



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

**Análise Paramétrica do comportamento do *zebrafish* no Labirinto em Cruz com Rampa**

CARLA MENDES DA MOTTA

**Belém-PA**

**2020**



**Análise Paramétrica do comportamento do *zebrafish* no Labirinto em Cruz com Rampa**

CARLA MENDES DA MOTTA

Dissertação apresentada ao Programa de Teoria e Pesquisa do Comportamento como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre.

Orientador: Prof. Dr. Amauri Gouveia Jr.

**Belém – PA**

**2020**

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP) de acordo com  
ISBD Biblioteca Central da UFPA - Belém-PA**

---

M921a Motta, Carla Mendes da

Análise paramétrica da resposta do *zebrafish* no labirinto em cruz com rampa / Carla Mendes da Motta – 2020.

39f.

Orientador Prof. Dr. Amauri Gouveia Jr.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Pará, Núcleo de Teoria e Pesquisa do Comportamento, Programa de Pós-Graduação em Teoria e Pesquisa do Comportamento, Belém, 2020.

1. Psicopatologia. 2. Ansiedade. 3. Modelos animais. 4. *Zebrafish*. 5. Labirinto em cruz com rampa. I. Título.

CDD - 23. ed. 616.89

---

**Elaborado por Rosemarie de Almeida Costa – CRB-2/726**



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

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

**Carla Mendes Da Motta, Programa de Pós-Graduação em Teoria e Pesquisa do Comportamento, Universidade Federal do Pará, Belém-PA, Brasil.**

**Contato: 98521-0744**

**Mail: carlamtt@gmail.com**

## Dissertação de Mestrado

### “Análise Paramétrica da Resposta do Zebrafish no Labirinto em Cruz Com Rampa”.

**Aluna:** Carla Mendes da Motta.

**Data da Defesa:** 27 de Março de 2020.

**Resultado:** Aprovada.

**Banca Examinadora:**

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

  
\_\_\_\_\_  
Prof.º Dr.º Andre Walsh Monteiro (Membro 1 – UFPA).

  
\_\_\_\_\_  
Prof.ª Dr.ª Prof.º Dr.º Thiago Marques de Brito (Membro 2 – UFMT).

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

### IDENTIFICAÇÃO DO AUTOR E DA OBRA

Autor\*: Carla Mendes da Motta  
RG: 5815851 CPF: 019.133.182-14 E-mail: carlamtt@gmail.com fone: 985210744  
Vínculo com a UFPA: Mestranda Unidade: PPTPC/NTPC/UFPA  
Tipo do documento: ( ) Tese (X) Dissertação ( ) Livro ( ) Capítulo de Livro ( ) Artigo de Periódico ( ) Trabalho de Evento ( ) Outro. Especifique: \_\_\_\_\_  
Título do Trabalho: Análise Paramétrica do comportamento do zebrafish no Labirinto em Cruz com Rampa  
Se Tese ou Dissertação: Data da Defesa: 26/06/2020 Área do Conhecimento: Etologia  
Agência de Fomento: CAPES  
Programa de Pós-Graduação em: Teoria e Pesquisa do Comportamento

\*Para cada autor, uma autorização preenchida e assinada.

### DECLARAÇÃO DE DISTRIBUIÇÃO NÃO EXCLUSIVO

O referido autor:

- Declara que o documento entregue é seu trabalho original, e que detém o direito de conceder os direitos contidos nesta licença. Declara também que a entrega do documento não infringe, tanto quanto lhe é possível saber, os direitos de qualquer outra pessoa ou entidade.
- Se o documento entregue contém material do qual não detém os direitos de autor, declara que obteve autorização do detentor dos direitos de autor para conceder à Universidade Federal do Pará os direitos requeridos por esta licença, e que esse material cujos direitos são de terceiros, está claramente identificado e reconhecido no texto ou conteúdo entregue.

### TERMO DE AUTORIZAÇÃO

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

Permitir o uso comercial da obra?

(X) Sim

( ) Não

Permitir modificações em sua obra?

(X) Sim, contanto que compartilhem pela mesma licença

( ) Não

O documento está sujeito ao registro de patente?

( ) Sim

(X) Não

A obra continua protegida conforme a Lei Direito Autoral.

Belém(PA), 22/06/2020

Assinatura do Autor:



## RESUMO

**Mendes da Motta, C. (2020). Análise Paramétrica do comportamento do *zebrafish* no Labirinto em Cruz com Rampa. Dissertação de Mestrado. Programa de Pós-Graduação em Teoria e Pesquisa do Comportamento. Belém-PA, 44p.**

Os modelos animais não humanos têm sido uma ferramenta útil na compreensão da ansiedade e no desenvolvimento de tratamentos para esta psicopatologia. Estudos paramétricos ajudam a garantir e aumentar a validade destes modelos, na medida em que identificam quais parâmetros são relevantes na produção dos comportamentos ansiosos. O Labirinto em Cruz com Rampa (LCR) é uma proposta de modelo animal de ansiedade para peixes, adaptado a partir do Labirinto em Cruz Elevado. O presente estudo consistiu em uma análise paramétrica da resposta do *zebrafish* no LCR, avaliando o efeito do sexo dos animais e da manipulação dos parâmetros inclinação da rampa, nível de luz e largura dos braços do aparato. Os resultados mostraram que os animais têm preferência pelos braços planos em detrimento dos braços com rampa, independente do sexo, inclinação, luz ou largura, que o nível de iluminação em 700 lux aumenta a atividade exploratória geral, e que a inclinação da rampa em 34,43° aumenta o número de entradas nos braços planos. O LCR parece ser um modelo válido para o estudo da ansiedade com *zebrafish* e as medidas padrão do aparato parecem adequadas.

**Palavras-chave:** Labirinto em cruz com rampa, *zebrafish*, ansiedade, modelos animais

## ABSTRACT

**Mendes da Motta, C. (2020). Parametric Analysis of zebrafish behavior in the Elevated Plus Maze with Ramp. Masters Dissertation. Postgraduate Program in Theory and Research of Behavior. Belém-PA, 44p.**

Animal models have been a useful tool in the study and treatment of anxiety. Parametric studies are important to ensure these models validity since they help to identify which parameters of the model are relevant to produce anxiety-like behaviors. The Plus-maze with Ramp is an anxiety model for fishes, adapted from the Elevated Plus-maze with Ramp. The present study consists of a parametric analysis of the *zebrafish's* response in the Plus-Maze with Ramp, evaluating the effects of sex, ramp inclination, light level and arms width. Results showed that, regardless of any manipulation in the evaluated parameters, the animals preferred the flat arms instead of arms with ramp, that the light level of 700 lux increased the animal's general exploratory behavior and that the ramp inclination of 34,43° increased the total number of entries in the flat arms. The plus-maze with Ramp seems to be a valid model for the study of anxiety in fish and the standard measures of the apparatus seems adequate.

**Key-words:** Plus-maze with ramp, zebrafish, anxiety, animal model

## SUMÁRIO

<b>RESUMO</b> .....	7
<b>ABSTRACT</b> .....	8
1. INTRODUÇÃO.....	10
1.1. Modelo animais de ansiedade.....	10
1.2. Modelos de ansiedade com roedores e peixes.....	11
1.3. Análises paramétricas.....	13
1.4. Zebrafish o estudo da ansiedade.....	15
2. OBJETIVO GERAL.....	16
3. MÉTODO.....	16
3.1. Sujeitos e manutenção.....	16
3.2. Equipamentos.....	16
3.3. Aparato.....	17
3.4. Medidas comportamentais.....	17
3.5. Análise de dados.....	19
4. RESULTADOS.....	21
4.1. Teste de Aquário Plano.....	21
4.2. Padrão Exploratório.....	22
4.2.1. Sexo.....	22
4.2.2. Inclinação da rampa.....	23
4.2.3. Nível de luz.....	25
4.2.4. Largura.....	26
4.3. Etograma.....	27
4.3.1. Sexo.....	27
4.3.2. Inclinação da Rampa.....	28
4.3.3. Nível de Luz.....	30
4.3.4. Largura.....	32
5. DISCUSSÃO.....	34
6. CONCLUSÕES.....	39
REFERÊNCIAS.....	40

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1. Modelos animais e ansiedade

Um modelo pode ser entendido como a redução de um fenômeno complexo a uma forma ideal e simplificada, preservando os principais elementos definidores do fenômeno (Gouveia e Brito, 2015). Na psicologia, isto possibilita um nível mais elevado de controle experimental e facilita o estudo destes elementos. A psicopatologia humana envolve componentes comportamentais, fisiológicos e neuroquímicos complexos e os modelos animais têm se mostrado uma alternativa para o estudo deste fenômeno, sendo utilizados nas neurociências, psicofarmacologia e ciências comportamentais em geral.

Os modelos animais envolvem procedimentos conduzidos com uma espécie objetivando estudar fenômenos ocorridos em outra espécie. No que tange à psicopatologia, procura-se desenvolver nos animais síndromes que se assemelhem de alguma forma às humanas para compreender os aspectos envolvidos nas mesmas (McKinney, 1984). Estas “síndromes” são caracterizadas pela produção de estados específicos nos animais utilizados, envolvendo alterações comportamentais e fisiológicas, a partir da manipulação de determinados parâmetros do modelo.

Para que um modelo possa cumprir aquilo a que se propõe, deve englobar características relevantes do transtorno que pretende mimetizar (Guerra e Silva, 2002). A literatura aponta que um modelo é válido quando tem validade de face, ou seja, quando os comportamentos observados em humanos e animais são análogos, validade preditiva, avaliada a partir da seletividade a determinadas classes de drogas e do potencial para gerar novos conhecimentos, e validade de constructo, relacionada à similaridade teórica acerca dos processos subjacentes envolvidos nos modelos e em humanos (Overall, 2000; Belzung e Griebel, 2001; Gouveia e Britto, 2015).

Dentre as psicopatologias, os transtornos de ansiedade são a condição mais frequentemente diagnosticada em humanos, em todas as faixas etárias (Hales et al. 2008), o que demanda o desenvolvimento constante de novas possibilidades de tratamento. Além disso, para uma compreensão mais abrangente desta psicopatologia, é necessário que o próprio constructo “ansiedade” seja progressivamente aperfeiçoado em seus aspectos fisiológicos, neuroquímicos, comportamentais e evolutivos (Maximino, Brito & Gouveia, 2010) e para a identificação destes mecanismos neurobiológicos subjacentes aos transtornos ansiosos, abordagens conceitual e metodologicamente inovadoras são essenciais (Andrade, Zangrossi & Graeffi, 2013; Stewart e Kalueff, 2014).

Os modelos animais têm constituído uma ferramenta essencial nas pesquisas voltadas para o desenvolvimento de psicoativos importantes no tratamento e na compreensão do fenómeno da ansiedade. Por meio deles, tem sido possível traçar importantes paralelos neurofisiológicos, neuroquímicos e comportamentais entre os organismos utilizados e os seres humanos, uma vez que a ansiedade é compreendida enquanto um traço adaptativo selecionado em diferentes formas de vida pela sua importância na evitação de situações perigosas ou potencialmente perigosas, mantendo uma consistência inter-específica de seus padrões evolutivos (Barlow, 2000; Brown, Kotler, & Bouskila, 2001; Maximino, Brito & Gouveia, 2010; McNaughton & Corr, 2004; Rodgers, Cao, Dalvi, & Holmes, 1997).

Os modelos de ansiedade podem ser de dois tipos: aprendidos ou sem necessidade de aprendizagem sendo que estes envolvem respostas específicas dos animais perante a apresentação de uma situação inatamente aversiva, envolvendo fatores como a novidade do ambiente, a presença de um predador, iluminação excessiva, dentre outros (Silva, 2003). A novidade do ambiente implicaria em um conflito, também presente em situações naturais, que envolve a incerteza quanto à presença de ameaças e a necessidade de explorar o ambiente novo à procura de alimentos ou parceiros aproximando-se da fonte do perigo potencial (McNaughton e Corr, 2004). Nesse contexto, a ansiedade ao entrar em um novo ambiente envolveria paralelamente comportamentos de avaliação de risco (aproximação cautelosa) e de evitação/esquiva em relação aos elementos ansiogênicos presentes no ambiente desconhecido. Desta forma, os modelos são desenvolvidos de modo a evocar simultaneamente estes conjuntos de respostas nos organismos escolhidos.

## 1.2. Modelos de ansiedade com roedores e peixes

Existem diversos modelos disponíveis para o estudo das respostas de ansiedade em animais não humanos. Em roedores, pode-se citar, por exemplo, o Campo-Aberto (Hall & Ballachey, 1932), o Claro-Escuro (Crawley & Goodwin, 1980) e o Labirinto em Cruz Elevado (LCE). Belovicova et al (2017) descrevem o LCE, desenvolvido por Handley & Mithani (1984), como um dispositivo elevado a aproximadamente 45 cm do chão, com quatro braços dispostos em formato de cruz e uma zona central no meio. Dois braços opostos possuem paredes frontais e laterais e os outros dois braços são abertos. O teste normalmente dura 5 minutos, tempo suficiente para iniciar a habituação (Pellow et al, 1985; Calvo-Torrent, Brain & Martinez, 1999). Tipicamente, o roedor entra mais vezes e passa a maior parte da duração do teste nos braços fechados. Nos braços

abertos apresenta mais comportamentos de defecação, congelamento e imobilidade, dentre outros. Acredita-se que essas medidas espaço-temporais e comportamentais sejam diretamente proporcionais aos níveis de ansiedade do animal, a partir dos resultados obtidos em testes de validação farmacológica (Treit et al., 1993; Rodgers & Shepherd, 1993; Bertoglio & Carobrez, 2004, dentre outros), e que um aumento no tempo de permanência nos braços abertos indique uma diminuição nos níveis de ansiedade (Carola et al., 2002).

