

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FISIOLOGIA E FARMACOLOGIA**

EDUARDA MARIA SILVA DE SOUZA

**ONTOGENIA DO COMPORTAMENTO TIPO-ANSIOSO EM LARVAS DE
ZEBRAFISH (*DANIO RERIO*): avaliação preliminar do paradigma
comportamental do labirinto em cruz com rampa (LCR)**

**BELO HORIZONTE
2025**

EDUARDA MARIA SILVA DE SOUZA

**ONTOGENIA DO COMPORTAMENTO TIPO-ANSIOSO EM LARVAS DE
ZEBRAFISH (*DANIO RERIO*): avaliação preliminar do paradigma
comportamental do labirinto em cruz com rampa (LCR)**

Dissertação apresentada ao programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas: Fisiologia e Farmacologia, do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Fisiologia.

Orientador: Bruno Rezende de Souza

Belo Horizonte
2025

043

Souza, Eduarda Maria Silva De.

Ontogenia do comportamento tipo-ansioso em larvas de zebrafish (*Danio rerio*): avaliação preliminar do paradigma comportamental do labirinto em cruz com rampa (LCR) [manuscrito] / Eduarda Maria Silva De Souza. – 2025.

91 f. : il. ; 29,5 cm.

Orientador: Bruno Rezende de Souza.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Fisiologia e Farmacologia.

1. Fisiologia. 2. Ansiedade. 3. Comportamento. 4. Teste de Labirinto em Cruz Elevado. 5. Peixe-Zebra. I. Souza, Bruno Rezende de. II. Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências Biológicas. III. Título.

CDU: 612



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

ICB - COLEGIADO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FISIOLOGIA E FARMACOLOGIA - SECRETARIA

FOLHA DE APROVAÇÃO

**"ONTOGENIA DO COMPORTAMENTO TIPO-ANSIOSO EM LARVAS DE ZEBRAFISH (DANIO RERIO):
AVALIAÇÃO PRELIMINAR DO PARADIGMA COMPORTAMENTAL DO LABIRINTO EM CRUZ COM RAMPA
(LCR)"**

**ESTUDANTE: EDUARDA MARIA SILVA DE SOUZA
ORIENTADOR: BRUNO REZENDE DE SOUZA**

Dissertação de Mestrado defendida e aprovada, no dia **25 de junho de 2025**, pela Banca Examinadora constituída pelos seguintes professores:

PROF. DR. THEO ROLLA PAULA MOTA - ICB/UFMG

PROF. DR. VICTOR RODRIGUES SANTOS - ICB/UFMG

PROF. DR. BRUNO REZENDE DE SOUZA – ORIENTADOR - ICB/UFMG

Belo Horizonte, 25 de junho de 2025



Documento assinado eletronicamente por **Victor Rodrigues Santos, Professor(a)**, em 04/07/2025, às 17:22, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Bruno Rezende de Souza, Professor do Magistério Superior**, em 07/07/2025, às 14:56, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Theo Rolla Paula Mota, Professor do Magistério Superior**, em 11/08/2025, às 07:48, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.ufmg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **4350703** e o código CRC **90969F60**.

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar, agradeço aos meus pais, Tânia e Domingos, por sempre estarem junto comigo, por todas as conversas, incentivos e companhia madrugadas a fora. Obrigada por sempre fazerem o que podem para me ajudar e me darem suporte para que eu possa seguir meus sonhos. Sem vocês, nada disso seria possível.

Ao meu orientador, Bruno, pela oportunidade de integrar a equipe do NeuroDEv, apoio, confiança e ricas discussões durante todo o desenvolvimento deste trabalho. Obrigada pelas conversas, ideias, dedicação e paciência, que foram fundamentais para a conclusão desta etapa.

Ao Matheus pelas conversas e por todo o trabalho com a análise dos vídeos de comportamento e à Bia por ter me acompanhado no início e me apresentado a rotina de trabalho e cuidados com o Zebrafish.

À Anna e Nathy, por todo o apoio, amizade, desabafos e noites em claro. É difícil expressar o quanto sou grata por poder contar com vocês. Devo muito a vocês não só por esse trabalho. Vocês são chuva de bençãos na minha vida.

À Mary, Gustavo e Ana Clara, por serem meus companheiros no trabalho com o zebrafish, pelas discussões, pelo apoio no trabalho, mas principalmente emocional. Obrigada por fazerem a rotina de trabalho mais divertida e suportável.

Aos meus colegas laboratório, pelas trocas acadêmicas ricas, pelo acolhimento, coletividade e pelas discussões que contribuíram para a construção deste estudo. Em especial, agradeço ao professor André, pelas conversas, orientações e amizade. À Laila, pelo acolhimento, inspiração e exemplo. À Bruna pelo suporte, amizade, excelentes interpretações musicais, desabafos e risadas. Ao João pelas piadas de qualidade questionável, observações dispensáveis, companhia, ajuda e suprimento de café. Ao Caião pelas ótimas conversas, reviews de livros e filmes, e companhia nos “corres”. À Luiza pelas trocas, conversas e reflexões. À Isadora pelo carinho, risadas e histórias inéditas. À Ana Luiza por me ajudar tanto academicamente como no meu desenvolvimento e aceitação pessoal, por sempre me trazer conforto e me mostrar que é sempre tempo de recomeçar.

Aos funcionários, principalmente os técnicos, pessoal da secretaria e da limpeza por contribuírem para que não só esse trabalho, mas toda a pesquisa do instituto seja possível. Em especial, agradeço ao Alexander pela paciência, suporte, inúmeras explicações e por ser sempre tão solícito. Às agências de fomento Capes, CNPq e Fapemig, pelo suporte financeiro que tornou possível a realização desta pesquisa.

Aos professores do programa de pós-graduação em Fisiologia e Farmacologia, por contribuírem, cada um a sua maneira, para a minha formação e realização da pesquisa. Aos professores Victor Santos e Theo Mota, por aceitarem compor a minha banca avaliadora, contribuindo para o aprimoramento deste trabalho.

Aos meus grandes amigos Debora, Guilherme e Obiwan. O que quer que eu diga sobre vocês jamais será suficiente para expressar a importância que vocês têm na minha vida. Cada conquista minha só é possível porque vocês existem. Esse trabalho existe porque vocês estiveram comigo em cada passo.

À Carol, por ser, além de amiga, um grande exemplo e inspiração. Obrigada por todo o carinho, amor e apoio no meu caminho como pessoa física, jurídica e científica. À Kessia, por ser meu porto seguro e estar comigo nas minhas conquistas e dificuldades. À Tate que mesmo longe fisicamente, está sempre comigo. Ao Gabriel, pelas horas e horas de estudo, companhia durante a escrita e conversas. À Isa, pela amizade, companheirismo, entretenimento e momentos únicos. À Maria Júlia, pela amizade, risadas, danças, mas principalmente por ter me possibilitado conhecer e conviver com Hugo e Thor, meus companheiros nas horas de estudo.

Ao Dexter e ao Bruninho, por cada um do seu jeitinho único, me ensinarem tanto sobre a vida, sobre amor e serem meus grandes companheiros de estudo e escrita.

Enfim, agradeço a todos que, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização deste trabalho e seguem comigo nessa caminhada. Cada gesto de ajuda, por menor que pareça, fez diferença nessa trajetória.

Obrigada.

"São as nossas escolhas que revelam quem realmente somos, muito mais do que as
nossas habilidades."
— Alvo Dumbledore, Harry Potter e a Câmara Secreta (J.K. Rowling)

RESUMO

Desde os organismos mais simples até os mais complexos, a capacidade de evitar estímulos aversivos é essencial para a sobrevivência. Aproximar-se de situações desejáveis e evitar as ameaçadoras são tarefas fundamentais, observáveis tanto em respostas comportamentais quanto em alterações bioquímicas. O comportamento de evitação pode estar relacionado a perigos iminentes ou à antecipação de eventos futuros com base em pistas específicas. Entretanto, essas respostas nem sempre estão associadas à homeostase natural, podendo refletir processos patológicos. Os transtornos de ansiedade representam um desafio global de saúde pública, afetando aproximadamente um terço da população mundial - com o Brasil apresentando a maior prevalência. Embora fatores genéticos e hereditários contribuam para esses transtornos, variáveis ambientais desempenham papel predominante, destacando a necessidade de compreender suas origens neurobiológicas e respostas fisiológicas. Este estudo investigou a ontogenia do comportamento tipo-ansioso em larvas de zebrafish utilizando o Labirinto em Cruz com Rampa (LCR). Padronizamos parâmetros como altura da coluna d'água (1,3 cm para 5 dpf; 1,5 cm para 14/21 dpf) e duração do teste (6 min), demonstrando que larvas mais velhas exibem maior evitação de áreas elevadas, sugerindo maturação progressiva de circuitos neurais relacionados à ansiedade. Adaptado do labirinto em cruz elevado para roedores, o LCR cria um conflito baseado na profundidade da coluna d'água, análogo aos paradigmas clássicos de ansiedade. As larvas foram testadas no LCR e no teste claro/escuro (CE) em diferentes alturas (1,1 cm, 1,3 cm e 1,5 cm) e estágios de desenvolvimento (5, 14 e 21 dias pós-fertilização). Os resultados revelaram que a altura da água influenciou significativamente o comportamento exploratório, sendo 1,3 cm ideal para larvas de 5 dpf, e 1,5 cm para larvas de 14 e 21 dpf. Esses achados indicam que larvas de zebrafish exibem comportamentos tipo-ansiosos qualitativamente distintos em diferentes fases do desenvolvimento, e o LCR é uma ferramenta sensível para detectar tais comportamentos, avançando a neurociência comportamental. Além de investigar a ontogenia das respostas tipo-ansiosas, a validação completa do LCR poderá permitir sua aplicação em triagens farmacológicas e estudos genéticos voltados à compreensão dos transtornos de ansiedade. Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética (CEUA, protocolo 192/2023) e contou com apoio da Capes, CNPq e Fapemig.

Palavras-chave: Ansiedade. Comportamento. Labirinto em Cruz com Rampa. Larva. Zebrafish.

ABSTRACT

From the simplest to the most complex organisms, the ability to avoid aversive stimuli is essential for survival. Approach toward desirable situations and avoidance of threatening ones are fundamental tasks, observable in both behavioral responses and biochemical alterations. Avoidance behavior may be linked to imminent danger or anticipation of future events based on specific cues. However, these responses are not always associated with natural homeostasis and may reflect pathological processes. Anxiety disorders represent a global public health challenge, affecting approximately one-third of the world's population—with Brazil showing the highest prevalence. While genetic and hereditary factors contribute to these disorders, environmental variables play a predominant role, underscoring the need to understand their neurobiological origins and physiological responses. This study investigated the ontogeny of anxiety-like behavior in zebrafish larvae using the Ramped Cross Maze (RCM). We standardized parameters such as water height (1.3 cm for 5 dpf; 1.5 cm for 14/21 dpf) and test duration (6 min), demonstrating that older larvae exhibit increased avoidance of elevated areas, suggesting progressive maturation of neural circuits related to anxiety. Adapted from the rodent elevated plus maze, the ECM creates a conflict based on water column depth, analogous to classical anxiety paradigms. Larvae were tested in the RCM and light/dark test (LD) at different water heights (1.1 cm, 1.3 cm, and 1.5 cm) and developmental stages (5, 14, and 21 days post-fertilization). Results revealed that water height significantly influenced exploratory behavior, with 1.3 cm being optimal for 5 dpf larvae, and 1.5 cm for 14 and 21 dpf larvae. These findings indicate that zebrafish larvae display qualitatively distinct anxiety-like behaviors across developmental stages, and the RCM is a sensitive tool to detect such behaviors, advancing behavioral neuroscience. Beyond investigating the ontogeny of anxiety-like responses, full validation of the RCM could enable its application in pharmacological screenings and genetic studies aimed at understanding anxiety disorders. This study was approved by the Ethics Committee (CEUA, protocol 192/2023) and supported by Capes, CNPq, and Fapemig.

Keywords: Anxiety. Behavior. Ramped Plus Maze. Larvae. Zebrafish.

SUMÁRIO

1.Introdução	8
1.1. Transtornos de ansiedade	9
1.2. Neurobiologia da Fisiologia e dos Transtornos de Ansiedade	11
1.3. Modelos animais e testes utilizados em pesquisas comportamentais	14
1.4. Zebrafish (<i>Danio rerio</i>) como organismo modelo em pesquisas em neurociência	17
1.5. Ferramentas e paradigmas comportamentais utilizados em zebrafish	22
1.5.1. Teste de Campo Aberto (CA)	22
1.5.2 Teste de Claro/Escuro (CE)	24
1.5.3 Labirinto em Cruz com Rampa (LCR)	25
2.Justificativa e Hipótese	27
3.Objetivos	29
3.1. Objetivos Específicos	29
4.Materiais e Métodos	29
4.1. Animais	29
4.2. Aparatos dos testes comportamentais	30
4.2.1. Labirinto em Cruz com Rampa adaptado para larvas	30
4.2.2. Claro/Escuro adaptado para larvas	31
4.3. Desenho Experimental	32
4.3.1. Teste LCR	33
4.3.2. Teste CE	33
4.4. Análise dos vídeos comportamentais	34
4.5. Análises Estatísticas	35
5.Resultados	35
5.1. A altura da coluna d'água influencia no comportamento da larva no teste LCR de forma distinta em diferentes idades	35
5.1.1. Larvas 5 dpf: a melhor altura para detectar o comportamento tipo-ansioso é 1.3cm	35
5.1.2. Larvas 14 dpf: a melhor altura para detectar o comportamento tipo-ansioso é 1.5 cm	44
5.1.3. Larvas 21 dpf: a melhor altura para detectar o comportamento tipo-ansioso é 1.5 cm	53
5.2. Larvas de 5 e 21 dpf evitam região escura no teste Claro/Escuro	64
6. Discussão	65
7.Conclusão	70
8.Referências	70

1.Introdução

Dos seres mais simples até os organismos mais complexos, a evitação de situações e estímulos aversivos é uma habilidade crucial para a sobrevivência. Aproximar-se de situações desejáveis e evitar situações indesejáveis são tarefas fundamentais e essa capacidade pode ser observada em respostas comportamentais com alterações fisiológicas e bioquímicas (Paisios et al., 2022). Estudos realizados no campo da neurociência buscam descrever e compreender a natureza de comportamentos que sistematicamente replicam um padrão de evitação de estímulos considerados aversivos em diferentes espécies, incluindo organismos unicelulares (Stein&Bouwer, 1997). Esse comportamento de evitação pode estar associado a um perigo iminente, ou pode ser a antecipação de algo que pode ou não acontecer no futuro e foi prevista a partir de algum estímulo.

É comum que na literatura encontremos ansiedade e medo sendo estudados como fenômenos distintos, mas com muitos pontos de sobreposição. O medo normalmente se manifesta em resposta a um objeto ou situação específicos, engatilhado por uma ameaça iminente percebida, enquanto a ansiedade representa uma resposta de medo generalizada em relação a ameaças antecipadas (Rodrigues-Ribeiro, 2024). Hofer definiu ansiedade sob uma perspectiva evolucionista como “estado comportamental que ocorre em resposta a sinais de perigo, implicando um conjunto especial de tendências de resposta que resultam em evitação de perigos similares durante eventos no desenvolvimento do organismo e na evolução da espécie” (Hofer, 1995; Stein&Bouwer, 1997). Essa definição destaca a relação entre ansiedade e a evolução, mostrando como esse comportamento pode se adaptar ao longo do tempo e está intimamente relacionado à capacidade de sobrevivência não só do indivíduo, como também à perpetuação da espécie.

O principal substrato neural tanto do medo quanto da ansiedade é representado por um circuito integrado no cérebro que comanda comportamentos defensivos e elabora estados emocionais e motivacionais aversivos (Graeff et. al, 1993). Essa sobreposição pode ser mais bem entendida ao observarmos os mecanismos envolvidos que são comuns a ambos os estados. Anatomicamente, algumas regiões cerebrais estão intimamente relacionadas à mediação de comportamentos defensivos, como a Amígdala, Hipotálamo e a Substância Cinzenta Periaquedutal (PAG). Foi

demonstrado que a estimulação dessas áreas, seja ela elétrica ou química, é capaz de induzir comportamentos tipo-defensivos, além de respostas comportamentais e subjetivas que indicam que o organismo está vivenciando uma experiência aversiva (Graeff et. al, 1993). Essas áreas estão, portanto, diretamente envolvidas na percepção e na reação a ameaças, sejam elas imediatas ou antecipadas.

Entretanto, nem sempre essas respostas estão associadas a um balanço homeostático típico, podendo estar associadas a um processo patológico. Os transtornos de humor, entre os quais os transtornos de ansiedade estão inseridos, são uma das principais causas de incapacidade em todo o mundo. Os transtornos de ansiedade são caracterizados principalmente por medo excessivo e persistente, ansiedade e/ou evitação de ameaças percebidas no ambiente externo, como em situações sociais, e interno, como sensações corporais (Craske, 2017). De acordo com o *Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders* (DSM-5), o diagnóstico diferencial para transtornos de ansiedade envolve a experiência de medo e/ou ansiedade desproporcionais que persistem ao longo do tempo, resultando em prejuízos significativos em áreas importantes do funcionamento diário, como nas áreas social e ocupacional. Além disso, os sintomas podem incluir inquietação, fadiga, dificuldade de concentração, irritabilidade, perturbações do sono, e tensão muscular.

Apesar de décadas de estudo, ainda há uma lacuna significativa na identificação de novos tratamentos e intervenções eficazes (Bliss-Moreau, 2021). Dada a complexidade dos transtornos de ansiedade e seu impacto abrangente na vida dos indivíduos, é fundamental compreender não apenas os aspectos clínicos desses distúrbios, mas também suas bases neurobiológicas e desenvolvimentais. Um entendimento mais profundo dos mecanismos cerebrais subjacentes e dos fatores que influenciam o desenvolvimento desses transtornos pode abrir caminhos para tratamentos mais eficazes e abordagens preventivas, além de contribuir para a redução do estigma associado a essas condições.

1.1. Transtornos de ansiedade

Os transtornos de ansiedade são um problema mundial, impactando cerca de 33,7% das pessoas de todas as idades, sendo o Brasil o líder mundial no que diz respeito à porcentagem da população que possui algum tipo de transtorno de ansiedade (War, 2022). Além disso, são relacionados a cerca de 6,1% de todos os suicídios (Bertolote & Fleischmann, 2002).

Existe um espectro de transtornos de ansiedade, que compreende um grupo de transtornos composto por Transtorno de Ansiedade de Separação, Mutismo Seletivo, fobias específicas, Transtorno de Ansiedade Social (TAS), Transtorno de Pânico, Agorafobia e Transtorno de Ansiedade Generalizada (TAG) (Craske, 2017). Assim, é importante desenvolver estratégias para compreender circuitos e vias neurais da ansiedade, tendo em vista as diferentes características de cada transtorno e os diferentes estímulos que podem estar associados a essas respostas de ansiedade.

As origens neurobiológicas e as respostas fisiológicas associadas à manifestação dessas condições ainda precisam ser mais bem elucidadas, considerando que, apesar de herdáveis e de fatores genéticos desempenharem um papel, as variáveis ambientais influenciam a maior parte no que diz respeito ao risco de se desenvolver esses transtornos (Kessler et. Al., 2005).

