análise paramétrica do NTT, já que o LCR foi baseado no Labirinto em Cruz Elevado (LCE) para roedores e era necessário comprovar que o teste media aquilo que se propunha a medir. Para tal validação, os autores Walsh-Monteiro et al. (2016) utilizaram drogas com efeito ansiolítico (clonazepam e álcool) e analisaram os efeitos dessas substâncias utilizando como parâmetros a duração total do teste e a altura da coluna d'água.

Nessa análise, Walsh-Monteiro et al. (2016) concluíram que independente da duração total da sessão do teste e da altura da coluna d'água, os animais apresentaram preferência inicial pelos braços planos do tanque, entrando e permanecendo pouco tempo nos braços com rampas do tanque (menor coluna d'água). Os pesquisadores também perceberam que quanto menor a coluna d'água mais aversivo o tanque se tornava para os animais, sendo que indiferente do tempo total de teste, a resposta dos sujeitos era a mesma. Tal análise confirmou a importância de parametrizar testes comportamentais, a fim de possibilitar afirmar que tal comportamento está sob controle de determinado estímulo e não de qualquer outro (Maximino et al., 2007).

Apesar da lacuna referente a parametria NTT, alguns autores se propuseram há alguns anos a realizar estudos que definiram alguns parâmetros importantes para utilizar o teste. Parker et al. (2012) manipularam variáveis relacionadas às condições do biotério dos animais e concluíram que o período do dia e a hora em que o NTT é realizado pode afetar a avaliação dos comportamentos do tipo ansiedade nos animais testados. Do mesmo modo, Stewart et al. (2015) observaram diferenças sutis no desempenho dos peixes testados no NTT em dias diferentes, sugerindo certa dificuldade em estabelecer confiabilidade relacionada ao teste-reteste do NTT.

Ainda sobre as condições do biotério, Shishis et al. (2022) realizaram um estudo com o intuito de investigar o impacto fisiológico e psicológico ao manipular a densidade habitacional dos animais nos tanques viveiros. Os autores trabalharam com animais da espécie *Danio rerio*, tendo sido utilizado três tamanhos de tanque (1.5, 10 ou 50 L) com densidades que variavam entre 1, 2 ou 4 peixes/L e concluíram que tanto o tamanho do tanque quanto a densidade populacional exercem efeitos nos comportamentos dos animais, porém os autores afirmaram que seriam necessários mais testes com maior variabilidade de tamanho e densidade populacional para confirmar hipóteses sobre efeitos em comportamentos de medo, ansiedade e estresse.

Já os autores Marcon et al. (2018), Parker (2015) e Parker et al. (2012) descobriram que manter o zebrafish isolado ou apenas em duplas por cerca de duas semanas que antecede o teste pode mascarar a eficácia de algumas toxinas do ambiente que afetam comportamentos sutis dos peixes. Os pesquisadores também perceberam que o isolamento social crônico pode reduzir o cortisol, contudo o isolamento agudo, pode favorecer o aumento dos níveis de cortisol.

Do mesmo modo, Fontana et al. (2022) utilizaram o NTT sem realizar a troca de água do tanque teste entre um teste e o próximo. Os autores observaram que utilizar a mesma água do teste anterior pode modificar o tempo de permanência dos animais da espécie *Danio rerio* no topo do tanque e *freezing*. Além disso, os autores observaram níveis elevados de cortisol, indicando que os animais apresentavam o aumento desse hormônio em função da falta de troca de água. Isso mostra que em experimentos comportamentais é necessário evitar usar a mesma água ao testar vários peixes.

Desta forma, tanto Parker et al. (2012) quanto Stewart et al. (2015) destacaram os desafios que pesquisadores mais experientes e novos pesquisadores vem enfrentando ao realizar estudos ou pesquisas sobre comportamentos do tipo ansiedade em vertebrados aquáticos, bem como os autores ressaltam a importância de que deve existir uma consideração cautelosa das condições ambientais e gerais do biotério, do laboratório onde os testes acontecem e das condições experimentais.

Além do mais, Parker (2015) mostrou em seu estudo o quão difícil e desafiador é maximizar a confiabilidade e validade ecológica em ensaios com vertebrados aquáticos, bem como Maximino et al. (2010a) mostraram em seu estudo o quão importante é realizar a parametria de um teste para compreender suas bases neurais e suas relações com os comportamentos estudados.

1.1 OBJETIVO GERAL

Realizar uma análise paramétrica do NTT, avaliando os efeitos de diferentes parâmetros.

1.1.1 Objetivos Específicos

Verificar se há diferença estatística significativa ao comparar os formatos trapezoidal e retangular quanto ao desempenho do zebrafish no NTT.

Verificar se há diferença estatística significativa ao comparar os sexos (fêmeas e machos) quanto ao desempenho do zebrafish no NTT.

Verificar se há diferença estatística significativa ao comparar diferentes tamanhos do tanque (medidas reduzidas pela metade e medidas dobradas utilizando como referência o tanque regular) quanto ao desempenho do zebrafish no NTT.

Verificar se há diferença estatística significativa ao comparar diferentes intensidades luminosas (125, 250 e 500 lúmens) quanto ao desempenho do zebrafish no NTT.

Verificar se há diferença estatística significativa ao comparar os três períodos do dia (matutino, vespertino e noturno) quanto ao desempenho do zebrafish no NTT.

Verificar se há diferença estatística significativa ao reexpor os animais no teste após 15 minutos da finalização da testagem anterior no que se refere ao desempenho do zebrafish no NTT.

Verificar se há diferença estatística significativa ao reexpor os animais após 24 horas da finalização da testagem anterior no que se refere ao desempenho do zebrafish no NTT.

Realizar a curva de habituação do zebrafish.

2 MÉTODO

2.1 SUJEITOS

Foram utilizados no total 132 (cento e trinta e dois) zebrafish ($n=132$), de ambos os sexos, com idade mínima de 2 e máxima de 6 meses, adquiridos na Aquaflowers em Osasco – SP, distribuídos em:

- a) 24 (vinte e quatro) zebrafish para os testes de formato e sexo.
- b) 24 (vinte e quatro) zebrafish para o teste de luminosidade/lúmens.
- c) 24 (vinte e quatro) zebrafish para o teste de dimensões/tamanho do tanque.
- d) 24 (vinte e quatro) zebrafish para o teste do período do dia.
- e) 12 (doze) zebrafish para o teste de reexposição de 15 minutos.
- f) 12 (doze) zebrafish para o teste de reexposição de 24 horas.
- g) 12 (doze) zebrafish para os testes de tempo total de teste e habituação.

O zebrafish é um peixe de água doce que mede em torno de 5 centímetros quando adulto (90 dias), vive em córregos, canais, valas, riachos e lagoas, em águas estagnadas, particularmente em arrozais da Ásia. As condições do ambiente em que o zebrafish vive é com o pH da água entre 6 e 8, a dureza da água entre 5 e 19mg/L e a temperatura da água variando entre 18°C e 24°C. Os animais costumam a viver em grupos de 5 ou mais indivíduos, alimentando-se de larvas de insetos, minhocas e pequenos crustáceos (Talwar & Jhingran, 1991).

2.2 MANUTENÇÃO DOS ANIMAIS

Após a compra, os animais foram transportados de automóvel para o biotério em um saco plástico com água do aquário viveiro e ar. Os sacos eram próprios para o transporte de peixes. O transporte levou entre 15 e 60 minutos até chegar ao biotério. Ao chegar no biotério, cerca de 80% da água do saco foi retirada e o saco plástico foi novamente preenchido com água

do tanque do biotério até igualar a quantidade de água que restou no saco (50% da água que restou somado a 50% de água do tanque do biotério). Posteriormente, os sacos foram amarrados e deixados em cima da água dos tanques do biotério para igualar a temperatura da água por 30 minutos. Em seguida, os animais foram colocados nos tanques do biotério utilizando uma rede própria para aquários. Os animais passaram 15 dias em período de habituação antes de passarem pelo NTT.

Durante toda a coleta de dados, os animais foram mantidos em quatro tanques viveiros de vidro medindo 60 x 30 x 40 cm (Dias et al, 2017) dividindo o espaço com no mínimo 12 e no máximo 30 outros animais da mesma espécie, tendo no mínimo 1L de água por animal. Cada tanque era composto por uma lâmpada de 15W de LED (equivalente a 60W incandescente ou 800 lúmens) amarela, um medidor de temperatura fixado em uma das paredes da parte de fora do tanque, um termostato individual acoplado dentro do tanque ajustado em 20°C e um filtro de esponja individual ligado através de uma mangueira transparente a um compressor de ar oxigenador com 4 saídas independentes.

No que se refere as condições do biotério, a exposição à luz foi controlada num ciclo de 14/10 iniciado às 06h da manhã e finalizado às 20h da noite. A condição da água foi medida semanalmente com um medidor de pH 7 em 1 (caneta de teste de água). Durante os meses em que ocorreram os experimentos, o pH da água foi mantido entre 7 e 8, a alcalinidade na faixa de 50-150mg de CaCO_3/L , a dureza da água acima de 75mg/L, a salinidade em torno de 0,5-2 g/L, o oxigênio acima de 4mg/L, os compostos nitrogenados abaixo de 0,02 mg/L e a temperatura da água entre 19°C e 22°C.

Os peixes foram alimentados uma vez por dia no período matutino entre 8h e 12h com ração própria para a espécie (Ace Pet Flocada, Kallina fabricante, São Paulo/SP). Nos dias em que não houve testes, os animais foram alimentados entre 8h e 9h da manhã, nos dias em que houve testes, os peixes foram alimentados entre 10h e 12h da manhã após as testagens, com

exceção do teste do período do dia, no qual os animais foram alimentados entre 8h e 9h da manhã e os testes foram realizados a partir das 16h. Durante todos os testes, os peixes permaneciam em um jejum que variou entre 22 a 26 horas e nos testes de período do dia, os animais ficavam em jejum por um período que variou entre 8 e 16 horas.

Todos os animais que passaram pelos testes foram retirados juntos do tanque do biotério 30 minutos antes dos testes serem iniciados. Nos dias de teste foram retirados do biotério e testados no mínimo 4 e no máximo 12 animais. Para tanto, os peixes foram colocados em um tanque de transporte de plástico transparente, medindo 32 x 24 x 10 cm, ficando todos os animais juntos até o momento em que cada um foi retirado individualmente para a testagem.

Foi usada a água dos tanques viveiros tanto para os testes quanto para o transporte dos animais até o local em que os testes foram realizados. Após serem retirados dos tanques viveiros, todos os animais ficaram 30 minutos juntos dentro desse recipiente de plástico para aclimação dentro do laboratório em cima da bancada onde os testes eram realizados, antes dos testes iniciarem.

Após cada teste, o animal testado era colocado dentro de outro tanque de transporte de plástico, semelhante ao tanque de transporte usado antes dos testes, medindo 32 x 24 x 10 cm. Todos os animais foram colocados nesse recipiente e devolvidos para o tanque viveiro em que não havia outros animais que tinham passado por algum teste. Após as testagens, os animais foram doados ou devolvidos para a distribuidora.

Foram realizadas no total 5 compras/recebimentos de peixes com o intuito de manter a idade dos peixes durante as testagens (entre 2 e 6 meses), todas as compras foram feitas com o mesmo distribuidor entre as datas de 20 de abril de 2024 e 22 de junho de 2024.

Todos os experimentos foram administrados pelo Laboratório de Ensino e Psicologia em Psicologia Experimental (LEPPEX), Serviço Aplicado de Psicologia (SPA) da Universidade Federal de Mato Grosso (UFMT). Todo o manejo dos animais foi realizado de

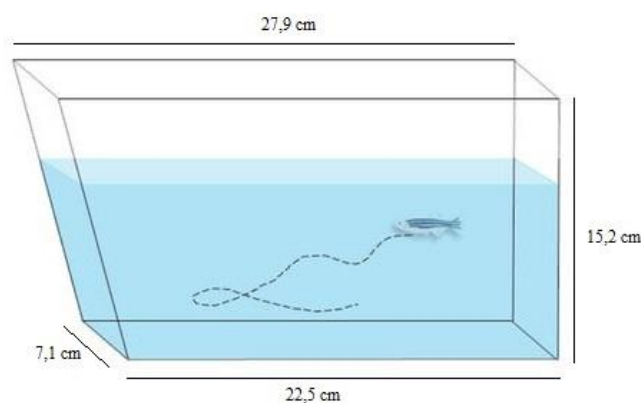
acordo com as diretrizes para a conduta ética no cuidado e uso de animais em pesquisas, sendo que o projeto de pesquisa teve o parecer aprovado pelo Comitê de Uso de Animais Regional da UFMT em 30 de julho de 2021 (parecer nº 23108.077275/2020-91).

2.3 EQUIPAMENTOS

2.3.1 Tanque Trapezoidal

Tanque trapezoidal (Figura 1) seguindo as dimensões propostas na literatura (Levin et al., 2007), sendo 15,2 cm altura x 27,9 cm comprimento do topo x 22,5 cm comprimento do fundo x 7,1 cm de largura (Tabela 1).

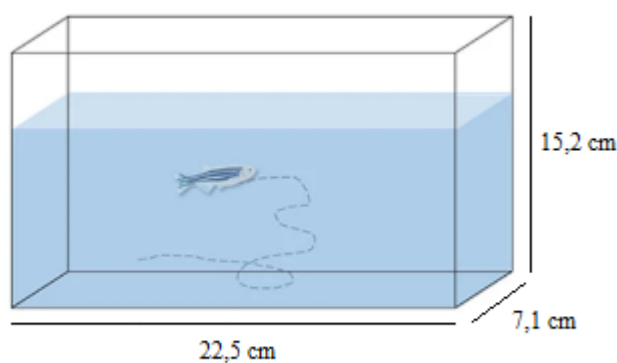
Figura 1. Tanque trapezoidal. Fonte: Fontana et al. (2021).



2.3.2 Tanque Retangular

Tanque retangular (Figura 2) seguindo as dimensões propostas na literatura (Levin et al., 2007), sendo 15,2 cm altura x 22,5 cm comprimento x 7,1 cm de largura (Tabela 1). Esse equipamento sofreu variações em todas as suas dimensões, teve seu tamanho reduzido pela metade, como também teve todas as suas medidas dobradas (Tabela 1).

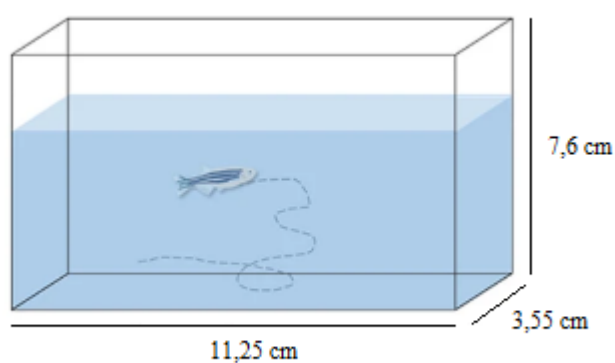
Figura 2. Tanque retangular. Fonte: Fontana et al. (2022).



2.3.2.1 Tanque retangular reduzido pela metade das medidas do tanque retangular regular

Tanque retangular (Figura3) com as medidas reduzidas pela metade para o experimento do parâmetro do tamanho do tanque, sendo as seguintes medidas: 7,6 x 11,25 x 3,55 cm (Tabela 1).

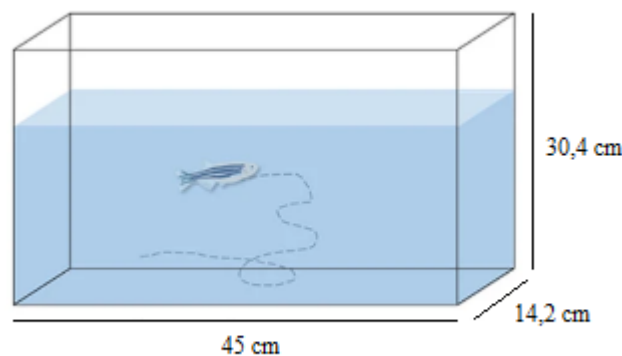
Figura 3. Tanque retangular reduzido pela metade das medidas do tanque retangular regular. Fonte: Fontana et al. (2022).



2.3.2.2 Tanque retangular com o dobro das medidas do tanque retangular regular

Tanque retangular (Figura 4) com as medidas dobradas para o experimento do parâmetro do tamanho do tanque, sendo as seguintes medidas: sendo 30,4 x 45 x 14,2 cm (Tabela 1).

Figura 4. Tanque retangular com o dobro das medidas do tanque retangular regular. Fonte: Fontana et al. (2022).



2.3.3 Tripé para dispositivo móvel (celular)

Tripé para câmera de celular ou câmera com comprimento mínimo de um metro de altura.

2.3.4 Luminária com luxímetro

Luminária com luxímetro (medição dos lúmens) e uma lâmpada branca de 60W incandescente acoplada.

2.3.5 Computador

Computador com qualquer versão do Windows ou com Wine para o sistema Linux. A máquina deve ter no mínimo 2 MB de espaço em disco rígido e 64 MB de memória RAM.

2.3.6 X-Plorat

O *software* X-PloRat, escrito na linguagem de programação Object Pascal que permite o registro manual da quantidade e tempo despendido dos comportamentos enquanto o usuário assiste ao vídeo do experimento. O aplicativo pode ser baixado em: <https://sites.ffclrp.usp.br/scotty/> e deve ser instalado de acordo com as orientações do próprio aplicativo.

2.4 PROCEDIMENTOS

Todos os testes foram gravados utilizando um dispositivo móvel, acoplado em um tripé regulado na altura de um metro, em uma distância de 80 cm a um metro do tanque teste.

2.4.1 Sexagem

A distinção do sexo dos animais foi realizada através da observação direta deles dentro do tanque teste após o início da filmagem. Os animais menores, mais esguios, delgados e escuros foram definidos como machos, enquanto os peixes maiores e com o formato mais ovalado foram definidos como fêmeas (Figura 5).

Figura 5. Zebrafish macho do lado esquerdo e zebrafish fêmea do lado direito. Fonte: <https://scienceofsewing.blogspot.com/>



2.4.2 Formato

Durante o período entre 7h30min e 8h30min da manhã, os animais foram retirados do tanque do biotério e colocados no tanque de transporte de plástico para a aclimação de 30 minutos. Uma luminária com luxímetro e uma lâmpada de 60W foi utilizada ao lado do aquário para regular e manter a iluminação dentro dele em 250 lúmens.

O tanque teste trapezoidal ou retangular (Figuras 1 e 2) foi preenchido com água do tanque do biotério até atingir 12 cm de altura e uma câmera de um dispositivo móvel foi utilizada apoiada nas duas paredes de cima do tanque teste para verificar possíveis sombras no fundo do tanque. Após isso, o primeiro animal foi retirado com uma rede do tanque de transporte, colocado dentro do tanque trapezoidal ou retangular e a filmagem foi iniciada. Ao completar 6 minutos de teste, a filmagem foi finalizada, o animal foi retirado do tanque teste com a rede e colocado no tanque de transporte. Após o animal ter sido testado, o aparato foi esvaziado e preenchido novamente com a água do biotério para a testagem do próximo animal (Egan et al., 2009).

Após o término de todos os testes, todos os animais testados foram devolvidos juntos ao tanque do biotério destinado aos animais que passaram pela testagem. Após o retorno para o tanque do biotério, todos os animais foram alimentados.

2.4.3 Luminosidade

O grupo controle desse teste equivale ao teste do formato retangular.

2.4.3.1 Iluminação com 250 lúmens

Durante o período entre 7h30min e 8h30min da manhã, os animais foram retirados do tanque do biotério e colocados no tanque de transporte de plástico para a aclimação de 30

minutos. Uma luminária com luxímetro e uma lâmpada de 60W foi utilizada ao lado do aquário para regular e manter a iluminação dentro dele em 250 lúmens.