Considerando que os processos que medeiam a ansiedade compartilham uma base bioquímica e anatômica e que esta base parece conservada em todos os vertebrados (Gouveia et al., 2006) os testes desenvolvidos para roedores têm servido como referência para o planejamento de modelos específicos para peixes, adaptando-se as características relevantes dos labirintos em aquários que reproduzam os elementos desencadeadores de ansiedade. De acordo com Walsh-Monteiro et al. (2016) os principais testes adaptados são: teste de Preferência Claro-Escuro, teste de Campo-Aberto e teste de Mergulho em Tanque Novo.

O teste de Preferência Claro-Escuro envolve um tanque metade preto, metade branco, no qual é realizada a mensuração do número de entradas e do tempo de permanência do peixe em cada compartimento, além do registro de um etograma comportamental que inclui timotaxia, congelamento e nado errático (Maximino et al, 2010; Blaser & Peñalosa, 2011). O teste de Mergulho em Tanque Novo, proposto por Gerlai, Lahav e Rosenthal (2000), envolve a mensuração dos comportamentos de mergulhar e permanecer no fundo do tanque, bem como do comportamento exploratório do peixe em relação aos níveis superiores do aquário, tendo sido observado em diversos estudos uma permanência de 70-85% no fundo do tanque ao longo do primeiro minuto e um aumento gradual da exploração da parte superior no decorrer do teste (Maximino et al, 2010).

Walsh-Monteiro et al. (2016) propuseram um novo modelo, adaptado a partir do LCE e incluindo elementos do teste de Mergulho em Tanque Novo: o Labirinto em Cruz com Rampa (LCR). O aparato utilizado consiste em um aquário com formato de cruz, no qual dois braços são planos (opostos um ao outro) e os outros dois braços possuem rampas com 6 cm de altura no ponto mais alto, além de um compartimento central que une os quatro braços do labirinto. Nos primeiros testes desenvolvidos no LCR, foi demonstrada uma preferência (avaliada pelo número de entradas e tempo de permanência nos compartimentos) pelos braços planos em detrimento dos braços com rampas, resultado análogo aos dados obtidos com roedores no LCE. Além dos resultados iniciais favoráveis, o Labirinto em Cruz com Rampa pode ser considerado uma proposta promissora por possibilitar não somente a observação do deslocamento do animal em relação à

entrada e saída dos braços, mas também de seu deslocamento entre níveis mais profundos e níveis superiores (como no teste de Mergulho em Tanque Novo), permitindo análises posteriores que cruzem estas informações.

### 1.3. Análises paramétricas

Maximino et al (2010) apontam que o refinamento dos modelos animais de ansiedade precisa ser uma atividade contínua e sugerem que estudos de validação e pesquisas paramétricas devem contribuir para este objetivo. Os estudos de validação farmacológica consistem na administração de drogas ansiolíticas e/ou ansiogênicas e posterior avaliação do efeito sobre o comportamento do animal. Considera-se um resultado favorável à validade do teste a redução/aumento dos comportamentos ditos ansiosos de acordo com a droga administrada. Já os estudos paramétricos consistem na manipulação e controle de diversos parâmetros (do aparato, dos organismos, das condições de aplicação do teste, etc) para determinar quais destes parâmetros tem relevância na produção dos efeitos observados no organismo e quais as condições ideais de aplicação do teste de acordo com os objetivos do estudo, uma vez que, em relação a comportamentos ansiosos, índices de linha de base muito baixos são pouco úteis para detecção de efeitos ansiolíticos, enquanto índices muito elevados são pouco úteis para detecção de efeitos ansiogênicos (Rodgers e Cole, 1993).

Diversos estudos paramétricos foram conduzidos com o Labirinto em Cruz Elevado (LCE), um dos testes que baseia o Labirinto em Cruz com Rampa. Verificou-se o efeito de fatores como a re-exposição ao teste, sexo dos animais, nível de iluminação, altura do aparato, período do dia em que foi realizado o teste, dentre outros (e.g. Pellow et al, 1985; Lister, 1987; Johnston e File, 1991; Falter et al, 1992; Treit et al, 1992; Griebel et al, 1993). Pellow et al (1985) também verificaram a influência da espécie do rato e de sua posição inicial no teste, para os quais não foram observadas diferenças significativas. Lister (1987) validou o teste para camundongos, utilizando um aparato proporcionalmente menor que o original em todas as medidas, obtendo efeitos semelhantes a estudos anteriores. Falter et al (1992) verificaram o efeito de uma configuração diferenciada do labirinto (com os braços semelhantes não opostos um ao outro) e exposição anterior à condições aversivas, observando que nenhuma manipulação no aparato influenciou significativamente no comportamento enquanto o efeito das exposições aversivas variou de acordo com a droga investigada. Já Treite et al (1992) investigaram o efeito da altura da mureta do braço fechado,

observando que este fator influencia nas medidas obtidas (quanto maior a mureta, maior a preferência pelo braço fechado).

Apesar do amplo espectro de pesquisas que se dedicaram a investigar os parâmetros relevantes no LCE, alguns estudos apontaram uma significativa variação na sensibilidade farmacológica obtida nos experimentos conduzidos pelos laboratórios que utilizaram o modelo, sugerindo que isso pode ter ocorrido em função de variações metodológicas entre um estudo e outro (Griebel et al., 1993; Hogg, S., 1996; Rodgers e Dalvi, 1997). Mudanças sutis em determinados fatores experimentais ou diferentes combinações entre variáveis importantes, tais como: variáveis orgânicas (por exemplo, a raça ou o sexo dos animais), variáveis de procedimento (elevação do labirinto, iluminação sobre o mesmo, presença do experimentador, etc.) e variáveis do aparato (altura em relação ao chão ou altura da mureta dos braços fechados, por exemplo), podem ter influenciado na resposta dos animais a diferentes agentes farmacológicos.

Já em relação ao teste de Mergulho em Tanque Novo, o segundo teste que baseia o Labirinto em Cruz com Rampa, a maior parte dos estudos descreve manipulações farmacológicas e a verificação de seu efeito sobre o tempo de permanência do animal no fundo do tanque (e.g. Suboski et al, 1990; Bencan, Sledge e Levin, 2009; Egan et al, 2009; Sackerman et al, 2010; Bass e Gerlai, 2008; Bencan e Levin, 2008; Levin, Bencan e Cerutti, 2006). Entretanto, apesar dos muitos estudos nesse sentido, a validação farmacológica do modelo é comprometida em função da variação e cruzamento entre os parâmetros utilizados em cada estudo, incluindo fatores como: a linhagem de *zebrafish* utilizada, duração da sessão, dimensões do tanque, nível de iluminação e condições de habitação anteriores – o que Bencan, Sledge e Levin (2009) já apontaram como uma variável relevante para a manutenção do fator de novidade do teste. Assim como foi apontado para o LCE por Rodgers e Dalvi (1997), também não parece haver uma padronização na aplicação do teste de Mergulho em Tanque Novo, o que pode ter influenciado nos resultados obtidos dificultando afirmar que as diferenças observadas se deram somente em função da droga administrada.

No trabalho inicial com o Labirinto em Cruz com Rampa, Walsh-Monteiro et al (2016) realizaram validação farmacológica com clonazepam e álcool, drogas de estabelecido efeito ansiolítico, e também verificaram o efeito de diferentes tempos de duração das sessões (5 minutos, 10 minutos e 15 minutos) e da altura da coluna d'água (1 cm, 2 cm e 4 cm, no ponto mais alto da rampa). Foi observado que independente dos parâmetros adotados, os animais apresentam preferência pelos braços planos, em seguida pelo compartimento central, entrando e permanecendo pouco tempo da sessão nos braços com rampas. Para a menor altura da coluna

d'água, 1 cm no ponto mais alto da rampa, observou-se um aumento progressivo no tempo de permanência no compartimento plano diretamente proporcional ao aumento na duração da tentativa, o que os autores entenderam como um efeito reverso ao da habituação, ou seja, quando a água estava mais rasa a aversividade do ambiente aumentou com o tempo. Também foi observada diferença em relação ao tempo no plano entre 2 cm e 4 cm, indicando que a altura da coluna d'água pode ser um parâmetro importante neste modelo.

#### 1.4. *Zebrafish* e o estudo da ansiedade

Dentre os modelos envolvendo peixes, aqueles que utilizam o teleósteo tropical *danio rerio*, tradicionalmente chamado paulistinha, bandeira, paulista, peixe-zebra ou *zebrafish*, têm recebido destaque em função de significativas analogias genéticas, endócrinas e anatômicas tanto com roedores, quanto com seres humanos em relação a padrões ansiosos (Gerlai, 2014; Howe et al., 2013; Walsh-Monteiro et al., 2016) sendo cada vez mais utilizados nas neurociências (Ahmed et al., 2011; Blaser et al, 2010). De modo geral, em comparação a roedores, peixes são menos custosos e de manutenção mais fácil (Barros et al., 2008; Champagne et al., 2010); dentre os estudos envolvendo estes animais, cerca de 25% utilizaram o *zebrafish* (Gouveia e Brito, 2016).

Em uma breve revisão de estudos comportamentais com peixes, Gouveia, Maximino e Britto (2016) identificaram que aqueles que utilizaram o *zebrafish* correspondiam a aproximadamente 25% dos estudos.

Nos modelos de ansiedade envolvendo *zebrafish*, as medidas comportamentais utilizadas têm sido: 1) os padrões exploratórios, que incluem o tempo de permanência do animal em cada compartimento do labirinto, proporcionalmente em relação ao tempo total da tentativa, e o número de entradas em cada compartimento e 2) etograma de nado do animal, que inclui os comportamentos de timotaxia, congelamento e nado errático (Maximino et al, 2010).

Estas medidas coincidem com o catálogo comportamental para *zebrafish* proposto por Kalueff et al (2012), no qual os autores classificam comportamentos ansiosos como: comportamento complexo evocado por ambientes/estímulos perigosos ou potencialmente perigosos, incluindo exploração reduzida, preferência pelo fundo (mergulho), timotaxia, preferência pelo escuro, *freezing*, mudança na coloração corporal e nado errático.

## 2. OBJETIVO GERAL

Dado que:

1. O labirinto em cruz com Rampa é um modelo de ansiedade proposto para o *zebrafish*;
2. Este modelo se mostrou sensível a algumas drogas, mas sua padronização ainda carece de estudos paramétricos;
3. O desenvolvimento de novos modelos é atividade necessária para o desenvolvimento desta área de estudos, este trabalho visa:

Aumentar a validade do Labirinto em Cruz com Rampa e a sua padronização para estudos futuros, de modo a definir quais parâmetros do modelo são relevantes na produção do comportamento tipo-ansiedade nos animais utilizados e quais destes parâmetros precisam ser diretamente controlados com vistas a melhor uso. Neste sentido, este estudo objetivou realizar uma análise paramétrica da resposta do *zebrafish* no Labirinto em Cruz com Rampa.

## 3. MÉTODO

### 3.1. Sujeitos e manutenção

Foram utilizados 90 *zebrafish* adultos, de ambos os sexos, adquiridos em lojas especializadas e mantidos em aquários coletivos (n=20) de 30L, medindo 10x27cm de profundidade, armazenados em estante com sistema de filtragem mecânica, química e biológica (Techniplast, Itália), com pH  $7,5 \pm 0,5$ , temperatura  $28 \pm 2^\circ\text{C}$  e ciclo de iluminação controlado (14/10h, com início às 6:00). Os animais eram alimentados com ração Floculada Tetra, uma vez ao dia, no período da manhã. O biotério onde os animais eram mantidos fica localizado no Laboratório de Neurociências e Comportamento, localizado no Núcleo de Teoria e Pesquisa do Comportamento, na Universidade Federal do Pará.

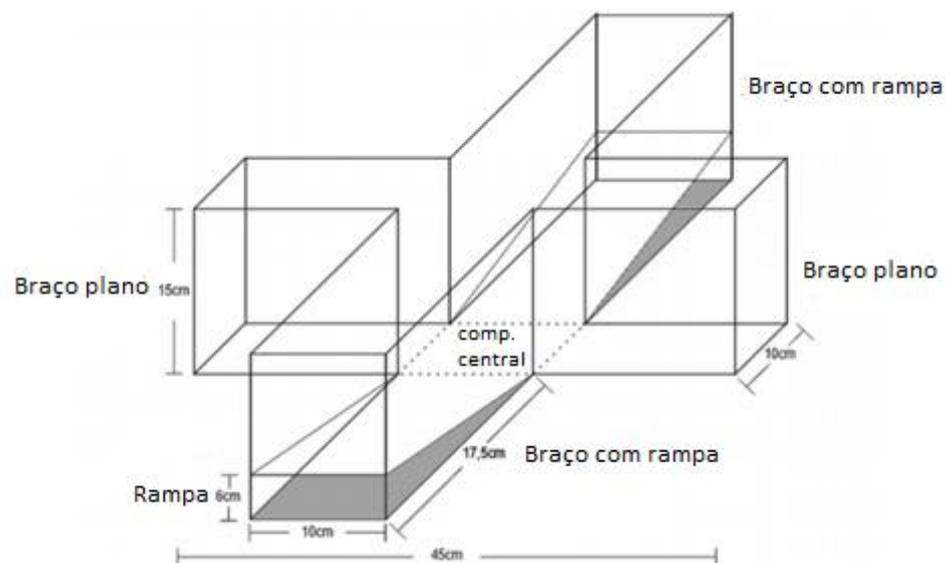
### 3.2. Equipamentos

Foram utilizadas filmadoras digitais SONY JVC e DCR-PJ para fazer o registro das sessões e posterior análise das tentativas a partir das filmagens. Também foi utilizado um luxímetro (Lux

Light Meter Pro) para medir o nível de iluminação acima do aparato. Para transcrição de parte das medidas de padrão exploratório, foi utilizado o *software* Zebtrack, desenvolvido na plataforma Matlab, descrito em Pinheiro-da-Silva et al., 2017.