Os transtornos de ansiedade manifestam-se de formas heterogêneas, cada um com características únicas que demandam abordagens diferenciadas. No Transtorno de Ansiedade de Separação, existe um medo excessivo da perda dos cuidadores (Castillo et al, 2000; Angelosante et al, 2013; Gesi et al, 2016), no Mutismo Seletivo há inibição da fala (Muris et al, 2021; Moldan, 2005; Giddan et al, 1997), enquanto as fobias específicas desencadeiam reações fisiológicas intensas diante de estímulos pontuais (Castillo et al, 2000; Burkauskas et al, 2024; Davey, 2004; Grös&Martin, 2006). Já o TAS e a Agorafobia envolvem esquiva de contextos interpessoais (Anastassiou-Hadjicharalambous et al, 2015; Cremers&Roelofs, 2016) ou públicos (Koch et al, 2018; Craske&Simos, 2013; Dias&Thuret, 2016), respectivamente, e o Transtorno de Pânico destaca-se por crises agudas de medo desencadeadas sem aviso (Koch et al, 2018; Gorbis&Jajoo,2024; Moraes et al, 2024; Dias&Thuret, 2016). Em condições como o Transtorno Obsessivo-Compulsivo (TOC) e o TAG, os sintomas – sejam compulsões ritualizadas (Chasson&Wihelm, 2010; Subramaniam et al, 2012; Rauch&Carlezon, 2013; Osman, 2024) ou preocupações difusas (Castillo et al, 2000; Portman et al, 2012; Allgulander, 2012; Erazo, et al, 2018; Llera&Newman, 2015) – refletem mecanismos psicológicos e neurobiológicos distintos. Essa complexidade realça a necessidade de modelos de pesquisa específicos para cada transtorno, capazes de capturar desde bases genéticas até respostas comportamentais, evitando generalizações e permitindo intervenções personalizadas.

Após explorar as diversas manifestações e especificidades dos transtornos de ansiedade, fica evidente que os reduzir a meras classificações pode ofuscar a complexidade dos fatores, tanto intra quanto interpessoais, que influenciam sua etiologia e fisiologia (Rodrigues-Ribeiro et. Al., 2024; Fried, 2022). Nesse sentido, considerando não apenas a pluralidade de apresentações clínicas, mas também a necessidade de avançarmos no entendimento das possíveis causas desses e de outros transtornos neuropsiquiátricos – aspecto crucial para o desenvolvimento de terapias farmacológicas e não farmacológicas de primeira linha –, enfatizamos que é fundamental aprofundar nossa compreensão da ontogenia do comportamento ansioso.

1.2. Neurobiologia da Fisiologia e dos Transtornos de Ansiedade

Como vimos, os sintomas presentes em diversos transtornos muitas vezes são compartilhados e que um mesmo transtorno pode manifestar diferentes grupos de características, que não estão necessariamente presentes em todos os indivíduos com a mesma condição (Adam, 2013). Diversas regiões do cérebro estão envolvidas na modulação e expressão da ansiedade, incluindo a amígdala, o núcleo da estria terminal (BNST), o córtex pré-frontal medial (CPFm), a área tegmental ventral (VTA), o hipocampo ventral, o hipotálamo e a PAG (Graeff et. al, 1993; Chen, 2023). Segundo Liu e colaboradores (2024), as pesquisas nessa área têm se concentrado em avanços terapêuticos — como tratamentos baseados em farmacoterapia, psicoterapia e intervenções digitais — e na investigação dos mecanismos subjacentes, com ênfase nas bases neurobiológicas e genéticas, além da análise da influência de fatores sociais e ambientais no surgimento desses transtornos. As comunicações entre essas regiões são moduladas por circuitos neurais, que determinam quando o ambiente externo é percebido como ameaçador (Chen, 2023). Estruturas interconectadas influenciam-se mutuamente, formando circuitos neurais complexos que regulam comportamentos emocionais (Liu et al, 2024).

O processo de regulação da ansiedade pelo sistema nervoso pode ser dividido em etapas sequenciais: detecção, integração, avaliação e ativação de respostas (Fig. 1). A detecção de estímulos sensoriais é realizada pelo hipotálamo, córtex sensorial e colículos superior e inferior. A interpretação desses estímulos é mediada por estruturas como BNST, a amígdala basolateral, núcleos central, lateral e medial da amígdala e o hipocampo ventral. A VTA atua como o principal centro de avaliação,

sendo modulada por projeções do BNST e da amígdala basolateral, além de receber influências excitatórias e inibitórias do hipotálamo lateral. Por fim, a VTA projeta-se para o CPFm e o núcleo accumbens, estruturas que coordenam uma série de respostas fisiológicas e comportamentais associadas à ansiedade, como taquicardia, imobilidade e aumento da frequência respiratória (Adhikari et al, 2015; Chen, 2023).

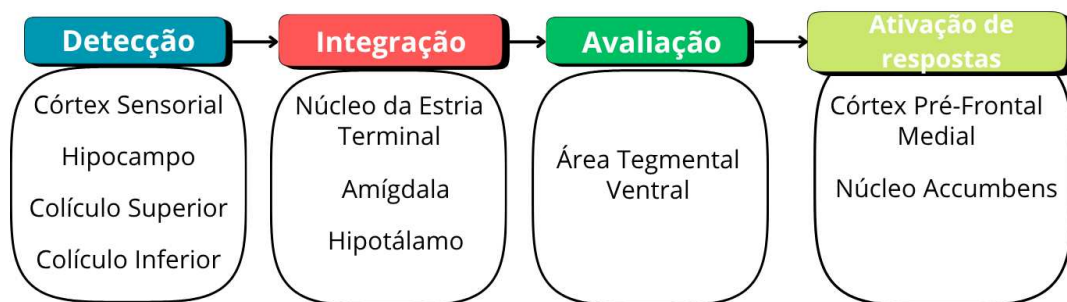


Figura 1. Processo de regulação da ansiedade pelo sistema nervoso.

Dadas suas conexões e atividade, a amígdala se destaca como uma das regiões chave envolvidas no medo e na ansiedade, funcionando como o centro de convergência na regulação da ansiedade. A ativação de projeções da amígdala basolateral para os núcleos centrais da amígdala resulta em alívio da ansiedade, enquanto sua inibição promove o oposto. Além disso, a ativação de inputs entre amígdala basolateral e hipocampo ventral produz efeitos ansiogênicos e sua inibição tem o efeito oposto (Felix-Ortiz, 2016).

O eixo Hipotálamo-Pituitária-Adrenal (HPA) também se destaca por ser ativado em resposta ao estresse, levando à secreção do hormônio liberador de corticotrofina (CRH). Esse hormônio estimula as células corticotróficas da pituitária a liberarem o hormônio adrenocorticotrófico (ACTH), que, por sua vez, estimula as glândulas adrenais a produzirem e liberarem o cortisol no sangue (Tan et al, 2022). A depressão e a ansiedade, entre outros transtornos de saúde mental, têm sido associadas a anomalias no eixo HPA e à desregulação de cortisol (Munshi et al, 2020).

Além disso, como mencionado por van der Poll et al. (2023), a região BNST, parte da amígdala estendida, é considerada envolvida na manutenção de informações em tempo real sobre humor, excitação, valência hedônica e estímulos sensoriais. Essa função é possibilitada pelas suas conectividades que moldam e regulam comportamentos motivados e relacionados ao estresse e à ansiedade, ao comportamento social, além de monitorarem ameaças sustentadas e regularem o comportamento de evitação. Estudos já demonstraram que essa região tem um papel

em uma série de transtornos psiquiátricos, incluindo transtorno de estresse pós-traumático (Ahearn et al., 2007), TAG (Buff et al., 2017), TAS (Clauss et al., 2019) e vícios (Feola et al., 2023).

A influência de alguns neurotransmissores nesse contexto também já foi identificada. Neurônios dopaminérgicos da VTA controlam respostas comportamentais do tipo ansioso, uma vez que desempenham um papel fundamental no processamento de recompensas e no efeito de reforço, além de auxiliar na aprendizagem de comportamentos adaptativos para lidar melhor com ambientes de estresse agudo e crônico (Morel et al, 2022). A hiperatividade desses neurônios por estresse crônico está envolvida em comportamentos tipo-ansiosos em ambientes ansiogênicos. O BNST modula tanto o medo quanto a ansiedade, e os aferentes de sua porção anteromedial podem ativar os neurônios dopaminérgicos da VTA (Qi, 2022).

Os circuitos dos neurônios GABAérgicos também têm se mostrado fundamentais no estudo da depressão e da ansiedade. Os neurônios dopaminérgicos e os neurônios GABAérgicos da VTA coregulam a aprendizagem relacionada à recompensa e à aversão. Esses neurônios GABAérgicos estão localmente conectados aos neurônios dopaminérgicos e enviam projeções de longo alcance para regiões cerebrais inervadas por esses neurônios, como o núcleo accumbens (Kallueff & Nutt, 2007).

Os neurônios serotoninérgicos também desempenham um papel crucial na modulação de diversas funções, incluindo humor, percepção, apetite, agressividade, ansiedade e processamento de recompensas (Abela et al, 2020; Cohen et al, 2015). A ativação serotoninérgica no núcleo da rafe mediana está associada ao aumento de comportamentos do tipo ansioso, enquanto a ativação no núcleo da rafe dorsal apresenta efeitos antidepressivos (Ohmura et al, 2020). Diferentes projeções serotoninérgicas para regiões como o hipocampo ventral, a VTA/substância negra e os núcleos subtalâmico/parassubtalâmico, desempenham papéis distintos na regulação da ansiedade, nos efeitos antidepressivos e no controle da impulsividade, respectivamente (Barnabe et al, 2024).

Além do papel dos circuitos e neurotransmissores descritos na fisiologia da ansiedade, vários fármacos que atuam nesses circuitos fisiológicos foram desenvolvidos para auxiliar no tratamento de transtornos neuropsiquiátricos (Griessner et al, 2021). A investigação dos níveis de monoaminas em diferentes regiões cerebrais foi essencial para a compreensão dos mecanismos envolvidos na ação desses fármacos e têm sido

os principais alvos nos tratamentos de transtornos de saúde mental (Tseilikman, 2024; Yuen et al, 2014).

Portanto, a neurobiologia dos comportamentos tipo-ansiosos revela uma complexa rede de interações entre estruturas cerebrais e neurotransmissores. O futuro da pesquisa nessa área promete avanços significativos que poderão transformar a forma como compreendemos e tratamos os transtornos de saúde mental, oferecendo esperança para milhões de pessoas que enfrentam esses desafios diariamente.

1.3. Modelos animais e testes utilizados em pesquisas comportamentais

A heurística do modelo comportamental de animais não-humanos tem ocupado um papel muito importante no que diz respeito às suas aplicações terapêuticas e como instrumento para elucidar as bases biológicas dos transtornos psiquiátricos (Maximino, 2011). No contexto dos transtornos de ansiedade, esses modelos são particularmente relevantes, pois permitem investigar a etiologia, a neurobiologia e potenciais tratamentos. No entanto, a heterogeneidade desses transtornos, combinada com critérios diagnósticos multifatoriais e complexos, impõe desafios significativos tanto para o desenvolvimento de modelos animais para transtornos neuropsiquiátricos quanto para a pesquisa clínica (Cryan & Sweeney, 2011).

Nos últimos anos, houve um crescimento expressivo no número de modelos e de testes comportamentais, com esforços concentrados na criação de paradigmas que induzam estados de hiperansiedade em animais, análogos aos observados em pacientes humanos (Cryan & Sweeney, 2011). Para que um modelo animal seja considerado eficaz, é fundamental que ele se baseie em uma compreensão sólida das manifestações etológicas da ansiedade em seres humanos. Além disso, a conservação de características genéticas, neuroquímicas e neuroanatômicas entre espécies, bem como a preservação de respostas comportamentais e farmacológicas, reforçam a validade translacional desses modelos. O estudo dos determinantes neurais e genéticos do comportamento animal oferece, assim, uma base robusta para inferir mecanismos subjacentes ao comportamento humano, tanto em condições saudáveis quanto patológicas (Bourin, 2020).

Para serem validados, os modelos animais devem atender a critérios rigorosos. Eles precisam apresentar uma correspondência clínica ou sintomatológica com o distúrbio humano, induzir alterações comportamentais mensuráveis e objetivas, demonstrar

sensibilidade a tratamentos clínicos comprovados e garantir reprodutibilidade entre diferentes pesquisadores (Cryan & Sweeney, 2011). Esses requisitos são essenciais para assegurar que os modelos sejam confiáveis e úteis no avanço do conhecimento científico e no desenvolvimento de novas abordagens terapêuticas.

A relevância clínica de modelos animais e testes comportamentais é avaliada com base em diferentes tipos de validade, tais como validade de face (manifestação de sintomas semelhantes à condição clínica), validade de construto (biologia subjacente semelhante), validade preditiva (resposta a agentes terapêuticos clinicamente eficazes), validade etiológica (induzida por estímulos semelhantes aos da condição clínica), validade convergente (medidas convergentes com outros modelos baseados em construtos) e validade divergente (medidas divergentes de outros modelos baseados em construtos) (Cryan & Sweeney, 2011) (Tabela I). Entre esses, a validade de construto destaca-se como um conceito central, referindo-se, em modelos animais, à capacidade de induzir sintomas que representem adequadamente a condição estudada e, em testes comportamentais, à eficácia do teste em mensurar de forma precisa o construto comportamental almejado. No entanto, ressalta-se que a confiabilidade e a validade preditiva são consideradas os critérios mais importantes para determinar a validade geral do sistema (Gencturk & Unal, 2024).

Estudos paramétricos ajudam a garantir e aumentar a validade dos modelos, na medida em que identificam quais parâmetros são relevantes na produção dos comportamentos ansiosos (Mendes da Motta, 2020). Em um estudo paramétrico, um ou dois valores dos parâmetros são alterados, enquanto os outros são mantidos constantes (Ang et al., 2011). Ao fazer isso, o impacto de um parâmetro ou de uma combinação de parâmetros nos objetivos do projeto pode ser avaliado.

Devido a razões práticas, como seu tamanho e facilidade para intervenções cirúrgicas, além da sua capacidade cognitiva e desempenho aprimorado em tarefas operantes e cognitivas, ratos e camundongos têm sido a espécie escolhida tradicionalmente para

Tabela I: Tipos de Validade em Modelos Animais e Testes Comportamentais

Tipo de Validade	Definição	Exemplo Prático
Validade de Face	O modelo apresenta sintomas observáveis semelhantes aos da condição humana.	Comportamento de evitação similar à ansiedade em humanos.
Validade de Construto	O modelo compartilha mecanismos biológicos subjacentes com a condição humana.	Sistema dopaminérgico homólogo ao humano, com neurônios em regiões equivalentes.
Validade Preditiva	O modelo responde a tratamentos eficazes em humanos.	Um ansiolítico (ex.: diazepam) reduz comportamento tipo-ansioso.
Validade Etiológica	A condição é induzida por fatores causais semelhantes aos humanos.	Estresse crônico imprevisível induzindo sintomas depressivos.
Validade Convergente	O modelo apresenta correlação com outros modelos baseados no mesmo construto.	Resultados similares no teste claro/escuro e labirinto em cruz com rampa.
Validade Divergente	O modelo difere de outros modelos com construtos distintos.	Um teste de ansiedade (ex.: labirinto em cruz elevado) não mostra alterações em modelos de dor crônica.

Fonte: Adaptado de Cryan & Sweeney (2011).

estudos de farmacologia comportamental. Muitos paradigmas comportamentais amplamente utilizados foram originalmente desenvolvidos e validados em roedores como testes de atividade ansiolítica, antes de serem adaptados para outras espécies (Cryan & Sweeney, 2011).

O teste Claro/Escuro (CE) é um teste de comportamento ansioso baseado no número de transições do roedor entre dois compartimentos: um escuro e outro claro. No aparato, 1/3 corresponde ao lado escuro e 2/3 claro. Os roedores têm que escolher entre sua aversão natural à luz e seu desejo de explorar um novo ambiente. Animais com comportamento tipo-ansioso tendem a passar mais tempo no lado escuro da

caixa, exibindo pouca ou nenhuma locomoção devido a um comportamento exploratório reduzido (Bourin, 2020; Rodrigues-Ribeiro et al, 2024). Já o Labirinto em Cruz Elevado (LCE) é um teste que induz um conflito de aproximação/evitação para avaliar respostas semelhantes à ansiedade em roedores composto por uma plataforma em cruz elevada. O aparato consiste em dois braços abertos (considerados mais aversivos) e dois braços fechados (considerados menos aversivos) cruzados no meio, perpendicularmente um ao outro, e elevados a uma certa altura acima do chão. O aumento do número de

entradas e/ou do tempo nos braços abertos é entendido como comportamento tipo-ansioso reduzido. Esse modelo, assim como o teste CE, induz mudanças comportamentais e fisiológicas que refletem ansiedade. A administração de benzodiazepínicos resulta em aumento da locomoção nos compartimentos 'estressantes' sem alterar o comportamento nos compartimentos 'seguros'. É um teste sensível a diversos compostos ansiolíticos ou ansiogênicos e preditivo da atividade de medicamentos usados na ansiedade generalizada (Moraes et al., 2024; Bourin, 2020).

Outro teste comumente utilizado para avaliação de comportamento tipo ansioso é o teste de Campo Aberto (CA). Esse teste avalia a atividade locomotora espontânea em um novo ambiente e a diminuição do tempo no centro do campo aberto pode ser utilizada para avaliar comportamentos tipo-ansiosos. Nesse aparato, a região central é naturalmente mais aversiva para o animal, por ser uma zona de maior exposição, e ele tende a evitá-la em certo nível. Entretanto, um comportamento onde essa evitação é maior e o indivíduo acaba explorando menos o espaço e ficando mais próximo das paredes, pode ser interpretado como um comportamento tipo-ansioso (Moraes et al., 2024; Rodrigues-Ribeiro, L. et al. 2024).

1.4. Zebrafish (*Danio rerio*) como organismo modelo em pesquisas em neurociência

O zebrafish (*Danio rerio*) é um modelo animal que tem se mostrado útil pesquisa e tem sido amplamente utilizado em estudos de desenvolvimento, genética e comportamento (Egan et al., 2009). A utilidade tanto de larvas quanto de adultos na neurociência tem crescido significativamente nas últimas décadas e possui benefícios consideráveis em comparação com roedores. Entre esses benefícios, destacam-se a tratabilidade genética, tamanho reduzido das larvas e adultos, simples manutenção e

criação, o baixo custo, rápida fertilização e desenvolvimento embrionário, embriões translúcidos e capacidades reprodutivas estáveis em laboratórios controlados (War et al., 2022; Kimmel et al., 1995; Mohamed & Ekker, 2023).

Estudos em neurobiologia comparativa têm o potencial de elucidar aspectos fundamentais do sistema nervoso humano e sua relação com a saúde. A utilização de peixes como modelos de pesquisa permite não apenas avançar na compreensão da neurobiologia dos vertebrados como um todo, mas também explorar as conexões evolutivas que esses organismos compartilham com outras espécies vertebradas (Powers, 1989). O zebrafish exibe comportamentos complexos em todos os domínios comportamentais, além de apresentar fortes similaridades genéticas e fisiológicas com humanos. Trata-se de um vertebrado com alta homologia genética e fisiológica, onde 70% dos genes têm alto grau de homologia com seus equivalentes em mamíferos, e 40% dos genes humanos possuem um análogo direto no zebrafish (War et al., 2022). Essa conservação evolutiva estende-se à organização do Sistema Nervoso Central (SNC), que compartilha padrões neuroanatômicos e circuitos neurais semelhantes aos observados em mamíferos (Kalueff et al., 2014; Fontana, et al., 2018; Khan & Alhewairini, 2018).

O SNC do zebrafish (*Danio rerio*), embora menos complexo que o humano, exibe uma organização filogeneticamente conservada entre vertebrados, com padrões neuroanatômicos comparáveis aos mamíferos (Wullimann et al., 1996; Mueller & Wullimann, 2016) (Tabela II). Em estágios larvais iniciais (3-5 dpf), o encéfalo apresenta regiões anatomicamente definidas (telencéfalo, diencéfalo, mesencéfalo e rombencéfalo), porém com estrutura mais compacta e menos estratificada que em adultos. A diferenciação celular progride significativamente ao longo do desenvolvimento, sendo que em adultos (em torno dos 90 dpf) demonstram nítida organização nuclear e cortical, particularmente no telencéfalo, onde se observam homologias funcionais com os gânglios basais e áreas palliais de mamíferos (Kimmel et al., 1995; Mueller & Wullimann, 2009).

