



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

Desamparo Aprendido com o Zebrafish (*Danio rerio*)

Gabriela Souza do Nascimento

Belém/PA
2014



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

Desamparo Aprendido com o Zebrafish (*Danio rerio*)

Gabriela Souza do Nascimento

Tese apresentada ao Programa de Teoria e Pesquisa do Comportamento, da Universidade Federal do Pará, como requisito parcial para obter o título de Doutor em Teoria e Pesquisa do Comportamento.

Area de concentração: Psicologia Experimental.

Tese parcialmente financiada pela CAPES através de bolsa de doutorado.

Orientador: Prof. Dr Amauri Gouveia Jr.

Belém/PA
2014

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)

Nascimento, Gabriela Souza do, 1985-
Desamparo aprendido com o zebrafish (danio
rerio) / Gabriela Souza do Nascimento. - 2014.

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, 2014.

1. Psicologia experimental. 2. Desamparo
(Psicologia). 3. Peixe - Pesquisa. I. Título.

CDD 23. ed. 150.724

Tese de Doutorado.

“Desamparo Aprendido no Zebrafish”

Aluna: Gabriela de Souza Nascimento

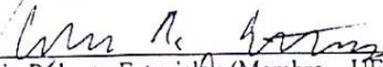
Data da Defesa: 23 de Maio de 2014.

Resultado: Aprovada.

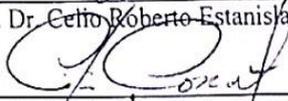
Banca examinadora:



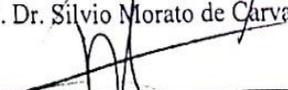
Prof.º Dr. Amauri Gouveia Junior (UFPA – Orientador).



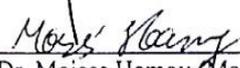
Prof.º Dr. Celso Roberto Estanislau (Membro – UEL).



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



Prof.º Dr. Anderson Manuel Herculano da Silva (Membro – UFPA).



Prof.º Dr. Moises Hamoy (Membro – UFPA).

Aos meus pais, Jorrimar e Maria, Irmãos Gabriel e Emerson, e esposo Paulo, por todo apoio e carinho que recebi ao longo destes quatro anos. Sem vocês a caminhada seria mais difícil.

Agradecimentos

Aos meus pais, irmãos e familiares, pela confiança, paciência e apoio. Vocês me forneceram a base necessária para que eu pudesse chegar até aqui.

Ao meu orientador, pela confiança depositada. Obrigada, é pouco para agradecer esses três anos de orientação, convivência e confiança. És um exemplo de pesquisador, docente e orientador.

Ao meu querido Paulo Silva, por compreender os momentos em que não podemos estar juntos, pelas noites em claro ao meu lado, lendo artigos e escrevendo, pela ajuda durante a coleta, e outras fases da pesquisa, e pelo ombro cedido, nas horas de desespero. Você é especial.

Aos meus alunos, Patrícia Caroline, Elize e Ednelson, espero ter ensinado algo a vocês. Sem vocês este trabalho demoraria mais para sair. Acreditem, vocês foram peças-chaves para este produto final.

Aos colegas do programa e do laboratório LABNEC, obrigada pela companhia, dúvidas sanadas e momentos de descontração. Vocês foram presentes que ganhei nestes quatro anos.

Ao André e Paula Carvalho, só nós sabemos o transtorno que é construir uma shuttlebox para peixes.

Aos meus amigos queridos, Tatiana, Bernardo, Débora, Pedro, Darlene, Lúcia e Celine, vocês me viram crescer na pesquisa, me conhecem e sabem que o caminho não foi fácil. Obrigada pelo apoio e pelas piadas sarcásticas que surgiram em relação a esses quatro anos.

Ao Prof^o Marcus Bentes, pelo incentivo para que eu fizesse o doutorado e ter aberto as portas da pesquisa.

“(...). O menor fato novo descoberto num laboratório, um tijolo acrescentado à construção do templo da ciência, é muito mais importante que uma palestra de segunda mão que mata uma hora de tempo, mas não pode deixar resultado útil em sua esteira. (...)”

(Parte do discurso proferido pelo professor Challenger em “O mundo perdido” de *Arthur Conan Doyle*)

Sumário

Lista de Figuras.....	vii
Resumo.....	viii
Abstract.....	ix
Apresentação.....	1
Estudo I	
Resumo.....	4
Abstract.....	5
Introdução.....	6
Materiais e Método.....	7
Resultados.....	9
Discussão.....	11
Referências.....	16
Estudo II	
Resumo.....	21
Abstract.....	22
Introdução.....	23
Materiais e Métodos.....	24
Resultados.....	28
Discussão.....	31
Referências.....	34
Estudo III	
Resumo.....	37

Abstract.....	38
Introdução.....	39
Materiais e Método.....	41
Resultados.....	44
Discussão.....	49
Referências.....	52
Conclusão Geral.....	56
Referências.....	58
Anexos.....	67

Lista de Figuras

Estudo I

Figura 1. Shuttlebox de Acrílico (26,5 x 12 x 3,8 cm – Insight Equipamentos).....8

Figura 2. Latência média (segundos), dos grupos Fuga (GF), Controle (GC) e Grupo Experimental (GE), distribuídas entre blocos de tentativas. * $p < 0,05$ x Grupo Controle (Anova de um fator).....10

Figura 3. Frequência média de tentativas falhas apresentadas pelo Grupo Fuga (GF), Controle (GC) e Grupo Experimental (G.Exp.). * $p < 0,05$ x Grupo Controle (Anova de um fator).....11

Estudo II

Figura 1. Shuttlebox de acrílico (28,0 X 7,7 X 4,0 cm – Insight Equipamentos).....26

Figura 2. Latência Média (segundos) dos grupos CHI LUZ, NCH LUZ, CHI S/LUZ e NCH S/LUZ distribuídas entre blocos de tentativas, representadas com desvio padrão. * $p < 0,05$ x 6° bloco do CHI S/LUZ (Anova de um fator).....29

Figura 3. Frequência média de tentativas falhas emitidas pelos sujeitos dos grupos NCH LUZ, CHI LUZ, NCH S/LUZ e CHI S/LUZ. * $p < 0,05$ x NCH S/LUZ (Mann-Whitney).....30

Estudo III

Figura 1. Latência média (segundos), distribuídas entre blocos de tentativas, dos grupos indicando diferentes doses de imipramina, segundo o tipo de tratamento: 0,0 mg/l NCH; 0,0 mg/l CHI; 1,0 mg/l CHI; 1,0 mg/l NCH; 2,0 mg/l NCH e 2,0 mg/l CHI. * $p < 0,05$ x 6° bloco do 0,0 mg/l NCH (Anova de um fator).....46

Figura 2. Frequência média de tentativas falhas dos grupos 0,0 mg/l NCH, 0,0 mg/l CHI, 1,0 mg/l CHI, 1,0 mg/l NCH, 2,0 mg/l NCH e 2,0 mg/l CHI. * $p < 0,05$ x 0,0 mg/l NCH (Mann-Whitney), ** $p < 0,05$ x 2,0 mg/l NCH (Teste T).....47

Figura 3. Frequência média das respostas de cruzamento (atividade motora) distribuída entre os diferentes grupos: 0, 0 mg/l NCH, 0,0 mg/l CHI, 1,0 mg/l CHI, 1,0 mg/l NCH, 2,0 mg/l NCH e 2,0 mg/l CHI.....48

Nascimento, Gabriela Souza (2014). Desamparo aprendido com o zebrafish (*Danio rerio*). Tese de Doutorado. Belém, Programa de Pós-graduação em Teoria e Pesquisa do Comportamento, Universidade Federal do Pará. 89 páginas.

RESUMO

Exposição a eventos aversivos incontroláveis gera dificuldade de aprendizagem para relações de contingência, fuga e/ou esquivas. Tal fenômeno foi denominado de desamparo aprendido e tem sido relacionado à depressão e transtorno de estresse pós-traumático. Este trabalho é composto de três estudos com os objetivos de: produzir desamparo aprendido em *Danio rerio* (Estudo I), investigar os efeitos da luz sobre o teste de fuga (Estudo II) e avaliar os efeitos da imipramina administrada em regime agudo sobre o desamparo aprendido em *Danio rerio* (Estudo III). Em todos os experimentos foi utilizada uma shuttlebox de acrílico (INSIGHT Equipamentos), que continham uma área central (removível) que permitia o isolamento dos sujeitos. O protocolo geral consistiu de duas fases: 1) Tratamento, onde cada peixe do tratamento choque incontrolável (CHI) foi submetido a 60 choques aleatórios e incontroláveis (0.7-0.9 V, com duração de 30 segundos), nesta fase os sujeitos do grupo que não receberam tratamento com choque elétrico (NCH) apenas permaneceram na área central por 60 minutos; e 2) Teste, onde cada sujeito, indiferente do tratamento recebido, foi submetido a uma sessão de fuga com 30 choques (0.7 a 0.9V, duração máxima de 30 segundos). No estudo I, foram utilizados 3 grupos, um experimental (GE-CHI) e dois controles, um permanecendo no aquário experimental por 60 minutos sem choque (GC-NCH) e outro que permaneceu no aquário viveiro durante a fase I (GF-NCH). No estudo II foram utilizados 4 grupos, um par de NCH e CHI submetidos ao teste com luz, outro par (NCH e CHI) que realizaram o teste na condição sem luz. Já no estudo III foram utilizados 6 grupos de acordo com a concentração de imipramina administrada por 10 minutos, antes da sessão teste: 0,0 mg/l NCH; 0,0 mg/CHI; 1,0 mg/l NCH; 1,0 mg/l CHI; 2,0 mg/l NCH; e 2,0 mg/l CHI. Os principais resultados mostraram que é possível gerar desamparo aprendido em *Danio rerio* (estudo I), sendo que a luz é uma variável que pode interferir diretamente na aquisição do fenômeno (estudo II) e a imipramina aguda, nas doses aqui administradas não revertem o desamparo aprendido em *Danio rerio*.

Palavras-Chave: Desamparo Aprendido; *Danio rerio*, Luz, Imipramina

Nascimento, Gabriela Nascimento (2013). *Learned Helplessness in Zebrafish (Danio rerio)*. Doctoral Thesis. Belém: Programa de Pós-Graduação em Teoria e Pesquisa do Comportamento, Federal University of Pará. 89 pages.

Abstract

Exposure to uncontrollable aversive events leads to difficulty in learning contingency relations, escape and/or avoidance. Such phenomenon was named learned helplessness and it has been correlated to depression and post-traumatic stress disorder. This thesis is composed by three studies that together have the aim of: producing learned helplessness in *Danio rerio* (Study I); investigating the effects of light on the escape test (Study II) and evaluating the effects imipramine have on learned helplessness when applied acutely in *Danio rerio* (Study III). In every experiment it was used an acrylic shuttlebox (INSIGHT equipment) which contained a central area (removable) that enabled the isolation of the subjects. The general protocol consisted in two phases: 1) Treatment, each subject of the Uncontrollable shock (USH) treatment was subjected to 60 random and uncontrollable shocks (0.7 – 0.9V, lasting 30 seconds each), in this phase the subjects of the group that didn't receive treatment with electric shock (NSH) only remained in the central area for 60 minutes; and 2) Test, each subject from both groups was subjected to an escape session with 30 shocks (0.7 – 0.9V, maximum duration of 30 seconds each). In Study I, 3 groups were used, one experimental (EG-USH) and two controls, one remaining in the experimental aquarium for 60 minutes without shock (CG-NSH). In Study II, 4 groups were used, a pair from NSH and USH subjected to the light test, another pair (NSH and USH) underwent the test no light condition. In Study III 6 groups were used according to the concentration of imipramine administered during 10 minutes before the test session: 0.0 mg/l NCH; 0.0 mg/CHI; 1.0 mg/l NCH; 1.0 mg/l CHI; 2.0 mg/l NCH; e 2.0 mg/l CHI. The main results show that it is possible to create learned helplessness in *Danio rerio* (study I), considering light as a variable that can interfere directly in the acquisition of the phenomenon (study II), in addition, it was showed that acute imipramine in the doses administered here did not revert the learned helplessness in *Danio rerio*.

Keywords: Learned Helplessness, *Danio rerio*, Light, Imipramine.

Apresentação

Um modelo animal consiste em um tipo de recurso utilizado para compreender processos, ou sintomas, observados em seres humanos (Andreatini, 2002; Guerra & Silva, 2002). Guerra e Silva (2002) ressaltam que em psicopatologia os modelos devem explicar e descrever os padrões comportamentais denominados culturalmente como transtornos.

A depressão é um transtorno de humor caracterizado por sintomas como, humor deprimido, perda de interesse e prazer em quase todas as atividades, perda ou ganho de peso, insônia ou hipersonia, agitação ou retardo motor, fadiga, ideações suicidas, pensamentos de mortes e entre outros (Manual Diagnóstico e Estatístico de Transtornos Mentais, DSM IV –TR, 2003). De acordo com Nguyen, Stewart e Kalueff (in press) a utilização de modelos animais análogos à depressão, são ferramentas úteis para ajudar a compreender e estudar esta patologia. Dentre os modelos animais de depressão encontra-se o desamparo aprendido, que é caracterizado pela dificuldade da aprendizagem de fuga após a pré-exposição a eventos aversivos incontroláveis (Maier & Seligman, 1976; Overmier & Seligman, 1967; Seligman, 1972; Seligman & Maier, 1967).

Na obra de Seligman “Desamparo” (1977) o capítulo intitulado “Depressão” faz um paralelo entre esta patologia e o desamparo aprendido, a fim de afirmar que ambos são homólogos. De acordo com Seligman (1977) devem-se levar em consideração quatro pontos, em comuns, existentes em ambos os fenômenos: (1) sintomas comportamentais; (2) etiologia; (3) cura; e (4) prevenção.

No que diz respeito à homologia entre os sintomas comportamentais do desamparo aprendido e depressão, destacam-se: a passividade; perda de apetite e peso; déficit social e sexual; depleção noradrenérgica e da atividade colinérgica; e dificuldade em aprender novas respostas que produzem alívio, que na depressão seria à tendência cognitiva negativa (Seligman, 1977).

A etiologia do desamparo aprendido consistiria na aprendizagem da não existência de contingência entre resposta e o término da situação aversiva, enquanto que, na depressão seria a crença na inutilidade do responder (Seligman, 1977). No que diz respeito à cura destacam-se como características a ação de drogas anti-colinérgicas e estimulantes noradrenérgicos; choques eletroconvulsivos; dissipação do fenômeno, com o passar do tempo; e repetidas exposições forçadas dos sujeitos a relações de contingências, que na depressão consistiria em uma recuperação na crença de que o responder produz reforço (Seligman, 1977).

A prevenção do desamparo aprendido ocorreria a partir da experiência prévia com situações aos quais o sujeito teria sucesso na emissão de uma resposta de fuga, ou esquiva, situação controlável (Seligman, 1977). Algo semelhante poderia acontecer com o ser humano, segundo Seligman (1977) provavelmente as pessoas com maiores predisposições a adquirirem depressão foram aquelas que possivelmente tiveram poucas experiências de controle, no decorrer de suas vidas.

Nos estudos iniciais sobre desamparo aprendido foram utilizados cães como sujeitos, mas, em seguida houve generalidade deste fenômeno para diferentes espécies, como: ratos (e.g. Seligman & Beagley, 1975; Willians & Maier, 1977), humanos (e. g. Hiroto & Seligman, 1975); baratas (e. g. Brown, Howe, & Jones, 1990; Brown & Stroup, 1988); gatos (e.g. Seward & Humphrey, 1967); e peixes (*Carassius auratus* -

Brown, Smith, & Peters, 1985; Padilla, Padilla, Ketterer, & Giacalone, 1970; Nash, Martinez, Dudeck, & Davis, 1983).

Este trabalho buscou demonstrar o desamparo aprendido com zebrafish (Paulistinha - *Danio rerio*), uma vez que até o momento a única espécie de peixe utilizada foi o *Carassius auratus*. Para isto foram realizados três estudos. No primeiro buscou-se reproduzir o fenômeno do desamparo aprendido, no segundo avaliou-se a presença da variável luz na aquisição da aprendizagem, teste de fuga, e no terceiro investigou-se os efeitos da imipramina em regime agudo sobre o desamparo aprendido.

Destaca-se que o *Zebrafish* é um peixe teleósteo que foi primeiramente usado em laboratório para investigações sobre genética molecular (Guo, 2004). Como motivos que justifiquem o uso do *zebrafish* em laboratórios encontram-se: a pequena dimensão deste animal, (em média de 3 a 5 cm) o que acaba por facilitar a sua manutenção em grande número e em espaço pequeno; o fato de ser um vertebrado que oscila entre a complexidade e a simplicidade; e o seu embrião é transparente e com um rápido desenvolvimento (Guo, 2004). De acordo com Kalueff e Cachat (2011), nos últimos anos o *zebrafish* tem sido amplamente utilizado em pesquisas neurocomportamentais.

Vale ressaltar que em revisão por Nguyen, Steward e Kalueff (in press) foram listados possíveis fenótipos comportamentais existentes no zebrafish que possibilitariam a construção de modelos animais de depressão nesta espécie, como, redução de atividade sexual, déficit de atenção, cognitivo e social, elevados níveis de cortisol e entre outros. Além disto, tais autores também enfatizam a escassez de modelos relacionados a transtorno de humor nesta espécie, embora ela possua características neurais e bioquímicas que favoreçam a criação de modelos de depressão.

Estudo I

UM PROVÁVEL MODELO DE DEPRESSÃO COM ZEBRAFISH (*Danio rerio*): O DESAMPARO APRENDIDO

Resumo

Zebrafish (*Danio rerio*) é um peixe teleósteo com ampla utilização em laboratórios e em pesquisas neurocomportamentais. Entretanto até o momento não foi reproduzido um modelo de depressão para esta espécie. O desamparo aprendido, modelo animal de depressão utilizado com roedores, é caracterizado pela dificuldade de emissão de respostas de fuga, e/ou esquiva, após prévia exposição a eventos aversivos incontroláveis. Neste trabalho buscou-se apresentar o desamparo aprendido adaptado para o zebrafish. 18 peixes, divididos igualmente em três grupos, foram submetidos a um teste de fuga 24 horas após serem expostos: a 60 choques incontroláveis (Grupo experimental), permanecer na shuttlebox por 60 minutos, sem estimulação aversiva (Grupo Controle) ou permanecer no aquário viveiro com o cardume (Grupo Fuga). Os resultados mostraram que as latências médias apresentadas pelo Grupo experimental foram maiores do que as do Grupos controle e fuga, demonstrando uma maior dificuldade para aprender a fugir da estimulação aversiva.

Palavras-chave: Desamparo aprendido, *Danio rerio*, Modelo animal

A PROBABLE MODEL OF DEPRESSION WITH ZEBRAFISH (*Danio rerio*):
LEARNED HELPLESSNESS

Abstract

The Zebrafish (*Danio rerio*) is a teleost fish widely used in neurobehavioral research; however, a depression-like model was not validated for this species hitherto. The learned helplessness is an animal model of depression, used in rodents, in which the escape/avoidance responses are markedly diminished after exposition to uncontrollable aversive stimuli. This work aims to present a learned helplessness model suitable for zebrafish. Eighteen fish were equally divided into 3 groups and then submitted to the shuttle box escape test 24h after one of the following procedures: 60 inescapable shocks (experimental group); 60 minutes of permanence in the shuttle box without electric shocks (control group); permanence in the collective tank, among the shoal (escape group). The results have shown that learning to escape the aversive stimulation was harder to the experimental group, which has shown a higher average latency when compared to the other groups (control and escape).

Key words: Learned helplessness, *Danio rerio*, Animal Model.