O tanque retangular (Figura 2) foi preenchido com água do tanque do biotério até atingir 12 cm de altura e foi medida a quantidade de lúmens incididos no tanque teste. A intensidade foi gerida através de um regulador próprio da luminária e o controle da quantidade de lúmens foi realizada através do uso do aplicativo de celular LUX Light Meter disponível gratuitamente no sistema operacional móvel iOS. Para tanto, o dispositivo móvel foi posicionado em cima das duas paredes do tanque, com a câmera de trás voltada para dentro do tanque, permitindo a verificação da quantidade de lúmens dentro do tanque teste e possíveis sombras no fundo do tanque.

Após a regulação da intensidade luminosa em 250 lúmens e a confirmação de que não havia sombras no fundo do tanque, o primeiro animal foi retirado com uma rede do tanque de transporte, colocado dentro do tanque retangular e a filmagem foi iniciada. Ao completar 6 minutos de teste, a filmagem foi finalizada, o animal foi retirado do tanque teste com a rede e colocado no tanque de transporte. Após o animal ter sido testado, o aparato foi esvaziado e preenchido novamente com a água do biotério para a testagem do próximo animal (Egan et al., 2009). Após cada testagem a quantidade de lúmens foi medida novamente com o intuito de manter a intensidade luminosa utilizada no teste.

2.4.3.2 Iluminação com 125 lúmens

Durante o período entre 7h30min e 8h30min da manhã, os animais foram retirados do tanque do biotério e colocados no tanque de transporte de plástico para a aclimação de 30 minutos. Uma luminária com luxímetro e uma lâmpada de 60W foi utilizada ao lado do aquário para regular e manter a iluminação dentro dele em 125 lúmens.

O tanque retangular (Figura 2) foi preenchido com água do tanque do biotério até atingir 12 cm de altura e foi medida a quantidade de lúmens incididos no tanque teste. A intensidade foi gerida através de um regulador próprio da luminária e o controle da quantidade de lúmens foi realizada através do uso do aplicativo de celular LUX Light Meter disponível gratuitamente no sistema operacional móvel iOS. Para tanto, o dispositivo móvel foi posicionado em cima das duas paredes do tanque, com a câmera de trás voltada para dentro do tanque, permitindo a verificação da quantidade de lúmens dentro do tanque teste e possíveis sombras no fundo do tanque.

Após a regulação da intensidade luminosa em 125 lúmens e a confirmação de que não havia sombras no fundo do tanque, o primeiro animal foi retirado com uma rede do tanque de transporte, colocado dentro do tanque retangular e a filmagem foi iniciada. Ao completar 6 minutos de teste, a filmagem foi finalizada, o animal foi retirado do tanque teste com a rede e colocado no tanque de transporte. Após o animal ter sido testado, o aparato foi esvaziado e preenchido novamente com a água do biotério para a testagem do próximo animal (Egan et al., 2009). Após cada testagem a quantidade de lúmens foi medida novamente com o intuito de manter a intensidade luminosa utilizada no teste.

2.4.3.3 Iluminação com 500 lúmens

Durante o período entre 7h30min e 8h30min da manhã, os animais foram retirados do tanque do biotério e colocados no tanque de transporte de plástico para a aclimação de 30 minutos. Uma luminária com luxímetro e uma lâmpada de 60W foi utilizada ao lado do aquário para regular e manter a iluminação dentro dele em 500 lúmens.

O tanque retangular (Figura 2) foi preenchido com água do tanque do biotério até atingir 12 cm de altura e foi medida a quantidade de lúmens incididos no tanque teste. A intensidade foi gerida através de um regulador próprio da luminária e o controle da quantidade

de lúmens foi realizada através do uso do aplicativo de celular LUX Light Meter disponível gratuitamente no sistema operacional móvel iOS. Para tanto, o dispositivo móvel foi posicionado em cima das duas paredes do tanque, com a câmera de trás voltada para dentro do tanque, permitindo a verificação da quantidade de lúmens dentro do tanque teste e possíveis sombras no fundo do tanque.

Após a regulação da intensidade luminosa em 500 lúmens e a confirmação de que não havia sombras no fundo do tanque, o primeiro animal foi retirado com uma rede do tanque de transporte, colocado dentro do tanque retangular e a filmagem foi iniciada. Ao completar 6 minutos de teste, a filmagem foi finalizada, o animal foi retirado do tanque teste com a rede e colocado no tanque de transporte. Após o animal ter sido testado, o aparato foi esvaziado e preenchido novamente com a água do biotério para a testagem do próximo animal (Egan et al., 2009). Após cada testagem a quantidade de lúmens foi medida novamente com o intuito de manter a intensidade luminosa utilizada no teste.

2.4.4 Período do dia

O grupo controle desse teste equivale ao teste do formato retangular.

2.4.4.1 Período matutino

Durante o período entre 7h30min e 8h30min da manhã, os animais foram retirados do tanque do biotério e colocados no tanque de transporte de plástico para a aclimação de 30 minutos. Uma luminária com luxímetro e uma lâmpada de 60W foi utilizada ao lado do aquário para regular e manter a iluminação dentro dele em 250 lúmens.

O tanque teste (Figura 2) foi preenchido com água do tanque do biotério até atingir 12 cm de altura e uma câmera de um dispositivo móvel foi utilizada apoiada nas duas paredes de cima do tanque teste para verificar possíveis sombras no fundo do tanque. Após isso, o primeiro

animal foi retirado com uma rede do tanque de transporte, colocado dentro do tanque teste e a filmagem foi iniciada. Ao completar 6 minutos de teste, a filmagem foi finalizada, o animal foi retirado do tanque teste com a rede e colocado no tanque de transporte. Após o animal ter sido testado, o aparato foi esvaziado e preenchido novamente com a água do biotério para a testagem do próximo animal (Egan et al., 2009).

Após o término de todos os testes, todos os animais testados foram devolvidos juntos ao tanque do biotério destinado aos animais que passaram pela testagem. Após o retorno para o tanque do biotério, todos os animais foram alimentados.

2.4.4.2 Período vespertino

Em função do horário desse teste, os animais foram alimentados entre 8h e 9h da manhã.

Durante o período entre 16h e 18h da tarde, os animais foram retirados do tanque do biotério e colocados no tanque de transporte de plástico para a aclimação de 30 minutos. Uma luminária com luxímetro e uma lâmpada de 60W foi utilizada ao lado do aquário para regular e manter a iluminação dentro dele em 250 lúmens.

O tanque teste (Figura 2) foi preenchido com água do tanque do biotério até atingir 12 cm de altura e uma câmera de um dispositivo móvel foi utilizada apoiada nas duas paredes de cima do tanque teste para verificar possíveis sombras no fundo do tanque. Após isso, o primeiro animal foi retirado com uma rede do tanque de transporte, colocado dentro do tanque teste e a filmagem foi iniciada. Ao completar 6 minutos de teste, a filmagem foi finalizada, o animal foi retirado do tanque teste com a rede e colocado no tanque de transporte. Após o animal ter sido testado, o aparato foi esvaziado e preenchido novamente com a água do biotério para a testagem do próximo animal (Egan et al., 2009).

Após o término de todos os testes, todos os animais testados foram devolvidos juntos ao tanque do biotério destinado aos animais que passaram pela testagem.

2.4.4.2 Período noturno

Em função do horário desse teste, os animais foram alimentados entre 8h e 9h da manhã.

Durante o período entre 20h e 22h da noite, os animais foram retirados do tanque do biotério e colocados no tanque de transporte de plástico para a aclimação de 30 minutos. Uma luminária com luxímetro e uma lâmpada de 60W foi utilizada ao lado do aquário para regular e manter a iluminação dentro dele em 250 lúmens.

O tanque teste (Figura 2) foi preenchido com água do tanque do biotério até atingir 12 cm de altura e uma câmera de um dispositivo móvel foi utilizada apoiada nas duas paredes de cima do tanque teste para verificar possíveis sombras no fundo do tanque. Após isso, o primeiro animal foi retirado com uma rede do tanque de transporte, colocado dentro do tanque teste e a filmagem foi iniciada. Ao completar 6 minutos de teste, a filmagem foi finalizada, o animal foi retirado do tanque teste com a rede e colocado no tanque de transporte. Após o animal ter sido testado, o aparato foi esvaziado e preenchido novamente com a água do biotério para a testagem do próximo animal (Egan et al., 2009).

Após o término de todos os testes, todos os animais testados foram devolvidos juntos ao tanque do biotério destinado aos animais que passaram pela testagem.

2.4.4 Reexposição 15 minutos

Durante o período entre 7h30min e 8h30min da manhã, os animais foram retirados do tanque do biotério e colocados no tanque de transporte de plástico para a aclimação de 30

minutos. Uma luminária com luxímetro e uma lâmpada de 60W foi utilizada ao lado do aquário para regular e manter a iluminação dentro dele em 250 lúmens.

Para evitar que os animais fossem confundidos durante as reexposições, os mesmos foram alocados em caixas transparentes distintas de acordo com a exposição do teste em que os animais estavam passando, por exemplo: os animais que ainda não tinham passado por nenhuma exposição estavam alocados na mesma caixa, os animais que tinham passado por uma exposição e estavam aguardando a primeira reexposição, ficaram alocados em outra caixa e o mesmo se deu para aqueles animais que iriam passar pela segunda reexposição.

Para tanto, o tanque teste (Figura 2) foi preenchido com água do tanque do biotério até atingir 12 cm de altura e uma câmera de um dispositivo móvel foi utilizada apoiada nas duas paredes de cima do tanque teste para verificar possíveis sombras no fundo do tanque. Após isso, o primeiro animal foi retirado com uma rede do tanque de transporte, colocado dentro do tanque teste e a filmagem foi iniciada. Ao completar 6 minutos de teste, a filmagem foi finalizada, o animal foi retirado do tanque teste com a rede e colocado no tanque transparente para aguardar a próxima exposição ao aparato.

Passados 15 minutos do teste, os animais foram reexpostos ao aparato e todo o procedimento descrito no parágrafo anterior foi repetido. Após a finalização, os animais foram retirados do tanque teste e colocados no tanque transparente. Após 15 minutos do final da testagem, anterior, os animais foram reexpostos pela segunda vez ao teste. Ao completar 6 minutos de teste, a filmagem foi finalizada, o animal foi retirado do tanque teste com a rede e colocado no tanque de transporte. Após o animal ter sido testado, o aparato foi esvaziado e preenchido novamente com a água do biotério para a testagem do próximo animal (Egan et al., 2009).

Após o término de todos os testes, todos os animais testados foram devolvidos juntos ao tanque do biotério destinado aos animais que passaram pela testagem. Após o retorno para o tanque do biotério, todos os animais foram alimentados.

2.4.5 Reexposição 24 horas

Durante o período entre 7h30min e 8h30min da manhã, os animais foram retirados do tanque do biotério e colocados no tanque de transporte de plástico para a aclimação de 30 minutos. Uma luminária com luxímetro e uma lâmpada de 60W foi utilizada ao lado do aquário para regular e manter a iluminação dentro dele em 250 lúmens.

Para evitar que os animais fossem confundidos com outros animais durante as reexposições, eles foram alocados em um tanque do biotério destinado apenas a eles durante os 3 dias de testes.

Desta forma, o tanque teste (Figura 2) foi preenchido com água do tanque do biotério até atingir 12 cm de altura e uma câmera de um dispositivo móvel foi utilizada apoiada nas duas paredes de cima do tanque teste para verificar possíveis sombras no fundo do tanque. Após isso, o primeiro animal foi retirado com uma rede do tanque de transporte, colocado dentro do tanque teste e a filmagem foi iniciada. Ao completar 6 minutos de teste, a filmagem foi finalizada, o animal foi retirado do tanque teste com a rede e colocado no tanque do biotério reservado para os animais que estavam passando pelo teste de reexposição a cada 24 horas. Após o animal ter sido testado, o aparato foi esvaziado e preenchido novamente com a água do biotério para a testagem do próximo animal (Egan et al., 2009).

Passados 24 horas do teste, os animais foram reexpostos ao aparato e todo o procedimento descrito no parágrafo anterior foi repetido. Após a finalização, os animais foram retirados do tanque teste, colocados no tanque de transporte e devolvidos ao tanque do biotério. Após 24 horas do final da testagem do dia anterior, os animais foram reexpostos pela segunda

vez ao teste. Ao completar 6 minutos de teste, a filmagem foi finalizada, o animal foi retirado do tanque teste com a rede e colocado no tanque de transporte. Após o animal ter sido testado, o aparato foi esvaziado e preenchido novamente com a água do biotério para a testagem do próximo animal (Egan et al., 2009).

Após o término de todos os testes, todos os animais testados foram devolvidos juntos ao tanque do biotério destinado aos animais que passaram pela testagem e foram alimentados.

2.4.6 Tamanho

O grupo controle desse teste equivale ao teste do formato retangular.

2.4.6.1 Tamanho regular

Durante o período entre 7h30min e 8h30min da manhã, os animais foram retirados do tanque do biotério e colocados no tanque de transporte de plástico para a aclimação de 30 minutos. Uma luminária com luxímetro e uma lâmpada de 60W foi utilizada ao lado do aquário para regular e manter a iluminação dentro dele em 250 lúmens.

O tanque teste (Figura 2) foi preenchido com água do tanque do biotério até atingir 12 cm de altura e uma câmera de um dispositivo móvel foi utilizada apoiada nas duas paredes de cima do tanque teste para verificar possíveis sombras no fundo do tanque. Após isso, o primeiro animal foi retirado com uma rede do tanque de transporte, colocado dentro do tanque teste e a filmagem foi iniciada. Ao completar 6 minutos de teste, a filmagem foi finalizada, o animal foi retirado do tanque teste com a rede e colocado no tanque de transporte. Após o animal ter sido testado, o aparato foi esvaziado e preenchido novamente com a água do biotério para a testagem do próximo animal (Egan et al., 2009).

Após o término de todos os testes, todos os animais testados foram devolvidos juntos ao tanque do biotério destinado aos animais que passaram pela testagem. Após o retorno para o tanque do biotério, todos os animais foram alimentados.

2.4.6.2 Tamanho com medidas reduzidas pela metade do tanque retangular regular

Durante o período entre 7h30min e 8h30min da manhã, os animais foram retirados do tanque do biotério e colocados no tanque de transporte de plástico para a aclimação de 30 minutos. Uma luminária com luxímetro e uma lâmpada de 60W foi utilizada ao lado do aquário para regular e manter a iluminação dentro dele em 250 lúmens.

O tanque teste foi preenchido (Figura 3) com água do tanque do biotério até atingir 6 cm de altura e uma câmera de um dispositivo móvel foi utilizada apoiada nas duas paredes de cima do tanque teste para verificar possíveis sombras no fundo do tanque. Após isso, o primeiro animal foi retirado com uma rede do tanque de transporte, colocado dentro do tanque teste e a filmagem foi iniciada. Ao completar 6 minutos de teste, a filmagem foi finalizada, o animal foi retirado do tanque teste com a rede e colocado no tanque de transporte. Após o animal ter sido testado, o aparato foi esvaziado e preenchido novamente com a água do biotério para a testagem do próximo animal (Egan et al., 2009).

Após o término de todos os testes, todos os animais testados foram devolvidos juntos ao tanque do biotério destinado aos animais que passaram pela testagem. Após o retorno para o tanque do biotério, todos os animais foram alimentados.

2.4.6.3 Tamanho com o dobro das medidas do tanque retangular regular

Durante o período entre 7h30min e 8h30min da manhã, os animais foram retirados do tanque do biotério e colocados no tanque de transporte de plástico para a aclimação de 30

minutos. Uma luminária com luxímetro e uma lâmpada de 60W foi utilizada ao lado do aquário para regular e manter a iluminação dentro dele em 250 lúmens.

O tanque teste foi preenchido (Figura 4) com água do tanque do biotério até atingir 24 cm de altura e uma câmera de um dispositivo móvel foi utilizada apoiada nas duas paredes de cima do tanque teste para verificar possíveis sombras no fundo do tanque. Após isso, o primeiro animal foi retirado com uma rede do tanque de transporte, colocado dentro do tanque teste e a filmagem foi iniciada. Ao completar 6 minutos de teste, a filmagem foi finalizada, o animal foi retirado do tanque teste com a rede e colocado no tanque de transporte. Em função do tamanho do tanque que utilizava toda a água do tanque do biotério (o aquário ficava vazio), foi decidido que os animais seriam todos testados sem trocar a água.

Após o término de todos os testes, todos os animais testados foram devolvidos juntos ao tanque do biotério destinado aos animais que passaram pela testagem. Depois do retorno ao tanque do biotério, todos os animais foram alimentados.

2.4.7 Tempo e habituação

Durante o período entre 7h30min e 8h30min da manhã, os animais foram retirados do tanque do biotério e colocados no tanque de transporte de plástico para a aclimação de 30 minutos. Uma luminária com luxímetro e uma lâmpada de 60W foi utilizada ao lado do aquário para regular e manter a iluminação dentro dele em 250 lúmens.

O tanque teste (Figura 2) foi preenchido com água do tanque do biotério até atingir 12 cm de altura e uma câmera de um dispositivo móvel foi utilizada apoiada nas duas paredes de cima do tanque teste para verificar possíveis sombras no fundo do tanque. Após isso, o primeiro animal foi retirado com uma rede do tanque de transporte, colocado dentro do tanque teste e a filmagem foi iniciada. Ao completar 30 minutos de teste, a filmagem foi finalizada, o animal foi retirado do tanque teste com a rede e colocado no tanque de transporte. Após o animal ter

sido testado, o aparato foi esvaziado e preenchido novamente com a água do biotério para a testagem do próximo animal (Egan et al., 2009).

Após o término de todos os testes, todos os animais testados foram devolvidos juntos ao tanque do biotério destinado aos animais que passaram pela testagem. Após o retorno para o tanque do biotério, todos os animais foram alimentados.

Para os testes de habituação e tempo total de teste foram usados no total 12 animais para ambas as avaliações, isto é, o tempo de 3, 6 e 12 minutos foram comparados entre os mesmos animais.

Tabela 1. Parâmetros avaliados, parâmetros citados na literatura (Egan et al., 2009; Levin et al., 2007) e parâmetros que foram testados.

Ordem de testagens	Parâmetro avaliado	Número de sujeitos	Parâmetro na literatura (controle)	Parâmetro estudado
1	Sexo	n=24	Não havia teste discriminando o sexo dos animais	Macho Fêmea
2	Formato	n=24	Trapezoidal Retangular	15,2 cm altura x 27,9 cm comprimento do topo x 22,5 cm comprimento do fundo x 7,1 cm de largura 15,2 cm altura x 22,5 cm comprimento do fundo x 7,1 cm de largura
3	Luminosidade	n=24	250 Lúmens	125 lúmens 500 lúmens
4	Período do dia	n=24	Matutino	Vespertino Noturno
5	Reexposição 15 minutos	n=12	Não havia teste de reexposição	2 reexposições

6	Reexposição 24 horas	n=12	Não havia teste de reexposição	2 reexposições
7	Tamanho	n=24	Tamanho regular (15,2 x 22,5 x 7,1 cm)	Tamanho reduzido pela metade das medidas (7,6 x 11,25 x 3,55 cm) Tamanho com as medidas dobradas (30,4 x 45 x 14,2 cm)
8	Tempo total de teste	n=12	6 minutos	3 minutos 12 minutos
9	Habituação	n=12	Não havia teste de habituação	30 minutos de teste

Os testes foram realizados na ordem em que foram colocados na tabela, tendo obrigatoriamente sido a sexagem e o teste do formato (retangular ou trapezoidal) os primeiros a serem realizados, já que ambos foram realizados nas mesmas testagens. De qualquer forma, os testes posteriores dependiam do resultado do teste do formato. O segundo parâmetro testado foi a iluminação incidida no aparato em 250 (grupo controle), 125 e 500 lúmens. O terceiro parâmetro analisado foi o teste do período do dia, no qual os animais passaram pelo teste nos períodos matutino (grupo controle), vespertino (das 16h às 18h) e noturno (das 20h às 22h).