A distribuição dos principais tipos neuronais segue padrões ontogenéticos específicos. Neurônios dopaminérgicos estão presentes desde fases precoces (24 hpf) no diencéfalo ventral (área pré-óptica) e mesencéfalo (tectum óptico), expandindo-se progressivamente para o telencéfalo (área ventral) e hipotálamo em adultos (Rink & Wullimann, 2002; Yamamoto et al., 2010). Já os neurônios serotoninérgicos,

detectáveis a partir de 2 dpf no núcleo do rafe (rombencéfalo), desenvolvem projeções telencefálicas mais robustas na fase adulta (Lillesaar et al., 2009). Os interneurônios GABAérgicos, por sua vez, distribuem-se predominantemente no telencéfalo dorsal nas larvas, com proliferação nos núcleos subtelencefálicos em adultos, refletindo a crescente complexidade dos

circuitos inibitórios (Mueller et al., 2004).

O desenvolvimento glial acompanha essa progressão neuronal. Em larvas, predominam células gliais radiais, essenciais para a migração neuronal e organização inicial dos circuitos. Na fase adulta, observa-se maior diversidade glial, incluindo astrócitos maduros no telencéfalo e oligodendrócitos mielinizantes na medula espinhal, indicando completa maturação do microambiente neural (Grupp et al., 2010; Baumgart et al., 2012). Essa ontogenia celular reflete na funcionalidade dos circuitos, com sistemas neurotransmissores (dopaminérgico, serotoninérgico e GABAérgico) exibindo papéis conservados na modulação de comportamentos complexos, como resposta ao estresse e formação de memórias (Panula et al., 2010; Friedrich et al., 2010).

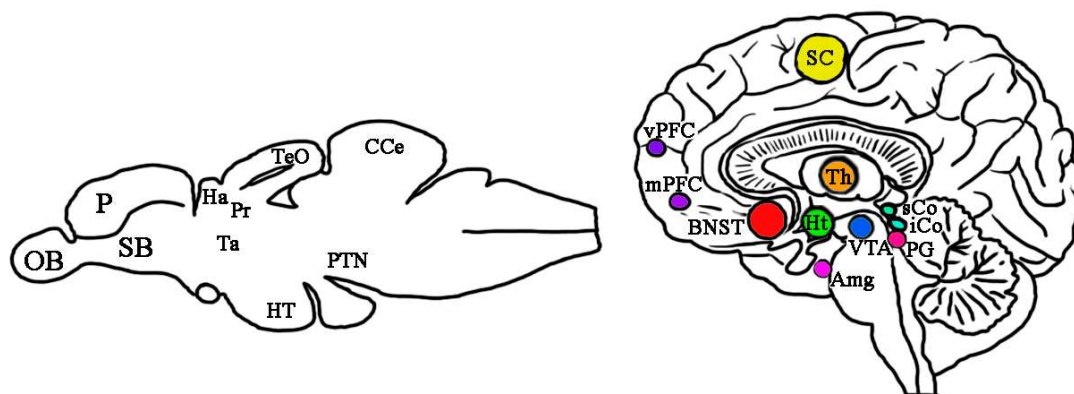


Figura 2. Comparação do (A) cérebro do zebrafish adulto e o (B) cérebro humano em seção sagital representativa. Abreviações: Zebrafish [adaptado de (Souza & Tropepe, 2011)]: OB, bulbo olfatório; P, pallium; SB, subpallium; Ha, habenula; TeO, tectum optico; Pr, pretectum; Ta, tálamo; HT, hipotálamo; PTN, núcleo tuberal posterior; Cce, corpus cerebelli. Humano [adaptado de (Lebow & Chen, 2016)]: SC, córtex sensorial; vPFC, cortex pré-frontal ventral; mPFC, córtex pré-frontal medial; Amg, amígdala; Th, Tálamo; HT, hipotálamo; BNST: núcleo da estria terminal; PG: substância cinzenta periaquedutal; VTA: área tegmental ventral; sCo, colículo superior; iCo, colículo inferior.

Embora zebrafish (*Danio rerio*) e humanos compartilhem a arquitetura neural básica comum aos vertebrados, divergem significativamente em escala, organização e complexidade. O cérebro humano adulto apresenta aproximadamente 86 bilhões de

neurônios organizados em um neocórtex laminado de seis camadas, especializado em funções cognitivas (Herculano-Houzel, 2016). Em contraste, o cérebro do zebrafish adulto contém cerca de 10 milhões de neurônios (Wullimann, 2009) organizados em núcleos compactos, resultado de um processo distinto de desenvolvimento por eversão telencefálica. Este dobramento externo contrasta com a invaginação característica dos mamíferos (Ganz et al., 2014), explicando a ausência de um córtex laminado no zebrafish.

Apesar das diferenças estruturais, o zebrafish apresenta homologias funcionais notáveis com estruturas cerebrais humanas. O pallium dorsolateral corresponde ao hipocampo dos mamíferos, enquanto o núcleo medial do subpallium equivale funcionalmente à amígdala (Portavella et al., 2004; O'Connell & Hofmann, 2011). Estas estruturas conservadas medeiam processos de memória e resposta emocional, demonstrando a manutenção de circuitos neurais fundamentais na evolução dos vertebrados.

Os padrões de neurogênese diferem marcadamente entre as espécies. Em humanos adultos, a produção de novos neurônios restringe-se à zona subventricular e ao giro denteado hipocampal (Lindsey et al., 2012). O zebrafish, por outro lado, mantém múltiplos nichos proliferativos ao longo do SNC, incluindo a zona ventricular do rombencéfalo e a medula espinhal caudal (Kaslin et al., 2017). A nível molecular, eventos de duplicação gênica específicos de cada linhagem resultaram em diferenças significativas. Humanos desenvolveram famílias expandidas de receptores de neurotransmissores, como os cinco subtipos do receptor serotoninérgico 5-HT₇, contra apenas dois no zebrafish (Panula et al., 2010). Contudo, as vias de sinalização downstream mantêm-se extraordinariamente conservadas, particularmente aquelas mediadas por receptores acoplados à proteína G (GPCRs).

O sistema serotoninérgico ilustra esta conservação funcional. Em ambas as espécies, os receptores 5-HT_{1A/1B} modulam respostas ao estresse e ciclos de sono-vigília (Maximino et al., 2010). Similarmente, o sistema dopaminérgico apresenta organização anatômica comparável, com neurônios originários da VTA em humanos e do núcleo posterior do tubérculo (NPTv) em zebrafish (Rink & Wullimann, 2002).

Tabela II - Homologias entre regiões cerebrais de zebrafish e humano associadas à ansiedade

Função / Processo	Zebrafish Larva (≤7 dpf)	Zebrafish Adulto	Cérebro Humano	Conservação Funcional
Modulação Dopaminérgica	Neurônios no diencéfalo ventral (área pré-óptica) e tectum óptico	Expansão para telencéfalo ventral e hipotálamo	Área tegmental ventral (VTA) e substância nigra	Controle de recompensa e respostas ao estresse
Modulação Serotoninérgica	Núcleo do rafe (rombencéfalo); projeções incipientes	Projeções robustas para telencéfalo	Núcleo do rafe (tronco encefálico)	Regulação do humor e ansiedade (via 5-HT)
Circuito GABAérgico	Interneurônios no telencéfalo dorsal	Núcleos subtelencefálicos (ex.: área ventral)	Córtex pré-frontal e amígdala	Inibição de respostas de medo exageradas
Região Homóloga ao Hipocampo	Pallium dorsolateral rudimentar	Pallium dorsolateral desenvolvido	Hipocampo	Memória contextual e extinção do medo
Região Homóloga à Amígdala	Núcleo medial do subpallium	Núcleo medial do subpallium ampliado	Amígdala (núcleo central e basolateral)	Processamento de ameaças e respostas emocionais
Glia	Células gliais radiais (suporte à migração)	Astrócitos maduros e oligodendrócitos	Astrócitos e oligodendrócitos corticais	Modulação da plasticidade sináptica

Fonte: Adaptado de Rink & Wullimann (2002), Yamamoto et al. (2010), O'Connell & Hofmann (2011) e Herculano-Houzel (2016).

Estas células projetam-se para regiões telencefálicas através de vias homologáveis: a via mesolímbica conecta a VTA ao núcleo accumbens em humanos, enquanto no

zebrafish o NPTv projeta-se para a área ventral do telencéfalo (Vv), região funcionalmente equivalente (Norton & Bally-Cuif, 2010).

A conservação molecular estende-se aos componentes fundamentais da neurotransmissão dopaminérgica. Os principais subtipos de receptores (D1-D5) e o transportador de dopamina (DAT) apresentam mais de 75% de identidade na sequência de aminoácidos (Yamamoto et al., 2011). Crucialmente, as vias de sinalização intracelular mantêm-se idênticas: a ativação dos receptores D1 esti-

mula a via cAMP/PKA em ambas as espécies, enquanto os receptores D2 exercem modulação negativa sobre esta cascata por meio da via DARPP32 (Reis et al., 2007; de Souza Lima et al., 2020).

Esta conservação explica a resposta similar a psicofármacos e a validade do zebrafish como modelo para estudos de distúrbios neuropsiquiátricos. Essa similaridade molecular, associada à homologia dos circuitos neurais básicos, consolida o zebrafish como modelo valioso para investigar os mecanismos subjacentes a distúrbios neuropsiquiátricos, desde que se considerem criticamente suas diferenças anatômicas e de escala (Fontana et al., 2018).

1.5. Ferramentas e paradigmas comportamentais utilizados em zebrafish

O estudo do comportamento tipo-ansioso em zebrafish tem se beneficiado de uma variedade de ferramentas e paradigmas comportamentais, cada um com suas bases lógicas e aplicações específicas. Esses testes são projetados para explorar diferentes aspectos da ansiedade, como a evitação de estímulos aversivos, a avaliação de risco e a resposta a conflitos de aproximação-evitação. Como já vimos, a validação de testes comportamentais envolve três aspectos principais: validação de face (se o teste mede o que se propõe a medir), validação de construto (se o teste reflete o conceito teórico subjacente) e validação farmacológica (se o teste é sensível a drogas conhecidas por afetar o comportamento em questão). Entre os testes mais utilizados estão o Teste de Campo Aberto, o Teste de Claro/Escuro e o Labirinto em Cruz com Rampa, todos validados para adultos de zebrafish, mas com adaptações ainda em desenvolvimento para larvas.

1.5.1. Teste de Campo Aberto (CA)

O teste CA consolidou-se como um dos principais paradigmas comportamentais na pesquisa com zebrafish, sendo amplamente empregado em estudos fundamentais

sobre ansiedade (Egan et al., 2009; Levin et al., 2007), mecanismos de estresse (Giacomini et al., 2016), avaliação de neurotoxicidade (Tierney, 2011) e triagem de fármacos psicoativos (Richendrfer et al., 2012). Consiste em um tanque fosco, podendo ser retangular ou circular, onde o animal é posicionado ao centro e seu comportamento é observado durante o tempo do teste. Sua robustez como ferramenta experimental foi demonstrada em adultos através de extensa validação farmacológica. Foi demonstrado que benzodiazepínicos como o diazepam (1-5 mg/L) produzem aumento significativo na exploração do centro e redução da tigmotaxia, enquanto agentes ansiogênicos como pentilenotetrazol (15-20 mM) e cafeína (100 mg/L) diminuem a exploração central em 40-60% (Cachat et al., 2010; Maximino et al., 2010). Além disso, a resposta dose-dependente a antidepressivos inibidores seletivos de recaptação de serotonina (SSRIs) como a fluoxetina (0,1-1 mg/L) reforçou a sensibilidade do teste a diferentes classes de psicofármacos (Wong et al., 2010).

A validação do CA estende-se além dos aspectos farmacológicos, incluindo evidências genéticas e desenvolvimentais. Estudos comparando linhagens de zebrafish revelaram que variedades com alta resposta ao estresse (como a cepa AB) exibem maior tigmotaxia do que linhagens menos reativas (como a TL), indicando uma base genética para esses comportamentos (Gerlai et al., 2009). Complementarmente, modelos genéticos modificados, como peixes knockout para receptores 5-HT_{1A}, apresentam alterações significativas nos padrões de exploração espacial, reforçando a validade do teste (Lau et al., 2011).

Para estudos com larvas, protocolos adaptados do CA foram desenvolvidos e validados em placas de 24 poços (5 cm de diâmetro) (Fig. 3). Esses protocolos demonstram que larvas a partir de 5 dpf respondem de forma dose-dependente a benzodiazepínicos (0,25-2 mg/L) e são sensíveis a agentes ansiogênicos como o pentilenotetrazol (5-10 mM) (Richendrfer & Créton, 2013; Best et al., 2008). Correlações significativas entre os padrões de tigmotaxia em larvas e comportamentos de ansiedade em adultos sugerem que o teste mantém validade preditiva ao longo do desenvolvimento (MacPhail et al., 2009). Essa versatilidade torna o CA uma boa ferramenta para estudos translacionais envolvendo diferentes estágios de desenvolvimento.

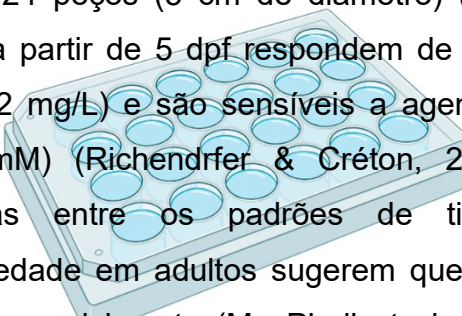


Figura 3. Representação esquemática da placa de 24 poços, utilizada no teste de Campo Aberto em larvas.

1.5.2 Teste de Claro/Escuro (CE)

O teste CE constitui um paradigma comportamental amplamente estabelecido para avaliação de respostas tipo-ansiosas em zebrafish, apresentando particularidades ontogenéticas significativas. Em organismos adultos, observa-se uma nítida preferência pelas áreas escuras do aparato experimental e menor exploração de zonas iluminadas (Stewart et al., 2014). Este comportamento anti-predatório reflete adaptações evolutivas, onde peixes adultos buscam ativamente ambientes sombreados em seu habitat natural como estratégia de camuflagem e proteção contra predadores visuais (Spence et al., 2008). O paradigma experimental padrão para adultos emprega um tanque dividido em dois compartimentos de dimensões equivalentes (tipicamente 15×30×15 cm), com uma zona escura (iluminância <50 lux) e outra clara (>500 lux), permitindo livre transição durante períodos de 5 a 15 minutos (Maximino et al., 2010).

Contrastando com o padrão adulto, larvas de zebrafish (5-21 dpf) demonstram uma tendência inversa, exibindo aumento na exploração de áreas claras (Burgess & Granato, 2007). Esta diferença ontogenética pode ser atribuída a exigências ecológicas distintas: enquanto adultos beneficiam-se da evitação luminosa como proteção, larvas em fase planctônica podem requerer maior exposição à luz para dispersão, termorregulação e captura de alimento. Protocolos adaptados para larvas utilizam placas de 24 poços (3 cm de diâmetro) com contrastes luminosos equivalentes, porém com tempos de teste reduzidos (3-5 minutos) devido ao metabolismo acelerado característico deste estágio desenvolvimental (Richendrfer & Créton, 2013); ou aparatos de teste similares aos utilizados em adultos, mas de tamanho reduzido (Fig. 4).

A validação farmacológica do CE em adultos demonstrou sensibilidade robusta a diversas classes de compostos psicotrópicos. Benzodiazepínicos como o diazepam (1-5 mg/L) promovem aumento significativo na exploração da zona clara, enquanto agentes ansiogênicos como a cafeína (50-100 mg/L) reduzem esta exploração

(Gebauer et al., 2011). Antidepressivos SSRIs, particularmente a fluoxetina (0,1-1 mg/L), exibem efeito dose-dependente característico, corroborando a validade do teste para triagem de fármacos psicoativos. Em estágios larvais, os protocolos de CE mostraram sensibilidade farmacológica precoce, detectando respostas a benzodiazepínicos a partir de 5 dpf (0,25-2 mg/L) e a agentes ansiogênicos como o pentilenotetrazol (5-10 mM) entre 7-21 dpf (Best et al., 2017).

Figura 4. Representação esquemática do aparato do teste Claro/Escuro.

1.5.3 Labirinto em Cruz com Rampa (LCR)

O LCR constitui um paradigma experimental inovador para avaliação de comportamentos tipo-ansiosos em peixes, desenvolvido originalmente por Walsh-Monteiro et al. (2016) para zebrafish adultos. Este teste foi concebido para analisar a evitação de corpos d'água rasos, comportamento naturalmente associado ao risco de predação e exposição ambiental em condições ecológicas (Maximino et al., 2010). O aparato consiste em um labirinto em forma de cruz com rampas que conectam áreas rasas e profundas, permitindo a quantificação objetiva de dois parâmetros comportamentais principais: (1) a preferência por áreas profundas (indicando evitação de risco) e (2) a exploração de áreas rasas (refletindo avaliação de risco) (Fig. 5).

A validação original do LCR para zebrafish adultos incluiu três abordagens complementares, conforme estabelecido por Walsh-Monteiro et al. (2016): (i) validação de construto, demonstrando correlação significativa com outros testes de ansiedade consolidados; (ii) validação farmacológica, mostrando sensibilidade a benzodiazepínicos (diazepam 2 mg/L aumentou a exploração de áreas rasas); e (iii) validação ecológica, confirmando a relevância do paradigma para comportamentos anti-predatórios naturais. Posteriormente, o modelo foi adaptado com sucesso para outras espécies de peixes, incluindo guppies (*Poecilia reticulata*), onde Carvalho et al.

(2024) demonstraram sua aplicabilidade tanto para larvas quanto para juvenis, com parâmetros comportamentais consistentes entre estágios desenvolvimentais.

Para zebrafish, o protocolo adulto foi consolidado através de estudos farmacológicos adicionais. Egan et al. (2009) comprovaram que ansiolíticos como o diazepam (1-5 mg/L) reduzem significativamente a evitação de áreas rasas, enquanto agentes ansiogênicos como a cafeína (100 mg/L) aumentam esta evitação. Em estágios larvais (8 dpf), Varga et al. (2018) desenvolveram uma versão adaptada do teste, substituindo as rampas por braços inteiramente rasos, que demonstrou sensibilidade farmacológica comparável. Contudo, uma versão larval do LCR mantendo a configuração original com rampas ainda carece de validação sistemática, particularmente no que concerne aos aspectos farmacológicos (resposta a diferentes classes de ansiolíticos) e neuroquímicos (envolvimento de sistemas dopaminérgicos e serotoninérgicos).

A validação do LCR para larvas exigirá, conforme apontado por Maximino (2011) e Willner (1991), quatro componentes essenciais: (1) padronização de parâmetros físicos (altura da água, inclinação da rampa); (2) estabelecimento de valores basais por estágio desenvolvimental; (3) verificação da sensibilidade a múltiplas classes farmacológicas; e (4) correlação com marcadores neuroquímicos. A completude deste processo permitirá a utilização do LCR como ferramenta transversal em pesquisas de comportamento, desde estudos ontogenéticos até triagem de psicofármacos.