### 3.3. Aparato

Utilizou-se o Labirinto em Cruz com Rampa (figura 1), que consiste em um aquário feito de vidro no formato de uma cruz, com quatro braços retangulares unidos por um compartimento central. Dois braços, oposto entre si, possuem rampas removíveis e os outros dois braços são planos. As medidas padrão do aparato são: braços com 17,5 cm de comprimento, 10 cm de largura e 15 cm de altura, rampas com 6 cm de altura no ponto mais alto (equivalente a uma inclinação de  $18,66^\circ$ ) e compartimento central medindo 5 cm x 5 cm.



**Figura 1:** Diagrama tridimensional do Labirinto em Cruz com Rampa, ilustrando os braços com e sem rampas, o compartimento central e suas medidas padrão. (Modificado a partir de Walsh-Monteiro et al, 2016).

### 3.4. Medidas comportamentais

As medidas comportamentais adotadas foram divididas em dois grupos: 1) padrão exploratório, que incluiu o tempo de permanência e o número de entradas em cada compartimento do LCR e 2) etograma de nado, que incluiu os comportamentos de timotaxia, *freezing* e nado errático. Estas medidas estão descritas na tabela 1.

**Tabela 1:** Medidas comportamentais registradas nas sessões.

<b>Medidas Comportamentais</b>	<b>Comportamento</b>	<b>Descrição</b>
	Permanência na rampa	Tempo (s) que o animal permanece nos braços com rampa do labirinto, em relação à duração total da tentativa.
	Permanência no plano	Tempo (s) que o animal permanece nos braços planos do labirinto, em relação à duração total da sessão.
<b>Padrão Exploratório</b>	Permanência no centro	Tempo (s) que o animal permanece no compartimento central do labirinto, em relação à duração total da sessão.
	Entradas na rampa	Número total de vezes que o animal entrar nos braços com rampas.
	Entradas no plano	Número total de vezes que o animal entrar nos braços planos.
	Timotaxia	Proporção de tempo (%) da tentativa que o animal permanecer em nado sustentado a uma distância

**Etograma de nado***Freezing*

de até 2 cm da parede.

Proporção de tempo (%) da tentativa que o animal permanecer imóvel.

Nado errático

Proporção de tempo da tentativa (%) que o animal permanecer em nado transitório e instável com duração menor que 2 s.

**3.5. Procedimentos**

Um procedimento padrão foi adotado em todos os experimentos realizados, que consistia em transportar por meio de uma rede, individualmente, os sujeitos dos aquários coletivos no qual eram mantidos até o compartimento central do Labirinto em Cruz, onde eram colocados no início das tentativas e liberados para explorar livremente, durante 5 minutos. Ao término da sessão o sujeito era retirado e transportado novamente até o aquário coletivo. A cada nova sessão a água do aparato era inteiramente trocada por água retirada diretamente do sistema de filtragem automático, antes que um novo sujeito fosse inserido, de modo a evitar que a presença de sinalizadores liberados pelo animal anterior influenciasse no desempenho do animal seguinte.

Foram conduzidos 5 experimentos, no total. No experimento 1 realizou-se um Teste de Aquário Plano (n=10), no qual as rampas foram removidas do aparato que ficou, portanto, com os quatro braços planos. No experimento 2, avaliou-se o efeito do sexo sobre as medidas comportamentais, a partir da separação dos sujeitos em um grupo de machos (n=10) e um grupo de fêmeas (n=10). No experimento 3, avaliou-se o efeito da variação na inclinação da rampa a partir de dois grupos: inclinação 9,73° (n=10) e inclinação 34,43° (n=10). No experimento 4, avaliou-se o efeito do nível de iluminação a partir dos grupos 700 lux (n=10) e 2.800 lux (n=10). E, por fim, no experimento 5 avaliou-se o efeito da largura dos braços do aparato a partir dos grupos: largura dos braços em 5 cm (n=10) e 20 cm (n=10). Para o experimento 2, no qual avaliou-

se o efeito do sexo, todos os parâmetros do Labirinto foram mantidos de acordo o padrão, e para os experimentos 3, 4 e 5, manipulou-se somente o parâmetro em questão, conforme ilustrado na tabela 2.

**Tabela 2:** Experimentos 2, 3, 4 e 5 de acordo com o parâmetro manipulado e a configuração dos demais parâmetros.

Experimento	Parâmetro manipulado	Demais parâmetros			
		Sexo	Rampa	Luz	Largura
Experimento 2	Sexo	Machos (10) Fêmeas (10)	18,66º	1400 lux	10 cm
Experimento 3	Inclinação da rampa	Ambos	9,73º (10) 34,43º (10)	1400 lux	10 cm
Experimento 4	Nível de Luz	Ambos	18,66º	700 lux 2800 lux	10 cm
Experimento 5	Largura dos braços	Ambos	18,66º	1400 lux	5 cm 20 cm

### 3.6. Análise de dados

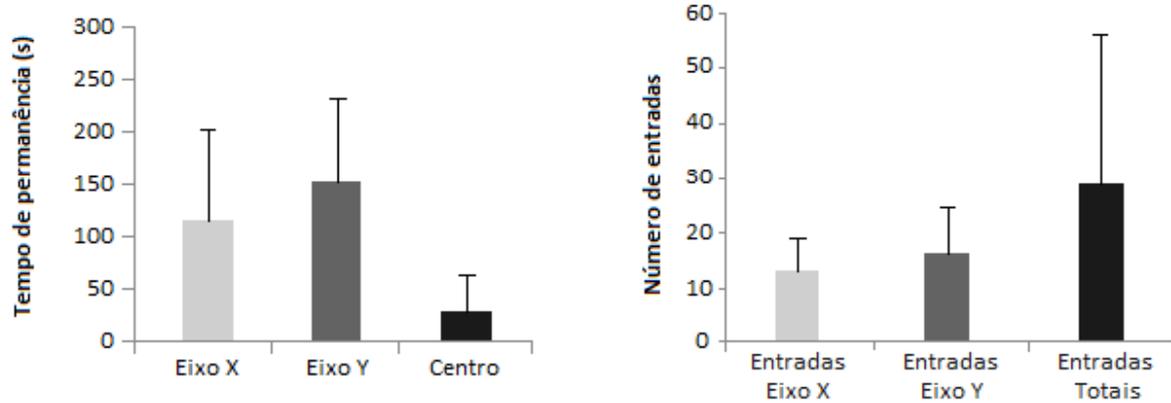
O tempo de permanência foi obtido por meio da análise das gravações das sessões no programa Zebtrack (Pinheiro-daSilva et al., 2017), que realiza o rastreamento do deslocamento do animal no aparato e fornece o registro do tempo de permanência total em segundos, em cada compartimento. O registro do número de entradas e do etograma de nado foi realizado manualmente pela pesquisadora a partir da observação das filmagens das sessões. Todos os dados foram tabulados em planilhas eletrônicas para análise estatística posterior.

A análise estatística consistiu na determinação da normalidade, pelo teste de Komoroff-Sminoff, seguido pela aplicação do teste ANOVA de uma via e pós teste de Tuckey para as medidas de padrão exploratório (tempo de permanência e número de entradas nos compartimentos) em função dos parâmetros manipulados. Para os dados que não apresentaram distribuição normal, utilizou-se o teste de Kruskal-Wallis e o pós-teste de Dunn. Na análise dos dados relativos ao etograma, foram aplicados os testes U de Mann-Whitney e Kruskal-Wallis para amostras independentes.

## 4. RESULTADOS

### 4.1. Teste de Aquário Plano

Para o teste de Aquário Plano, dois braços opostos entre si foram considerados como Eixo X e os outros dois braços como Eixo Y. Os valores do tempo de permanência e número de entradas nos braços componentes de cada eixo foram somados. Não houve diferença significativa no tempo de permanência, nem no número de entradas entre os compartimentos quando as rampas foram removidas (Figura 2).



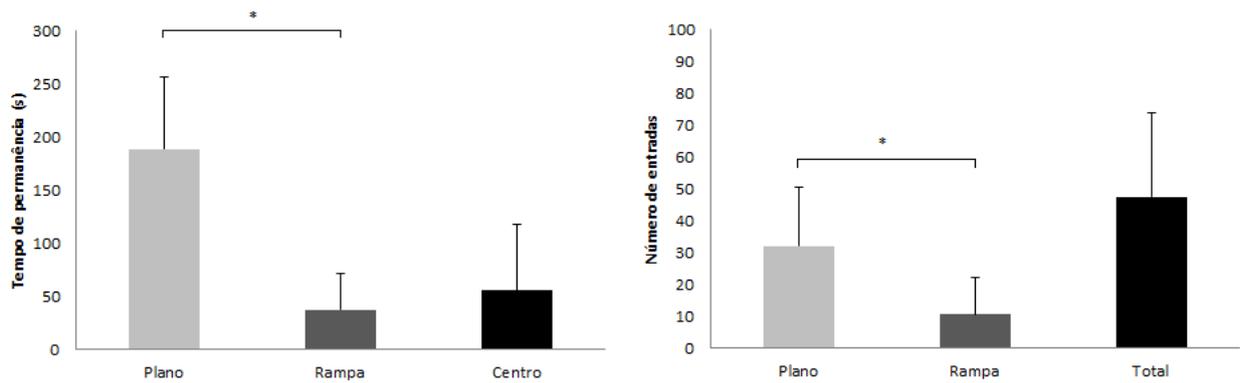
**Figura 2.** Tempo de permanência e número de entradas no Teste de Aquário Plano.

## 4.2. Padrão exploratório

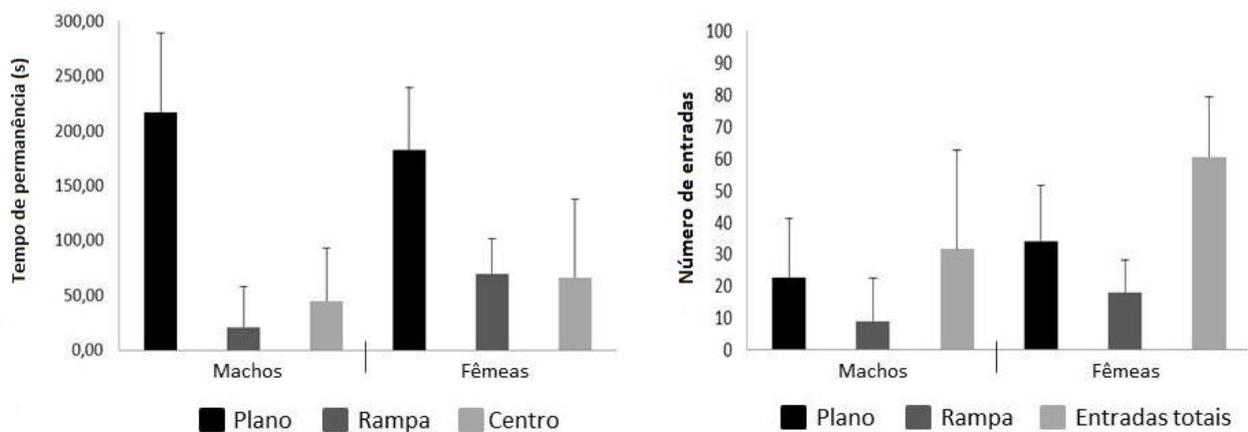
### 4.2.1. Sexo

Há diferença significativa entre o tempo de permanência nos braços planos e com rampa [ $t(38)=8,800$ ,  $p<0,001$ ], bem como no número de entradas nestes compartimentos [ $t(38)=3,441$ ,  $p=0,001$ ] sendo que os animais passam mais tempo e entram mais vezes nos braços planos (figura 3). O mesmo foi observado para todas as variações de inclinação na rampa, nível de luz e largura.

Não foi observada diferença significativa entre machos e fêmeas para nenhuma das medidas comportamentais adotadas: tempo de permanência nos braços planos [ $F(1,18)=3,167$ ,  $p=0,092$ ], com rampa [ $F(1,18)=1,424$ ,  $p=0,248$ ], centro [ $F(1,18)=1,501$ ,  $p=0,236$ ], entradas nos braços planos [ $F(1,18)=2,064$ ,  $p=0,168$ ], com rampa [ $F(1,18)=0,689$ ,  $p=0,418$ ] e totais [ $F(1,18)=1,959$ ,  $p=0,179$ ] (Figura 4). Considerando este resultado, e que para esta etapa os demais parâmetros do labirinto (inclinação da rampa, nível de luz e largura) foram mantidos de acordo com o padrão, estes dados foram utilizados como medida de controle para os testes seguintes, sem considerar diferenças sexuais.