Um grande número de modelos de psicopatologia vem sendo desenvolvido para o zebrafish (*Danio rerio*): modelos de ansiedade, como a preferência Claro-escuro (Lockwood, Bjerke, Kobayashi, & Guo, 2004; Maximino, et al., 2010a; Maximino, Brito, Dias, Gouveia Jr, & Morato, 2010b; Maximino, Silva, Gouveia Jr, & Herculano, 2011; Piato et al., 2011); modelos para o estudo de autismo (Tropepe & Sive, 2003), de dependência de drogas (Echevarria, Hammack, Jouandot, & Toms, 2010; Gerlai, Lee, & Blaser, 2006), entre outros. Não houve até o momento o desenvolvimento de um modelo de comportamento tipo depressão para esta espécie. Os protocolos empregados até agora são baseados em exposição a situações aversivas incontroláveis crônicas, avaliando-se a produção de biomarcadores que possam estar envolvidos na ansiedade e/ou em transtornos de humor (Chakravarty, et al., 2013) deixando de lado aspectos comportamentais.

Um dos modelos animais de depressão, amplamente utilizados com roedores, é o desamparo aprendido. Neste modelo a pré-exposição do organismo a eventos incontroláveis, em geral aversivos, gera dificuldades para aprender a fugir, ou esquivar-se, de futuras situações aversivas (Maier & Seligman, 1976; Overmier & Seligman, 1967; Seligman & Maier, 1967; Seligman, 1972). A um nível comportamental, o paralelo com a depressão se daria principalmente na passividade, resultante da dificuldade do sujeito em estabelecer uma relação entre a sua resposta e o término da situação ameaçadora, após a exposição a aversivos incontroláveis (Seligman, 1977). Tal modelo apresenta valor farmacológico, dado que drogas antidepressivas (Gouveia Jr, 2001; Martin, Soubrie, & Simon, 1987; Sherman, Allers, Petty, & Henn, 1979; Sherman, Sacquitne, & Petty, 1982) em roedores, revertem (ou previnem) o desamparo aprendido. Existem apenas três experimentos de desamparo aprendido em peixes

(Brown, Smith, & Peters, 1985; Padilla, Padilla, Ketterer, & Giacalone, 1970; Nash, Martinez, Dudeck, & Davis, 1983), sendo que apenas dois deles (Padilla, Padilla, Ketterer, & Giacalone, 1970; Nash, Martinez, Dudeck & Davis, 1983) reproduziram fielmente o fenômeno. Em tais estudos foram utilizados somente *Carassius auratus* (Goldfish). Neste trabalho buscamos reproduzir desamparo aprendido em zebrafish.

MATERIAL E MÉTODO

SUJEITOS:

18 peixes adultos, *Danio rerio*, (selvagem) de sexo e idade indeterminados, provenientes de pet shops locais, mantidos por pelo menos uma semana em um tanque de 25 L, antes do experimento ter início, e com alimentação diária. O tanque apresentava filtragem constante e a água foi mantida em um pH 7, temperatura de $25^{\circ} \pm 0,1^{\circ}$ C. O ambiente climatizado foi mantido em temperatura de $24 \pm 1^{\circ}$ C, com ciclo de iluminação de 14/10 horas, luz/escuro (início as 6:00 horas).

APARATO E PROCEDIMENTO:

Uma shuttlebox (INSIGHT Equipamentos, Brasil) de acrílico transparente (26,5 x 12 x 3,8 cm) com eletrodos ligados a duas placas de aço (14,16 x 12,0 cm) por onde choque elétrico foi liberado (Figura 1), e dois pontos de leds, abaixo do piso de acrílico. Duas barreiras móveis de isopor (3,5 x 9,7 cm) serviram para isolar uma área menor no centro do equipamento (13,0 x 12,0 x 3,0 cm). O choque elétrico, oriundo de um gerador (INSIGHT Equipamentos, Mod. EP113, Brasil), foi programado a 0.7 V (AC),

com uma margem de erro do aparelho variando de 0.7 a 0.9 V (AC). A água foi mantida a um nível de 7,0 cm.

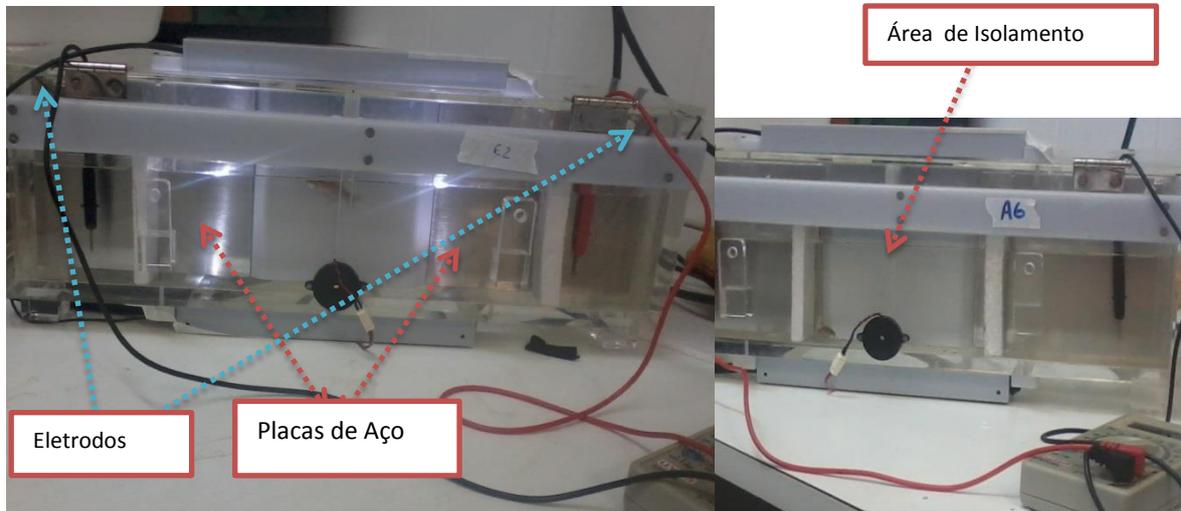


Figura 1. Shuttlebox de Acrílico (26,5 x 12 x 3,8 cm – Insight Equipamentos)

Para o presente experimento, os sujeitos foram divididos em três grupos ($n=6$) segundo tratamento experimental na Fase 1: Grupo Controle (GC), Grupo Experimental (GE) e Grupo Fuga (GF).

Fase 1: Cada sujeito do GE foi colocado na área isolada, no centro do equipamento, e recebeu 60 choques (30 seg.) aleatórios e imprevisíveis (com um tempo médio de 60 seg. entre cada choque). Cada sujeito do GC apenas permaneceu na área isolada por 60 minutos. Ao término desta fase cada sujeito, de ambos os grupos, foi mantido em aquário isolado. Os sujeitos do GF permaneceram em seus aquários tanques com o cardume, não sendo expostos a shuttlebox.

Fase 2 (Teste): Para todos os grupos, cada animal foi submetido a uma única sessão teste, 24 h após a Fase 1, composto de 30 choques (duração máxima de 30 s, média de 60 segundos entre cada choque). Após 5 minutos de exploração livre, na

shuttlebox, foi iniciada a sessão com o choque apresentado sempre que o sujeito estivesse em um dos lados do equipamento. O choque foi desligado após 30 segundos, ou quando o animal cruzasse aparato (o que ocorresse primeiro). Nesta fase os leds foram mantidos ligados. Cada apresentação do choque foi considerada como uma tentativa. Tentativas sem a ocorrência de respostas de cruzamento, foram consideradas como falhas, sendo registrada a latência (tempo para cruzar o equipamento após o choque ser ligado) de 30 segundos. A latência de cada tentativa e o número de falhas foram registradas para análise. Todas as sessões testes foram filmadas e ao final de cada sessão, em ambas as fases, a água da shuttlebox foi trocada.

ANÁLISE ESTATÍSTICA:

ANOVA de um fator, para os blocos de tentativas e as médias das tentativas falhas entre os grupos. ANOVA de medidas repetidas para diferença geral entre os blocos de tentativas entre os grupos. O nível de significância adotado foi de $p \leq 0.05$.

RESULTADOS

Na Figura 2 observa-se o desempenho dos sujeitos, dentro dos diferentes grupos no decorrer dos blocos de tentativas¹. Os sujeitos do GF apresentaram em média latências mais altas no primeiro bloco de tentativas comparado com o GC e GE. A partir do segundo bloco as latências médias do GF aumentaram em comparação com os outros grupos. A ANOVA de medidas repetidas mostra que há diferença entre os blocos de tentativas ($F[2,15]=6,9$, $p=0,01$) segundo o tratamento prévio (ausência ou presença de choque incontrolável).

¹ Para desempenho por sujeito de cada grupo (Latência Média) ver Anexo 1A.

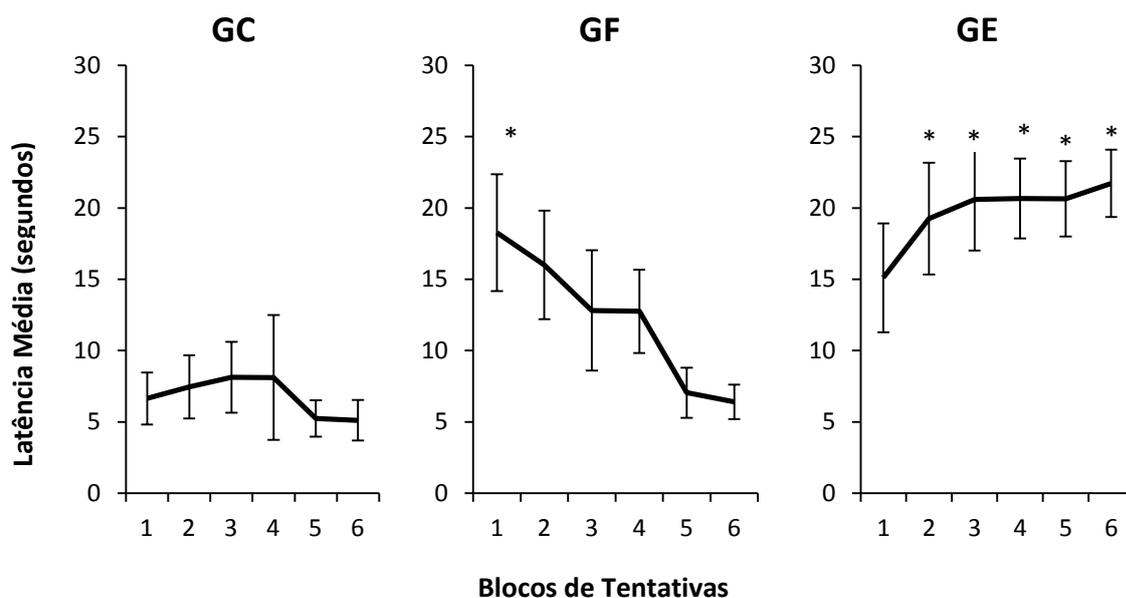


Figura 2. Latência média (segundos), dos grupos Fuga (GF), Controle (GC) e Grupo Experimental (GE), distribuídas entre blocos de tentativas. * $p < 0,05$ x Grupo Controle (Anova de um fator).

De maneira geral, nota-se na Figura 2 que os sujeitos do GE apresentaram latências maiores, no decorrer dos blocos de tentativas, levando um tempo maior para fugir do choque elétrico. Ao se comparar as latências médias do GF com o GC, grupos que não foram pré-expostos aos choques incontrolláveis, notou-se que ocorreu diferença significativa nas latências médias somente no primeiro bloco de tentativas ($F[1]=6,7$, $p=0,03$). Já quando se comparou o GC com o GE as diferenças entre as latências médias foram estatisticamente significativas no segundo ($F[1]=7,4$, $p=0,02$), terceiro ($F[1]=8,8$, $p=0,01$), quarto ($F[1]=9,3$, $p=0,01$), quinto ($F[1]=38,4$, $p=0,00$) e sexto ($F[1]=38,2$, $p=0,00$) blocos. E quando se comparou o GF com o GE as diferenças entre as latências médias foram significativas somente no quinto ($F[1]=24,3$, $p=0,00$) e sexto ($F[1]=32,0$, $p=0,00$) blocos.

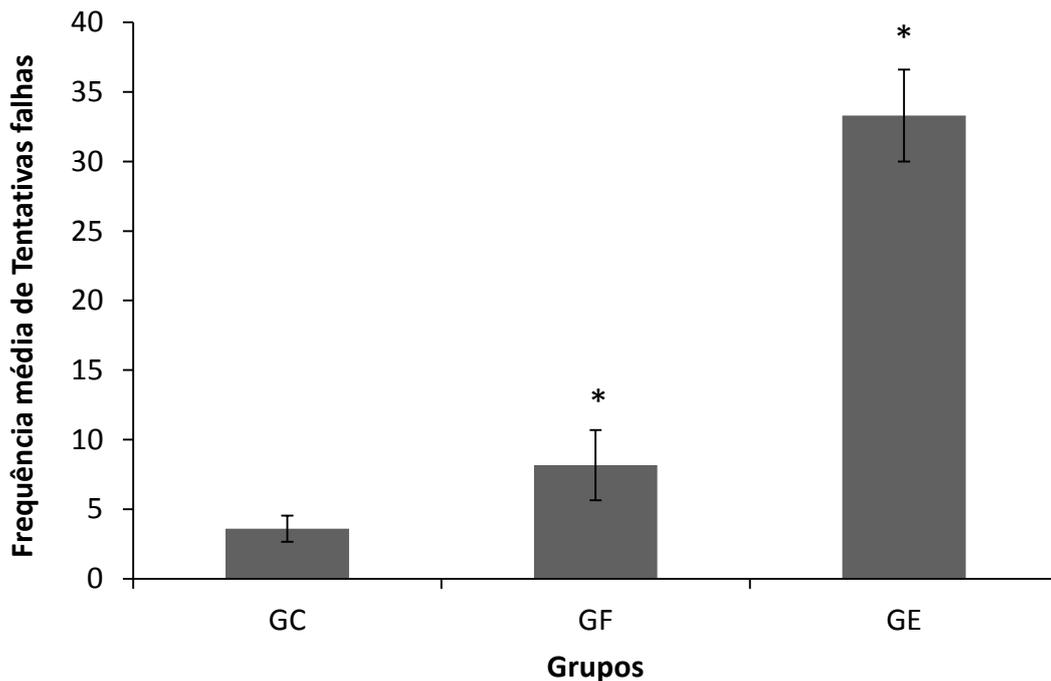


Figura 3. Frequência média de tentativas falhas apresentadas pelo Grupo Fuga (GF), Controle (GC) e Grupo Experimental (G.Exp.). * $p < 0,05$ x Grupo Controle (Anova de um fator).

Na Figura 3 é possível observar a frequência de tentativas falhas emitidas no teste de fuga para os diferentes grupos. O GE foi o que apresentou maior quantidade de falhas comparado ao GC ($F[1]=18,5$, $p=0,00$) e ao GF ($F[1]=15,0$, $p=0,00$). Entretanto a diferença encontrada entre o GF e GC foi também estatisticamente significativa ($F[1]=5,5$, $p=0,04$).

DISCUSSÃO

As altas latências apresentadas pelo G.Exp., no decorrer dos blocos de tentativas assim como o grande número de tentativas falhas, em comparação aos GC e GF, demonstraram a ocorrência de desamparo aprendido em zebrafish. Portanto, os sujeitos

do GE apresentaram dificuldades para aprender a fugir do choque elétrico após exposição prolongada a estimulação aversiva incontrolável. Tais resultados sugerem a replicação de um possível modelo de depressão com o zebrafish.

Na literatura sobre desamparo aprendido com roedores (Hunziker & Santos, 2007; Hunziker, Yamada, Manfré, & Azevedo, 2006; Seligman, Rosellini, & Kozak, 1975; Williams & Maier, 1977), uma das características de uma curva de aprendizagem, de fuga ou esquiva, consistem em altos valores de latência, nos primeiros blocos de tentativas com decréscimo gradual nos blocos finais. Tal forma de análise permite observar os efeitos da incontrolabilidade de uma situação aversiva sobre o processo da aquisição da aprendizagem. Ressalta-se que a maior parte dos estudos sobre desamparo aprendido com peixes (Padilla, Padilla, Ketterer, & Giacalone, 1970; Nash, Martinez, Dudeck, & Davis, 1983) analisou tal fenômeno a partir de médias gerais de: latência de fuga, esquivas, ou/e médias de tentativas para a primeira resposta de fuga, não levando em consideração o desempenho dos sujeitos no decorrer dos blocos de tentativas. O único trabalho de desamparo com peixes que fez uma análise do processo de aprendizagem de fuga, por blocos de tentativas, acabou por não produzir dados que demonstrassem a ocorrência do desamparo aprendido (Brown, Smith, & Peters, 1985). Isto acaba por não permitir uma comparação direta entre os dados aqui apresentados e os produzidos com goldfish.

Os dados do atual estudo também mostram que os sujeitos do GF apresentaram em média maiores latências no primeiro bloco de tentativas, sendo que quando comparado com o GE a diferença encontrada não foi significativa, mas somente quando comparado ao GC (Figura 2). No que diz respeito também às tentativas falhas os valores obtidos pelo GF foram significativos tanto em comparação com o GC quanto o GD (Figura 3), entretanto o valor de p foi maior quando comparado ao GC (0,04). Ressalta-

se que apesar do GC e o GF não terem sido pré-expostos aos choques incontrolláveis, o GF foi exposto a shuttlebox somente no dia do teste de fuga. Possivelmente o GF passou por uma situação aversiva de exposição ao equipamento, efeito novidade. Já para os sujeitos do GC, por terem sido pré-expostos ao equipamento na Fase 1, é provável que tenha ocorrido uma habituação das possíveis respostas eliciadas pelo efeito novidade. Esta habituação possivelmente facilitou, na Fase 2, as baixas latências para a emissão das respostas de fuga, nos primeiros blocos de tentativas.

No que diz respeito ao protocolo aqui adotado afirma-se que foram seguidos parâmetros semelhantes aos utilizados em pesquisas sobre desamparo aprendido com roedores (e. g. Gouveia Jr, 2001; Martin, 1991; Sweeney, Lesourd, & Gandon, 1998) e peixes (Brown, Smith & Peters, 1985; Padilla, Padilla, Ketterer, & Giacalone, 1970): Prévia exposição a uma grande quantidade de choques incontrolláveis seguida, 24 horas depois, de um teste de fuga, com metade da quantidade de choques recebidos no dia anterior. Entretanto, ressalta-se que de acordo com os dados do atual estudo é possível produzir desamparo aprendido quando os sujeitos são pré-expostos a choques incontrolláveis de baixa intensidade (0,7 a 0,9 V), mas que possuem uma longa duração (30 segundos).

Em geral, nos estudos que buscaram produzir tal fenômeno em peixes, a duração do choque elétrico foi de 5 (Padilla, Padilla, Ketterer, & Giacalone, 1970; Nash, Martinez, Dudeck & Davis, 1983) ou 10 segundos (Brown, Smith & Peters, 1985), mas somente os trabalhos que utilizaram maiores voltagens de choque, 28V (Padilla, Padilla, Ketterer, & Giacalone, 1970) e 5V (Nash, Martinez, Dudeck, & Davis, 1983), demonstraram claramente a ocorrência do desamparo aprendido. Ressalta-se que os parâmetros da estimulação aversiva adotados aqui, são baseados no trabalho de Xu, Scott-Scheiern, Kempler, e Simons (2007) que mostraram a ocorrência de esquiva ativa

em *zebrafish* abraçando como parâmetros: apresentação de 30 choques, com voltagem de 0,73 V/cm (corrente alternada) e duração máxima de 24 segundos.