O quarto e quinto parâmetros testados se referia a reexposição do animal ao teste, no quarto teste os animais foram expostos ao teste (grupo controle) e reexpostos por mais duas vezes a cada 15 minutos, já o quinto teste, os animais foram expostos ao teste (grupo controle) e reexpostos por mais duas vezes após 24 horas. O sexto parâmetro testado foi o tamanho do aparato, tendo sido utilizado as dimensões de acordo com a literatura (grupo controle), um tanque com a metade das medidas do tanque regular (7,6 x 3,5 x 11,2 cm) e outro tanque com o dobro das medidas do tanque regular (30,4 x 14,2 x 45 cm).

O último teste composto foi por dois experimentos, no qual os animais foram expostos ao teste pela metade do tempo proposta na literatura (3 minutos), pelo tempo estipulado pela

literatura (6 minutos) como também foram expostos ao teste pelo dobro do tempo proposto na literatura (12 minutos). Por fim, o último parâmetro analisado foi a curva de habituação dos animais, no qual os sujeitos foram expostos ao teste pelo tempo total de 30 minutos. Em ambos os testes, o tempo de 6 minutos foi utilizado como controle.

2.5 ANÁLISE DE DADOS

2.5.1 Comportamentos-alvo do tipo ansiedade

- a) Latência para entrar no topo do tanque;
- b) Tempo despendido no topo do tanque;
- c) Número de entradas ou cruzamentos para o topo do tanque;
- d) Número de movimentos erráticos (nado com mudança brusca de percurso) no topo e no fundo do tanque;
- e) Tempo total despendido em movimentos erráticos no topo e no fundo do tanque;
- f) Frequência de congelamentos/*freezing* (ausência total de movimento, exceto pelas guelras e olhos, por 1 segundo ou mais) no topo e no fundo do tanque;
- g) Tempo total despendido em congelamentos/*freezing* no topo e no fundo do tanque;
- h) Frequência de geotaxia;
- i) Tempo total despendido em geotaxia;

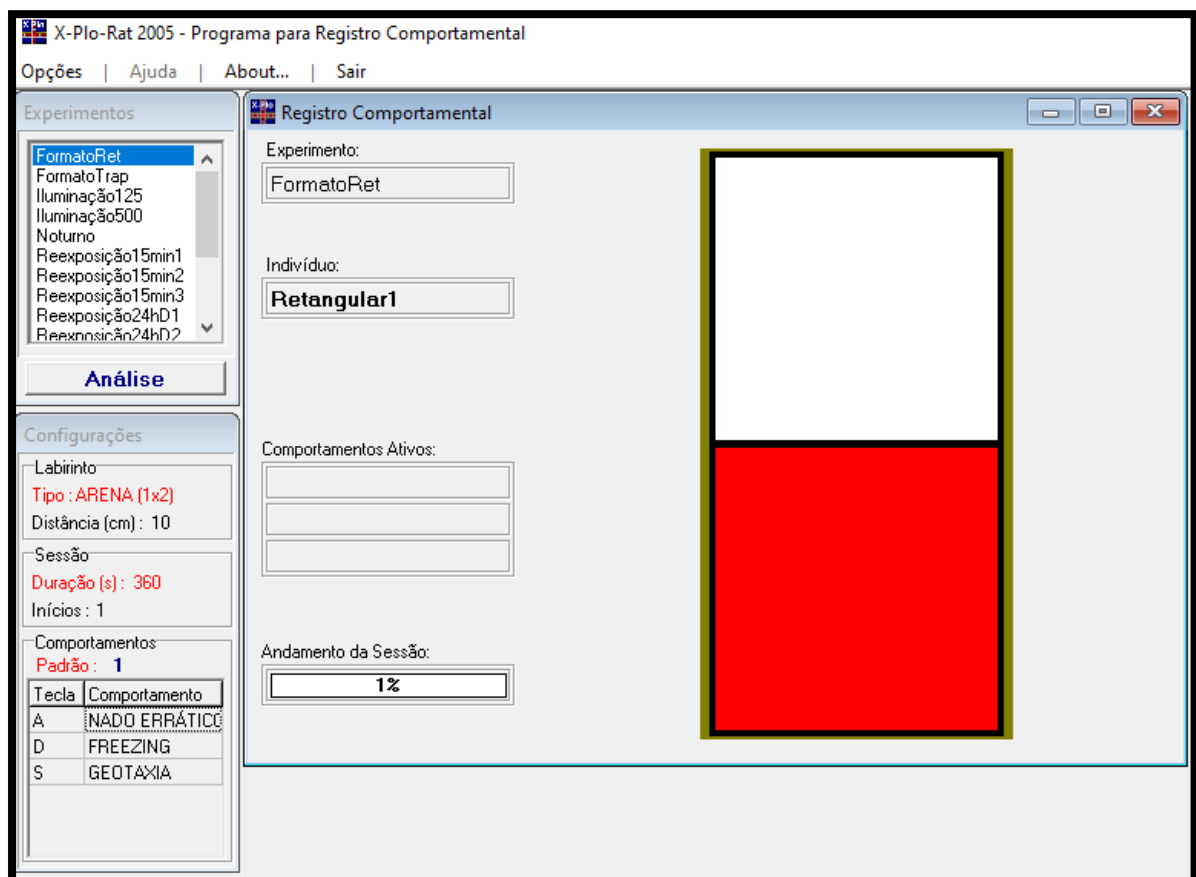
2.5.2 Registro dos comportamentos utilizando o X-Plorat

Após realizado o download, o aplicativo foi instalado, executado e o teclado foi configurado em Opções > Configurar Teclado > Confirmar. Um novo experimento foi criado após clicar em Opções > Experimento > Novo. Em seguida, uma caixa de diálogo foi aberta, o nome do experimento foi cunhado, por exemplo: “FormatoRentagular”, foi confirmado o nome do experimento, posteriormente o tipo do labirinto foi selecionado (arena 1x2), a distância

mantida em 10cm, a duração do experimento foi de 360 segundos (6 minutos) com apenas um início. O único experimento que teve alteração na formatação foi o teste de habituação, na qual a duração total do experimento foi de 1800 segundos (30 minutos).

Depois que o experimento foi configurado, a letra A foi selecionada para indicar nado errático, a letra D para *freezing*, a letra S para geotaxia e as setas para baixo e para cima para indicar a mudança do topo para o fundo e vice-versa. Em seguida, outra caixa foi aberta com a simulação do aquário teste (Figura 5). Após isso, foi selecionado o item “do início da sessão” e foi clicado em confirmar seleção. Uma nova caixa foi aberta, foi identificado o número/nome do experimento, por exemplo: “Sexo1”, o nome foi confirmado e o aplicativo estava completo para realizar o registro dos comportamentos-alvo. O início foi dado ao pressionar a tecla 5 e ao concluir o tempo total do experimento (360 segundos), o próprio aplicativo fechava a sessão.

Figura 6. X-Plorat. Fonte: arquivo pessoal.



Todos os animais iniciaram o teste no fundo do topo, por isso a Figura 6 está com o fundo em vermelho indicando que o animal está naquele espaço. A latência para entrar no topo foi medida através da contagem de segundos que o animal levou para cruzar para o topo do aquário, bem como cada vez que o animal fazia uma transição do topo para o fundo (e vice-versa), as setas (cima e baixo) eram utilizadas para sinalizar os cruzamentos. O tempo total no topo foi medido a partir do tempo que o aplicativo indicou que o animal permaneceu no topo.

A letra A foi utilizada para sinalizar movimentos erráticos, a letra D para congelamentos/*freezing* e a letra S para geotaxia. Durante a análise dos vídeos, a frequência de cada comportamento foi contabilizada a partir do acionamento da tecla relacionada ao comportamento indicado, já quando a tecla foi acionada e mantida pressionada, além de contar como frequência, o *software* contabilizou o tempo despendido naquele comportamento.

Após a análise de todos os vídeos referente ao experimento, foi selecionado ao lado esquerdo o experimento analisado e clicado em análise. Os experimentos foram movidos para o lado direito da caixa de diálogo e o botão 'ok' foi escolhido. A análise de todos os testes com exceção dos testes de tempo e habituação foi realizada de toda a sessão (a análise dos testes tempo e habituação foram realizados minuto a minuto). Após esse procedimento, o *software* forneceu uma planilha de Excel com os dados organizados por sujeito/comportamento.

2.5.2 Análise estatística

Os resultados obtidos foram analisados a partir de testes paramétricos e não-paramétricos. Dados com mais de duas amostras foram tratados com a análise de variância (ANOVA) ou teste H de Kruskal-Wallis. Foi utilizado o teste U de Mann-Whitney para comparações entre dois grupos e o teste Y de Friedman para comparação dos mesmos sujeitos em três ou mais situações experimentais, seguido dos pós-testes *post hoc* Tukey ou Dunn. Em todos os casos, o nível de significância considerado foi de $p < 0,05$.

3 RESULTADOS

Em todos os testes realizados foi feita uma comparação entre diferentes estímulos, bem como foram avaliadas as seguintes variáveis dependentes: latência para entrar no topo, frequência de entradas no topo, tempo despendido no topo, frequência e tempo despendido de nado errático no topo e no fundo, frequência e tempo despendido de *freezing* no topo e no fundo e frequência e tempo total de geotaxia.

Em função do resultado inicial de que não foram encontradas diferenças estatísticas significativas ao comparar os dois formatos (trapezoidal e retangular), foi adotado um dos formatos (retangular), tal como previsto no projeto de pesquisa inicial. Caso fossem encontradas diferenças significativas, todos os experimentos teriam sido realizados nos dois formatos. Além do formato, foi realizada a sexagem dos animais e não foram encontradas diferenças estatísticas significativas entre os dois sexos. Em decorrência desse resultado, não houve uma discriminação do sexo para realização e análise das demais testagens.

Tanto na diferenciação dos sexos quanto no formato, foram utilizados os mesmos animais. Nos testes de iluminação, período do dia e tamanho do tanque, foi utilizado como grupo controle os animais do teste do formato retangular. E os testes de tempo total e habituação, foram usados apenas 12 animais e a comparação entre o tempo total de teste se deu entre os mesmos indivíduos.

Em nenhuma das testagens houve emissão do comportamento de *freezing* no topo do tanque, por isso não há resultados estatísticos e figuras referente a esse comportamento.

3.1 SEXO

As testagens foram realizadas nos dois formatos de tanque, seguem abaixo os resultados obtidos em cada um dos formatos.

No formato trapezoidal, o teste U de Mann-Whitney revelou que não existe diferença estatística em nenhuma das variáveis avaliadas: frequência para entrada no topo [$U_{(1,10)} = 8.50$, $p = 0.1398$], tempo total despendido no topo [$U_{(1,10)} = 7.000$, $p = 0.0830$], latência para entrar no topo [$U_{(1,10)} = 15.50$, $p = 0.7719$] (Figura 7), frequência de nado errático no topo [$U_{(1,10)} = 8.000$, $p = 0.1187$], tempo total despendido em nado errático no topo [$U_{(1,10)} = 10.00$, $p = 0.2049$], frequência de nado errático no fundo [$U_{(1,10)} = 13.000$, $p = 0.5137$], tempo total despendido em nado errático no fundo [$U_{(1,10)} = 14.00$, $p = 0.6389$] (Figura 8), frequência de *freezing* no fundo [$U_{(1,10)} = 14.00$, $p = 0.5869$], tempo total despendido em *freezing* no fundo [$U_{(1,10)} = 12.00$, $p = 0.4318$], frequência de geotaxia [$U_{(1,10)} = 17.00$, $p = 1.000$] e tempo total despendido em geotaxia [$U_{(1,10)} = 10.00$, $p = 0.2677$] (Figura 9).

No formato retangular, o teste U de Mann-Whitney revelou que não existe diferença estatística em nenhuma das variáveis avaliadas: frequência para entrada no topo [$U_{(1,10)} = 17.50$, $p = 0.9230$], tempo total despendido no topo [$U_{(1,10)} = 17.50$, $p = 0.9230$], latência para entrar no topo [$U_{(1,10)} = 15.50$, $p = 0.7719$] (Figura 7), frequência de nado errático no topo [$U_{(1,10)} = 16.50$, $p = 0.9223$], tempo total despendido em nado errático no topo [$U_{(1,10)} = 16.50$, $p = 0.9230$], frequência de nado errático no fundo [$U_{(1,10)} = 9.000$, $p = 0.1908$], tempo total despendido em nado errático no fundo [$U_{(1,10)} = 12.00$, $p = 0.4160$] (Figura 8), frequência de *freezing* no fundo [$U_{(1,10)} = 13.00$, $p = 0.5115$], tempo total despendido em *freezing* no fundo [$U_{(1,10)} = 14.00$, $p = 0.6237$], frequência de geotaxia [$U_{(1,10)} = 16.00$, $p = 0,8705$] e tempo total despendido em geotaxia [$U_{(1,10)} = 12.00$, $p = 0.4318$] (Figura 9).

Figura 7. Comparação entre os sexos no que se refere a frequência de entradas no topo, tempo total despendido no topo e latência para entrar no topo nos formatos trapezoidal (primeira linha) e retangular (segunda linha).

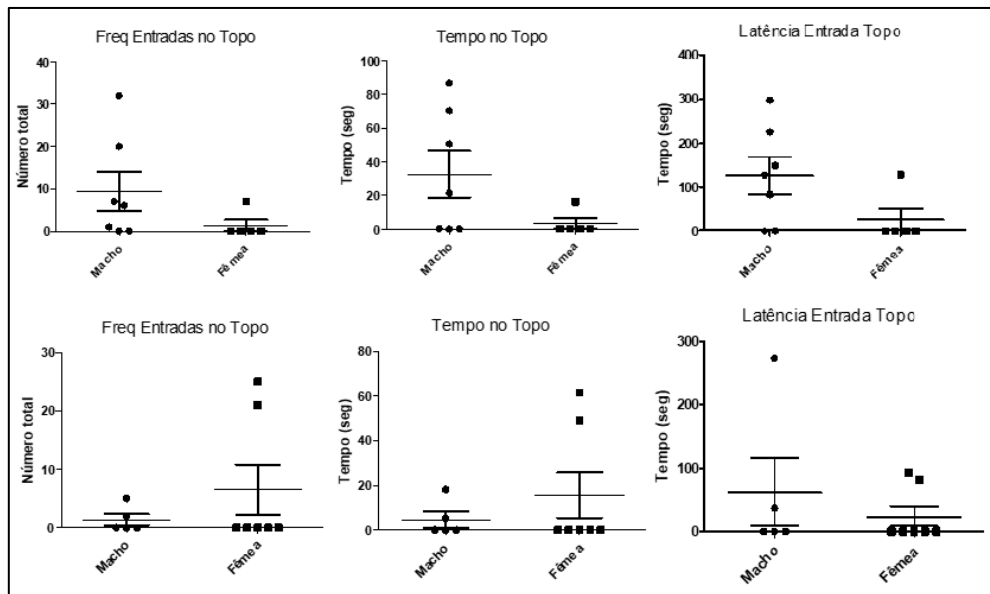


Figura 8. Comparação entre os sexos no que se refere a frequência e ao tempo total despendido e movimentos erráticos no topo e no fundo nos formatos trapezoidal (primeira linha) e retangular (segunda linha).

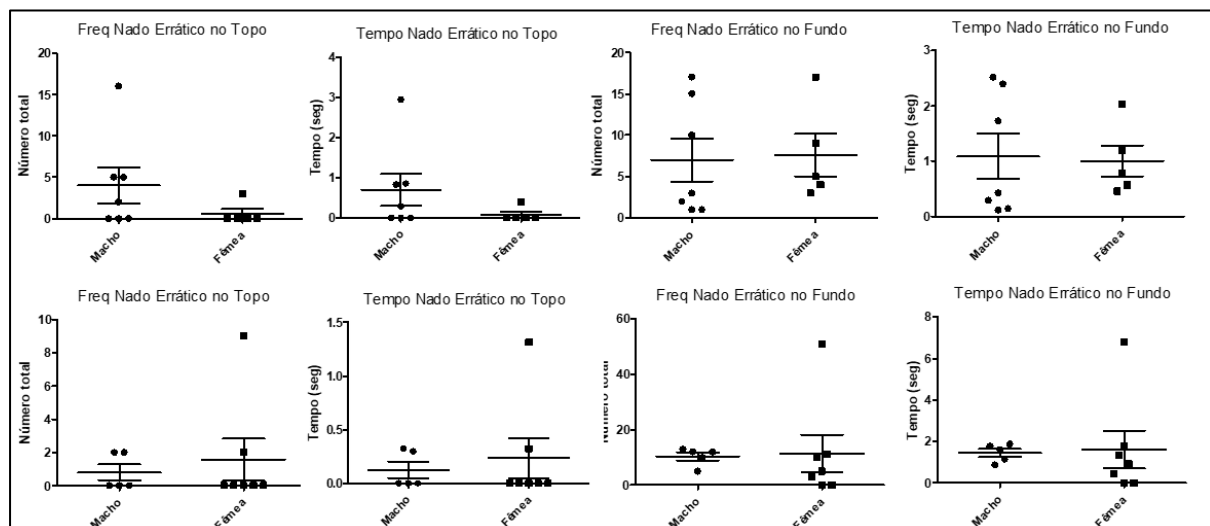
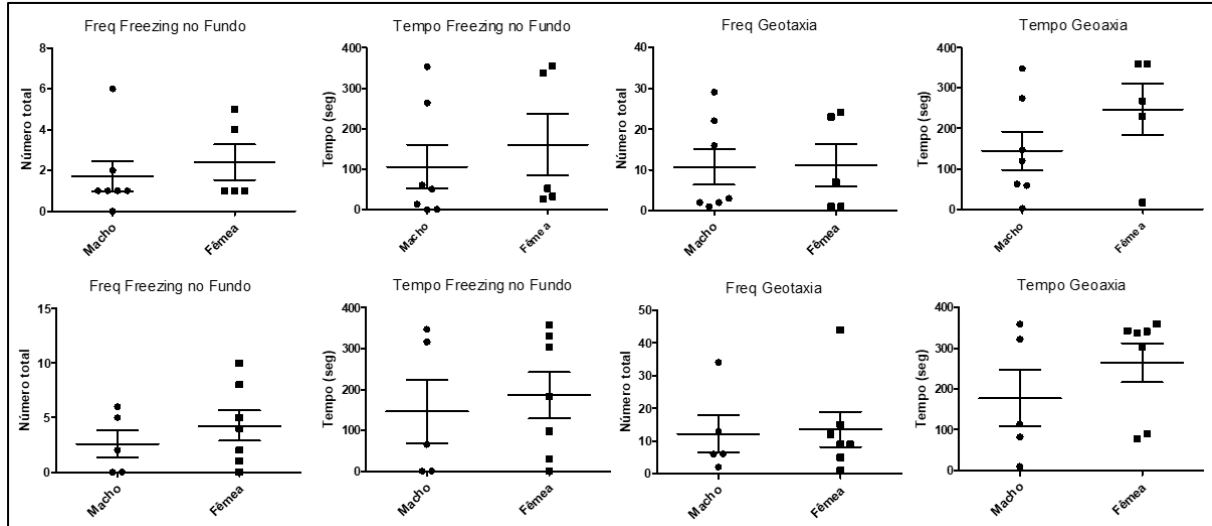


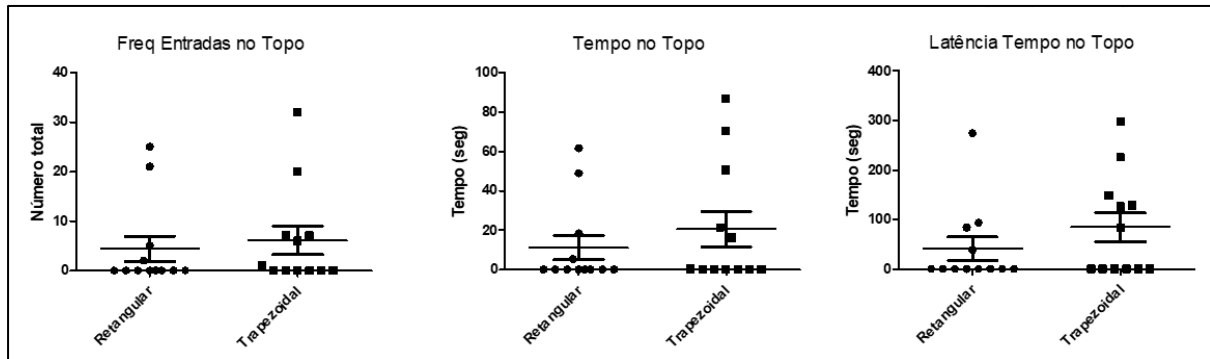
Figura 9. Comparação entre os sexos no que se refere a frequência e ao tempo total despendido em *freezing* no fundo do tanque e a frequência e tempo total de geotaxia nos formatos trapezoidal (primeira linha) e retangular (segunda linha).