A distinção fundamental entre medo e ansiedade está nos mecanismos comportamentais que cada um desses estados emocionais desencadeia. Enquanto o medo induz respostas imediatas de fuga ou esquiva ativa diante de ameaças concretas, a ansiedade caracteriza-se por comportamentos mais complexos de avaliação de risco e esquiva passiva em situações potencialmente perigosas (Maximino, 2011). Essa dicotomia, inicialmente descrita em modelos mamíferos

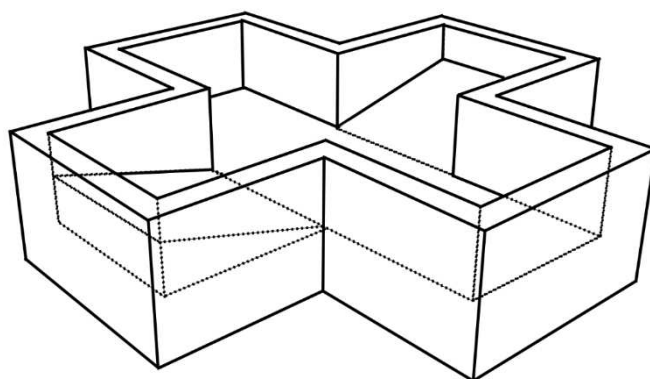


Figura 5. Representação esquemática do aparato do teste Labirinto em Cruz com Rampa.

clássicos (Miller & Kraeling, 1952; Montgomery, 1955), revela-se igualmente relevante em zebrafish, onde os paradigmas experimentais demonstram padrões consistentes de conflito aproximação-evitação ao longo do desenvolvimento (Halliday, 1966; Russel, 1973).

Considerando a complexidade inerente aos transtornos neuropsiquiátricos e sua natureza multifacetada, o presente estudo adota uma abordagem que transcende o desenvolvimento e validação de testes comportamentais isolados. Nosso objetivo central consiste em investigar sistematicamente a ontogenia do comportamento tipo-ansioso em larvas de zebrafish, utilizando dois paradigmas complementares: o teste CE, já consolidado na literatura para larvas (Maximino et al., 2010), e uma versão adaptada do LCR, especificamente desenvolvida para estágios larvais.

A relevância deste estudo vai além do âmbito metodológico, oferecendo insights valiosos sobre a maturação dos circuitos neurais envolvidos nas respostas de ansiedade. A combinação dos paradigmas CE e LCR possibilita examinar tanto a sensibilidade a estímulos luminosos quanto a avaliação de risco espacial, proporcionando uma visão abrangente do desenvolvimento do comportamento tipo-ansioso. Além disso, a caracterização de parâmetros basais em diferentes estágios larvais (5, 14 e 21dpf) estabelece fundamentos cruciais para futuras investigações farmacológicas e genéticas sobre os mecanismos subjacentes à ansiedade nesse modelo.

2. Justificativa e Hipótese

O zebrafish (*Danio rerio*) tem se destacado como um modelo animal extremamente valioso para pesquisas neurocomportamentais, graças à sua combinação de características como homologia genética com humanos, transparência em estágios

larvais e facilidade de manipulação experimental. Esses atributos tornam esse organismo particularmente adequado para investigar os mecanismos neurobiológicos subjacentes à ansiedade, permitindo a análise de respostas comportamentais a diversos estímulos desde as primeiras fases do desenvolvimento. No entanto, a área ainda enfrenta um desafio significativo - a carência de métodos padronizados, validados e suficientemente sensíveis para avaliar comportamentos do tipo ansioso em estágios iniciais do desenvolvimento.

O desenvolvimento do teste de labirinto em cruz com rampa neste trabalho vai além da criação de uma ferramenta comportamental, representando um elemento central para testar nossa hipótese fundamental de que as larvas de zebrafish exibem comportamentos tipo-ansiosos qualitativamente distintos em diferentes fases do desenvolvimento, com padrões específicos que emergem conforme os circuitos neurais amadurecem.

A aplicação sistemática desse teste em múltiplos estágios desenvolvimentais não apenas valida sua eficácia como ferramenta de pesquisa, mas servirá principalmente para revelar como esses comportamentos se manifestam e evoluem ao longo do tempo. Nossa hipótese prevê que seremos capazes de detectar e quantificar possíveis diferenças nos padrões comportamentais tipo-ansiosos entre larvas de 5, 14 e 21 dpf, refletindo o amadurecimento progressivo dos sistemas neurotransmissores envolvidos na regulação emocional.

Além de estabelecer um protocolo robusto e reprodutível para a comunidade científica, este trabalho tem o potencial de gerar insights valiosos sobre a ontogenia do comportamento tipo-ansioso, elucidando como fatores intrínsecos (como a maturação de circuitos dopaminérgicos, GABAérgicos e serotoninérgicos) e extrínsecos (como exposição a estressores ambientais) interagem para moldar essas respostas comportamentais desde os estágios mais precoces do desenvolvimento. O teste de nossa hipótese abrirá novas perspectivas para o estudo dos fundamentos neurobiológicos da ansiedade e para o desenvolvimento de abordagens terapêuticas mais precoces e eficazes.

3. Objetivos

Estabelecer um protocolo quantitativo e reprodutível para investigar padrões ontogenéticos do comportamento tipo-ansioso em larvas de zebrafish, integrando análise comportamental com os mecanismos neurobiológicos do desenvolvimento.

3.1. Objetivos Específicos

- I. Investigar a capacidade do teste de labirinto em cruz com rampa em detectar comportamentos do tipo-ansioso em larvas de zebrafish (*Danio rerio*) em diferentes estágios do desenvolvimento.
- II. Estabelecer os parâmetros ideais de altura da coluna d'água e duração do teste para a aplicação do teste de labirinto em cruz com rampa em larvas de zebrafish em cada estágio de desenvolvimento analisado.
- III. Caracterizar o comportamento de larvas de zebrafish em diferentes estágios do desenvolvimento (5, 14 e 21 dias pós-fertilização) nos testes labirinto em cruz com rampa e claro/escuro.
- IV. Comparar os padrões comportamentais das larvas de zebrafish no teste de labirinto em cruz com rampa com o teste de preferência claro/escuro já validado para avaliação de ansiedade.

4. Materiais e Métodos

4.1. Animais

Para realização desse trabalho, utilizamos larvas de zebrafish de 5, 14 e 21dpf, sem distinção de machos e fêmeas. Foram obtidas a partir do cruzamento de indivíduos adultos homozigotos Wild Type (AB) criados no Biotério de Zebrafish do Departamento de Fisiologia do Instituto de Ciências Biológicas da UFMG em aquários de 25L contendo de 7 a 12 animais por aquário, em ciclo claro/escuro 14h/10h, temperatura da água de 26°C a 28°C e manutenção semanal para limpeza e controle de pH entre 7,0 e 7,4.

As larvas foram mantidas em placas de petri contendo até 50 animais, em meio de embrião E2 [1,0 mL da Solução Estoque #1 (8,0 g NaCl + 0,4 g KCl/100 mL), 0,1 mL da Estoque #2 (0,358 g Na₂HPO₄ + 0,60 g KH₂PO₄/100 mL), 1,0 mL da Estoque #4 (0,72 g CaCl₂/50 mL), 95,9 mL ddH₂O, 1,0 mL da Estoque #5 (1,23 g

MgSO₄·7H₂O/50 mL) e 1,0 mL da Estoque #6 recém-preparada (0,35 g NaHCO₃/10 mL) e ajuste de pH para 7,2] até 9dpf e, posteriormente, em água do sistema [30L H₂O + 60mL de solução de sal marinho (20g NaCl + 1L H₂O) + 3mL de solução de carbonato de cálcio (1,5g CaCO₃ + 3mL HCl); ajuste de pH para 7,2] . A temperatura ambiente do biotério foi mantida entre 25 e 30°C. Foram alimentadas de uma a duas vezes por dia, a partir do 5dpf, com ração industrializada em pó. As condições de manutenção dos animais e testes experimentais realizados posteriormente foram aprovadas pelo CEUA sob número de protocolo 192/2023.

Tabela III – Distribuição de animais para cada grupo experimental.

Idade	Grupo	Número de reproduções	Número Amostral
5dpf	LCR 1.1cm	3	30
	LCR 1.3cm	3	30
	LCR 1.5cm	3	29
	CE	1	19
14dpf	LCR 1.1cm	5	18
	LCR 1.3cm	5	19
	LCR 1.5cm	5	19
	CE	0	0
21dpf	LCR 1.1cm	5	14
	LCR 1.3cm	5	16
	LCR 1.5cm	5	12
	CE	1	12

4.2. Aparatos dos testes comportamentais

4.2.1. Labirinto em Cruz com Rampa adaptado para larvas

Os labirintos foram fabricados em parceria com o Laboratório Ideia Real da UFMG, em impressora 3D, utilizando material branco fosco, com formato de cruz composto por dois braços fundos planos, uma área central e dois braços com rampa. As medidas internas dos braços fundos e da área central são de 2 cm de comprimento, 2 cm de largura e 1,5 cm de profundidade. Nos braços com rampa, as medidas são as mesmas, com uma elevação de 0,5 cm no ponto mais alto da rampa (Fig. 6).

Os labirintos foram posicionados sobre uma superfície fosca translúcida, com duas luminárias posicionadas abaixo, apontadas para cima (~300 lux), garantindo iluminação uniforme de baixo para cima. Gravamos em vídeo atividade das larvas utilizando um celular modelo iPhone 7 Plus (formato .mov; resolução de 1920 x 1080; frequência de 30fps), suspenso a aproximadamente 30 cm dos aparatos.

Os parâmetros analisados incluem o tempo gasto e o número de entradas em cada braço durante três intervalos: os primeiros 2 minutos (período de habituação), de 2 a 6 minutos (janela 1) e de 6 a 10 minutos (janela 2), além do tempo total do teste (10 minutos). Também foram avaliados a distância total percorrida e a localização das larvas no aparato durante o tempo total do teste. Essa divisão temporal permitiu avaliar possíveis variações comportamentais ao longo do teste, considerando tanto a adaptação inicial das larvas ao ambiente quanto suas respostas em fases posteriores.

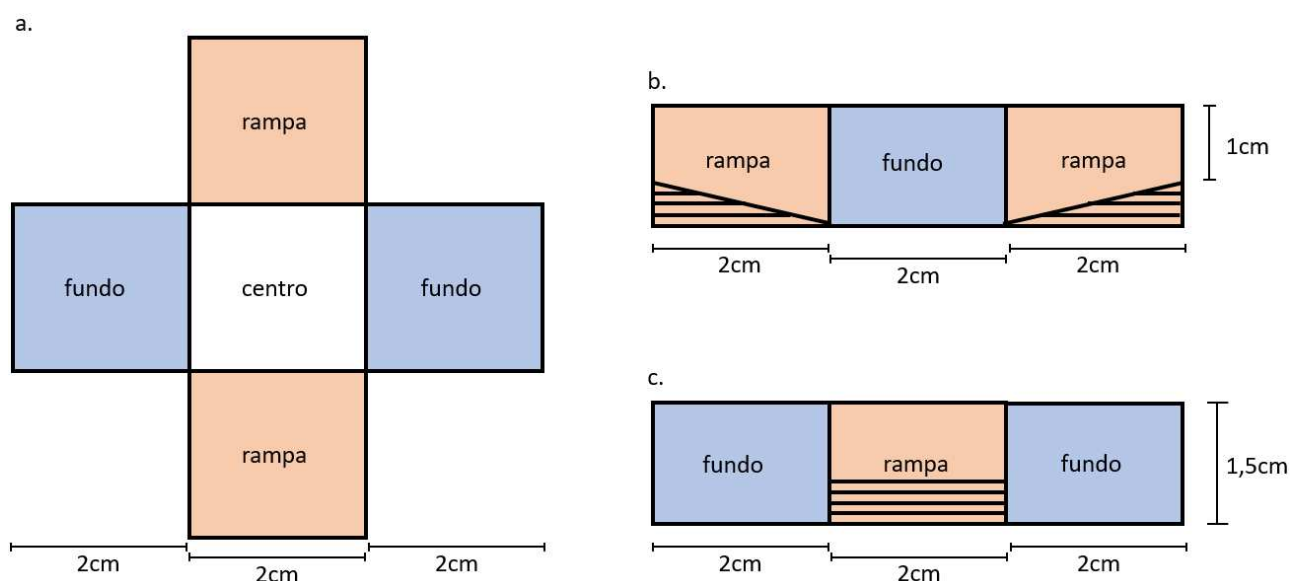


Figura 6. Desenho esquemático do aparato do teste LCR (a) visto de cima. (b) em visão lateral dos braços com rampas. (c) em visão lateral dos braços fundos.

4.2.2. Claro/Escuro adaptado para larvas

As caixas utilizadas para esse teste foram fabricadas em parceria com o Laboratório Ideia Real da UFMG, em impressora 3D, sendo metade em material branco e metade em material preto fosco (Fig. 7). O aparato consiste em uma caixa retangular com medidas internas de 6 cm de comprimento, 4,3 cm de largura e 3,1 cm de profundidade. As larvas foram posicionadas individualmente no centro da região branca do aparato, utilizando uma pipeta Pasteur para transferi-las diretamente da placa de criação para o teste. Registramos o comportamento das larvas durante aproximadamente 6 minutos.

A caixa foi posicionada sobre uma superfície fosca translúcida, com duas luminárias colocadas abaixo e apontadas para cima (~300 lux), garantindo iluminação uniforme de baixo para cima. A atividade das larvas foi monitorada com um celular

modelo iPhone 7 Plus (formato .mov; resolução de 1920 x 1080; frequência de 30fps), suspenso a aproximadamente 30 cm do aparato.

Os dados coletados incluem o tempo gasto em cada lado (preto e branco), o número de entradas em cada lado e a localização das larvas no aparato ao longo do teste.

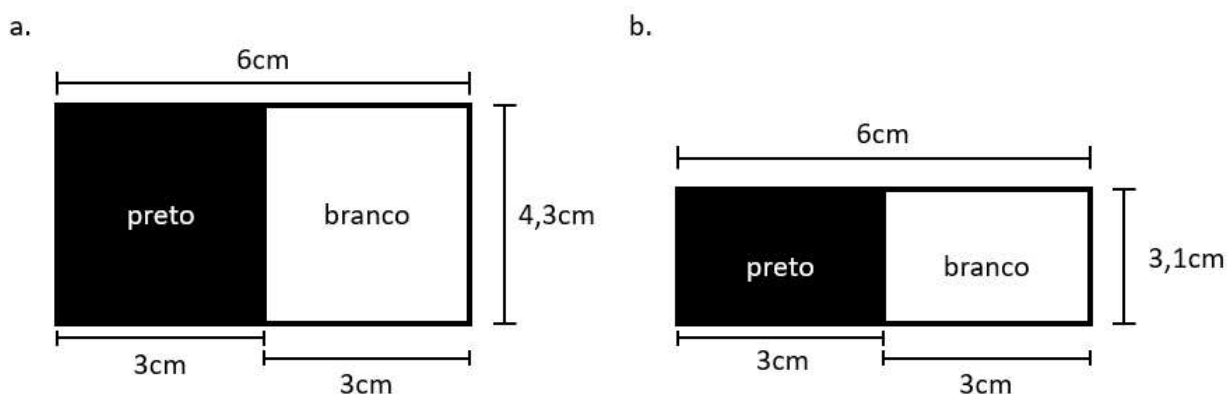


Figura 7. Desenho esquemático do aparato do teste CLARO/ESCURO (a) visto de cima. (b) em visão lateral

4.3. Desenho Experimental

Para avaliar quais seriam os melhores parâmetros de altura de coluna d'água (1.1cm, 1.3cm e 1.5cm) para investigação de comportamento tipo-ansioso em cada idade larval (5, 14 e 21 dias pós-fertilização (dpf)), registramos o comportamento larval em LCR, individualmente em uma rodada de teste única. Foi realizada uma rodada de teste em cada uma das idades investigadas (1 teste/larva/idade), com duração de 10 minutos no teste LCR (Fig. 8). Cada larva foi testada apenas uma vez, sem reutilização em outros experimentos. A partir dos resultados obtidos, foram estabelecidos parâmetros essenciais para a aplicação do teste de LCR em cada idade larval: (1) a altura ideal da coluna d'água; e (2) a duração adequada do teste.

Após a definição dos parâmetros do LCR, realizamos o teste CE para detectar comportamento tipo-ansioso nas mesmas idades testadas com LCR. O CE foi utilizado para avaliar comportamento tipo-ansioso em outro contexto, comparando com LCR. Aplicamos o teste com animais nas idades de 5 e 21 dpf e, posteriormente, será aplicado também com larvas aos 14dps. Cada larva foi testada apenas uma vez, sem reutilização em outros experimentos. Essa abordagem teve como objetivo validar os dados coletados no LCR, garantindo a confiabilidade dos resultados.

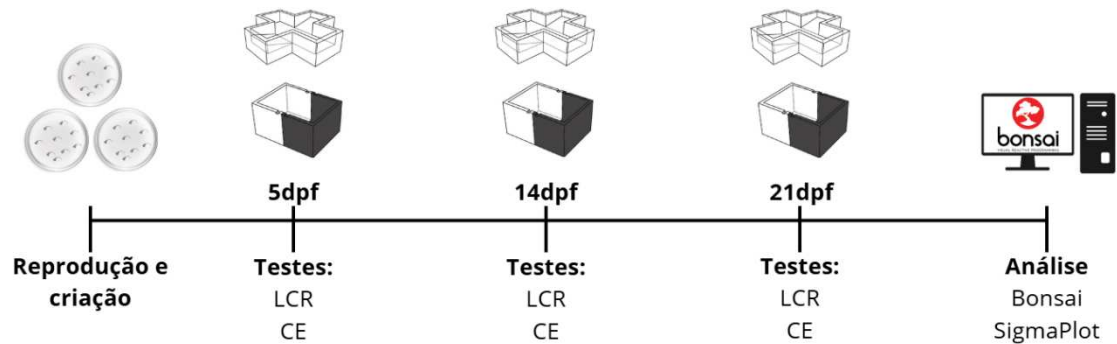


Figura 8. Representação geral da linha do tempo do protocolo experimental.

4.3.1. Teste LCR

Os animais com 5, 14 e 21 dpf foram transportados para sala de experimentação nas próprias placas de criação e eram habituados às condições da sala por um período mínimo de 30 minutos. Após esse período, cada larva foi coletada individualmente com auxílio de uma pipeta Pasteur e posicionada no centro do labirinto, onde poderia explorar livremente os braços fundos, região central e braços com rampa.

Para definir os parâmetros ideais do teste, foram realizados experimentos com diferentes alturas de coluna d'água (1.1cm, 1.3cm e 1.5cm), utilizando meio E2 para as larvas de 5dpf e água do sistema para 14 e 21 dpf. O objetivo foi determinar a altura de coluna d'água mais apropriada e o tempo ideal de aplicação do teste para cada idade. Os experimentos foram conduzidos no período da manhã até o meio da tarde, utilizando três aparatos simultaneamente por rodada, cada um com uma altura de coluna d'água distinta. Cada rodada teve duração de 10 minutos, e cada larva foi testada apenas uma vez, sem reutilização em outros experimentos.

4.3.2. Teste CE

Assim como no teste de labirinto em cruz com rampa (LCR), os animais foram transportados para a sala de comportamento em suas placas de criação e mantidos por um período de 30 minutos para habituação às condições da sala. Após esse período, cada larva foi coletada individualmente com o auxílio de uma pipeta Pasteur e posicionada na região branca do aparato, contendo 2cm de coluna d'água, onde poderia explorar livremente e escolher entre as áreas de cor branca e preta (Fig. 9).