**Figura 3.** Tempo de permanência e número de entradas para os 20 sujeitos utilizados no experimento 2 (machos e fêmeas) \*=  $p < 0,001$  (Teste-t).

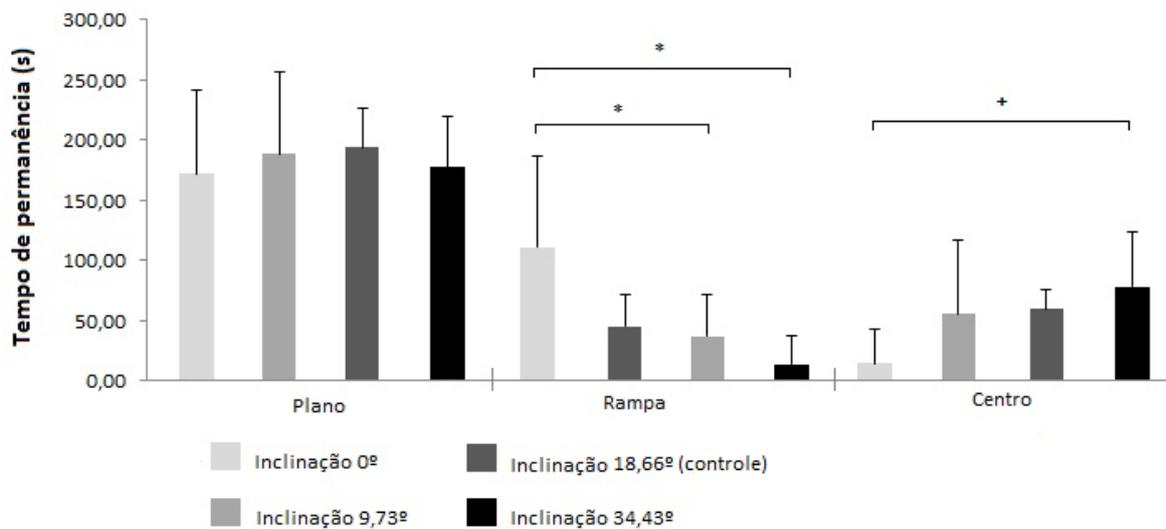


**Figura 4.** Tempo de permanência e número de entradas em cada compartimento para o teste sexo. Não houve diferença significativa entre machos e fêmeas. (Anova ou Kruskal-Wallis, a depender da normalidade).

#### 4.2.2. Inclinação da rampa

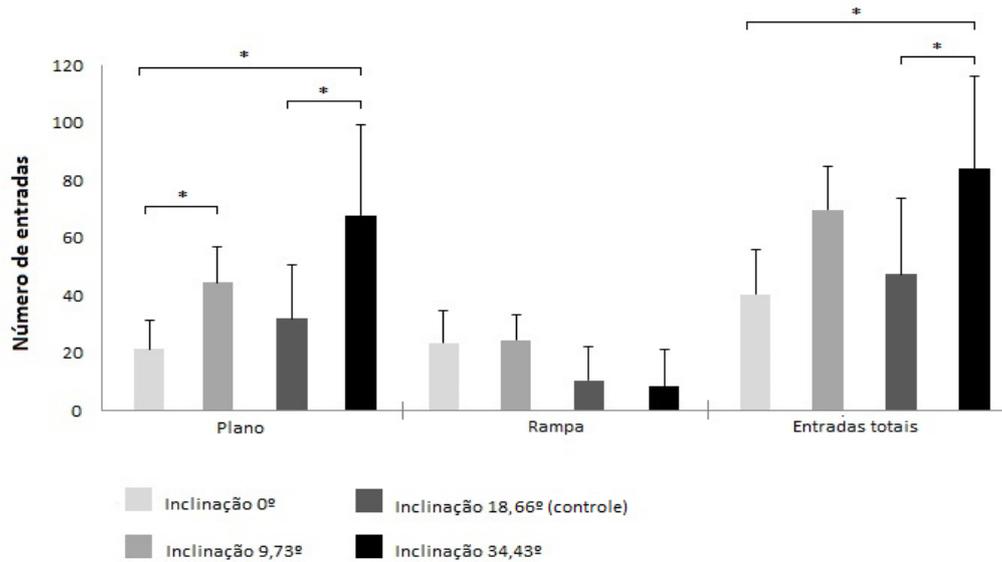
A variação na inclinação das rampas não apresentou diferença significativa entre os grupos no tempo de permanência nos braços planos [ $H(3)=2,148$ ,  $p=0,542$ ], porém, esta diferença ocorreu no tempo de permanência nos braços com rampa [ $H(3)=15,767$ ,  $p=0,001$ ] entre os grupos inclinação  $0^\circ$  e inclinação  $34,43^\circ$ , e os grupos inclinação  $0^\circ$  e inclinação  $18,66^\circ$  (Teste de Dunn) (Figura 5). Esta diferença não ocorre entre os grupos inclinação  $0^\circ$  e inclinação  $9,73^\circ$  ou entre as inclinações  $9,73^\circ$ ,  $18,66^\circ$  e  $34,43^\circ$  entre si. Em relação ao tempo de permanência no

compartimento central, foi identificada diferença significativa [ $H(3)=12,896$ ,  $p=0,005$ ] entre os grupos inclinação  $0^\circ$  e inclinação  $34,43^\circ$  (Teste de Dunn).



**Figura 5.** Tempo de permanência em cada compartimento nos testes de inclinação da rampa. \*=  $p < 0,001$  (Teste-t) e + =  $p < 0,05$  (Teste de Dunn).

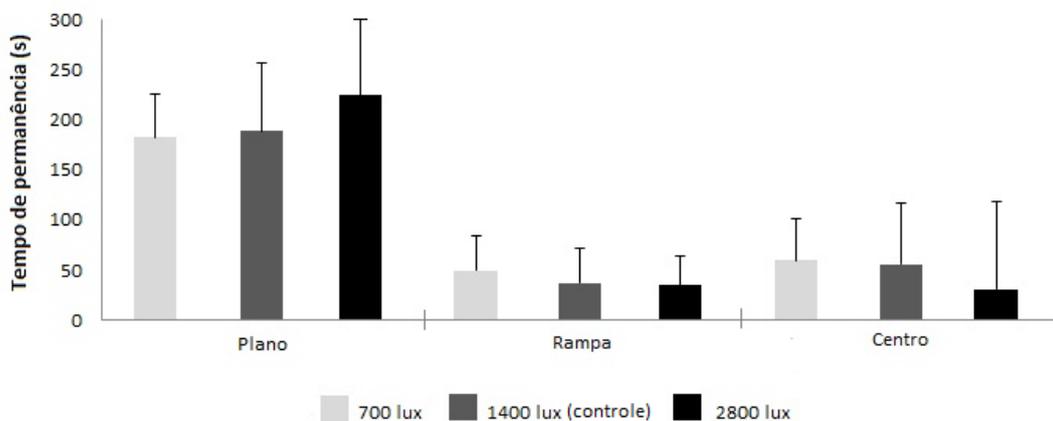
Para as medidas de entradas nos compartimentos houve diferença entre os grupos quanto ao número de entradas no plano [ $H(3)=20,731$ ,  $p=0,001$ ] (entre as inclinações  $0^\circ$  e  $34,43^\circ$ ; inclinações  $0^\circ$  e  $9,73^\circ$ ; e inclinações  $18,66^\circ$  e  $34,43^\circ$ ) (Teste Dunn) e na rampa [ $F(3,46)=2,800$ ,  $p=0,05$ ]; embora o pós-teste Dunn não tenha sido capaz de identificar especificamente onde ocorreu esta diferença, a representação gráfica sugere entre as inclinações  $0^\circ$  e  $18,66^\circ$ ; inclinações  $0^\circ$  e  $34,43^\circ$ ; inclinações  $9,73^\circ$  e  $18,66^\circ$  e inclinações  $9,73^\circ$  e  $34,43^\circ$ . Também ocorreu diferença significativa para o número de entradas total [ $F(3,49)=6,371$ ,  $p=0,001$ ] entre os grupos: inclinação  $0^\circ$  cm e  $34,43^\circ$  e inclinação  $18,66^\circ$  e  $34,43^\circ$  (Teste de Tukey) (Figura 6).



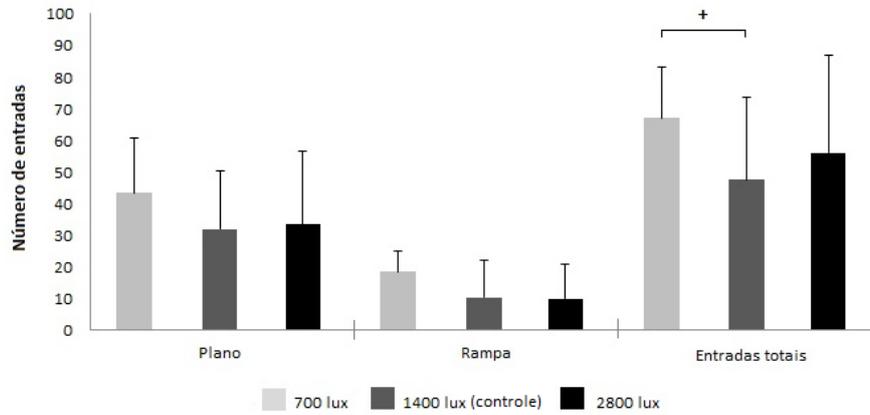
**Figura 6.** Número de entradas em cada compartimento para os testes de Inclinação da Rampa. \*=  $p < 0,001$  (Teste de Dunn).

#### 4.2.3. Nível de luz

Não há diferença significativa entre os grupos para a maioria das medidas exploratórias em função dos níveis de iluminação testados: tempos de permanência nos compartimentos plano [ $F(2,37)=0,25$ ,  $p=0,78$ ], com rampa [ $H(2)=2,08$ ,  $p=0,353$ ] e centro [ $H(2)=2,08$ ,  $p=0,353$ ] e números de entradas nos braços planos [ $F(2,37) = 0,458$ ,  $p=0,636$ ] e com rampa [ $F(2,37)=0,46$ ,  $p=0,64$ ] (Figura 7). Houve diferença somente em relação ao número de entradas total [ $F(2,37)=3421$ ,  $p=0,04$ ] entre os grupos 700 lux e 1400 lux (Figura 8).



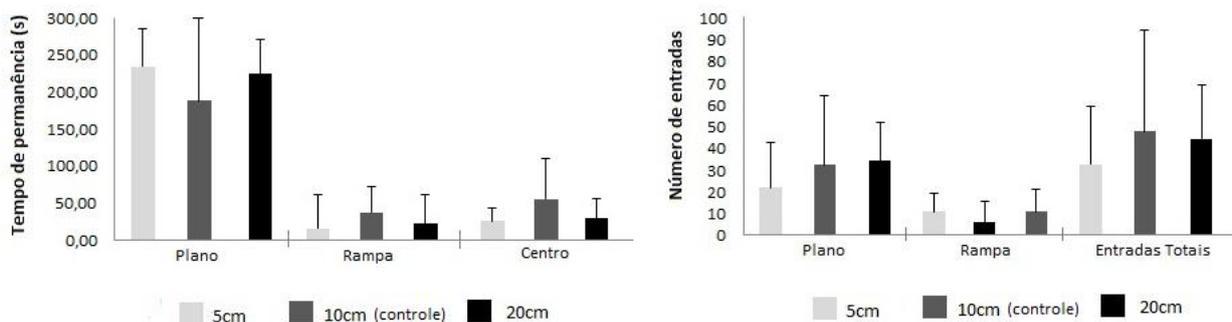
**Figura 7.** Tempo de permanência em cada compartimento para os testes com diferentes níveis de luz. Não houve diferença entre os grupos (Anova ou Kruskal-Wallis, a depender da normalidade).



**Figura 8.** Número de entradas em cada compartimento para os testes com diferentes níveis de luz. += $p < 0,05$  (pós-teste Tukey).

#### 4.2.4. Largura dos braços

A largura parece não alterar os padrões exploratórios, tanto para o tempo de permanência nos compartimentos (Plano [ $F(2,37)=1,878$ ,  $p=0,167$ ], Rampa [ $H(2)=0,0759$ ,  $p=0,963$ ] e Centro [ $H(2)=5,515$ ,  $p=0,063$ ] quanto para o número de entradas nos mesmos (Plano [ $F(2,37)=0,331$ ,  $p=0,721$ ], Rampa [ $F(2,37)=0,914$ ,  $p=0,41$ ] e Entradas totais [ $H(2)=1,580$ ,  $p=0,454$ ]) (Figura 8).