Alguns trabalhos que buscaram investigar aprendizagem em *zebrafish* também chegaram a utilizar voltagens de choque elétrico, maiores do que a testada neste estudo, para produzir respostas de fuga e/ou esquivas: 4 V (Gleason & Weber, 1977) 9V (Valente, Huang, Portugues, & Engert, 2012). Dados da literatura mostram que os peixes teleósteos possuem nociceptores (Sneddon, 2002; Segner, 2012). Entretanto, até o momento existem somente sugestões sobre a ocorrência de consciência para a experiência de dor (Roques, et al., 2012). Em experimento realizado com tilápias Mosambique (Roques, et al., 2012) que buscou especificamente avaliar respostas desta espécie a padrões de estímulos dolorosos, choque elétrico na calda (15 V, 64 mA), foi observado que estimulação aversiva adotada não causou danos físicos, apesar de percebido como nocivo e doloroso. No experimento aqui empregado as únicas respostas analisadas do *zebrafish* foram às de fuga, não sendo efetivado, portanto um mapeamento das possíveis respostas eliciadas por choque elétrico nesta espécie. Por se ter utilizado uma baixa intensidade de choque por um longo período, supõe-se que tal estimulação aversiva foi suficiente apenas para causar um desconforto momentâneo no animal. Entretanto, nota-se a necessidade de maiores investigações paramétricas sobre os efeitos do choque elétrico tanto a nível comportamental quanto neuroquímico em *zebrafish*.

O presente estudo mostrou que é possível estudar características comportamentais relacionadas à depressão em *zebrafish*, a partir da generalização do desamparo aprendido para esta espécie. O próximo passo agora é validar este modelo investigando os efeitos de diferentes drogas, e seus regimes de administração, sobre este fenômeno. Porém, nota-se ainda a necessidade de maiores investigações paramétricas a fim de aprimorar o modelo de desamparo aprendido com *zebrafish*. Deve-se ressaltar a

existência de um trabalho com larvas desta espécie (Lee, et al., 2010) com o objetivo de investigar o efeitos de lesões na habenula sobre o déficits de esquiva, entretanto não reproduziu desamparo aprendido com *Danio rerio*.

Por fim, o desamparo aprendido em zebrafish além de servir como um instrumento que permite a avaliação de respostas de depressão com esta espécie poderá também ser útil para investigar estresse pós traumático. Alguns trabalhos (Maier & Watkins, 2005; Sawamura, et al., 2004; Vollmayr & Henn, 2003) utilizam o procedimento de desamparo aprendido para estudar o transtorno de estresse pós traumático. Entretanto, somente maiores investigações permitirão verificar se processos fisiológicos, bioquímicos e comportamentais do desamparo aprendido com zebrafish são paralelos a depressão e ao transtorno de estresse pós traumático.

Referências

- Brown, G.E., Smith, P.J., & Peters, R. B. (1985). Effects of escapable versus inescapable shocks on avoidance behavior in the goldfish (*Carassius auratus*). *Psychological reports*, 57, 1027-1030.
- Chakravarty, S., Reddy, B. R., Sudhakar, S. R., Saxena, S., Das, T., Meghah, V., et al. (2013). Chronic Unpredictable Stress (CUS)-Induced Anxiety and Related Mood Disorders in a Zebrafish Model: Altered Brain Proteome Profile Implicates Mitochondrial Dysfunction. *Plos One*, 8, 1-11.
- Echevarria, D. J., Hammack, C. M., Jouandot, D. J., & Toms, C. N. (2010). Does Acute Alcohol Exposure Modulate Aggressive Behaviors in the Zebrafish (*Danio rerio*), or is the Bark Worse than the Bite? *International Journal of Comparative Psychology*, 23, 62-69.
- Gerlai, R., Lee, V., & Blaser, R. (2006). Effects of acute and chronic ethanol exposure on the behavior of adult zebrafish (*Danio rerio*). *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*, 85, 752-761.
- Gleason, P. E., & Weber, S. (1977). Effect of group size on a avoidance learning in zebra fish, *Brachydanio rerio* (Pisces: *Cyprinidae*). *Animal Learning & Behavior*, 5, 213-216.
- Gouveia Jr., A. (2001). Efeitos da administração aguda de imipramina sobre o desamparo aprendido em ratos machos e fêmeas. *Acta Comportamentalia*, 9, 19-29.
- Hunziker, M. H. L., & Santos, C. V. (2007). Learned helplessness: Effects of response requirement and interval between treatment and testing. *Behavioral Processes*, 76, 183-191.

- Hunziker, M. H. L., Yamada, T. K., Manfré, F. N., & Azevedo, E. F. (2006). Variabilidade e Repetição Operantes Aprendidas após Estímulos Aversivos Incontroláveis. *Psicologia: Teoria e Pesquisa*, 22, 347-354.
- Lee, A., Mathuru, A. S., Teh, C., Kibat, C., Korzh, V., Penney, T. B., & Jesuthasan, S., (2010). The Habenula Prevents Helpless Behavior in Larval Zebrafish. *Current Biology*, 20, 2211-2216.
- Lockwood, B., Bjerke, S., Kobayashi, K., & Guo, S. (2004). Acute effects of alcohol on larval zebrafish: a genetic system for large-scale screening. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*, 77, 647-654.
- Maier, S. F., & Seligman, M. E. P. (1976). Learned helplessness: Theory and evidence. *Journal of Experimental Psychology: General*, 105, 3-46.
- Maier, S. F., & Watkins, L. R. (2005). Stressor controllability and learned helplessness: The roles of the dorsal raphe nucleus, serotonin, and corticotropin-releasing factor. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 29, 829-841.
- Martin, P. (1991). 1-(2-Pyrimidinyl)-piperazine may alter the effects of the 5-HT1A agonists in the learned helplessness paradigm in rats. *Psychopharmacology*, 104, 275-278.
- Martin, P., Soubrié, P., & Simon, P. (1987). The effects of monoamine oxidase inhibitor compared with classical tricyclic antidepressants on the learned helplessness paradigm. *Progress in Neuropsychopharmacology*, 10, 1-7.
- Maximino, C., Brito, T. M., Colmanetti, R. B., Pontes, A. A. A., Castro, H. M., Lacerda, R. I. T., et al. (2010a). Parametric analyses of anxiety in zebrafish scototaxis. *Behavioural Brain Research*, 210, 1-7.
- Maximino, C., Brito, T. M., Dias, C. A. G. M., Gouveia Jr, A., & Morato, S. (2010b). Scototaxis as anxiety-like behavior in fish. *Nature Protocols*, 5, 209-216.

- Maximino, C., Silva, A. W. B., Gouveia Jr, A., & Herculano, A. M. (2011). Pharmacological analysis of zebrafish (*Danio rerio*) scototaxis. *Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry*, 35(2), 624-641.
- Nash, S. M. Martinez, S. L. Dudeck, M. M., & Davis, S. F. (1983). Learned helplessness in goldfish under conditions of low shock intensity. *The Journal of General Psychology*, 108, 97-101.
- Overmier, J. B., & Seligman, M. E. P. (1967). Effects of inescapable shock upon subsequent escape and avoidance learning. *Journal of Comparative and Physiological Psychology*, 63 (1), 28-33.
- Padilla, A. M., Padilla, C., Ketterer, T., & Giacalone, D. (1970). Inescapable shocks and subsequent escape avoidance conditioning in goldfish, *Carassius auratus*. *Psychonomic Science*, 20, 295-296.
- Piato, A. L., Capiotti, K. M., Tamborski, A. R., Oses, J. P., Barcellos, L. G., Bogo, M., et al. (2011). Unpredictable chronic stress model in zebrafish (*Danio rerio*): Behavioral and physiological responses. *Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry*, 35, 561-167.
- Roques, A. C., Abbink, W., Chereau, G., Fourneyron, A., Spanings T., Burggraaf, D., et al. (2012). Physiological and behavioral responses to an electrical stimulus in Mozambique tilapia (*Oreochromis mossambicus*). *Fish Biological Biochemistry*, 38, 1019-1028.
- Sawamura, T., Shimizu, K., Nibuya, M., Wakizono, T., Suzuki, G., Tsunoda, T., et al. (2004). Effect of paroxetine on a model of posttraumatic stress disorder in rats. *Neuroscience Letters*, 357, 37-40.

- Segner, H. (2012). *Fish Nociception and Pain: A biological perspective*. Bern: Federal Office for Buildings and Logistics.
- Seligman, M.E.P. (1977). *Desamparo: sobre depressão, desenvolvimento e morte*. São Paulo: HUCITEC-EDUSP.
- Seligman, M. E. P. (1972). Learned Helplessness. *Annual Review of Medicine*, 23, 407-412.
- Seligman, M. E. P., & Maier, S. F. (1967). Failure to escape traumatic shock. *Journal of Experimental Psychology*, 74, 1-9
- Seligman, M. E. P. Rosellini, R. A. & Kozak, M. J. (1975). Learned helplessness in the rat: time course, immunization, and reversibility, *Journal of Comparative and Physiological Psychology*, 88, 542-547.
- Sherman, A.D., Allers, G.L., Petty, F., & Henn F.A. (1979). A neuropharmacologically-relevant animal model of depression. *Neuropharmacology*, 18, 891–893.
- Sherman, A. D., Sacquitne, J. L., & Petty, F. (1982). Specificity of learned helplessness model of depression. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*, 16, 449-454.
- Sneddon, L., (2002). Anatomical and eletrophysiological analysis of the trigeminal nerve in a teleost fish, *Oncorhynchus mykiss*. *Neuroscience Letters*, 319, 167-171.
- Sweeney, C. P. M., Lesourd, M., & Gandon J. (1998). Antidepressant-like effects of alnespirone (S 20499) in the learned helplessness test in rats. *European Journal of Pharmacology*, 345, 133–137.
- Tropepe, V., & Sive, H. L. (2003). Can zebrafish be used as a model to study the neurodevelopmental causes of autism? *Genes, Brain and Behavior*, 2, 268-181.
- Valente, A., Huang, K., Portugues, R., & Engert, F. (2012). Ontogeny of classical and operant learning behaviors in zebrafish. *Learning & Memory*, 19, 170-177.

- Vollmayr, B., & Henn, F. A. (2003). Stress models of depression. *Clinical Neuroscience Research*, 3, 245-251.
- Williams, J. L., & Maier, S. F. (1977). Transituational immunization and therapy of learned helplessness in the rat. *Journal of Experimental Psychology*, 3(3), 240-252.
- Xu, X., Scott-Scheiern, T., Kempker, L., & Simons, K. (2007). Active Avoidance Conditioning in Zebrafish (*Danio rerio*). *Neurobiology of Learning and Memory*, 87, 72-77.

Estudo II

DESAMPARO APRENDIDO COM ZEBRAFISH (*Danio rerio*): EFEITOS DA LUZ SOBRE O TESTE DE FUGA.

Resumo

Ambientes claros são naturalmente aversivos para zebrafish (*Danio rerio*) tanto que existem modelos de ansiedade para esta espécie baseado nessa preferência por escuro. Neste estudo buscou-se investigar os efeitos da luz sobre o teste de fuga, em um procedimento de desamparo aprendido com *Danio rerio*. 32 peixes adultos (*Danio rerio*) de sexo e idade indeterminados foram divididos em 4 grupos segundo o tratamento experimental, choque incontrolável (CHI) e não choque (NCH), e condição de teste com luz e sem luz. Na fase de tratamento cada sujeito do grupo CHI foi submetido a 60 choques aleatórios e imprevisíveis (0.7 a 0.9V). Já os sujeitos do NCH apenas permaneceram no aquário por 60 minutos. Na situação de teste, 24, horas após o tratamento, um grupo do CHI e NCH foram submetidos a teste de fuga com luz e os outros dois grupos, também um do CHI e outro NCH, realizaram teste sem luz. Os principais resultados mostraram que a luz é uma variável que pode funcionar como um evento estressor interferindo diretamente no processo de aprendizagem de uma resposta de fuga.

Palavras-Chave: Desamparo Aprendido, *Danio rerio*, Zebrafish, Luz, Fuga

LEARNED HELPLESSNESS WITH ZEBRAFISH (*Danio rerio*): EFFECTS OF
LIGHT ON THE ESCAPE TEST

Abstract

Light environment are naturally aversive to the zebrafish (*Danio rerio*), in such a way that there are models of anxiety for this species based on the preference for dark places. In these study it was investigated the effect of light on the escape test, in a learned helplessness procedure with *Danio rerio*. 32 adult fish (*Danio rerior*) with gender and age unknown were separated into 4 groups according to the experimental treatment, first, uncontrollable shock (USH) and no-shock (NSH), second, the test condition, with light and without light. During the treatment phase each subject of the group USH was subjected to 60 random and unpredictable electric shocks (0.7 to 0.9V). On the other hand, the subjects from the NSH only remained in the aquarium for 60 minutes. In the test situation, 24 hours after the treatment, one group of each condition USH and NSH was subjected to the escape test with light, the other two groups, one from each condition USH and NSH accomplished the test without light. The main results point to light as a variable that can work as an stressor, directly interfering in the learning process of a escape response.

Keywords: Learned helplessness, *Danio rerio*, Light, Escape.

O zebrafish (*Danio rerio*) é um peixe teleósteo que foi primeiramente usado em laboratório para investigações sobre genética molecular (Guo, 2004) e atualmente é amplamente utilizada em pesquisas neurocomportamentais (Kalueff & Cachat, 2011). Esta espécie possui preferência natural por ambientes escuros (Serra, Medalha, & Mattioli, 1999) tanto é que existe um modelo animal de ansiedade, claro-escuro (Lockwood, Bjerke, Kobayashi, & Guo, 2004; Maximino, Brito, Colmanetti, Pontes, Castro, et al., 2010a; Maximino, Brito, Dias, Gouveia Jr, & Morato, 2010b; Maximino, Silva, Gouveia Jr, & Herculano, 2011; Piato et al., 2011) para o zebrafish, baseado neste comportamento. De acordo com Maximino, Brito, Dias, Gouveia Jr, & Morato (2010b) essa preferência por ambientes escuros e por áreas protegidas ocorre devido ao processo de crypsis, ao qual a presença de melanóforos dorsais tende a minimizar a refração e a reflexão de luz, que incide sobre o animal, o que conseqüentemente reduz a sua visualização por parte dos predadores. Sendo assim, o ambiente iluminado funciona como uma situação aversiva e estressante.

Recentemente foi possível reproduzir com esta espécie um modelo de depressão comportamental, o fenômeno do desamparo aprendido (Estudo 1). Tal fenômeno tem como característica principal, a prévia exposição a uma situação de estresse incontrolável, geralmente choques elétricos imprevisíveis, que resultam em uma dificuldade posterior em apresentar uma resposta aprendida, fuga de uma situação aversiva (Maier & Seligman, 1976; Overmier & Seligman, 1967; Seligman, 1972; Seligman & Maier, 1967;). Mas, características como a intensidade da estimulação aversiva, ou a existência de outros eventos estressores, são variáveis que podem afetar diretamente a qualidade do fenômeno.

Em geral nos experimentos que buscaram reproduzir o fenômeno do desamparo aprendido, tanto com ratos (e.g. Martin, 1991; Martin, Tissier, Adrien, & Puech, 1991;

Sweeney, Lesourd, & Gandon, 1998) quanto com peixes – goldfish (*Carassius auratus*) (Brown, Smith, & Peters, 1985; Padilla, Padilla, Ketterer, & Giacalone; 1970), a luz estava presente nos testes de fuga. Mas, foi utilizada apenas como um estímulo que sinalizava a ocorrência de uma provável situação aversiva, no caso as apresentações do choque elétrico.

Apesar da luz, ou ambientes claros, ser uma estimulação estressante para o *Danio rerio* (Maximino, Brito, Dias, Gouveia Jr, & Morato, 2010b; Serra, Medalha & Mattioli, 1999), no estudo 1 o teste de fuga (fase 2) ocorreu com a presença de luz branca, mas os leds, que iluminavam o equipamento, estavam localizados no piso e refletiam em áreas restritas do aparato (Figura 1 – Estudo I), não interferindo portanto no processo de aprendizagem da resposta de fuga (cruzar o equipamento e conseqüentemente desligar o choque).

Neste trabalho será utilizado um protocolo semelhante ao do estudo 1, entretanto, os pontos de leds brancos foram fixados na parede externa do equipamento promovendo iluminação em grande parte do aparato (parte superior e central da shuttlebox). Partindo disto buscaremos investigar o efeito da luz sobre o desempenho do sujeito em um teste de fuga, 24 horas após a exposição a choques incontroláveis.

MATERIAL E MÉTODO

SUJEITOS:

32 peixes adultos, *Danio rerio*, do tipo selvagem (calda curta), de sexo e idade indeterminados, provenientes de fornecedores locais, mantidos por pelo menos uma

semana em um tanque de 25 L (antes do experimento ter início) e com alimentação diária. O tanque apresentava filtragem constante e a água foi mantida em um pH 7, com temperatura de $25^{\circ} \pm 0,1^{\circ}$ C. O ambiente climatizado foi mantido em temperatura de $24 \pm 1^{\circ}$ C, com ciclo de iluminação de 14/10 horas, luz/escuro (início as 6:00 horas).

APARATO E PROCEDIMENTO:

Duas shuttleboxes de acrílico transparente montadas em um só equipamento (INSIGHT Equipamentos, Brasil), contendo eletrodos ligados a duas placas de aço, em formato de U, por onde o choque elétrico foi liberado (Figura 1). As duas shuttleboxes, com dimensões iguais (28,0 X 7,7 X 4,0 cm), estavam dispostas em lados opostos e foram denominadas de Equipamento A e B. No equipamento A, na parede externa, estavam localizados dois pontos de led branco (variação de iluminação de 0 a 100%). Já no B na parede externa, os leds, estavam ausentes. Em ambos os equipamentos duas barreiras móveis de isopor (7,7 X 3,7 cm), serviram para isolar uma área menor no centro do aparato (13,0 X 7,7 cm). No decorrer de todas as fases do experimento a água foi mantida a um nível de 6,0 cm. O choque elétrico foi advindo de um gerador (INSIGHT Equipamentos, Mod. EP113), programado a 0,7 V (AC), com uma margem de erro do aparelho variando de 0,7 a 0,9 V (AC).

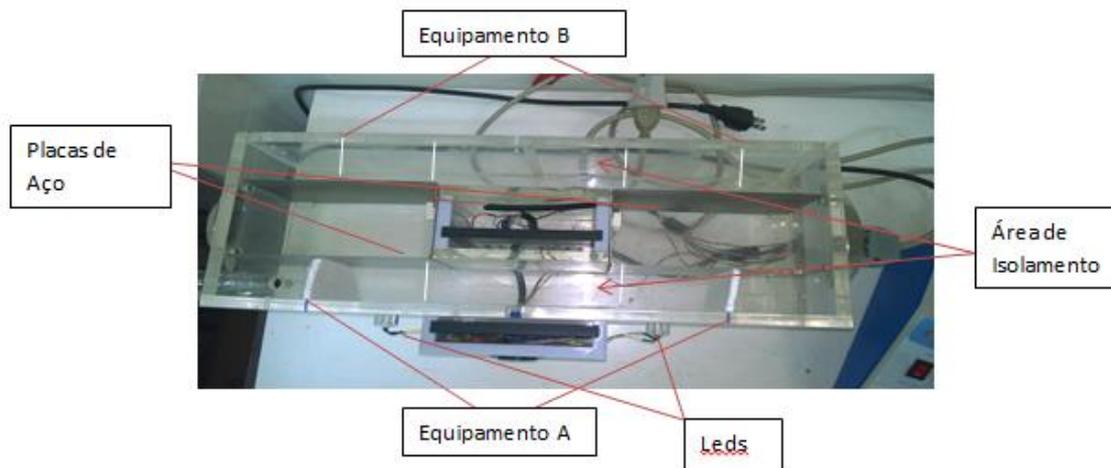


Figura 1. Shuttlebox de acrílico (28,0 X 7,7 X 4,0 cm – Insight Equipamentos)

Os sujeitos foram divididos em quatro grupos ($n=8$) segundo tratamento experimental, choque incontrolável (CHI) e não choque (NCH), na Fase 1 e condição de teste com ou sem luz na Fase 2. Grupos Controles: NCH LUZ e NCH S/LUZ; Grupos Experimentais: CHI LUZ (CHI) e CHI S/LUZ.

