



UNIVERSIDADE  
ESTADUAL DE LONDRINA

---

CAIQUE ORTIZ COLOMBO ARNOLDI FABRIS

**AVALIAÇÃO METODOLÓGICA DE TESTES  
COMPORTAMENTAIS SEQUENCIAIS COM PEIXES *Danio*  
*rerio* EXPOSTOS AO ETANOL**

---

Londrina  
2022

CAIQUE ORTIZ COLOMBO ARNOLDI FABRIS

**AVALIAÇÃO METODOLÓGICA DE TESTES  
COMPORTAMENTAIS SEQUENCIAIS COM PEIXES *Danio*  
*rerio* EXPOSTOS AO ETANOL**

Dissertação de Mestrado apresentada à  
Universidade Estadual de Londrina - UEL, como  
requisito parcial para a obtenção do título de  
Mestre em Ciências Fisiológicas.

Orientador: Prof. Dr. Paulo César Meletti.

Londrina  
2022

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do Programa de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UEL

Fabris, Caique Ortiz Colombo Arnoldi.

AVALIAÇÃO METODOLÓGICA DE TESTES COMPORTAMENTAIS SEQUENCIAIS COM PEIXES *Danio rerio* EXPOSTOS AO ETANOL / Caique Ortiz Colombo Arnoldi Fabris. - Londrina, 2022.  
73 f. : il.

Orientador: Paulo César Meletti.

Dissertação (Mestrado em Ciências Fisiológicas) - Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas, 2022.

Inclui bibliografia.

1. zebrafish - Tese. 2. comportamento - Tese. 3. etanol - Tese. 4. testes sequenciais - Tese. I. Meletti, Paulo César. II. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas. III. Título.

CDU 574

CAIQUE ORTIZ COLOMBO ARNOLDI FABRIS

**AVALIAÇÃO METODOLÓGICA DE TESTES  
COMPORTAMENTAIS SEQUENCIAIS COM PEIXES *Danio*  
*rerio* EXPOSTOS AO ETANOL**

Dissertação de Mestrado apresentada à  
Universidade Estadual de Londrina - UEL, como  
requisito parcial para a obtenção do título de  
Mestre em Ciências Fisiológicas.

**BANCA EXAMINADORA**

---

Prof. Dr. Paulo César Meletti  
Universidade Estadual de Londrina - UEL

---

Prof. Dr. Célio Roberto Estanislau  
Universidade Estadual de Londrina - UEL

---

Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Maria Fernanda Rodrigues Graciano  
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Londrina, 28 de fevereiro de 2022.

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço à toda a minha família, especialmente minha mãe Cris, meus pais Bebé e Denis e minhas irmãs Natália e Joana, pelos ensinamentos, companheirismo e suporte emocional. Incluo aqui, também, todos os familiares que tiveram participação direta ou indireta ao longo da trajetória de conclusão deste trabalho.

Agradeço à minha esposa Tayla e meu filho Leon, a quem dedico este trabalho. Os maiores professores das nossas vidas, às vezes, nem imaginam a contribuição que proporcionaram àqueles que inspiraram. Sigo aprendendo a ser alguém muito melhor com eles, pois são agora o combustível das minhas ações.

Aos meus amigos todos, que permaneceram do meu lado nos momentos mais difíceis, provando serem verdadeiros. Aos que torcem pelo sucesso e são construtivos. Um verdadeiro refúgio iluminado em um mundo às vezes tão sombrio.

A todos os integrantes do Laboratório de Ecofisiologia Animal da UEL, especialmente a Ana Ju, pela companhia, apoio e suporte técnico ao trabalho.

Por último, mas não menos importante, ao meu orientador, que admiro muito, professor Paulo, pela atenção, paciência e disponibilidade exemplares. Um verdadeiro modelo, tanto na esfera profissional quanto na esfera pessoal. Muito obrigado.

“Quanto mais pesado o fardo, mais próxima da terra está a nossa vida, e mais ela é real e verdadeira. Por outro lado, a ausência total de fardo faz com que o ser humano se torna mais leve do que o ar, com que ele voe, se distancie da terra, do ser terrestre, faz com que ele se torne semirreal, que seus movimentos sejam tão livres quanto insignificantes.”

- Milan Kundera, a Insustentável Leveza do Ser.

..

## RESUMO

FABRIS, Caique Ortiz Colombo Arnoldi. **Avaliação metodológica de testes comportamentais sequenciais com *Danio rerio* expostos ao etanol**. 2022. 72 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Fisiológicas) – Centro de Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2022.

O *zebrafish* (*Danio rerio*) vem se destacando crescentemente como modelo “alternativo” nas pesquisas em Ciências Neurocomportamentais. A excelente relação custo-benefício, a facilidade de manutenção e reprodução, e a conveniência de exposição por imersão a compostos solúveis compõem o seu repertório de vantagens sobre modelos mais clássicos. Este trabalho propôs a aplicação sequencial de três testes comportamentais sensíveis a parâmetros de estresse e ansiedade-símile como metodologia promissora na redução do tempo de empenho e esforço amostral, sendo executada com sucesso em roedores e ainda em processo de adaptação para peixes. Esta bateria foi planejada para iniciar com o teste tipo claro-escuro, a fim de verificar a afinidade ou esquia ao ambiente claro, passando pelo teste tipo *novel tank*, avaliando seus parâmetros de locomoção, e finalizada com um teste de resistência natatória para avaliara capacidade de nadar contra um fluxo de água crescente. Para avaliar sua sensibilidade, modulamos o comportamento através da ação farmacológica do etanol em concentrações 0%, 0,5% e 1% durante 1h, 24h e 96h. Para investigar o possível efeito de um teste antecedente sobre seu sucessor, e também a eficiência da ordem de aplicação dos testes, o segundo e o terceiro testes foram repetidos de maneira isolada, isto é, sem um teste antecedente, sendo que, após o teste de natação espontânea, inserimos um teste tipo claro-escuro para obtermos um controle para a configuração original. A bateria-teste apresentou sensibilidade na detecção da alteração do comportamento de forma dose-dependente e tempo-dependente. Não houve diferença estatística entre testes em sequência e testes isolados para a performance da natação espontânea e do claro-escuro. As variações detectadas para ambas as metodologias foram as mesmas. A exposição ao etanol por 1h aumentou a atividade natatória sem impactar a fototaxia. As exposições por 24h e 96h aumentaram a fototaxia e reduziram a atividade natatória. Houve perda de sensibilidade para testes aplicados em sequência, especialmente de natação forçada, mas, para todos os testes, esta diferença foi amenizada em tempos de exposição mais longos. A aplicação de uma bateria-teste deve ser encorajada em estudos com peixes cujo desenho experimental envolva diversos testes comportamentais, uma vez que oferece redução de recursos e empenho e possibilita uma maior correlação dos parâmetros através dos testes.

**Palavras-chave:** *zebrafish*; comportamento; etanol; bateria-teste.

## ABSTRACT

FABRIS, Caique Ortiz Colombo Arnoldi. **Methodological assessment of a sequence behavioral tests with *Danio rerio* exposed to ethanol.** 2022. 72 p. Dissertação (Mestrado em Ciências Fisiológicas) – Centro de Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2022.

The zebrafish (*Danio rerio*) has been increasingly highlighted as an “alternative” model in several fields of Neurobehavioral research. The excellent cost-benefit ratio, the ease of maintenance and reproduction, and the convenience of exposure are leading this model over classic ones. This study proposed a sequential battery consisting of three behavioral tests that are sensitive to stress and anxiety-like parameters as a promising methodology in reducing sampling size and effort, being successfully performed with rodents and still in the process of adaptation for fish. This battery was designed to start with the light-dark test, evaluating affinity or avoidance to the light environment, going through a novel-tank like test, to assess locomotion parameters, and ending in a swimming endurance test, in order to evaluate the ability to swim against an increasing stream of water. Ethanol was used at 0%, 0.5% and 1% in 1h, 24h and 96h exposures to assess the sensitivity in detecting behavioral modulation. The second and third tests of the tiered-test battery were repeated in a separate manner, *i.e.*, without another test being applied prior to it. This sequential battery revealed sensitive when detecting anxiety-like behavior modulation within a dose-dependent and time-dependent pattern. There was no statistical difference between tiered tests and separated tests when accounting performance for light-dark and novel tank. The variations observed for both methodologies were the same. Exposure to ethanol for 1h increased swimming activity without impacting phototaxis. Exposures for 24h and 96h increased phototaxis while reduced swimming activity. There was loss of sensitivity for tests applied in sequence, especially endurance swimming, but, for all tests, longer exposures lessened this contrast. The application of a tiered-test battery should be encouraged in studies regarding fish undergoing several behavioral tests, since it reduces effort as well as resources and allows for a greater correlation within parameters across tests.

**Key words:** zebrafish; behavior; ethanol; tiered-test battery.

## LISTA DE FIGURAS

### INTRODUÇÃO

- Figura 1** – *Zebrafish* ou “paulistinha” (*Danio rerio*) .....14
- Figura 2** – Fórmula estrutural da molécula de etanol .....20

### MATERIAL E MÉTODO

- Figura 3** – Bateria 1 e 2 de experimentos .....32
- Figura 4** – Aquário utilizado para os testes de claro-escuro.....37
- Figura 5** – Aquário utilizado para os testes de natação espontânea.....39
- Figura 6** – Espaço interno da caixa de isolamento onde foram aplicados os testes de claro-escuro e natação espontânea.....39
- Figura 7** – Sistema utilizado para aplicação do teste de resistência natatória .....41

### RESULTADOS

- Figura 8** – Gráficos de cargas da componente 1 (atividade natatória) .....45
- Figura 9** – Gráficos de cargas da componente 2 (fototaxia).....45
- Figura 10** – Gráfico de dispersão das baterias 1 (acima) e 2 (abaixo) de testes.....47
- Figura 11** – Gráfico comparando o parâmetro de permanência no claro entre testes sequenciais (Seq) e isolados (Iso).....49
- Figura 12** – Gráfico comparando o parâmetro de distância total percorrida entre testes sequenciais (Seq) e isolados (Iso).....49
- Figura 13** – Gráfico comparando o parâmetro de Índice de Resistência Natatória entre testes sequenciais (Seq) e isolados (Iso) .....50
- Figura 14** – Tempo de latência (para escolha no teste claro-escuro) no teste em segunda posição, após a natação espontânea, na bateria 2 (à esquerda) e em primeira posição, “isolado”, na bateria1 (à direita) .....51
- Figura 15** – Gráfico de barras empilhadas mostrando a proporção entre claro e escuro para a primeira escolha (no teste claro-escuro) na bateria 2 (teste em segunda posição, após a natação espontânea), à esquerda) e na bateria 1 (teste em primeira

	posição, “isolado”), à direita .....	52
<b>Figura 16</b>	– Número de trocas (entre os lados no teste claro-escuro) no teste em segunda posição, após a natação espontânea (à esquerda) e em primeira posição, “isolado” (à direita) .....	52
<b>Figura 17</b>	– Tempo médio por investida no ambiente claro no teste claro-escuro em segunda posição na bateria 2, após a natação espontânea (à esquerda) e em primeira posição, “isolado”, na bateria 1 (à direita) .....	53
<b>Figura 18</b>	– Tempo total de movimentação no teste de natação espontânea em sequência, na bateria 1 (à esquerda) e isolado, em primeira posição, na bateria 2 (à direita) .....	54
<b>Figura 19</b>	– Preferência por um estrato no aquário de natação espontânea em sequência (à esquerda) e isolado (à direita) .....	54
<b>Figura 20</b>	– Velocidade média de natação espontânea em sequência (à esquerda) e isolado (à direita) .....	55
<b>Figura 21</b>	– Número de tentativas de resistência ao fluxo no teste de resistência natatória em sequência (à esquerda) e isolado (à direita) .....	55
<b>Figura 22</b>	– Concentração de glicose plasmática coletada após o fim da sequência de todos os testes (à esquerda), na bateria 1, e após o teste isolado de resistência natatória (à direita) .....	56
<b>Figura 23</b>	– Tabela contendo o fator de condição de Fulton (Kf) para todos os grupos testados .....	56

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABNT	Associação Brasileira de Normas Técnicas
UEL	Universidade Estadual de Londrina
PET	Positron Emission Tomography
MRI	Magnetic Resonance Image
EtOH	Etanol
ADH	Álcool desidrogenase
$\alpha$ ADH	Alfa-Álcool desidrogenase
NAD <sup>+</sup>	Dinucleótido de nicotinamida e adenina (oxidado)
NADH	Dinucleótido de nicotinamida e adenina (reduzido)
NADP <sup>+</sup>	Nicotinamida adenina dinucleótido fostato (oxidado)
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleótido fostato (reduzido)
ERRO	Espécies reativas de Oxigênio
ALDH	Acetaldeído desidrogenase
DA	Dopamina
5-HT	5-hidroxitriptamina
GABA	Ácido gama-aminobutírico
GABAA	Receptor GABA sub-tipo A
SNC	Sistema Nervoso Central
NMDA	N-Metil-D-aspartato
LEFA	Laboratório de Ecofisiologia Animal
NE	Teste de natação espontânea
CE	Teste de claro-escuro
RN	Teste de resistência natatória
CFTV	Circuito fechado de televisão
BT1	Bateria de testes 1
BT2	Bateria de testes 2
SACAM	Software de Análise e Captura de Animais em Movimento
IRN	Índice de Resistência Natatória
Wt	Weigth total
Lt	Length total
Ls	Length standart
Kf	Fator de condição de Fulton

CEUA	Comissão de Ética em Uso Animal
PCA	Principal Components Analysis
ANOVA	Análise de Variância
SNK	Student-Newman-Keuls

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	<b>12</b>
<b>2</b>	<b>OBJETIVOS</b> .....	<b>30</b>
2.1	OBJETIVO GERAL .....	30
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	30
<b>3</b>	<b>MATERIAL E MÉTODO</b> .....	<b>31</b>
3.1	ANIMAIS EXPERIMENTAIS: SUA ORIGEM E CONDIÇÕES DE MANUTENÇÃO EM LABORATÓRIO.....	31
3.2	DESENHO EXPERIMENTAL .....	31
3.2.1	Configuração das Baterias de Testes.....	31
3.2.2	Exposição ao Etanol .....	34
3.3	TESTES COMPORTAMENTAIS E SEUS PARÂMETROS DERIVADOS .....	36
3.3.1	Teste de Claro-Escuro .....	36
3.3.2	Teste de Natação Espontânea .....	38
3.3.3	Teste de Resistência Natatória.....	40
3.4	BIOMETRIA, SEXAGEM, DETERMINAÇÃO DE GLICEMIA E FINALIZAÇÃO .....	41
3.5	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	42
<b>4</b>	<b>RESULTADOS</b> .....	<b>44</b>
<b>5</b>	<b>DISCUSSÃO</b> .....	<b>57</b>
<b>6</b>	<b>CONCLUSÕES</b> .....	<b>65</b>
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	<b>66</b>

## 1 1 INTRODUÇÃO

2 A Psicofisiologia constitui uma ciência relativamente nova, mas incorpora uma  
3 ideia antiga: unir conceitualmente o corpo e a mente. Ela parte do princípio de que,  
4 desde que o ser humano começou a se experienciar como objeto de sua própria  
5 consciência, teve uma noção intuitiva de que mudanças em seu corpo estavam, em  
6 algum grau, relacionadas com seu humor e seus sentimentos. Unir estes dois  
7 aspectos tão primordialmente controversos da essência humana tem sido um grande  
8 desafio para filósofos, cientistas e outros pensadores de tempos imemoriais  
9 (CACCIOPO et al., 2007).

10 As ciências neurocomportamentais compõem uma das principais linhas de  
11 estudo da Psicofisiologia. O comportamento determina como um animal interage com  
12 o meio e, em última instância, é a emergência da complexa relação entre as  
13 funcionalidades do sistema nervoso e o ambiente. O estudo do comportamento em  
14 condições naturais apresenta gama rica e complexa de parâmetros, mas em  
15 neurociências é preferível uma abordagem mais reducionista, focando em  
16 componentes isolados do arsenal comportamental e situações artificiais que permitem  
17 um controle mais rígido dos parâmetros e a repetição das condições experimentais.  
18 Isso torna possível a comparação entre os resultados, criando uma base estatística  
19 potente para a relação entre os comportamentos observados e as bases neurais  
20 envolvidas (ORGER & POLAVIEJA, 2017).

21 O amadurecimento das tecnologias de investigação permitiu uma abordagem  
22 mais especializada dos mecanismos neurais que fundamentam o comportamento,  
23 através de métodos como, por exemplo, a eletroencefalografia (SLAWECKI et al.,  
24 2006), análises de neuroimagens como as obtidas por tomografia por emissão de  
25 pósitrons (PET, do inglês *Positron Emission Tomography*) e ressonância magnética  
26 (MRI, do inglês *Magnetic Resonance Image*) (CALHOUN et al., 2004) e a  
27 neuroquímica (MÜLLER et al., 2019). Outro grande avanço foi o desenvolvimento das  
28 metodologias moleculares, capazes de relacionar com relativa precisão alguns grupos  
29 de comportamento a vias neurais específicas. Assim, áreas como a Farmacologia e a  
30 Toxicologia passam a adotar o estudo do comportamento na aplicação de substâncias  
31 com mecanismos de ação conhecidos para relacionar seus efeitos às repercussões  
32 comportamentais observadas (RUSSEL et al., 1990). Desta forma, as metodologias

33 neurocomportamentais contribuíram historicamente para a compreensão dos  
34 mecanismos biológicos abordados pela Psicologia e Psiquiatria, envolvendo desde  
35 processos como a atenção, aprendizado e memória, até disfunções neuropsicológicas  
36 como, por exemplo, ansiedade, depressão, autismo, demência, psicopatia,  
37 esquizofrenia e doenças de Alzheimer e Parkinson, possibilitando tratamentos cada  
38 vez mais eficazes para estas condições (CACCIPO et al., 2007).

39 Neste contexto, é muito comum o uso de animais não-humanos como modelos  
40 experimentais, chamados de “modelos translacionais”, tanto em experimentos que  
41 visam o entendimento das funções normais do sistema nervoso quanto em testes pré-  
42 clínicos de determinadas doenças e no desenvolvimento dos medicamentos utilizados  
43 em sua farmacoterapia. Satisfazer o maior número de critérios possível é de prima  
44 importância na escolha de modelos experimentais. A validação de face considera o  
45 grau de semelhança biológica entre as espécies utilizadas. A validação preditiva  
46 considera a precisão na previsão de efeitos de tratamento em uma espécie baseada  
47 no desempenho de outra espécie. E, por fim, a validação construtiva considera a  
48 relação teórica que guia os mecanismos de interesse compartilhados entre as duas  
49 espécies, baseando-se na definição adotada para o parâmetro (MAXIMINO et al.,  
50 2010).

51 Tradicionalmente, as ciências neurocomportamentais fazem uso de mamíferos  
52 como modelos translacionais, particularmente símios (ROWLAND et al., 2017) e  
53 roedores de pequeno porte (HANKS & GONZÁLES-MAESO, 2016), uma vez que  
54 satisfazem com excelência todos os critérios de validação necessários. Porém,  
55 modelos “alternativos” ou “complementares” também são utilizados quando atendem  
56 aos critérios de validação. Para pesquisas que envolvem mecanismos celulares  
57 conservados, os critérios permitem a inclusão de uma surpreendente gama de  
58 organismos além dos vertebrados, desde, por exemplo, a mosca-da-fruta *Drosophila*  
59 *melanogaster* (SCHMITT et al., 2019) até o verme *Caenorhabditis elegans* (LEUNG et  
60 al., 2008). É dentro deste contexto que o peixe tropical *Danio rerio* ganhou notoriedade  
61 particularmente nas duas últimas décadas, emergindo em uma onda crescente de  
62 popularidade e relevância em diversos setores da pesquisa científica (EISEN, 2020).

63 O *Danio rerio* (Fig. 1) é um pequeno teleosteo dulcícola, endêmico das regiões  
64 sul e sudeste da Ásia, com maior abundância no nordeste indiano, Bangladesh e  
65 Mianmar. Seu nome vem do bengali “*dhani*”, que significa “dos campos de arroz”,

66 referente ao seu *habitat* em águas rasas de lagoas e plantações. Pertence à família  
67 Cyprinidae, a mesma das carpas, fato que pode ser constatado pela presença dos  
68 barbilhões popularmente conhecidos como “bigodes” em seu aparato bucal (SPENCE  
69 et al., 2008). Quando adulto não ultrapassa 5 centímetros de comprimento total, e seu  
70 corpo possui listras horizontais paralelas alternadas, com cores que variam do azul  
71 claro ao azul escuro sobre prata, levando ao seu nome popular “zebrafish” ou “peixe-  
72 zebra” (GERLAI, 2000). Os indivíduos dessa espécie são conhecidos, no Brasil,  
73 também como “paulistinha” (ABNT, 2003), pelo padrão de cores semelhante à  
74 bandeira do Estado de São Paulo. Possui dimorfismo sexual, sendo o macho  
75 diferenciado da fêmea por ser mais afilado e apresentar coloração mais intensa nas  
76 nadadeiras peitorais. A expectativa de vida média em cativeiro é de aproximadamente  
77 4 anos, atingindo maturidade reprodutiva ainda com três meses de idade  
78 (LAWRENCE, 2012).

79

80

Figura 1. Zebrafish ou “paulistinha” (*Danio rerio*)

81

82

83

84

85



86

Fonte: Google imagens.

87

88

89

90

91

92

93

94

95

96

97

Diversas vantagens podem ser apontadas no uso de *D. rerio* como modelo experimental, como o custo de aquisição e utilização consideravelmente menores que o de modelos tradicionais; o pequeno tamanho possibilita alta estocagem sem a necessidade de uma instalação com infraestrutura muito sofisticada, permitindo que até 100 exemplares adultos sejam acondicionados em tanques de 12 litros com sistema de recirculação (DAMMSKI et al., 2011). Uma vez adquiridos, podem ser facilmente reproduzidos, de forma rápida e abundante, contando com protocolos detalhados disponíveis na literatura. A desova gera em média 100 ovos, que eclodem dentro de 72 horas, com fertilidade diária e perene (ALESTRÖM et al., 2019). O desenvolvimento do embrião é externo e suas estruturas são transparentes, visíveis

98 através até mesmo dos equipamentos ópticos mais simples, facilitando o estudo do  
99 desenvolvimento embrionário, evidenciado no interesse inicial pela espécie no  
100 começo dos anos 60. Estas características fizeram desta espécie de peixe um modelo  
101 conveniente também para outros campos de estudo, como a Neurologia,  
102 Farmacologia e Toxicologia. O mapeamento do genoma de *zebrafish* constatou  
103 homologia genética com humanos, apresentando aproximadamente 87% de  
104 similaridade, com diversas rotas metabólicas evolutivamente conservadas, agregando  
105 validação de face e permitindo a criação e manipulação de variantes genéticas que  
106 melhor atendessem demandas mais específicas de pesquisa (HUNG et al., 2012).