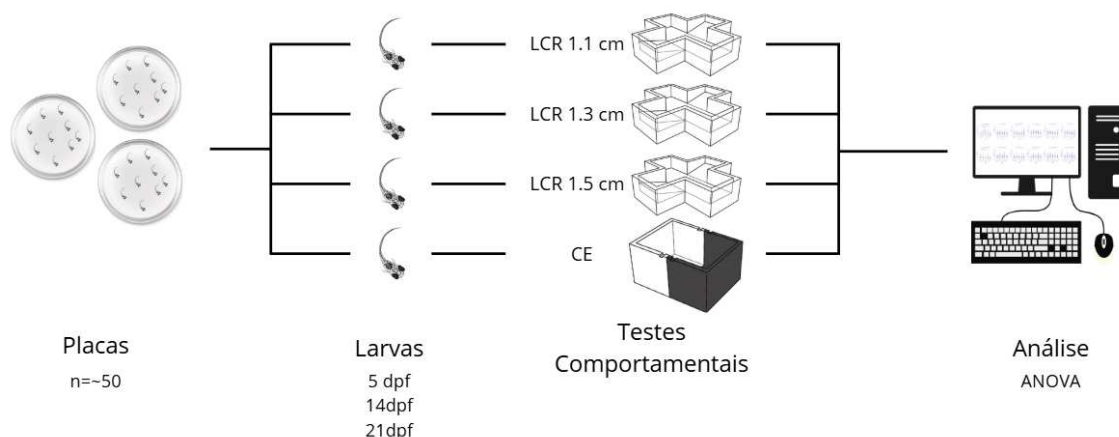


Figura 9. Representação do protocolo experimental para determinação da altura da coluna d'água no LCR.

4.4. Análise dos vídeos comportamentais

Para a análise quantitativa do comportamento das larvas nos experimentos, foi implementado um sistema automatizado de processamento de vídeo utilizando o software Bonsai (versão 2.8.5). Os vídeos foram capturados em alta resolução (1080p, 30fps) sob condições controladas de iluminação (~300 lux), garantindo a padronização entre os diferentes grupos experimentais.

O pré-processamento das imagens incluiu etapas de estabilização digital para compensar eventuais vibrações do equipamento, seguido pela aplicação de algoritmos de subtração de background e limiarização adaptativa. Esses procedimentos permitiram a identificação precisa do corpo larval e sua trajetória ao longo do tempo. O rastreamento automatizado foi capaz de detectar em tempo real a atividade da larva no aparato. Para obtenção de dados mais detalhados com relação a exploração da larva, dividimos cada braço do aparato LCR em uma região proximal (metade do braço até o centro) e uma região distal (metade do braço até a extremidade distal).

Todos os dados quantitativos foram analisados em diferentes intervalos de tempo (janela 1 [0-2 min], janela 2 [2-6 min], janela 3 [6-10 min], janela 1 + janela 2 [0-6 min], janela 2 + janela 3 [2-10 min] e tempo total [0-10 min]) (Fig. 10). Esses dados foram exportados em formato .csv para posterior análise estatística, permitindo a comparação sistemática entre os diferentes grupos e condições experimentais.

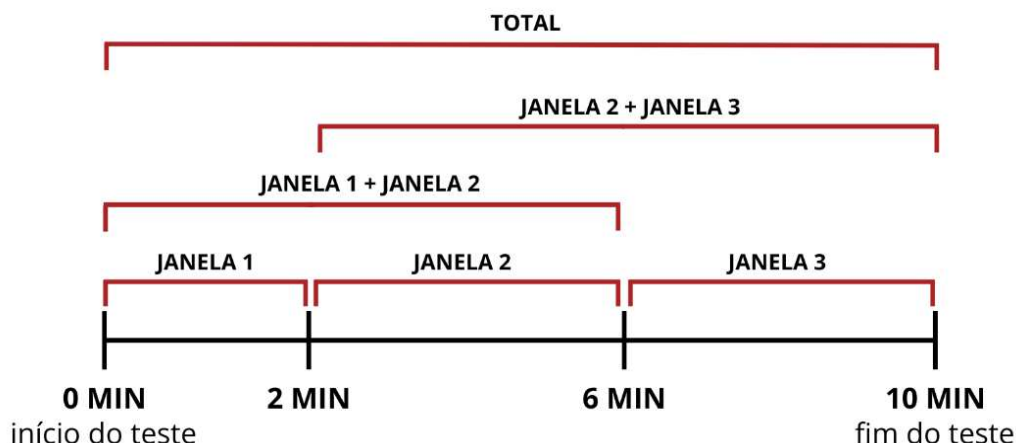


Figura 10. Representação das janelas de tempo analisadas do comportamento das larvas nos aparatos dos testes LCR.

4.5. Análises Estatísticas

Todos os dados estão representados por valores de média, mediana, intervalos interquartis, bem como os pontos mínimos e máximos da distribuição. Para análise do teste LCR, após verificação da normalidade (Shapiro-Wilk) e igualdade de variâncias, os dados paramétricos (distribuição normal e variâncias homogêneas) foram analisados por ANOVA one-way com post-hoc de Tukey, enquanto os não-paramétricos (quando os pressupostos de normalidade ou homogeneidade não foram atendidos) foram tratados com Kruskal-Wallis, adotando $p < 0,05$ como significativo. Para análise do teste CE, foi feito o teste t Student. O software utilizado foi o SigmaPlot versão 11.0.

5.Resultados

5.1. A altura da coluna d'água influencia no comportamento da larva no teste LCR de forma distinta em diferentes idades

5.1.1. Larvas 5 dpf: a melhor altura para detectar o comportamento tipo-ansioso é 1.3cm

Tempo 1.1cm

Observamos diferença entre o tempo que as larvas com 5dpf em 1.1cm de coluna d'água no teste LCR passaram em cada região durante a janela 1 (0-2 minutos) (Figura 11a). Observamos que as larvas passaram menos tempo na rampa distal (Kruskal-Wallis; $H = 37,969$; Tukey; $q = 6,762$; $p < 0,050$), fundo distal (Kruskal-Wallis; $H = 37,969$; Tukey; $q = 6,218$; $p < 0,050$) e rampa proximal (Kruskal-Wallis; $H = 37,969$; Tukey; $q = 5,140$; $p < 0,050$) em relação ao centro. Também identificamos menos tempo gasto em ambos rampa distal (Kruskal-Wallis; $H = 37,969$; Tukey; $q = 5,064$; $p < 0,050$) e fundo distal (Kruskal-Wallis; $H = 37,969$; Tukey; $q = 4,521$; $p < 0,050$) em relação ao fundo proximal. Não observamos diferença significativa durante o intervalo da janela 2 de análise (Figura 11b). Na janela 3 (Figura 11c), observamos que as larvas passaram menos tempo no centro em relação ao fundo distal (Kruskal-Wallis; $H = 10,787$; Tukey; $q = 4,025$; $p < 0,050$). Quando combinado o período da janela 1 com a janela 2 (Figura 11d), identificamos menor tempo gasto na rampa distal em relação ao centro (Kruskal-Wallis; $H = 14,780$; Tukey; $q = 4,439$; $p < 0,050$). Tanto a combinação das janelas 1 e 2 (Figura 11e), como a análise do tempo total (Figura 11f) não apresentam diferença significativa no tempo gasto em cada região.

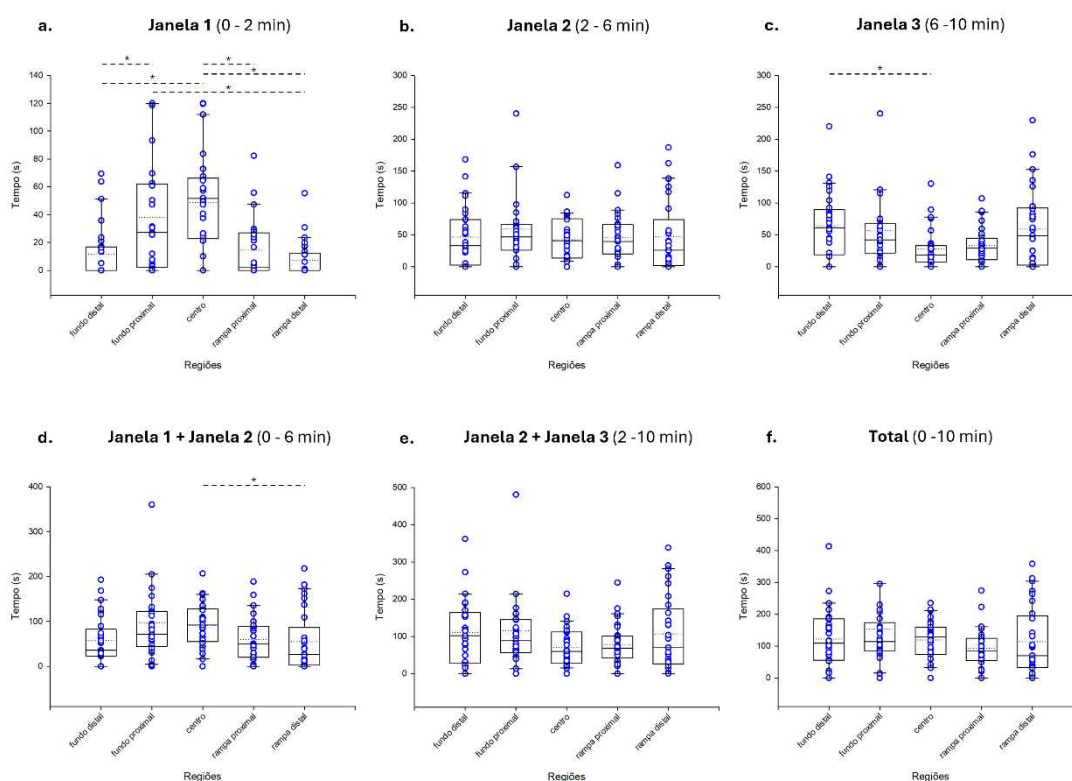


Figura 11. Tempo gasto pelas larvas de 5dpf em cada região do aparato LCR na altura de 1.1cm de coluna d'água em diferentes intervalos. Houve diferença de tempo gasto entre algumas regiões, sendo que na janela 1 (a), houve diferença entre o centro e rampa distal, centro e fundo distal, centro e rampa proximal, fundo proximal e rampa distal, e fundo proximal e fundo distal; na janela 3 (c), houve

diferença entre fundo distal e centro; e na janela 1 + janela 2 (d), houve diferença entre o centro e rampa distal. Não houve diferença no tempo gasto entre as regiões na janela 2 (b), na janela 2 + janela 3 (e) e no total (f). Os dados estão representados pelo valor da mediana, o intervalo interquartil e os valores mínimos e máximos; a linha pontilhada representa a média. Os dados foram analisados usando os testes Kruskal-Wallis e Tukey; * $p < 0.05$.

Entradas 1.1cm

Já no número de entradas registradas para mesma altura e idade, no período da janela 1 (Figura 12a) observamos menor número de entradas no centro (Kruskal-Wallis; $H = 22,967$; Tukey; $q = 5,310$; $p < 0,050$) e rampa distal (Kruskal-Wallis; $H = 22,967$; Tukey; $q = 4,779$; $p < 0,050$) em relação ao fundo distal; e menor número de entradas no centro em relação ao fundo proximal (Kruskal-Wallis; $H = 22,967$; Tukey; $q = 4,262$; $p < 0,050$). Nas janelas 2 e 3 de análise (Figura 12b, c), individualmente, não identificamos diferença significativa. Quando combinado o intervalo da janela 1 com a janela 2 (Figura 12d), observamos menos entradas no fundo distal em relação ao centro (Kruskal-Wallis; $H = 15,196$; Tukey; $q = 3,868$; $p < 0,050$). Tanto a combinação das janelas de análise 2 e 3 (Figura 12e), como a análise do tempo total (Figura 12f) não apresentam diferença significativa no número de entradas em cada região.

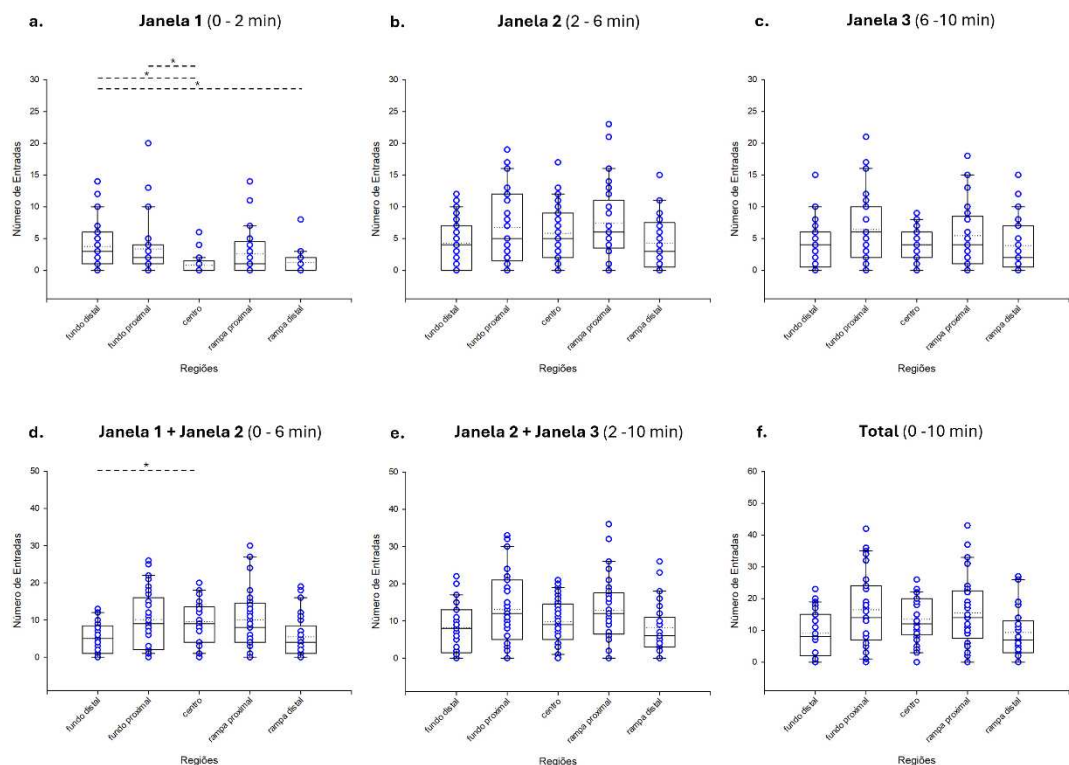


Figura 12. Número de entradas das larvas de 5dpf em cada região do aparato LCR na altura de 1.1cm de coluna d'água em diferentes intervalos. Houve diferença no número de entradas em

algumas regiões, sendo que na janela 1 (a) houve diferença entre o fundo distal e centro, fundo distal e rampa distal, e fundo proximal e centro; e na janela 1 + janela 2 (d), houve diferença entre o centro e fundo distal. Na janela 2 (b), janela 3 (c), janela 2 + janela 3 (e) e no total (f) não houve diferença. Os dados estão representados pelo valor da mediana, o intervalo interquartil e os valores mínimos e máximos; a linha pontilhada representa a média. Os dados foram analisados usando os testes Kruskal-Wallis e Tukey; * $p < 0.05$.

Tempo 1.3cm

Nas larvas de 5dpf em 1.3cm de coluna d'água no teste LCR (Figura 13), observamos diferenças significativas tanto no tempo gasto, quanto no número de entradas em cada região em todos os intervalos analisados. Durante o intervalo da janela 1 (Figura 13a), identificamos menor tempo gasto na rampa distal (Kruskal-Wallis; $H = 34,559$; Tukey; $q = 7,326$; $p < 0,050$) e no fundo distal (Kruskal-Wallis; $H = 34,559$; Tukey; $q = 5,880$; $p < 0,050$) em relação ao centro. Também houve menor tempo gasto na rampa distal em relação ao fundo proximal (Kruskal-Wallis; $H = 34,559$; Tukey; $q = 4,448$; $p < 0,050$). Já na janela 2 (Figura 13b), observamos que as larvas passaram menos tempo na rampa proximal (Kruskal-Wallis; $H = 24,310$; Tukey; $q = 4,379$; $p < 0,050$) e na rampa distal (Kruskal-Wallis; $H = 24,310$; Tukey; $q = 6,024$; $p < 0,050$) em relação ao fundo proximal, menos tempo gasto na rampa distal em relação ao centro (Kruskal-Wallis; $H = 24,310$; Tukey; $q = 4,985$; $p < 0,050$) e menor tempo gasto na rampa distal em relação ao fundo distal (Kruskal-Wallis; $H = 24,310$; Tukey; $q = 3,871$; $p < 0,050$). Na janela 3 (Figura 13c), identificamos que as larvas passaram menos tempo na rampa proximal em relação ao fundo proximal (Kruskal-Wallis; $H = 19,276$; Tukey; $q = 5,080$; $p < 0,050$) e em relação ao fundo distal (Kruskal-Wallis; $H = 19,276$; Tukey; $q = 4,797$; $p < 0,050$). Quando combinado o intervalo da janela 1 com a janela 2 (Figura 13d), identificamos menor tempo gasto na rampa distal em relação ao centro (Kruskal-Wallis; $H = 27,732$; Tukey; $q = 6,254$; $p < 0,050$) e em relação ao fundo proximal (Kruskal-Wallis; $H = 27,732$; Tukey; $q = 6,167$; $p < 0,050$). Analisando a janela 2 e a janela 3 em conjunto (Figura 13e), observamos menor tempo gasto na rampa proximal (Kruskal-Wallis; $H = 23,522$; Tukey; $q = 5,330$; $p < 0,050$) e na rampa distal (Kruskal-Wallis; $H = 23,522$; Tukey; $q = 4,967$; $p < 0,050$) em relação ao fundo proximal; além de menor tempo gasto na rampa proximal (Kruskal-Wallis; $H = 23,522$; Tukey; $q = 4,487$; $p < 0,050$) e na rampa distal (Kruskal-Wallis; $H = 23,522$; Tukey; $q = 4,125$; $p < 0,050$) em relação ao fundo distal. Fazendo a análise do tempo total (Figura 13f), observamos menor tempo gasto na rampa proximal (Kruskal-Wallis; $H = 22,923$;

Tukey; $q = 4,620$; $p < 0,050$) e na rampa distal (Kruskal-Wallis; $H = 22,923$; Tukey; $q = 5,562$; $p < 0,050$) em relação ao fundo proximal, bem como menor tempo na rampa distal em relação ao centro (Kruskal-Wallis; $H = 22,923$; Tukey; $q = 4,607$; $p < 0,050$).