Fase 1 (Tratamento): Cada sujeito, do tratamento choque incontrolável, foi colocado na área isolada, pelas barreiras móveis no centro do equipamento, e recebeu 60 choques (30 seg., 0,7V a 0,9V,) aleatórios e imprevisíveis (com um tempo médio de 60 seg. entre cada choque). Já cada sujeito do tratamento não choque, apenas permaneceu na área isolada por 60 minutos. Nesta fase, realizaram-se duas sessões ao mesmo tempo, uma em cada shuttlebox e o choque foi manipulado por um software. Ao término desta fase cada sujeito foi mantido em aquário isolado (14,0 X 10,0 X 7,3 cm) com 600 ml de água (nível de 7,0 cm).

Fase 2 (Teste): Para todos os grupos, cada animal foi submetido a uma única sessão teste, 24 h após a Fase 1, composto de 30 choques manipulados manualmente (duração máxima de 30 s, 0,7 a 0,9V, média de 60 segundos entre cada choque). Nesta

fase, inicialmente cada sujeito ficou contido por 10 minutos em um Becker com 200 ml de água, a fim de avaliar se a contenção em tal aparato funcionava como um estressor para administração via hídrica de droga. Em seguida, dependendo do grupo, e conseqüentemente da condição, aos quais os sujeitos pertenciam o teste foi realizado no equipamento A ou B. Sendo que no equipamento A os leds foram mantidos ligados durante toda a sessão a uma intensidade de 100%. Após 5 minutos de exploração livre, na shuttlebox sem as barreiras móveis, foi iniciada a sessão com o choque apresentado sempre que o sujeito estivesse em um dos lados do equipamento. O choque foi desligado após 30 segundos, ou quando o animal cruzasse o aparato (o que ocorresse primeiro). Cada apresentação do choque foi considerada como uma tentativa. Tentativas onde não houvessem a resposta de cruzamento foram consideradas falhas, sendo registrada a latência (tempo para cruzar o equipamento após o choque ser ligado) de 30 segundos. A latência de cada tentativa e o número de falhas foram registradas para análise. Vale observar que diferente da Fase 1, na Fase 2 foi realizada apenas sessão com um sujeito por vez.

Todos os testes foram filmados e ao final de cada sessão (de ambas as fases), metade da água da shuttlebox foi trocada.

ANÁLISE ESTATÍSTICA:

ANOVA de um fator, para analisar os blocos de tentativas. ANOVA de medidas repetidas para diferença geral entre os blocos de tentativas entre os grupos. Teste T ou Mann-Whitney (dependendo da normalidade da amostra) para avaliar a média de tentativas falhas entre os diferentes grupos. O nível de significância adotado foi de $p \leq 0.05$.

RESULTADOS

Na Figura 2 observa-se a latência média, no decorrer dos blocos de tentativas, dos sujeitos dos grupos CHI e NCH, que passaram pela condição de teste com e sem luz². A anova de medidas repetidas mostra que as diferenças entre os blocos de tentativas entre os grupos das diferentes condições não foram estatisticamente significante, $F(12,114) = 0,5$, $p = 0,9$. Nota-se que na condição LUZ, o grupo CHI LUZ foi o que apresentou maiores latências, entretanto em comparação com o NCH LUZ não foi possível observar diferenças estatística entre as latências médias de nenhum bloco de tentativas entre ambos os grupos (Anexo 2B).

² Para dados sobre o desempenho de cada sujeito por grupo (Latência média) ver Anexo 2A.

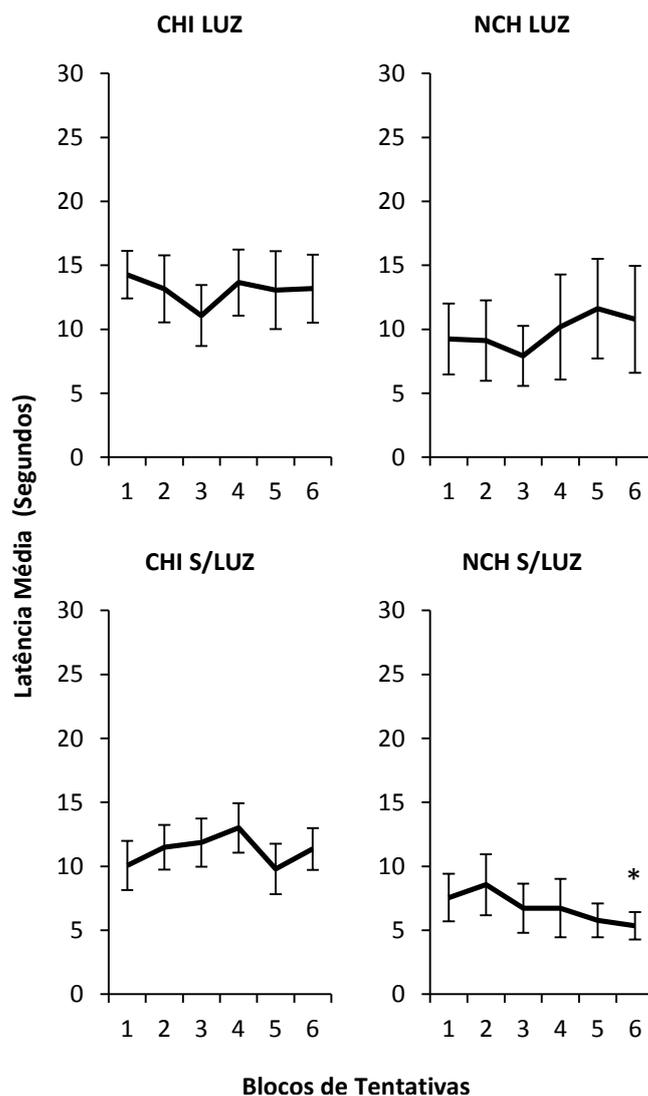


Figura 2. Latência Média (segundos) dos grupos CHI LUZ, NCH LUZ, CHI S/LUZ e NCH S/LUZ distribuídas entre blocos de tentativas, representadas com desvio padrão. * $p < 0,05$ x 6º bloco do CHI S/LUZ (Anova de um fator).

Na condição sem luz o grupo CHI apresentou maiores latências médias que o grupo NCH, a ANOVA de um fator mostrou que ocorreu diferença significativa no sexto bloco, $F(1)=9,4$, $p=0,01$. Vale ressaltar que no grupo NCH há uma tendência à diminuição das latências nos decorrer dos blocos de tentativas, diferente do grupo CHI. Já nos grupos da condição com luz não ocorre nenhuma tendência a diminuição das latências médias, mas sim uma possível estabilidade (Figura 2). Não ocorreu diferença

significativa entre as latências médias, de nenhum bloco de tentativas, entre os grupos: CHI LUZ e CHI S/LUZ; e NCH LUZ e NCH S/LUZ (Anexo 2B).

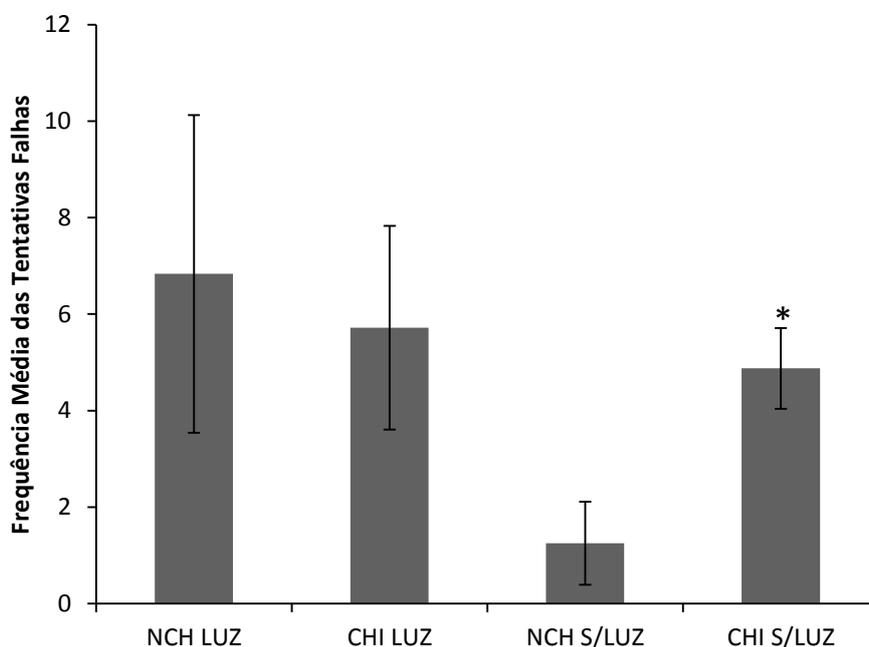


Figura 3. Frequência média de tentativas falhas emitidas pelos sujeitos dos grupos NCH LUZ, CHI LUZ, NCH S/LUZ e CHI S/LUZ. * $p < 0,05$ x NCH S/LUZ (Mann-Whitney).

Ao se analisar as tentativas falhas (Figura 3) observa-se que na condição sem luz o grupo que foi exposto ao choque incontrolável (CHI) apresentou mais falhas que o grupo NCH, $U=55,5$; $p= 0,010$. Entretanto, na condição com luz notou-se que a diferença entre ambos os grupos não foi estatisticamente significante (Anexo 2B). Observou-se também que não foi estatisticamente significante a comparação entre os grupos: NCH S/Luz com NCH LUZ e CHI LUZ com CHI S/Luz (Anexo 2B).

DISCUSSÃO

As altas latências médias, apresentadas pelos grupos na condição luz e conseqüentemente a falta de diferença significativa entre os blocos de tentativas, somado: à tendência decrescente nas latências médias do NCH S/LUZ; à diferença estatística encontrada entre este grupo e o CHI S/LUZ, no último bloco de tentativa (latência média) e tentativas falhas, sugerem que a luz é uma variável que pode interferir na aprendizagem de uma resposta de fuga do choque elétrico, funcionando como um estressor adicional.

Levando em consideração que o *Danio rerio* tem uma preferência natural por ambientes escuros e ambientes claros funcionam como ansiogênicos (Maximino, Brito, Dias, Gouveia Jr, & Morato, 2010b; Serra, Medalha, & Mattioli, 1999) no atual experimento, é possível que os testes na condição luz tenham induzido uma quantidade maior de respostas ansiosas, dificultando a exploração do equipamento e conseqüentemente a aprendizagem da resposta de fuga. Etologicamente, em ambientes claros o animal estaria mais exposto a possíveis predadores.

Estudos que utilizaram o protocolo do claro-escuro com zebrafish, em geral mostraram que quando os animais encontram-se no compartimento claro (do aquário claro-escuro) ocorre um aumento de comportamentos ditos ansiosos, como freezing, movimentos erráticos (e.g. Maximino, Brito, Batista, Herculano, Morato, & Gouveia Jr., 2010). Entretanto, vale ressaltar que neste experimento não foram analisados padrões comportamentais ansiosos, ficando a necessidade de futuros estudos que busquem explorar tais padrões em procedimento de desamparo aprendido com zebrafish.

Observou-se também que além da luz ter funcionado como um possível ansiogênico, a prévia contenção em um Becker com 200 ml de água, por 10 min. na fase 2, também pode ter funcionado como estressor adicional. No estudo 1, em que não houve contenção em um Becker, obteve-se uma diferença estatística entre os grupos nos blocos de tentativas. Já no atual experimento obteve-se diferença significativa somente no ultimo bloco de tentativas entre os grupos que não foram expostos a luz. Dados da literatura (Pagnussat, et. al, 2013) mostram que zebrafish testados individualmente, em diferentes protocolos comportamentais (claro-escuro, esquiiva inibitória) possuem níveis de cortisol maior do que os testados em trios. Já Blazina e Lara (2013) isolaram zebrafish por 21 dias sendo que no 21º dia foram realizados testes comportamentais (análise de interação grupal). Os resultados de Blazina e Lara (2013) mostraram que após o isolamento de 21 dias os animais manifestaram comportamentos dos tipos depressivos, que no caso foram caracterizados como isolamento do grupo. Maximino (2011) analisou os efeitos de diferentes estressores ambientais, entre eles o confinamento, em respostas nociceptivas de zebrafish a ácido acético. Os animais foram isolados por 30 min em 8% de um aquário, que possuía como área total (10x10x20 cm) e em seguida foram transferidos para o tanque de observação (Maximino, 2011). Os principais resultados com o grupo controle mostraram que o confinamento aumentou o tempo em que os sujeitos permaneceram no fundo do aquário e o tempo em que permaneceram em freezing, mostrando que a restrição evocou respostas de estresse (Maximino, 2011).

A contenção em um Becker com 200 ml de água, utilizado aqui, foi de apenas 10 minutos. Vale lembrar que após a fase de tratamento (Fase 1), cada sujeito foi mantido em isolamento antes do teste, além disso, o teste ocorria em um ambiente diferente da fase anterior. Portanto, suspeita-se que além da luz, o isolamento após a fase 1 e a

exposição ao ambiente novo (equipamento de teste), o isolamento no Becker com uma baixa quantidade de água foi mais um evento estressor que teve um efeito somatório aos já existentes, o que possivelmente acabou também interferindo na aquisição da resposta de fuga. Maiores testes isolando a variável, contenção em Becker, são necessários para avaliar possíveis marcadores bioquímicos e padrões comportamentais de estresse e ansiedade, dentro do protocolo de desamparo aprendido.

Vale ressaltar que, apesar de aparentemente o isolamento em Becker parecer ser uma situação geradora de estresse, dados de nosso laboratório mostraram que este é um método mais eficaz para administração de drogas, via hídrica, em protocolos de desamparo aprendido quando comparado à via de administração intraperitoneal (Anexo 3). De acordo com Stewart et. al. (2011) a injeção via intraperitoneal é um dos regimes de administração que garante maior precisão, entretanto é mais estressante do que a imersão.

Muitos dos estudos sobre o fenômeno do desamparo aprendido, em geral com roedores, acabaram por gerar resultados contraditórios devido a questões metodológicas (Hunziker, 2003). Segundo Willner (1985) tais resultados inconsistentes deixam vagos à relação entre desamparo aprendido e depressão. Neste estudo pode-se observar que as variáveis luz e contenção em um Becker, durante e antes do teste de fuga, respectivamente, possivelmente afetaram o desamparo aprendido produzido com zebrafish. Os dados aqui produzidos contribuem para elucidar o fenômeno. Entretanto ainda existem muitas variáveis paramétricas a serem investigadas e que podem interferir diretamente na ocorrência do fenômeno, como a quantidade de choques incontroláveis e o tempo decorrente entre o tratamento e o teste.

Referências

- Brown, G.E., Smith, P.J., & Peters, R. B. (1985). Effects of escapable versus inescapable shocks on avoidance behavior in the goldfish (*Carassius auratus*). *Psychological reports*, 57, 1027-1030.
- Blazina, A. N., & Lara, D. R.(2013). Análise dos efeitos protetores da fluoxetina na indução de depressão por isolamento em Zebrafish (*Danio Rerio*) [Resumo]. *Seminário interno de avaliação científica*, PUC, RS. Retirado em 7 de maio de 2014 de <http://ebooks.pucrs.br/edipucrs/anais/SIC/XIV/XIV/47.pdf>
- Guo, s. (2004). Linking genes to brain, behavior and neurological diseases: What can we learn from zebrafish?. *Genes, Brain and Behavior*, 3,63-74.
- Hunziker, M. H. L. (2003). Desamparo Aprendido. *Tese de Livre-Docência*, Instituto de Psicologia, Universidade de São Paulo, São Paulo.
- Kalueff, A. V., & Cachat, J. M. (Eds.). (2011). *Zebrafish neurobehavioral protocols*. New Orleans: Humana Press.
- Lockwood, B., Bjerke, S., Kobayashi, K., & Guo, S. (2004). Acute effects of alcohol on larval zebrafish: a genetic system for large-scale screening. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*, 77, 647-654.
- Maier, S. F., & Seligman, M. E. P. (1976). Learned helplessness: Theory and evidence. *Journal of Experimental Psychology: General*, 105, 3-46.
- Martin, P. (1991). 1-(2-Pyrimidinyl)-piperazine may alter the effects of the 5-HT1A agonists in the learned helplessness paradigm in rats. *Psychopharmacology*, 104, 275-278.

- Martin, P., Tissier, M. H., Adrien, J., & Puech, A. J. (1991). Antidepressant-like effects of buspirone mediated by the 5-HT_{1A} post-synaptic receptors in the learned helplessness paradigm. *Life Sciences*, *48*, 2505-2511.
- Maximino, C. (2011). Modulation of nociceptive-like behavior in zebrafish (*Danio rerio*) by environmental stressors. *Psychology & Neuroscience*, *4*(1), 149-155.
- Maximino, C., Brito, T. M., Batista, A. W. S., Herculano, A. M., Morato, S., Gouveia Jr. (2010). Measuring anxiety in zebrafish: A critical review. *Behavioural Brain Research*, *214*, 157-171.
- Maximino, C., Brito, T. M., Colmanetti, R. B., Pontes, A. A. A., Castro, H. M., Lacerda, R. I. T., et al. (2010a). Parametric analyses of anxiety in zebrafish scototaxis. *Behavioural Brain Research*, *210*, 1-7.
- Maximino, C., Brito, T. M., Dias, C. A. G. M., Gouveia Jr, A., & Morato, S. (2010b). Scototaxis as anxiety-like behavior in fish. *Nature Protocols*, *5*, 209-216.
- Maximino, C., Silva, A. W. B., Gouveia Jr, A., & Herculano, A. M. (2011). Pharmacological analysis of zebrafish (*Danio rerio*) scototaxis. *Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry*, *35*(2), 624-641.
- Overmier, J. B., & Seligman, M. E. P. (1967). Effects of inescapable shock upon subsequent escape and avoidance learning. *Journal of Comparative and Physiological Psychology*, *63* (1), 28-33.
- Padilla, A. M., Padilla, C., Ketterer, T., & Giacalone, D. (1970). Inescapable shocks and subsequent escape avoidance conditioning in goldfish, *Carassius auratus*. *Psychonomic Science*, *20*, 295-296.

- Pagnussat, N., Piato, A. L., Schaefer, I. C., Blank, M., Tamborski, A. R., Guerim, L. D., et al. (2013). One for all and all for one: The importance of shoaling on behavioral and stress responses in zebrafish. *Zebrafish*, *10*, 2013.
- Piato, A. L., Capiotti, K. M., Tamborski, A. R., Oses, J. P., Barcellos, L. G., Bogo, M., et al. (2011). Unpredictable chronic stress model in zebrafish (*Danio rerio*): Behavioral and physiological responses. *Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry*, *35*, 561-167.
- Seligman, M. E. P. (1972). Learned Helplessness. *Annual Review of Medicine*, *23*, 407-412.
- Seligman, M. E. P., & Maier, S. F. (1967). Failure to escape traumatic shock. *Journal of Experimental Psychology*, *74*, 1-9.
- Serra, E. L., Medalha, C. C., & Mattioli, R. (1999). Natural preference of zebrafish (*Danio rerio*) for a dark environment. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, *32*, 1551-1553.
- Stewart et. al. (2011). Intraperitoneal injection as a method of psychotropic drug delivery in adult zebrafish, *Neuromethods*, *51*, 169-179.
- Sweeney, C. P. M., Lesourd, M., & Gandon J. (1998). Antidepressant-like effects of alnespirone (S 20499) in the learned helplessness test in rats. *European Journal of Pharmacology*, *345*, 133–137.
- Willner, P. (1985). *Depression: A psychobiological synthesis*. New York: Wiley.

Estudo III

EFEITOS DA ADMINISTRAÇÃO AGUDA DE IMIPRAMINA SOBRE O DESAMPARO APRENDIDO COM ZEBRAFISH (*Danio rerio*).