107 Outra vantagem muito atraente de *D. rerio*, particularmente para a  
108 Neurociência, é o repertório comportamental rico e robusto recentemente revisado e  
109 padronizado (KALUEFF et al., 2013). Os parâmetros comportamentais adotados são  
110 relativamente simples, mas possuem boa validação. Normalmente são analisados os  
111 padrões individuais de locomoção, preferência por altura na coluna d'água ou  
112 luminosidade/tonalidade de um ambiente. A literatura já conta com uma lista  
113 promissora de dados em diversos domínios neurofenotípicos (KALUEFF et al., 2014).  
114 Estudos abordando depressão, por exemplo, relatam uma redução na atividade  
115 motora do peixe, acompanhado de uma elevação crônica dos níveis de cortisol  
116 (ABREU et al., 2018). Os peixes desta espécie possuem excelente memória de curto  
117 e de longo prazo, testada por meio de diferentes tarefas que avaliam o aprendizado,  
118 além de apresentar sensibilidade a agentes amnésicos e promnésicos (HAMILTON et  
119 al., 2016). O comportamento social da espécie também já se mostrou robusto e  
120 sensível à manipulação farmacológica, apresentando modulação na proximidade ou  
121 distância entre os indivíduos de um cardume como resposta à exposição a  
122 diazepínicos (ROSA et al., 2020). Também já foram observadas a discriminação e  
123 preferência por substâncias de abuso, respondendo a estímulos de recompensa  
124 (TRAN et al., 2017). Como modelo para doenças epiléticas, apresenta comportamento  
125 hiperativo quando em crise epilética, padrões de encefalogramas com *spikes* e  
126 suprarregulação da *c-fos*, sintomas característicos da doença em humanos e que  
127 podem ser reduzidos nos peixes após administração de antiepiléticos (GAWEL et al.,  
128 2020).

129 Pelo exposto, *Danio rerio* se mostra uma alternativa promissora à utilização de  
130 modelos mamíferos, como os roedores, mas também pode ser um excelente

131 complemento como intermediário entre os modelos invertebrados e vertebrados  
132 superiores. Por isso, existe um esforço crescente por parte da comunidade científica  
133 em estabelecer metodologias análogas às aplicadas em roedores para os peixes, de  
134 forma a padronizar os dados e permitir um melhor entendimento das bases neurais  
135 que fundamentam os comportamentos analisados. Para este trabalho, vamos focar  
136 especificamente nas metodologias que analisam o chamado comportamento  
137 ansiedade-símile nestes animais.

138 Alguns autores propõem uma diferenciação entre ansiedade, medo e pânico  
139 baseados em um conceito de distância defensiva, um constructo psicológico que  
140 aborda a postura do animal frente à iminência de um risco. Um risco meramente  
141 potencial induz nos animais a adoção de uma postura investigativa refletida em sua  
142 atividade exploratória, equivalente ao estado de ansiedade. Riscos distantes podem  
143 eliciar comportamento de fuga, ou agressivo – equivalentes ao medo, enquanto que  
144 riscos urgentes desencadeiam ataques ou uma resposta defensiva característica tanto  
145 em peixes quanto em roedores, chamada *freezing* (do inglês, congelamento), onde há  
146 inibição de toda a movimentação do corpo por imobilização tônica, equivalente ao  
147 pânico. O *freezing* é considerado uma estratégia evolutivamente estável e conservada  
148 em vários animais, incluindo invertebrados, uma vez que previne a detecção do animal  
149 frente à um possível predador (MAXIMINO et al., 2010).

150 Por ser um peixe de hábitos diurnos e ocupar águas rasas, existe uma  
151 preferência natural do *zebrafish* por ambientes mais claros e estratos superiores da  
152 coluna d'água, onde encontra os insetos e plantas que compõem sua dieta *in natura*  
153 (SPENCE et al., 2008). Este padrão comportamental fundamenta alguns dos testes  
154 mais utilizados para avaliar seu comportamento tipo-ansioso.

155 Paralelo aos roedores, a exposição dos peixes a um ambiente desconhecido  
156 induz a deflagração de comportamentos ansiedade-símile, refletido na redução da  
157 atividade exploratória. Este paradigma fundamenta os testes de novidade (*novelty*  
158 *tests*), contando com o teste de campo aberto para roedores e o *novel tank test*  
159 equivalente para os peixes. Em ambos, há um padrão consistente de movimentação  
160 através da periferia, próximo às paredes ou fundo do aquário, de forma a evitar o  
161 centro do novo ambiente. Este padrão comportamental é chamado de tigmotaxia, e  
162 constitui uma das principais medidas de ansiedade. A arena de teste é dividida em  
163 duas porções de igual proporção e vídeos digitais são gravados para análise posterior

164 através de *softwares* específicos. Os parâmetros avaliados normalmente incluem o  
165 tempo de permanência em cada porção, a distância percorrida e a velocidade média  
166 de movimento (STEWART et al., 2012). A exposição do peixe a substâncias de alarme  
167 aumenta o tempo de permanência no estrato inferior e reduz a distância e a velocidade  
168 média de movimentação total, configurando um estado de ansiogênese. Da mesma  
169 forma, a exposição a substâncias como o etanol (em determinadas concentrações) e  
170 benzodiazepínicos, reconhecidamente ansiolíticos, induz o quadro inverso dos  
171 mesmos parâmetros (TRAN & GERLAI, 2013).

172 A sensibilidade dos parâmetros de locomoção na exposição à diferentes  
173 substâncias é expandida para além do comportamento exploratório e da natação  
174 espontânea dos peixes. Especialmente em áreas como a Ecotoxicologia, que avalia o  
175 impacto de contaminantes sobre o comportamento animal, a capacidade de um peixe  
176 em resistir a um fluxo de água, que pode ser constante ou gradativamente crescente,  
177 e pode ser modulada através da aplicação de agentes farmacológicos (PLAUT, 2001).  
178 Em condições naturais, a capacidade de um peixe em resistir a um fluxo pode  
179 determinar seu sucesso de fuga, captura ou reprodução, cujo desempenho reflete sua  
180 aptidão física, estado fisiológico, nutrição e bem-estar (SAGLIO et al., 2003). A  
181 resistência ao fluxo está diretamente relacionada com a velocidade máxima que o  
182 peixe é capaz de suportar, sendo conceitualmente dividida em três categorias  
183 principais (BAEMISH, 1978). A velocidade de natação sustentada, que é mais baixa,  
184 observada em situações rotineiras de forrageio, deslocamento e migração, pode ser  
185 aplicada por longos períodos sem causar fadiga. A velocidade de natação prolongada  
186 requer mais empenho dos peixes, não excede 240 minutos de atividade e resulta na  
187 fadiga muscular devido ao constante aporte metabólico por vias aeróbias. A  
188 velocidade de natação de explosão é mais alta, observada em situações de fuga ou  
189 captura de presas, não é suportada por mais de 60 segundos, obtém energia por vias  
190 anaeróbias e resulta em rápida fadiga muscular (REIDY et al., 2000).

191 A capacidade de peixes em resistir a um fluxo contínuo foi proposta pela  
192 primeira vez por CAIRNS (1966) como medida importante do impacto de  
193 contaminantes, conferindo ao parâmetro um valor ambiental. Desde então, medidas  
194 de resistência natatória são utilizadas para definir os limites e a tolerância de uma  
195 espécie à toxicidade de diferentes agentes. VIERA e colaboradores (2009)  
196 observaram redução neste parâmetro após exposição à 50  $\mu\text{g.L}^{-1}$  de cobre. BLAZINA

197 e colaboradores (2013) demonstraram que a aplicação de etanol, clonazepam e  
198 haloperidol também reduz o tempo médio de resistência ao fluxo. Inúmeros fatores  
199 contribuem para a performance do peixe em um teste de aptidão física, pois esta  
200 requer uma integração de todos os sistemas fisiológicos para emergir em força e  
201 motivação (MELO, 2011).

202 Outro paradigma explorado pelos testes comportamentais é a afinidade ou  
203 aversão à ambientes iluminados, fortemente relacionado aos hábitos naturais dos  
204 animais. Em roedores, de hábito noturno, existe uma preferência natural por  
205 ambientes mais escuros. O inverso é verdade para peixes de hábito diurno, que  
206 apresentam preferência natural para ambientes mais claros. Utilizando este  
207 paradigma simples, porém robusto, pesquisadores conseguem investigar os efeitos  
208 ansiogênicos ou ansiolíticos provocados por determinada condição. Os testes de  
209 claro-escuro são globalmente aplicados para avaliação dos parâmetros relacionados  
210 a este paradigma. Originalmente desenvolvido para roedores, ele foi adaptado  
211 com sucesso para peixes. Consiste em inserir o animal, normalmente individualmente,  
212 em um ambiente dicotômico para clareza, com duas porções de igual tamanho, isto  
213 é, uma clara e outra escura. Como o *zebrafish*, especificamente, é um animal gregário,  
214 encontrar-se sozinho em um ambiente desconhecido, além da manipulação humana  
215 que o introduz ali, contribui para a deflagração de comportamento ansiedade-símile  
216 quando sóbrio. Este comportamento é refletido por uma preferência inicial pelo  
217 ambiente escuro, presumindo-se ser evolutivamente estável por dificultar a detecção  
218 visual do animal por um possível predador em condições naturais. Esta preferência  
219 diminui com o tempo, provavelmente devido à habituação. Assim, o tempo que o  
220 animal despende em cada compartimento e o número de vezes que ele troca de  
221 compartimento configuram medidas objetivas de sua ansiedade (STEWART et al,  
222 2010). Coerentemente, a aplicação de substâncias ansiolíticas reduz ou até mesmo  
223 anula o tempo de permanência no ambiente escuro, enquanto que a administração de  
224 ansiogênicos aumenta este parâmetro (MAXIMINO et al., 2012).

225 Quando se estuda o comportamento, parâmetros fisiológicos podem ser  
226 adições valiosas para a interpretação das observações. Em *Danio rerio*, o eixo  
227 hipotalâmico-hipofisário-interrenal é fundamental nas vias neuroendócrinas que  
228 medeiam as respostas comportamentais da ansiedade-símile, envolvendo uma  
229 cascata de hormônios relacionados ao estresse. Notavelmente, nos peixes desta

230 espécie, assim como nos humanos, é o cortisol ao invés de corticosterona, como nos  
231 roedores, que desempenha o papel de sinalizador primário das respostas de estresse,  
232 agregando valor adicional no emprego destes peixes como modelo para estudo da  
233 fisiologia do estresse em humanos (EGAN et al., 2009). O cortisol possui papel chave  
234 na homeostase do metabolismo energético, e variações em sua concentração no  
235 sistema circulatório interferem diretamente na performance natatória dos peixes por  
236 alterar a disponibilidade de glicose plasmática para abastecimento das vias aeróbias  
237 do tecido muscular (MASSÉ et al., 2013). Neste contexto, a glicemia pode ser  
238 considerada um parâmetro válido não só para avaliação indireta dos níveis de cortisol,  
239 mas, também, para refletir o esforço e o desempenho dos peixes em testes que  
240 envolvam tarefas fisicamente exigentes, como é o caso da resistência ao fluxo  
241 (EAMES et al., 2010).

242 Fica evidente, então, que estes testes apresentam uma caracterização não  
243 somente qualitativa do estado de ansiedade dos animais, mas também quantitativa,  
244 através, por exemplo, da modulação farmacológica dos parâmetros relacionados ao  
245 comportamento tipo-ansioso. A administração de substâncias psicoativas como, para  
246 citar alguns exemplos, fluoxetina, clonazepam, diazepam, buspirona, etanol e cafeína  
247 altera sensivelmente os parâmetros levantados de forma similar em roedores e peixes  
248 (CHAMPAGNE et al., 2010), com a vantagem de que, nestes, a administração pode  
249 ser feita diluindo a substância diretamente na água (quando solúvel) para ser  
250 absorvida através das brânquias e pele (BASNET et al., 2019), enquanto que, em  
251 roedores, é administrada via gavagem ou por injeção intraperitoneal, atrelando um  
252 fator de stress e invasão adicional à sua manipulação (BROCARD et al., 2016). O  
253 etanol, em específico, é uma substância ideal para analisar a modulação  
254 neurofarmacológica dos parâmetros ansiedade-símile por ser altamente solúvel em  
255 água, garantindo a absorção pelo peixe, ser de aquisição barata e simples, além de  
256 contar com extensa lista de estudos na literatura, conferindo um amplo *pool* de  
257 comparação de dados.

258 O etanol, ou álcool etílico é um álcool primário, de fórmula  $C_2H_6O$  (ou  $C_2H_5OH$ )  
259 (fig. 2), derivado da hidroxialquilação de um dos hidrogênios do etano. Sua aparência  
260 é a de um líquido incolor, possuindo um característico odor avinhado e sabor pungente  
261 (PUBCHEM, 2021). É um produto encontrado nas emissões de plantas, fogo, vulcões,  
262 excretas animais e fermentação natural de açúcares.

263 Cabe aqui uma observação acerca das nomenclaturas utilizadas no presente  
264 trabalho para o composto em questão. Nesta introdução, será utilizada a denominação  
265 genérica “álcool” e suas derivações para a maior parte das menções ao etanol  
266 enquanto substância de uso recreacional, mesmo porque este termo tem caráter  
267 genérico, popular, e bebidas fermentadas naturalmente podem conter concentrações  
268 traço de outros álcoois como metanol, propanol e butanol (DESTANOGLU & ISMAIL,  
269 2019). O termo “etanol”, e suas derivações, será adotado para citações referentes a  
270 trabalhos e estudos científicos, sendo especificamente atribuído ao fármaco  
271 psicoativo. Para o manuscrito será utilizado a denominação “EtOH” por ser a forma  
272 mais comum encontrada nos artigos consultados.

273 Devido à alta solubilidade, o etanol possui importante utilidade comercial como  
274 solvente para produtos de limpeza, perfumes e cosméticos, além de ser utilizado como  
275 aditivo para combustíveis e fármacos (O’NEIL, 2013). Ademais, é o principal composto  
276 ativo em bebidas alcoólicas utilizadas globalmente como psicoativos recreativos por  
277 potencializarem a desinibição, a sociabilidade e a euforia (RITCHIE & ROSER, 2019).  
278 No entanto, seu consumo excessivo tem sido relacionado a situações adversas à  
279 saúde e à sociedade, como danos físicos, comportamento sexual de risco, gravidez  
280 indesejada, infarto agudo do miocárdio, violência doméstica, acidentes de trânsito,  
281 dependência psicológica ou química, além de estar associado ao aumento do índice  
282 de mortalidade em diversas condições patológicas, como, por exemplo, esteatose  
283 hepática, hepatite, pancreatite, doenças cardiovasculares, neuropatia e atrofia  
284 cerebelar (HECKMAN & SILVEIRA, 2009).

285

286 *Figura 2. Fórmula estrutural da molécula de etanol. Imagem de domínio público.*

287

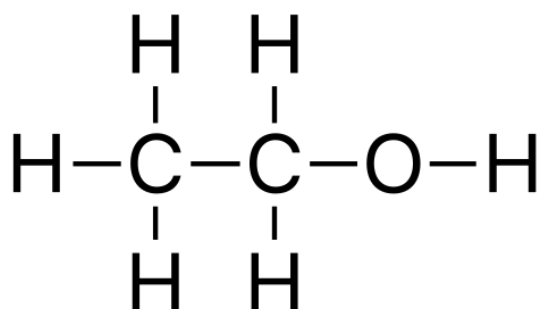
288

289

290

291

292



293

Fonte: PUBCHEM, 2021.

294

295 O consumo recreativo de álcool tem origem em tempos muito antigos. A

296 “hipótese do macaco bêbado” propõe que a atração dos humanos pela substância  
297 remonta a dezenas de milhares de anos, sendo derivada de seus ancestrais primatas.  
298 Esta hipótese parte do princípio de que o etanol, por ser um produto natural da  
299 fermentação de açúcares presentes nas frutas e sementes que compunham a dieta  
300 dos hominídeos ancestrais, constituiu o odor desses alimentos. Uma vez que é possui  
301 molécula relativamente leve e volátil, o etanol teria a capacidade de ser carregado  
302 rapidamente pelos ventos através da vegetação, ajudando alguns indivíduos a  
303 encontrar frutas maduras com maior facilidade, conferindo, assim, uma vantagem  
304 seletiva aos que possuíam maior sensibilidade ao seu aroma (DUDLEY, 2014).  
305 Evidências arqueológicas de cunho mais rigoroso, no entanto, datam do começo do  
306 período Neolítico, há aproximadamente 8.000 A.C. e apontam para diversas culturas  
307 ao redor do globo, sugerindo que a produção de bebidas alcoólicas tenha surgido de  
308 maneira espontânea e independente em várias civilizações (VIDRIH & HRIBAR,  
309 2016). O uso de álcool como uma droga recreativa perdurou até os dias atuais,  
310 tornando-se um tema de crescente relevância, abrangendo também questões clínicas,  
311 epidemiológicas e socioeconômicas (AXLEY et al., 2019).

312 A principal motivação das pessoas em consumir determinadas bebidas é  
313 desfrutar dos efeitos prazerosos provenientes da intoxicação pelo etanol, que, em  
314 doses relativamente baixas, incluem sedação moderada, desinibição social e uma  
315 sensação subjetiva de bem-estar. Doses mais altas, no entanto, podem interferir na  
316 coordenação motora, causar náuseas, vômitos, convulsões, coma e, em casos  
317 extremos, morte por inativação de funções vegetativas, conferindo à substância um  
318 efeito bifásico (VALE, 2007). Essas alterações fisiológicas e comportamentais são  
319 produto de seu mecanismo de intoxicação. Apesar de ser uma droga muito antiga,  
320 seus mecanismos de ação ainda não são completamente compreendidos. A  
321 neurofarmacologia do etanol é muito complexa devido ao tamanho relativamente  
322 pequeno da molécula, carga elétrica resultante praticamente nula e alta solubilidade,  
323 permitindo que ela transite livremente através de membranas biológicas, interagindo  
324 não só com receptores e proteínas específicos do seu mecanismo, mas, por alterar  
325 parâmetros como a permeabilidade da membrana, interferindo nas mais diversas  
326 funções intracelulares, dependendo de sua concentração (VENGELIENE et al., 2008).

327 Parcela significativa da literatura sobre o álcool, no entanto, é voltada para o  
328 tratamento da doença de seus adictos, o alcoolismo. Por isso, grande parte dos

329 estudos utiliza como base a fisiologia de mamíferos, com finalidade translacional para  
330 seres humanos. Publicações relatando com profundidade satisfatória a  
331 farmacodinâmica e farmacocinética do etanol em teleósteos como o *zebrafish* são  
332 extremamente escassas. Porém, uma vez que os principais sistemas de  
333 neurotransmissores de mamíferos descritos nestes mecanismos estão  
334 evolutivamente conservados em *D. rerio* (STEWART et al., 2015) e a regulação gênica  
335 e as enzimas envolvidas no seu metabolismo oxidativo estão presentes em ambos os  
336 grupos (MOCELIN et al., 2019), é seguro assumir que compartilham ao menos alguns  
337 pontos chave dos processos farmacológicos envolvendo essa substância (HOWARTH  
338 et al., 2011).

339 Sua administração em mamíferos, incluindo nos humanos, é normalmente feita  
340 por via oral. Uma vez que possui carga elétrica resultante praticamente nula, ele é  
341 capaz de atravessar as membranas das mucosas gastrintestinais livremente, sendo  
342 absorvido por difusão passiva seguindo naturalmente o gradiente de concentração. A  
343 absorção pela mucosa intestinal, especificamente no duodeno e no jejuno, no entanto,  
344 é muito mais rápida que pela mucosa gástrica, sendo essa, portanto, a principal via  
345 de entrada do álcool no sangue. Neste caso, a taxa de absorção dependerá, então,  
346 da biodisponibilidade, do gradiente de concentração e da taxa de esvaziamento  
347 gástrico. A biodisponibilidade do etanol nas porções gastrintestinais citadas é  
348 influenciada por uma série de fatores que contribuem para o efeito de primeira  
349 passagem. Na mucosa gástrica, ele será oxidado pela atividade das isoformas da  
350 enzima Álcool Desidrogenase (ADH), especificamente a  $\sigma$ ADH, e as ADHs de classes  
351 I e III. Na mucosa intestinal, será degradado pela atividade da microbiota  
352 (KOURKOUNPETIS & SOOD, 2019). A administração em peixes oferece uma  
353 vantagem quando comparada à de mamíferos, uma vez que o etanol pode ser  
354 simplesmente diluído no meio de exposição e absorvido principalmente pela mucosa  
355 branquial, seguindo os mesmos princípios físico-químicos e alcançando diretamente  
356 a circulação sistêmica (GERLAI, 2000). Não se sabe com precisão, porém, a extensão  
357 do efeito de primeira passagem nos peixes.

358 Uma vez que o etanol atinge a circulação sistêmica, sua distribuição não  
359 depende de nenhuma proteína transportadora, e a perfusão é determinada pela taxa  
360 de fluxo sanguíneo, massa, dimensões e proporção relativa entre água e gordura dos  
361 tecidos. A concentração no sangue se dá pela razão simples entre a taxa de absorção

362 pela taxa de oxidação (CEDERBAUM, 2012). A taxa de oxidação, por sua vez, será  
363 determinada por fatores genéticos do indivíduo e pela saturação das enzimas  
364 envolvidas no metabolismo oxidativo (DLUGOS & RABIN, 2003).

365 Os efeitos comportamentais podem ser observados pouco tempo após contato  
366 com a substância, que alcança rapidamente o Sistema Nervoso Central (SNC).  
367 MATHUR et al. (2011) detectou no cérebro de *zebrafish* uma concentração  
368 proporcional à décima parte da solução-teste com apenas 20 minutos corridos de  
369 exposição por imersão, descrevendo também alterações subsequentes no  
370 comportamento e indicando que este tempo foi suficiente para exercer efeito  
371 farmacológico. Com uma taxa de absorção constante pelas brânquias e pela pele, os  
372 níveis de etanol no cérebro e no sangue atingem ponto de equilíbrio dentro de 40  
373 minutos (GERLAI, 2000).

374 Tanto em mamíferos quanto em peixes, a oxidação do etanol acontece  
375 majoritariamente através de rotas enzimáticas no fígado, por duas vias principais: a  
376 das álcool desidrogenases (ADH), especialmente pelas desidrogenases de Classe I e  
377 III, e, numa proporção muito menor, a do complexo Citocromo P450, pela ação das  
378 isoformas da CYP2E1. As ADHs são enzimas citosólicas portadoras de Zinco e  
379 constituídas de duas sub-unidades de aproximadamente 40 kDa cada, responsáveis  
380 pela transformação do etanol em acetaldeído através da redução da coenzima  
381 nicotinamida adenina dinucleotídeo (NAD<sup>+</sup>) em NADH. Como a constante de Michaelis  
382 ( $K_m$ ) da maioria das isozimas é muito baixa (aproximadamente 1 mM), a saturação  
383 acontece em pequenas concentrações, fazendo com que a dinâmica de eliminação  
384 esteja sempre em velocidade máxima ( $V_m$ ) e, uma vez que este grupo proteico é  
385 responsável pela maior parte da oxidação, ele rege o ritmo oxidativo resultante, sendo  
386 este, portanto, linear. A taxa de eliminação média do etanol para um ser humano  
387 adulto de 70 Kg é de aproximadamente 7 g.h<sup>-1</sup>, mas animais com dimensões menores  
388 metabolizam muito mais rapidamente, sugerindo que o processo está relacionado com  
389 a taxa metabólica basal do organismo (CEDERBAUM, 2012).