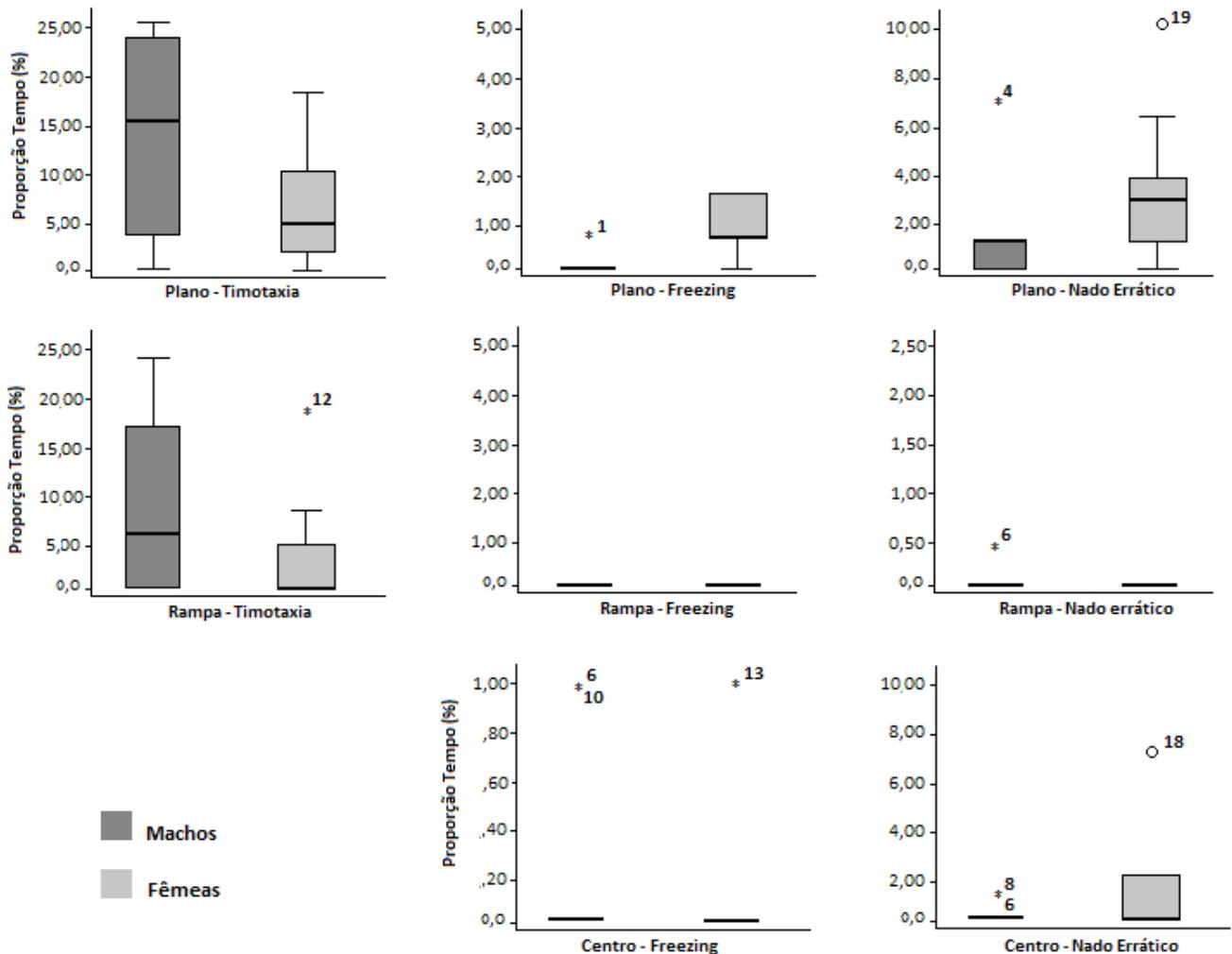


**Figura 8.** Tempo de permanência e número de entradas em cada compartimento para os testes de largura. Não houve diferença entre grupos (Anova ou Kruskal-Wallis).

### 4.3. Etograma

#### 4.3.1. Sexo

Os dados do etograma de nado em relação ao sexo estão apresentados na figura 9. Observou-se que no compartimento plano os machos passaram em média 15% do tempo total da tentativa realizando timotaxia, enquanto as fêmeas passaram em média 5% do tempo realizando este comportamento. Já os comportamentos de *freezing* e nado errático, foram mais apresentados pelas fêmeas, tendo sido observada diferença significativa entre os grupos somente em relação ao *freezing*. No compartimento com rampa, em relação à timotaxia observa-se um resultado semelhante ao compartimento plano, ou seja, os machos passaram mais tempo realizando o comportamento que as fêmeas. Já os comportamentos de *freezing* e nado errático praticamente não ocorreram neste compartimento em nenhum dos grupos. No centro, com exceção de dois machos e uma fêmea, que passaram apenas 1% do tempo total em *freezing*, a maioria dos sujeitos não apresentou este comportamento. Resultados semelhantes foram observados em relação ao nado errático: com exceção de dois sujeitos o comportamento praticamente não ocorreu em machos, enquanto para as fêmeas a ocorrência variou entre 0% e 2% do tempo da tentativa.

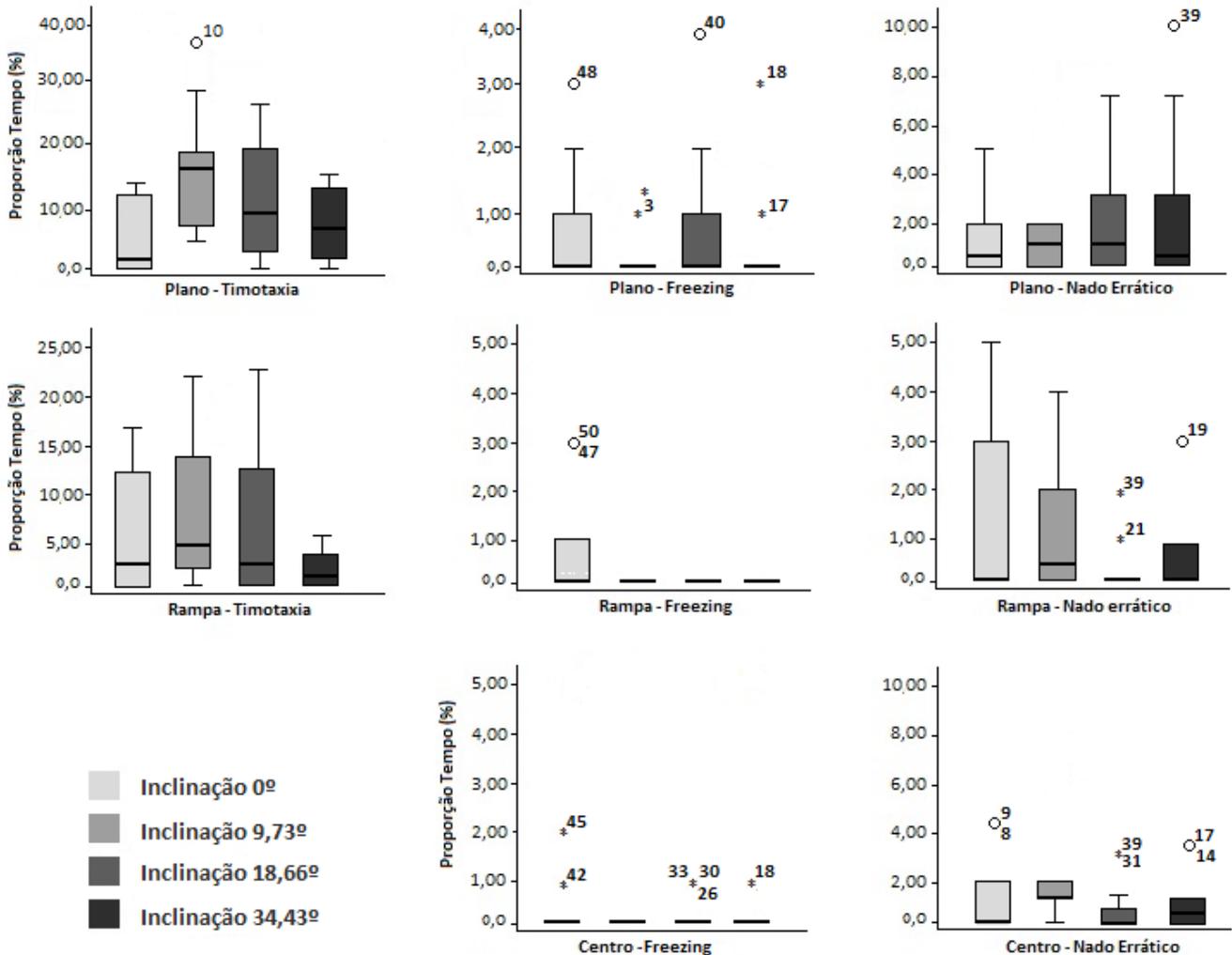


**Figura 9.** Proporção de tempo da tentativa (%) em que foram apresentados os comportamentos timotaxia, *freezing* e nado errático nos compartimentos plano, rampa e centro, por machos e fêmeas.

#### 4.3.2. Inclinação da rampa

Os dados do etograma de nado em relação à inclinação da rampa estão apresentados na figura 10. No compartimento plano, observou-se que o comportamento de timotaxia ocorreu mais no grupo para o qual a inclinação da rampa era 9,73°, havendo diferença significativa em relação aos outros grupos. Também houve diferença significativa para o comportamento de *freezing*, que ocorreu somente para as inclinações 0° e 18,66°. Já o nado errático ocorreu de forma semelhante nos grupos. No compartimento com rampa, observa-se que a timotaxia ocorre de forma semelhante entre todos os grupos, variando de 0% a aproximadamente 15% a 20% do tempo, exceto para a maior inclinação,

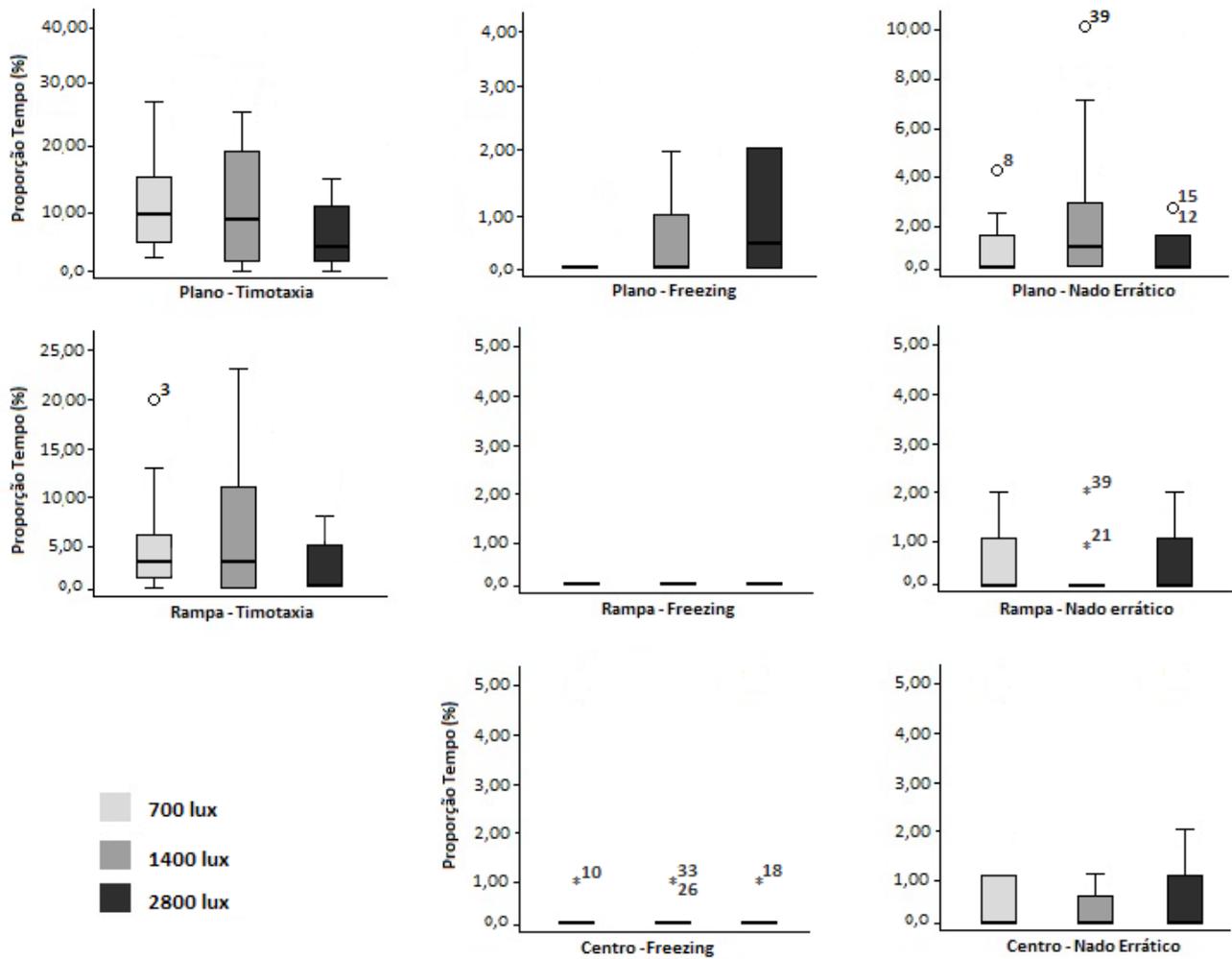
34,43°, na qual a ocorrência variou entre 0% e 5%. *Freezing* ocorreu somente para a inclinação 0°, existindo diferença significativa em relação aos demais grupos. Em relação ao nado errático na rampa, a ocorrência foi semelhante para as inclinações 0° e 9,73° (entre 0% e aproximadamente 5% do tempo) e para as inclinações 0° e 34,73° (0 a 1% do tempo). No centro, o comportamento de *freezing* foi apresentado somente por alguns indivíduos e o comportamento de nado errático teve distribuição semelhante entre os grupos (entre 0% e 2%).