3.2 FORMATO

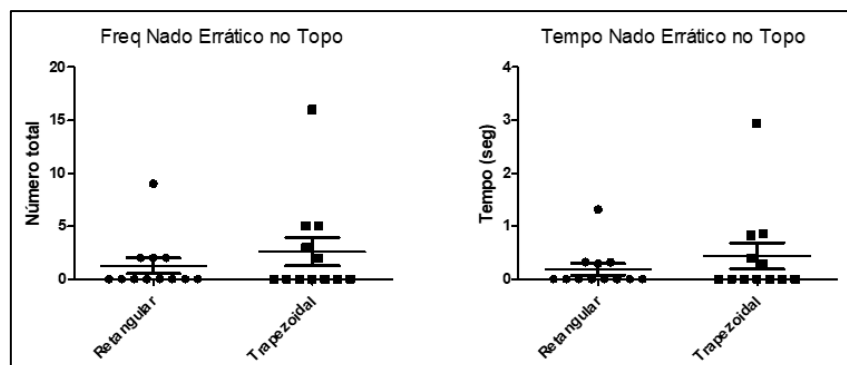
O teste U de Mann-Whitney mostrou que não existe diferença estatística significativa no que se refere a frequência de entradas no topo do tanque [$U_{(1,22)} = 60.00$, $p = 0.4584$] ao tempo total despendido no topo do aquário [$U_{(1,22)} = 58.00$, $p = 0.3842$] e a latência para a entrar no topo do aquário [$U_{(1,22)} = 54.50$, $p = 0.2730$] ao comparar os dois formatos de tanque (Figura 10).

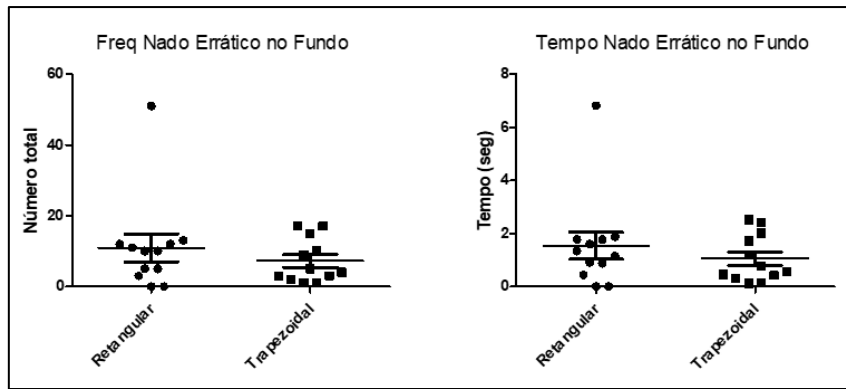
Figura 10. Comparação entre os formatos trapezoidal e retangular no que se refere a frequência de entradas no topo do tanque, ao tempo total despendido no topo e a latência para entrar no topo do NTT.



O teste U de Mann-Whitney mostrou que não existe diferença estatística significativa no que se refere a frequência de nado errático no topo [$U_{(1,22)} = 61.50$, $p = 0.5055$], ao tempo despendido em nado errático no topo do tanque [$U_{(1,22)} = 63.00$, $p = 0.5726$], a frequência de nado errático no fundo do aquário [$U_{(1,22)} = 62.00$, $p = 0.5820$] e ao tempo total despendido em nado errático no fundo do aquário [$U_{(1,22)} = 64.00$, $p = 0.6649$] ao comparar os formatos retangular e trapezoidal (Figura 11).

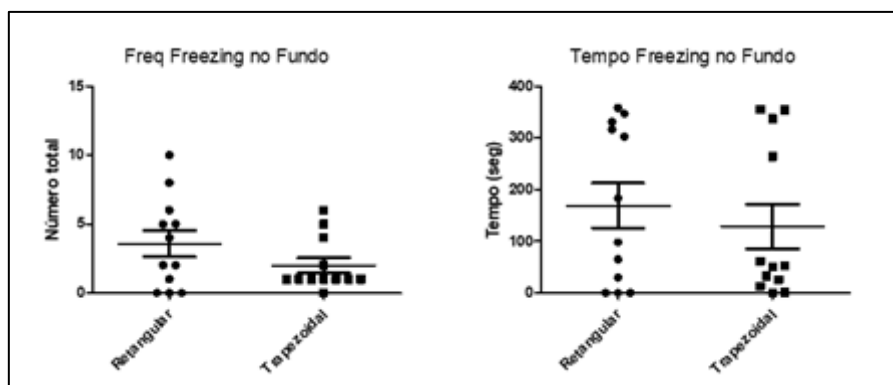
Figura 11. Comparação entre os formatos no que se refere a frequência de entradas e tempo total despendido em movimentos erráticos no topo e no fundo do NTT.

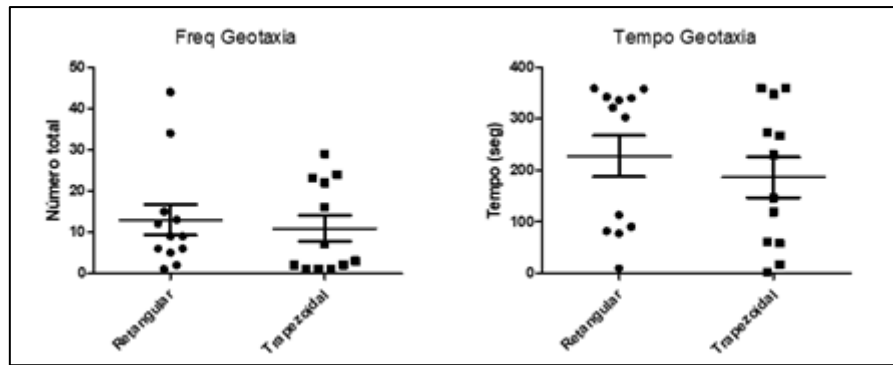




O teste U de Mann-Whitney mostrou que não existe diferença estatística significativa no que se refere a frequência de *freezing* no fundo do tanque [$U_{(1,22)} = 55.00$, $p = 0.3296$], ao tempo despendido em *freezing* no fundo do aquário [$U_{(1,22)} = 65.00$, $p = 0.7285$], como também não foi encontrada diferença estatística significativa no que se refere a frequência de geotaxia [$U_{(1,22)} = 61.50$, $p = 0.5623$] e ao tempo despendido em geotaxia [$U_{(1,22)} = 62.00$, $p = 0.5834$] (Figura 12).

Figura 12. Comparação entre os formatos no que se refere a frequência, ao tempo total despendido em *freezing* no fundo do tanque e frequência e tempo total despendido em geotaxia no NTT.

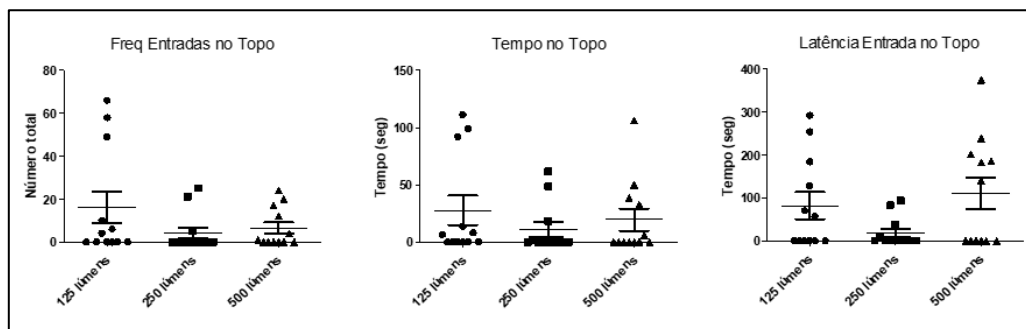




3.3 LUMINOSIDADE

O teste H de Kruskal-Wallis mostrou que não existe diferença significativa no que se refere a frequência de entradas no topo do tanque [$H_{(2,33)} = 1.759$, $p = 0.4150$], ao tempo total despendido no topo do aquário [$H_{(2,33)} = 1.045$, $p = 0.5930$] e a latência para a entrada no topo do tanque [$H_{(2,33)} = 2.746$, $P = 0.2533$] ao comparar as três diferentes intensidades de iluminação (Figura 13).

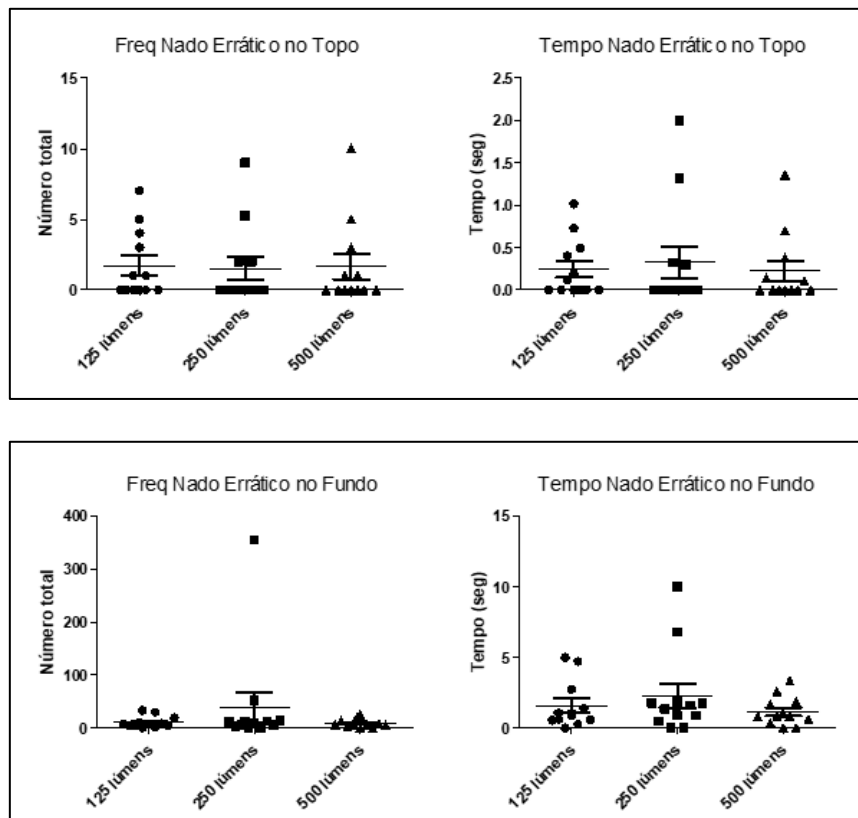
Figura 13. Comparação entre as três intensidades luminosas no que se refere a frequência de entradas, ao tempo total despendido no topo e latência para entra no topo do tanque no NTT.



O teste H de Kruskal-Wallis mostrou que não existe diferença significativa no que se refere a frequência [$H_{(2,33)} = 0.3734$, $p = 0.8397$], ao tempo despendido ($H_{[2,33]} = 0.3764$, $p = 0.8284$] em nado errático no topo do tanque, como também o teste H de Kruskal-Wallis mostrou que não existe diferença estatística significativa no que se refere a quantidade ou

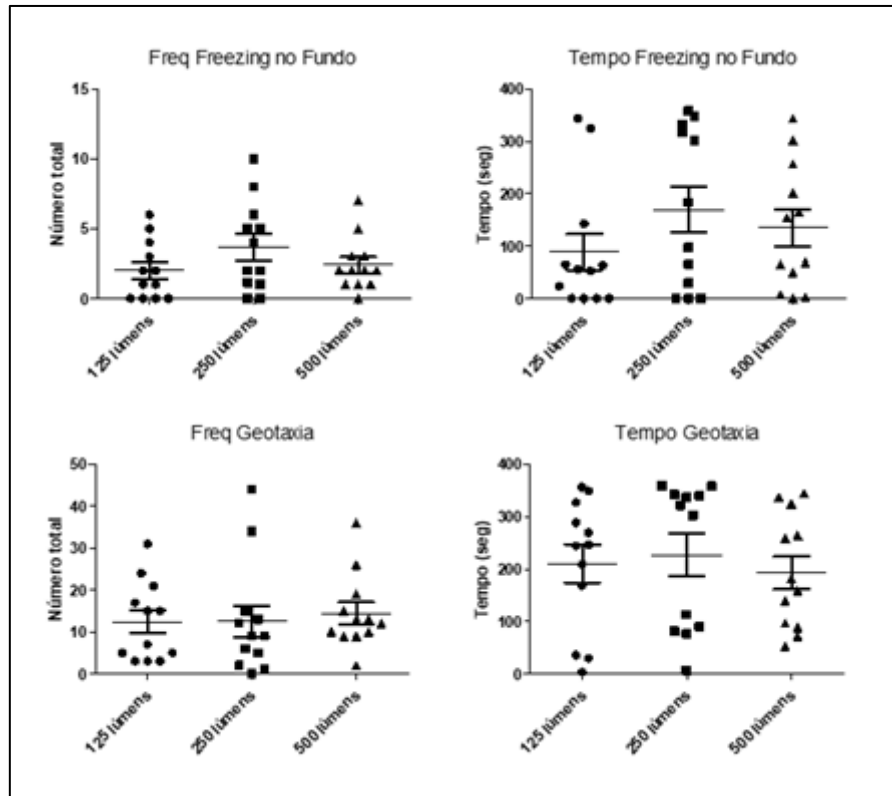
frequência de movimentos erráticos [$H_{(2,33)} = 0.1914$, $p = 0.9087$] e ao tempo total despendido em nado errático no fundo do tanque [$H_{(2,33)} = 0.8480$, $p = 0.6544$] ao comparar as três diferentes intensidades luminosas (Figura 14).

Figura 14. Comparação entre as três intensidades luminosas no que se refere a frequência de entradas e ao tempo total despendido de movimentos erráticos no topo e no fundo do NTT.



O teste H de Kruskal-Wallis revelou que não existe diferença estatística significativa referente a frequência [$H_{(2,33)} = 0.1996$, $p = 0.3686$] e ao tempo despendido em *freezing* [$H_{(2,33)} = 2.380$, $p = 0.3043$] no fundo do tanque, bem como o mesmo teste revelou que não existe diferença estatística no que se refere a quantidade [$H_{(2,33)} = 1.359$, $p = 0.5070$] e ao tempo despendido [$H_{(2,33)} = 0.8348$, $p = 0.6587$] em geotaxia ao comparar as três diferentes intensidades de iluminação (Figura 15).

Figura 15. Comparação entre as três intensidades luminosas no que se refere a frequência de entradas e ao tempo total despendido em *freezing* no fundo do tanque e frequência e tempo total de geotaxia no NTT.



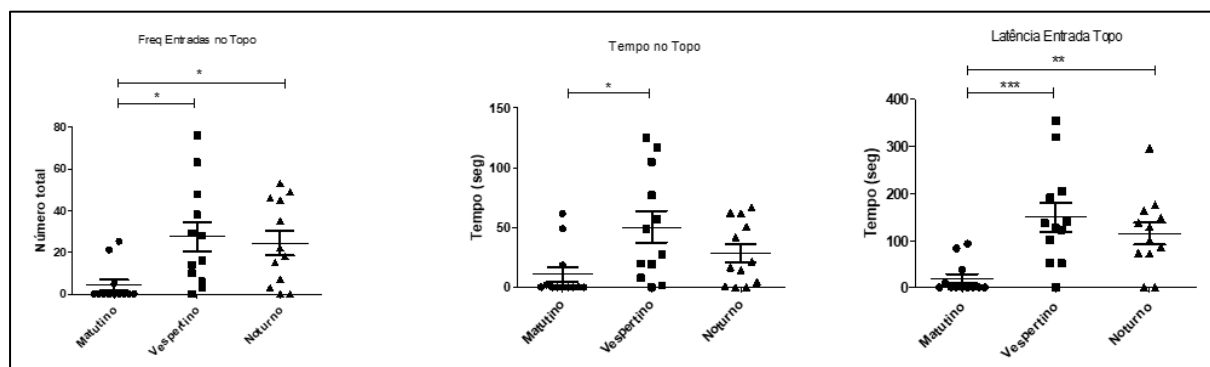
3.4 PERÍODO DO DIA

O teste ANOVA de uma via mostrou que existe diferença significativa no que se refere a frequência de entradas no topo do aquário [$F_{(2,33)} = 5.299$, $p = 0.0101$] ao realizar o teste em diferentes períodos do dia (Figura 16). O teste *post-hoc* (Tukey) indicou que existe diferença significativa ao comparar os testes realizados no período matutino com o período noturno e ao comparar os testes realizados no período vespertino com o período matutino.

O teste ANOVA de uma via mostrou que existe diferença significativa no que se refere ao tempo total despendido no topo do tanque [$F_{(2,33)} = 4.356$, $p = 0.0101$] (Figura 16). O teste *post-hoc* (Tukey) indicou que existe diferença significativa ao comparar os testes realizados no período matutino com os testes realizados no período vespertino.

No que condiz a latência para a entrada no topo do tanque o teste H de Kruskal-Wallis mostrou que existe diferença significativa ao comparar os três grupos que foram testados em períodos diferentes do dia [$H_{(2,33)} = 14.70$, $p = 0.0006$] (Figura 16). O teste *post-hoc* indicou que existe diferença significativa ao comparar os testes realizados no período matutino com o período noturno e ao comparar os testes realizados no período vespertino com o período matutino.

Figura 16. Comparação entre três períodos do dia no que se refere a frequência de entradas, ao tempo total despendido no topo e latência para entra no topo do tanque no NTT.



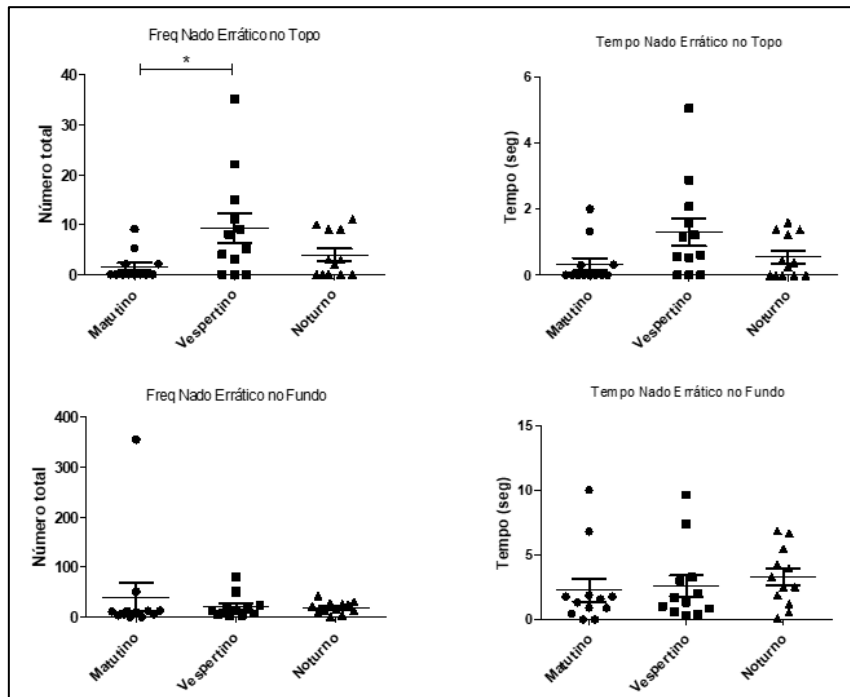
Nota: * Diferente de Matutino; ** Diferente de Noturno; ***Diferente de Vespertino ($p < 0.05$).