390 Análises filogenéticas de duas ADHs de *D. rerio* demonstram que elas dividem  
391 ancestralidade com as ADHs de classe I e III de mamíferos. Os genes para estas  
392 enzimas foram mapeados e localizados no cromossomo 13, sendo nomeados *Adh8a*  
393 e *Adh8b*. A sequência de aminoácidos codificada pela *Adh8a* apresenta similaridade  
394 de 82% e 72% para as enzimas homólogas de humanos e roedores, respectivamente.

395 A capacidade de metabolização do etanol ( $V_{max}$ ) é de 13,4 nmol.min<sup>-1</sup> por miligrama  
396 de proteína e sua afinidade ( $K_m$ ) é de 0.7 mM. A *Adh8b*, apesar de sua similaridade  
397 constitucional com a de mamíferos, não compartilha das mesmas funcionalidades,  
398 tendo maior eficiência na oxidação de cadeias maiores que cinco carbonos. Ambos  
399 os genes são expressos ainda durante o desenvolvimento embrionário e prosseguem  
400 no cérebro, coração, nadadeiras, brânquias, músculos e fígado dos adultos  
401 (REIMERS et. Al, 2004).

402 O etanol também é oxidado a acetaldeído pelas enzimas microsossomais do  
403 CYP450 através das isoformas da CYP2E1 presentes no retículo endoplasmático liso.  
404 Esta via está presente tanto no fígado quanto no cérebro, porém se faz mais presente  
405 neste. Ela atua por intermédio da coenzima nicotinamida adenina dinucleotídeo  
406 fosfato (NADP<sup>+</sup>) sendo reduzida à NADPH. As vias microsossomais possuem afinidade  
407 muito menor ao etanol quando comparadas às ADHs, e geram proporcionalmente  
408 mais espécies reativas de oxigênio (EROs) como produto, notavelmente peróxido de  
409 hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) e superóxido (O<sub>2</sub>). A expressão das isoformas da CYP2E1 é  
410 positivamente induzida pelo etanol, e acredita-se que alguns dos efeitos deletérios da  
411 substância às células nervosas esteja relacionado ao estresse oxidativo causado pela  
412 atividade destas enzimas (BERNARDO et al., 2019).

413 Altas concentrações do produto final da via oxidativa citoplasmática do etanol,  
414 o acetaldeído, estão diretamente relacionadas com as sensações desagradáveis que  
415 seguem o consumo excessivo da substância, como náuseas, vômitos e cefaleia. A  
416 molécula de acetaldeído possui alto poder reativo e pode desencadear efeito deletério  
417 em proteínas e ácidos nucleicos, modificando estas estruturas por interação com o  
418 grupamento amino e, conseqüentemente, interferindo em sua função. O acetaldeído  
419 resultante das vias de metabolização é então, por sua vez, oxidado a acetato em um  
420 processo catalisado pela ação da enzima acetaldeído desidrogenase (ALDH),  
421 encontrada exclusivamente no interior das mitocôndrias. Esta reação também  
422 acontece por intermédio da coenzima NAD<sup>+</sup> sendo reduzida à NADH. O acetato passa  
423 por uma outra etapa de oxidação, sendo convertido a Acetil-CoA em uma reação  
424 catalisada pela acetil-CoA sintetase onde, a partir daí, divide sua rota metabólica com  
425 lipídeos, proteínas e carboidratos que também geram Acetil-CoA como subproduto  
426 (MUGGIRONI et al., 2013).

427 Devido à suas características físico-químicas, o etanol atravessa com facilidade

428 a barreira hematoencefálica, alcançando equilíbrio químico no cérebro rapidamente.  
429 Uma vez que ele influencia uma ampla gama de vias neuroquímicas e metabólicas,  
430 seu efeito é caracterizado como pleiotrópico. Sabe-se que, no geral, o efeito  
431 neurocomportamental está relacionado com influência direta sobre vias inibitórias e  
432 excitatórias do SNC, e indiretamente pelo sistema de recompensa mediado pela  
433 dopamina (DA) e serotonina, ou 5-hidroxitriptofano (5-HT). É considerado uma droga  
434 neurodepressora por potencializar a ação do principal neurotransmissor inibitório, o  
435 ácido gama-aminobutírico (GABA) e concomitantemente, diminuir a ação do principal  
436 neurotransmissor excitatório, o glutamato. Ademais, ele também reduz o fluxo  
437 transmembrana de íons  $\text{Ca}^{2+}$  através da inibição dos Canais de  $\text{Ca}^{2+}$  tipo L,  
438 relacionados com comportamentos depressivos e com a neuroadaptação induzida  
439 pela exposição à substância (HARRISON et al., 2017).

440 O sistema de recompensa modulado pela DA e 5-HT está relacionado com a  
441 regulação de parâmetros comportamentais como a locomoção, cognição, emoção,  
442 agressividade e ansiedade. Mesmo em doses baixas, o etanol é capaz de influenciar  
443 uma enorme liberação de DA e 5-HT no *nucleus accumbens*, reforçando  
444 positivamente o uso da substância. A super-ativação desta via está associada a  
445 sensações de prazer que facilitarão nova busca pela droga. Em contrapartida, o  
446 consumo exagerado e crônico reduz a concentração desses neurotransmissores, o  
447 que sugere que estão envolvidos com os sintomas comportamentais observados  
448 durante a abstinência (MATHUR et al., 2011).

449 A via serotoninérgica, em especial, desempenha papel central no  
450 comportamento de consumo, recompensa, preferência e dependência ao etanol. Este  
451 neurotransmissor regula comportamentos de impulsividade, agressividade, motivação  
452 e medo. O consumo da droga influencia diretamente a ativação desta via e a  
453 expressão de seus receptores, alterando sua atividade e homeostase (MÜLLER et  
454 al., 2020). A exposição aguda produz aumento dos níveis extracelulares de  
455 concentração de 5-HT, enquanto que o consumo crônico leva, em geral, à uma  
456 redução nesta neurotransmissão, evidenciado pela redução dos níveis de seu  
457 metabólito primário, o ácido 5-hidróxiindoleacético, em detecção no fluido  
458 cerebrospinal de alcoólatras em análises *post-mortem* (VIRKKUNEN & LINNOILA,  
459 1990). As vias serotoninérgicas também influenciam de maneira indireta a  
460 neurotransmissão de GABA e aumentam a produção de DA, repercutindo no processo

461 de tomada de decisões e em comportamentos emocionais.

462 Alguns estudos relacionam a atividade serotoninérgica no cérebro de *D. rerio*  
463 com a deflagração de comportamentos específicos, como medo e ansiedade. Os  
464 genes que codificam as sequências de aminoácido das proteínas envolvidas na  
465 síntese, transporte, sinalização e degradação em *zebrafish* dividem alta similaridade  
466 com os de outros vertebrados, sugerindo que os efeitos das drogas que alteram o  
467 metabolismo de 5-HT é conservado nestas espécies. Coerentemente, a exposição de  
468 *D. rerio* a agonistas e antagonistas de 5-HT possui relação positiva com parâmetros  
469 comportamentais de ansiedade e locomoção. Considerando que manipulações  
470 farmacológicas envolvendo o sistema serotoninérgico em peixes produzem efeito  
471 comportamental robusto, é razoável concluir que esta é uma espécie promissora para  
472 estudos envolvendo esta via de neurotransmissão (STEWART et al., 2014).

473 Os receptores GABA<sub>A</sub> também são alvos promissores do estudo de efeito  
474 farmacodinâmico direto do etanol. Estudos com roedores *knock-out* para proteínas de  
475 síntese destes receptores reduzem os efeitos comportamentais relacionados ao  
476 etanol (CHANDRA et al., 2008), e, coerentemente, agonistas GABAérgicos os  
477 potencializam (TRAN et al., 2017). Estes receptores são canais ionotrópicos ligante-  
478 dependentes que possuem como agonista endógeno o neurotransmissor GABA,  
479 principal neurotransmissor inibitório do SNC. Uma vez em sua conformação ativa, o  
480 receptor permite o influxo de íons cloreto, aumentando o número de cargas negativas  
481 no interior da célula pós-sináptica e reduzindo a chance de disparo de um potencial  
482 de ação, inibindo, em última instância, a neurotransmissão. Ensaios eletrofisiológicos  
483 *in vitro* constataram que o etanol em concentrações entre 1 mM e 50 mM administrado  
484 em culturas celulares após remoção aguda proporcionam potencialização da atividade  
485 dos receptores GABA<sub>A</sub> em neurônios da região dorsal, hipocampal e cortical de ratos,  
486 camundongos e galináceos. Esta potencialização acontece, a nível de receptor, por  
487 aumentar tanto a frequência dos eventos de abertura, quanto o tempo médio do  
488 estado ativo (LOBO & HARRIS, 2008).

489 Outro receptor muito presente nos neurônios centrais que possui afinidade  
490 relatada ao etanol é o N-metil-D-aspartato (NMDA), um tipo de receptor que possui  
491 como agonista endógeno o principal neurotransmissor excitatório do SNC, o  
492 glutamato. Quando ativado pela ligação com o glutamato, o receptor produz uma  
493 excitação na célula pós-sináptica por permitir influxo catiônico. O rápido movimento

494 de cargas positivas para o interior celular reduz a diferença de potencial que existe  
495 para com o ambiente externo, facilitando, assim, o disparo de um potencial de ação.  
496 Estudos com cultivos celulares demonstram que etanol administrado mesmo em  
497 baixas concentrações (0,03% v/v) é capaz de inibir o influxo catiônico provocado pelos  
498 receptores NMDA, sugerindo que a droga exerce efeito farmacológico em quantidades  
499 relevantes para o consumo humano. O mecanismo molecular que fundamenta este  
500 efeito ainda não foi completamente elucidado, mas é consenso que existe um  
501 decréscimo na taxa de influxo de íons  $Ca^{2+}$ . A inibição da excitabilidade pós-sináptica  
502 causada pelo EtOH sobre as vias glutamatérgicas repercute em outras vias  
503 importantes da sinalização central, reduzindo a neurotransmissão dopaminérgica,  
504 serotoninérgica e colinérgica por impedir a liberação das vesículas dos respectivos  
505 neurotransmissores. Especificamente nas vias hipocâmpais, esta interação pode estar  
506 relacionada aos efeitos deletérios do etanol sobre a memória e a aprendizagem  
507 (GONZALES & JAWORSKI, 1997). A exposição crônica ao etanol também aumenta  
508 a expressão de proteínas associadas à síntese dos receptores NMDA, apresentando  
509 efeito direto sobre a plasticidade neural por aumentar a população destes receptores  
510 através de mecanismos de suprarregulação (ALASMARI et al., 2018).

511 O etanol configura, então, uma substância ideal para a modulação  
512 farmacológica do comportamento do *D. rerio* por apresentar conveniências como fácil  
513 acesso e preço aquisitivo, além da facilidade de administração. Também, o efeito do  
514 etanol sobre o comportamento do *zebrafish* e outros modelos experimentais é  
515 amplamente relatado na literatura, possibilitando um bom repertório de comparação  
516 de dados. Além disto, sabe-se que o *zebrafish* possui as estruturas neurais envolvidas  
517 no efeito farmacológico relacionado à suas expressões comportamentais  
518 evolutivamente conservadas, validando-o como modelo. Desta forma, o etanol permite  
519 a modulação quantitativa dos parâmetros comportamentais avaliados nos testes de  
520 comportamento abordados até então. No entanto, na maioria das vezes, estes testes  
521 são aplicados separadamente. A aplicação de diferentes testes comportamentais  
522 sequencialmente, numa bateria de testes, oferece muitas vantagens, e constitui uma  
523 metodologia exercida com roedores e ainda não transferida para peixes.

524 Mesmo entre indivíduos de uma mesma espécie é possível encontrar  
525 diferenças morfológicas, preferências, aptidões no desenvolvimento de tarefas e  
526 vulnerabilidades. O repertório comportamental individual de cada espécime oferece

527 um desafio no estudo das bases neurobiológicas do comportamento (LEITE-  
528 FERREIRA et al., 2019). O tamanho de um animal, sua posição numa hierarquia ou  
529 seu *background* genético são apenas alguns dos fatores que podem influenciar sua  
530 tomada de decisão frente a situações de risco. Desta forma, é natural que o fenótipo  
531 comportamental tipo-ansioso seja deflagrado com diversidade intraespecífica e  
532 interindividual. Testes comportamentais aplicados separadamente coletam dados  
533 comportamentais de uma população, mas excluem essas variações, uma vez que o  
534 comportamento adotado por um animal em um dos testes pode não ser relacionado  
535 com o resultado de outro teste para o domínio comportamental abordado (MCILWAIN  
536 et al., 2001). Por exemplo, um peixe de proporções relativamente grandes ou em grau  
537 alto de sua hierarquia, poderia estar mais confiante em explorar as porções superiores  
538 do aquário de natação espontânea (*novel tank*), não apresentando o fenótipo  
539 comportamental típico do padrão tipo-ansioso, a tigmotaxia, mas ainda assim  
540 apresentar aversão ao estímulo luminoso em um teste de claro-escuro. Utilizando este  
541 espécime ilustrativo em apenas um teste, não apenas limitamos a diversidade  
542 fenotípica observada no experimento como também necessitaríamos de outro  
543 indivíduo para o outro teste, dobrando a quantidade de indivíduos utilizados  
544 (HARRISON et al., 2020).

545 Ademais, a utilização de modelos experimentais nas últimas décadas  
546 acompanhou também um enrijecimento das medidas bioéticas necessárias para a  
547 execução dos trabalhos envolvendo pesquisas com animais. O Princípio dos 3 R's,  
548 como foi batizado pelos idealizadores RUSSEL & BURCH (1959), prevê uma eficácia  
549 maior na utilização destes modelos. Ela implica nos preceitos *Replace*, *Reduction* e  
550 *Refinement* nas metodologias experimentais. Por *Replacement*, do inglês  
551 “substituição”, entende-se a substituição dos modelos tanto quanto possível, por  
552 metodologias ou tecnologias que não envolvam seres vivos, mas também pela adoção  
553 de modelos que se acredita possuírem menor grau de experienciar dor ou sofrimento.  
554 Por *Reduction*, do inglês “redução”, entende-se reduzir a quantidade de indivíduos  
555 utilizados sem impactar o respaldo estatístico da pesquisa, garantindo sua validação.  
556 E por fim, *Refinement*, do inglês “refinamento”, implica na adoção de procedimentos  
557 que proporcionem uma relação mais eficiente entre severidade e resultados (KOLAR,  
558 2006). A aplicação de baterias testes contempla todos os três pontos, substituindo  
559 modelos mamíferos, reduzindo o número de animais necessários para o

560 desenvolvimento das pesquisas e ampliando o fenótipo comportamental observado,  
561 garantindo dados mais robustos para a análise.

562           Portanto, a avaliação de várias respostas comportamentais de um mesmo  
563 peixe em diferentes testes permite uma correlação entre os fenótipos de diferentes  
564 domínios, ampliando a compreensão dos padrões comportamentais interindividuais e  
565 trazendo mais confiança na interpretação das diferenças observadas. Ao expor um  
566 mesmo indivíduo a vários testes sequencialmente padronizados, reduz-se também a  
567 quantidade de animais necessários para a pesquisa (PAYLOR et al., 2006). Porém,  
568 existem desafios relacionados à esta metodologia. Não se sabe com precisão qual a  
569 extensão do impacto da manipulação de um indivíduo seguidas vezes, nem a  
570 interferência dos testes antecedentes. É possível contornar esses obstáculos  
571 definindo uma sequência padronizada, partindo de testes menos desafiadores em  
572 termos de esforço físico e também menos “invasivos”, ou seja, que requerem menos  
573 manipulação, para testes progressivamente mais exigentes ou intensos nestes  
574 quesitos (WOLF et al., 2016). Outro ponto é o fator de habituação do animal. Testes  
575 de novidade serão burlados por animais “treinados”, ou seja, uma vez que o animal  
576 foi retirado de seu aquário de residência e inserido em um novo ambiente, é possível  
577 que a reinserção em um segundo novo ambiente reduza o fator de novidade,  
578 interferindo em sua resposta comportamental. É necessário avaliar até que ponto  
579 estas desvantagens interferem na validação desta metodologia.

580

581           **2 OBJETIVOS**

582

583           **2.1 OBJETIVO GERAL**

584

585           Avaliar a eficácia da aplicação de uma bateria de testes comportamentais  
586 aplicados de maneira sequencial utilizando peixes *Danio rerio* como modelos  
587 experimentais.

588

589           **2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

590

591           Investigar através da ação farmacológica do etanol sobre o comportamento de  
592 *Danio rerio* em uma bateria de testes comportamentais aplicados em sequência,  
593 quanto existe, ou se existe, impacto de um teste antecessor sobre o teste sucessor.

594

595           Obter, através da inversão da ordem dos dois primeiros testes da bateria-teste,  
596 um vislumbre do impacto que a ordem de aplicação dos testes pode oferecer sobre a  
597 sensibilidade e o resultado final da bateria.

598

### 599 3 MATERIAL E MÉTODOS

600

#### 601 3.1 ANIMAIS EXPERIMENTAIS: ORIGEM E CONDIÇÕES DE MANUTENÇÃO EM 602 LABORATÓRIO

603

604 Para este estudo, foram utilizados 414 indivíduos adultos de *Danio rerio*  
605 linhagem selvagem (AB), de sexo sortido, comprimento total médio de  $3,4 \pm 0,4$  cm e  
606 peso médio de  $0,3 \pm 0,1$  g, sem experiência prévia com o experimento, provenientes  
607 de um fornecedor comercial (Angelfish, Londrina-PR). Os peixes foram aclimatados  
608 no Laboratório de Ecofisiologia Animal (LEFA) da Universidade Estadual de Londrina  
609 (UEL) por pelo menos 10 dias em aquários de vidro contendo aproximadamente 70 L  
610 de água de cultivo (água de torneira desclorada por filtro de carvão ativado),  
611 respeitando-se a densidade populacional máxima de 1 g de peixe por litro de água. A  
612 alimentação foi feita com ração comercial Alcon Basic<sup>®</sup> e ocorreu duas vezes ao dia.  
613 As condições de manutenção simularam um ambiente tropical, com temperatura  
614 mantida a  $26 \pm 1$  °C através do uso de aquecedores dotados de termostato, e  
615 fotoperíodo de 14 horas claro e 10 horas escuro. Os seguintes parâmetros físicos e  
616 químicos foram monitorados (valores entre parênteses): pH ( $7,0 \pm 0,5$ ); condutividade  
617 elétrica ( $110 \pm 10 \mu\text{S cm}^{-1}$ ). nitrito e amônia não-ionizada (máximos de  $0,25 \text{ mg L}^{-1}$  e  
618  $5 \mu\text{g L}^{-1}$ , respectivamente; ambos Labcon Test<sup>®</sup>). Para manter a qualidade da água e  
619 o bem-estar dos animais foi realizada a retirada de resíduos por sifonação sempre que  
620 notados no fundo dos aquários e renovação parcial da água (de 50 a 75%) com  
621 frequência semanal, além da utilização de bombas ligadas a filtros de esponja e a  
622 aeradores.

623

#### 624 3.2 DESENHO EXPERIMENTAL

625

##### 626 3.2.1 Configuração das Baterias-Teste

627

628 Para avaliar a eficácia e viabilidade de execução de testes comportamentais de  
629 forma sequencial, foram realizados, em um primeiro momento três tipos de testes em  
630 uma ordem pré-estabelecida, com os mesmos indivíduos passando de um teste para

631 o outro e, em um segundo momento, a aplicação dos mesmos testes de forma  
 632 individual ou com a posição invertida na sequência. A figura 3 permite uma melhor  
 633 compreensão da metodologia adotada. Para fins didáticos estes dois momentos de  
 634 realização dos testes foram denominados Bateria 1 (BT1) e Bateria 2 (BT2) de  
 635 experimentos.

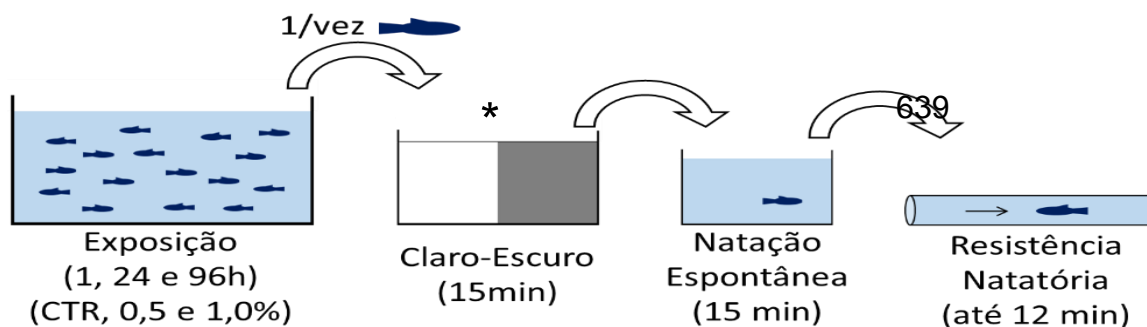
636

Figura 3. Baterias 1 e 2 de experimentos. Bateria 1: três testes comportamentais em sequência. Bateria 2: inversão dos dois primeiros testes da bateria 1 e teste de resistência natatória em separado. Os testes marcados com asterisco (\*), mesmo constituindo uma bateria, têm caráter de testes isolados, pois são os primeiros da sequência. CE = teste claro-escuro; NE = teste de natação espontânea; RN = teste de resistência natatória.