Resumo

O desamparo aprendido teve sua relação fortalecida com a depressão a partir dos estudos com antidepressivos revertendo ou atenuando o fenômeno. A imipramina está entre as drogas mais testadas neste modelo, com roedores. Este trabalho teve por objetivo avaliar o efeito da imipramina, em regime agudo, sobre o desamparo aprendido com zebrafish. 48 peixes adultos, *Danio rerio*, foram divididos em seis grupos (n=8) segundo o tratamento experimental, choque incontrolável (CHI) e não choque (NCH), e a concentração de imipramina na fase de teste, 0,0 mg/l, 1,0 mg/l e 2,0 mg/l. Na fase de tratamento cada sujeito do grupo CHI recebeu 60 choques (0.7 – 0.9V) aleatórios e imprevisíveis, enquanto que cada sujeito do NCH apenas permanecia no equipamento por 60 minutos. Na segunda fase, 24 horas após o tratamento, cada sujeito foi imerso por 10 minutos a concentração de imipramina, correspondente ao grupo ao qual pertencia, e em seguida foi submetido a um teste de fuga, com 30 choques. Os principais resultados mostraram que a imipramina, em regime agudo, nas doses aqui utilizadas não revertem nem atenuaram o desamparo aprendido em zebrafish, mas interferiram na aquisição da resposta de fuga.

Palavras-chave: Desamparo aprendido, *Danio rerio*, imipramina.

THE EFFECT OF ACUTE IMIPRAMINE ADMINISTRATION ON LEARNED
HELPLESSNESS WITH ZEBRAFISH (*Danio rerio*)

Abstract

Learned helplessness had a stronger connection with depression since the studies with antidepressant drugs, which reduced or reverted the phenomenon. Imipramine is among the most tested drugs in this model with rodents. This study aimed at evaluating the effect of imipramine, applied acutely, on learned helplessness with zebrafish. 48 adult fish, *Danio rerio*, were separated into six groups (n=8), first, according to the experimental treatment, uncontrollable shock (USH) and no-shock (NSH); second according to the concentration of imipramine in the test phase, 0.0 mg/l, 1.0 mg/l, and 2.0 mg/l. In the treatment phase each subject from the USH received 60 random and unpredictable electric shocks (0.7 – 0.9V), while each subject from NSH only remained in the equipment for 60 minutes. In the second phase, 24 hours after the treatment, each subject was immersed for 10 minutes in the concentration of imipramine corresponding to its group, in the continuance they were subjected to a escape test with 30 shocks. The main results showed that imipramine, in acute regimen, in the doses used here, did not revert nor attenuated the learned helplessness in zebrafish, however interfered in the acquisition of the escape response.

Key words: Learned Helplessness, *Danio rerio*, Imipramine.

O desamparo aprendido é um procedimento, ou modelo animal de depressão, caracterizado pela dificuldade em aprender a fugir, ou esquivar-se, de situações aversivas após uma prévia exposição a eventos aversivos incontroláveis (Maier & Seligman, 1976; Overmier & Seligman, 1967; Seligman & Maier, 1967; Seligman, 1972). A sensibilidade do desamparo aprendido aos agentes farmacológicos é avaliada a partir da reversão, ou atenuação, do fenômeno, após a administração da droga, mensurada a partir da latência de fuga, ou esquiva, e quantidade de tentativas falhas. De acordo com Hunziker (1993), a ação de antidepressivos no desamparo aprendido (revertendo-o, ou prevenindo-o) acabou por contribuir para o fortalecimento da relação deste fenômeno com a depressão. Dentre as inúmeras drogas testadas encontram-se a imipramina (Gouveia Jr, 2001; Martin, Soubrie, & Simon, 1987; Sherman, Allers, Petty, & Henn, 1979; Sherman, Sacquitne, & Petty, 1982).

A imipramina é um antidepressivo tricíclico que age inibindo a recaptação de noradrenalina (NA) e bloqueando o transporte de serotonina (5-HT) aumentando a concentração de tais aminas na fenda sináptica (Baldessarini, 2006). Além disso, age como antagonistas competitivos dos receptores colinérgicos, histamínicos H1 e adrenérgicos $\alpha 1$ e $\alpha 2$. A imipramina possui uma seletividade na inibição da captura de 5-HT (Baldessarini, 2006; Ciraulo, Tsurlinik-Barts, Shader, & Greenblatt, 2004; Moreno, Moreno, & Soares, 1999).

No procedimento de desamparo aprendido o antidepressivo imipramina foi amplamente empregado (Gambarana, Ghiglieri, Tagliomonte, D'Alessandro, & Montis, 1995; Geoffroy, Tvede, Christensen, & Schou, 1991; Gouveia Jr, 2001; Itoh, Tokumura, & Abe, 2004; Martin & Puech, 1991; Martin, Soubrier, & Simon, 1987; Real, Mico, Maldonato, Roques, & Gibert-Rahola, 1995; Sherman, Allers, Petty, & Henn, 1979;

Sherman, Sacquitne, & Petty, 1982; Sweeney, Lesourd, & Gandon, 1998; Takamori, Yoshida, & Okuyama, 2001). Nestes estudos esta droga foi administrada em sua grande maioria em regime subcrônico – três a cinco dias (Besson, Privat, Eschaliere, & Fialip, 1999; Martin & Puech, 1991; Real, Mico, Maldonato, Roques, & Gibert-Rahola, 1995; Sherman, Allers, Petty, & Henn, 1979; Sherman, Sacquitne, & Petty, 1982; Sweeney, Lesourd, & Gandon, 1998; Takamori, Yoshida & Okuyama, 2001) e crônico (Gambarana, Ghiglieri, Tagliomonte, D'Alessandro & Montis, 1995; Geoffroy, Tvede, Christensen e Schou, 1991; Martin, Soubrier, & Simon, 1987; Itoh, Tokumura, & Abe, 2004), revertendo o fenômeno, sendo que foram poucos os experimentos em que o efeito antidepressivo, em tais regime, não foi observado (Besson, Privat, Eschaliere e Fialip, 1999; Geoffroy, Tvede, Christensen, & Schou, 1991; Itoh, Tokumura, & Abe, 2004).

No que diz respeito à administração aguda, além deste regime ter sido pouco utilizado (Sherman, Allers, Petty, & Henn, 1979; Gouveia Jr., 2001; Itoh, Tokumura, & Abe, 2004), em geral, a reversão do desamparo aprendido acabou sendo influenciado por variáveis como dose e o sexo do animal (Gouveia Jr. 2001). Alguns dados com roedores mostram que a imipramina, em regime agudo, foi capaz de atenuar o desamparo aprendido (Gouveia Jr., 2001). Vale ressaltar que em seres humanos a ação antidepressiva da imipramina tem um início lento, levando em média de uma a duas semanas (Rang & Dale, 2007). Portanto, tais dados com roedores acabam por discordar da ação terapêutica em humanos.

Levando em consideração: a) a reprodução do fenômeno do desamparo aprendido, com zebrafish (*Danio rerio*) (estudo I); b) a contenção prévia em um Becker com 200 ml de água, como um evento menos estressor, para administração de droga quando comparado a injeção via intraperitoneal (Anexo 3), estudo II; e c) a relação

historicamente fortalecida na literatura entre a ação dos antidepressivos no fenômeno e a patologia da depressão, este estudo teve por objetivo investigar os efeitos da administração aguda da imipramina sobre o desamparo aprendido em zebrafish. Deve-se ressaltar que neste experimento, os dados dos grupos que não receberam a droga (grupos controles), são os mesmos dados dos grupos que foram submetidos à condição sem luz no estudo II.

MATERIAIS E MÉTODO

SUJEITOS:

48 peixes adultos, *Danio rerio*, selvagem (calda curta), de sexo e idade indeterminados, provenientes de pet shops locais, mantidos por pelo menos uma semana em um tanque de 25 L (antes do experimento ter início), com alimentação diária. O tanque apresentava filtragem constante e a água foi mantida em um pH 7, com temperatura de $25^{\circ} \pm 0,1^{\circ}$ C. O ambiente climatizado foi mantido em temperatura de $24 \pm 1^{\circ}$ C, com ciclo de iluminação de 14/10 horas, luz/escuro (início as 6:00 horas).

TRATAMENTO FARMACOLÓGICO

As concentrações de imipramina (0,0 mg/L, 1,0 mg/L, e 2,0 mg/L [Magno, 2012]) foram dissolvidas em água destilada até a obtenção de uma solução homogênea, formando uma solução mãe, que foi embalada em um frasco escuro e mantida sob refrigeração, a fim de evitar fotodegradação. A partir da solução mãe foi realizada a administração da droga, por via hídrica, onde cada sujeito foi submergido em um Becker, com 200 ml de água do aquário ao qual o animal se encontrava mais a

concentração da droga a ser testada. Cada sujeito permaneceu neste Becker por 10 min (Magno, 2012).

APARATO E PROCEDIMENTO:

Duas shuttleboxes de acrílico transparente montada em um só equipamento (INSIGHT Equipamentos, Brasil), contendo eletrodos ligados a duas placas de aço, em formato de U, por onde o choque elétrico foi liberado (Figura 1-Estudo II). As duas shuttleboxes, com dimensões iguais (28,0 X 7,7 X 4,0 cm), estavam dispostas em lados opostos e foram denominadas de Equipamento A e B. Em ambos os equipamentos duas barreiras móveis de isopor (7,7 X 3,7 cm), serviram para isolar uma área menor no centro do aparato (13,0 X 7,7 cm). No decorrer de todas as fases do experimento a água foi mantida a um nível de 6,0 cm. O choque elétrico foi advindo de um gerador (INSIGHT Equipamentos, Mod. EP113), programado a 0.7 V (AC), com uma margem de erro do aparelho variando de 7 a 9 V (AC).

Os sujeitos foram divididos em seis grupos ($n=8$) segundo tratamento experimental, choque incontrolável (CHI) e não choque (NCH), na Fase 1 e a concentração da imipramina na Fase 2. Grupos Controles: 0,0 mg/L CHI e 0,0 mg/L NCH; Grupos Experimentais: 1,0 mg/L CHI; 1,0 mg/L NCH; 2,0 mg/L CHI; e 2,0 mg/L NCH.

Fase 1 (Tratamento): Cada sujeito, do tratamento choque incontrolável, foi colocado na área isolada, pelas barreiras móveis no centro do equipamento, e recebeu 60 choques (30 seg., 0.7V a 0.9V,) aleatórios e imprevisíveis (com um tempo médio de 60 seg. entre cada choque). Já cada sujeito do tratamento não choque, apenas permaneceu na área isolada por 60 minutos. Nesta fase, realizaram-se duas sessões ao mesmo tempo, uma em cada shuttlebox e o choque foi manipulado automaticamente por

um software. Ao término desta fase cada sujeito foi mantido em aquário isolado (14,0 X 10,0 X 7,3 cm) com 600 ml de água (nível de 7,0 cm).

Fase 2 (Teste): 24 horas, após a Fase 1 foi realizada uma sessão de teste de fuga. Inicialmente, cada sujeito foi exposto, por 10 min. a concentração de imipramina, referente ao grupo ao qual fazia parte. Em seguida cada animal foi colocado na shuttlebox B, sem as barreiras móveis, para cinco minutos de livre exploração. Após o período de exploração foram liberados manualmente 30 choques (duração máxima de 30 s, 0.7 a 0.9V, média de 60 segundos entre cada choque). O choque foi desligado após 30 segundos, ou quando o animal atravessasse o aparato (o que ocorresse primeiro). Cada apresentação do choque foi considerada como uma tentativa. Tentativas onde não houvesse a resposta esperada, de cruzamento, foram consideradas como falhas, sendo registrada a latência (tempo para cruzar o equipamento após o choque ser ligado) de 30 segundos. A latência de cada tentativa e o número de falhas foram registradas para análise.

Todos os testes foram filmados e ao final de cada sessão (de ambas as fases), metade da água da shuttlebox foi trocada.

ANÁLISE ESTATÍSTICA:

ANOVA de um fator, para analisar os blocos de tentativas. ANOVA de medidas repetidas para diferença geral entre os blocos de tentativas entre os grupos. Teste T ou Mann-Whitney para avaliar os valores médios das tentativas falhas entre os diferentes grupos. O nível de significância adotado foi de $p \leq 0.05$.

RESULTADOS

Na Figura 1 é possível observar os efeitos das diferentes doses de imipramina segundo o tratamento a que cada grupo foi submetido, choque incontrolável ou não choque³. A anova de medidas repetidas mostra que não há diferença, $F(20,166)=1,3$, $p=0,2$, entre os blocos de tentativas, dentro os grupos. Ao compararmos os grupos controles, notou-se que foi significativa a diferença entre as latências médias no sexto, $F(1)=9,4$, $p=0,01$, bloco. Ressalta-se a existência de uma tendência decrescente nos valores médios da latência, no decorrer dos blocos de tentativas do grupo 0,0 mg/l NCH, enquanto que no grupo 0,0 mg/l CHI, apresentou uma tendência a estabilidade da latência no decorrer dos blocos. A partir de tais dados, supõe-se que o grupo que não recebeu choque incontrolável, com o passar dos blocos, aprendeu a fugir do choque, diferente do grupo que foi exposto ao choque incontrolável.

Com relação aos grupos que receberam 1,0 mg/l de imipramina antes do teste de fuga (1,0 mg/l NCH e 1,0 mg/l CHI), ressalta-se que não foi encontrada nenhuma diferença significativa entre os blocos de ambos os grupos (Anexo 4B). Também não houve diferença estatística entre nenhum bloco dos grupos 1,0 mg/l CHI e 0,0 mg/l CHI (Anexo 4B) entretanto ocorreu diferença significativa entre o sexto bloco do 1,0 mg/l NCH e 0,0 mg/l NCH, $F(1)=11,3$, $p=0,00$, (Figura 5).

Entre os grupos que receberam uma dose de 2,0 mg/L de imipramina (Figura 1) as diferenças existentes entre ambos grupos não foram significativas em nenhum bloco de tentativa (Anexo 4B). Entretanto, ocorreu diferença estatística nas latências médias entre o último bloco de tentativas do 2,0 mg/l NCH e 0,0 mg/l NCH, $F(1)=6,1$, $p=0,03$, e entre quarto bloco dos grupos 2,0 mg/l CHI e 0,0 mg/l CHI, $F(1)=6,3$, $p=0,02$.

³ Para ver o desempenho de cada sujeito por grupo (Latência média), ir ao Anexo 4A.

É possível observar na Figura 1 que as latências médias dos grupos que não foram expostos ao choque incontrolável (NCH) e que receberam 1,0 e 2,0 mg/l de Imipramina apresentam uma curvatura em forma de U. Começando com altas latências nos primeiros blocos, diminuído em seguida e aumentando as latências médias novamente. Ao comparar-se estatisticamente ambos os grupos (1,0 mg/l NCH e 2,0 mg/l NCH) notou-se que a diferença entre latências dos diferentes blocos não foram significativas (Anexo 4B). Também não foram significativas as diferenças entre as latências médias dos blocos dos grupos 1,0 mg/l CHI e 2,0 mg/l CHI (Anexo 4B).

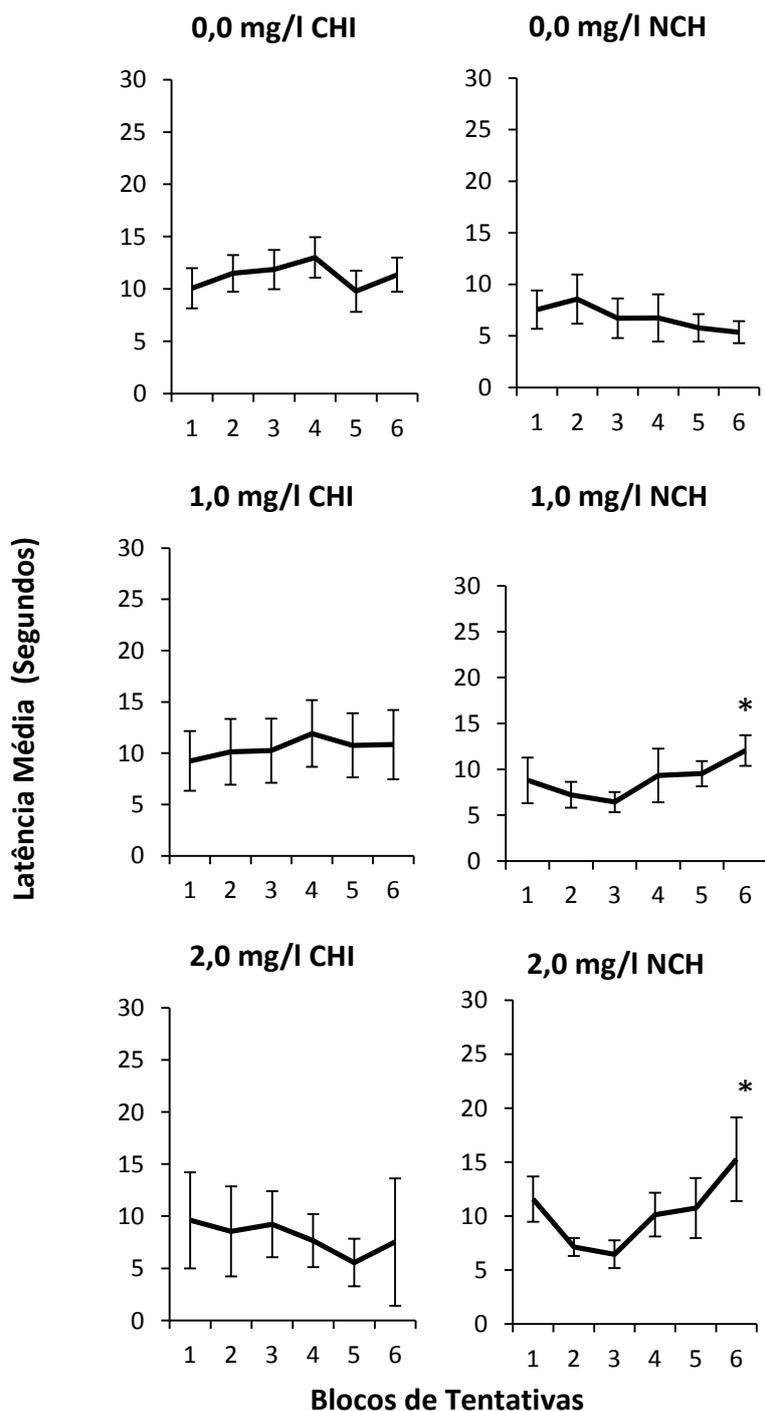


Figura 1. Latência média (segundos), distribuídas entre blocos de tentativas, dos grupos indicando diferentes doses de imipramina, segundo o tipo de tratamento: 0,0 mg/l NCH; 0,0 mg/l CHI; 1,0 mg/l CHI; 1,0 mg/l NCH; 2,0 mg/l NCH e 2,0 mg/l CHI. * $p < 0,05$ x 6º bloco do 0,0 mg/l NCH (Anova de um fator).

Ao se analisar o total de tentativas falhas (Figura 2), por grupos, nota-se que os grupos 0,0 mg/l CHI, 1,0 mg/l CHI e 2,0 mg/l NCH, foram os que apresentaram maiores quantidades de falhas para fugir do choque elétrico, na sessão teste.

A análise estatística mostrou que foi possível obter diferença significativa entre as tentativas falhas dos seguintes grupos: 0,0 mg/l. CHI e 0,0 mg/l NCH, $U=55,5$; $p=0,010$; 2,0 mg/l. NCH e 2,0 mg/l CHI, $t(10)=2,295$, $p=0,038$; e 2,0 mg/l. CHI e 0,0 mg/l CHI, $U=59,500$; $p=0,002$.