O teste ANOVA de uma via mostrou que existe diferença significativa no que se refere a frequência de nado errático no topo do aquário [$F_{(2,33)} = 4.189$, $p = 0.0239$] (Figura 17). O teste *post-hoc* (Tukey) indicou que existe diferença significativa ao comparar os testes realizados no período matutino com o período vespertino.

O teste ANOVA de uma via revelou que não existe diferença significativa no que se refere ao tempo despendido em nado errático no topo do tanque [$F_{(2,33)} = 3.125$, $p = 0.0572$] (Figura 17), porém o teste H de Kruskal Wallis revelou que não existe diferença significativa

no que se refere a frequência [$H_{(2,33)} = 2.407$, $p = 0.3001$] e ao tempo despendido [$H_{(2,33)} = 2.599$, $p = 0.2726$] de nado errático no fundo do aquário (Figura 17).

Figura 17. Comparação entre três períodos do dia no que se refere a frequência de entradas e ao tempo total despendido de movimentos erráticos no topo e no fundo do NTT.



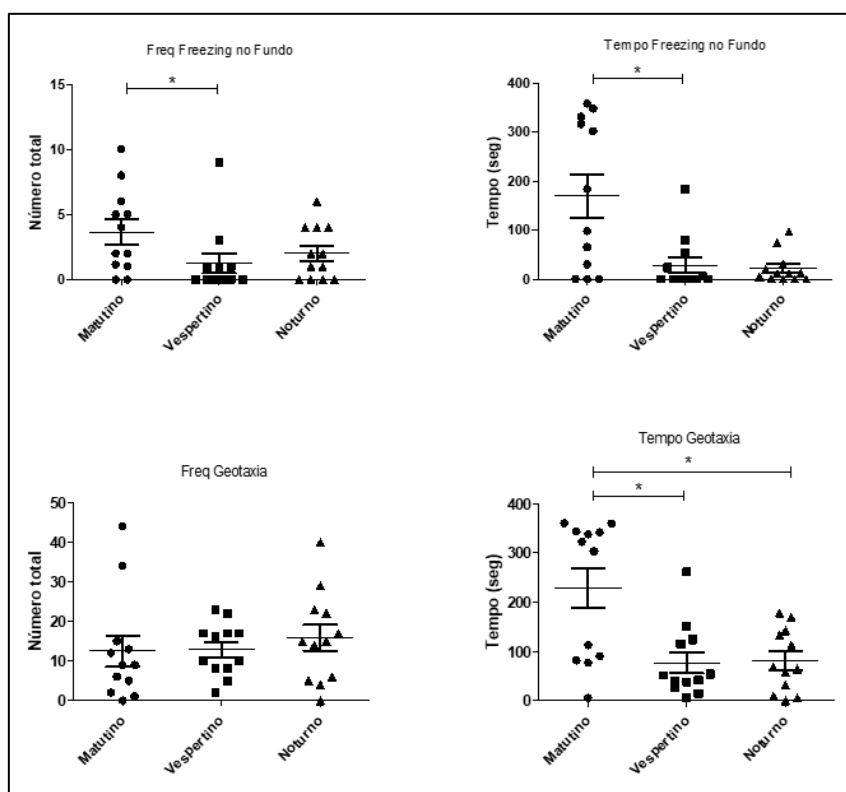
Nota: * Diferente de Matutino ($p < 0.05$).

O teste H de Kruskal-Wallis revelou que existe diferença estatística significativa na frequência [$H_{(2,33)} = 6.504$, $p = 0.0387$] e ao tempo total de *freezing* [$H_{(2,33)} = 7.240$, $p = 0.0268$] (Figura 18). O teste *post hoc* (Dunn) indicou que existe diferença entre os períodos matutino e vespertino no que se refere a frequência e ao tempo de *freezing* no fundo do tanque (Figura 18).

O teste H de Kruskal-Wallis revelou que não existe diferença estatística significativa na frequência de geotaxia [$H_{(2,33)} = 1.547$, $p = 0.4614$], porém o mesmo teste mostrou diferença estatística significativa no que se refere ao tempo total de geotaxia [$H_{(2,33)} = 8.587$, $p = 0.0137$]

(Figura 18). O teste *post hoc* (Dunn) indicou que existe diferença entre os períodos matutino e vespertino e os períodos matutino e noturno (Figura 18).

Figura 18. Comparação entre três períodos do dia no que se refere a frequência de entradas e ao tempo total despendido de *freezing* no fundo no tanque e frequência e tempo total despendido em geotaxia no NTT.

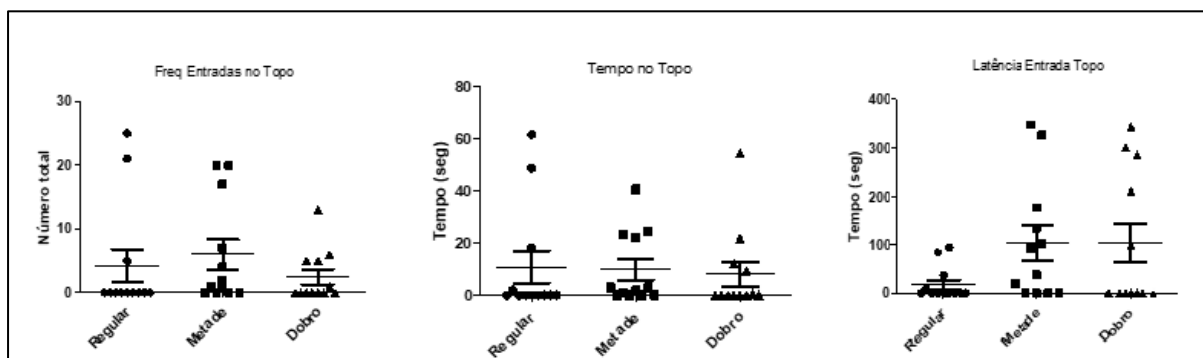


Nota: * Diferente de Matutino ($p < 0.05$).

3.5 TAMANHO

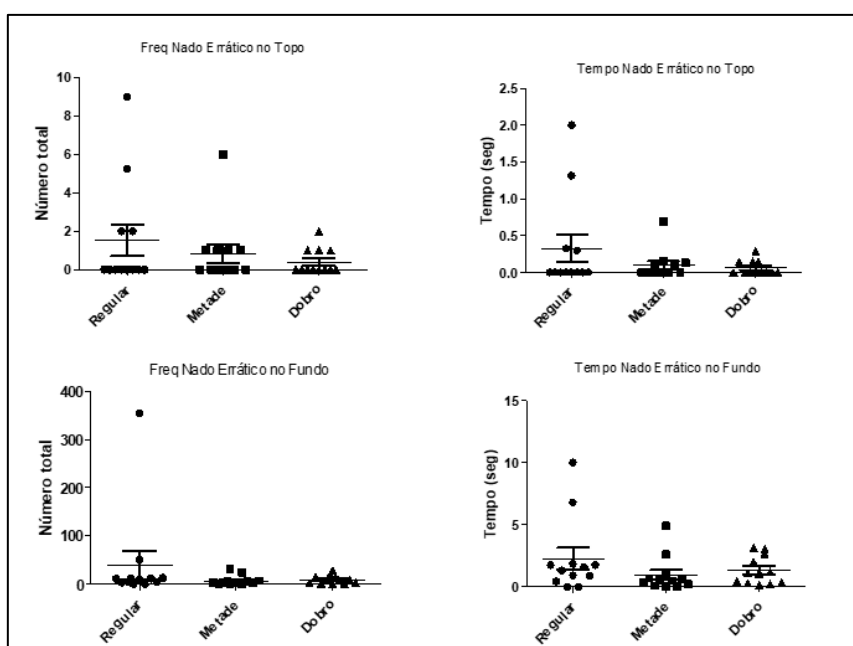
O teste H de Kruskal-Wallis mostrou que não existe diferença estatística significativa no que se refere a frequência [$H_{(2,33)} = 2.531$, $p = 0.2821$], ao tempo despendido no topo do tanque [$H_{(2,33)} = 1.726$, $p = 0.4218$] e a latência para entrar no topo do tanque [$H_{(2,33)} = 3.935$, $p = 0.1398$], (Figura 19).

Figura 19. Comparação entre 3 diferentes tamanhos de tanques no que se refere a frequência de entradas, ao tempo total despendido no topo e latência para entra no topo do tanque no NTT.



O teste H de Kruskal-Wallis indicou que não existe diferença significativa no que se refere a frequência [$H_{(2,33)} = 0.2647$, $p = 0.8760$] e ao tempo despendido [$H_{(2,33)} = 0.2255$, $p = 0.8934$], em nado errático no topo (Figura 20), como também na frequência [$H_{(2,33)} = 2.132$, $p = 0.3443$] e no tempo despendido em nado errático no fundo do aquário [$H_{(2,33)} = 2.657$, $p = 0.2649$], ao comparar os três tamanhos dos tanques (Figura 20).

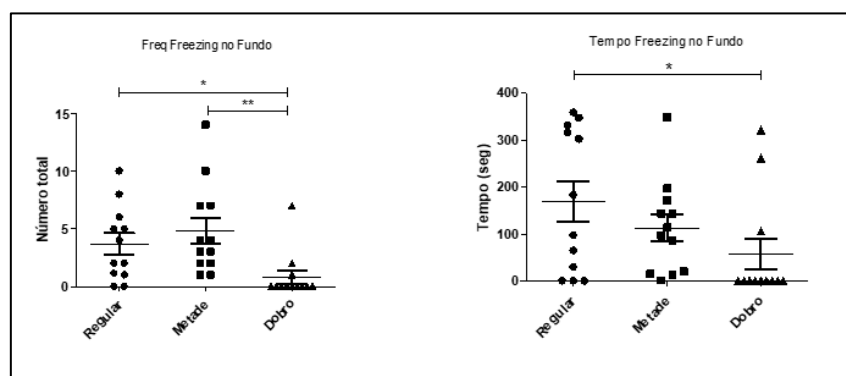
Figura 20. Comparação entre 3 diferentes tamanhos de tanques no que se refere a frequência de entradas e ao tempo total despendido de movimentos erráticos no topo e no fundo do NTT.

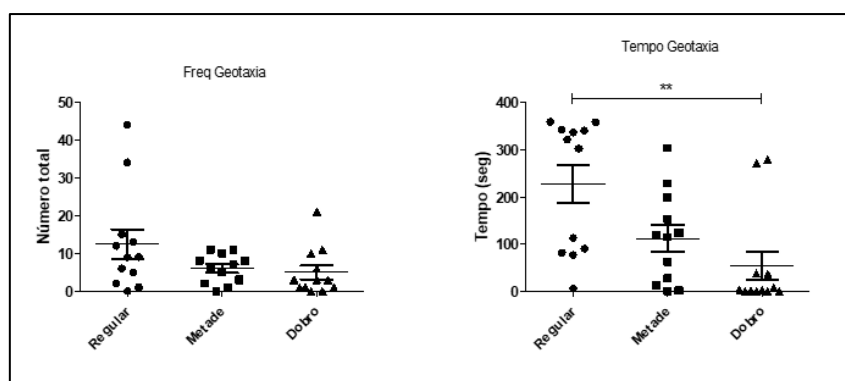


O teste H de Kruskal-Wallis revelou existe diferença significativa no que se refere a frequência [$H_{(2,33)} = 13.24$, $p = 0.0013$] e ao tempo despendido em *freezing* [$H_{(2,33)} = 7.605$, $p = 0.0223$] no fundo do aquário (Figura 21). O teste *post hoc* (Dunn) indicou que existe diferença estatística ao comparar os tamanhos metade com o dobro e tamanho regular com o dobro no que se refere a quantidade de *freezing*. Já na variável tempo total de *freezing*, o teste *post hoc* (Dunn) mostrou que existe diferença estatística entre os tanques do tamanho regular e o dobro.

O teste H de Kruskal-Wallis mostrou que não existe diferença significativa no que se refere a frequência de geotaxia [$H_{(2,33)} = 3.527$, $p = 0.1715$], porém o mesmo teste revelou que existe diferença estatística relacionada ao tempo total de geotaxia [$H_{(2,33)} = 12.58$, $p = 0,0019$] ao comparar os três tamanhos dos tanques (Figura 21). O teste *post hoc* (Dunn) mostrou que a diferença estatística encontrada está na comparação entre o tamanho regular e o dobro.

Figura 21. Comparação entre 3 diferentes exposições com intervalo de 24 horas no que se refere a frequência de entradas e ao tempo total despendido de *freezing* no fundo no tanque e frequência e tempo total de geotaxia no NTT.



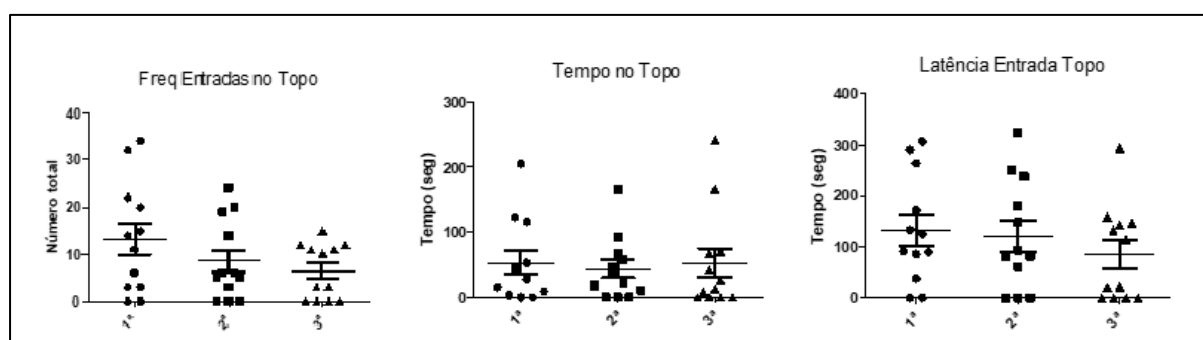


Nota: * Diferente de Regular, ** Diferente de Dobro ($p < 0.05$).

3.6 REEXPOSIÇÃO 15 MINUTOS

O teste Y de Friedman mostrou que não existe diferença significativa no que se refere a frequência [$Y_{(2,33)} = 5.692$, $p = 0.0581$], ao tempo despendido no topo do tanque [$Y_{(2,33)} = 0.200$, $p = 0.9048$] e a latência para a entrada no topo do tanque [$Y_{(2,33)} = 0.6000$, $p = 0.7408$] ao comparar as três exposições ao aparato (Figura 22).

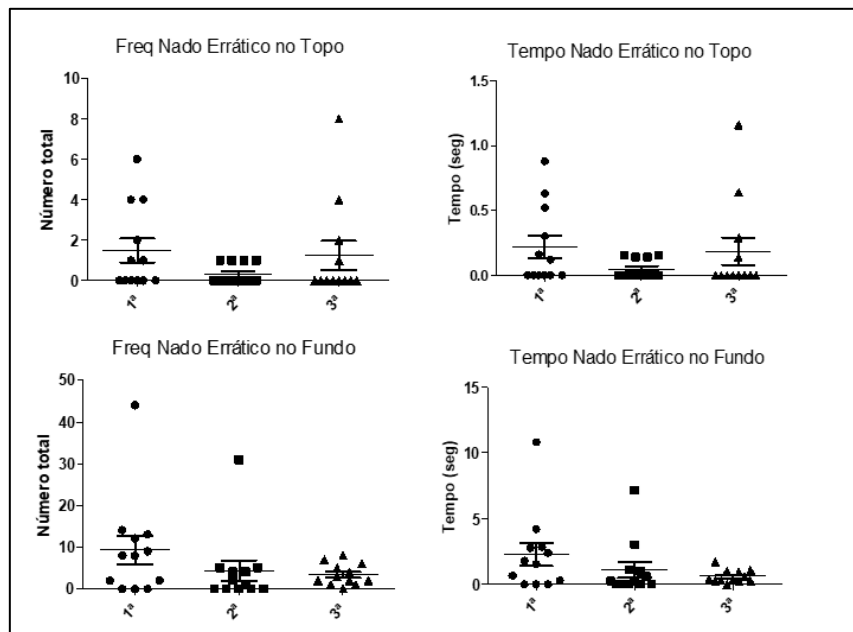
Figura 22. Comparação entre 3 diferentes exposições com intervalo de 15 minutos no que se refere a frequência de entradas, ao tempo total despendido no topo e latência para entra no topo do tanque no NTT.



O teste Y de Friedman revelou que não existe diferença significativa no que se refere a frequência [$Y_{(2,33)} = 2.769$, $p = 0.2504$] e ao tempo despendido em nado errático no topo do tanque [$Y_{(2,33)} = 1.786$, $p = 0.4095$] (Figura 23), como também o mesmo teste mostrou que não

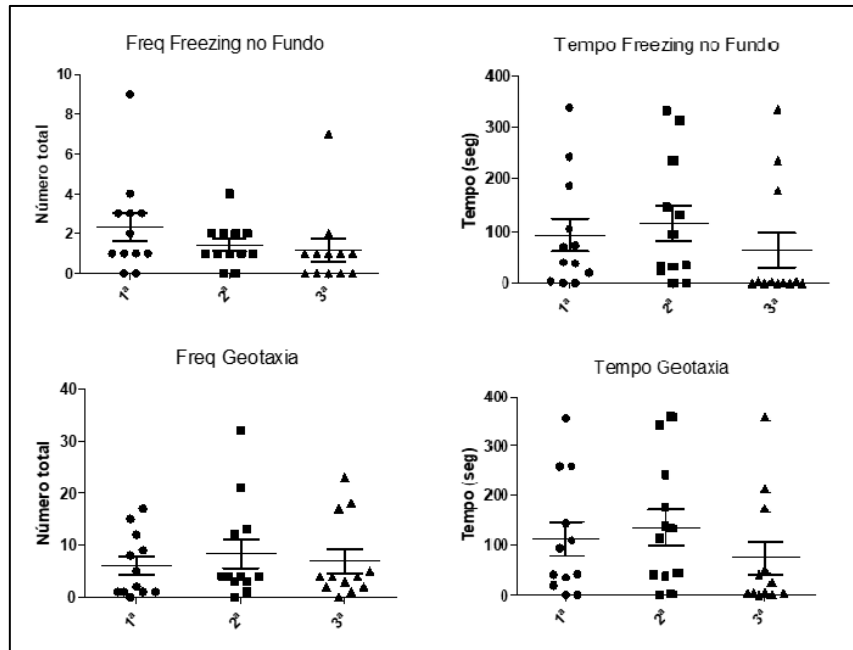
existe diferença estatística no que se refere a frequência [$Y_{(2,33)} = 5.600$, $p = 0.0608$] e ao tempo despendido [$Y_{(2,33)} = 4.000$, $p = 0.1353$] em nado errático no fundo do tanque (Figura 23).

Figura 23. Comparação entre 3 diferentes exposições com intervalo de 15 minutos no que se refere a frequência de entradas e ao tempo total despendido de movimentos erráticos no topo e no fundo do NTT.



O teste Y de Friedman revelou que não existe diferença significativa no que se refere a frequência [$Y_{(2,33)} = 2.516$, $p = 0.2842$] e ao tempo despendido em *freezing* [$Y_{(2,33)} = 5.190$, $p = 0.0746$] no fundo do aquário (Figura 24), como também o mesmo teste mostrou que não existe diferença estatística significativa no que se refere a frequência [$Y_{(2,33)} = 3.190$, $p = 0.2029$] e ao tempo total de geotaxia [$Y_{(2,33)} = 4.233$, $p = 0.1205$] ao comparar as três diferentes exposições ao teste (Figura 24).