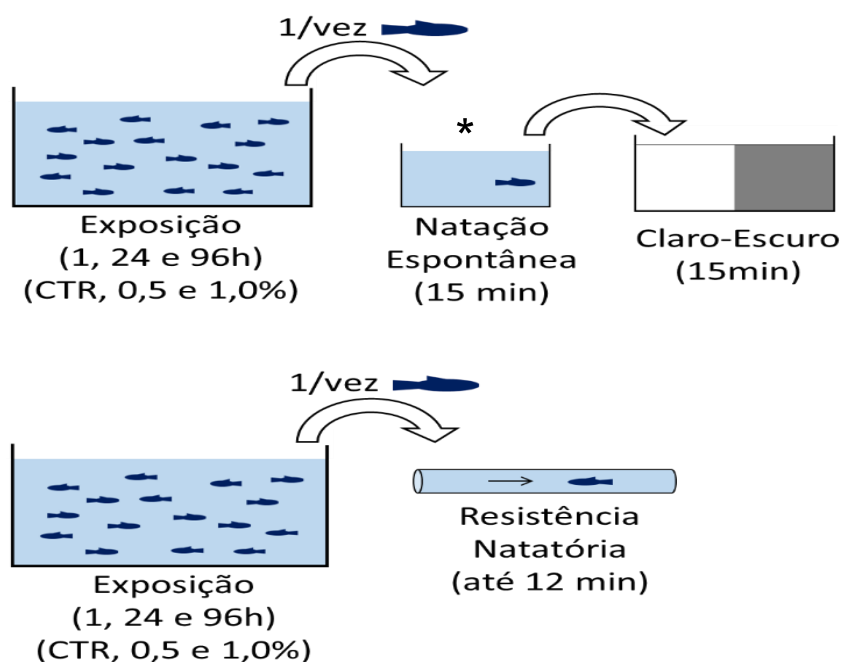
637

### BATERIA 1: CE, NE e RN em sequência

638



### BATERIA 2: sequência de NE e CE; RN em separado



640 Para avaliação da eficácia de um determinado teste e do possível efeito de  
641 testes precedentes em testes seguintes, repetiu-se os experimentos com os testes  
642 integrantes da bateria-teste de forma isolada. É importante esclarecer que a  
643 terminologia teste “isolado” não é, necessariamente, um teste fora de uma sequência,  
644 mas sim um teste que não tem a influência de testes precedentes, como é o caso do  
645 teste claro-escuro na bateria de 3 testes (BT1), na qual ele é o primeiro. Do mesmo  
646 modo, na BT2, a natação espontânea é o primeiro e tem caráter “isolado” na  
647 sequência NE-CE.

648 A bateria-teste inicia-se com o teste claro-escuro, estabelecido como o primeiro  
649 por ser considerado o mais sensível a parâmetros de ansiedade (KYSIL et al., 2017),  
650 e, assim, amenizar possíveis interferências causadas naturalmente pela manipulação  
651 do animal. Prossegue-se à finalização do primeiro teste com a cuidadosa realocação  
652 imediata do mesmo indivíduo para o segundo teste, de natação espontânea, no qual  
653 é avaliada sua atividade exploratória em um ambiente desconhecido. Para evitar que  
654 fatores externos (por exemplo, fluxo de pesquisadores no laboratório ou ruídos)  
655 influenciem nos parâmetros observados, estes dois primeiros testes foram aplicados  
656 em uma caixa de isolamento (fig. 6) de medidas 0,80 x 1,20 x 1,20 m (largura,  
657 comprimento, altura) na sala de análises comportamentais do LEFA. As imagens do  
658 interior da caixa de isolamento foram capturadas por duas câmeras de circuito fechado  
659 de televisão (CFTV), acessadas em tempo real e gravadas digitalmente por meio do  
660 *software* Geovision®. A bateria 1 teve fim com o teste de resistência natatória, no qual  
661 os peixes foram desafiados, um a um, por um fluxo crescente de água corrente. À  
662 medida que um indivíduo avançou para o teste seguinte na bateria-teste, outro entrou  
663 no lugar de seu antecessor, de tal modo que a aplicação dos três testes se sobrepôs  
664 com peixes em todos os compartimentos, com exceção dos indivíduos iniciais e finais.

665 Para compararmos a performance dos testes dentro da bateria-teste, ou seja,  
666 para avaliarmos se existe, ou quanto existe de influência de seus testes antecedentes,  
667 aplicamos, num segundo momento, os testes de natação espontânea e resistência  
668 natatória isoladamente. Para estes testes isolados, a metodologia de manipulação e  
669 exposição foi rigorosamente mantida. O teste claro-escuro não exige uma aplicação  
670 isolada, uma vez que é o primeiro da bateria e constitui-se como um controle para si  
671 mesmo. No entanto, como não haveria prejuízo para o teste de natação espontânea,  
672 como checagem de um potencial efeito ansiogênico da manipulação neste teste,

673 optou-se pela realização do teste claro-escuro após o teste isolado de natação  
674 espontânea. Embora intuitiva e conceitualmente julgamos ser mais adequado realizar  
675 um teste de ansiedade como o primeiro em uma sequência, procuramos vislumbrar  
676 com essa inversão verificar a influência de um teste antecedente em um cenário onde  
677 o teste claro-escuro não seria adotado como o primeiro. Assim, resumidamente,  
678 podemos definir os testes deste trabalho em três principais momentos, divididos em  
679 duas partes: a primeira parte contendo a bateria-teste e aplicação sequencial dos três  
680 testes, e uma segunda parte dividida entre a aplicação do teste de natação  
681 espontânea isoladamente (seguido pelo teste claro-escuro), e a aplicação do teste de  
682 resistência natatória isoladamente. A não realização do teste de resistência natatória  
683 antecedendo os testes de natação espontânea e claro escuro na bateria 2, como um  
684 espelho da BT1, justifica-se:

685 a) pelo caráter fisicamente exigente deste teste, em que o animal nada contra  
686 a corrente, o que poderia constituir um forte fator de confusão para os demais testes  
687 por: i) potencialmente provocar esgotamento de reservas energéticas; ii)  
688 potencialmente ser um provocador de estresse e/ou ansiedade; iii) produzir  
689 desigualdade de condições no grupo testado, uma vez que o término do teste não tem  
690 tempo pré-definido, mas é dado pela resistência de cada indivíduo;

691 b) por não possuir tempo de duração fixo, o que impossibilita a  
692 introdução/passagem simultânea de peixes em testes subsequentes;

693 c) por exigir, por isonomia metodológica, a realização de, no mínimo, mais uma  
694 bateria para o reposicionamento dos outros testes, o que significaria um dispêndio  
695 muito maior de animais para a testagem de sequências que consideramos menos  
696 lógicas dos que as que utilizamos no presente trabalho.

697

### 698 3.2.2 Exposição ao Etanol

699

700 Todos os experimentos foram realizados após exposição ao etanol por 1, 24 e  
701 96 horas, nas concentrações de 0 (controle), 0,5 e 1,0% em todos os tempos de  
702 exposição, com um número de peixes igual a 16 por grupo experimental. A efetividade  
703 das concentrações e o número amostral adotado foram baseados em trabalhos  
704 preliminares realizados em nosso laboratório e em trabalhos na literatura com a

705 espécie (GERLAI, 2000; DUGLOS & RABIN, 2003; ROSEMBERG, 2012; MATHUR &  
706 GUO, 2011; TRAN & GERLAI, 2013), mostrando consistência da ação farmacológica  
707 da substância nessas concentrações. Os tempos de exposição adotados são períodos  
708 clássicos em estudos ecotoxicológicos de exposição aguda a xenobióticos.

709 Para a exposição aguda rápida (1h), os peixes foram transferidos  
710 individualmente de seu aquário de aclimatação para um recipiente plástico  
711 transparente de 250 mL contendo 200 mL de solução. Indivíduos do grupo controle  
712 foram inseridos em meio contendo somente água de cultivo. Para confecção de todos  
713 os meios de exposição, retirou-se do compartimento uma porção de volume de água  
714 de cultivo proporcional ao volume de EtOH (PA 99,9%) que seria introduzido  
715 posteriormente para alcançar a concentração desejada. Os animais permaneceram  
716 no recipiente de exposição por 30 minutos até o início da bateria-teste. O primeiro e o  
717 segundo teste da bateria tiveram, cada um, duração de 15 minutos. A água dos  
718 aquários destes dois testes continha EtOH em concentração proporcional ao do  
719 recipiente de exposição para evitar que houvesse depuração da substância ao longo  
720 do experimento. Desta forma, o tempo de exposição total ao EtOH foi de 45 minutos  
721 ao final do teste claro-escuro e início do teste de natação espontânea, e 1h ao final do  
722 teste de natação espontânea e início do teste de resistência natatória. Neste, os  
723 organismos foram expostos apenas à água de cultivo em todos os grupos testados,  
724 uma vez que foi a última etapa. Além disso, o aparato que mantém o fluxo de água é  
725 complexo, de tamanho grande e exigindo uma constante renovação do meio para  
726 manter a concentração estável, uma vez que a configuração do sistema, com água  
727 recirculante e uma caixa de escape aberta poderia facilitar a volatilização do EtOH. É  
728 importante ressaltar que ensaios preliminares sugerem não haver alteração  
729 considerável dos parâmetros comportamentais entre 30 minutos e 1 hora de  
730 exposição ao EtOH.

731 Para exposições agudas de caráter mais prolongado (24h e 96h), os peixes  
732 foram retirados de seu aquário de aclimatação e inseridos em aquários experimentais  
733 contendo 30 L de solução, onde foram aclimatados sob o mesmo regime de  
734 manutenção por pelo menos 5 dias antes do início da exposição. Uma vez introduzido  
735 o EtOH nestes aquários, os filtros foram retirados, e a oxigenação foi reduzida para  
736 atenuar impactos na biodisponibilidade. Por razões de padronização, os peixes foram  
737 retirados dos aquários transcorrido o tempo de exposição e inseridos individualmente

738 em recipientes de 250 mL contendo 200 mL de solução durante os 30 minutos que  
739 antecederam os testes.

740 Para os testes da bateria 2, a metodologia seguiu rigorosamente o tempo de  
741 exposição inicial de cada teste da bateria 1. Desta forma, para o teste de natação  
742 espontânea, os indivíduos foram retirados de seus aquários e inseridos  
743 individualmente em recipientes plásticos contendo 200 mL de solução, onde  
744 permaneceram por 45 minutos até o início dos testes. Assim, para o teste de  
745 resistência natatória, o tempo de permanência neste recipiente de exposição se  
746 estendeu para 1h. Assim como na bateria-teste, os grupos de exposição prolongada  
747 foram expostos coletivamente em aquários experimentais contendo 30 L de solução  
748 antes de serem realocados para o recipiente plástico que precede os testes, sob as  
749 mesmas condições de manutenção e aclimatação.

750

### 751 3.3 TESTES COMPORTAMENTAIS E SEUS PARÂMETROS DERIVADOS

752

#### 753 3.3.1 Teste Claro-Escuro

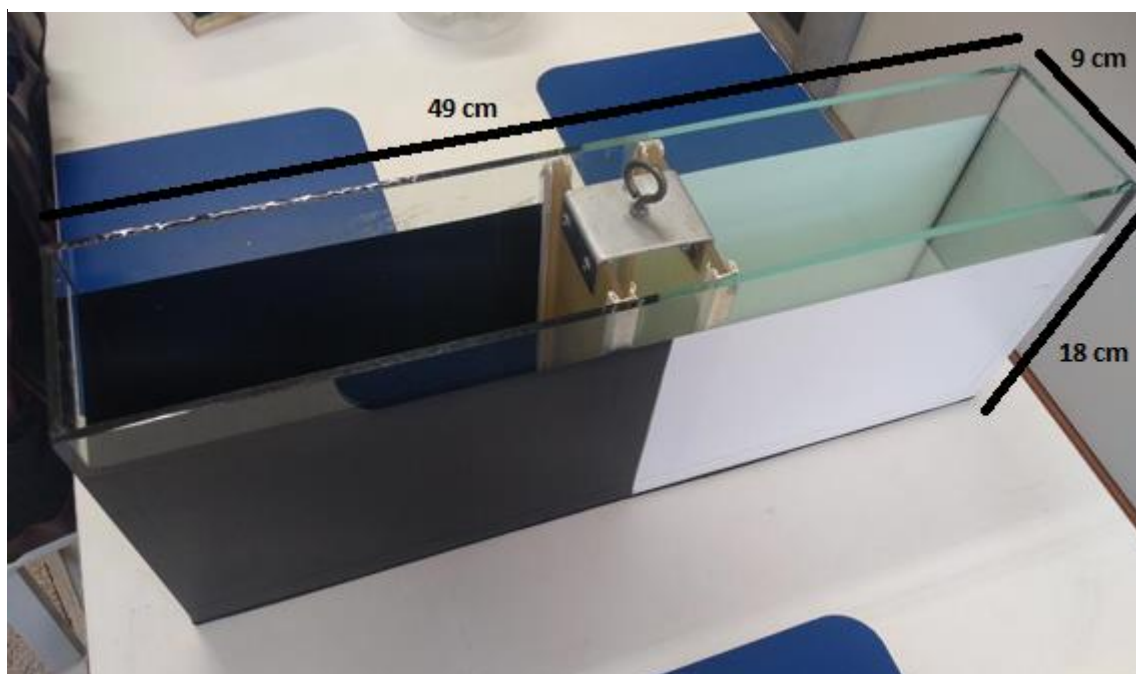
754

755 Para este teste, os peixes foram individualmente inseridos com cuidado no  
756 compartimento central de um aquário com dimensões 18 x 49 x 9 cm (altura,  
757 comprimento e largura) (fig. 4) contendo 6,8 L de solução. Para manter a temperatura  
758 constante, um aquecedor foi instalado na região mediana (espaço de aclimatação) com  
759 o sensor digital do termostato, de cor preta, instalado na parede da extremidade  
760 escura. Foi determinado um período de 5 minutos para aclimatação dentro do  
761 compartimento central, que restringe a exploração e o contato visual com as demais  
762 regiões do aquário. Decorrido este tempo, a divisória do compartimento foi suspensa  
763 com auxílio de um sistema de acesso remoto por fio, acionado do lado de fora da caixa  
764 de isolamento, liberando o animal e permitindo sua circulação. O aquário simulou dois  
765 ambientes de equiparáveis dimensões: um claro e um escuro, produzidos pela  
766 aplicação de adesivos plásticos de cores branco e preto sobre a parede externa do  
767 aquário de vidro. Em condições de não exposição, há uma tendência de preferência  
768 pelo ambiente escuro (chamada de escototaxia) que pode ser intensificada em  
769 situações de ansiedade ou medo, configurando um parâmetro comportamental

770 (MAXIMINO et al., 2010; STEWART et al., 2011). Os animais tiveram sua atividade  
771 monitorada durante 10 minutos com auxílio do *software* Geovision® e de uma câmera  
772 fixada em posição zenital ao aquário. Os vídeos foram posteriormente analisados  
773 visualmente e com o auxílio de um cronômetro digital para avaliação dos seguintes  
774 parâmetros comportamentais: 1) primeira escolha (ambiente que o peixe escolheu  
775 para explorar primeiro); 2) latência (tempo, em segundos, decorrido entre a liberação  
776 do peixe e o início de sua atividade exploratória); 3) tempo de permanência (tempo de  
777 permanência do peixe no lado claro). Este parâmetro foi coletado assistindo aos  
778 vídeos e disparando o cronômetro sempre que havia trânsito pelo lado claro e  
779 pausando o tempo quando o animal retornava para o lado escuro. O tempo de  
780 permanência no lado escuro foi calculada pela subtração do tempo de permanência  
781 no lado claro do tempo total de avaliação do teste; 4) número de trocas (número de  
782 vezes que o animal passou de um ambiente para o outro) e 5) tempo médio por  
783 investida no ambiente claro, parâmetro derivado da razão simples entre o tempo de  
784 permanência no claro pelo número de trocas.

785

Figura 4. Aquário utilizado para os testes de claro-escuro. As medidas são apresentadas em centímetros.



786 Fonte: o próprio autor.

787

788

789

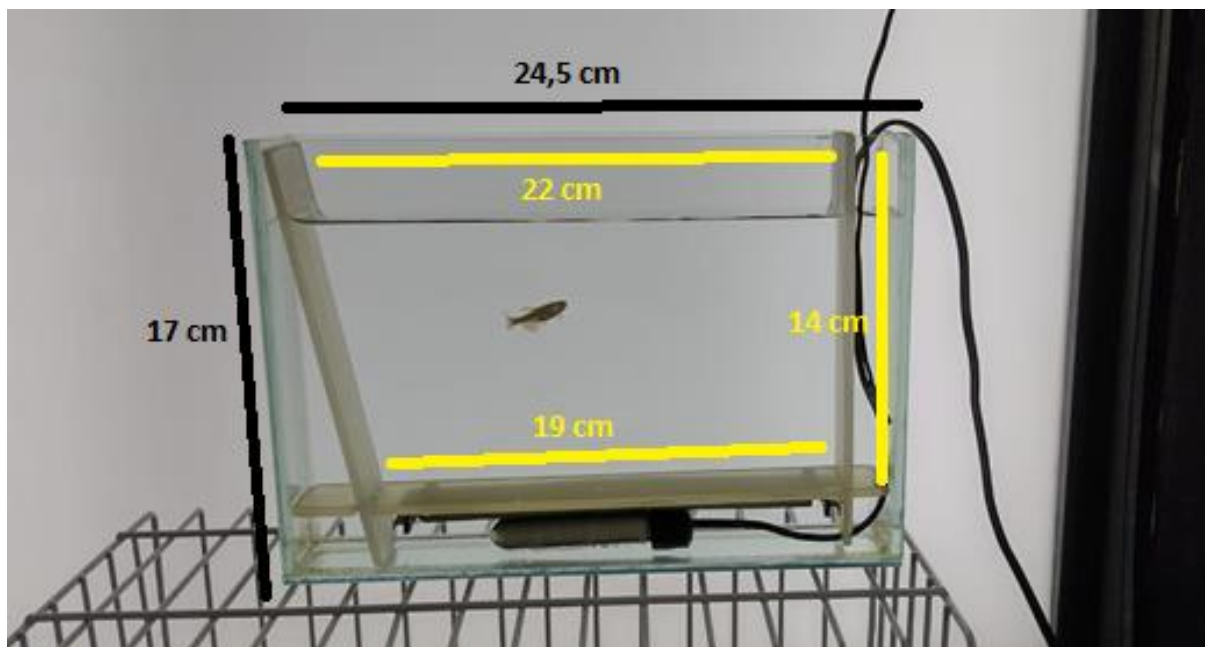
### 790 3.3.2 Teste de Natação Espontânea

791

792 Os peixes foram cuidadosamente inseridos de forma individual em um aquário  
793 tipo *novel tank* (EGAN et al., 2009) de dimensões 14 x 24,3 x 4,5 cm (fig. 5) contendo  
794 solução em 1,5 L de volume. Para garantir o formato trapezoidal do plano frontal,  
795 característico de *novel tanks*, foram utilizados fundo e laterais falsos de acrílico fosco,  
796 impedindo, também, a produção de reflexos que pudessem estimular comportamento  
797 agressivo (GERLAI, 2000) e imagens duplicadas. Uma câmera digital posicionada  
798 frontalmente ao aquário foi utilizada em conjunto com o *software* de monitoramento  
799 GeoVision® para captura de imagens, gerando vídeos de 15 minutos, dos quais os  
800 cinco primeiros foram considerados período de aclimatação. Os vídeos foram  
801 posteriormente analisados com auxílio do *Software* de Análise do Comportamento de  
802 Animais em Movimento (SACAM) (CAETANO et al., 2006). Para as análises, o aquário  
803 foi virtualmente dividido em dois estratos, superior e inferior, e os seguintes  
804 parâmetros foram avaliados: (1) a distância total percorrida pelo animal durante o  
805 tempo de execução do teste, uma vez que sua atividade exploratória é sensível a ação  
806 de psicofármacos (STEWART et al., 2012); (2) o tempo (em segundos) de locomoção  
807 (tempo de movimento). Para este parâmetro, subtraiu-se do tempo total de avaliação  
808 do teste (480 segundos) o tempo em que não há detecção de movimento pelo  
809 SACAM; (3) a velocidade média, correspondente à razão entre a distância total  
810 percorrida pelo tempo de movimento, descrito como um parâmetro alterado em  
811 quadros de ansiedade (STEWART et al., 2012). Adotou-se o cálculo da velocidade  
812 por tempo de movimento porque a velocidade derivada do tempo total (480 segundos)  
813 produz relações idênticas às de distância, configurando redundância; (4) Por fim, foi  
814 observada a preferência por um estrato inferior ou superior, apresentada em forma de  
815 porcentagem do tempo de detecção de movimento dos indivíduos em cada estrato.

816

817 Figura 5. Aquário utilizado para os testes de natação espontânea. As medidas em preto correspondem  
818 à altura e comprimento totais do aquário. As medidas em amarelo correspondem à altura e  
819 comprimento superior e inferior da área útil para natação do animal. Os valores são apresentados em  
820 centímetros.



821 Fonte: o próprio autor.

822

Figura 6. Espaço interno da caixa de isolamento onde foram aplicados os testes de claro-escuro e natação espontânea.



823 Fonte: o próprio autor.

824

825

826

## 827 3.3.3 Teste de Resistência Natatória

828

829 Este teste explora a tendência natural de alguns actinoptérgios,  
 830 principalmente ciprinídeos (família que inclui o *D. rerio*), a nadar contra um fluxo de  
 831 água corrente (chamado de reotaxia). Aqui, os animais foram inseridos  
 832 individualmente, sempre com bastante cuidado, em um equipamento (fig.7) baseado  
 833 no projeto de MELO (2011), em processo de adaptação e automatização. Este  
 834 equipamento é constituído por uma bomba que gera gradiente de pressão, criando  
 835 um fluxo que pode ser controlado manualmente através de um registro. A corrente de  
 836 água passa do registro através de uma rede interna à tubulação (que impede a  
 837 movimento do animal por todo o sistema) para um tubo de acrílico transparente, de  
 838 diâmetro interno de 18 mm, ligado pela outra extremidade à caixa de escape contendo  
 839 aquecedor e termômetro para controle da temperatura, além da bomba, definindo um  
 840 percurso circular para a água. Os peixes foram inseridos no tubo através de uma  
 841 abertura superior, contendo uma tampa em sua base, que impede o retorno do animal  
 842 ao recipiente de inserção uma vez que o teste é iniciado. A fim de evitar contato visual  
 843 e diminuir interferência de fatores externos, aproximadamente 75% do tubo foi  
 844 coberto, em sua porção medial, com folha de alumínio. A vazão inicial do teste foi  
 845 determinada em 1 L min<sup>-1</sup> (vazão de aclimatação), aumentada em 1 L min<sup>-1</sup> a cada  
 846 minuto, até atingir a vazão máxima de 12 L min<sup>-1</sup> (vazão de expulsão). Eventualmente,  
 847 os peixes podem não responder ao estímulo da vazão inicial e são carregados pelo  
 848 fluxo até a caixa de escape (captura). Assim, foi estipulada uma tolerância máxima de  
 849 cinco tentativas de reinserção para indivíduos que não responderam ao fluxo e  
 850 desistiram ainda na vazão inicial.

851 O resultado final foi avaliado na forma de um Índice de Resistência Natatória  
 852 (IRN), representado pela somatória das vazões suportadas por um minuto, com a  
 853 última vazão ponderada pelo tempo (em segundos) suportado, conforme a seguinte  
 854 equação:

$$855 \quad IRN = \sum \text{vazões suportadas por 1 min} + \text{última vazão} \times \frac{\text{tempo (s) na última vazão}}{60}$$

856 Por exemplo, se um peixe resistiu por 30 segundos na vazão de 10 L/min, o  
 857 IRN calculado para este peixe será: 1+2+3+4+5+6+7+8+9+10x30/60 = 50

858           Valores baixos de IRN refletem uma menor capacidade do animal em manter a  
859 natação contra o fluxo e podem ser relacionados a diversos fatores, como depleção  
860 de reservas energéticas, catabolismo proteico, distúrbios neuromusculares, sedação  
861 ou até mesmo ao estado anímico ou motivacional.

862

Figura 7. Sistema utilizado para aplicação do teste de resistência natatória.