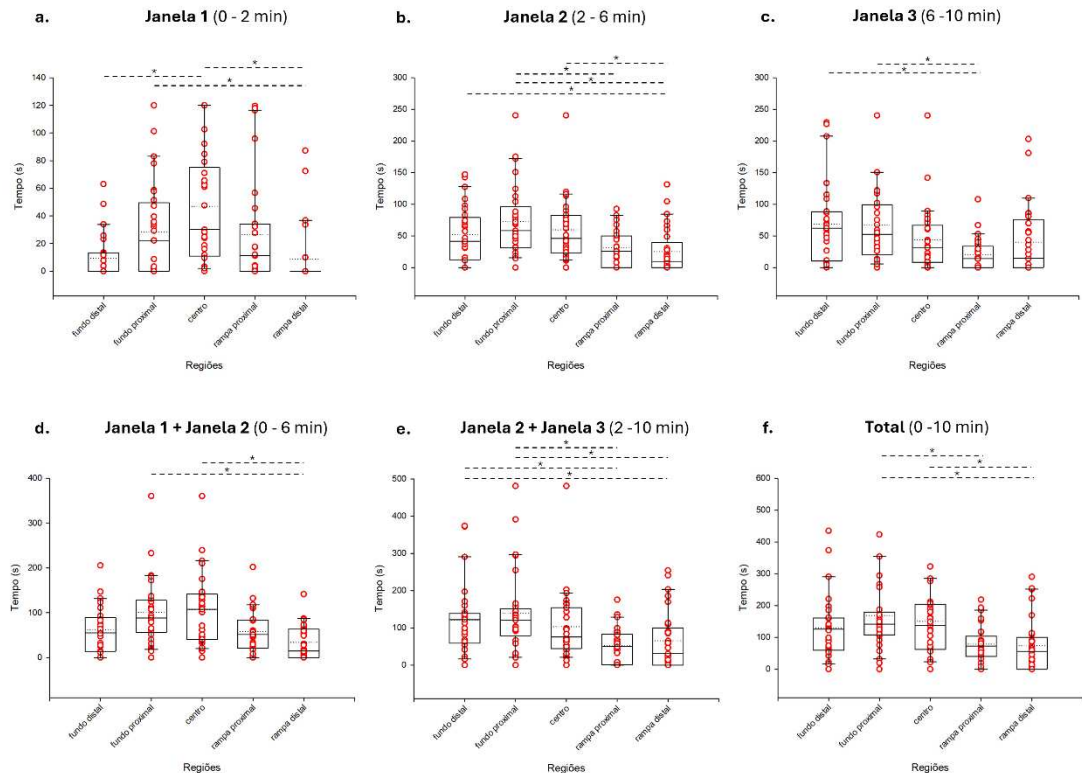


Figura 13. Tempo gasto pelas larvas de 5dpf em cada região do aparato LCR na altura de 1.3cm de coluna d'água em diferentes intervalos. Durante os intervalos da janela 1(a), observamos diferença entre o tempo gasto no centro em relação à rampa distal, no centro com relação ao fundo distal e no fundo proximal com relação à rampa distal; janela 2 (b), observamos diferença entre o tempo gasto no fundo proximal em relação à rampa distal, no fundo proximal em relação à rampa proximal, no centro em relação à rampa distal e no fundo distal em relação à rampa distal; na janela 3 (c), observamos diferença entre o tempo gasto no fundo proximal em relação à rampa proximal, e no fundo distal em relação à rampa proximal; na janela 1 + janela 2 (d), observamos diferença entre o tempo gasto no centro em relação à rampa distal e no fundo proximal em relação à rampa distal; na janela 2 + janela 3 (e), observamos diferença entre o tempo gasto no fundo proximal em relação à rampa proximal, no fundo proximal em relação à rampa distal, no fundo distal em relação à rampa proximal, e no fundo distal em relação à rampa distal; e no total (f), observamos diferença entre o tempo gasto no fundo proximal em relação à rampa distal, no fundo proximal em relação à rampa proximal, e no centro em relação à rampa distal. Os dados estão representados pelo valor da mediana, o intervalo interquartil e os valores mínimos e máximos; a linha pontilhada representa a média. Os dados foram analisados usando os testes Kruskal-Wallis e Tukey; * $p < 0.05$.

Entradas 1.3cm

Com relação ao número de entradas para mesma altura e idade, no intervalo da janela 1 (Figura 14a) observamos menor número de entradas na rampa distal (Kruskal-Wallis; $H = 28,592$; Tukey; $q = 6,663$; $p < 0,050$) e no fundo distal (Kruskal-Wallis; $H = 28,592$; Tukey; $q = 4,726$; $p < 0,050$) em relação ao centro, além de menor número de entradas na rampa distal em relação fundo proximal (Kruskal-Wallis; $H = 28,592$; Tukey; $q = 4,770$; $p < 0,050$). Durante a janela 2 (Figura 14b), identificamos menor número de entradas no fundo distal (Kruskal-Wallis; $H = 28,657$; Tukey; $q = 3,961$; $p < 0,050$) e na rampa distal (Kruskal-Wallis; $H = 28,657$; Tukey; $q = 6,749$; $p < 0,050$) em relação ao fundo proximal; e menos entradas na rampa distal em relação ao centro (Kruskal-Wallis; $H = 28,657$; Tukey; $q = 5,867$; $p < 0,050$). Na janela 3 (Figura 14c), observamos menor número de entradas na rampa proximal (Kruskal-Wallis; $H = 21,464$; Tukey; $q = 4,103$; $p < 0,050$) e na rampa distal (Kruskal-Wallis; $H = 21,464$; Tukey; $q = 6,183$; $p < 0,050$) em relação ao fundo proximal. Também observamos menor número de entradas na rampa distal (Kruskal-Wallis; $H = 21,464$; Tukey; $q = 3,868$; $p < 0,050$) em relação ao fundo distal nesse intervalo. Ao analisarmos o intervalo da janela 1 juntamente com a janela 2 (Figura 14d), identificamos menor número de entradas no fundo distal (Kruskal-Wallis; $H = 35,413$; Tukey; $q = 4,295$; $p < 0,050$) e na rampa distal (Kruskal-Wallis; $H = 35,413$; Tukey; $q = 7,275$; $p < 0,050$) em relação ao fundo proximal; além de menor número de entradas na rampa distal em relação ao centro (Kruskal-Wallis; $H = 21,464$; Tukey; $q = 6,782$; $p < 0,050$). Analisamos também o intervalo da janela 2 somado a janela 3 (Figura 14e) e identificamos menor número de entradas na rampa distal em relação ao fundo proximal (Kruskal-Wallis; $H = 27,804$; Tukey; $q = 7,129$; $p < 0,050$) e em relação ao centro (Kruskal-Wallis; $H = 27,804$; Tukey; $q = 5,224$; $p < 0,050$). Fazendo análise do tempo total (Figura 14f), identificamos menor número de entradas na rampa distal em relação ao centro (Kruskal-Wallis; $H = 33,012$; Tukey; $q = 6,092$; $p < 0,050$), em relação ao fundo proximal (Kruskal-Wallis; $H = 33,012$; Tukey; $q = 7,604$; $p < 0,050$) e em relação fundo distal (Kruskal-Wallis; $H = 33,012$; Tukey; $q = 3,968$; $p < 0,050$).

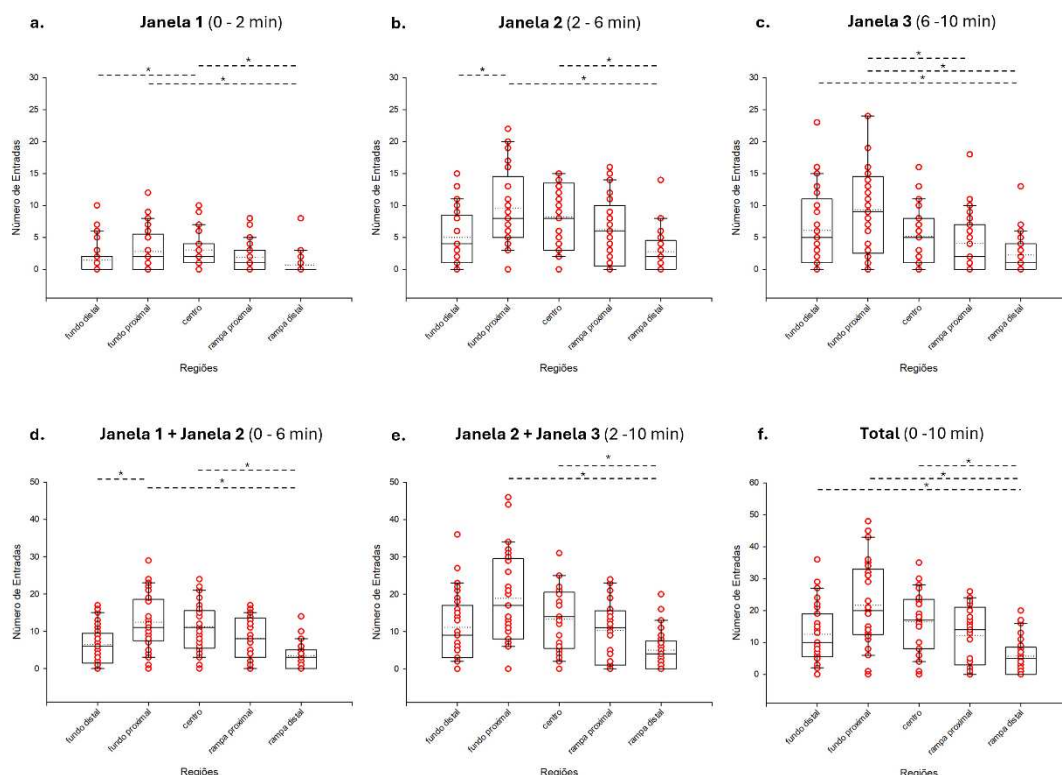


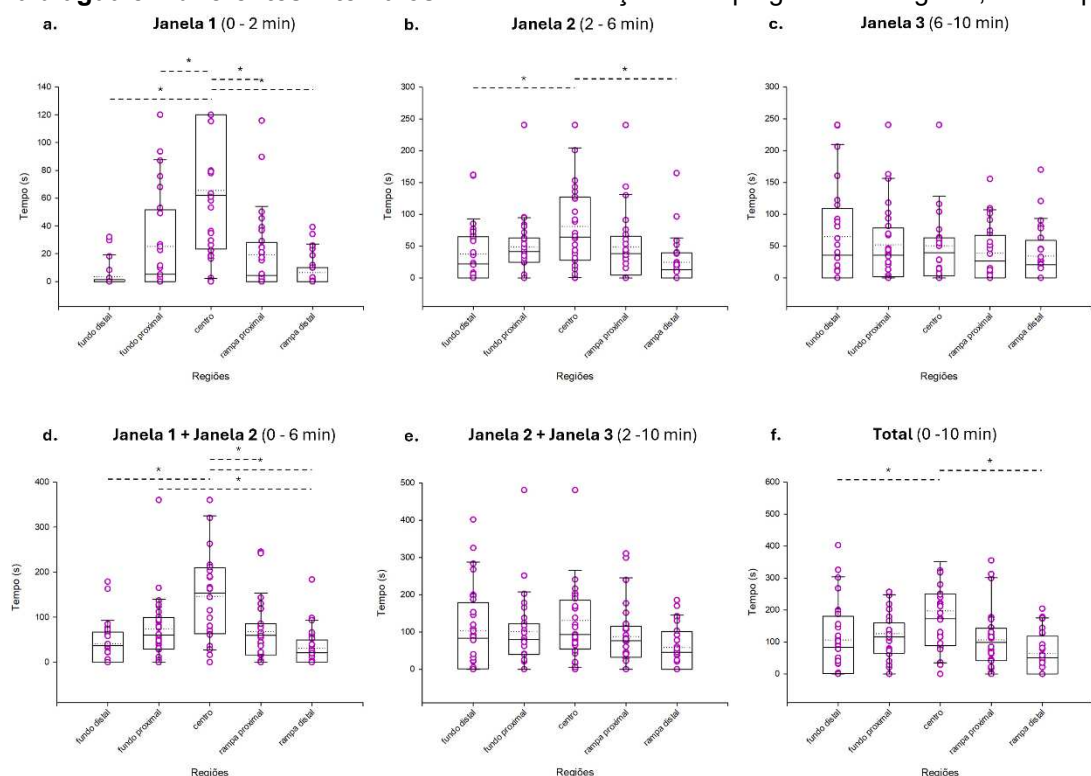
Figura 14. Número de entradas das larvas de 5dpf em cada região do aparato LCR na altura de 1.3 cm de coluna d'água em diferentes intervalos. Houve diferença no número de entradas em cada região, sendo que na janela 1 (a) houve diferença entre o centro e rampa distal, centro e fundo distal, e fundo proximal e rampa distal; na janela 2 (b) houve diferença entre o fundo proximal e rampa distal, entre o fundo proximal e o fundo distal, e entre o centro e a rampa distal; na janela 3 (c) houve diferença entre o fundo proximal e a rampa distal, fundo proximal e rampa proximal, e fundo distal e rampa distal; na janela 1 + janela 2 (d) houve diferença entre o fundo proximal e a rampa distal, fundo proximal e fundo distal, centro e rampa distal, e entre a rampa proximal e rampa distal; na janela 2 + janela 3 (e) houve diferença entre o fundo proximal e a rampa distal, e centro e rampa distal; e no total (f) houve diferença entre o fundo proximal e a rampa distal, centro e rampa distal, e entre o fundo distal e a rampa distal. Os dados estão representados pelo valor da mediana, o intervalo interquartil e os valores mínimos e máximos; a linha pontilhada representa a média. Os dados foram analisados usando os testes Kruskal-Wallis e Tukey; * $p < 0.05$.

Tempo 1.5cm

Nas larvas de 5dpf em 1.5cm de coluna d'água no teste LCR durante o intervalo da janela 1 (Figura 15a), identificamos que as larvas passaram menos tempo no fundo distal (Kruskal-Wallis; $H = 48,888$; Tukey; $q = 8,730$; $p < 0,050$) e na rampa distal (Kruskal-Wallis; $H = 48,888$; Tukey; $q = 7,574$; $p < 0,050$) em relação ao centro; menos tempo na rampa proximal (Kruskal-Wallis; $H = 48,888$; Tukey; $q = 5,391$; $p < 0,050$) e no fundo proximal (Kruskal-Wallis; $H = 48,888$; Tukey; $q = 5,132$; $p < 0,050$) também em relação ao centro. Durante a janela 2 (Figura 15b), identificamos menor tempo

gasto na rampa distal (Kruskal-Wallis; $H = 18,002$; Tukey; $q = 5,680$; $p < 0,050$) e no fundo distal (Kruskal-Wallis; $H = 18,002$; Tukey; $q = 3,907$; $p < 0,050$) em relação ao centro. Não observamos diferença significativa durante o intervalo da janela 3 (Figura 15c). Analisando o intervalo da janela 1 até o final da janela 2 (Figura 15d), observamos menor tempo gasto na rampa distal (Kruskal-Wallis; $H = 33,720$; Tukey; $q = 7,467$; $p < 0,050$), no fundo distal (Kruskal-Wallis; $H = 33,720$; Tukey; $q = 6,360$; $p < 0,050$) e na rampa proximal (Kruskal-Wallis; $H = 33,720$; Tukey; $q = 4,058$; $p < 0,050$) em relação ao centro. Identificamos também menor tempo gasto na rampa distal em relação ao fundo proximal (Kruskal-Wallis; $H = 33,720$; Tukey; $q = 3,942$; $p < 0,050$). Não observamos diferença significativa durante o intervalo da janela 2 somado à janela 3 (Figura 15e). Fazendo a análise do tempo total, identificamos que as larvas passaram menos tempo na rampa distal (Kruskal-Wallis; $H = 9,388$; Tukey; $q = 5,987$; $p < 0,050$) e no fundo distal (Kruskal-Wallis; $H = 19,388$; Tukey; $q = 4,226$; $p < 0,050$) em relação ao centro.

Figura 15. Tempo gasto pelas larvas de 5dpf em cada região do aparato LCR na altura de 1.5cm de coluna d'água em diferentes intervalos. Houve diferença no tempo gasto nas regiões, sendo que



na janela 1 (a) observamos diferença entre o tempo gasto no centro e fundo distal, no centro e rampa distal, centro e rampa proximal, e entre o centro e fundo proximal; na janela 2 (b) houve diferença entre o centro e rampa distal, e centro e fundo distal; na janela 1 + janela 2 (d) houve diferença entre o centro e a rampa distal, centro e fundo distal, centro e rampa proximal, e entre o fundo proximal e rampa distal;

e no total (f) houve diferença entre o centro e rampa distal; e entre centro e fundo distal. Na janela 3 (c) e na janela 2 + janela 3 (e) não houve diferença. Os dados estão representados pelo valor da mediana, o intervalo interquartil e os valores mínimos e máximos; a linha pontilhada representa a média. Os dados foram analisados usando os testes Kruskal-Wallis e Tukey; * $p < 0.05$.

Entradas 1.5cm

Com relação ao número de entradas para mesma altura e idade, no intervalo da janela 1 (Figura 16a) observamos menor número de entradas no fundo distal (Kruskal-Wallis; $H = 26,058$; Tukey; $q = 6,134$; $p < 0,050$) e rampa distal (Kruskal-Wallis; $H = 26,058$; Tukey; $q = 5,172$; $p < 0,050$) em relação ao centro. Observamos também menor número de entradas no fundo distal em relação à rampa proximal (Kruskal-Wallis; $H = 26,058$; Tukey; $q = 3,972$; $p < 0,050$). Não observamos diferença significativa entre o número de entradas em cada região durante os intervalos da janela 2 (Figura 16b) e da janela 3 (Figura 16c) individualmente. Fazendo análise do intervalo da janela 1 somado à janela 2 (Figura 16d), observamos menor número de entradas na rampa distal (Kruskal-Wallis; $H = 21,505$; Tukey; $q = 4,983$; $p < 0,050$) e no fundo distal (Kruskal-Wallis; $H = 21,505$; Tukey; $q = 4,618$; $p < 0,050$) em relação ao centro. Identificamos também menor número de entradas da rampa distal (Kruskal-Wallis; $H = 21,505$; Tukey; $q = 4,275$; $p < 0,050$) e no fundo distal (Kruskal-Wallis; $H = 21,505$; Tukey; $q = 3,909$; $p < 0,050$) em relação à rampa proximal. Não observamos diferença significativa entre o número de entradas em cada região durante o intervalo da janela 2 somada à janela 3 (Figura 16e). Analisando o tempo total em que o teste foi aplicado (Figura 16f), observamos menor número de entradas na rampa distal em relação ao centro (Kruskal-Wallis; $H = 15,353$; Tukey; $q = 3,961$; $p < 0,050$).

= 32,746; Tukey; $q = 5,847$; $p < 0,050$) em relação ao fundo distal no intervalo da janela 3 (Figura 17c). Analisando o intervalo da janela 1 até o final da janela 2 (Figura 17d), observamos menor tempo gasto na rampa distal (Kruskal-Wallis; $H = 16,820$; Tukey; $q = 4,913$; $p < 0,050$) e na rampa proximal (Kruskal-Wallis; $H = 16,820$; Tukey; $q = 4,560$; $p < 0,050$) em relação ao fundo distal. No intervalo compreendendo a janela 2 e a janela 3 (Figura 17e), identificamos menor tempo gasto na rampa proximal (Kruskal-Wallis; $H = 29,224$; Tukey; $q = 6,333$; $p < 0,050$) e na rampa distal (Kruskal-Wallis; $H = 29,224$; Tukey; $q = 6,147$; $p < 0,050$) em relação ao fundo distal. Observamos também menor tempo gasto no centro (Kruskal-Wallis; $H = 29,224$; Tukey; $q = 5,415$; $p < 0,050$) em relação ao fundo distal nesse mesmo intervalo. No tempo total (Figura 17f) identificamos menor tempo gasto na rampa distal (Kruskal-Wallis; $H = 27,507$; Tukey; $q = 6,142$; $p < 0,050$), na rampa proximal (Kruskal-Wallis; $H = 27,507$; Tukey; $q = 6,112$; $p < 0,050$) e no centro (Kruskal-Wallis; $H = 27,507$; Tukey; $q = 5,228$; $p < 0,050$) em relação ao fundo distal.