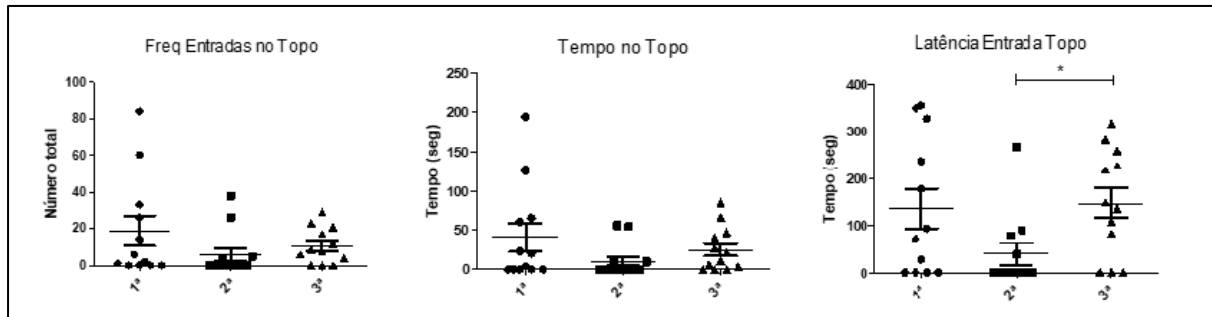
Figura 24. Comparação entre 3 diferentes exposições com intervalo de 15 minutos no que se refere a frequência de entradas e ao tempo total despendido de *freezing* no fundo no tanque e frequência e tempo total despendido em geotaxia no NTT.



3.7 REEXPOSIÇÃO 24 HORAS

O teste Y de Friedman mostrou que não existe diferença significativa no que se refere a frequência [$Y_{(2,33)} = 3.231$, $p = 0.1988$], ao tempo despendido no topo do tanque [$Y_{(2,33)} = 2.400$, $p = 0.3012$], contudo o mesmo teste indicou diferença estatística significativa na latência para a entrada no topo do tanque [$Y_{(2,33)} = 7.800$, $p = 0.0202$] ao comparar as três exposições ao aparato (Figura 25). O teste *post hoc* (Dunn) indicou que existe diferença entre a 2ª e a 3ª exposição.

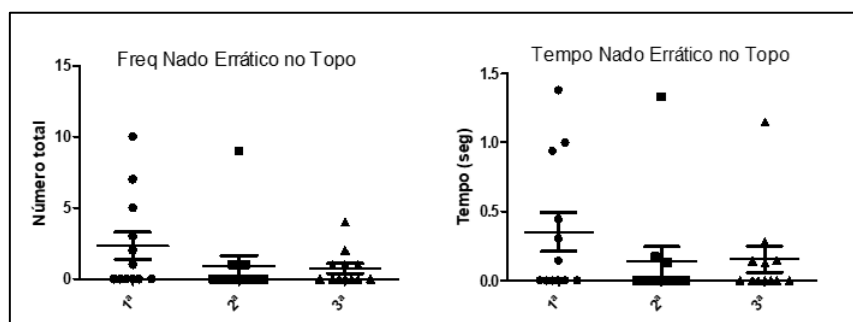
Figura 25. Comparação entre 3 diferentes exposições com intervalo de 24 horas no que se refere a frequência de entradas, ao tempo total despendido no topo e latência para entra no topo do tanque no NTT.

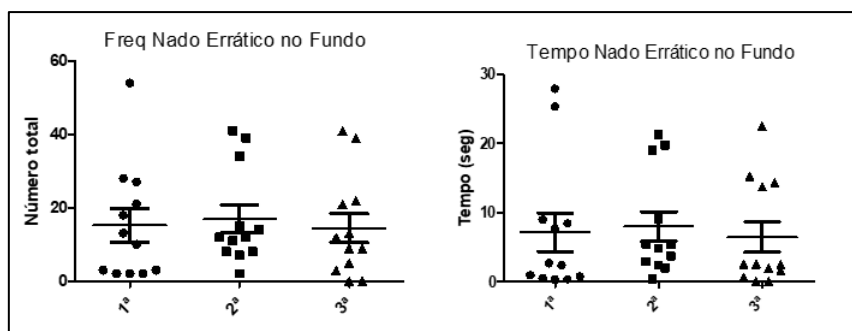


Nota: * Diferente da 2ª exposição ($p < 0.05$).

O teste Y de Friedman mostrou que não existe diferença significativa no que se refere a frequência [$Y_{(2,33)} = 4.467$, $p = 0.1072$] e ao tempo despendido em nado errático no topo do tanque [$Y_{(2,33)} = 4.065$, $p = 0.1310$] (Figura 26), bem como no que se refere a frequência [$Y_{(2,33)} = 1.167$, $p = 0.5580$] e ao tempo despendido [$Y_{(2,33)} = 3.167$, $p = 0.2053$] em nado errático no fundo do aquário (Figura 26).

Figura 26. Comparação entre 3 diferentes exposições com intervalo de 24 horas no que se refere a frequência de entradas e ao tempo total despendido de movimentos erráticos no topo e no fundo do NTT.

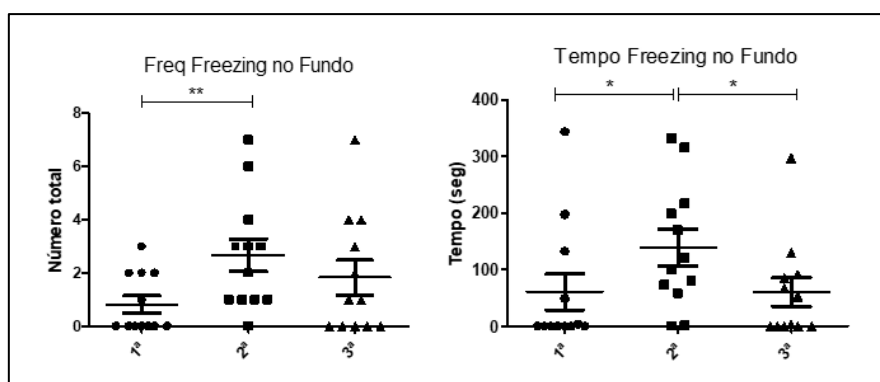




O teste Y de Friedman revelou que existe diferença significativa no que se refere a frequência [$Y_{(2,33)} = 10.29$, $p = 0.0058$] e ao tempo despendido em *freezing* no fundo do tanque [$Y_{(2,33)} = 8.727$, $p = 0.0127$] no fundo do aquário ao comparar as três diferentes exposições ao teste (Figura 27).

No que se refere à variável frequência de *freezing* no fundo do tanque, o teste *post hoc* (Dunn) mostrou que a diferença ocorreu entre a 1ª e a 2ª exposições. Já na variável tempo total de *freezing*, o teste *post hoc* (Dunn) revelou que a diferença ocorreu entre a 1ª e a 2ª exposições e entre a 2ª e a 3ª exposições.

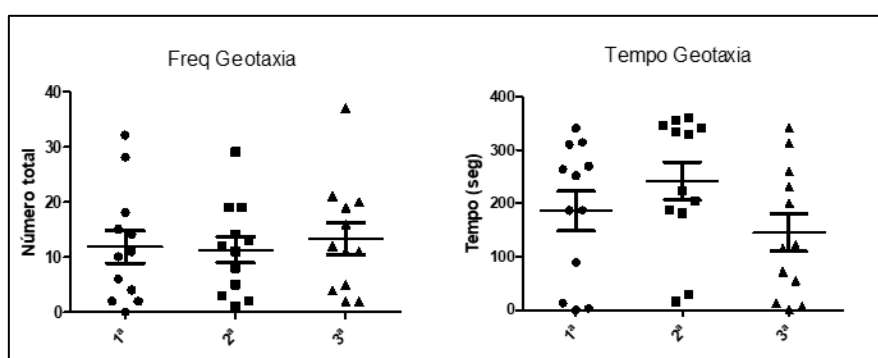
Figura 27. Comparação entre 3 diferentes exposições com intervalo de 24 horas no que se refere a frequência de entradas e ao tempo total despendido de *freezing* no fundo no tanque do NTT.



Nota: * Diferente da 2ª exposição, ** Diferente da 1ª exposição ($p < 0.05$).

O teste Y de Friedman revelou que não existe diferença significativa no que se refere a frequência [$Y_{(2,33)} = 0.6667$, $p = 0.7165$] e ao tempo despendido geotaxia [$Y_{(2,33)} = 4.667$, $p = 0.0970$] ao comparar as três diferentes exposições ao teste (Figura 28).

Figura 28. Comparação entre 3 diferentes exposições com intervalo de 24 horas no que se refere a frequência de entradas e ao tempo total despendido em geotaxia no NTT.



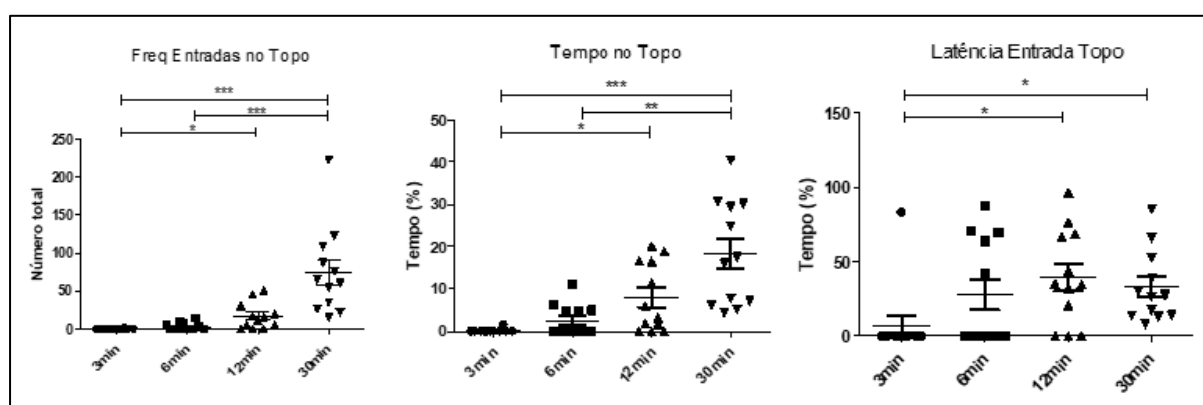
3.8 TEMPO E HABITUAÇÃO

As variáveis relacionadas ao tempo despendido e a latência para entrar no topo tiveram seus dados convertidos para valores em porcentagem, com o intuito de alocar cada tempo total de teste em uma mesma escala. Já no que se refere as variáveis de frequência, é necessário considerar que os tempos posteriores foram somados com os anteriores, o que impactou nos resultados obtidos nos tempos que vinham depois deixando-os sempre iguais ou maiores que o tempo total de teste anterior.

O teste H de Kruskal-Wallis mostrou que existe diferença significativa estatística no que se refere a frequência [$H_{(3,44)} = 33.30$, $p = 0.0001$], a latência [$H_{(3,44)} = 12.22$, $p = 0.0067$] e ao tempo despendido no topo do tanque [$H_{(3,44)} = 27.06$, $p = 0.0001$] (Figura 29). O teste *post hoc* (Dunn) revelou que no que se refere a frequência de entradas no topo e tempo total despendido no topo, existe diferença significativa ao comparar o tempo de 30 minutos com 3 e 6 minutos, bem como foi indicada diferença entre 3 e 12 minutos. No que se refere a latência,

o teste *post hoc* (Dunn) revelou diferença na comparação entre 3 minutos com 12 minutos e 3 minutos com 30 minutos.

Figura 29. Comparação entre o encerramento do teste com 3, 6 e 12 minutos e habituação de 30 minutos no que se refere a frequência de entradas, ao tempo total despendido e a latência para entrar no topo do tanque no NTT.

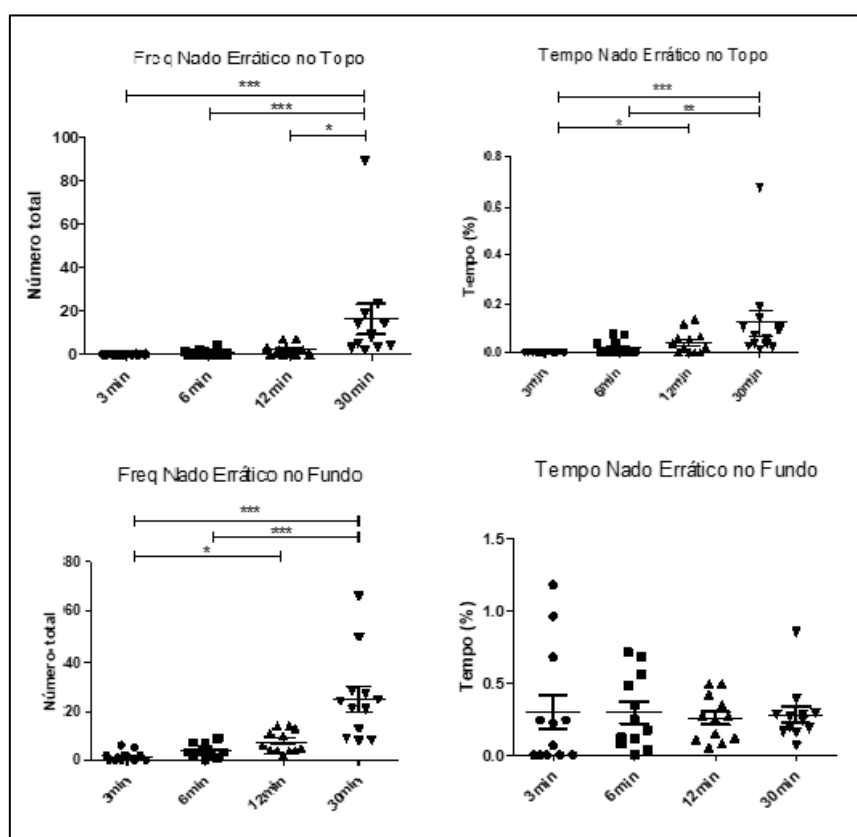


Nota: * Diferente de 3 minutos, ** Diferente de 6 minutos, *** Diferente de 30 minutos ($P < 0,05$).

O teste H de Kruskal-Wallis indicou que existe diferença estatística no que se refere a frequência [$H_{(3,44)} = 31.78$, $p = 0.0001$] e ao tempo despendido [$H_{(3,44)} = 23.39$, $p = 0.0001$] em nado errático no topo ao comparar o tempo de exploração dos animais no tanque (Figura 30). O teste *post hoc* (Dunn) mostrou que a diferença encontrada na frequência de nado errático no topo está na comparação entre 30 e 3 minutos, entre 30 e 6 minutos, e entre 12 e 30 minutos, já o teste *post hoc* (Dunn) mostrou que a diferença encontrada na variável tempo total despendido no topo do tanque foi na comparação entre 3 e 12 minutos, 3 e 30 minutos, e 6 e 30 minutos (Figura 30).

O teste H de Kruskal-Wallis mostrou que não existe diferença estatística significativa no que se refere a frequência de movimentos erráticos [$H_{(3,44)} = 1.167$, $p = 0.5580$] e ao tempo despendido em nado errático [$H_{(3,44)} = 1725$, $p = 0.6314$] no fundo do aquário (Figura 30).

Figura 30. Comparação entre o encerramento do teste com 3, 6 e 12 minutos e habituação de 30 minutos no que se refere a frequência de entradas e ao tempo total despendido de movimentos erráticos no topo e no fundo do NTT.



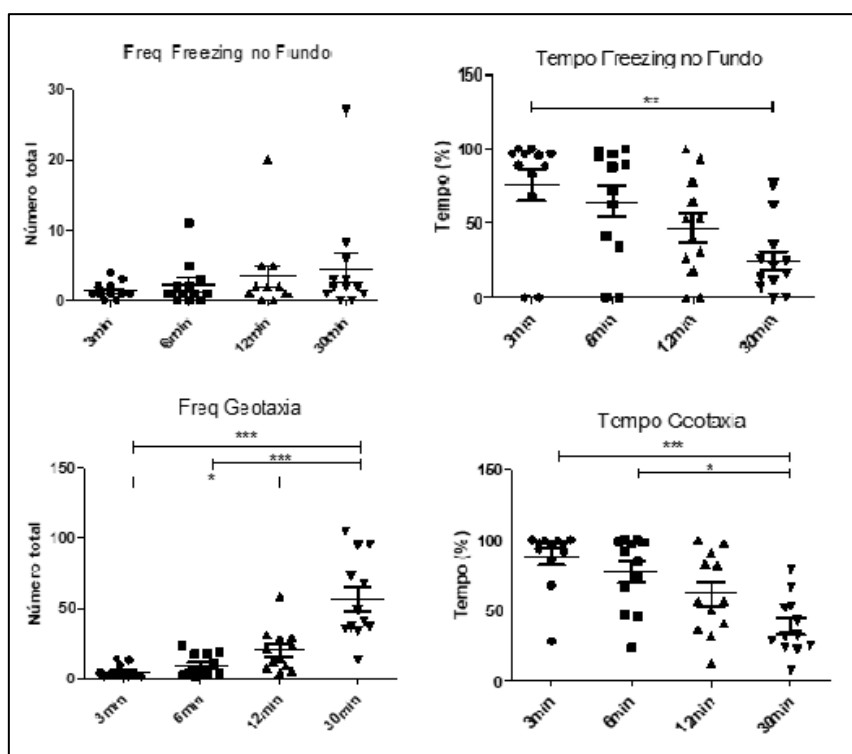
Nota: * Diferente de 3 minutos, ** Diferente de 6 minutos, *** Diferente de 30 minutos ($P < 0,05$).

O teste H de Kruskal-Wallis indicou que não existe diferença estatística significativa no que se refere a frequência de *freezing* [$H_{(3,44)} = 2.844$, $p = 0.4163$] no fundo do aquário, porém o mesmo teste revelou diferença estatística significativa relacionada ao tempo

despendido de *freezing* [$H_{(3,44)} = 12.15$, $p = 0.0069$] no fundo do aquário ao comparar o tempo de exploração dos animais no tanque (Figura 31). O teste *post hoc* (Dunn) revelou existe diferença significativa no tempo de *freezing* entre 30 minutos e 3 minutos.

O teste H de Kruskal-Wallis mostrou que existe diferença significativa no que se refere a frequência [$H_{(3,44)} = 30.73$, $p = 0.0001$] e ao tempo total despendido em geotaxia [$H_{(3,44)} = 18.06$, $p = 0.0004$]. O teste *post hoc* (Dunn) revelou a diferença significativa na frequência de geotaxia ao comparar 3 e 12 minutos, 3 e 30 minutos, e mostrou que a diferença encontrada na frequência de nado errático no topo está na comparação entre 30 e 3 minutos

Figura 31. Comparação entre o encerramento do teste com 3, 6 e 12 minutos e habituação de 30 minutos no que se refere a frequência de entradas e ao tempo total despendido de *freezing* no fundo no tanque e frequência e tempo total de geotaxia no NTT.



Nota: * Diferente de 3 minutos, ** Diferente de 6 minutos, *** Diferente de 30 minutos ($P < 0,05$).

4 DISCUSSÃO

O NTT é um teste que vem sendo utilizado sem que suas propriedades paramétricas tenham sido analisadas. Poucos foram os autores que se propuseram a realizar estudos paramétricos do NTT (Fontana et al., 2022; Bozi et al., 2021; Anwer et al., 2021; Marcon et al., 2018; Parker, 2015; Stewart et al., 2015; Parker et al., 2012), sendo que nenhum estudo ainda havia analisado os parâmetros comportamentais basais ao afirmar que esse teste mede aquilo que foi afirmado que mediria – comportamentos do tipo ansiedade em peixes. Sendo assim, segue uma discussão com algumas possíveis inferências relacionadas aos dados encontrados.

O NTT não apresenta um padrão do formato tanque, podendo ser encontrado na literatura dois principais modelos (mas existem outros, com outras medidas): o retangular e o trapezoidal (Levin et al., 2007; Cachat et al. 2010a) (Figuras 1 e 2). A partir dos modelos ofertados pela literatura foi realizada uma comparação entre os formatos retangular e trapezoidal (Figuras 10, 11 e 12) e não foram encontradas diferenças estatísticas significativas nas medidas avaliadas. Tal achado corrobora com a descrição filogenética do zebrafish dada por Talwar & Jhingran (1991) de que o animal provavelmente estaria sob controle do topo do aquário e a abertura no topo promovida pelo formato trapezoidal possivelmente não modificaria a percepção da coluna d'água pelo animal (Talwar & Jhingran, 1991; Tran & Gerlai, 2013).