863 Fonte: o próprio autor.

864

### 865           3.4 BIOMETRIA, SEXAGEM, DETERMINAÇÃO DE GLICEMIA E FINALIZAÇÃO

866

867           Ao término das atividades experimentais, os peixes foram realocados  
868 individualmente para um recipiente de vidro contendo água de cultivo em banho-maria  
869 com gelo para anestesia. Transcorrido um tempo mínimo de 1 minuto para ação do  
870 efeito anestésico, e observado o completo cessamento dos batimentos operculares,  
871 os peixes foram retirados com auxílio de uma rede e tiveram o excesso de água  
872 removido para pesagem do corpo (Wt), com uma balança digital com duas casas  
873 decimais de precisão. Com um paquímetro, foram medidos o comprimento total (Lt),  
874 correspondente ao valor da extremidade rostral até a extremidade caudal, e o  
875 comprimento padrão (Ls) correspondente ao valor da extremidade rostral até o início  
876 dos raios da cauda, desconsiderando-a. A partir da razão simples entre peso (em  
877 gramas) pela terceira potência do comprimento (em centímetros), calculou-se o fator

878 de condição de Fulton ( $K_f$ ). Como este quociente resulta em valores numéricos muito  
879 baixos, foi realizada a multiplicação por  $10^6$ , para a apresentação em valores da  
880 primeira ordem de unidade. O sexo foi discriminado através de parâmetros  
881 morfológicos, pela observação de ganchos ou rugosidades nos raios das nadadeiras  
882 peitorais (presente somente em machos). Utilizou-se uma tesoura de aço cirúrgico  
883 para efetuar uma secção medular na altura da região caudal, onde uma amostra de  
884 sangue foi imediatamente coletada para análise da glicemia, por meio de um  
885 glicosímetro portátil Abbott Freestyle<sup>®</sup> modelo Optium Neo. As carcaças foram  
886 posteriormente depositadas em um tubo Falcon<sup>®</sup> para armazenamento em *freezer* a -  
887 80 °C até o momento do descarte, de acordo com o sistema de coleta de materiais  
888 biológicos da UEL.

889 Todos os procedimentos experimentais foram formalmente submetidos à  
890 Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA/UEL) e aprovados sob o ofício  
891 040.2020.

892

### 893 3.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

894

895 Com a intenção de sintetizar a estrutura de variabilidade dos dados, de  
896 construir grupos de elementos amostrais que apresentassem similaridades e de  
897 verificar as relações de dependência entre as variáveis, foram realizadas análises  
898 multivariadas, especificamente análises de componentes principais (PCAs) (Mingoti,  
899 2005). A partir delas foi possível identificar, dentre as muitas variáveis, inclusive as  
900 não diretamente relacionadas aos fatores comportamentais, como fator de condição  
901 e glicemia, quais são os componentes principais oriundos das combinações lineares  
902 das variáveis originais. Ainda a partir dessas análises, pela verificação das cargas de  
903 cada variável, foi possível verificar quais as mais significativas nas comparações, por  
904 análise univariada, entre os testes dentro de uma sequência e seu análogo (mesmo  
905 tempo de exposição e concentração) realizado isoladamente (ou em posição diferente  
906 em outra sequência). Foram utilizadas, para as análises de componentes principais,  
907 o software Past, e para as análises univariadas, o *software* SigmaPlot 11.0. Para todas  
908 as análises univariadas os dados foram submetidos a um teste de normalidade. Para  
909 dados não-paramétricos, aplicou-se o teste de Kruskal-Wallis. Para dados

910 paramétricos, aplicou-se em todos os testes, com exceção do claro e escuro, a análise  
911 de variância (ANOVA) seguida do teste de comparações múltiplas de Student-  
912 Newman-Keuls (SNK). O teste t de Student foi adotado para o parâmetro de  
913 preferência por um estrato no teste de natação espontânea e preferência por um  
914 ambiente no teste claro-escuro. O teste de McNemar foi adotado para o parâmetro de  
915 primeira escolha no teste claro-escuro. Em todos os testes, o nível adotado como  
916 significativo foi  $p \leq 0,05$ .

917

#### 4 RESULTADOS

918

919

920 Nas figuras 8 e 9 podemos observar os gráficos de cargas da análise de  
921 componentes principais. As figuras apresentam, respectivamente, a componente 1 e  
922 a componente 2. Nas duas baterias de testes, de modo geral, para a componente 1,  
923 os parâmetros com maior correlação positiva foram a distância total percorrida, o  
924 tempo total de movimentação, a velocidade média e a resistência ao fluxo, todos  
925 relacionados a atividade natatória do animal, assim a nomeando. Da mesma forma,  
926 para a componente 2, os parâmetros com maior correlação positiva foram o tempo de  
927 permanência no ambiente claro e o tempo médio por investida, relacionados a  
928 fototaxia.

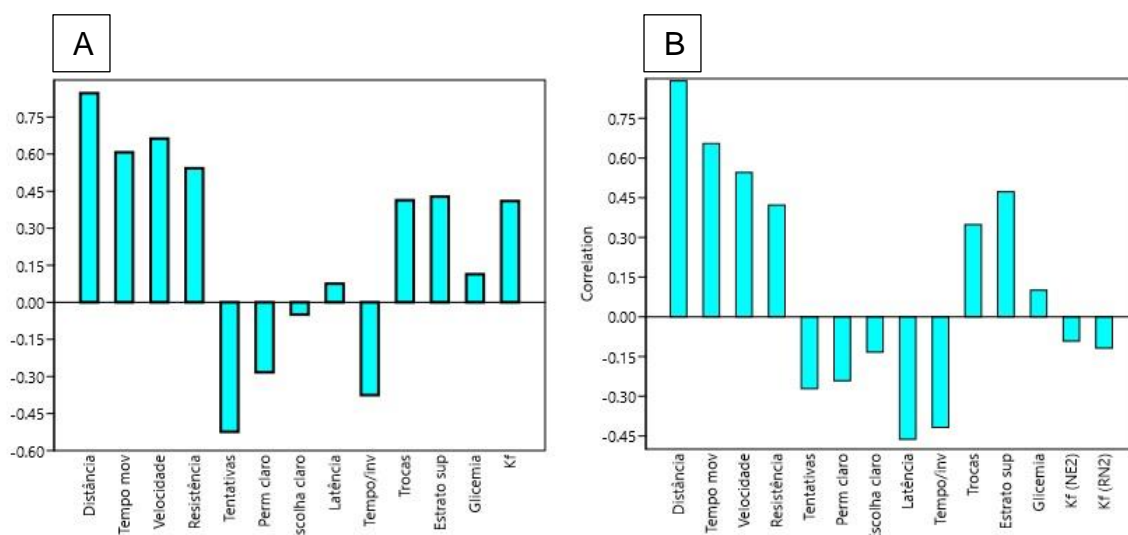
929 Na BT1, o número de tentativas, o tempo médio por investida e o tempo de  
930 permanência no claro apresentaram correlação negativa com a atividade natatória.  
931 Em contrapartida, o número de trocas, a exploração do estrato superior e o fator de  
932 condição de Fulton apresentaram correlação positiva, mas todos com magnitude  
933 moderada. A glicemia, a primeira escolha e o tempo de latência não apresentaram  
934 correlação relevante para esta componente (Figura 9A). Na BT2, a latência, o tempo  
935 médio por investida, o número de tentativas e o tempo de permanência no claro se  
936 correlacionaram de maneira negativa com esta componente. A primeira escolha, a  
937 glicemia e o fator de condição de Fulton não apresentaram correlação relevante  
938 (Figura 9B).

939 O tempo médio por investida, a exploração do extrato superior, o número de  
940 tentativas, a velocidade média, a distância percorrida e o tempo total de movimento  
941 apresentaram correlação positiva, ainda que moderada, com a fototaxia na BT1,  
942 enquanto que o tempo de latência e a resistência ao fluxo apresentaram a relação  
943 inversa. A glicemia, o fator de condição de Fulton e o número de trocas não atingiram  
944 magnitudes relevantes para esta componente. Na BT2, o tempo total de movimento,  
945 a exploração no estrato superior e a primeira escolha foram parâmetros que se  
946 relacionaram positivamente com a fototaxia, enquanto que o número de trocas, a  
947 velocidade média, a resistência ao fluxo e o tempo de latência apresentaram  
948 correlação negativa. A magnitude de variação do número do fator de condição de  
949 Fulton, da glicemia e do número de tentativas não atingiu valores relevantes para esta  
950 componente.

951

952

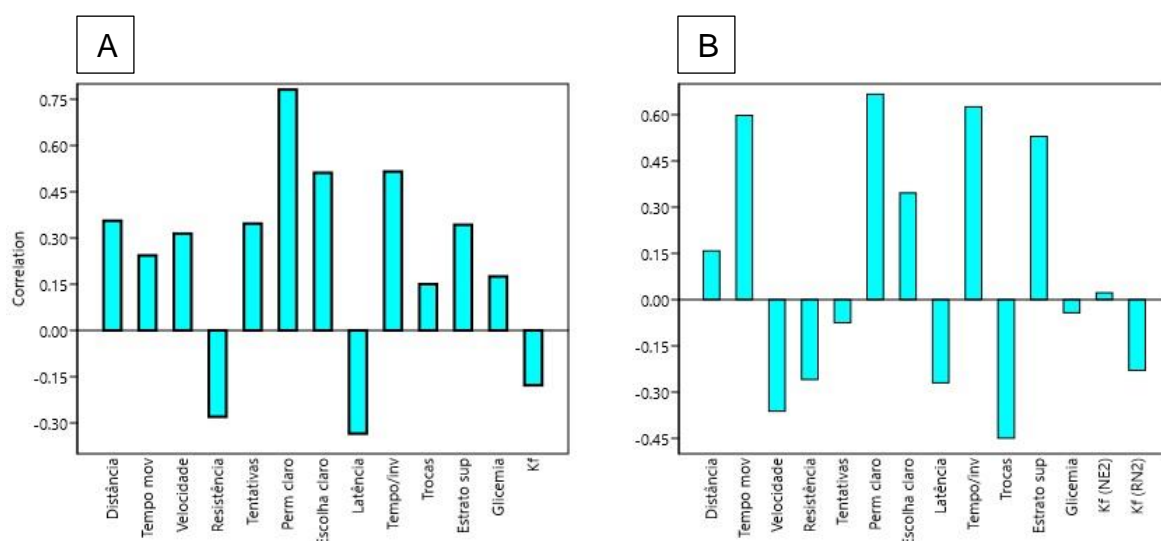
953 Figura 8. Gráficos de cargas da componente 1 (atividade natatória). A) BT1; B) BT2. As variáveis são,  
 954 da esquerda para a direita: distância total percorrida, tempo total de movimento, velocidade média,  
 955 Índice de Resistência Natatória, número de tentativas, tempo de permanência no claro, primeira  
 956 escolha, tempo de latência, tempo médio por investida, número de trocas, exploração do estrato  
 957 superior, glicemia e fator de condição de Fulton (Kf, fator de condição dos peixes finalizados após o  
 958 término da sequência dos três testes na primeira bateria, sendo o último teste o de resistência  
 959 natatória); KfNE2, dos peixes finalizados após a natação espontânea; KfRN2, dos peixes finalizados  
 960 após o teste de resistência natatória).



961 Fonte: o próprio autor.

962

963 *Figura 9. Gráficos de cargas da componente 2 (fototaxia). A) Bateria 1; B) Bateria 2. As variáveis são,*  
 964 *da esquerda para a direita: distância total percorrida, tempo total de movimento, velocidade média,*  
 965 *Índice de Resistência Natatória, número de tentativas, tempo de permanência no claro, primeira*  
 966 *escolha, tempo de latência, tempo médio por investida, número de trocas, exploração do estrato*  
 967 *superior, glicemia e fator de condição de Fulton (Kf, fator de condição dos peixes finalizados após o*  
 968 *término da sequência dos três testes na primeira bateria, sendo o último teste o de resistência*  
 969 *natatória); KfNE2, dos peixes finalizados após a natação espontânea; KfRN2, dos peixes finalizados*  
 970 *após o teste de resistência natatória).*



971 Fonte: o próprio autor.

972

973 A figura 10 apresenta os gráficos de dispersão da análise multivariada. Para  
974 facilitar a visualização, ambas acompanham gráficos derivados destacando cada um  
975 dos seus três tempos de exposição (1h, 24h e 96h) nos anexos deste trabalho.

976 Na BT1, podemos observar que a distância total percorrida, a velocidade média  
977 e o tempo total de movimento apresentam posição próxima no quadrante superior  
978 direito, com forte correlação com a atividade natatória e moderada correlação com a  
979 fototaxia. O tempo de permanência no ambiente claro, a escolha pelo claro, o tempo  
980 médio por investida e o número de tentativas de resistência ao fluxo são parâmetros  
981 que ocupam o quadrante superior esquerdo, indicando forte correlação positiva com  
982 a fototaxia, e uma correlação negativa moderada para a atividade natatória. A latência  
983 se correlacionou negativamente com a fototaxia, enquanto a resistência,  
984 positivamente com a atividade natatória. O fator de condição, embora com menor  
985 força, se correlacionou mais com a atividade natatória do que com a fototaxia negativa.  
986 A glicemia, o número de trocas e a latência não apresentaram relação relevante com  
987 nenhuma das componentes.

988 Na BT2, a distância total percorrida, o tempo total de movimento, a exploração  
989 do estrato superior, a resistência e a velocidade tiveram forte relação com a  
990 componente 2, atividade natatória, com as duas últimas variáveis relacionando-se  
991 inversamente com a fototaxia, assim como o número de trocas, mas este com menor  
992 força. O tempo de permanência no claro, juntamente com o tempo médio por investida  
993 foram variáveis fortemente relacionadas à fototaxia, assim como o tempo de latência,  
994 mas com correlação moderadamente negativa. Assim como na BT1, a glicemia não  
995 apresentou magnitude relevante para se relacionar com nenhuma componente na  
996 BT2; o mesmo foi observado para o fator de condição e o número de tentativas nessa  
997 segunda bateria.

998

999

1000

1001

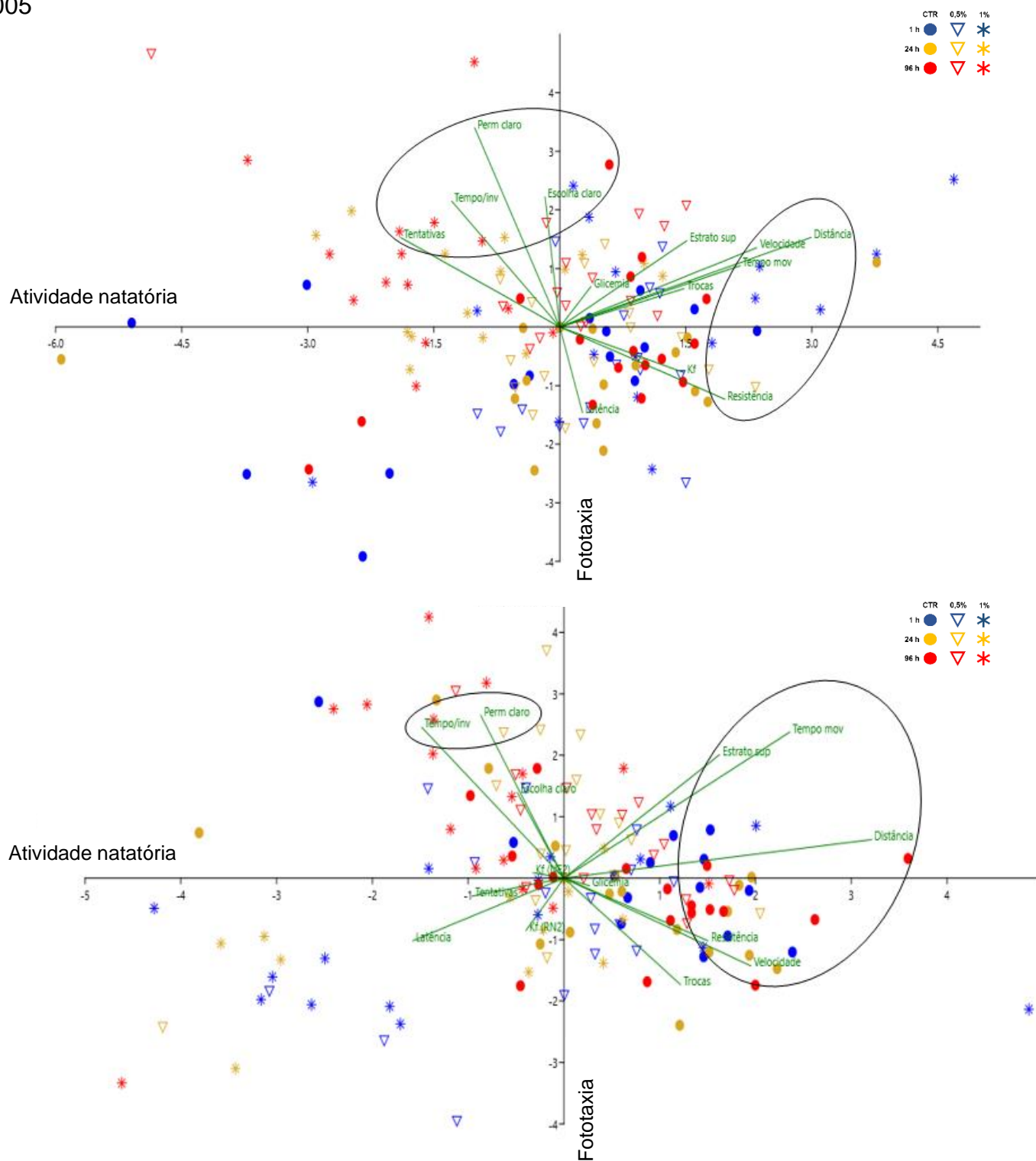
1002

1003

1004

Figura 10. Gráfico de dispersão das baterias 1 (acima) e 2 (abaixo) de testes. Indivíduos expostos a diferentes concentrações de EtOH são representados por: círculo (CTR), triângulo invertido (0,5%) e estrela (1%). As cores representam tempo de exposição: azul (1h), amarelo (24h) e vermelho (96h). Os vetores *biplot* mostram as relações de cada variável com cada componente.

1005



Fonte: o próprio autor.

1006 As variáveis que apresentaram correlação de maior magnitude com as  
1007 componentes principais apontadas pelas PCAs foram tempo de permanência no claro,  
1008 distância percorrida, e resistência natatória, e são apresentadas de forma comparada,  
1009 em análises univariadas, entre as duas baterias nas figuras 11, 12 e 13.

1010 Não houve diferença significativa entre os grupos análogos (mesma  
1011 concentração e mesmo tempo em testes em sequência comparados aos isolados)  
1012 para o tempo de permanência no claro e distância total percorrida. Para o índice de  
1013 Resistência Natatória, no entanto, as médias de todos os grupos em exposição por  
1014 1h, e os grupos 0,5% e controle de 24h foram significativamente maiores para o teste  
1015 de resistência natatória que integra a os testes sequenciais em comparação ao  
1016 mesmo teste quando aplicado de forma isolada.

1017 Para o tempo de permanência no ambiente claro, não houve variação  
1018 significativa na exposição de 1h em nenhum grupo. Em 24h houve crescimento dose-  
1019 dependente apenas para o teste de claro e escuro integrante dos testes sequenciais.  
1020 Em 96h houve crescimento dose-dependente para as duas baterias. Quando o teste  
1021 claro-escuro foi o primeiro da sequência, os grupos expostos ao EtOH em  
1022 concentração 0,5% e 1% alcançaram notável proximidade com o limiar de diferença  
1023 significativa ( $p = 0,051$ ), mas ao ser aplicado em sequência ao teste de natação  
1024 espontânea, apenas o grupo exposto a 1% apresentou crescimento significativo em  
1025 relação aos outros dois do mesmo tempo de exposição.

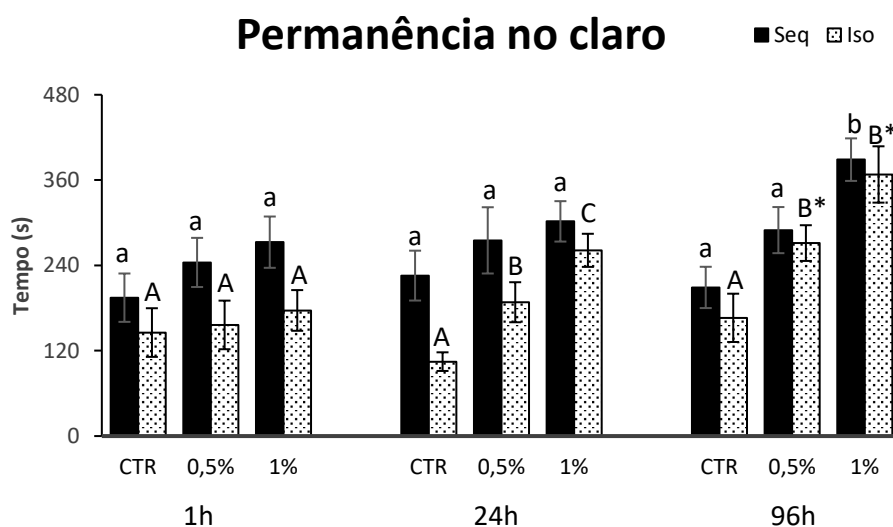
1026 A distância total percorrida apresentou efeito tempo-dependente de natureza  
1027 bifásica nos testes sequenciais, crescendo de maneira dose-dependente em 1h e  
1028 decrescendo de maneira dose-dependente em 96h, não apresentando variação na  
1029 exposição por 24h. Quando o teste de natação espontânea foi aplicado em primeiro  
1030 lugar, o grupo exposto ao EtOH em 0,5% por 24h nadou uma distância  
1031 significativamente menor que o grupo controle, sendo estes dois não diferentes de  
1032 EtOH a 1%. Em 96h, a exposição ao EtOH em concentração 1% acarretou numa  
1033 distância de nado consideravelmente menor em relação às outras duas  
1034 concentrações.

1035 O Índice de Resistência Natatória decresceu significativamente em todos os  
1036 tempos de exposição a 1%, além de 0,5% em 96h no teste aplicado de forma isolada,  
1037 revelando um padrão aproximado dose e tempo-dependente. No teste de resistência  
1038 natatória aplicado em sequência aos demais, houve redução significativa deste índice

1039 somente na maior concentração em 24h e 96h.

1040 Figura 11. Gráfico comparando o parâmetro de permanência no claro entre testes claro-escuro  
1041 sequenciais (Seq) e isolados (Iso). Não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos  
1042 análogos em um mesmo tempo de exposição e concentração. Letras indicam diferença estatística ( $p \leq$   
1043 0,05) entre os grupos dentro de um mesmo tempo de exposição, sendo minúsculas para testes  
1044 sequenciais e maiúsculas para testes isolados. Os asteriscos (\*) indicam forte tendência de diferença  
1045 estatística entre os dois grupos ( $p = 0,051$ ).