**Figura 10.** Proporção de tempo da tentativa (%) em que foram apresentados os comportamentos timotaxia, *freezing* e nado errático nos compartimentos plano, rampa e centro, para a inclinação da rampa.

#### 4.3.3. Nível de luz

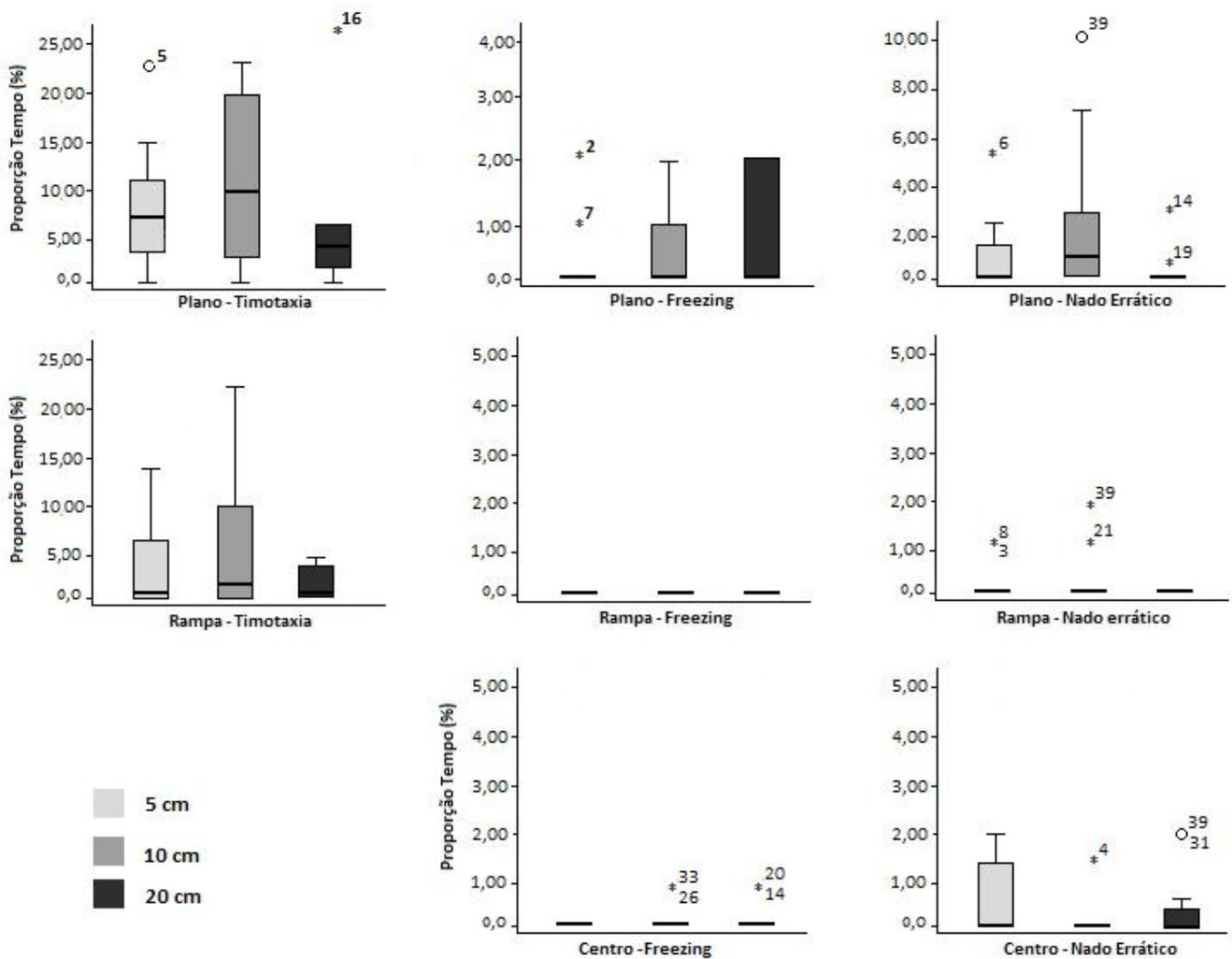
Os dados do etograma de nado em relação ao nível de luz estão apresentados na figura 11. Só ocorreu diferença significativa entre os grupos para *freezing* no compartimento plano. Este comportamento não ocorreu para o grupo com a menor iluminação no aparato, 700 lux, e para os grupos 1400 lux e 2800 lux ocorreu até 2% do tempo da tentativa. O comportamento de timotaxia foi apresentado de forma semelhante entre os grupos ocorrendo, em média, entre 5% e 10% do tempo. Nado errático variou entre 0% e, aproximadamente, 2% para os grupos, sendo que para o grupo 1400 lux ocorreu uma variação maior de até, aproximadamente, 8% do tempo. Em relação ao compartimento com rampa, o comportamento de timotaxia teve uma ocorrência menor que àquela observada no compartimento plano, o comportamento de *freezing* não ocorreu, e o nado errático ocorreu somente para os grupos 700 lux e 2800 lux (até 2% do tempo) e para apenas dois sujeitos do grupo 1400 lux. No centro, o comportamento de *freezing*, assim como na rampa, praticamente não ocorre, e o nado errático é apresentado de forma semelhante entre os grupos, com a ocorrência variando de 0% a até 2% do tempo da tentativa.



**Figura 11.** Proporção de tempo da tentativa (%) em que foram apresentados os comportamentos timotaxia, *freezing* e nado errático nos compartimentos plano, rampa e centro, para o nível de luz.

#### 4.3.4. Largura

Os dados do etograma de nado em relação à largura estão apresentados na figura 12. No compartimento plano, o comportamento de timotaxia ocorreu mais no grupo com a largura 10 cm (até 20% do tempo) e menos para a largura 20 cm (até, aproximadamente, 5% do tempo). O *freezing* ocorreu entre 0% e 2% do tempo para as larguras 10 cm e 20 cm e praticamente não ocorreu para a menor largura, 5 cm. Em relação ao nado errático no plano, ocorreu diferença significativa: aproximadamente 2% do tempo para a largura 5 cm, entre 0% e, aproximadamente, 8% do tempo para a largura 10 cm (grupo em que mais ocorreu) e praticamente nenhuma ocorrência para a largura 20 cm. No compartimento com rampa, a timotaxia ocorreu de forma semelhante ao que foi observado no compartimento plano: maior tempo de ocorrência para largura 10 cm e menor tempo para largura 20 cm. Os comportamentos de *freezing* e nado errático praticamente não ocorreram, com exceção de três sujeitos para o nado errático. No centro, *freezing* foi apresentado somente por quatro sujeitos e nado errático ocorreu entre 0% e 2% para a largura 5 cm, 0% e aproximadamente 1% para a largura 20 cm e, com exceção de um sujeito, não ocorreu para a largura 10 cm.



**Figura 12.** Proporção de tempo da tentativa em que foram apresentados os comportamentos timotaxia, *freezing* e nado errático nos compartimentos plano, rampa e centro, em relação às diferentes medidas de largura dos braços.

As diferenças significativas encontradas no etograma de nado nos experimentos 2 a 5 estão apresentadas na tabela 3 (testes U de Mann-Whitney e Kruskal-Wallis, a depender do número de grupos experimentais). Para os demais comportamentos não houve diferença estatística entre os grupos.

**Tabela 3:** Diferenças significativas observadas no etograma de nado, de acordo com o parâmetro manipulado.

Parâmetro manipulado	Comportamento/Compartimento	Índice de significância
Sexo	Freezing/Plano	0,015

Inclinação da rampa	Timotaxia/Plano	0,34
	Freezing/Rampa	0,007
Nível de luz	Freezing/Plano	0,040
Largura	Nado Errático/Plano	0,040

## 5. DISCUSSÃO

Em todos os testes realizados, com exceção do teste de Aquário Plano, houve diferença entre o tempo de permanência e o número de entradas nos compartimentos plano e com rampa. Estes resultados corroboram o entendimento de Walsh-Monteiro et al (2016) de que os braços planos seriam um paralelo aos braços fechados e os braços com rampa um paralelo aos braços abertos do LCE, sendo a preferência do *zebrafish* pelo compartimento plano também análoga à preferência pelo fundo nos Testes de Mergulho em Tanque.

A ausência desta diferença no teste de Aquário Plano reforça este entendimento, demonstrando que essa preferência não se dá por outros fatores, como o formato do labirinto e a forma como os braços estão dispostos, por exemplo. Na ausência de rampas e quando os quatro braços do labirinto possuem o mesmo nível de profundidade, a exploração dos compartimentos se dá de forma equivalente. O teste com Aquário Plano, além de ter sido uma medida de controle em relação ao LCR, também forneceu um parâmetro a mais de comparação em relação à inclinação da rampa (inclinação 0°).

Em relação aos resultados obtidos no experimento 2, teste realizado para avaliar o efeito do sexo, considerando que não houve diferença significativa entre as medidas comportamentais de machos e fêmeas, o sexo dos animais não parece influenciar a ansiedade apresentada no labirinto. Este resultado diverge dos dados obtidos com roedores no LCE por Johnston e File (1991) em um estudo no qual verificaram diferenças sexuais. Segundo as autoras, fêmeas apresentam menor aversão aos braços abertos, entrando significativamente mais vezes e passando mais tempo nos mesmos que roedores machos. Entretanto, outros estudos envolvendo diferenças sexuais obtiveram resultados que variaram em função de outros fatores investigados, como a idade dos animais (Imhof et al, 1993) e a fase do

ciclo estral em que as fêmeas estavam (Frye, Petralia & Rhodes 2000), tornando difícil afirmar se as diferenças observadas por Johnston e File (1991) se deram exclusivamente em função do sexo ou de sua interação com outras variáveis importantes não controladas pelas autoras. Considerando que os *zebrafish* utilizados neste estudo possuíam aproximadamente a mesma idade e os testes foram realizados antes de os animais atingirem maturidade sexual, acredita-se que estes fatores não tenham influenciado no desempenho dos animais.

Embora aparentemente o sexo não seja variável relevante, a necessidade de separar ou não machos e fêmeas em testes futuros envolvendo o LCR deverá depender dos objetivos de cada estudo. Em estudos de validação farmacológica, dependendo da droga investigada, essa separação pode ser necessária. Patiño et al (2008), por exemplo, administraram cocaína em *zebrafish* e verificaram efeitos de abstinência distintos para fêmeas e machos no teste de Mergulho em Tanque. O efeito apareceu mais rápido nas fêmeas, porém se deu de forma mais intensa e duradoura nos machos. Poucos estudos farmacológicos envolvendo este modelo e o LCE descrevem ter controlado o sexo dos animais, o que acaba limitando a discussão em relação à interação das drogas e a fisiologia dos animais quanto a este aspecto.

Em relação à inclinação da rampa, a diferença encontrada para o tempo na rampa entre a inclinação 0° e as inclinações 18,66° e 34,43° e a ausência de diferença entre a inclinação 0° e 9,73° sugere que os animais sejam mais sensíveis à inclinação da rampa quando seu grau for algum valor no mínimo entre as medidas 9,73° e 18,66°. Pode ser interessante adotar este parâmetro como referência em estudos futuros envolvendo o LCR para garantir que o grau de inclinação da rampa esteja em uma medida com maior probabilidade de discriminação pelo animal. Embora não tenha sido encontrada diferença significativa entre as inclinações 9,73°, 18,66° e 34,43° é possível observar uma tendência à diminuição no tempo de permanência conforme a inclinação aumenta. Possivelmente, com inclinações mais elevadas, esta diferença ocorra, o que corroboraria a hipótese de que o principal fator de aversividade do LCR estaria na diferença do nível de profundidade da água, mais especificamente, em sua progressiva diminuição.

Alguns dados fortalecem a sugestão de que os animais seriam sensíveis à variações na inclinação da rampa. Por exemplo, a diferença significativa no tempo de permanência no compartimento central entre as inclinações 0° e 34,43°; esta diferença não ocorre entre a inclinação 0° e as inclinações 9,73° e 18,66°, portanto, somente diante da rampa mais elevada, o animal passou significativamente mais tempo no compartimento central, compreendido como uma área de escolha. Além disso, em relação ao número de entradas, houve diferença para o compartimento plano e também no número de entradas totais entre as inclinações 18,66° e 34,43° sendo maior para a rampa

mais alta, indicando aumento no comportamento de esquiva do animal para o compartimento plano perante a maior elevação.

No estudo de Walsh-Monteiro et al (2016), os autores manipularam o nível da coluna d'água que variou em 1 cm, 2 cm e 4 cm no ponto mais alto da rampa. Foi observado que para 1 cm, o tempo no compartimento plano aumentou progressivamente ao longo da tentativa de 10 minutos. Para 2 cm e 4 cm, o tempo de permanência foi estável independente da duração da tentativa, porém, o tempo de permanência no plano foi maior para 2 cm que para 4 cm. Os autores entendem que o *zebrafish* consegue perceber e comparar os diferentes níveis de profundidade da água no labirinto. Tanto o nível da coluna d'água quanto a inclinação da rampa alteram a profundidade na rampa, porém, sugere-se que a coluna d'água pode influenciar na percepção do animal a partir da diferença na pressão hidrostática exercida sobre o mesmo em relação à profundidade, enquanto a inclinação da rampa poderia, além deste fator, fornecer uma indicação visual mais perceptível. Em estudos futuros pode ser interessante avaliar o efeito da manipulação simultânea destes dois fatores.