Além do formato, ainda não havia sido realizada uma comparação referente ao desempenho de machos e fêmeas no NTT. Os dados mostraram que não existe diferença ao comparar o sexo dos animais no que concerne aos comportamentos do tipo ansiedade (Figuras 7, 8 e 9), tal como proposto no estudo de Anwer et al. (2021). No estudo de Anwer et al. (2021) foram utilizados dois modelos de tanques, o trapezoidal com as medidas originais (Levin et al., 2007; Cachat et al. 2010a) e um outro tanque mais comprido com as seguintes medidas: 10,5

x 7x 52 cm. Os autores não encontraram diferenças entre os sexos no tanque trapezoidal, o que corrobora com os achados da pesquisa em questão, porém os autores encontraram diferença estatística significativa no tanque comprido. Mais uma vez é possível inferir que os animais, independente do sexo, provavelmente estejam sob controle da coluna d'água no NTT que se modifica ao encompridar o aparato (Talwar & Jhingran, 1991).

Apesar dos achados de Anwer et al. (2021), os autores Bozi et al. (2021) apresentaram um estudo sobre o aumento dos comportamentos do tipo ansiedade a partir do estresse social em machos e fêmeas utilizando o NTT. De forma geral, os pesquisadores concluíram que o estresse social relacionado ao comportamento de subordinação diante do outro sujeito foi conservado entre os vertebrados, como também a capacidade de estabelecer hierarquias. Apesar desse resultado, os autores mostraram a necessidade de mais estudos, já que as fêmeas parecem ter apresentado maior dominância diante do sexo oposto, bem como níveis mais baixos de cortisol ao serem subordinadas, diferentemente dos machos que apresentaram níveis elevados de cortisol e comprometimento da capacidade de neurogênese ao serem subordinados. Desta forma, os estudos de Bozi et al. (2021) permitem inferir que talvez haja alguma diferença entre machos e fêmeas, contudo tais diferenças não foram encontradas ao analisar as medidas relacionadas a ansiedade dentro dessa pesquisa.

Para além da compreensão das diferenças no desempenho dos animais referentes ao formato e ao sexo (Figuras 7, 8, 9, 10, 11 e 12)), os sujeitos também foram testados em três diferentes intensidades de luminosidade: 125, 250 e 500 lúmens (Figuras 13, 14 e 15) e em diferentes períodos do dia: matutino, vespertino e noturno (16, 17 e 18). Em ambos os testes os parâmetros utilizados foram aqueles propostos originalmente pela literatura: 250 lúmens incididos em cima do tanque no teste de luminosidade e período matutino no teste do período do dia (Egan et al., 2009).

Tanto no teste de luminosidade quanto nos estudos sobre o período do dia (Figuras 13, 14, 15, 16, 17, e 18), o ciclo circadiano e a fisiologia geral do zebrafish devem ser considerados dentro da análise e discussão dos achados. O ciclo circadiano é um relógio endógeno que regula o funcionamento do organismo durante as 24 horas de um dia. Em vertebrados inferiores (por exemplo: peixes e pássaros), grande parte do relógio é composto pela glândula pineal (responsável pela síntese do hormônio melatonina e identificação da ausência/presença de luminosidade), contudo, apesar da enorme importância dos circuitos neurais, na maior parte das espécies de animais vertebrados, as retinas também se mostram capazes de provocar oscilações circadianas autossustentadas (Hurd et al., 1998; Huang et al., 2018; Dias et al., 2014).

Desta forma, para além do ciclo circadiano, o zebrafish também pode sofrer influência visual da luminosidade, sendo que esta pode levar alguns animais a desenvolverem distúrbios em sua atividade motora, na secreção de hormônios, no controle hipotalâmico do ciclo sono-vigília e na temperatura após constante exposição a luz (Dias et al., 2014). Ainda com relação a iluminação, Dias et al. (2014) e Hurd et al. (1998) mostraram que o zebrafish tende a reduzir sua atividade motora em locais completamente escuros. Sendo assim, uma possível explicação para a ausência de diferença estatística neste trabalho entre as três intensidades de luz pode estar relacionada ao fato de que independente da intensidade luminosa, existia iluminação e os animais pareciam estar sob controle da iluminação e do período do dia (matutino) e não necessariamente da intensidade luminosa (Emran et al., 2008; Hurd et al., 2014).

Além do mais, o zebrafish possui uma condição ocular filogenética que incide em um movimento de nado em direção a algum estímulo visual, sendo que tal situação permite estudar comportamentos que dependam direta ou indiretamente da visão do animal (Gahtan et al., 2005). Para tanto, é necessário que o zebrafish apresente em sua morfologia bastonetes e quatro tipos de cones que são sensíveis a diferentes frequências (luz ultravioleta, comprimentos de

onda curto, médio e longo) (Meier et al., 2018). Ao considerar a morfologia da espécie, é possível inferir que não tenha havido diferença estatística nos resultados por razões distintas das explanadas nos parágrafos anteriores, já que com 125 lúmens a luminosidade é reduzida e seja mais provável a ativação de bastonetes do que de cone e talvez os animais tenham tido uma percepção de menor risco e por conseguinte, menor esquiva. Por um outro lado, a intensidade de 500 lúmens permite uma maior intensidade luminosa, o que pode dificultado a discriminação de estímulos no tanque, levando também a uma redução de possíveis esquivas.

Tal como nos testes de luminosidade, o ciclo circadiano também influencia os comportamentos do tipo ansiedade no zebrafish em diferentes períodos do dia. O zebrafish é um animal que apresenta uma preferência pelo período diurno, apresentando maior atividade motora e ciclo circadiano semelhante ao da espécie humana: vigília no período claro e sono no período escuro (Gerlai et al., 2000; Champagne et al., 2010; Blaser & Penalosa, 2011; Emran et al., 2008).

Sendo assim, no teste do período do dia foram encontradas algumas diferenças estatísticas nas medidas comportamentais que podem ser compreendidas a partir do ciclo circadiano dos animais. Em todas as medidas de exploração do topo (frequência de entradas, tempo total despendido, frequência de nado errático e latência para entrar no topo) (Figuras 16 e 17) houve diferença estatística significativa entre o período matutino e/ou os períodos vespertino e noturno, mostrando que os sujeitos do período diurno levaram menos de 100 segundos para ir ao topo do aquário, porém, apesar de atravessarem para o topo mais rapidamente, os sujeitos exploraram muito menos esse compartimento quando comparados com os animais do período vespertino e noturno.

Apesar da preferência pelo período diurno e maior atividade motora (Gerlai et al., 2000; Champagne et al., 2010; Blaser & Penalosa, 2011; Emran et al., 2008), não foi possível detectar se tais dados confirmam a literatura, uma vez que a atividade motora não foi medida e

foram avaliadas apenas as medidas de ansiedade. De qualquer forma, o zebrafish é um animal que pode ser predado por espécies piscinas e/ou aéreas que tenha acesso ao mesmo através da coluna d'água ou superfície da água e como forma de tentar evitar a predação, o animal tende a ficar mais para o fundo em seu ambiente natural buscando se esquivar da predação que pode vir a acontecer principalmente no período matutino que é de maior vigília. Tanto em seu ambiente natural quanto no tanque teste é esperado que os sujeitos explorem menos o topo e fiquem mais tempo no fundo em períodos em que seu relógio endógeno detecta como período matutino, ficando mais sob controle de algum possível predador, corroborando com os achados desse trabalho (Lima, 2003; Talwar & Jhingran, 1991; Weitzman & Palmer, 1997).

Além das variáveis estudadas que foram citadas anteriormente, foi realizado também um teste que avaliava a diferença do desempenho dos animais em um tanque com as medidas originais (Levin et al., 2007; Cachat et al. 2010a), um tanque com as medidas reduzidas pela metade (Figura 3) e um terceiro tanque com as medidas originais dobradas (Figura 4). Neste teste, não foi encontrada nenhuma diferença estatística significativa nas medidas relacionadas ao topo dos tanques (Figuras 19 e 20).

De forma geral, os animais expostos ao tanque maior apresentaram diferenças nas medidas avaliadas ao serem comparados com os sujeitos expostos no tanque original e no tanque menor no que concerne aos comportamentos de *freezing* no fundo do tanque e geotaxia (Figura 21), isto é, tais comportamentos caíram drasticamente de frequência no tanque maior ao ser comparado com os outros dois tamanhos. O zebrafish é um animal que tende a ficar mais na parte inferior ou fundo do tanque em seu período de vigília podendo ou não apresentar o comportamento de geotaxia, já que esta é uma forma de esquiva de predadores aéreos, mas não necessariamente garante a esquiva de predadores piscinos. Do mesmo modo, em um tanque maior, com mais espaço para explorar e menor risco de predação, os animais apresentaram uma quantidade menor e despenderam menos tempo em *freezing*, sendo este um comportamento de

fuga de possíveis predadores (Bencan et al., 2009; Cachat et al., 2010, Levin et al., 2007; Maximino et al., 2012; Raymond et al., 2012; Wong et al., 2010)

Além de investigarem a densidade populacional, os autores Shishis et al. (2022) também investigaram a relação entre a mesma e o tamanho dos tanques de teste. Os autores utilizaram três tamanhos de tanque (1.5, 10 ou 50 L) com densidades que variavam entre 1, 2 ou 4 peixes/L e concluíram que tanto o tamanho do tanque quanto a densidade populacional alteram os comportamentos avaliados, porém os autores não conseguiram afirmar se as modificações comportamentais encontradas estavam relacionadas ao medo ou ansiedade, evidenciando a necessidade de mais testes comportamentais para avaliar tais respostas. Todos os estudos citados acerca do tamanho do tanque corroboram com os dados encontrados, uma vez que foi encontrada diferença estatística significativa em grande parte das medidas do fundo do aquário.

Na busca por compreender melhor os parâmetros do NTT, também foi investigada a aptidão para habituação intersessão e intrasessão dos animais testados. Para tanto, foram realizados dois testes de reexposição dos animais ao NTT com o intuito de investigar se o comportamento exploratório mudava após exposições com intervalos de 15 minutos (Figuras 22, 23 e 24) e exposições com intervalos de 24 horas (Figuras 25, 26, 27 e 28). No teste com 15 minutos de intervalo entre uma testagem e a próxima não foram encontradas diferenças significativas em nenhuma das medidas, já no teste com 24 horas de intervalo entre uma testagem e a próxima foram encontradas diferenças nas medidas de latência para entrar no topo, frequência e tempo total de *freezing* no fundo do aquário (Figuras 25 e 27).

Em contraposto aos achados dessa pesquisa, os autores Resmim et al. (2023) sugeriram que a reexposição dos animais ao aparato influencie na exploração dos sujeitos no tanque. De qualquer forma, independente do resultado obtido é necessário considerar as diferenças do método empregado, já que Resmim et al. (2023) utilizaram duas diferentes

strains de zebrafish (*short fin* e o leopardo), tendo sido usados o total de 40 animais divididos entre as duas *strains* e três diferentes testes, com intervalo de 24 horas entre uma exposição e a próxima, sendo que o aparato do NTT foi apresentado com medidas diferentes das propostas por Levin et al. (2007), isto é, com a largura menor, o comprimento maior e apresentando pouca diferença no tamanho da coluna d'água que foi reduzida em 0,2cm.

Do mesmo modo, Maximino et al. (2010a) obtiveram diferentes resultados no teste claro/escuro dos achados da presente pesquisa. Os autores mostraram que uma sessão de 15 minutos total de teste não altera o desempenho dos animais, porém exposições repetidas independentes do intervalo estabelecido (15 minutos ou 24 horas) afetam o comportamento locomotor dos sujeitos, resultado que confirma o estudo de Resmim et al. (2023). De qualquer forma, em ambas as pesquisas citadas, os métodos utilizados são diferentes dos propostos no presente estudo. Além do mais, embora a atividade locomotora sofra habituação no teste claro/escuro, a evitação do lado claro, isto é, do compartimento mais aversivo continua presente independente do tempo total de sessão e da quantidade ou intervalo de exposições, o que vai de encontro com os resultados obtidos no NTT, já que os animais não apresentaram diferença significativa na comparação entre as três exposições com 15 minutos de intervalo e diferenças sutis na comparação das três exposições com intervalo de 24 horas tanto no topo quanto no fundo do aquário (Figuras 22, 23, 24, 25, 26, 27 e 28).

Ainda que os achados de Resmim et al. (2023) e Maximino et al. (2010a) sugiram que a atividade locomotora apresente diferenças significativas nos testes de reexposição, os resultados obtidos na presente pesquisa abrem margem para discutir sobre uma possível reutilização do zebrafish no NTT, uma vez que não foi encontrada diferença estatística significativa. Para tanto, é fundamental seguir o passo a passo descrito no item Método, uma vez que foram nessas condições que os animais não apresentaram diferença significativa ao comparar as três diferentes exposições aos testes.

Além dos testes de reexposição, os animais também foram testados em diferentes referências de tempo total de teste, ou seja, originalmente o teste possui a duração total de 6 minutos, porém também foi avaliado o desempenho dos animais considerando apenas 3 minutos de sessão e 12 minutos de sessão (Figuras 29, 30 e 31). Na busca por compreender melhor o controle de estímulos do NTT, foi realizada uma avaliação da possibilidade de habituação ao deixar os animais explorarem livremente o tanque do teste por 30 minutos ininterruptos (Figura 8). Sendo assim, é possível perceber através dos resultados obtidos que as principais diferenças estatísticas se deram ao comparar o tempo total de teste de 3 minutos com o de 30 minutos.

Tais diferenças encontradas ao avaliar o tempo total de teste podem ser explicadas considerando aspectos filogenéticos e ecológicos do zebrafish. O zebrafish é uma espécie piscina com amplo repertório cognitivo relacionado a memória e consequentemente a atividade locomotora, aprendizagem, reconhecimento espacial, retenção de memória e respostas de medo e ansiedade (Tan et al., 2022). A partir de uma perspectiva filogenética é possível inferir que os animais podem ter se familiarizado com o tanque novo, isto é, retido a memória espacial com o decorrer da sessão, uma vez que os sujeitos reduziram a atividade exploratória de forma geral, despenderam mais tempo no topo do aquário e reduziram o tempo total de *freezing*, tal como observado nas Figuras 29, 30 e 31 (Matsunaga & Watanabe, 2010; Wong et al., 2010). Tal familiarização pode ainda ser compreendida através da ecologia do zebrafish, visto que esses animais apresentam neofobia diante de um ambiente desconhecido, porém, conforme o tempo passa, o NTT deixa de ser uma novidade, a aversividade ao aquário tende a ir diminuir e os animais apresentam comportamento oposto, a neofilia, que pode ser caracterizada por um aumento da exploração dos componentes inicialmente aversivos do teste, isto é, o topo do tanque (Franks et al., 2023; May et al., 2016; Petrazzini et al., 2012).

Em contraposto aos testes de reexposição que demonstraram que não ocorre habituação com o tanque, o teste que compara o tempo total de sessão de 30 minutos com outras referências apresentou resultados que possibilitam compreender que ocorre habituação dos animais entre o 12º e o 30º minuto do teste, ou seja, redução da atividade locomotora (Figuras 29, 30 e 31). Esse resultado permite afirmar que houve aprendizagem de que o tanque não era mais um ambiente ansiogênico tal como no início do teste, já que os comportamentos do tipo ansiedade reduziram de frequência e houve um aumento da exploração no topo do tanque após o 12º minuto (Franks et al., 2023; Matsunaga & Watanabe, 2010).

5 CONCLUSÃO

O intuito dessa pesquisa foi realizar uma análise paramétrica para identificar os parâmetros que podem interferir no NTT. Desta forma, foi possível concluir que o formato (trapezoidal ou retangular), o sexo dos animais e a quantidade de lúmens (teste de luminosidade) ou intensidade luminosa não alteram o desempenho dos sujeitos no NTT. Apesar do resultado obtido no teste de luminosidade, o teste do período do dia, que também proporciona mudança na intensidade luminosa mostrou que o período da manhã difere do período vespertino e noturno na frequência, no tempo total e na latência para a entrada no topo, na frequência de nado errático no topo, na frequência e no tempo total de *freezing* e no tempo total de geotaxia confirmando que o período mais adequado para execução do teste é entre as 8 e 12 horas do dia.

No que se refere ao tamanho do tanque, foi observado que no aquário com as medidas dobradas, o desempenho dos animais nesse aparato foi diferente ao ser comparado com o aparato do tamanho regular e com o tanque com medidas reduzidas pela metade nos comportamentos de *freezing* (frequência e tempo total no fundo do tanque) e geotaxia. De

qualquer modo, o tanque original é aquele que demonstrou ser mais efetivo ao avaliar os comportamentos dos animais.

No que concerne à avaliação de aprendizagem e habituação foram realizados dois testes de reexposição (reexposição dos animais ao teste com o intervalo de 15 minutos e de 24 horas entre o fim de um teste e o início do próximo) e um teste de habituação intrasessão, no qual o tempo total do teste foi manipulado. Em ambos os testes de reexposição não foram encontradas diferenças estatísticas entre uma exposição e as outras.

Já o teste de habituação revelou que após 6 minutos de teste o desempenho dos sujeitos não é alterado, porém com menos de 6 minutos existe o risco de que o comportamento dos animais seja alterado tanto no topo quanto no fundo do tanque. Também foi percebido que após 12 minutos de tempo total de teste os animais parecem ter iniciado o processo de familiarização, isto é, habituação ao NTT. Além disso, o teste de reexposição de 15 minutos mostrou que os animais não habituaram após 6 minutos de teste, porém é sabido a partir deste trabalho que com 30 minutos ocorre habituação, ou seja, os animais que foram expostos até 6 minutos no teste podem ser testados novamente, porém não é possível afirmar que os animais que passaram mais do que 6 minutos no teste irão ter o mesmo desempenho do que aqueles que foram testados por apenas 6 minutos.

A análise paramétrica do NTT proposta neste trabalho revelou que o sexo dos animais, o formato, a luminosidade e a reutilização dos animais após 15 minutos ou 24 horas de teste/reteste não alteram os comportamentos do tipo ansiedade, porém o período do dia, o tamanho do tanque e o tempo total de teste pode interferir nos comportamentos do tipo ansiedade no zebrafish.

Por fim, o NTT pode ser realizado no período matutino, não é necessário realizar a sexagem dos animais, o tanque pode ser no formato trapezoidal ou retangular (porém as medidas da literatura devem ser seguidas tanto na capacidade de volume de água quanto nos

formatos testados), com iluminação que pode variar entre 125 e 500 lúmens dentro do aquário (sem sombras no fundo do tanque), sendo o teste com tempo total de 6 minutos e podendo utilizar os mesmos animais por até três vezes se os testes não tiverem ultrapassado o tempo total de 6 minutos de testagem. Tais condições favorecem a continuidade do uso desse modelo animal através da segurança de uma parametria, possibilitando a reutilização dos sujeitos levando a redução de custos e insumos.