1046



1047

1048

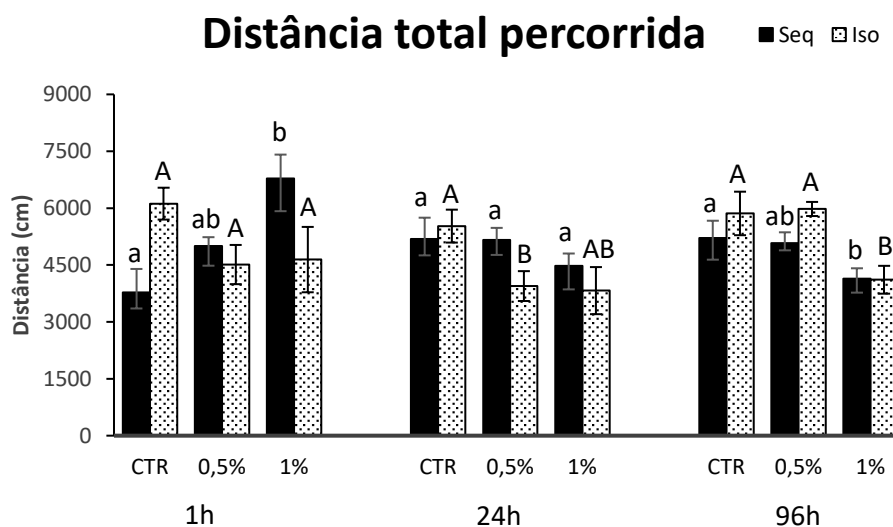
Fonte: o próprio autor.

1049

1050 Figura 12. Gráfico comparando o parâmetro de distância total percorrida entre testes de natação  
1051 espontânea sequenciais (Seq) e isolados (Iso). Não houve diferença estatisticamente significativa entre  
1052 os grupos análogos em um mesmo tempo de exposição e concentração. Letras indicam diferença  
1053 estatística ( $p \leq 0,05$ ) entre os grupos dentro de um mesmo tempo de exposição, sendo minúsculas para  
1054 testes sequenciais e maiúsculas para testes isolados.

1055

1056

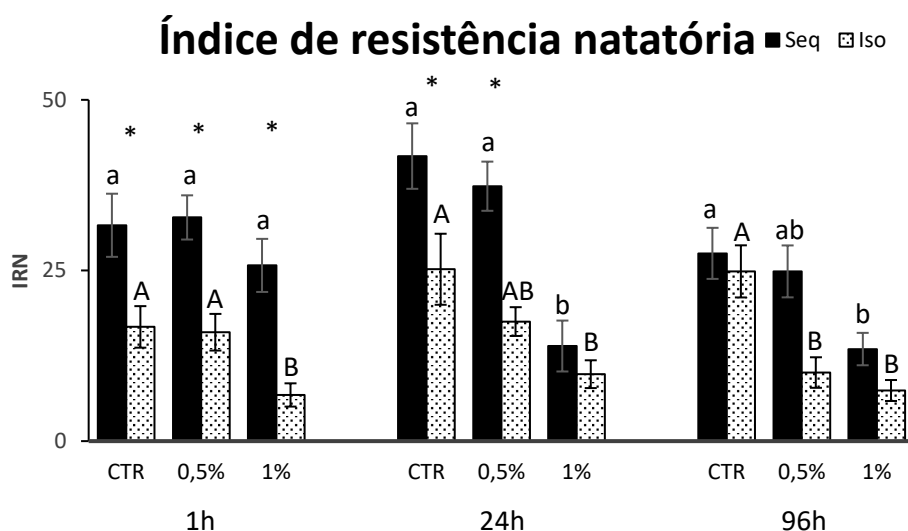


1055

1056

Fonte: o próprio autor.

1057 Figura 13 Gráfico comparando o parâmetro de Índice de Resistência Natatória entre testes de  
 1058 resistência natatória sequenciais (Seq) e isolados (Iso). Asteriscos (\*) indicam diferença  
 1059 estatisticamente significativa ( $p \leq 0,05$ ) entre os grupos análogos em um mesmo tempo de exposição  
 1060 e concentração. Letras indicam diferença estatística ( $p \leq 0,05$ ) entre os grupos dentro de um mesmo  
 1061 tempo de exposição, sendo minúsculas para testes sequenciais e maiúsculas para testes isolados.



1062

1063

Fonte: o próprio autor.

1064

1065 As figuras 14, 15, 16 e 17 mostram parâmetros do teste de claro-escuro em análises  
 1066 univariadas.

1067 Para o parâmetro de latência, quando o teste claro-escuro é aplicado em  
 1068 primeiro lugar na bateria, a grande variância não permitiu que fossem detectadas  
 1069 diferenças significativas entre os grupos sob concentração de 0,5%, que  
 1070 apresentaram maior tempo médio de tomada de decisão em relação aos outros dois  
 1071 grupos em todos os tempos de exposição. Quando o teste claro-escuro sucede a  
 1072 natação espontânea, as médias crescem de maneira proporcional à concentração e  
 1073 ao tempo de exposição, porém também sem qualquer diferença estatisticamente  
 1074 significativa.

1075

1076

1077

1078

1079

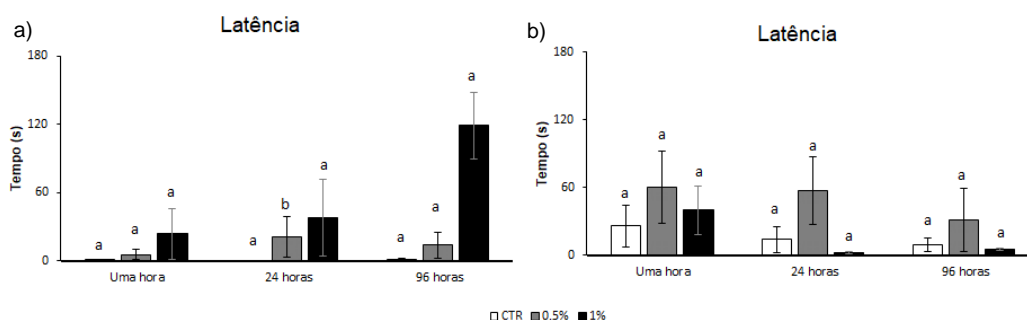
1080

1081

1082

1083

1084 Figura 14. Tempo de latência (para escolha no teste claro-escuro) no teste em segunda posição, após  
 1085 a natação espontânea, na bateria 2 (à esquerda) e em primeira posição, “isolado”, na bateria1 (à  
 1086 direita). Letras diferentes indicam diferença estatística ( $p \leq 0,05$ ) entre grupos de um mesmo tempo de  
 1087 exposição.

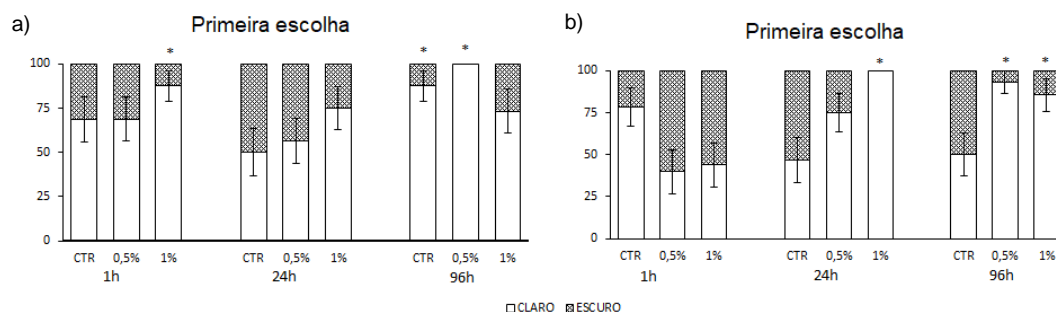


1088 Fonte: o próprio autor.  
 1089  
 1090  
 1091  
 1092

1093 Quanto à preferência por um dos lados no momento de liberação (primeira  
 1094 escolha) do peixe no aquário de claro e escuro, os peixes dos grupos controles, em  
 1095 todos os tempos de exposição quanto o teste é aplicado em primeiro lugar, não  
 1096 apresentaram preferência significativa por nenhum dos ambientes. Nos grupos sob  
 1097 ambas as concentrações de exposição aguda rápida (1h) ao EtOH, mais peixes  
 1098 escolheram o lado escuro primeiro em relação ao grupo controle. Para os grupos sob  
 1099 exposição aguda prolongada, houve preferência pelo lado claro na primeira escolha  
 1100 para ambas as concentrações de EtOH em 96h, e na maior concentração em 24h, na  
 1101 qual, notavelmente, todos os indivíduos escolheram o lado claro primeiro (Figura 15a).  
 1102 Quando o teste claro-escuro foi aplicado em segundo lugar, houve preferência  
 1103 significativa pelo ambiente claro nos grupos expostos ao EtOH em contração 1% por  
 1104 1h, e concentração 0,5% por 96h. Os peixes do grupo controle da exposição por 96h  
 1105 também demonstraram preferência significativa pelo lado claro na primeira escolha  
 (Figura 15b).

1106  
 1107  
 1108  
 1109  
 1110  
 1111  
 1112  
 1113  
 1114  
 1115  
 1116  
 1117

1118 Figura 15. Gráfico de barras empilhadas mostrando a proporção entre claro e escuro para a primeira  
 1119 escolha (no teste claro-escuro) na bateria 2 (teste em segunda posição, após a natação espontânea),  
 1120 à esquerda) e na bateria 1 (teste em primeira posição, “isolado”), à direita. Letras diferentes indicam  
 1121 diferença estatística ( $p \leq 0,05$ ) entre grupos de um mesmo tempo de exposição.



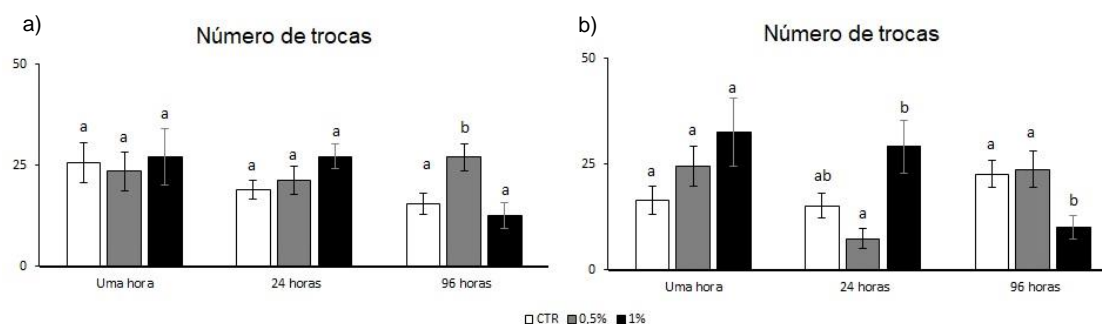
1122  
 1123  
 1124

Fonte: o próprio autor.

1125 O número de vezes em que houve troca de ambientes entre o claro e o escuro  
 1126 não apresentou diferença significativa em nenhum grupo deste teste quando aplicado  
 1127 em primeiro lugar, com exceção do grupo sob concentração de 0,5% em exposição  
 1128 por 96h, que foi significativamente maior que os outros dois grupos do mesmo tempo  
 1129 de exposição (Figura 16a). Quando o teste claro-escuro foi aplicado em segundo  
 1130 lugar, houve aumento significativo do número de trocas no grupo exposto ao EtOH em  
 1131 concentração 0,5% por 24h e queda para EtOH 1% em 96h (Figura 16b).

1132

1133 Figura 16. Número de trocas (entre os lados no teste claro-escuro) no teste em segunda posição, após  
 1134 a natação espontânea (à esquerda) e em primeira posição, “isolado” (à direita). Letras diferentes  
 1135 indicam diferença estatística ( $p \leq 0,05$ ) entre grupos de um mesmo tempo de exposição.



1136  
 1137  
 1138

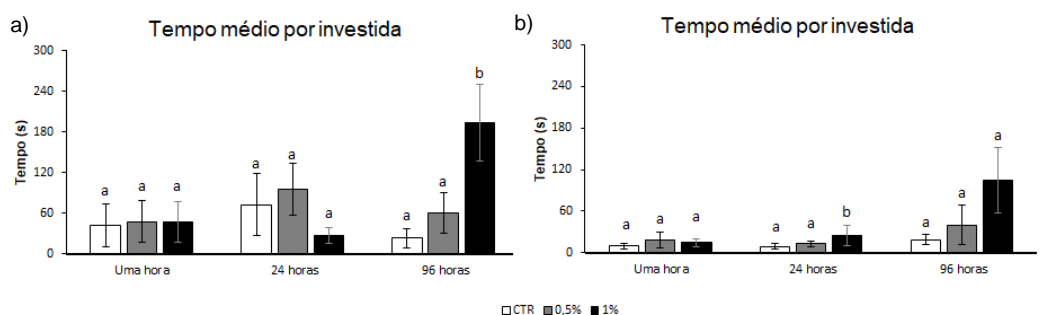
Fonte: o próprio autor.

1139 No teste claro-escuro em primeiro lugar, houve aumento do tempo médio por  
 1140 investida no ambiente claro por parte do grupo exposto a 1% por 24h. Embora os dois  
 1141 grupos expostos ao EtOH (0,5% e 1%) por 96h apresentem a mesma tendência, não  
 1142 foi detectada uma diferença significativa entre eles. Para o teste de claro e escuro

1143 aplicado em sequência, apenas o grupo exposto ao EtOH em concentração 1%  
 1144 durante 96h apresentou aumento significativo deste parâmetro (Figuras 17 a e b).

1145

1146 Figura 17. Tempo médio por investida no ambiente claro no teste claro-escuro em segunda posição na  
 1147 bateria 2, após a natação espontânea (à esquerda) e em primeira posição, “isolado”, na bateria 1 (à  
 1148 direita). Letras diferentes indicam diferença estatística ( $p \leq 0,05$ ) entre grupos de um mesmo tempo de  
 1149 exposição.



1150  
 1151  
 1152

Fonte: o próprio autor.

1153 Nas figuras 18, 19 e 20, podemos observar os parâmetros da natação  
 1154 espontânea em análise univariada.

1155 Nos testes sequenciais, os grupos expostos ao EtOH em concentração 1% por  
 1156 24h e 96h apresentaram menor tempo de movimentação em relação a 0,5%, sem  
 1157 qualquer variação significativa para este parâmetro nos grupos sob 1h de exposição.  
 1158 No teste isolado, o tempo total de movimento na exposição de 1h foi menor em  
 1159 concentração 1% em relação aos dois outros grupos do mesmo tempo. Em  
 1160 contrapartida, houve aumento deste parâmetro para dois grupos sob concentração  
 1161 0,5%: na exposição por 24h em relação ao grupo exposto a 1%, e na exposição por  
 1162 96h em relação ao grupo controle.

1163

1164

1165

1166

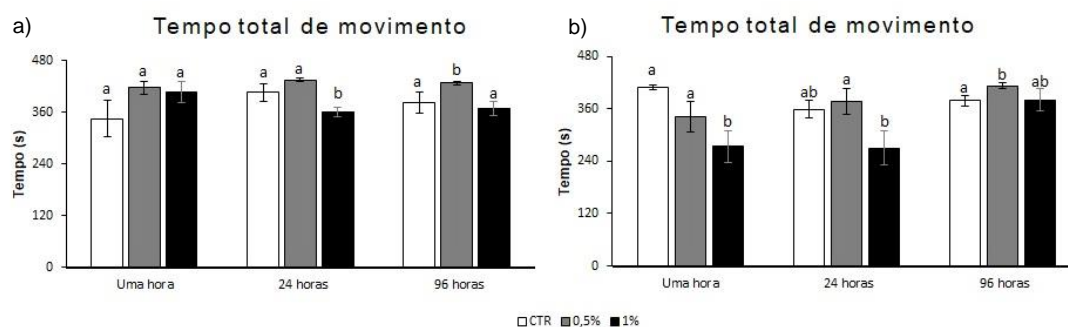
1167

1168

1169

1170

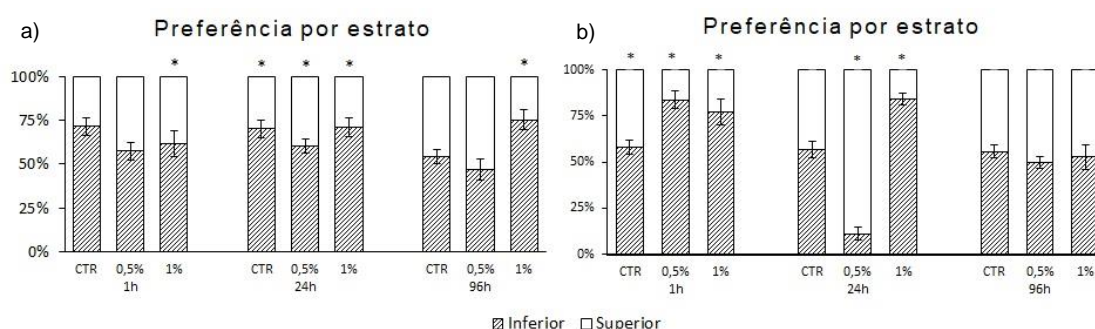
1171 Figura 18. Tempo total de movimentação no teste de natação espontânea em sequência, na bateria 1  
 1172 (à esquerda) e isolado, em primeira posição, na bateria 2 (à direita). Letras diferentes indicam diferença  
 1173 estatística ( $p \leq 0,05$ ) entre grupos de um mesmo tempo de exposição.



1174  
 1175 Fonte: o próprio autor.  
 1176

1177 Em ambas as posições na sequência (em primeiro lugar, “isolado”, ou após o  
 1178 teste claro-escuro), o estrato inferior foi prevalente para os grupos que demonstraram  
 1179 preferência, com exceção do grupo sob EtOH a 0,5% por 24h, apresentando  
 1180 surpreendente inversão. Para o teste de natação espontânea aplicado em primeiro  
 1181 lugar, todos os grupos sob exposição por 1h preferiram o estrato inferior, além do  
 1182 grupo sob 1% em exposição por 24h. Quando em segundo lugar, foram os grupos  
 1183 expostos por 24h que apresentaram, todos, preferência pelo estrato inferior, além dos  
 1184 grupos expostos a 1% durante 1h e 96h.

1185 Figura 19. Preferência por um estrato no aquário de natação espontânea em sequência (à esquerda) e  
 1186 isolado (à direita). Letras diferentes indicam diferença estatística ( $p \leq 0,05$ ) entre grupos de um mesmo  
 1187 tempo de exposição. Asteriscos (\*) indicam preferência estatisticamente significativa ( $p \leq 0,05$ ) por um  
 1188 estrato específico.

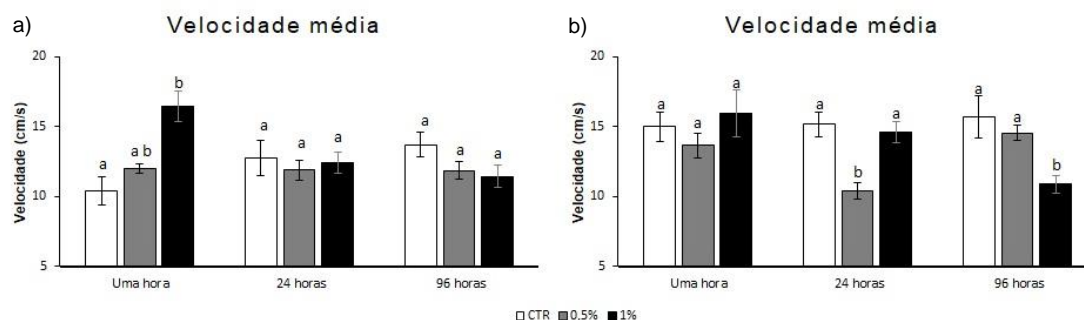


1189  
 1190 Fonte: o próprio autor.  
 1191

1192 A velocidade média apresentou variação significativa, no teste em sequência,  
 1193 apenas para o grupo exposto a 1% por 1h, sendo maior que os outros grupos que  
 1194 dividem o mesmo tempo de exposição. No teste isolado, a velocidade média foi menor

1195 em concentração 0,5% durante 24h e em concentração 1% durante 96h, não  
 1196 apresentando variação significativa para os grupos sob exposição por 1h.

1197 Figura 20. Velocidade média de natação espontânea em sequência (à esquerda) e isolado (à direita).  
 1198 Letras diferentes indicam diferença estatística ( $p \leq 0,05$ ) entre grupos de um mesmo tempo de  
 1199 exposição.



1200  
 1201  
 1202

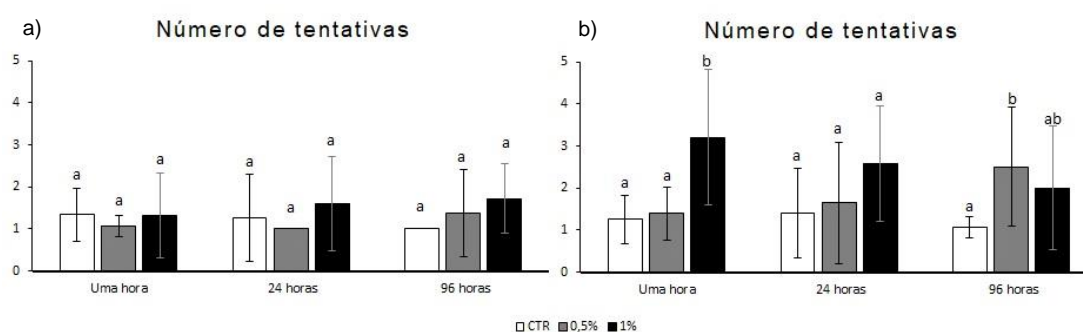
Fonte: o próprio autor.

1203 Nas figuras 21 e 22 podemos observar, respectivamente, o número de  
 1204 tentativas de resistência ao fluxo e a glicemia. A tabela 1 apresenta os valores de fator  
 1205 de condição de Fulton.

1206 Não houve variação significativa para o número de tentativas de resistência ao  
 1207 fluxo em nenhum grupo dos testes sequenciais. Para o teste de resistência natatória  
 1208 aplicado isoladamente, no entanto, os peixes submetidos ao EtOH em concentração  
 1209 1% precisaram de mais tentativas para responder ao estímulo quando comparados  
 1210 aos outros dois grupos do mesmo tempo de exposição. Em 96h, o grupo sob EtOH  
 1211 0,5% precisou de mais tentativas em relação ao controle somente. Nenhuma variação  
 1212 significativa foi detectada para os peixes expostos por 24h.

1213

1214 Figura 21. Número de tentativas de resistência ao fluxo no teste de resistência natatória em sequência  
 1215 (à esquerda) e isolado (à direita). Letras diferentes indicam diferença estatística ( $p \leq 0,05$ ) entre grupos  
 1216 de um mesmo tempo de exposição.