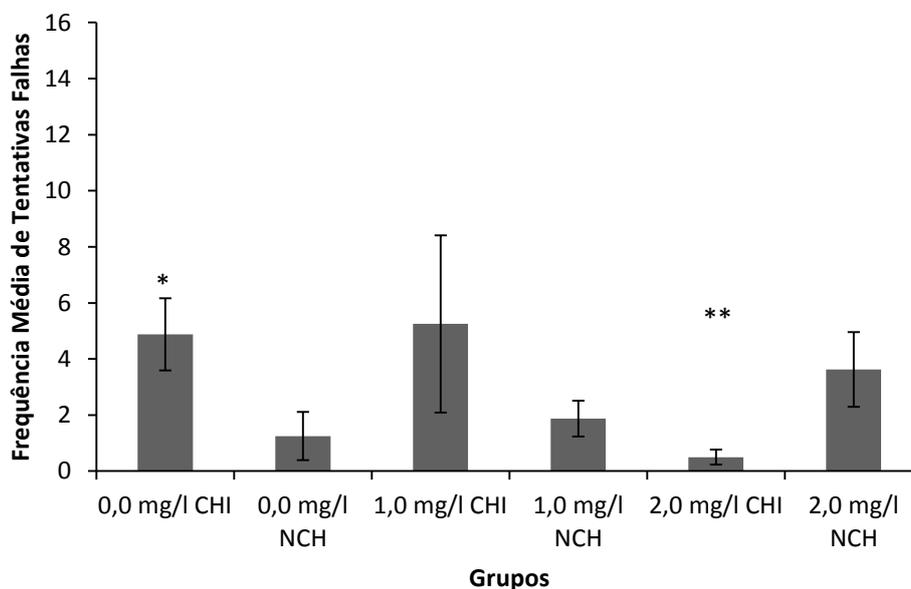


Figura 2. Frequência média de tentativas falhas dos grupos 0,0 mg/l NCH, 0,0 mg/l CHI, 1,0 mg/l CHI, 1,0 mg/l NCH, 2,0 mg/l NCH e 2,0 mg/l CHI. * $p<0,05$ x 0,0 mg/l NCH (Mann-Whitney), ** $p<0,05$ x 2,0 mg/l NCH (Teste T).

Entretanto, não se obteve diferença estatística ao compararem-se as tentativas falhas dos grupos: 1,0 mg/l CHI e 1,0 mg/l NCH; 1,0 mg/l CHI e 0,0 mg/l CHI; 1,0 mg/l. NCH e 0,0 mg/l. NCH; 2,0 mg/l NCH e 0,0 mg/l NCH; 1,0 mg/l CHI e 2,0 mg/l CHI; e 1,0 mg/l NCH e 2,0 mg/l. NCH (Anexo 4B).

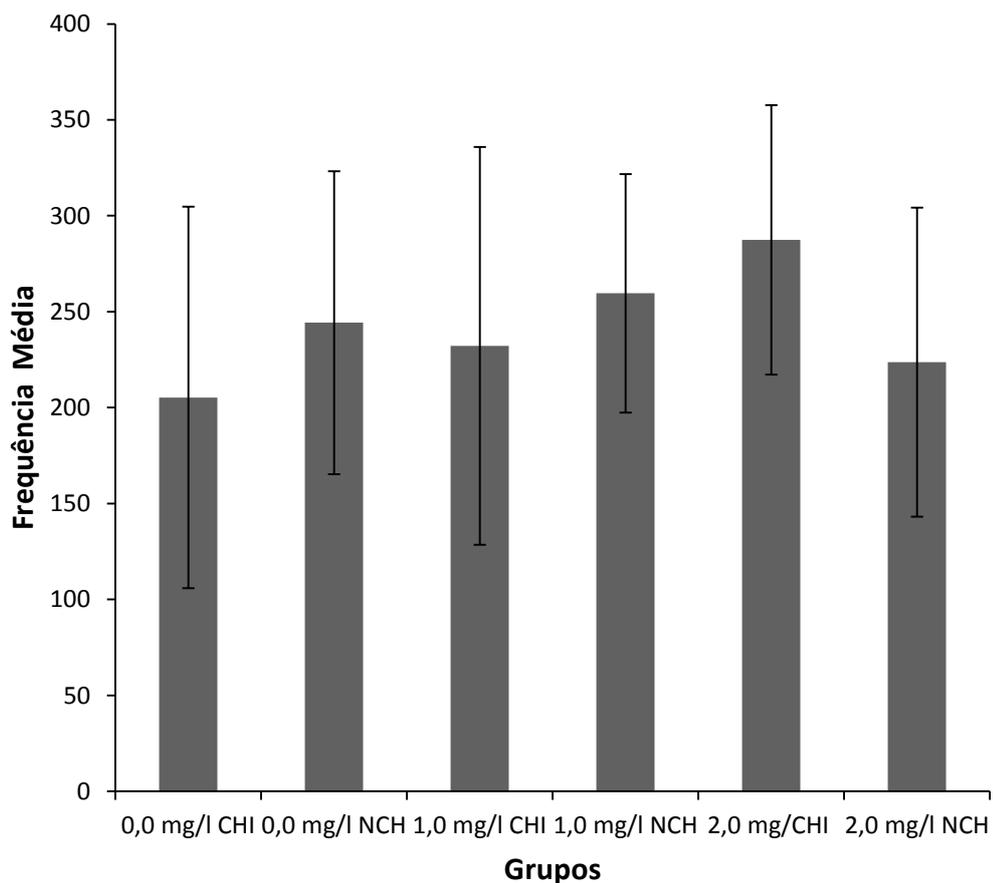


Figura 3. Frequência média das respostas de cruzamento (atividade motora) distribuída entre os diferentes grupos: 0,0 mg/l NCH, 0,0 mg/l CHI, 1,0 mg/l CHI, 1,0 mg/l NCH, 2,0 mg/l NCH e 2,0 mg/l CHI.

Na figura 3 é possível observar a frequência média das respostas de cruzar em cada grupo. O grupo 2,0 mg/l CHI apresentou uma frequência maior de cruzamento em comparação aos outros grupos. Entretanto, a estatística mostrou que não houve nenhuma diferença significativa na frequência média entre os diferentes grupos (Anexo 4B).

DISCUSSÃO

As altas latências apresentadas pelos grupos CHI que receberam 1,0 e 2,0 mg/l de imipramina antes do teste de fuga, a falta de diferença estatística entre as latências médias desses grupos com a do grupo controle (0,0 mg/l NCH), sugerem que a imipramina, nas doses e regime de administração aqui empregados, não reverteu e nem atenuou o fenômeno do desamparo aprendido em zebrafish. Na literatura sobre desamparo aprendido com ratos foram poucos os trabalhos em que a imipramina, quando empregada em regime agudo, reverteu o fenômeno (Gouveia Jr. 2001). Além disso, dados de Gouveia Jr (2001) em regime agudo com ratos mostraram que a imipramina funcionando como antidepressivo depende diretamente do sexo que o animal possui e possivelmente do tipo de resposta que é analisada naquela espécie, correr ou saltar.

As concentrações aqui utilizadas foram baseadas na literatura sobre o teste de claro-escuro com zebrafish (Magno, 2012), não sendo, portanto, adaptadas da literatura de desamparo com ratos. Em humanos o efeito antidepressivo da imipramina ocorre em média de duas a três semanas após o início do tratamento (Moreno, Moreno & Soares 1999; Rang & Dale, 2007). Na literatura com ratos tanto a administração crônica (Martin, Soubrier e Simon, 1987; Geoffroy, Tvede, Christensen e Schou, 1991; Gambarana, Ghiglieri, Tagliomonte, D'Alessandro e Montis, 1995; Itoh, Tokumura e Abe, 2004), quanto a subcrônica (Sherman, Allers, Petty e Henn, 1979; Sherman, Sacquitne e Petty, 1982; Martin e Puech, 1991; Real, Mico, Maldonato, Roques e Gibert-Rahola, 1995; Sweeney, Lesourd e Gandon, 1998; Besson, Privat, Eschaliere e Fialip, 1999; Takamori, Yoshida e Okuyama, 2001), em sua grande parte foram capazes de amenizar o fenômeno. Os resultados aqui encontrados somados aos da literatura

sugerem mais estudos, utilizando o protocolo de desamparo aprendido em zebrafish, em que esta droga seja administrada em outras doses, tanto em regime agudo, quanto crônico e subcrônico.

No que diz respeito à relação imipramina e *Danio rerio*, Magno (2012) administrou imipramina, via hídrica, em regime agudo no protocolo de ansiedade claro-escuro. Seus dados mostraram que: a concentração de 1,0 mg/l, aumentou o tempo médio que os animais permaneceram no lado escuro; as concentrações de 1 mg/l e 2 mg/l aumentaram o tempo da primeira latência (impulsividade para explorar novos ambientes); e nas concentrações de 0,5 mg/l, 1,0 mg/l, 2,0 mg/l e 4,0 mg/l ocorreram diminuição no número de alternâncias (atividade motora). De acordo com Magno (2012) tais dados sugerem que administração desta droga em regime agudo funciona como um ansiogênico. Santos (2013) em protocolo de esquiva inibitória, modelo de ansiedade, administrou também em regime agudo, via intraperitoneal, doses de 4 mg/kg, 8 mg/kg e 12 mg/kg. Os principais resultados de Santos (2013) mostraram que as doses de 4 mg/kg e 12 mg/kg ocasionaram efeitos ansiogênicos (os sujeitos permaneceram no compartimento escuro ao longo das tentativas, impedindo a aquisição de esquiva). Já a dose de 8 mg/kg não impediu a aquisição da esquiva inibitória, mas de acordo com Santos (2013) foi observado um provável efeito ansiogênico uma vez que ocorreu um aumento de permanência no ambiente escuro, a partir da 3ª tentativa, em comparação ao grupo controle. Para Santos (2013) esse efeito ansiogênico da imipramina pode está relacionado ao aumento da serotonina na fenda sináptica.

Esse efeito ansiogênico da imipramina, quando administrada de forma aguda, possivelmente também foi observada no atual experimento, interferindo no processo de aprendizagem. As latências médias apresentadas pelos grupos que não foram submetidos ao choque incontrolável (NCH) e que receberam 1,0 mg/l e 2,0 mg/l de

imipramina, tiveram uma diminuição gradual, seguido de aumento gradual de tais dados nos blocos de tentativas. As latências médias emitidas por tais grupos, formando um gráfico em forma de U, sugerem em um primeiro momento, que inicialmente os sujeitos estavam apresentando uma aprendizagem da resposta de fuga, mas posteriormente ocorreu uma interferência desta aprendizagem. As análises das tentativas falhas e das respostas de cruzamento indicam que não ocorreu um déficit da atividade motora, como foi observado em Magno (2012). Aqui o critério adotado para uma resposta de fuga, foi a de cruzamento de um lado do equipamento para o outro. Na análise dos vídeos para registro das respostas de atividade motora, notou-se que nas doses de 1,0 mg/l e 2,0 mg/l, no início da sessão os sujeitos apresentavam um padrão de nado desorganizado, não conseguindo mover as caldas, nadando rapidamente do topo ao fundo do aquário (e vice-versa). Em geral, a partir da metade da sessão, tais padrões diminuía ou desapareciam e os sujeitos passavam a cruzar os lados do equipamento em linha reta, mas de maneira ininterrupta, não caracterizando uma aprendizagem. Infelizmente, tais dados não foram computados, não permitindo, portanto uma análise de maior precisão. Mas, estas informações somadas os resultados sistematizados aqui e aos da literatura (Gouveia Jr., 2001; Magno, 2012; Santos, 2013) sugerem que a Imipramina aguda, dependendo da dose, pode interferir diretamente em processos de aprendizagem.

No que diz respeito às baixas quantidades de tentativas falhas emitidas pelo 2,0 mg/l CHI, em comparação ao 2,0 mg/l NCH, supõe-se que a imipramina na concentração de 2,0 mg/l potencializou ou efeito aversivo do choque elétrico, aumentando as respostas de cruzamento (ou atividade motora) em relação aos outros grupos, embora tais respostas não tenham sido estatisticamente significante. Além disso, essa baixa frequência média de tentativas falhas sugerem a ocorrência de respostas de medo incondicional. Em uma situação de medo o organismo encontra-se em uma

condição de ameaça real, interrompendo a imobilidade (freezing) e dando início a respostas de fuga, ou deslocação rápida (Shuhama, Del-Bem, Loureiro & Graeff, (2007). De acordo com Blanchard e Blanchard (1988) as reações de medo são pareados com estímulos que eliciam dor. Esse medo incondicional ocasionando fuga incondicional, não poderia ser considerada como uma fuga aprendida pelo fato de não ter ocorrido diminuição das latências (não houve uma relação de contiguidade entre choque elétrico e fuga). É bem provável que o ambiente em que o sujeito estava, shuttlebox, tenha se tornado um estímulo aversivo condicional, e no caso também contribuído para um aumento das respostas de cruzamento e diminuição das tentativas falhas.

Por fim, os dados aqui apresentados não permitem fechar a conclusão de que a imipramina não pode funcionar como um antidepressivo neste modelo. O desamparo aprendido com zebrafish é um fenômeno recente, portanto ainda são necessários inúmeros trabalhos para avaliar questões paramétricas e possíveis respostas eliciadas neste protocolo, a fim de não se obter resultados contraditórios, devido a questões metodológicas, como os observados na literatura com ratos (Hunziker,2003). Talvez somente a partir da realização destes trabalhos seja possível realizar a validação farmacológica do desamparo aprendido com *Danio rerio*.

Referências

Baldessarini, R. J. (2006). Tratamento farmacológico da depressão e dos transtornos de ansiedade. Em L. L. Brunton, J. S. Lazo, & K. L. Parker (Eds.), *Goodman & Gilman: As bases farmacológicas da terapêutica* (pp. 383-410). Rio de Janeiro: McGraw-Hill Interamericana do Brasil.

- Besson, A., Privat, A. M., Eschalier, A., & Fialip, J. (1999). Dopaminergic and Opioidergic Mediations of Tricyclic Antidepressants in the Learned Helplessness Paradigm. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, *64*, 541–548.
- Blanchard, D. C. & Blanchard, R. J. (1988). Ethoexperimental approaches to the biology of emotion. *Annual Review Psychology*, *39*, 43-68.
- Ciraulo, D.A., Tsirolnik-Barts, L., Shader, R.I., & Greenblatt, D.J. (2004). Clinical pharmacology and therapeutics of antidepressants. In Ciraulo, D.A. & Shader, R.I. (Eds.), *Pharmacotherapy of depression* (pp. 33–117). Totowa, NJ: Humana Press.
- Gambarana, C., Ghiglieri, O., Tagliomonte, A., D'Alessandro, N., & Montis, M. G. (1995). Crucial Role of D1 Dopamine Receptors in Mediating the Antidepressant Effect of Imipramine. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, *50*, 147-151.
- Geoffroy, M., Tvede, K., Christensen, A. V., & Schou J. S. (1991). The Effect of Imipramine and Lithium on "Learned Helplessness" and Acetylcholinesterase in Rat Brain. *Pharmacology Biochemistry & Behavior*, *38*, 93-97.
- Gouveia Jr., A. (2001). Efeitos da administração aguda de imipramina sobre o desamparo aprendido em ratos machos e fêmeas. *Acta Comportamental*, *9*, 19-29.
- Hunziker, M. H. L. (2003). *Desamparo Aprendido*. Tese de Livre-Docência, Instituto de Psicologia, Universidade de São Paulo, São Paulo, Brasil.
- Hunziker, M. H. L. (1993). Desamparo Aprendido: um modelo animal da depressão? *Psicologia: Teoria e Pesquisa*, *9*, 487-498.
- Itoh, T., Tokumura, M., & Abe, K. (2004). Effects of rolipram, a phosphodiesterase 4 inhibitor, in combination with imipramine on depressive behavior, CRE-binding

activity and BDNF level in learned helplessness rats. *European Journal of Pharmacology* 498, 135– 142.

Magno, L. D. P. (2012). *Validação farmacológica da preferência claro-escuro em Danio rerio*. Dissertação de mestrado não publicada, Universidade Federal do Pará, Belém, Pará, Brasil.

Maier, S. F., & Seligman, M. E. P. (1976). Learned helplessness: Theory and evidence. *Journal of Experimental Psychology: General*, 105, 3-46.

Martin, P., & Puech, A. J. (1991). Is there a relationship between 5-HT1b receptors and mechanisms of action of antidepressant drugs in the learned helplessness paradigm in rats? *European Journal of Neuropharmacology*, 192, 193-196.

Martin, P., Soubrié, P., & Simon, P. (1987). The effects of monoamine oxidase inhibitor compared with classical tricyclic antidepressants on the learned helplessness paradigm. *Progress in Neuropsychopharmacology*, 10, 1-7.

Moreno, R. A., Moreno D. H., & Soares M. B. M. (1999). Psicofarmacologia de Antidepressivos. *Revista Brasileira de Psiquiatria*, 21(1) ,24-40.

Overmier, J. B., & Seligman, M. E. P. (1967). Effects of inescapable shock upon subsequent escape and avoidance learning. *Journal of Comparative and Physiological Psychology*, 63 (1), 28-33.

Rang, H. P., Dale, M. M., Ritter, J. M., & Flower, R. J. (2007). *Rang & Dale Farmacologia*. Rio de Janeiro: Elsevier.

Real, P. T., Mico, J. A., Maldonato, R., Roques, B. P., & Gibert-Rahola, J. (1995). Implication of Endogenous Opioid System in the Learned Helplessness Model of Depression. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 52 (1), 145-152.

- Santos, B. R. (2013). *Validação farmacológica da esquia inibitória do Danio rerio*. Tese de doutorado não publicada, Universidade Federal do Pará, Belém, Pará, Brasil.
- Seligman, M. E. P. (1972). Learned Helplessness. *Annual Review of Medicine*, 23, 407-412.
- Seligman, M. E. P., & Maier, S. F. (1967). Failure to escape traumatic shock. *Journal of Experimental Psychology*, 74, 1-9.
- Sherman, A.D., Allers, G.L., Petty, F., & Henn F.A. (1979). A neuropharmacologically-relevant animal model of depression. *Neuropharmacology*, 18, 891–893.
- Shuhama, R., Del-Bem, C. M., Loureiro, S. R., & Graeff, F. G. (2007). Animal defense strategies and anxiety disorders. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, 79, 97-109.
- Sherman, A. D., Sacquitne, J. L., & Petty, F. (1982). Specificity of learned helplessness model of depression. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*, 16, 449-454.
- Sweeney, C. P. M., Lesourd, M., & Gandon J. (1998). Antidepressant-like effects of alnespirone (S 20499) in the learned helplessness test in rats. *European Journal of Pharmacology*, 345, 133–137.
- Takamori, K., Yoshida, S., & Okuyama S. (2001). Repeated treatment with imipramine, fluvoxamine and tranylcypromine decreases the number of escape failures by activating dopaminergic systems in a rat learned helplessness test. *Life Sciences*, 69, 1919–1926.

Conclusão Geral

De maneira geral, este trabalho mostrou que é possível reproduzir o desamparo aprendido com zebrafish, produzindo um possível modelo de depressão para esta espécie, baseada na dificuldade em aprender respostas de fuga.

Entretanto, observou-se a existência de possíveis variáveis que podem interferir diretamente na aquisição do fenômeno do desamparo aprendido com o zebrafish, como a luz e a imersão em becker. A luz dependendo da forma em que é apresentada no equipamento, pode interferir na aprendizagem de fuga. Pois, tal estímulo também possui propriedades aversivas para o zebrafish e pode funcionar como um ansiogênico. A imersão, método de administração de droga, apesar de ser colocada pela literatura como um método de administração menos estressante pareceu ser um evento, que somado a luz, dificultou a aquisição das respostas de fuga. Entretanto, para o protocolo de desamparo aprendido tal meio de administração pareceu ser mais eficaz que a injeção intraperitoneal.

No que diz respeito aos efeitos da imipramina, no desamparo aprendido com o zebrafish, observou-se que as concentrações de 1,0 mg/l e 2,0 mg/l, administradas em regime agudo, não foram capazes de reverter ou atenuar o fenômeno. Mas, tiveram possíveis efeitos ansiogênicos que interferiram na aprendizagem da fuga.