6 REFERÊNCIAS

- Abreu, M. S.; Giacomini, A. C. V. V.; Kalueff, A. V.; Barcellos, L. J. G. (2016). *The smell of “anxiety”: Behavior modulation by experimental anosmia in zebrafish*. Physiology & Behavior. doi: doi.org/10.1016/j.physbeh.2016.01.030
- Ahmad, F.; Richardson, M. K. (2013). *Exploratory Behaviour in the Open Field Test Adapted for Larval Zebrafish Impact of Environmental Complexity*. Behavioural Processes, 92, 88-98. doi: doi.org/10.1016/j.beproc.2012.10.014
- Alia, A.; Petrunich-Rutherford, M. L. (2019). *Anxiety-like Behavior and Whole-Body Cortisol Responses to Components of Energy Drinks in Zebrafish (Danio rerio)*. PeerJ, 7(7). doi: 10.7717/peerj.7546
- Anwer, H.; Mason, D.; Zajitschek, S.; Noble, D. W. A.; Hesselson, D.; Morris, M. J.; Lagisz, M.; Nakagawa, S. (2021). *An Efficient New Assay for Measuring Zebrafish Anxiety: Tall Tanks That Better Characterize Between-Individual Differences*. Journal of Neuroscience Methods, 356, 1-11. doi: 10.1016/j.jneumeth.2021.109138
- 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(7). doi: 10.7717/peerj.7469

- Bencan, Z., Sledge, D., Levin, E. D. (2009). *Buspirone, chlordiazepoxide and diazepam effects in a zebrafish model of anxiety*. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*, 94, 75– 80. doi: doi.org/10.1016/j.pbb.2009.07.009
- Blaser, R. E.; Penalosa, Y. M. (2011). *Stimuli Affecting Zebrafish (Danio rerio) Behavior in the Light/Dark Preference Test*. *Physiology & Behavior*, 104(5), 831-837. doi: 10.1016/j.physbeh.2011.07.029
- Blaser, R. E.; Rosemberg, D. B. (2012). *Measures of Anxiety in Zebrafish (Danio rerio): Dissociation of Black/White Preference and Novel Tank Test*. *PLoSone*, 7(5). doi: 10.1371/journal.pone.0036931
- Bozi, B.; Rodrigues, J.; Lima-Maximino, M.; Siqueira-Silva, D. H.; Soares, M.; Maximino, C. (2021). *Social Stress Increases Anxiety-Like Behavior Equally in Male and Female Zebrafish*. *Frontiers in Behavioral Neuroscience*, 15, 01-07. doi: https://doi.org/10.3389/fnbeh.2021.785656
- Cachat, J. M.; Canavello, P. R.; Elkhayat, S. I.; Bartels, B. K.; Hart, P. C.; Elegante, M. F.; Beeson, E. C.; Laffoon, A. L.; Haymore, W. A. M.; Tien, D. H.; Tien, A. K.; Mohnot, S.; Kalueff, A. V. (2011). *Modeling Stress and Anxiety in Zebrafish*. In: *Zebrafish Models in Neurobehavioral Research*. *Neuromethods*. New Orleans, USA: Human Press, 52. doi: 10.1016/j.neuropharm.2011.07.037
- Cachat, J.; Stewart, A.; Grossman, L.; Gaikwad, S.; Kadri, F.; Chung, K. M.; Wu, N.; Wong, K.; Roy, S.; Suci, C.; Goodspeed, J.; Elegante, M.; Bartels, B.; Elkhayat, S.; Tien, D.; Tan, J.; Denmark, A.; Gilder, T.; Kyzar, E.; Dileo, J.; Frank, K.; Chang, K.; Utterback, E.; Hart, P.; Kalueff, A. V. (2010a). *Measuring behavioral and endocrine responses to novelty stress in adult zebrafish*. *Nature Protocols*, 5(11), 1786-1799. doi: 10.1038/nprot.2010.140
- Cachat, J. M.; Canavello, P. R.; Elegante, M.; Bartels, B.; Hart, P.; Bergner, C.; Egan, R.; Duncan, A.; Tien, D.; Chung, A.; Wong, K.; Goodspeed, J.; Tan, J.; Grimes, C.; Elkhayat,

- S.; Suciu, C.; Rosenberg, M.; Chung, K. M.; Kadri, F.; Roy, S.; Gaikwad, S.; Stewart, A.; Zapolsky, I.; Gilder, T.; Mohnot, S.; Beeson, E.; Amri, H.; Zukowska, Z.; Soignier, R. D.; Kalueff, A. V. (2010b). *Modeling withdrawal syndrome in zebrafish*. Behav Brain Res, 208(2), 371- 376. doi: doi.org/10.1016/j.bbr.2009.12.004m
- Champagne, D. L.; Hoefnagels, C. C., Kloet; R. E.; Richardson, M. K. (2010). *Translating Rodent Behavioral Repertoire to Zebrafish (Danio rerio): Relevance for Stress Research*. Behavioural Brain Research, 214(2), 332-342. doi: 10.1016/j.bbr.2010.06.001
- Chin, J. S. R.; Albert, L. T.; Loomis, C. L.; Keene, A. C.; Duboué, E. R. (2019). *Behavioral Approaches to Studying Innate Stress in Zebrafish*. Journal of Visualized Experiments, 157, 1-9. doi:10.3791/59092
- Dias, C. A. G. M.; Santos, B. R.; Mansur, B. M.; Pinheiro, M. A.; Fecury, A. A.; Sá-Oliveira, J. C.; Matayoshi-Calixto, P. H.; Oliveira, E.; Gouveia Jr, A. (2014). *Light / Dark Preference in Danio rerio: Effects of Light Exposure Duration and Day Period*. Biota Amazônia, 4(3), 106-111. doi: 10.18561/2179-5746/biotaamazonia.v4n3p106-111
- Egan, R. J., Bergner, C. L., Hart, P. C., Cachat, J. M., Canavello, P., Elegante, M. et al. (2009). *Understanding behavioral and Physiological Phenotypes of Stress and Anxiety in Zebrafish*. Behavioral Brain Research, 205(1), 38-44. doi.org/10.1016/j.bbr.2009.06.022
- Emran, F., Rihel, J., Dowling, J.E. (2008). *A Behavioral Assay to Measure Responsiveness of Zebrafish to Changes in Light Intensities*. Journal of Visualized Experiments, 20, 1-6. doi: 10.3791/923
- Fontana, B. D.; Gibbon, A. J.; Cleal, M.; Sudwarts, A.; Prichett, D.; Petrazzini, M. E. M.; Brennan, C. H.; Parker, M. O. (2021). *Moderate early-life stress improves adult zebrafish (Danio rerio) spatial short-term memory but does not affect social and anxiety-like responses*. Developmental Psychobiology, 63, 54-64. doi: 10.1002/dev.21986

- Fontana, B. D.; Alnassar, N.; Parker, M. O. (2022). *The Impact of Water Changes on Stress and Subject Variation in a Zebrafish (Danio rerio) Anxiety-Related Task*. Journal of Neuroscience Methods, 363, 1-7. doi: 10.1016/j.jneumeth.2021.109347.
- Franks, B.; Gaffney, L. P.; Graham, C.; Weary, D. (2023). *Curiosity in Zebrafish (Danio rerio)? Behavioral responses to 30 novel objects*. Frontiers in Veterinary Science, 9, 1-14. doi: <https://doi.org/10.3389/fvets.2022.1062420>
- Gahtan, E.; Tanger, P.; Baier, H. (2005). *Visual Prey Capture in Larval Zebrafish is Controlled by Identified Reticulospinal Neurons Downstream of the Tectum*. Journal of Neuroscience, 25(40), 9294-9303. doi: 10.1523/JNEUROSCI.2678-05.2005.
- Gerlai, R.; Lahav, M.; Guo, S.; Rosenthal, A. (2000). *Drinks Like a Fish Zebrafish (Danio rerio) as a Behavior Genetic Model to Study Alcohol Effects*. Pharmacology Biochemistry and Behavior, 67(4), 773-782. doi: 10.1016/s0091-3057(00)00422-6
- Gerlai, R. (2013). *Antipredatory Behavior of Zebrafish Adaptive Function and a Tool for Translational Research*. Evolutionary Psychology, 11(3), 591-605. doi: doi.org/10.1177/147470491301100308
- Giacomini, A. C. V. V.; Abreu, M. S.; Giacomini, L. V.; Siebel, A. M.; Zimmerman, F. F.; Rambo, C. L.; Mocelin, R.; Bonan, C. D.; Piato, A. L.; Barcellos, L. J. G. (2016). *Fluoxetine and Diazepam Acutely Modulate Stress Induced-Behavior*. Behavioural Brain Research, 296, 301-310. doi: 10.1016/j.bbr.2015.09.027
- Haghani, S.; Karia, M.; Cheng, R.; Mathuru, A. (2019). *An Automated Assay System to Study Novel Tank Induced Anxiety*. Frontiers in Behavioral Neuroscience, 13. doi: 10.3389/fnbeh.2019.00180
- Hong, X. Zha, J. (2019). *Fish behavior: A Promising Model for Aquatic Toxicology Research*. Science of the Total Environment, 686, 311-321. doi: doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.06.028

- Hurd, M. W.; Debruyne, J.; Straume, M.; Cahill, G. M. (1998). *Circadian Rhythms of Locomotor Activity in Zebrafish*. *Physiology & Behavior*, 65(3), 465-472. doi: 10.1016/s0031-9384(98)00183-8
- Jat, D. Hasan, W.; Nahar, M.; Jain, J. (2018). *A Study of Anxiety Related Behavioural Alterations in Zebrafish*. In: Sustainable Development of Ecosystem, Wildlife and Heritage Conservation for Human Welfare. New Delhi: Astral International.
- Kalueff, A. V.; Kaluyueva, A.; Maillet, E. L. (2017). *Anxiolytic-like Effects of Noribogaine in Zebrafish*. *Behavioural Brain Research*, 330, 63-67. doi: 10.1016/j.bbr.2017.05.008
- Kysil, E. V.; Meshalkina, D. A.; Frick, E. E.; Echevarria, D. J.; Rosemberg, D. B.; Maximino, C.; Lima, M. G.; Abre, M. S.; Giacomini, A. C.; Barcellos, L. J. G.; Song, C.; Kalueff, A. V. (2017). *Comparative Analyses of Zebrafish Anxiety-Like Behavior Using Conflict-Based Novelty Tests*. *Zebrafish*, 14(3), 197-208. doi: doi.org/10.1089/zeb.2016.1415
- Levin, E. D., Bencan, Z., & Cerutti, D. T. (2007). *Anxiolytic Effects of Nicotine in Zebrafish*. *Physiology & Behavior*, 90(1), 54-58. doi: doi.org/10.1016/j.physbeh.2006.08.026
- Lima, R. S. (2003). Subfamily Aphyocharacinae (Characins). In: *Checklist of the Freshwater Fishes of South and Central America*. Porto Alegre (Brazil): EDIPUCRS.
- Macri, S.; Clément, R. J. G.; Spinello, C.; Porfiri, M. (2019). *Comparison Between Two- and Three-Dimensional Scoring of Zebrafish Response to Psychoactive Drugs: Identifying When Three-Dimensional Analysis is Needed*. *PeerJ*. doi: 10.7717/peerj.7893
- Marcon, M.; Mocelin, R.; Benvenutti, R.; Costa, T.; Herrmann, A. P.; Oliveira, D. L.; Koakoski, G.; Barcellos, L. J. G.; Piato, A. (2018). *Environmental Enrichment Modulates the Response to Chronic Stress in Zebrafish*. *Journal of Experimental Biology*, 221, 1-7. doi: 10.1242/jeb.176735

- Matsunaga, W.; Watanabe, E. (2010). *Habituation of Medaka (Oryzias latipes) Demonstrated by Open-Field Testing*. Behavioural Process, 85, 142-150. doi: 10.1016/j.beproc.2010.06.019
- Maximino, C.; Brito, T. M.; Colmanetti, R.; Pontes, A. A. A., Castro, H. M.; Lacerda, R. I. T.; Morato, S.; Gouveia Jr, A. (2010a). *Parametric Analysis of Anxiety in Zebrafish Scototaxis*. Behavioural Brain Research, 210, 1-7. doi: 10.1016/j.bbr.2010.01.031
- Maximino, C.; Brito, T. M., Dias, C. A.; Gouveia Jr, A.; Morato, S. (2010b). *Scototaxis as Anxiety-Like Behavior in Fish*. Nature Protocols, 5, 209 –216. doi: 10.1038/nprot.2009.225
- Maximino, C.; Brito, T. M.; Moraes, F. D.; Oliveira, F. V. C. (2007). *A Comparative Analysis of the Preference for Dark Environments in Five Teleosts*. International Journal of Comparative Psychology, 20, 351-367.
- Maximino, C.; Puty, B.; Benzecry, R.; Araújo, J.; Lima, M. G.; Batista, E. J. O.; Oliveira, K. R. M.; Crespo-Lopez, M. E.; Herculano, A. M. (2013). *Role of Serotonin in Zebrafish (Danio rerio) Anxiety: Relationship with Serotonin Levels and Effect of Buspirone, WAY 100635, SB 224289, Fluoxetine and para-Chlorophenylalanine (pCPA) in Two Behavioral Models*. Neuropharmacology, 71, 83-97. doi: 10.1016/j.neuropharm.2013.03.006
- Maximino, C.; Benzecry, R.; Oliveira, K. R. M.; Batista, E. De J. O.; Herculano, A; M.; Rosemberg, D. B.; Oliveira, D. L. De; Blaser, R. (2012). *A Comparison of the Light/Dark and Novel Tank Tests in Zebrafish*. Behaviour, 149, 1099-1123. doi: <https://doi.org/10.1163/1568539X-00003029>
- May, Z.; Morrill, A.; Holcombe, A.; Johnston, T.; Gallup, J.; Fouad, K.; Schalomon, M.; Hamilton, T. J. (2016). *Object Recognition Memory in Zebrafish*. Behavioral Brain Research, 296, 199-210. doi:10.1016/j.bbr.2015.09.016

- Meier, A.; Nelson, R.; Connaughton, V. P. (2018). *Color Processing in Zebrafish Retina*. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 12, 327. doi: 10.3389/fncel.2018.00327
- Mezzomo, N. J.; Silveira, A.; Giuliani, G. S.; Quadros, V. A.; Rosemberg, D. B. (2016). *The Role of Taurine on Anxiety-Like Behaviors in Zebrafish A Comparative Study Using the Novel Tank and the Light-Dark Tasks*. *Neuroscience Letters*, 613, 19-24. doi: 10.1016/j.neulet.2015.12.037
- Miletto Petrazzini, M. E.; Agrillo, C.; Piffer, L.; Dadda, M.; Bisazza, A. (2012). *Development and Application of a New Method to Investigate Cognition in Newborn Guppies*. *Behavioural Brain Research*, 233(2), 443–449. doi: <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2012.05.044>
- Parker, M. O. (2015). *Adult Vertebrate Behavioural Aquatic Toxicology: Reability and Validity*. *Aquatic Toxicology*. doi: 10.1016/j.aquatox.2015.09.001
- 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 Ansiolytics*. *PloS One*, 7(4), 1-9. doi: doi.org/10.1371/journal.pone.0034992
- Parra, K. V.; Adrian Jr., J. C.; Gerlai, R. (2009). *The Synthetic Substance Hypoxanthine 3- N-Oxide Elicits Alarm Reactions in Zebrafish (Danio rerio)*. *Behav Brain Res*, 205, 336–41. doi: 10.1016/j.bbr.2009.06.037
- Raymond, J.; Chanin, S.; Stewart, A. M.; Kyzar, E.; Gaikwad ,S.; Roth, A.; Bruce, I.; Fryar, C.; Varga, D.; Enriquez, J.; Bagawandoss, S.; Pham, M.; Zapolsky, I.; Green, J.; Desmond, D.; Hester, J.; Kalueff, A. V. (2012). *Assessing Habituation Phenotypes in Adult Zebrafish intra-and inter-trial Habituation in the Novel Tank Test*. In: *Zebrafish Protocols For Neurobehavioral Research*. Neuromethods. Totowa: Humana Press, 66.

- Resmim, C. A.; Borba, J. V.; Pretzel, C. W.; Santos, L. W.; Rubin, M. A.; Rosenberg, D. B. (2023). *Assessing the Exploratory Profile of Two Zebrafish Populations: Influence of Anxiety-Like Phenotypes and Independent Trials on Homebase-Related Parameters and Exploration*. Behavioural Process, 210. doi: <https://doi.org/10.1016/j.beproc.2023.104912>
- Sackerman, J., Donegan, J., Cunningham, C., Nguyen, N., Lawless, K., & Gould, G. (2010). *Zebrafish Behavior in Novel Environments: Effects of Acute Exposure to Anxiolytic Compounds and Choice of Danio Rerio Line*. International Journal of Comparative Psychology, 23(1), 43-61
- Shishis, S.; Tsang, B.; Gerlai, R. (2022). *The Effect of Fish Density and Tank Size on the Behavior of Adult Zebrafish A Sistematic Analysis*. Frontiers in Behavioral Neuroscience, 01-20. doi: 10.3389/fnbeh.2022.934809
- Slooman, K. A.; McNeil, P. L. (2012). *Using Physiology and Behaviour to Understand the Responses of Fish Early Life Stages to Toxicants*. Journal of Fish Biology. doi: doi.org/10.1016/j.chemosphere.2013.07.036
- Speedie, N.; Gerlai, R. (2008). *Alarm Substance Induced Behavioral Responses in Zebrafish (Danio rerio)*. Behavioural Brain Research, 188, 168-177. doi: 10.1016/j.bbr.2007.10.031
- Stewart, A.; Gaikwad, S. K.; Kyzar, E.; Green, J.; Roth, A.; Kalueff, A. V. (2012). *Modeling Anxiety Using Adult Zebrafish A Conceptual Review*. Neuropharmacology, 62, 135-143. doi: 10.1016/j.neuropharm.2011.07.037
- Stewart A.; Kadri, F.; Dileo, J. (2010). *The Developing Utility of Zebrafish in Modeling Neurobehavioral Disorders*. International Journal of Comparative Psychology, 23(1), 103-120. doi: 10.2174/157015912803217323
- Stewart, A. M., Kaluyeva, A. A., Poudel, M. K., Nguyen, M., Song, C., Kalueff, A. V. (2015). *Building Zebrafish Neurobehavioral Phenomics: Effects of Common Environmental*

- Factors on Anxiety and Locomotor Activity*. Zebrafish, 12(5), 1-10. doi: doi.org/10.1089/zeb.2015.1106
- Talwar, P. K.; Jhingran, A. G. (1991). *Inland Fishes of India and Adjacent Countries*. A. A. Balkema Rotterdam: Netherlands. doi: 10.1007/BF00043269
- Tan, J. K.; Nazar, F. H.; Makpol, S.; Teoh, S. L. (2022). *Zebrafish A Pharmacological Model for Learning and Memory Research*. Molecules, 27(21), 1-21. doi: 10.3390/molecules27217374
- Tran, S.; Gerlai, R. (2013). *Individual Differences in Activity Levels in Zebrafish (Danio rerio)*. Behav. Brain Res, 257, 224-229. doi: 10.1016/j.bbr.2013.09.040
- Walsh-Monteiro, A., Chirinéa, G., Pessoa, R. S., Sanches, E. M., Carvalho, A. C. C., Silva, Y. C. B., & Gouveia Jr, A. (2016). *A New Anxiety Test for Zebrafish Plus Maze with Ramp*. Psychology & Neuroscience. Advance online publication. doi: doi.org/10.1037/pne0000067
- Weitzman, S. H.; Palmer, L. (1997). *A New Species of Hyphessobrycon (Teleostei: Characidae) from Neblina Region of Venezuela and Brazil, with Comments on the Putative 'Rosy Tetra Clade'*. Ichthyol. Explor. Freshwater, 7(3), 209-242.
- Wisenden, B. D. (2010). *Quantifying Anti-Predator Responses to Chemical Alarm Cues*, In: *Zebrafish Neurobehavioral Protocols*. Switzerland: Springer Nature, 51. doi: 10.1007/978-1-60761-953-6_4
- Wong, K.; Elegante, M.; Basrtels, B.; Elkhayat, S./ Tien, D.; Roy, S.; Goodspeed, J.; Suciu, C.; Tan, J.; Grimes, C.; Chung, A.; Rosenberg, M.; Gaikwad, S.; Denmark, A.; Jackson, A.; Kadri, F.; Min Chung, K.; Stewart, A.; Gilder, T.; Beeson, E.; Zapolsky, I.; Wu, N.; Cachat, J.; Kalueff, A. V. (2010). *Analyzing Habituation Responses to Novelty in Zebrafish (Danio rerio)*. Behavioural Brain Research, 208, 450-457. doi: 10.1016/j.bbr.2009.12.023