Não houve diferença significativa em função dos níveis de luz testados para a maioria das medidas avaliadas, somente em relação ao número de entradas total entre os grupos 700 lux e 1400 lux, que foi maior em função da menor iluminação. Em relação ao LCE e estudos com roedores, quanto ao efeito da iluminação, alguns resultados distintos foram obtidos. Pellow et al. (1985) e Falter, Gower & Gobert (1992), por exemplo, não observaram mudanças no padrão exploratório do LCE em função de mudanças no nível de iluminação. Já Griebel et al. (1993) observaram que níveis elevados de luz diminuiriam significativamente o tempo de permanência e número de entradas nos braços abertos, indicando que a luz seria um elemento aversivo que poderia influenciar no desempenho dos roedores. Como um dos objetivos que justifica a adaptação deste teste para peixes é a possibilidade de comparação futura com os dados obtidos no LCE, pode ser importante levar em consideração o efeito da iluminação enquanto uma variável estranha que pode influenciar diferencialmente o desempenho de peixes e roedores.

A aparente pouca influência da luz no LCR também parecem contrapor-se à interpretação de alguns resultados obtidos com o labirinto claro-escuro e a escototaxia apresentada pelos animais – uma preferência pelo compartimento preto em detrimento do branco, avaliada a partir do tempo de permanência e número de entradas em cada compartimento (Blaser & Penalosa, 2011; Faccioli et al., 2017; Magno et al, 2015; Maximino et al., 2007). De modo geral, entende-se que os animais prefeririam ambientes mais escuros e que luminosidade excessiva possivelmente seria um elemento naturalmente aversivo e ansiogênico para os *zebrafish*.

A partir desta interpretação, faria sentido supor que níveis de luminosidades mais baixas poderiam ter um efeito ambiental ansiolítico, favorecendo o tempo de permanência e entradas nos compartimentos com rampa e que níveis de luminosidade mais elevados, poderiam ter efeito ansiogênico, diminuindo estas medidas. Entretanto, esta diferença não ocorreu para os níveis de luz testados. A única diferença observada, em relação ao número de entradas totais, sugere que o menor nível de luminosidade adotado (700 lux) influenciou na atividade exploratória geral do animal, aumentando-a, o que poderia indicar algum efeito ansiolítico. Entretanto, o número de entradas total para o nível de luminosidade mais alto (2800 lux) foi maior que a medida controle adotada (1400 lux), o que contradiz essa suposição. Uma interpretação alternativa, é de que o aumento no número de entradas totais represente tentativas de fuga/esquiva da luz e que, portanto, seria uma situação ansiogênica.

Uma interessante discussão em relação à interpretação dos dados obtidos com o Labirinto Claro/Escuro foi levantada por Facciol et al (2019). Os autores argumentam que tem ocorrido na literatura uma confusão entre os parâmetros luminosidade (claro/escuro) e a cor do aparato (branco/preto). Em diversos estudos estes termos são utilizados como sinônimos, mas os autores observaram que em tanques com o fundo totalmente preto, há preferência pelo compartimento mais iluminado e que, em tanques com o fundo totalmente branco, a variação na iluminação não produziu efeitos, argumentando a partir disto que estes dois parâmetros não somente podem produzir efeitos distintos no comportamento como interagir diferencialmente entre si.

Considerando que o aparato utilizado em nosso estudo possuía um fundo completamente branco, e praticamente não houve diferenças entre os grupos com diferentes níveis de iluminação, os dados são semelhantes àqueles obtidos por Facciol et al (20019) reforçando o entendimento dos autores de que o fundo branco pode ser o principal fator de aversividade para os animais e não a luminosidade.

Inicialmente, estava previsto para este estudo um experimento no qual a cor do aparato seria manipulada, entretanto, dificuldades técnicas inviabilizaram esta etapa. Uma vez que os estudos com o Labirinto Claro-Escuro têm demonstrado a relevância da cor na indução de um estado de ansiedade no *zebrafish*, é importante que estudos futuros avaliem o efeito desta variável em relação ao LCR e de que modo o fundo preto ou transparente interage com a presença dos compartimentos com rampa.

Em relação à largura do aparato, as manipulações realizadas não produziram efeitos nas medidas exploratórias, de modo semelhante ao que foi observado por Lister (1987) para o LCE, em estudo no qual observou que utilizar um aparato reduzido não influenciou no comportamento dos

roedores. Estes resultados indicam que a largura não seria um parâmetro relevante na produção de comportamentos ditos ansiosos nos animais e, portanto, provavelmente não haveria necessidade de controlá-la em estudos futuros envolvendo *zebrafish* e modelo LCR. No que diz respeito à questões técnicas como custos de produção e facilidade de transporte e armazenamento, por exemplo, a possibilidade de utilizar aparatos menores pode ser um fator relevante na escolha deste modelo pelos laboratórios; os dados obtidos sugerem que para *zebrafish* seria possível utilizar aparatos com no mínimo 5 cm de largura sem influência diferencial no comportamento. Outra possibilidade, em relação a futuro estudos paramétricos envolvendo o LCR, quanto à redução de custos de fabricação e facilidade de transporte, é a manipulação do comprimento dos braços do labirinto, considerando que não houve diferenças significativas em função da menor largura utilizada.

Os resultados obtidos a partir da análise do etograma adotado para avaliar o repertório comportamental dos animais não apontaram diferença significativa para a maioria dos testes, com exceção daqueles apresentados na Tabela 3. Para o teste sexo, ocorreu diferença na proporção de tempo das tentativas que machos e fêmeas permaneceram em *freezing*, no compartimento plano. A mesma diferença foi observada no teste de nível de luz. Em relação ao teste de inclinação da rampa, também ocorreu diferença para o comportamento de *freezing*, no compartimento com rampa e para timotaxia, no compartimento plano. Para o teste de largura, ocorreu diferença somente para o comportamento de nado errático, no compartimento plano. O pós-teste não identificou entre quais grupos ocorreram as diferenças, possivelmente em função da grande variação individual apresentada pelos animais.

Em relação à diferença observada no teste de inclinação da rampa para o comportamento de *freezing* no compartimento com rampa, é importante observar que este comportamento ocorreu somente para o grupo inclinação 0º para o qual o compartimento “com rampa” também era plano. Para qualquer inclinação e também em todos os demais testes, este comportamento não ocorreu nos compartimentos com rampa. Possivelmente isto tenha ocorrido porque permanecer imóvel na rampa, onde a profundidade da água é menor e teoricamente o animal está mais exposto a predadores aéreos, deixaria o animal mais vulnerável a ameaças potenciais. Além disto, seria um comportamento incompatível com a aversão demonstrada a este compartimento por meio do curto tempo de permanência no mesmo.

De modo geral, não houve uma consistência na ocorrência dos comportamentos observados e o repertório dos animais apresentou muitas variações individuais. Considerando que timotaxia, *freezing* e nado errático têm sido considerados comportamentos ansiosos evocados por

estímulos ou ambientes potencialmente perigosos (Grossman et al, 2010; Riehl et al, 2011; Kalueff et al, 2012) seria esperado que os animais exibissem estes comportamentos com alguma regularidade no labirinto, principalmente nos compartimentos com rampas. Entretanto, a proporção de tempo das tentativas em que estes comportamentos ocorreram variou de 0% a, em média, 30%. Neste sentido, não é possível afirmar que os dados do etograma convergiram com os resultados obtidos em relação às medidas exploratórias. Entretanto, é possível que a baixa ocorrência destes comportamentos no compartimento com rampa, seja resultado do pouco tempo de permanência no mesmo, em função do elevado índice de esquiva em relação a ele.

Foi observado que roedores confinados nos braços abertos do Labirinto em Cruz Elevado apresentaram alterações fisiológicas e comportamentais características de um estado ansioso como *freezing*, defecação e aumento em esteroides corticais (Pellow et al., 1985; Cruz, Frei e Graeff, 1994), sendo que estas medidas ajudam a determinar a aversividade do compartimento aberto. Em estudos futuros que objetivem a validação comportamental do LCR, pode ser interessante isolar os animais separadamente nos braços planos e nos braços com rampa, efetuando o registro do etograma de nado e comparando o comportamento apresentado quando não há possibilidade de esquiva para outros compartimentos.

De modo geral, as medidas adotadas no estudo original de Wash-Monteiro et al (2016) parecem adequadas para a utilização do modelo em estudos futuros. Os dados obtidos em relação aos padrões exploratórios do animal corroboram aqueles obtidos até o presente momento, na medida em que novamente foi constatada a preferência do animal pelo compartimento plano e uma esquiva consistente do compartimento com rampa, independente das manipulações feitas nos diferentes parâmetros, indicando que o Labirinto em Cruz com Rampa é um modelo válido para o estudo da ansiedade em *zebrafish*.

## 6. CONCLUSÕES

1. O sexo dos animais, a inclinação da rampa, o nível de iluminação sobre o aparato e a largura dos braços do labirinto não parecem influenciar significativamente no tempo de permanência dos animais nos compartimentos do LCR;
2. O nível de iluminação em 700 lux aumenta a atividade exploratória geral do animal, alterando o número de entradas totais;

3. A inclinação da rampa em 34,43º aumenta o número de entradas no compartimento plano e na atividade geral do animal;

4. As medidas utilizadas no estudo de Walsh-Monteiro et al (2016) são adequadas para adoção em estudos futuros.

## REFERÊNCIAS

- Ahmed, O., Seguin, D., Gerlai, R. (2011). An automated predator avoidance task in zebrafish. *Behavioral Brain Research*, 216, 166-171. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbr.2010.07.028>
- Andrade, T. G., Zangrossi, H. Jr., & Graeff, F. G. (2013). The median raphe nucleus in anxiety revisited. *Journal of Psychopharmacology*, 27, 1107 – 1115. <http://dx.doi.org/10.1177/0269881113499208>
- Barlow, D. H. (2000). Unraveling the mysteries of anxiety and its disorders from the perspective of emotion theory. *American Psychologists*, 55(11), 1247 – 1263. <http://dx.doi.org/10.1037/0003-066X.55.11.1247>
- Barros, T. P., Alderton, W. K., Reynolds, H. M., Roach, A. G., Berghmans, S. (2008). Zebrafish: an emerging technology for in vivo pharmacological assessment to identify potential safety liabilities in early drug discovery. *British Journal of Pharmacology*, 154, 1400-1413. <http://dx.doi.org/10.1038/bjp.2008.249>
- Bass, S. L., & Gerlai, R. (2008). Zebrafish (*Danio rerio*) responds differentially to stimulus fish: the effects of sympatric and allopatric predators and harmless fish. *Behavioral Brain Research*, 186(1), 107-117. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbr.2007.07.037>
- Belovicova, K.; Bogi, E.; Csatlosova, K., & Dubovicky, M. (2017). Animal tests for anxiety-like and depression-like behavior in rats. *Interdisciplinary Toxicology* 10(1), 40–43. <http://dx.doi.org/10.1515/intox-2017-0006>
- Belzung, C. & Griebel, G. (2001). Measuring normal and pathological anxiety-like behaviour in mice: a review. *Behavioral Brain Research*, 125, 141-149. [http://dx.doi.org/10.1016/S0166-4328\(01\)00291-1](http://dx.doi.org/10.1016/S0166-4328(01)00291-1)
- Bencan, Z., & Levin, E. D. (2008). The role of  $\alpha 7$  e  $\alpha 4\beta 2$  nicotinic receptors in the nicotine-induced anxiolytic effect on zebrafish. *Physiology & Behavior*, 95(3), 408-412. <http://dx.doi.org/10.1016/j.physbeh.2008.07.009>
- Bencan, Z., Sledge, D., & Levin, E. D. (2009). Buspirone, chlordiazepoxide and diazepam effects in a zebrafish model of anxiety. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*, 94, 75– 80. <http://dx.doi.org/10.1016/j.pbb.2009.07.009>
- Bertoglio, L. J.; & Carobrez, A. P. (2002). Anxiolytic effects of ethanol and phenobarbital are abolished in test-experienced rats submitted to the elevated plus-maze. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*, 73, 963 – 969. [https://dx.doi.org/10.1016/S0091-3057\(02\)00958-9](https://dx.doi.org/10.1016/S0091-3057(02)00958-9)