Apesar dos dados, obtidos neste estudo, mostrarem um possível protocolo para o estudo de comportamentos do tipo depressivo em zebrafish, ainda há muitas lacunas a serem elucidadas na área. Dentre elas sugere-se novos estudos sobre padrões de comportamentos eliciados em zebrafish no protocolo de desamparo aprendido, questões paramétricas do desamparo com zebrafish, como quantidades de estimulação aversiva incontrolável apresentada, período de retenção do desamparo aprendido, e

administração de outras concentrações de imipramina e outros antidepressivos, além da utilização de vias crônicas e subcrônicas.

Referências

- Andreatini, R. (2002). A importância dos modelos animais em psiquiatria. *Revista Brasileira de Psiquiatria*, 24,164.
- American Psychiatric Association. (2003). *Manual Diagnóstico e Estatístico de Transtornos Mentais* (4º ed.). Porto Alegre, Artmed.
- Baldessarini, R. J. (2006). Tratamento farmacológico da depressão e dos transtornos de ansiedade. Em L. L. Brunton, J. S. Lazo, & K. L. Parker (Eds.), *Goodman & Gilman: As bases farmacológicas da terapêutica* (pp. 383-410). Rio de Janeiro: McGraw-Hill Interamericana do Brasil.
- Besson, A., Privat, A. M., Eschalier, A., & Fialip, J. (1999). Dopaminergic and Opioidergic Mediations of Tricyclic Antidepressants in the Learned Helplessness Paradigm. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 64, 541–548.
- Blanchard, D. C. & Blanchard, R. J. (1988). Ethoexperimental approaches to the biology of emotion. *Annual Review Psychology*, 39, 43-68.
- Blazina, A. N., & Lara, D. R.(2013). Análise dos efeitos protetores da fluoxetina na indução de depressão por isolamento em Zebrafish (*Danio Rerio*) [Resumo]. *Seminário interno de avaliação científica*, PUC, RS. Retirado em 7 de maio de 2014 de <http://ebooks.pucrs.br/edipucrs/anais/SIC/XIV/XIV/47.pdf>
- Brown, G. E., Howe, A. R., & Jones, T. E. (1990). Immunization against learned helplessness in the cockroach (*P. americana*). *Psychological Report*, 67, 635-640.

- Brown, G.E., Smith, P.J., & Peters, R. B. (1985). Effects of escapable versus inescapable shocks on avoidance behavior in the goldfish (*Carassius auratus*). *Psychological reports*, 57, 1027-1030.
- Brown. G. E., & Stroup, K. (1988). Learned helplessness in the cockroach (*P.americana*). *Behavioral and Neural Biology*, 50, 246-250.
- Ciraulo, D.A., Tsirolnik-Barts, L., Shader, R.I., & Greenblatt, D.J. (2004). Clinical pharmacology and therapeutics of antidepressants. In Ciraulo, D.A. & Shader, R.I. (Eds.), *Pharmacotherapy of depression* (pp. 33–117). Totowa, NJ: Humana Press.
- Chakravarty, S., Reddy, B. R., Sudhakar, S. R., Saxena, S., Das, T., Meghah, V., et al. (2013). Chronic Unpredictable Stress (CUS)-Induced Anxiety and Related Mood Disorders in a Zebrafish Model: Altered Brain Proteome Profile Implicates Mitochondrial Dysfunction. *Plos One*, 8, 1-11.
- Echevarria, D. J., Hammack, C. M., Jouandot, D. J., & Toms, C. N. (2010). Does Acute Alcohol Exposure Modulate Aggressive Behaviors in the Zebrafish (*Danio rerio*), or is the Bark Worse than the Bite? *International Journal of Comparative Psychology*, 23, 62-69.
- Gambarana, C., Ghiglieri, O., Tagliomonte, A., D'Alessandro, N., & Montis, M. G. (1995). Crucial Role of D1 Dopamine Receptors in Mediating the Antidepressant Effect of Imipramine. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 50, 147-151.
- Geoffroy, M., Tvede, K., Christensen, A. V., & Schou J. S. (1991). The Effect of Imipramine and Lithium on "Learned Helplessness" and Acetylcholinesterase in Rat Brain. *Pharmacology Biochemistry & Behavior*, 38, 93-97.

- Gerlai, R., Lee, V., & Blaser, R. (2006). Effects of acute and chronic ethanol exposure on the behavior of adult zebrafish (*Danio rerio*). *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*, 85, 752-761.
- Gleason, P. E., & Weber, S. (1977). Effect of group size on a avoidance learning in zebra fish, *Brachydanio rerio* (Pisces: *Cyprinidae*). *Animal Learning & Behavior*, 5, 213-216.
- Guerra, L.G.G.C. & Silva, M.T.A. (2002) Modelos animais de psicopatologia: Fundamentos conceituais. Em: H.J. Guilhardi (Org), *Sobre comportamento e cognição - vol 9*. (pp. 232-235) São Paulo: ESETec.
- Gouveia Jr., A. (2001). Efeitos da administração aguda de imipramina sobre o desamparo aprendido em ratos machos e fêmeas. *Acta Comportamentalia*, 9, 19-29.
- Guo, s. (2004). Linking genes to brain, behavior and neurological diseases: What can we learn from zebrafish?. *Genes, Brain and Behavior*, 3,63-74.
- Hiroto, D. S., & Seligman, M. E. P. (1975) Generality of learned helplessness in man. *Journal of Personality and Social Psychology*, 31, 311 – 327.
- Hunziker, M. H. L. (2003). Desamparo Aprendido. *Tese de Livre-Docência*, Instituto de Psicologia, Universidade de São Paulo, São Paulo.
- Hunziker, M. H. L. (1993). Desamparo Aprendido: um modelo animal da depressão? *Psicologia: Teoria e Pesquisa*, 9, 487-498.
- Hunziker, M. H. L., & Santos, C. V. (2007). Learned helplessness: Effects of response requirement and interval between treatment and testing. *Behavioral Processes*, 76, 183-191.

- Hunziker, M. H. L., Yamada, T. K., Manfré, F. N., & Azevedo, E. F. (2006). Variabilidade e Repetição Operantes Aprendidas após Estímulos Aversivos Incontroláveis. *Psicologia: Teoria e Pesquisa*, 22, 347- 354.
- Itoh, T., Tokumura, M., & Abe, K. (2004). Effects of rolipram, a phosphodiesterase 4 inhibitor, in combination with imipramine on depressive behavior, CRE-binding activity and BDNF level in learned helplessness rats. *European Journal of Pharmacology* 498, 135– 142.
- Kalueff, A. V., & Cachat, J. M. (Eds.). (2011). *Zebrafish neurobehavioral protocols*. New Orleans: Humana Press.
- Lee, A., Mathuru, A. S., Teh, C., Kibat, C., Korzh, V., Penney, T. B., & Jesuthasan, S., (2010). The Habenula Prevents Helpless Behavior in Larval Zebrafish. *Current Biology*, 20, 2211-2216.
- Lockwood, B., Bjerke, S., Kobayashi, K., & Guo, S. (2004). Acute effects of alcohol on larval zebrafish: a genetic system for large-scale screening. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*, 77, 647-654.
- Magno, L. D. P. (2012). *Validação farmacológica da preferência claro-escuro em Danio rerio*. Dissertação de mestrado não publicada, Universidade Federal do Pará, Belém, Pará, Brasil.
- Maier, S. F., & Seligman, M. E. P. (1976). Learned helplessness: Theory and evidence. *Journal of Experimental Psychology: General*, 105, 3-46.
- Maier, S. F., & Watkins, L. R. (2005). Stressor controllability and learned helplessness: The roles of the dorsal raphe nucleus, serotonin, and corticotropin-releasing factor. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 29, 829-841.

- Martin, P. (1991). 1-(2-Pyrimidinyl)-piperazine may alter the effects of the 5-HT_{1A} agonists in the learned helplessness paradigm in rats. *Psychopharmacology*, *104*, 275-278.
- Martin, P., & Puech, A. J. (1991). Is there a relationship between 5-HT_{1b} receptors and mechanisms of action of antidepressant drugs in the learned helplessness paradigm in rats? *European Journal of Neuropharmacology*, *192*, 193-196.
- Martin, P., Soubrié, P., & Simon, P. (1987). The effects of monoamine oxidase inhibitor compared with classical tricyclic antidepressants on the learned helplessness paradigm. *Progress in Neuropsychopharmacology*, *10*, 1-7.
- Martin, P., Tissier, M. H., Adrien, J., & Puech, A. J. (1991). Antidepressant-like effects of buspirone mediated by the 5-HT_{1A} post-synaptic receptors in the learned helplessness paradigm. *Life Sciences*, *48*, 2505-2511.
- Maximino, C. (2011). Modulation of nociceptive-like behavior in zebrafish (*Danio rerio*) by environmental stressors. *Psychology & Neuroscience*, *4*(1), 149-155.
- Maximino, C., Brito, T. M., Batista, A. W. S., Herculano, A. M., Morato, S., Gouveia Jr. (2010). Measuring anxiety in zebrafish: A critical review. *Behavioural Brain Research*, *214*, 157-171.
- Maximino, C., Brito, T. M., Colmanetti, R. B., Pontes, A. A. A., Castro, H. M., Lacerda, R. I. T., et al. (2010a). Parametric analyses of anxiety in zebrafish scototaxis. *Behavioural Brain Research*, *210*, 1-7.
- Maximino, C., Brito, T. M., Dias, C. A. G. M., Gouveia Jr, A., & Morato, S. (2010b). Scototaxis as anxiety-like behavior in fish. *Nature Protocols*, *5*, 209-216.
- Maximino, C., Silva, A. W. B., Gouveia Jr, A., & Herculano, A. M. (2011). Pharmacological analysis of zebrafish (*Danio rerio*) scototaxis. *Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry*, *35*(2), 624-641.

- Moreno, R. A., Moreno D. H., & Soares M. B. M. (1999). Psicofarmacologia de Antidepressivos. *Revista Brasileira de Psiquiatria*, 21(1) ,24-40.
- Nash, S. M. Martinez, S. L. Dudeck, M. M., & Davis, S. F. (1983). Learned helplessness in goldfish under conditions of low shock intensity. *The Journal of General Psychology*, 108, 97-101.
- Nguyen, M., Stewart, A M., & Kalueff, A. V. (in press). Aquatic blues: Modeling depression and antidepressant action in zebrafish. *Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry*.
- Overmier, J. B., & Seligman, M. E. P. (1967). Effects of inescapable shock upon subsequent escape and avoidance learning. *Journal of Comparative and Physiological Psychology*, 63 (1), 28-33.
- Padilla, A. M., Padilla, C., Ketterer, T., & Giacalone, D. (1970). Inescapable shocks an subsequent escape avoidance conditioning in goldfish, *Carassius auratus*. *Psychonomic Science*, 20, 295-296.
- Pagnussat, N., Piato, A. L., Schaefer, I. C., Blank, M., Tamborski, A. R., Guerim, L. D., et al. (2013). One for all and all for one: The importance of shoaling on behavioral and stress responses in zebrafish. *Zebrafish*, 10, 2013.
- Piato, A. L., Capiotti, K. M., Tamborski, A. R., Oses, J. P., Barcellos, L. G., Bogo, M., et al. (2011). Unpredictable chronic stress model in zebrafish (*Danio rerio*): Behavioral and physiological responses. *Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry*, 35, 561-167.
- Rang, H. P., Dale, M. M., Ritter, J. M., & Flower, R. J. (2007). *Rang & Dale Farmacologia*. Rio de Janeiro: Elsevier.

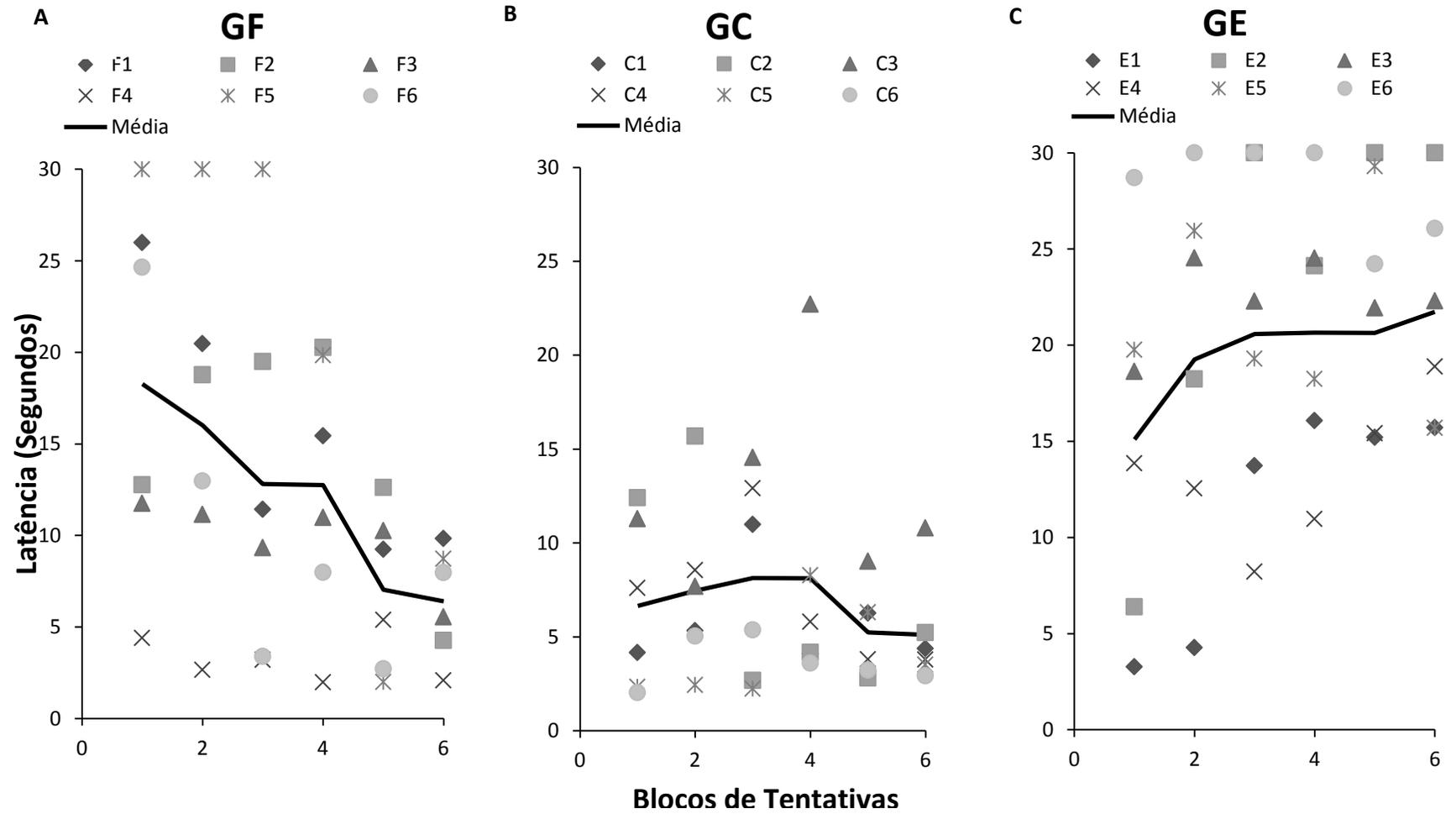
- Real, P. T., Mico, J. A., Maldonato, R., Roques, B. P., & Gibert-Rahola, J. (1995). Implication of Endogenous Opioid System in the Learned Helplessness Model of Depression. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 52 (1), 145-152.
- Roques, A. C., Abbink, W., Chereau, G., Fourneyron, A., Spanings T., Burggraaf, D., et al. (2012). Physiological and behavioral responses to an electrical stimulus in Mozambique tilapia (*Oreochromis mossambicus*). *Fish Biological Biochemistry*, 38, 1019-1028.
- Santos, B. R. (2013). *Validação farmacológica da esquia inibitória do Danio rerio*. Tese de doutorado não publicada, Universidade Federal do Pará, Belém, Pará, Brasil.
- Sawamura, T., Shimizu, K., Nibuya, M., Wakizono, T., Suzuki, G., Tsunoda, T., et al. (2004). Effect of paroxetine on a model of posttraumatic stress disorder in rats. *Neuroscience Letters*, 357, 37–40.
- Segner, H. (2012). *Fish Nociception and Pain: A biological perspective*. Bern: Federal Office for Buildings and Logistics.
- Seligman, M.E.P. (1977). *Desamparo: sobre depressão, desenvolvimento e morte*. São Paulo: HUCITEC-EDUSP.
- Seligman, M. E. P. (1972). Learned Helplessness. *Annual Review of Medicine*, 23, 407-412.
- Seligman, M. E. P. & Beagley, G. (1975). Learned helplessness in the rat. *Journal of Comparative and Physiological Psychology*, 88(6), 534-541.
- Seligman, M. E. P., & Maier, S. F. (1967). Failure to escape traumatic shock. *Journal of Experimental Psychology*, 74, 1-9.

- Seligman, M. E. P., Rosellini, R. A. & Kozak, M. J. (1975). Learned helplessness in the rat: time course, immunization, and reversibility, *Journal of Comparative and Physiological Psychology*, 88, 542-547.
- Serra, E. L., Medalha, C. C., & Mattioli, R. (1999). Natural preference of zebrafish (*Danio rerio*) for a dark environment. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 32, 1551-1553.
- Sherman, A.D., Allers, G.L., Petty, F., & Henn F.A. (1979). A neuropharmacologically-relevant animal model of depression. *Neuropharmacology*, 18, 891–893.
- Sherman, A. D., Sacquitne, J. L., & Petty, F. (1982). Specificity of learned helplessness model of depression. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*, 16, 449-454.
- Shuhama, R., Del-Bem, C. M., Loureiro, S. R., & Graeff, F. G. (2007). Animal defense strategies and anxiety disorders. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, 79, 97-109.
- Sneddon, L., (2002). Anatomical and eletrophysiological analysis of the trigeminal nerve in a teleost fish, *Oncorhynchus mykiss*. *Neuroscience Letters*, 319, 167-171.
- Stewart et. al. (2011). Intraperitoneal injection as a method of psychotropic drug delivery in adult zebrafish, *Neuromethods*, 51, 169-179.
- Seward, J., & Humphrey, G. L. (1967). Avoidance learning as a function of pretraining in the cat. *Journal of Comparative & Physiological Psychology*, 63, 338-341.
- Sweeney, C. P. M., Lesourd, M., & Gandon J. (1998). Antidepressant-like effects of alnespirone (S 20499) in the learned helplessness test in rats. *European Journal of Pharmacology*, 345, 133–137.

- Takamori, K., Yoshida, S., & Okuyama S. (2001). Repeated treatment with imipramine, fluvoxamine and tranylcypromine decreases the number of escape failures by activating dopaminergic systems in a rat learned helplessness test. *Life Sciences*, *69*, 1919–1926.
- Tropepe, V., & Sive, H. L. (2003). Can zebrafish be used as a model to study the neurodevelopmental causes of autism? *Genes, Brain and Behavior*, *2*, 268-181.
- Valente, A., Huang, K., Portugues, R., & Engert, F. (2012). Ontogeny of classical and operant learning behaviors in zebrafish. *Learning & Memory*, *19*, 170-177.
- Vollmayr, B., & Henn, F. A. (2003). Stress models of depression. *Clinical Neuroscience Research*, *3*, 245-251.
- Xu, X., Scott-Scheiern, T., Kempker, L., & Simons, K. (2007). Active Avoidance Conditioning in Zebrafish (*Danio rerio*). *Neurobiology of Learning and Memory*, *87*, 72-77.
- Williams, J. L., & Maier, S. F. (1977). Transituational immunization and therapy of learned helplessness in the rat. *Journal of Experimental Psychology*, *3*(3), 240-252.
- Willner, P. (1985). *Depression: A psychobiological synthesis*. New York: Wiley.

ANEXOS

Anexo 1 A–Gráfico de dispersão caracterizando o desempenho individual (Latência média) dos sujeitos dos grupos controle (GD), experimental (GE) e Fuga (GF) – Estudo I



Anexo 1B- Análise Estatística do Estudo 1, Blocos de tentativas e Tentativas

falhas.