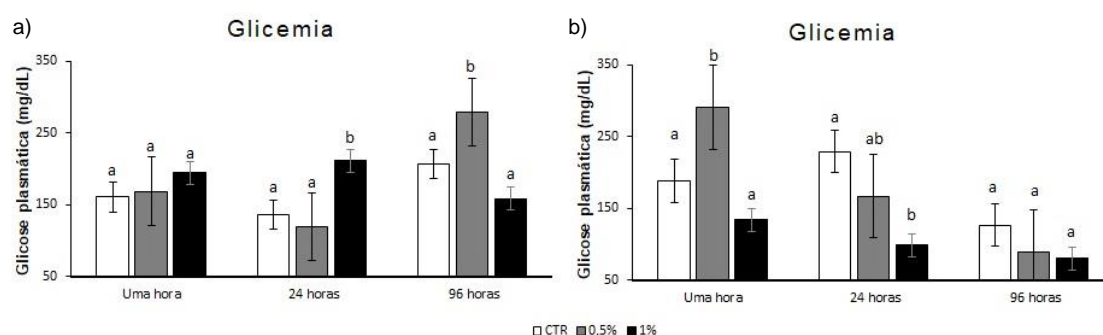
1217  
 1218  
 1219

Fonte: o próprio autor.

1220 A glicemia aumentou significativamente, nos testes sequenciais, para 24h 1%  
 1221 e 96h 0,5% em relação aos seus respectivos grupos por tempo de exposição. Para o  
 1222 teste de resistência natatória aplicado fora da bateria-teste, houve aumento para 1h  
 1223 0,5% em relação aos outros dois grupos de mesmo tempo de exposição e decréscimo  
 1224 significativo para 24h 1% em relação ao controle somente.

1225

1226 Figura 22. Concentração de glicose plasmática coletada após o fim da sequência de todos os testes (à  
 1227 esquerda), na bateria 1, e após o teste isolado de resistência natatória (à direita). Letras diferentes  
 1228 indicam diferença estatística ( $p \leq 0,05$ ) entre grupos de um mesmo tempo de exposição.



1229  
 1230  
 1231  
 1232

Fonte: o próprio autor.

1233 Figura 23. Tabela contendo o fator de condição de Fulton ( $K_f$ ) para todos os grupos testados. Os valores  
 1234 correspondem a média  $\pm$  erro padrão para a bateria completa dos três testes sequenciais (BT),  
 1235 sequência NE-CE e teste isolado de resistência natatória (RN).

$K_f$	1h			24h			96h		
	CTR	0,5%	1%	CTR	0,5%	1%	CTR	0,5%	1%
<b>BT</b>	1,64 $\pm$ 0,05	1,73 $\pm$ 0,05	1,76 $\pm$ 0,08	1,52 $\pm$ 0,08	1,58 $\pm$ 0,05	1,50 $\pm$ 0,05	1,63 $\pm$ 0,08	1,48 $\pm$ 0,06	1,50 $\pm$ 0,04
<b>NE-CE</b>	1,78 $\pm$ 0,08	2,01 $\pm$ 0,05	2,07 $\pm$ 0,07	1,77 $\pm$ 0,08	2,22 $\pm$ 0,25	1,77 $\pm$ 0,08	1,81 $\pm$ 0,09	1,69 $\pm$ 0,06	1,94 $\pm$ 0,07
<b>RN</b>	1,49 $\pm$ 0,04	1,91 $\pm$ 0,14	1,61 $\pm$ 0,07	1,67 $\pm$ 0,09	1,48 $\pm$ 0,09	1,54 $\pm$ 0,11	1,45 $\pm$ 0,08	1,20 $\pm$ 0,08	1,38 $\pm$ 0,07

1236  
 1237

Fonte: o próprio autor.

## 5 DISCUSSÃO

1238

1239

1240 Os testes tipo claro-escuro são considerados os testes mais sensíveis na  
1241 avaliação do comportamento ansiedade-símile (KYSIL et al., 2017). Assim, a  
1242 sequência dos testes foi planejada, no presente trabalho, para iniciar por esses testes,  
1243 amenizando possíveis alterações pela manipulação sucessiva do animal, e  
1244 avançando até testes que envolvem tarefas fisicamente mais exigentes e desafiadoras  
1245 (resistência natatória). A inserção de um peixe num teste sucessor, implica em outro  
1246 entrando no antecessor, de maneira que todos os peixes passam pelas mesmas  
1247 provas, sempre na mesma ordem e de maneira sobreposta, com a possibilidade de  
1248 aplicação de todos os testes em paralelo, se houver um indivíduo para cada teste.  
1249 Metodologias similares já apresentam sucesso com roedores (BLANCHARD et al.,  
1250 1993; BLOKLAND et al., 2012; HARRO et al., 2018) mas ainda carecem de adaptação  
1251 equivalente para os peixes, por serem modelos relativamente novos da pesquisa  
1252 comportamental, mas com popularidade ainda crescente.

1253

1254 Para avaliar a sensibilidade da bateria-teste, escolhemos o psicoativo etanol  
1255 como modulador farmacológico do comportamento dos peixes. É uma substância de  
1256 fácil acesso e baixo custo de aquisição, e a alta solubilidade em água permite  
1257 exposição eficiente e conveniente, bastando apenas sua diluição no meio de solução  
1258 para absorção direta pelas brânquias através de imersão. As mudanças  
1259 comportamentais características que seguem à exposição a esta substância podem  
1260 ser avaliadas através de testes simples e de rápida execução. Este trabalho avalia,  
1261 resumidamente, duas questões: a primeira, se existe, através da exposição ao etanol,  
1262 uma diferença perceptível e significativa no comportamento observável entre peixes  
1263 que se submetem a testes de maneira sucessiva e peixes submetidos a apenas um  
1264 teste isolado. Para investigarmos isso, repetimos, noutro momento, o segundo e o  
1265 terceiro teste da bateria-teste de forma isolada, ou seja, sem qualquer teste  
1266 antecedente, oferecendo um controle para sua performance em sequência. A segunda  
1267 questão é o impacto da ordem de aplicação dos testes no resultado final da bateria-  
1268 teste. Para termos um vislumbre disto, adicionamos sucessivamente ao teste de  
1269 natação espontânea isolado, um teste de claro e escuro, arbitrariamente invertendo,  
1270 assim, sua ordem original na bateria.

1270

1271 Uma vez que, para a bateria-teste, os indivíduos submetidos a todos os testes  
são os mesmos, interpretar o resultado de cada teste de forma independente e

1272 analisá-los em separado ignora a necessidade de uma correlação entre seus  
1273 parâmetros, além de limitar a capacidade de abstrair conclusões de natureza inter-  
1274 teste. Neste contexto, a aplicação de uma análise multivariada de componentes  
1275 principais se mostra como opção mais apropriada para administrar os dados através  
1276 de todos os testes. Aplicamos esta análise tanto para os experimentos da BT1 quanto  
1277 para a BT2, para melhor comparação dos resultados.

1278 O gráfico de cargas da análise multivariada de componentes principais  
1279 demonstrou que a componente 1 está fortemente relacionada com a atividade  
1280 natatória do animal. As maiores magnitudes observadas foram de distância total  
1281 percorrida, tempo de movimento, velocidade média e capacidade de resistência ao  
1282 fluxo, indicando que todos esses parâmetros tiveram variação positivamente  
1283 correlacionada. Assim, no gráfico de dispersão da análise multivariada, o eixo x está  
1284 relacionado à atividade natatória. O eixo y está relacionado à fototaxia porque, para a  
1285 componente 2, as maiores magnitudes de variação foram as de tempo de  
1286 permanência no claro e tempo médio por investida. Desta forma, os parâmetros que  
1287 ascendem no eixo y (componente 2) se relacionam positivamente com a fototaxia,  
1288 assim como os parâmetros que se deslocam através do eixo x (componente 1) se  
1289 relacionam com a atividade natatória.

1290 Podemos notar em ambos os gráficos, uma variação muito clara do efeito do  
1291 etanol sob o comportamento de *Danio rerio* de maneira tempo-dependente.  
1292 Analisando os indivíduos expostos a concentração 1% (estrelas no gráfico), a  
1293 exposição de 1h teve efeito positivo sobre a atividade natatória, com a maior  
1294 população dos indivíduos no lado direito do gráfico, ainda que não tenha impactado  
1295 de maneira significativa a sua preferência pela luminosidade, uma vez que ainda estão  
1296 divididos entre os quadrantes superior e inferior. O aumento do tempo de exposição  
1297 para 24h acarretou em um “arrasto” dos indivíduos expostos a esta concentração para  
1298 o hemisfério superior, indicando agora uma preferência por ambientes claros, além de  
1299 uma maior população no lado esquerdo, indicando também impacto deletério sobre a  
1300 atividade natatória. Por sua vez, a exposição por 96h levou a uma distribuição  
1301 majoritária no quadrante superior esquerdo do gráfico, demonstrando claramente uma  
1302 queda na atividade locomotora concomitante a uma forte preferência pelo ambiente  
1303 claro. Esta preferência pode ser observada em uma meta-análise executada por  
1304 CHAVES et al. (2018), reunindo 22 importantes trabalhos sob as palavras-chave  
1305 “etanol”, “withdrawal” e “zebrafish”, demonstrando consistentemente ( $p = 0,0467$ ) que

1306 a permanência no ambiente claro aumenta proporcionalmente à dose e ao tempo de  
1307 exposição ao etanol.

1308 Observando os gráficos de análises univariadas para os parâmetros de  
1309 locomoção, no teste de natação espontânea (distância total percorrida e tempo total  
1310 de movimento) e resistência natatória (IRN), esta relação torna-se ainda mais  
1311 evidente. Podemos notar o aumento da atividade locomotora em 1h (evidenciado pelo  
1312 aumento significativo da distância total percorrida e da velocidade média, sem  
1313 alteração do tempo total de movimento e do IRN) e sua queda significativa após 24h  
1314 e 96h quando em concentração 1%. Este impacto de natureza tempo-dependente na  
1315 atividade locomotora é relatado por ROSEMBERG et al. (2012), embora em escala de  
1316 tempo menor, apresentando aumento da distância total percorrida após 20 minutos  
1317 de exposição seguido por queda significativa após 60 minutos. Em TRAN et al., (2013)  
1318 foi observado um efeito tempo-dependente em contraste ao efeito dose-dependente.  
1319 Porém, a exposição aguda por 1h causou aumento da atividade locomotora, sendo  
1320 atenuada pela exposição crônica de 22 dias seguida por nova exposição de 1h, um  
1321 resultado similar ao encontrado por GERLAI et al. (2006), que observaram aumento  
1322 da distância percorrida após exposição de 1h em etanol a 1% e atenuação desta  
1323 alteração após exposição de 2 semanas. Curiosamente, este aumento da distância  
1324 total percorrida foi observado em nosso teste aplicado em sequência, mas não no  
1325 teste de aplicação isolada.

1326 Da maneira geral, espera-se que peixes *Danio rerio*, que são gregários,  
1327 apresentem comportamento tipo-ansioso quando expostos individualmente a um  
1328 ambiente desconhecido. Neste cenário, observa-se uma queda na exploração do  
1329 aquário até eventual habituação. Associamos este comportamento a ansiedade  
1330 porque ele pode ser modulado farmacologicamente pela exposição a ansiolíticos  
1331 (EGAN et al., 2009). É possível que este aumento observado na distância total  
1332 percorrida no teste de natação espontânea em sequência seja reflexo de uma  
1333 habituação dos indivíduos à exposição de novidades, causada pelo teste antecessor.  
1334 Aqui existem duas forças competindo: por um lado, é preciso considerar o potencial  
1335 ansiolítico do etanol, por outro lado, um comportamento tipo-ansioso estimulado pela  
1336 exposição a um teste de novidade. No caso do teste de natação espontânea, seria  
1337 possível argumentar, pelo aumento significativo da distância total percorrida que foi  
1338 observado apenas no teste em sequência e coerente com vários resultados da  
1339 literatura, que a habituação à novidade causada pela pré-exposição ao teste claro-

1340 escuro antecedente potencializou, de certo modo, o efeito ansiolítico do etanol em  
1341 detrimento do estímulo ansiogênico do teste em sequência.

1342 Este efeito do teste antecedente pode ser um dos motivos que causou a  
1343 diferença significativa entre grupos análogos no teste de resistência natatória. É  
1344 possível observar que as médias de IRN foram significativamente maiores para o teste  
1345 aplicado em sequência quando comparamos os grupos aos seus análogos no teste  
1346 de aplicação isolada. Da mesma forma, o número de tentativas também foi maior  
1347 neste. Se levarmos em consideração como o número de tentativas se posiciona  
1348 diametralmente à resistência e outros parâmetros de atividade natatória na análise de  
1349 componentes principais, peixes que nadaram menos também necessitaram, em geral,  
1350 de mais tentativas para responder ao estímulo do fluxo. Desta forma, é possível que  
1351 a aplicação do teste de resistência natatória em sequência esteja sujeita a um efeito  
1352 de “ativação” do organismo, aumentando sua performance de resistência e sua  
1353 capacidade de responder ao fluxo. Novamente, existindo duas forças em jogo, nota-  
1354 se que aumentar a potência do etanol sobre esta relação suprime este efeito, uma vez  
1355 que a diferença significativa entre grupos análogos é atenuada ou mesmo deixa de  
1356 existir em exposições de caráter mais prolongado.

1357 Embora a comparação estatística entre os grupos análogos dos testes de claro  
1358 e escuro e natação espontânea não tenham acusado diferença significativa, podemos  
1359 notar que existe um impacto sensível para a sensibilidade dos testes quando  
1360 aplicados em sequência, especialmente para o teste de claro e escuro. Observando o  
1361 gráfico de cargas para a componente 2, podemos observar que o tempo de  
1362 permanência no claro, principal parâmetro do teste, perdeu magnitude quando em  
1363 sequência em relação à sua aplicação isoladamente, assim como parâmetros de  
1364 locomoção passaram a exercer mais influência. Este impacto não foi observado no  
1365 teste de natação espontânea, uma vez que suas magnitudes e correlações  
1366 apresentaram determinada consistência para ambos os métodos. Isso reforça o  
1367 posicionamento do teste de claro e escuro como introdutório na bateria-teste por ser  
1368 mais sensível às manipulações recorrentes da aplicação de provas sucessivas.

1369 Voltando à meta-análise de CHAVES et al. (2018), a apresentação de uma  
1370 preferência pelo ambiente claro como resposta à exposição ao etanol não acarretou  
1371 em alteração significativa para o número de trocas ou tempo de latência, resultado  
1372 coerente com o observado em nosso estudo. Porém, podemos ver através de seu  
1373 posicionamento nos gráficos de dispersão, que o número de trocas é um parâmetro

1374 mais relacionado com a atividade natatória do animal do que com a fototaxia,  
1375 sugerindo que este seja um parâmetro do teste de claro e escuro que, ao se  
1376 correlacionar positivamente com parâmetros encontrados no teste de natação  
1377 espontânea, possa refletir variações observadas no outro teste. As análises  
1378 univariadas fortalecem esta ideia, uma vez que a queda da atividade locomotora  
1379 (parâmetros de natação espontânea e resistência natatória) observada nos grupos  
1380 expostos à maior concentração de etanol foi simultânea à queda no número de trocas.

1381 Da mesma forma, a exploração do estrato superior no aquário de natação  
1382 espontânea apresentou positiva correlação com o tempo de permanência no ambiente  
1383 claro. A tigmotaxia é um comportamento tipo-ansioso caracterizado pela exploração  
1384 periférica do ambiente desconhecido. EGAN et al. (2009) demonstraram como a  
1385 exposição a ansiogênicos como a cafeína podem potencializar esse parâmetro,  
1386 prolongando a permanência dos peixes no estrato inferior do aquário. É natural que o  
1387 efeito ansiolítico do etanol reflita em uma segurança de explorar porções superiores  
1388 além dos ambientes mais claros, onde estariam, teoricamente, mais expostos a  
1389 predadores em condições naturais. Neste contexto, estabelece-se uma relação entre  
1390 a exploração do estrato superior no teste de natação espontânea e a fototaxia no teste  
1391 de claro e escuro.

1392 É possível observar, então, que, principalmente quando aplicados em  
1393 sequência, estes testes apresentam parâmetros que se relacionam de forma inter-  
1394 teste e de maneira complementar. Partindo desta ideia, ao observarmos o reflexo da  
1395 queda da atividade natatória no teste de resistência e no número de trocas do teste  
1396 de claro e escuro, podemos concluir que, em uma situação onde a bateria-teste deva  
1397 ser alterada através da remoção de ao menos um dos testes para se adequar a  
1398 limitações de recurso de quaisquer natureza, o melhor candidato para tal supressão  
1399 seria o teste de natação espontânea.

1400 O teste de natação espontânea requer não somente seu aquário em condições  
1401 determinadas (*novel tank*) para padronização dos resultados, como também lhe é  
1402 mandatório equipamento tecnológico mais sofisticado, como câmera digital e  
1403 computador para armazenamento e análise dos dados através de *softwares*  
1404 específicos. Em um cenário onde nem todos os requisitos são satisfeitos, concluímos  
1405 que sua remoção poderia ser complementada pelos parâmetros relacionados à  
1406 atividade natatória dos outros dois testes.

1407 Vale notar que o fator de condição de Fulton é um parâmetro que se

1408 correlaciona de maneira positiva com a atividade natatória na bateria-teste, mas esta  
1409 relação não é verdadeira para a BT2. Esta relação é mais forte no primeiro caso  
1410 porque se trata realmente do mesmo indivíduo para todos os testes. BLAZINA et al.  
1411 (2013) demonstrou em um teste peculiar de resistência natatória chamado de “*spining*  
1412 *task*” que existe uma relação entre o tamanho do indivíduo e sua performance de  
1413 resistência. Este teste consiste em adicionar uma pequena barra de metal ao fundo  
1414 de um Becker de 1 L preenchido com 800 mL de solução e aloca-lo em um agitador  
1415 magnético para criar um fluxo por rodaminho. A performance de peixes expostos ao  
1416 etanol por 30 minutos em concentração 0,25% reduziu significativamente em relação  
1417 ao controle, corroborando com nossos resultados. É interessante ressaltar que  
1418 citaram uma influência do tamanho corporal sobre este parâmetro, uma vez que  
1419 peixes maiores levavam mais tempo para serem arrastados pelo rodaminho. Nossa  
1420 análise multivariada evidencia como a variação no tamanho corporal se relaciona com  
1421 o desempenho físico, uma vez que peixes menores, além de possuírem menos  
1422 potência muscular e reserva energética para combater o fluxo, também estariam,  
1423 teoricamente, mais suscetíveis aos efeitos do etanol por apresentarem pouca gordura  
1424 em relação à água em seus tecidos, facilitando a distribuição da substância através  
1425 de seus corpos.

1426 Assim como o fator de condição de Fulton, o número de tentativas também  
1427 apresenta uma correlação na BT1, mas não na BT2. Não somente este parâmetro se  
1428 encontra diametralmente oposto aos parâmetros de natação, como antagoniza  
1429 totalmente a posição da resistência ao fluxo no gráfico de dispersão. Novamente, isto  
1430 demonstra que, de maneira geral, os peixes que precisaram de mais tentativas  
1431 apresentaram menor atividade natatória. Os peixes que apresentaram menor  
1432 atividade natatória, por sua vez, dispenderam mais tempo no claro. Traçando esta  
1433 relação, é possível que o aumento no número de tentativas está relacionado ao efeito  
1434 ansiolítico do etanol, atenuando o fator de desafio incitado pela vazão e aumentando  
1435 o limiar de resposta ao estímulo. Vale lembrar também, que não foi observada uma  
1436 diferença estatística para a latência nos grupos da BT1, como aconteceu na BT2, mas  
1437 esta variação, apesar de menor, foi suficiente para gerar uma magnitude de correlação  
1438 maior para a BT1, sendo razoável concluir que o motivo seja porque, nesta, trata-se  
1439 dos mesmos indivíduos.

1440 Por fim, podemos concluir que, na bateria-teste, existe um impacto na  
1441 sensibilidade do teste sucessor pelo teste antecessor. Todos os três testes

1442 apresentaram maior variação e detectaram mais diferenças entre grupos quando  
1443 aplicados de maneira isolada. Esta perda de sensibilidade, no entanto, é complexa,  
1444 sendo observada em diferentes graus para os testes, para os parâmetros e para as  
1445 condições de exposição. As condições naturalmente ansiogênicas dos testes podem  
1446 ser amenizadas por um fator de habituação, mas podemos perceber que a ação  
1447 farmacológica do etanol acaba sobrepujando os impactos deste fator, uma vez que as  
1448 diferenças entre os grupos análogos foram amenizadas para todos os grupos sob  
1449 exposição mais rigorosa (96h). O teste de claro-escuro é o mais sensível à sua  
1450 posição na bateria-teste, sendo necessário a exposição mais potente (96h 1%) para  
1451 acusar uma diferença significativa no tempo de permanência no claro do teste em  
1452 sequência, enquanto sua versão isolada detectou variações ainda em 24h.

1453         Esta perda de sensibilidade do teste sucessor pelo teste antecessor, no  
1454 entanto, não é significativa quando comparamos os grupos análogos dos testes em  
1455 sequência com os testes isolados, pelo menos para os testes de claro-escuro e  
1456 natação espontânea. Além disso, todos os testes apresentaram a mesma variação,  
1457 tanto em sua versão isolada quanto em sua versão em sequência, possibilitando a  
1458 mesma conclusão: a exposição ao etanol por 1h aumenta a atividade natatória sem  
1459 grandes impactos na fototaxia, enquanto exposições mais prolongadas  
1460 gradativamente reduzem a atividade natatória ao mesmo tempo em que aumentam a  
1461 fototaxia. Agora, levando em consideração que a bateria-teste utilizou  $\frac{1}{3}$  dos animais  
1462 necessários para aplicar os testes isoladamente e permitiu observar as mesmas  
1463 variações, possibilita uma aplicação sobreposta dos testes, reduzindo também o  
1464 tempo necessário para a aplicação e manutenção do espaço laboratorial, além de  
1465 apresentar, na análise de componentes principais, correlações de magnitude  
1466 significativamente maiores, é seguro afirmar que esta metodologia oferece uma  
1467 alternativa relevante e promissora não somente para questões de caráter bioético,  
1468 mas de praticidade e precisão na hora de contornar diferenças inter-individuais em  
1469 experimentos com mais de um teste comportamental.

1470         Assim, a aplicação de uma bateria de testes comportamentais se torna  
1471 legitimamente recomendável em um cenário onde múltiplos testes comportamentais  
1472 serão empregados. Especialmente em caso de exposições de caráter prolongado  
1473 (dias), onde, presumivelmente, o efeito farmacológico do xenobiótico em estudo pode  
1474 amenizar os impactos do fator de habituação. Para reforçar essa afirmação, estudos

1475 utilizando a bateria-teste sob efeito de substâncias de outras naturezas são  
1476 encorajados.

## 1477           **6 CONCLUSÕES**

1478

1479           A aplicação de uma bateria de testes comportamentais aplicados em sequência  
1480 é efetiva, ainda que menos sensível - em especial quando são realizados testes de  
1481 natação forçada - que a aplicação de seus testes isolados, para detectar variações  
1482 causadas pelo efeito farmacológico do etanol, principalmente em tempos de  
1483 exposição mais prolongados (96h).