- Blaser, R. E., & Peñalosa, Y. M. (2011). Stimuli affecting zebrafish (*Danio rerio*) behavior in the light/dark preference test. *Physiology & Behavior*, *104*, 831–837. <https://dx.doi.org/10.1016/j.physbeh.2011.07.029>
- Brown, J.S., Kotler, B.P., & Bouskila, A. (2001). Ecology of fear: Foraging games between predator and prey with pulsed resources. *Annales Zoologici Fennici*, *38*(1), 71-87.
- Calvo-Torrent, A.; Brain, P., & Martinez, M. (1999). Effect of predatory stress on sucrose intake and behavior on the plus-maze in male mice. *Physiology and Behavior*, *67*(2), 189–196. [http://dx.doi.org/10.1016/S0031-9384\(99\)00051-7](http://dx.doi.org/10.1016/S0031-9384(99)00051-7)
- Carola, V., D'Olimpio, F., Brunamonti, E., Mangia, F., & Renzi, P. (2002). Evaluation of the elevated plus-maze and open-field tests for the assessment of anxiety related behaviour in inbred mice. *Behavior and Brain Research*, *134*(1-2), 49–57. [http://dx.doi.org/10.1016/S0166-4328\(01\)00452-1](http://dx.doi.org/10.1016/S0166-4328(01)00452-1)
- Champagne, D. L., Hoefnagels, C. C. M., de Kloet, R. E., Richardson, M. K. (2010). Translating rodent behavioral repertoire to zebrafish (*Danio rerio*): Relevance for stress research. *Behavioral Brain Research*, *214*, 332 – 342. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbr.2010.06.001>
- Crawley, J., & Goodwin, F. K., (1980). Preliminary report of a simple animal behavior model for the anxiolytic effects of benzodiazepines. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, *13*(12), 167–70. [http://dx.doi.org/10.1016/0091-3057\(80\)90067-2](http://dx.doi.org/10.1016/0091-3057(80)90067-2)
- Cruz, A. P. M., Frei, F., & Graeff, F. G. (1994). Ethopharmacological Analysis of Rat Behavior on the Elevated Plus-Maze. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*, *49*(1), 171 – 176. [http://dx.doi.org/10.1016/0091-3057\(94\)90472-3](http://dx.doi.org/10.1016/0091-3057(94)90472-3)
- Egan, R. J., Bergner, C. L., Hart, P. C., Cachat, J. M., Canavello, P., Elegante, M. et al. (2009). Understanding behavioral and physiological phenotypes of stress and anxiety in zebrafish. *Behavioral Brain Research*, *205*(1), 38-44. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbr.2009.06.022>
- Falter, U., Gower, A. J., & Gobert, J. (1992). Resistance of baseline activity in the elevated plus-maze to exogenous influences. *Behavioural Pharmacology*, *3*(2), 123 – 128.
- Facciol, A. Tran, S., & Gerlai, R. (2017). Re-examining the factors affecting choice in the light-dark preference test in zebrafish, *Behavioral Brain Research*, *327*, 21 – 28. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbr.2017.03.040>
- Facciol, A., Iqbal, M., Eada, A., Tran, S., & Gerlai, R. (2019). The light-dark task in zebrafish confuses two distinct factors: Interaction between shade and illumination level preference. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*. <http://dx.doi.org/10.1016/j.pbb.2019.01.006>.
- Frye, C. A., Petralia, S. M., & Rhodes, M. E. (2000). Estrous cycle and sex differences in performance on anxiety tasks coincide with increases in hippocampal progesterone and 3 $\alpha$ , 5 $\alpha$ -THP. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*, *67*, 587 – 596. [http://dx.doi.org/10.1016/S0091-3057\(00\)00392-0](http://dx.doi.org/10.1016/S0091-3057(00)00392-0)
- Gerlai, R., Lahav, M. S., & Rosenthal, A. (2010). Drinks like a fish: zebra fish (*Danio rerio*) as a behavior genetic model to study alcohol effects. *Pharmacology, biochemistry and Behavior*, *67*(4), 773 – 782. [http://dx.doi.org/10.1016/S0091-3057\(00\)00422-6](http://dx.doi.org/10.1016/S0091-3057(00)00422-6)

- Gerlai, R. (2014). Fish in behavior research: Unique tools with a great promise! *Journal of Neuroscience Methods*, 234, 54 – 58. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jneumeth.2014.04.015>
- Gouveia, A. J., Maximino, C., & Brito, T. M. (2006). Comportamento de peixes: vantagens e utilidades nas neurociências. Faculdade de ciências/UNESP. Bauru: SP.
- Gouveia, A. J., & Brito, T. M. (2015) Animal models of psychopathology and its relation to clinical practice. *Psychiatry and Neuroscience Update*, 305 – 309. [http://dx.doi.org/10.1007/978-3-319-17103-6\\_22](http://dx.doi.org/10.1007/978-3-319-17103-6_22)
- Griebel, G., Moreau, J-L., Jenck, F., Martin, B. & Misslin, R. (1993). Some critical determinants of the behaviour of rats in the elevated plus-maze. *Behavioural Processes*, 29(1-2), 37-48. [http://dx.doi.org/10.1016/0376-6357\(93\)90026-N](http://dx.doi.org/10.1016/0376-6357(93)90026-N)
- Grossman, L.; Utterback, E.; Stewart, A.; Gaikwad, A.; Chung, K.M.; et al. (2010). Characterization of behavioral and endocrine effects of LSD on zebrafish. *Behavioral Brain Research*, 214(2), 277-284. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbr.2010.05.039>
- Guerra, L. G., & Silva, M. T. A. (2002). Modelos animais em psicopatologia: fundamentos conceituais. In H. J. Guilhardi & M. B. B. P. Madi & P. P. Queiroz & M. C. Scoz (Eds.). *Sobre comportamento e cognição* (Vol. 9, pp. 231 – 235) Santo André: ESETec.
- Hall, C., & Ballachey, E. L. (1932). A study of the rat's behavior in a field. A contribution to method in comparative psychology. *Publications in Psychology*, 6, 1–12.
- Hales, R. E., Yudofsky, S. C., & Roberts, L. W. (2008) Textbook of Psychiatry. 6ª edição. Washington, D. C: The American Psychiatric Publishing. 1473 p.
- Handley, S. L., & Mithani, S. (1984). Effects of alpha-adrenoceptor agonists and antagonists in a maze-exploration model of “fear” motivated behavior. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology*, 327(1), 1-5. <http://dx.doi.org/10.1007/BF00504983>
- Hogg, S. (1996). A review of the validity and variability of the elevated plus-maze as an animal model of anxiety. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*, 54(1), 21-30. [http://dx.doi.org/10.1016/0091-3057\(95\)02126-4](http://dx.doi.org/10.1016/0091-3057(95)02126-4)
- Howe, K., Clark, M. D., Torroja, C. F., Turrance, J., Berthelot, C., Muffato, M. Collins, J. E., Humphray, S., ... & Stemple, D. L. (2013). The zebrafish reference genome sequence and its relationship to the human genome. *Nature*, 496, 498-503. <http://dx.doi.org/10.1038/nature12111>
- Imhof, J. T., Coelho, Z. M., Schmitt, M. L., Morato, G. S., & Carobrez, A. P. (1993). Influence of gender and age on performance of rats in the elevated plus maze apparatus. *Behavioural Brain Research*, 56, 177 – 180. [http://dx.doi.org/10.1016/0166-4328\(93\)90036-P](http://dx.doi.org/10.1016/0166-4328(93)90036-P)
- Johnston, A. L., & File, S. E. (1991). Sex differences in animal tests of anxiety. *Physiology & Behavior*, 49, 245 – 250. [http://dx.doi.org/10.1016/0031-9384\(91\)90039-Q](http://dx.doi.org/10.1016/0031-9384(91)90039-Q)
- Kalueff, A. V., Gebhardt, M., Stewart, A. M., Cachat, J. M., Brimmer, M., et al. (2012). Towards a Comprehensive Catalog of Zebrafish Behavior 1.0 and Beyond. *Zebrafish*, 10(1), 70 – 86. <http://dx.doi.org/10.1089/zeb.2012.0861>.

- Levin, E. D., Bencan, Z., & Cerutti, D. T. (2007). Anxiolytic effects of nicotine in zebrafish. *Physiology & Behavior*, *90*(1), 54-58. <http://dx.doi.org/10.1016/j.physbeh.2006.08.026>
- Lister, R. G. (1987). The use of a plus-maze to measure anxiety in the mouse. *Psychopharmacology*, *92*(2), 180 – 185. <http://dx.doi.org/10.1007/BF00177912>
- Magno, L.D., Fontes, A., Gonçalves, B. M., & Gouveia, A. Jr. (2015). Pharmacological atudy of the light/dark preeference test in zebrafish (Danio rerio): Waterborne administration. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*, *135*, 169 – 176. <http://dx.doi.org/10.1016/j.pbb.2015.05.014>
- Maximino, C., Marques, T., Dias, F., Cortes, F. V., Taccolini, I. B., Pereira, P. M., et al. (2007). A comparative analysis of the preference for dark environments in five telosts. *International Journal of Comparative Psychology*, *20*, 351 – 367.
- Maximino, C., Marques de Brito, T., Dias, C. A., & Gouveia, A., Jr. (2010). Construct validity of behavioral models of anxiety: where experimental psychopathology meets ecology and evolution. *Psychology & Neuroscience*, *3*(1) 117 – 123. <http://dx.doi.org/10.3922/j.psns.2010.1.015>
- Maximino, C., Marques de Brito, T., Dias, C. A., Gouveia, A., Jr., & Morato, S. (2010). Scototaxis as anxiety-like behavior in fish. *Nature Protocols*, *5*, 209 –216. <http://dx.doi.org/10.1038/nprot.2009.225>
- McKinney, W.T. (1984). Animal models of depression: An overview. *Psychiatric Development*, *2*(2), 77-96.
- McNaughton, N., & Corr, P.J. (2004). A two-dimensional neuropsychology of defense: Fear/anxiety and defensive distance. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, *28*(3), 285-305. <http://dx.doi.org/10.1016/j.neubiorev.2004.03.005>
- Overall, K. L. (2000). Natural animal models of human psychiatryc conditions: assessment of mechanism and validity. *Progress in neuropsychopharmacological and biological psychiatry*, *24*(5), 727 – 776. [http://dx.doi.org/10.1016/S0278-5846\(00\)00104-4](http://dx.doi.org/10.1016/S0278-5846(00)00104-4)
- Patiño, M. A. L., Yu, L., Yamamoto, B. K., & Zhdanova, I. V. (2008). Gender differences in zebrafish responses to cocaine withdrawal. *Physiology and Behavior*, *95*, 36 – 47. <http://dx.doi.org/10.1016/j.physbeh.2008.03.021>
- Pinheiro-da-Silva, J.; Silva, P. F.; Nogueira, M. B.; & Luchiari, A. C. (2017). Sleep deprivation effects on object discrimination task in zebrafish. *Animal Cognition*, *20*(2), 159-169. <http://dx.doi.org/10.1007/s10071-016-1034-x>.
- Pellow, S., Chopin, P., File, S. E., & Briley, M. (1985). Validation of open: closed arms entries in an elevated plus-maze as a measure of anxiety in the rat. *Journal of Neuroscience Methods*, *14*(3), 149 – 167. [http://dx.doi.org/10.1016/0165-0270\(85\)90031-7](http://dx.doi.org/10.1016/0165-0270(85)90031-7)
- Riehl, R.; Kyzar, E.; Allain, A.; Green, J.; Hook, M.; et al. (2011). Behavioral and physiological effects of acute ketamine exposure in adult zabrafish. *Neurotoxicology and Teratology*, *33*, 658 – 667. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ntt.2011.05.011>

- Rodgers, R.J., Cao, B.-J., Dalvi, A., & Holmes, A. (1997). Animal models of anxiety: An ethological perspective. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 30(3), 289-304. <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-879X1997000300002>
- Rodgers, R. J., & Cole, J. C. (1993). Influence of social isolation, gender, strain, and prior novelty on plus-maze behavior in mice. *Physiology & Behavior*, 54(4), 729-736. [http://dx.doi.org/10.1016/0031-9384\(93\)90084-S](http://dx.doi.org/10.1016/0031-9384(93)90084-S)
- Rodgers, R. J., & Dalvi, A. (1997) Anxiety, defense and the elevated plus-maze. *Neuroscience and Behavioral Reviews*, 21(4), 801 – 810. [http://dx.doi.org/10.1016/0031-9384\(93\)90084-S](http://dx.doi.org/10.1016/0031-9384(93)90084-S)
- Rodgers, R. J., & Johnson, N. J. T. (1995). Factor analysis of spatiotemporal and ethological measures in the murine elevated plus-maze teste of anxiety. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 52(2), 297 – 303. [http://dx.doi.org/10.1016/0091-3057\(95\)00138-M](http://dx.doi.org/10.1016/0091-3057(95)00138-M)
- Sackerman, J., Donegan, J., Cunningham, C., Nguyen, N., Lawless, K., & Gould, G. (2010) Zebrafish behavior in novel environments: effects of acute exposure to anxiolytic compounds and choice of *Danio rerio* line. *International Journal of Comparative Psychology*, 23(1), 43-61. <http://dx.doi.org/>
- Silva, M. T. A. (2003). Modelos comportamentais em neurociências. Tese de doutorado, Instituto de Psicologia da Universidade de São Paulo, São Paulo, SP, Brasil.
- Stewart, A. M., & Kalueff, A. V. (2014). Anxiolytic drug Discovery: What are the novel approaches and how can we improve them? *Expert Opinion on Drug Discovery*, 9, 15-26.
- Suboski, M. D., Bain, S., Carty, A., McQuoid, L., Seelen, M., & Seifert, M.; (1990). Alarm reaction in acquisition and social transmission of simulated-predator, recognition by zebra danio fish (*Brachydanio rerio*). *Journal of Comparative Psychology*, 104(1), 101,112. <http://dx.doi.org/10.1037/0735-7036.104.1.101>
- Treit, D., Menard, J., & Royan, C. (1993). Anxiogenic Stimuli in the elevated plus-maze. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 44(2), 463-469. [http://dx.doi.org/10.1016/0091-3057\(93\)90492-C](http://dx.doi.org/10.1016/0091-3057(93)90492-C)
- Walsh-Monteiro, A., Chirinéa, G., Pessoa, R. S., Sanches, E. M., Carvalho, A. C. C., Silva, Y. C. B., & Gouveia, A. J. (2016) A new anxiety test for zebrafish: plus maze with ramp. *Psychology & Neuroscience*. Advance online publication. <http://dx.doi.org/10.1037/pne0000067>.