Blocos	GC x GE	GF x GC	GF x GE
Bloco 1	F(1)=3,99, $p=0,07$	F(1)=6,70, $p=0,03$	F(1)=0,32, $p=0,58$
Bloco 2	F(1)=7,41, $p=0,02$	F(1)=4,06, $p=0,07$	F(1)=0,35, $p=0,56$
Bloco 3	F(1)=8,85, $p=0,01$	F(1)=0,97, $p=0,35$	F(1)=1,98, $p=0,19$
Bloco 4	F(1)=9,34, $p=0,01$	F(1)=1,23, $p=0,29$	F(1)=3,82, $p=0,08$
Bloco 5	F(1)=38,4, $p=0,00$	F(1)=0,80, $p=0,39$	F(1)=24,3, $p=0,00$
Bloco 6	F(1)=38,2, $p=0,00$	F(1)=0,59, $p=0,46$	F(1)=32,1, $p=0,00$

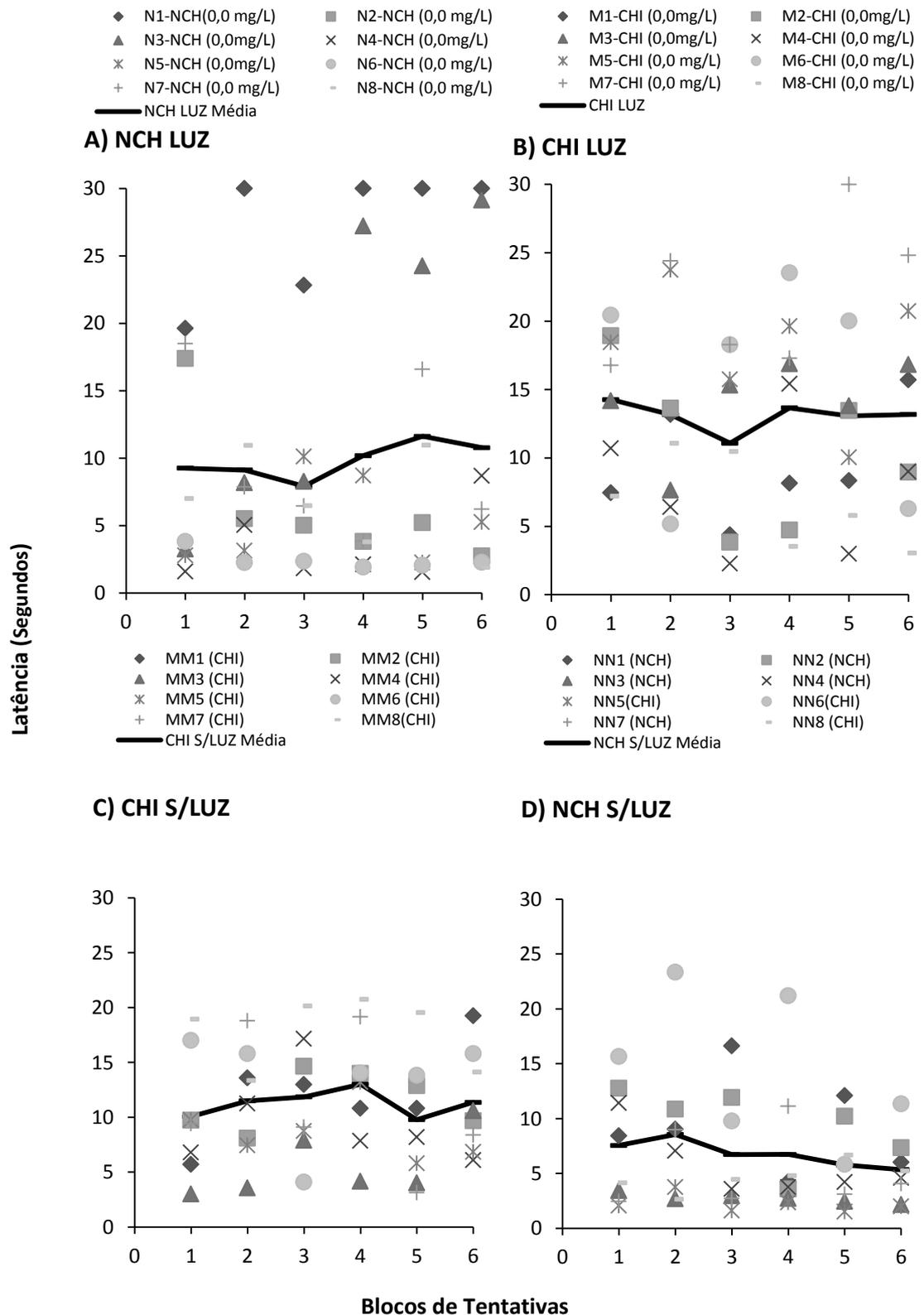
Tabela 1. Análise estatística entre os blocos de tentativas (Anova de uma via) dos diferentes grupos do estudo I, GC=Grupo Controle; GE= Grupo Experimental; GF= Grupo Fuga.

GC x GE	GF x GC	GF x GE
F(1)=18,5, $p=0,00$	F(1)=5,52, $p=0,04$	F(1)=15, $p=0,00$

Tabela 2. Análise estatística entre as tentativas falhas dos grupos do estudo I, GC=Grupo Controle; GE= Grupo Experimental; GF= Grupo Fuga

Anexo 2B – Gráfico de dispersão caracterizando o desempenho individual
(Latência Média) dos sujeitos dos grupos NCH LUZ, CHI LUZ, NCH S/LUZ,

CHI S/LUZ – Estudo II



Anexo 2B – Análise estatística do Estudo II – Blocos de tentativas e
Tentativas falhas.

Blocos	NCH LUZ x CHI LUZ	NCH S/LUZ x CHI S/LUZ	NCH LUZ x NCH S/LUZ	CHI LUZ x CHI S/LUZ
Bloco 1	F(1)=2,26, $p=0,15$	F(1)=0,88, $p=0,37$	F(1)=0,26, $p=0,62$	F(1)=2,48, $p=0,14$
Bloco 2	F(1)=0,98, $p=0,34$	F(1)=0,99, $p=0,34$	F(1)=0,02, $p=0,89$	F(1)=0,28, $p=0,60$
Bloco 3	F(1)=0,89, $p=0,36$	F(1)=3,64, $p=0,08$	F(1)=0,16, $p=0,70$	F(1)=0,07, $p=0,80$
Bloco 4	F(1)=0,51, $p=0,49$	F(1)=4,4, $p=0,1$	F(1)=0,54, $p=0,47$	F(1)=0,04, $p=0,84$
Bloco 5	F(1)=0,09, $p=0,77$	F(1)=2,85, $p=0,11$	F(1)=2,03, $p=0,18$	F(1)=0,82, $p=0,38$
Bloco 6	F(1)=0,23, $p=0,64$	F(1)=9,4, $p=0,01$	F(1)=1,58, $p=0,23$	F(1)=0,34, $p=0,57$

Tabela 1. Análise estatística entre os blocos de tentativas dos diferentes grupos do estudo II.

NCH LUZ x CHI LUZ	NCH S/LUZ x CHI S/LUZ	NCH LUZ x NCH S/LUZ	CHI LUZ x CHI S/LUZ
U=23,0, $p=0,38$	U=55,5; $p=0,01$	U=16, $p=0,105$	t(14)=0,81, $p=0,43$

Tabela 2. Análise estatística das tentativas falhas (Teste T ou Mann Whitney) dos diferentes grupos do estudo II.

Anexo 3 – Dados da administração via injeção intraperitoneal

MÉTODOS

SUJEITOS:

12 peixes adultos, *Danio rerio*, do tipo selvagem (calda curta), de sexo e idade indeterminados, provenientes de pet shops locais, mantidos sob as mesmas condições dos estudos I, II e III.

APARATO E PROCEDIMENTO:

O mesmo utilizado no estudo I, com a diferença que antes da sessão de teste em cada sujeito era injetado, via intraperitoneal, solução ringer (Cloreto de Sódio: 8,6 mg; Cloreto de Potássio: 0,3 mg; Cloreto de Cálcio: 0,33 mg) no volume de 10 µl utilizando uma seringa Hamilton (Hamilton Company, Reno, NV, USA). O animal era contido, em um suporte de espuma de fabricação própria (Figura 1).



Figura 1. Suporte de espuma, com abertura central, onde o peixe era contido

Anexo 3 – Dados da administração via injeção intraperitoneal

RESULTADOS

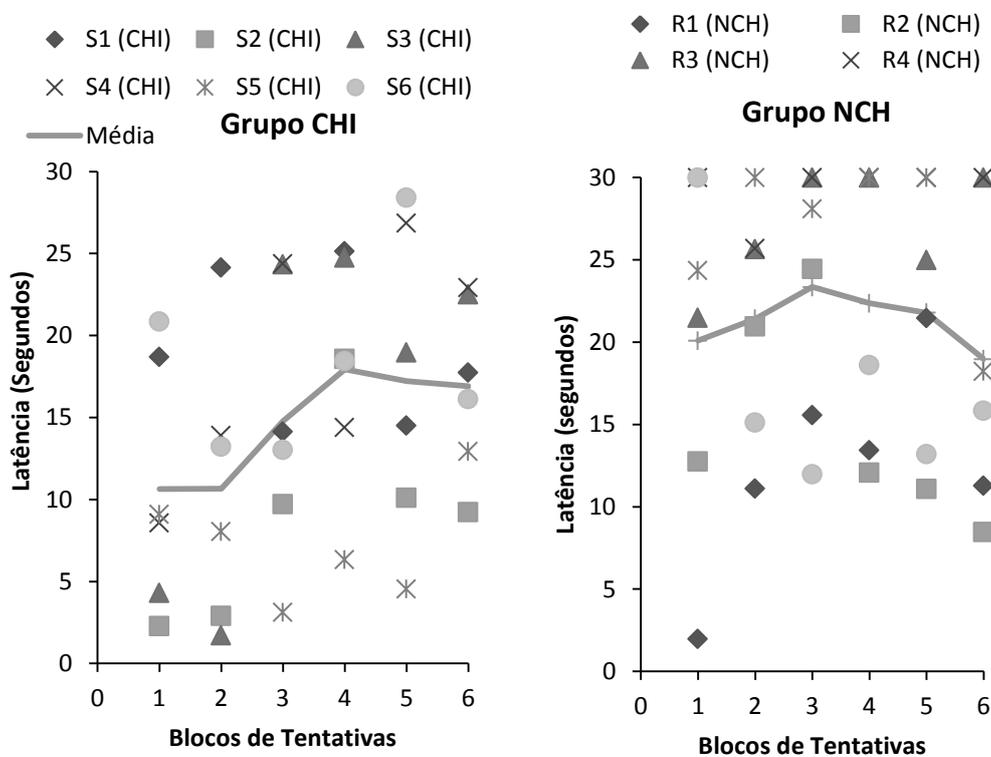


Figura 2. Latência Média apresentada pelos sujeitos dos grupos submetidos ao choque incontrolável (CHI) e não choque (NCH) de acordo com a média geral.

Blocos	Estatística
CHI xNCH	(Anova de uma via)
Bloco 1	F(1)=3,03, $p=0,11$
Bloco 2	F(1)=5,68, $p=0,04$
Bloco 3	F(1)=3,38, $p=0,10$
Bloco 4	F(1)=0,94, $p=0,35$
Bloco 5	F(1)=1,81, $p=0,39$
Bloco 6	F(1)=0,23, $p=0,65$

Tabela 1. Análise estatística (Anova de uma via) comparando os blocos de tentativas, entre os grupos choque incontrolável (CHI) e não choque (NCH). $p \leq 0,05$.

Anexo 3 – Dados da administração via injeção intraperitoneal

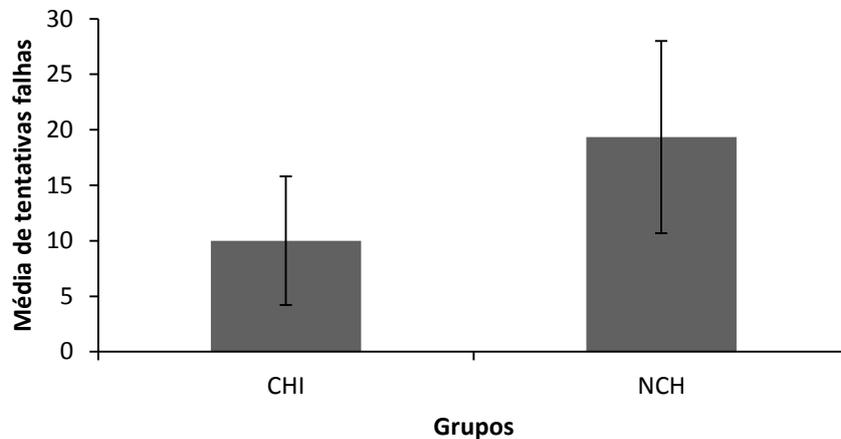


Figura 3. Média de tentativas falhas apresentadas pelos grupos choque incontrolável (CHI) e não choque (NCH). O Teste T mostrou que ocorreu diferença significativa entre os grupos, $t(10)=2,19$, $p=0,05$

CONCLUSÃO

O grupo NCH apresentou valores de latência maiores do que o grupo CHI. Além disso, notou-se que a média de tentativas falhas do NCH também foi maior do que a do CHI. A partir de tais dados é possível supor que a via de administração intraperitoneal funcionou como um estressor que interferiu no processo de aprendizagem de fuga. Os dados do Estudo II mostraram que apesar da imersão em um Becker também ter funcionado como um possível estressor, ele não impediu a aquisição da aprendizagem de fuga no grupo controle. Juntos, tais dados permitem concluir que em procedimento de desamparo aprendido a imersão (Estudo II) é um método mais eficaz, e mais indicado, do que a injeção intraperitoneal para administração de drogas em desamparo aprendido em zebrafish.

Anexo 4B – Análise estatística do Estudo III, blocos de tentativas, tentativas falhas e respostas de cruzamento (atividade motora).

Blocos	0,0 mg/l NCH	1,0 mg/l CHI	2,0 mg/l CHI	0,0 mg/l CHI	0,0 mg/l NCH	0,0 mg/l NCH	0,0 mg/l CHI	1,0 mg/l CHI	1,0 mg/l NCH
	x	x	x	x	x	x	x	x	x
	0,0 mg/l CHI	1,0 mg/l NCH	2,0 mg/l NCH	1,0 mg/l CHI	1,0 mg/l NCH	2,0 mg/l NCH	2,0 mg/l CHI	2,0 mg/l CHI	2,0 mg/l NCH
Bloco	F(1)= 0,88,	F(1)=0,01,	F(1)=5,44,	F(1)=0,06,	F(1)=0,16,	F(1)=2,05,	F(1)=0,03,	F(1)=0,01,	F(1)=0,73,
1	<i>p</i> =0,37	<i>p</i> =0,91	<i>p</i> =0,47	<i>p</i> =0,82	<i>p</i> =0,70	<i>p</i> =0,17	<i>p</i> =0,86	<i>p</i> =0,91	<i>p</i> =0,41
Bloco	F(1)=0,99,	F(1)=0,69,	F(1)=0,68,	F(1)=0,14,	F(1)=0,23,	F(1)=0,33,	F(1)=1,61,	F(1)=0,20,	F(1)=0,00,
2	<i>p</i> =0,34	<i>p</i> =0,42	<i>p</i> =0,42	<i>p</i> =0,21	<i>p</i> =0,64	<i>p</i> =0,58	<i>p</i> =0,22	<i>p</i> =0,66	<i>p</i> =0,95
Bloco	F(1)=3,64,	F(1)=1,32,	F(1)=2,66,	F(1)=0,19,	F(1)=0,02,	F(1)=0,01,	F(1)=1,43,	F(1)=0,09,	F(1)=0,00,
3	<i>p</i> =0,08	<i>p</i> =0,27	<i>p</i> =0,13	<i>p</i> =0,67	<i>p</i> =0,90	<i>p</i> =0,91	<i>p</i> =0,25	<i>p</i> =0,76	<i>p</i> =0,99
Bloco	F(1)=4,40,	F(1)=0,35,	F(1)=1,23,	F(1)=0,08,	F(1)=0,49,	F(1)=1,22,	F(1)=6,32,	F(1)=1,60,	F(1)=0,05,
4	<i>p</i> =0,05	<i>p</i> =0,56	<i>p</i> =0,29	<i>p</i> =0,78	<i>p</i> =0,49	<i>p</i> =0,29	<i>p</i> =0,25	<i>p</i> =0,23	<i>p</i> =0,83
Bloco	F(1)=2,85,	F(1)=0,13,	F(1)=3,18,	F(1)=0,07,	F(1)=3,88,	F(1)=2,58,	F(1)=3,93,	F(1)=2,60,	F(1)=0,15,
5	<i>p</i> =0,11	<i>p</i> =0,72	<i>p</i> =0,10	<i>p</i> =0,79	<i>p</i> =0,07	<i>p</i> =0,13	<i>p</i> =0,07	<i>p</i> =0,13	<i>p</i> =0,71
Bloco	F(1)=9,42, <i>p</i> =	F(1)=0,10,	F(1)=3,05,	F(1)=0,02,	F(1)=11,25,	F(1)=6,09,	F(1)=2,0,	F(1)=0,68,	F(1)=0,58,
6	0,01	<i>p</i> =0,75	<i>p</i> =0,10	<i>p</i> =0,89	<i>p</i> =0,00	<i>p</i> =0,03	<i>p</i> =0,18	<i>p</i> =0,42	<i>p</i> =0,46

Tabela 1. Análise estatística entre os blocos de tentativas (Anova de uma via) dos diferentes grupos do estudo III.

Anexo 4B – Análise estatística do Estudo III, blocos de tentativas, tentativas falhas e respostas de cruzamento (atividade motora).

0,0 mg/l NCH	1,0 mg/l CHI	2,0 mg/l CHI	0,0 mg/l CHI	0,0 mg/l NCH	0,0 mg/l NCH	0,0 mg/l CHI	1,0 mg/l CHI	1,0 mg/l NCH
x	x	x	x	x	x	x	x	x
0,0 mg/l CHI	1,0 mg/l NCH	2,0 mg/l NCH	1,0 mg/l CHI	1,0 mg/l NCH	2,0 mg/l NCH	2,0 mg/l CHI	2,0 mg/l CHI	2,0 mg/l NCH
U=55,5, <i>p</i> = 0,01	U=34,0, <i>p</i> =0,88	t(14)=2,29, <i>p</i> =0,04	U=22, <i>p</i> =0,33	U=21,5, <i>p</i> =0,28	U=17,5, <i>p</i> =0,13	U=59,5, <i>p</i> =0,00	U=19, <i>p</i> =0,20	U=23, <i>p</i> =0,38

Tabela 2. Análise estatística das tentativas falhas (Teste T ou Mann Whitney) entre os diferentes grupos do estudo III

0,0 mg/l NCH	1,0 mg/l CHI	2,0 mg/l CHI	0,0 mg/l CHI	0,0 mg/l NCH	0,0 mg/l NCH	0,0 mg/l CHI	1,0 mg/l CHI	1,0 mg/l NCH
x	x	x	x	x	x	x	x	x
0,0 mg/l CHI	1,0 mg/l NCH	2,0 mg/l NCH	1,0 mg/l CHI	1,0 mg/l NCH	2,0 mg/l NCH	2,0 mg/l CHI	2,0 mg/l CHI	2,0 mg/l NCH
t(14)=0,87, <i>p</i> =0,40	t(14)=0,64, <i>p</i> =0,53	U=15, <i>p</i> =0,08	t(14)=0,53, <i>p</i> =0,60	t(14)=0,43, <i>p</i> =0,67	U=25, <i>p</i> =0,50	t(14)=1,91, <i>p</i> =0,08	t(14)=1,25, <i>p</i> =0,23	t(14)=0,10, <i>p</i> =0,33

Tabela 3. Análise estatística das respostas de cruzamento (Teste T ou Mann Whitney) entre os diferentes grupos do estudo III