1484           A ordem de aplicação dos testes pode influenciar na interpretação do resultado  
1485 final. O teste de claro-escuro apresentou mais perda de sensibilidade quando não  
1486 posicionado em primeiro lugar na sequência se comparado ao teste de natação  
1487 espontânea e resistência natatória nas mesmas condições.

1488           Os testes de **claro-escuro** e de **resistência natatória** possuem parâmetros  
1489 baseados em paradigmas comportamentais, em tese, diferentes (IRN e preferência  
1490 pelo claro, por exemplo) e outros complementares (número de tentativas e indicação  
1491 de ansiólise) e, pelo fato de ambos possuírem parâmetros sombreados aos do teste  
1492 de **natação espontânea** (preferência pelo claro e ocupação do estrato superior;  
1493 distância percorrida e IRN), na impossibilidade da realização deste último, os dois  
1494 primeiros, se realizados na sequência CE-RN, podem constituir um interessante *set*  
1495 de experimentos comportamentais para serem aplicados conjuntamente.

1496           O emprego de uma bateria-teste em mais estudos comportamentais com  
1497 peixes deve ser encorajado para a redução do número de organismos-teste, do  
1498 esforço experimental, e contorno das diferenças inter-individuais, principalmente em  
1499 desenhos experimentais que envolvam exposições de caráter prolongado (dias). Em  
1500 suma, a utilização de baterias-teste na forma de testes em sequência com os mesmos  
1501 indivíduos atende a dois dos três princípios da bioética (princípio dos 3R), pois  
1502 possibilita a redução do número de animais experimentais e o refinamento, uma vez  
1503 que a utilização dos mesmos indivíduos parece produzir resultados mais robustos e  
1504 de mais fácil interpretação e comparação.

1505

## REFERÊNCIAS

- 1506
- 1507
- 1508 ABNT – Associação Brasileira de Normas e Técnicas (2003) Ecotoxicologia aquática  
 1509 – Toxicidade aguda – Método de ensaio com peixes. Projeto N 00:001.44-001. Rio  
 1510 de Janeiro, ABNT, 15 p.
- 1511
- 1512 ALASMARI, Fawaz et al. Role of glutamatergic system and mesocorticolimbic circuits  
 1513 in alcohol dependence. **Progress in neurobiology**, v. 171, p. 32-49, 2018.
- 1514
- 1515 ALESTRÖM, Peter et al. *Zebrafish*: Housing and husbandry  
 1516 recommendations. **Laboratory animals**, v. 54, n. 3, p. 213-224, 2020.
- 1517
- 1518 AXLEY, Page D.; RICHARDSON, Crit Taylor; SINGAL, Ashwani K. Epidemiology of  
 1519 alcohol consumption and societal burden of alcoholism and alcoholic liver  
 1520 disease. **Clinics in liver disease**, v. 23, n. 1, p. 39-50, 2019.
- 1521
- 1522 BAEMISH, F. W. H. et al. Swimming capacity. **Fish Physiology**. Academic Press,  
 1523 New York, pp. 101-187. 1978.
- 1524
- 1525 BASNET, Ram Manohar et al. *Zebrafish* larvae as a behavioral model in  
 1526 neuropharmacology. **Biomedicines**, v. 7, n. 1, p. 23, 2019.
- 1527
- 1528 BERNARDO, Henrique Teza et al. Cholinergic system and exploratory behavior are  
 1529 changed after weekly-binge ethanol exposure in *zebrafish*. **Pharmacology**  
 1530 **Biochemistry and Behavior**, v. 186, p. 172790, 2019.
- 1531
- 1532 BLANCHARD D. Caroline et al. Alcohol and anxiety: effects on offensive and  
 1533 defensive aggression. **Journal of Studies on Alcohol, Supplement**. vol. 1993 n.  
 1534 11, p. 9-19, 1993.
- 1535
- 1536 BLAZINA, Ana R.; VIANNA, Mônica R.; LARA, Diogo R. The spinning task: a new  
 1537 protocol to easily assess motor coordination and resistance in *zebrafish*. **Zebrafish**,  
 1538 v. 10, n. 4, p. 480-485, 2013.
- 1539
- 1540 BLOKLAND, Arjan et al. The use of a test battery assessing affective behavior in  
 1541 rats: order effects. **Behavioural brain research**, vol. 228, n. 1, p. 16-21, 2012.
- 1542
- 1543 BROCARD, Lucila et al. Beneficial and detrimental remodeling of glial connexin and  
 1544 pannexin functions in rodent models of nervous system diseases. **Frontiers in**  
 1545 **cellular neuroscience**, v. 13, p. 491, 2019.
- 1546
- 1547 CACIOPPO, J. T., TASSINARY, L. G., & BERNTSON, G. *Handbook of*  
 1548 *psychophysiology*. Cambridge university press. Cambridge. 2007.
- 1549
- 1550 CAETANO, L. et al. SACAM: software para análises de comportamento de insetos.  
 1551 In **Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia-Resumo em anais de**  
**congresso (ALICE)**. In: ENCONTRO DO TALENTO ESTUDANTIL DA EMBRAPA  
 RECURSOS GENÉTICOS E BIOTECNOLOGIA, 11., 2006, Brasília, DF. Anais:

- 1552 resumos dos trabalhos. Brasília, DF: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia,  
1553 2006.
- 1554 CALHOUN, Vince D.; PEKAR, James J.; PEARLSON, Godfrey D. Alcohol  
1555 intoxication effects on simulated driving: exploring alcohol-dose effects on brain  
1556 activation using functional MRI. **Neuropsychopharmacology**, v. 29, n. 11, p. 2097-  
1557 2107, 2004.
- 1558  
1559 CEDERBAUM, Arthur I. Alcohol metabolism. **Clinics in liver disease**, v. 16, n. 4, p.  
1560 667-685, 2012.
- 1561  
1562 CHAMPAGNE, Danielle L. et al. Translating rodent behavioral repertoire to *zebrafish*  
1563 (*Danio rerio*): relevance for stress research. **Behavioural brain research**, v. 214, n.  
1564 2, p. 332-342, 2010.
- 1565  
1566 CHANDRA, Dev et al. Normal acute behavioral responses to moderate/high dose  
1567 ethanol in GABAA receptor  $\alpha 4$  subunit knockout mice. **Alcoholism: Clinical and**  
1568 **Experimental Research**, v. 32, n. 1, p. 10-18, 2008.
- 1569  
1570 DA SILVA CHAVES, Suianny Nayara et al. Behavioral and biochemical effects of  
1571 ethanol withdrawal in **zebrafish**. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, vol.  
1572 169, p. 48-58, 2018.
- 1573 DAMMSKI, Ana Paula et al. *Zebrafish*-Manual de criação em Biotério. **Curitiba (PR):**  
1574 **Universidade Federal do Paraná**, p. 20-1, 2011.
- 1575  
1576 DE ABREU, Murilo S. et al. *Zebrafish* models: do we have valid paradigms for  
1577 depression?. **Journal of pharmacological and toxicological methods**, v. 94, p. 16-  
1578 22, 2018.
- 1579  
1580 DESTANOĞLU, Orhan; İSMAIL, A. T. E. Ş. Determination and evaluation of  
1581 methanol, ethanol and higher alcohols in legally and illegally produced alcoholic  
1582 beverages. **Journal of the Turkish Chemical Society Section A: Chemistry**, v. 6,  
1583 n. 1, p. 21-28, 2019.
- 1584  
1585 DLUGOS, Cynthia A.; RABIN, Richard A. Ethanol effects on three strains of *zebrafish*:  
1586 model system for genetic investigations. **Pharmacology Biochemistry and**  
1587 **Behavior**, v. 74, n. 2, p. 471-480, 2003.
- 1588  
1589 DUDLEY, Robert. **The Drunken Monkey**. University of California Press, 2014.
- 1590 EAMES, Stefani C. et al. Blood sugar measurement in *zebrafish* reveals dynamics of  
1591 glucose homeostasis. **Zebrafish**, v. 7, n. 2, p. 205-213, 2010.
- 1592  
1593 EISEN, Judith S. History of *zebrafish* research. In: **The zebrafish in biomedical**  
1594 **research**. Academic Press, p. 3-14, 2020.
- 1595  
1596 GAWEL, Kinga et al. Seizing the moment: *Zebrafish* epilepsy models. **Neuroscience**  
1597 **& Biobehavioral Reviews**, v. 116, p. 1-20, 2020.
- 1598

- 1599 GERLAI, Robert; LEE, Vallent & BLASER, Rachel. Effects of acute and chronic  
1600 ethanol exposure on the behavior of adult *zebrafish* (*Danio rerio*). **Pharmacology**  
1601 **Biochemistry and Behavior**, vol. 85 n. 4, p. 752-761, 2006.
- 1602 GERLAI, Robert et al. Drinks like a fish: zebra fish (*Danio rerio*) as a behavior genetic  
1603 model to study alcohol effects. **Pharmacology biochemistry and behavior**, v. 67, n.  
1604 4, p. 773-782, 2000.
- 1605  
1606 GERLAI, Robert. Fish in behavior research: unique tools with a great  
1607 promise! **Journal of neuroscience methods**, v. 234, p. 54-58, 2014.
- 1608  
1609 GONZALES, Rueben A.; JAWORSKI, Jason N. Alcohol and glutamate. **Alcohol**  
1610 **health and research world**, v. 21, n. 2, p. 120, 1997.
- 1611  
1612 HAMILTON, Trevor J. et al. Episodic-like memory in *zebrafish*. **Animal Cognition**, v.  
1613 19, n. 6, p. 1071-1079, 2016.
- 1614  
1615 HANKS, James B.; GONZÁLEZ-MAESO, Javier. Hallucinogens: Circuits, Behavior,  
1616 and Translational Models. In: **Neuropathology of Drug Addictions and Substance**  
1617 **Misuse**. Academic Press, 2016. p. 813-820.
- 1618  
1619 HARRISON, David J. et al. Unified behavioral scoring for preclinical models. **Frontiers**  
1620 **in neuroscience**, v. 14, p. 313, 2020.
- 1621  
1622 HARRISON, Neil L. et al. Effects of acute alcohol on excitability in the  
1623 CNS. **Neuropharmacology**, v. 122, p. 36-45, 2017.
- 1624  
1625 HARRO, Jaanus. Animals, anxiety, and anxiety disorders: How to measure anxiety in  
1626 rodents and why. **Behavioural brain research**, vol. 352, p. 81-93, 2018
- 1627 HECKMANN, Wolfgang; SILVEIRA, Camila Magalhães. Dependência do álcool:  
1628 aspectos clínicos e diagnósticos. **Andrade AG, Anthony JC, Silveira CM. Álcool e**  
1629 **suas consequências: uma abordagem multiconceitual. Barueri (SP): Minha**  
1630 **Editora**, p. 67-87, 2009.
- 1631  
1632 HOWARTH, Deanna L.; PASSERI, Mike; SADLER, Kirsten C. Drinks like a fish: using  
1633 *zebrafish* to understand alcoholic liver disease. **Alcoholism: clinical and**  
1634 **experimental research**, v. 35, n. 5, p. 826-829, 2011.
- 1635  
1636 HUNG, Ming Wai et al. From omics to drug metabolism and high content screen of  
1637 natural product in *zebrafish*: a new model for discovery of neuroactive  
1638 compound. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2012,  
1639 2012.
- 1640  
1641 KALUEFF, Allan; ECHEVARRIA, David & STEWART, Adam Michael. Gaining  
1642 translational momentum: more *zebrafish* models for neuroscience research. **Progress**  
1643 **in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry**. v. 55, n. 3; p. 1-6, 2014.
- 1644 KALUEFF, Allan V. et al. Towards a comprehensive catalog of *zebrafish* behavior 1.0  
1645 and beyond. **Zebrafish**, v. 10, n. 1, p. 70-86, 2013.
- 1646

- 1647 KOLAR, Roman. Animal experimentation. **Science and Engineering Ethics**, v. 12, n.  
1648 1, p. 111-122, 2006.
- 1649
- 1650 KOURKOUMPETIS, Themistoklis; SOOD, Gagan. Pathogenesis of alcoholic liver  
1651 disease: an update. **Clinics in liver disease**, v. 23, n. 1, p. 71-80, 2019.
- 1652
- 1653 Kysil, E. V., Meshalkina, D. A., Frick, E. E., Echevarria, D. J., Rosemberg, D. B.,  
1654 Maximino, C., ... & Kalueff, A. V. (2017). Comparative analyses of *zebrafish* anxiety-  
1655 like behavior using conflict-based novelty tests. *Zebrafish*, 14(3), 197-208.
- 1656 LAWRENCE, Christian et al. The effects of feeding frequency on growth and  
1657 reproduction in *zebrafish* (*Danio rerio*). **Aquaculture**, v. 368, p. 103-108, 2012.
- 1658
- 1659 LEITE-FERREIRA, Maria Elisa; ARAUJO-SILVA, Heloysa; LUCHIARI, Ana Carolina.  
1660 Individual differences in hatching time predict alcohol response in *Zebrafish*. **Frontiers**  
1661 **in behavioral neuroscience**, v. 13, p. 166, 2019.
- 1662
- 1663 LEUNG, Maxwell CK et al. *Caenorhabditis elegans*: an emerging model in biomedical  
1664 and environmental toxicology. **Toxicological sciences**, v. 106, n. 1, p. 5-28, 2008.
- 1665
- 1666 LOBO, Ingrid A.; HARRIS, R. Adron. GABAA receptors and alcohol. **Pharmacology**  
1667 **Biochemistry and Behavior**, v. 90, n. 1, p. 90-94, 2008.
- 1668
- 1669 MASSÉ, Anita J.; THOMAS, Jith K.; JANZ, David M. Reduced swim performance and  
1670 aerobic capacity in adult *zebrafish* exposed to waterborne selenite. **Comparative**  
1671 **Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology**, v. 157, n. 3,  
1672 p. 266-271, 2013.
- 1673
- 1674 MATHUR, Priya; BERBEROGLU, Michael A.; GUO, Su. Preference for ethanol in  
1675 *zebrafish* following a single exposure. **Behavioural brain research**, v. 217, n. 1, p.  
1676 128-133, 2011.
- 1677
- 1678 MAXIMINO, Caio et al. A comparison of the light/dark and novel tank tests in  
1679 *zebrafish*. **Behaviour**, v. 149, n. 10-12, p. 1099-1123, 2012.
- 1680
- 1681 MAXIMINO, Caio et al. Measuring anxiety in *zebrafish*: a critical review. **Behavioural**  
1682 **brain research**, v. 214, n. 2, p. 157-171, 2010.
- 1683
- 1684 MCILWAIN, Kellie L. et al. The use of behavioral test batteries: effects of training  
1685 history. **Physiology & behavior**, v. 73, n. 5, p. 705-717, 2001.
- 1686
- 1687 MELO, Flávio Roberto Mendonça de. **Avaliação dos efeitos do hidrocarboneto**  
1688 **aromático fenantreno e do metal cobre em juvenis do peixe *Poecilia vivipara*.**  
1689 **Dissertação de Mestrado em Biologia Animal. Recife. 49. 2011.**
- 1690
- 1691 MINGOTI, S. A. Análise de dados através de métodos de estatística multivariada: uma  
1692 abordagem aplicada. Belo Horizonte: Editora UFMG, 2005.
- 1693
- 1694 MOCELIN, Ricieri et al. N-Acetylcysteine reverses anxiety and oxidative damage  
1695 induced by unpredictable chronic stress in *zebrafish*. **Molecular neurobiology**, v. 56,

- 1696 n. 2, p. 1188-1195, 2019.  
1697
- 1698 MUGGIRONI, Giulia; FOIS, Giulia R.; DIANA, Marco. Ethanol-derived acetaldehyde:  
1699 pleasure and pain of alcohol mechanism of action. **Frontiers in behavioral**  
1700 **neuroscience**, v. 7, p. 87, 2013.  
1701
- 1702 MÜLLER, Talise Ellwanger et al. **Alterações comportamentais mediadas pelo**  
1703 **etanol em peixe-zebra: influência do estresse oxidativo, disfunção mitocondrial**  
1704 **e modulação serotoninérgica**. 2020. Tese de Doutorado. Universidade Federal de  
1705 Santa Maria.  
1706
- 1707 O'NEIL, Meghan L. et al. The  $\alpha$ 1-adrenergic receptor antagonist, doxazosin, reduces  
1708 alcohol drinking in alcohol-preferring (P) Rats. **Alcoholism: Clinical and**  
1709 **Experimental Research**, v. 37, n. 2, p. 202-212, 2013.  
1710
- 1711 ORGER, Michael & DE POLAVIEJA, Gonzalo. *Zebrafish* behavior: opportunities and  
1712 challenges. **Annual review of neuroscience**, v. 40, p. 125-147, 2017.
- 1713 PAYLOR, Richard et al. The use of behavioral test batteries, II: effect of test  
1714 interval. **Physiology & behavior**, v. 87, n. 1, p. 95-102, 2006.  
1715
- 1716 PLAUT, Itai. Critical swimming speed: it's ecological relevance. **Comparative**  
1717 **Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology**. v.  
1718 131, n. 1, p. 41-50, 2001  
1719
- 1720 PUBCHEM. Ethanol compound. Página da web disponível em  
1721 <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Ethanol> Acesso em: 16/10/2021 às  
1722 10:43 am.  
1723
- 1724 REIDY, S. P. et al. Aerobic and anaerobic swimming performance of individual  
1725 Atlantic Cod. **Journal of Experimental Biology**. v. 203, n. 2, p. 347-357, 2000.  
1726
- 1727 REIMERS, Mark J.; HAHN, Mark E.; TANGUAY, Robert L. Two *zebrafish* alcohol  
1728 dehydrogenases share common ancestry with mammalian class I, II, IV, and V alcohol  
1729 dehydrogenase genes but have distinct functional characteristics. **Journal of**  
1730 **Biological Chemistry**, v. 279, n. 37, p. 38303-38312, 2004.  
1731
- 1732 RITCHIE, Hannah; ROSER, Max. Alcohol consumption. **Our world in data**, 2018.  
1733
- 1734 ROSA LV, COSTA FV, CANZIAN J, BORBA JV, QUADROS VA, ROSEMBERG DB.  
1735 Three-and bi-dimensional analyses of the shoaling behavior in zebrafish: Influence of  
1736 modulators of anxiety-like responses. **Progress in Neuro-Psychopharmacology**  
1737 **and Biological Psychiatry**. Vol. 102, n. 30, 2020.  
1738
- 1739 ROSEMBERG, Denis et al. Behavioral effects of taurine pretreatment in *zebrafish*  
1740 acutely exposed to ethanol. **Neuropharmacology**, v. 63, n. 4, p. 613-623, 2012.
- 1741 ROWLAND, Jared A. et al. Changes in nonhuman primate brain function following  
1742 chronic alcohol consumption in previously naïve animals. **Drug and alcohol**  
1743 **dependence**, v. 177, p. 244-248, 2017.  
1744

- 1745 RUSSEL, R. W. EBERT FLATTAU, P. POPE A. M. Neurobehavioral Tests:  
1746 Problems, Potential and Prospects. Behavioral Measures of Neurotoxicity: Report of  
1747 a Symposium. National Academies Press, US. 1990.  
1748
- 1749 SAGLIO, P. et al. Chemobehavioral changes induced by short-term exposures to  
1750 prochloras, nicosulfuron, and carbofuroan in goldfish. **Archives of environmental**  
1751 **contamination and toxicology**, v. 45, n. 4, p. 515-524, 2003.  
1752
- 1753 SCHMITT, Rebecca E. et al. Convergent evidence from humans and *Drosophila*  
1754 *melanogaster* implicates the transcription factor MEF2B/Mef2 in alcohol  
1755 sensitivity. **Alcoholism: Clinical and Experimental Research**, v. 43, n. 9, p. 1872-  
1756 1886, 2019.  
1757
- 1758 SLAWECKI, Craig J.; ROTH, Jennifer; GILDER, Allison. Neurobehavioral profiles  
1759 during the acute phase of ethanol withdrawal in adolescent and adult Sprague-  
1760 Dawley rats. **Behavioural brain research**, v. 170, n. 1, p. 41-51, 2006.  
1761
- 1762 SPENCE, Rowena et al. The behaviour and ecology of the *zebrafish*, *Danio*  
1763 *rerio*. **Biological reviews**, v. 83, n. 1, p. 13-34, 2008.  
1764
- 1765 STEWART, Adam Michael et al. Neurophenotyping of adult *zebrafish* using the  
1766 light/dark box paradigm. **Zebrafish neurobehavioral protocols**. Humana Press, p.  
1767 157-167, 2011.
- 1768 STEWART, Adam Michael et al. Modeling anxiety using adult *zebrafish*: a conceptual  
1769 review. **Neuropharmacology**, v. 62, n. 1, p. 135-143, 2012.  
1770
- 1771 STEWART, Adam Michael et al. The developing utility of *zebrafish* in modeling  
1772 neurobehavioral disorders. **International Journal of Comparative Psychology**, v.  
1773 23, n. 1, 2010.  
1774
- 1775 STEWART, Adam Michael et al. Molecular psychiatry of *zebrafish*. **Molecular**  
1776 **psychiatry**, v. 20, n. 1, p. 2-17, 2015.  
1777
- 1778 STEWART, Adam Michael et al. *Zebrafish* models for translational neuroscience  
1779 research: from tank to bedside. **Trends in neurosciences**, v. 37, n. 5, p. 264-278,  
1780 2014.  
1781
- 1782 TRAN, Steven & GERLAI, Robert. Time-course of behavioural changes induced by  
1783 ethanol in *zebrafish* (*Danio rerio*). **Behavioural brain research**, v. 252, p. 204-213,  
1784 2013.
- 1785 TRAN, Steven et al. Time-dependent interacting effects of caffeine, diazepam, and  
1786 ethanol on *zebrafish* behaviour. **Progress in Neuro-Psychopharmacology and**  
1787 **Biological Psychiatry**, v. 75, p. 16-27, 2017.  
1788
- 1789 VALE, Allister. Ethanol. **Medicine**, v. 35, n. 11, p. 615-616, 2007.  
1790
- 1791 VENGELIENE, V. et al. Neuropharmacology of alcohol addiction. **British journal of**  
1792 **pharmacology**, v. 154, n. 2, p. 299-315, 2008.  
1793

- 1794 VIDRIH, Rajko; HRIBAR, Janez. Mead: the oldest alcoholic beverage. In: **Traditional**  
1795 **foods**. Springer, Boston, MA, 2016. p. 325-338.  
1796
- 1797 VIEIRA, L. R. et al. Acute effects of copper and mercury on the estuarine fish  
1798 *Pomatoschistus microps*: linking biomarkers to behaviour. **Chemosphere**, v. 76, n.  
1799 10, p. 1416-1427, 2009.  
1800
- 1801 VIRKKUNEN, Matti; LINNOILA, Markku. Serotonin in early onset, male alcoholics with  
1802 violent behaviour. **Annals of Medicine**, v. 22, n. 5, p. 327-331, 1990.  
1803
- 1804 WOLF, Andrea et al. A comprehensive behavioral test battery to assess learning and  
1805 memory in 129S6/Tg2576 mice. **PloS one**, v. 11, n. 1, p. e0147733, 2016.