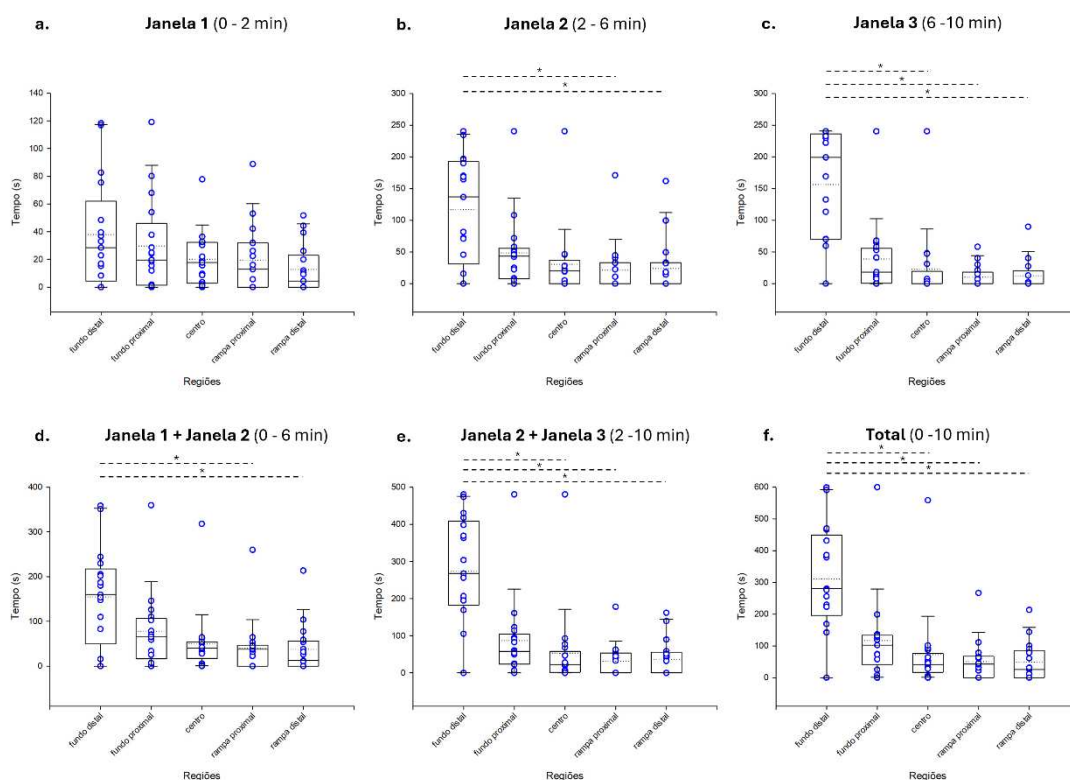


Figura 17. Tempo gasto pelas larvas de 14 dpf em cada região do aparato LCR na altura de 1.1cm de coluna d'água em diferentes intervalos. Houve diferença no tempo gasto em cada região, sendo que na janela 2 (b) observamos diferença entre o tempo gasto no fundo distal e rampa proximal, e entre fundo distal e rampa distal; na janela 3 (c) observamos diferença entre o tempo gasto no fundo distal e rampa proximal, fundo distal e rampa distal, e fundo distal e centro; na janela 1 + janela 2 (d) observamos diferença entre o tempo gasto no fundo distal e rampa distal, e fundo distal e rampa proximal; na janela 2 + janela 3 (e) observamos diferença entre o tempo gasto no fundo distal e rampa

proximal, fundo distal e rampa distal, e entre o fundo distal e centro; e no total (f) observamos diferença entre o fundo distal e rampa distal, fundo distal e rampa proximal, e fundo distal e centro. Não houve diferença no tempo gasto em cada região durante a janela 1 (a). Os dados estão representados pelo valor da mediana, o intervalo interquartil e os valores mínimos e máximos; a linha pontilhada representa a média. Os dados foram analisados usando os testes Kruskal-Wallis e Tukey; * $p < 0.05$.

Entradas 1.1cm

Com relação ao número de entradas em cada região para mesma altura e idade, não observamos diferença significativa durante o intervalo da janela 1 (Figura 18a). Na janela 2 (Figura 18b), observamos menor número de entradas na rampa distal (Kruskal-Wallis; $H = 11,402$; Tukey; $q = 3,931$; $p < 0,050$) em relação ao fundo proximal. Durante a janela 3 (Figura 18c), também não observamos diferença significativa no número de entrada em cada uma das regiões. Analisando o intervalo da janela 1 em conjunto com a janela 2 (Figura 18d), identificamos menor número de entradas na rampa distal em relação ao fundo distal (Kruskal-Wallis; $H = 9,517$; Tukey; $q = 4,225$; $p < 0,050$). No intervalo da janela 2 somado à janela 3 (Figura 18e), observamos menor número de entradas na rampa distal em relação ao fundo proximal (Kruskal-Wallis; $H = 14,887$; Tukey; $q = 4,456$; $p < 0,050$). Analisando o tempo total (Figura 18f), identificamos menor número de entradas na rampa distal em relação ao fundo proximal (Kruskal-Wallis; $H = 11,755$; Tukey; $q = 4,574$; $p < 0,050$).

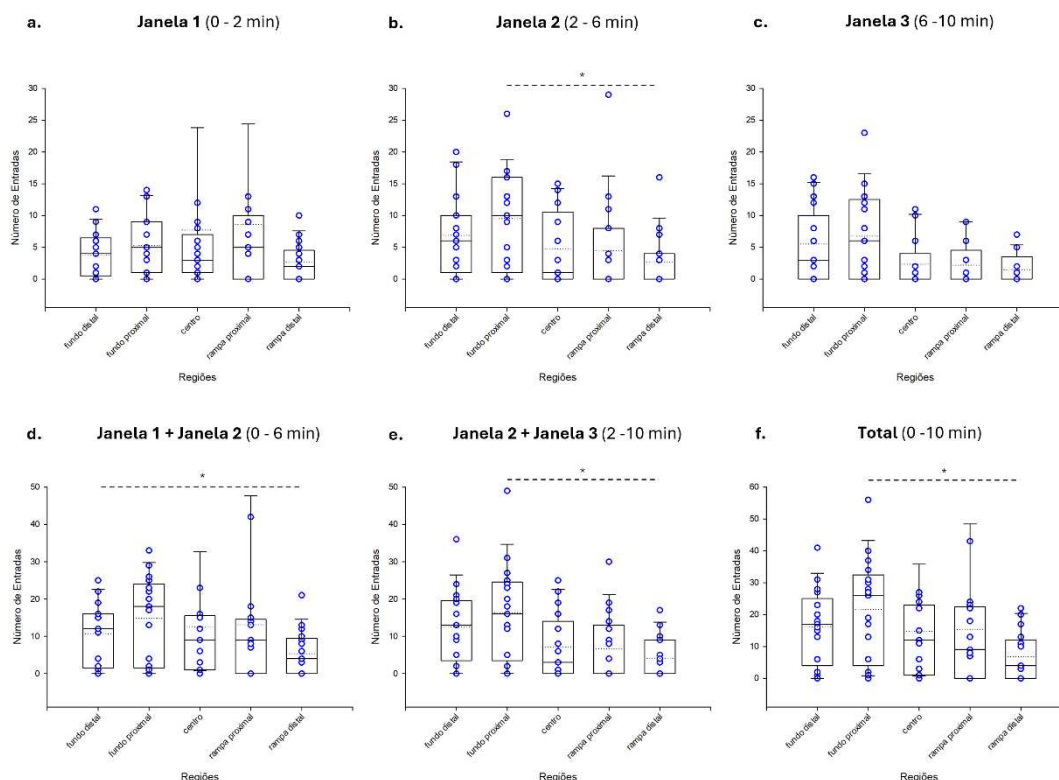


Figura 18. Número de entradas das larvas de 14dpf em cada região do aparato LCR na altura de 1.1cm de coluna d'água em diferentes intervalos. Houve diferença no número de entradas em cada região, sendo que na janela 2 (b) houve diferença entre o fundo proximal e a rampa distal; na janela 1 + janela 2 (d) houve diferença entre o fundo distal e rampa distal; na janela 2 + janela 3 (e) houve diferença entre o fundo proximal e a rampa distal; e no total (f) houve diferença entre o fundo proximal e rampa distal. Não houve diferença entre as regiões durante a janela 1 (a). Os dados estão representados pelo valor da mediana, o intervalo interquartil e os valores mínimos e máximos; a linha pontilhada representa a média. Os dados foram analisados usando os testes Kruskal-Wallis e Tukey; * $p < 0.05$.

Tempo 1.3cm

Nas larvas de 14dpf em 1.3cm de coluna d'água no teste LCR durante o intervalo da janela 1 (Figura 19a), não identificamos diferença significativa entre o tempo gasto em cada uma das regiões. Durante o intervalo da janela 2 (Figura 19b), observamos menor tempo gasto no fundo distal (Kruskal-Wallis; $H = 12,618$; Tukey; $q = 4,331$; $p < 0,050$) e na rampa distal (Kruskal-Wallis; $H = 12,618$; Tukey; $q = 4,322$; $p < 0,050$) em relação ao centro. Não observamos diferença significativa entre o tempo gasto em cada região durante a janela 3 (Figura 19c) e nem durante a soma dos intervalos da janela 1 e janela 2 (Figura 19d). Durante o intervalo da janela 2 somada à janela 3 (Figura 19e), observamos menor tempo gasto na rampa distal (Kruskal-Wallis; $H = 15,642$; Tukey; $q = 4,944$; $p < 0,050$) e no fundo distal (Kruskal-Wallis; $H = 15,642$;

Tukey; $q = 4,583$; $p < 0,050$) em relação ao centro. Analisando o tempo total (Figura 19f), observamos menor tempo gasto na rampa distal (Kruskal-Wallis; $H = 12,946$; Tukey; $q = 4,484$; $p < 0,050$) e no fundo distal (Kruskal-Wallis; $H = 12,946$; Tukey; $q = 4,286$; $p < 0,050$) em relação ao centro.

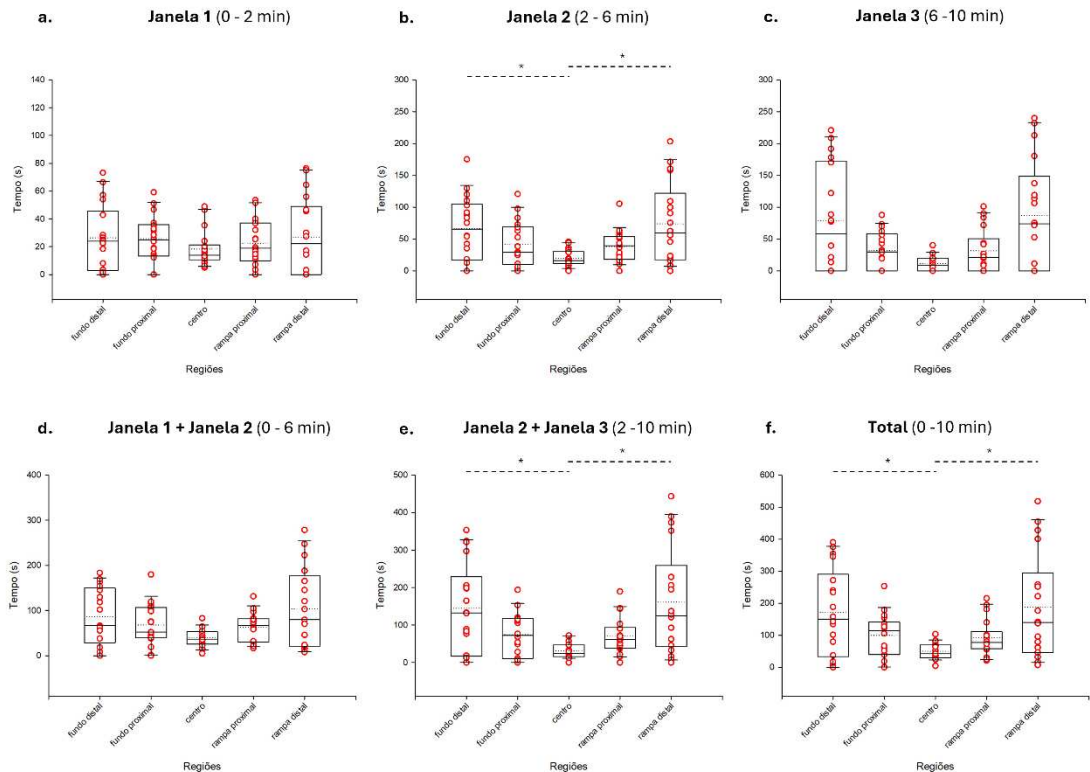


Figura 19. Tempo gasto pelas larvas de 14dpf em cada região do aparato LCR na altura de 1.3cm de coluna d'água em diferentes intervalos. Tempo que as larvas de 14dpf ficaram em cada uma das regiões do aparato LCR em diferentes intervalos de tempo. Durante os intervalos, observamos diferença no tempo gasto em cada região, sendo que na janela 2 (b) observamos diferença entre o fundo distal e o centro, e rampa distal e centro; na janela 2 + janela 3 (e) observamos diferença entre a rampa distal e o centro, e fundo distal e centro; e no total (f) observamos diferença entre a rampa distal e o centro, e fundo distal e centro. Os dados estão representados pelo valor da mediana, o intervalo interquartil e os valores mínimos e máximos; a linha pontilhada representa a média. Os dados foram analisados usando os testes Kruskal-Wallis e Tukey; $*p < 0.05$.

Entradas 1.3cm

Com relação ao número de entradas em cada região para mesma altura e idade, não observamos diferença significativa durante o intervalo da janela 1 (Figura 20a). Na janela 2 (Figura 20b), observamos número menor de entradas no centro em relação ao fundo proximal (Kruskal-Wallis; $H = 12,690$; Tukey; $q = 4,394$; $p < 0,050$) e em relação à rampa proximal (Kruskal-Wallis; $H = 12,690$; Tukey; $q = 4,295$; $p < 0,050$).

Não observamos diferença significativa entre o número de entradas em cada região durante a janela 3 (Figura 20c) e nem durante a soma dos intervalos da janela 1 e janela 2 (Figura 20d). No intervalo da janela 2 somada à janela 3 (Figura 20e), observamos menor número de entradas no centro em relação à rampa proximal (Kruskal-Wallis; $H = 11,537$; Tukey; $q = 4,173$; $p < 0,050$) e em relação ao fundo proximal (Kruskal-Wallis; $H = 11,537$; Tukey; $q = 4,065$; $p < 0,050$). Não observamos diferença significativa entre o número de entradas em cada região durante o tempo total (Figura 20f).

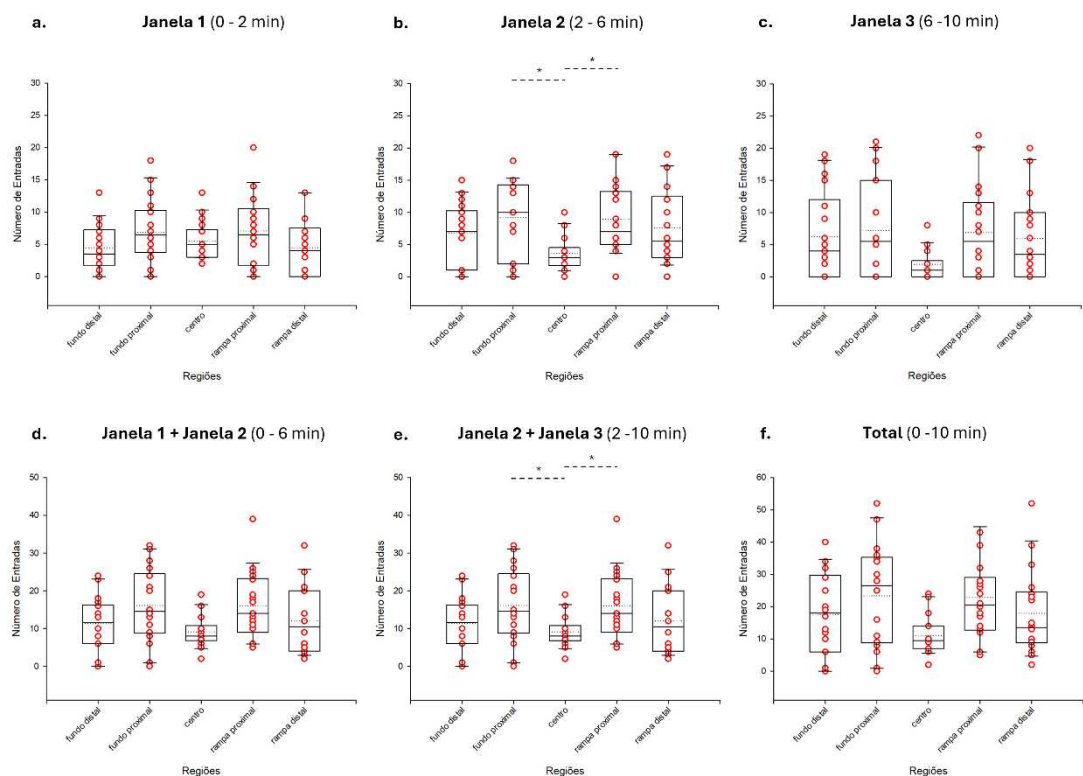


Figura 20. Número de entradas das larvas de 14dpf em cada região do aparato LCR na altura de 1.3cm de coluna d'água em diferentes intervalos. Houve diferença no número de entradas em cada região, sendo que na janela 2 (b) observamos diferença entre o fundo proximal e o centro, e entre a rampa proximal e centro; e na janela 2 + janela 3 (e) observamos diferença entre a rampa proximal e centro, e entre o fundo proximal e o centro. Não houve diferença entre as regiões durante a janela 1 (a), janela 3 (c), janela 1 + janela 2 (d) e no total (f). Os dados estão representados pelo valor da mediana, o intervalo interquartil e os valores mínimos e máximos; a linha pontilhada representa a média. Os dados foram analisados usando os testes Kruskal-Wallis e Tukey; * $p < 0.05$.

Tempo 1.5cm

Nas larvas de 14dpf em 1.5cm de coluna d'água no teste LCR durante o intervalo da janela 1 (Figura 21a), não identificamos diferença significativa entre o tempo gasto em cada uma das regiões. Durante o intervalo da janela 2 (Figura 21b), observamos que as larvas passaram menos tempo na rampa proximal (Kruskal-Wallis; $H = 19,034$; Tukey; $q = 5,246$; $p < 0,050$), no centro (Kruskal-Wallis; $H = 19,034$; Tukey; $q = 4,651$; $p < 0,050$) e na rampa distal (Kruskal-Wallis; $H = 19,034$; Tukey; $q = 3,902$; $p < 0,050$) em relação ao fundo distal. No intervalo da janela 3 (Figura 21c), identificamos menor tempo na rampa proximal (Kruskal-Wallis; $H = 18,260$; Tukey; $q = 4,683$; $p < 0,050$) e na rampa distal (Kruskal-Wallis; $H = 18,260$; Tukey; $q = 4,249$; $p < 0,050$) em relação ao fundo distal. Analisando a janela 1 em conjunto com a janela 2 (Figura 21d), observamos menor tempo gasto no fundo proximal em relação ao fundo distal (Kruskal-Wallis; $H = 15,183$; Tukey; $q = 4,719$; $p < 0,050$). Analisando o intervalo da janela 2 somada à janela 3 (Figura 21e), observamos menor tempo gasto na rampa proximal (Kruskal-Wallis; $H = 20,142$; Tukey; $q = 5,305$; $p < 0,050$), no centro (Kruskal-Wallis; $H = 20,142$; Tukey; $q = 4,633$; $p < 0,050$) e na rampa distal (Kruskal-Wallis; $H = 20,142$; Tukey; $q = 4,213$; $p < 0,050$) em relação ao fundo distal. Considerando o tempo total (Figura 21f), observamos que as larvas passaram menos tempo na rampa proximal (Kruskal-Wallis; $H = 19,128$; Tukey; $q = 5,197$; $p < 0,050$), na rampa distal (Kruskal-Wallis; $H = 19,128$; Tukey; $q = 4,222$; $p < 0,050$), e no centro (Kruskal-Wallis; $H = 19,128$; Tukey; $q = 4,186$; $p < 0,050$) em relação a fundo distal.

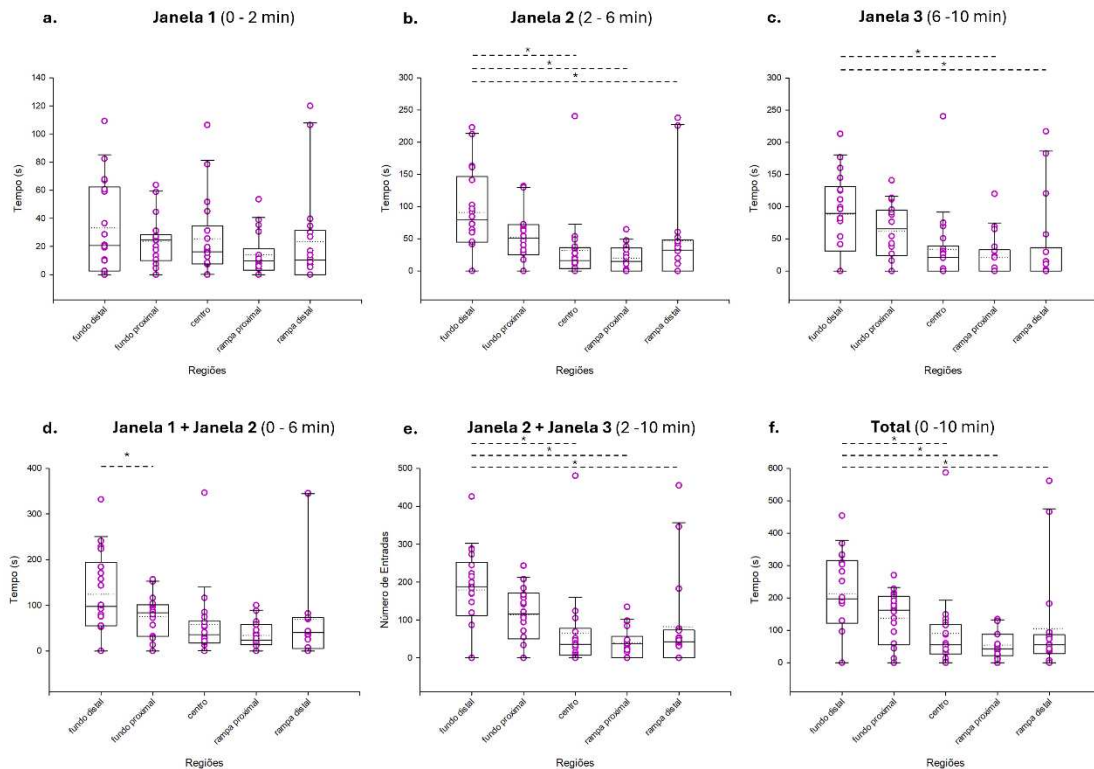


Figura 21. Tempo gasto pelas larvas de 14dpf em cada região do aparato LCR na altura de 1.5cm de coluna d'água em diferentes intervalos. Houve diferença no tempo gasto em cada região, sendo que na janela 2 (b), houve diferença entre o fundo distal e rampa proximal, entre o fundo distal e centro, e entre o fundo distal e rampa distal; na janela 3 (c) houve diferença entre o fundo distal e rampa proximal, e fundo distal e rampa distal; na janela 1 + janela 2 (d) houve diferença entre o fundo distal e o fundo proximal; na janela 2 + janela 3 (e) houve diferença entre o fundo distal e rampa proximal, fundo distal e centro, e fundo distal e rampa distal; e no total (f) houve diferença entre o fundo distal e rampa proximal, fundo distal e rampa distal, e fundo distal e centro. Os dados estão representados pelo valor da mediana, o intervalo interquartil e os valores mínimos e máximos; a linha pontilhada representa a média. Os dados foram analisados usando os testes Kruskal-Wallis e Tukey; * $p < 0.05$.

Entradas 1.5cm

Com relação ao número de entradas em cada região para mesma altura e idade, não observamos diferença significativa durante o intervalo da janela 1 (Figura 22a). Na janela 2 (Figura 22b), observamos número menor de entradas na rampa proximal (Kruskal-Wallis; $H = 17,132$; Tukey; $q = 4,755$; $p < 0,050$) e no centro (Kruskal-Wallis; $H = 17,132$; Tukey; $q = 4,177$; $p < 0,050$) em relação ao fundo proximal. Na janela 3 (Figura 22c), observamos número menor de entradas na rampa distal (Kruskal-Wallis; $H = 21,377$; Tukey; $q = 4,786$; $p < 0,050$) e na rampa proximal (Kruskal-Wallis; $H = 21,377$; Tukey; $q = 4,367$; $p < 0,050$) em relação ao fundo proximal. Observamos menor número de entradas no centro (Kruskal-Wallis; $H = 21,377$; Tukey; $q = 4,168$; p

< 0,050) em relação ao fundo proximal. Além disso, identificamos menor número de entradas na rampa distal em relação ao fundo distal (Kruskal-Wallis; $H = 21,377$; Tukey; $q = 4,010$; $p < 0,050$). Analisando o intervalo da janela 1 somada à janela 2 (Figura 22d), observamos número de entradas menor na rampa distal ($F(4,85) = 5,571$; Tukey; $p < 0,001$), no centro ($F(4,85) = 5,571$; Tukey; $p = 0,009$) e na rampa proximal ($F(4,85) = 5,571$; Tukey; $p = 0,025$) em relação ao fundo proximal. Analisando o intervalo da janela 2 somada à janela 3 (Figura 22e), observamos número de entradas menor na rampa distal (Kruskal-Wallis; $H = 22,097$; Tukey; $q = 5,210$; $p < 0,050$), no centro (Kruskal-Wallis; $H = 22,097$; Tukey; $q = 4,800$; $p < 0,050$) e na rampa proximal (Kruskal-Wallis; $H = 22,097$; Tukey; $q = 3,934$; $p < 0,050$) em relação ao fundo proximal. Também observamos número de entradas menor na rampa distal em relação ao fundo distal (Kruskal-Wallis; $H = 22,097$; Tukey; $q = 4,177$; $p < 0,050$). Analisando o tempo total (Figura 22f), identificamos número de entradas menor na rampa distal (Kruskal-Wallis; $H = 24,024$; Tukey; $q = 5,774$; $p < 0,050$), no centro (Kruskal-Wallis; $H = 24,024$; Tukey; $q = 4,926$; $p < 0,050$) e na rampa proximal (Kruskal-Wallis; $H = 24,024$; Tukey; $q = 4,137$; $p < 0,050$) em relação ao fundo proximal. Também observamos número de entradas menor na rampa distal em relação ao fundo distal (Kruskal-Wallis; $H = 24,024$; Tukey; $q = 4,371$; $p < 0,050$).

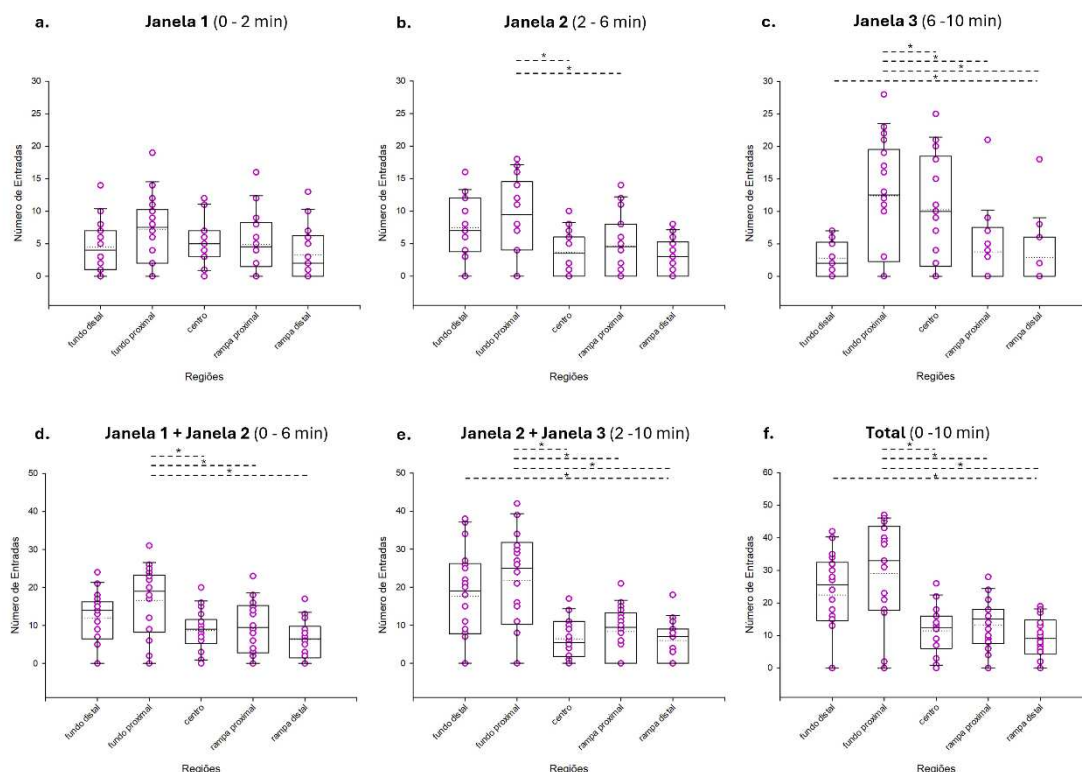


Figura 22. Número de entradas pelas larvas de 14dpf em cada região do aparato LCR na altura de 1.5cm de coluna d'água em diferentes intervalos. Não houve diferença no número de entradas em cada região durante a janela 1 (a). Houve diferença no número de entradas em cada região, sendo que na janela 2 (b) houve diferença entre o fundo proximal e rampa distal, e entre o fundo proximal e centro; na janela 3 (c) houve diferença entre o fundo proximal e rampa distal, fundo proximal e rampa proximal, fundo proximal e centro, e entre o fundo distal e rampa distal; na janela 1 + janela 2 (d), houve diferença entre o fundo proximal e rampa distal, fundo proximal e centro, e entre o fundo proximal e rampa proximal; na janela 2 + janela 3 (e) houve diferença entre o fundo proximal e rampa distal, fundo proximal e centro, fundo proximal e rampa proximal, e fundo distal e rampa distal; e no total (f) houve diferença entre o fundo proximal e rampa distal, fundo proximal e centro, fundo proximal e rampa proximal, e entre o fundo distal e rampa distal. Os dados estão representados pelo valor da mediana, o intervalo interquartil e os valores mínimos e máximos; a linha pontilhada representa a média. Os dados foram analisados usando os testes ANOVA One Way, Kruskal-Wallis e Tukey; * $p < 0.05$.

5.1.3. Larvas 21 dpf: a melhor altura para detectar o comportamento tipo-ansioso é 1.5 cm

Tempo 1.1cm

Nas larvas de 21dpf em 1.1cm de coluna d'água no teste LCR durante o intervalo da janela 1 (Figura 23a), identificamos que as larvas passaram menos tempo na rampa distal (Kruskal-Wallis; $H = 17,237$; Tukey; $q = 5,119$; $p < 0,050$) e na rampa proximal (Kruskal-Wallis; $H = 17,237$; Tukey; $q = 4,239$; $p < 0,050$) em relação ao fundo distal. Durante a janela 1 (Figura 23b), observamos menor tempo gasto no centro (Kruskal-

Wallis; $H = 19,905$; Tukey; $q = 5,867$; $p < 0,050$), na rampa proximal (Kruskal-Wallis; $H = 19,905$; Tukey; $q = 4,753$; $p < 0,050$) e na rampa distal (Kruskal-Wallis; $H = 19,905$; Tukey; $q = 4,093$; $p < 0,050$) em relação ao fundo distal. Durante a janela 3 (Figura 23c), observamos menor tempo gasto no centro (Kruskal-Wallis; $H = 32,188$; Tukey; $q = 6,850$; $p < 0,050$), na rampa proximal (Kruskal-Wallis; $H = 32,188$; Tukey; $q = 6,440$; $p < 0,050$) e na rampa distal (Kruskal-Wallis; $H = 32,188$; Tukey; $q = 5,559$; $p < 0,050$) em relação ao fundo distal. Analisando o intervalo da janela 1 somada à janela 2 (Figura 23d), observamos que as larvas passaram menos tempo no centro (Kruskal-Wallis; $H = 27,205$; Tukey; $q = 6,572$; $p < 0,050$), na rampa proximal (Kruskal-Wallis; $H = 27,205$; Tukey; $q = 5,809$; $p < 0,050$), na rampa distal (Kruskal-Wallis; $H = 27,205$; Tukey; $q = 5,427$; $p < 0,050$) e no fundo proximal (Kruskal-Wallis; $H = 27,205$; Tukey; $q = 4,122$; $p < 0,050$) em relação ao fundo distal. Analisando o intervalo da janela 2 somada à janela 3 (Figura 23e), observamos menor tempo gasto no centro (Kruskal-Wallis; $H = 30,856$; Tukey; $q = 7,085$; $p < 0,050$), na rampa proximal (Kruskal-Wallis; $H = 30,856$; Tukey; $q = 6,176$; $p < 0,050$) e na rampa distal (Kruskal-Wallis; $H = 30,856$; Tukey; $q = 5,134$; $p < 0,050$) em relação ao fundo distal. Considerando o tempo total em que o teste foi aplicado (Figura 23f), observamos menor tempo gasto no centro (Kruskal-Wallis; $H = 32,983$; Tukey; $q = 7,261$; $p < 0,050$), na rampa proximal (Kruskal-Wallis; $H = 32,983$; Tukey; $q = 6,440$; $p < 0,050$), rampa distal (Kruskal-Wallis; $H = 32,983$; Tukey; $q = 5,515$; $p < 0,050$) e fundo proximal (Kruskal-Wallis; $H = 32,983$; Tukey; $q = 3,887$; $p < 0,050$) em relação ao fundo distal.

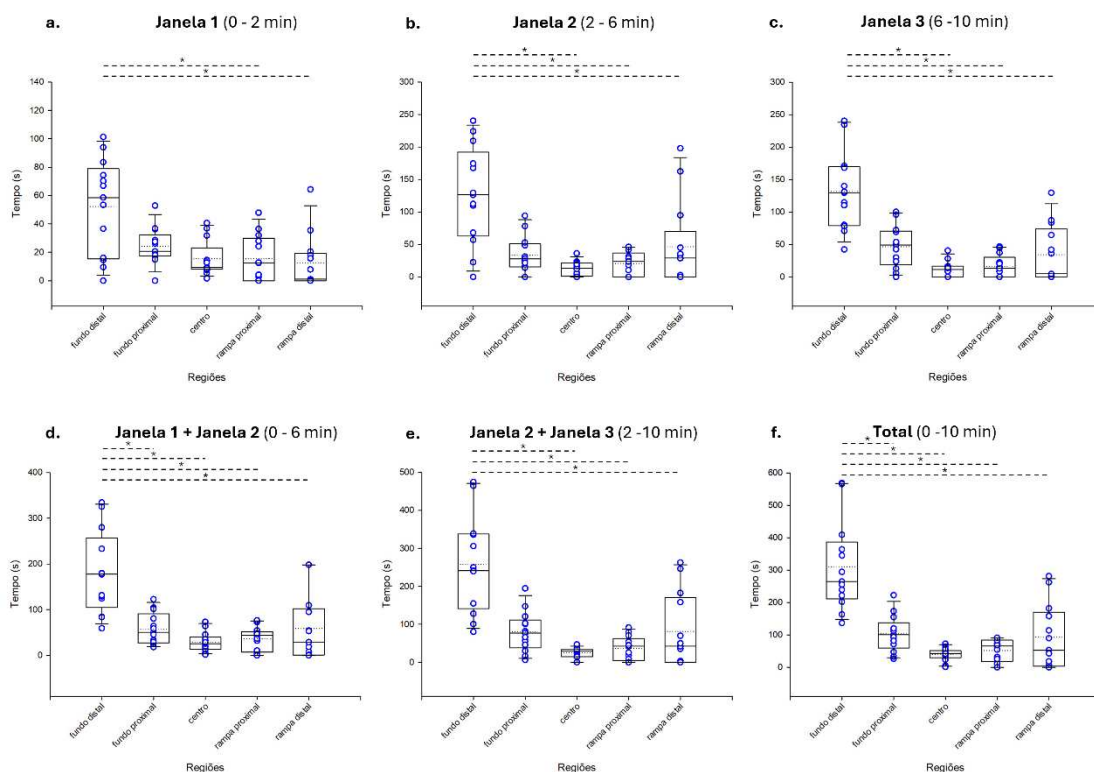


Figura 23. Tempo gasto pelas larvas de 21dpf em cada região do aparato LCR na altura de 1.1cm de coluna d'água em diferentes intervalos. Houve diferença no tempo gasto em cada região, sendo que na janela 1 (a) houve diferença entre o fundo distal e rampa distal, e entre o fundo distal e rampa proximal; na janela 2 (b) houve diferença entre o fundo distal e centro, fundo distal e rampa proximal, e fundo distal e rampa distal; na janela 3 (c) houve diferença entre o fundo distal e centro, fundo distal e rampa proximal, e entre fundo distal e rampa distal; na janela 1 + janela 2 (d) houve diferença entre o fundo distal e centro, fundo distal e rampa proximal, fundo distal e rampa distal, e entre o fundo distal e fundo proximal; na janela 2 + janela 3 (e) houve diferença entre o fundo distal e centro, fundo distal e rampa proximal, e fundo distal e rampa distal; e no total houve diferença entre o fundo distal e centro, fundo distal e rampa proximal, fundo distal e rampa distal, e entre o fundo distal e o fundo proximal. Os dados estão representados pelo valor da mediana, o intervalo interquartil e os valores mínimos e máximos; a linha pontilhada representa a média. Os dados foram analisados usando os testes Kruskal-Wallis e Tukey; * $p < 0.05$.

Entradas 1.1cm

Com relação ao número de entradas em cada região para mesma altura e idade, observamos que as larvas entraram menos na rampa distal em relação ao fundo proximal (Kruskal-Wallis; $H = 11,460$; Tukey; $q = 4,496$; $p < 0,050$) durante o intervalo da janela 1 (Figura 24a). Na janela 2 (Figura 24b), identificamos número de entradas menor na rampa proximal ($F(4,60) = 3,989$; Tukey; $p = 0,010$) e no centro ($F(4,60) = 3,989$; Tukey; $p = 0,035$) em relação ao fundo proximal. Na janela 3 (Figura 24c) observamos número de entradas menor na rampa distal (Kruskal-Wallis; $H = 19,114$;

Tukey; $q = 4,493$; $p < 0,050$) e centro (Kruskal-Wallis; $H = 19,114$; Tukey; $q = 3,939$; $p < 0,050$) em relação ao fundo proximal. Observamos também número de entradas menor na rampa distal em relação ao fundo distal (Kruskal-Wallis; $H = 19,114$; Tukey; $q = 4,188$; $p < 0,050$). Analisando o intervalo da janela 1 somada à janela 2 (Figura 24d), observamos número de entradas menor na rampa distal ($F(4,60) = 4,428$; Tukey; $p = 0,001$) em relação ao fundo proximal. Analisando o intervalo da janela 2 somada à janela 3 (Figura 24e), observamos número de entradas menor na rampa distal ($F(4,60) = 8,595$; Tukey; $p < 0,001$), no centro ($F(4,60) = 8,595$; Tukey; $p < 0,001$) e rampa proximal ($F(4,60) = 4,428$; Tukey; $p = 0,004$) em relação ao fundo proximal. Além disso, observamos número de entradas menor na rampa distal ($F(4,60) = 4,428$; Tukey; $p = 0,006$) e no centro ($F(4,60) = 4,428$; Tukey; $p = 0,034$) em relação ao fundo distal nesse mesmo intervalo. Na análise do tempo total (Figura 24f) identificamos um número de entradas menor na rampa distal ($F(4,60) = 9,692$; Tukey; $p < 0,001$), no fundo distal ($F(4,60) = 9,692$; Tukey; $p = 0,001$) e na rampa proximal ($F(4,60) = 9,692$; Tukey; $p = 0,004$) em relação ao fundo proximal. Além disso, observamos número de entradas menor na rampa distal em relação ao centro ($F(4,60) = 9,692$; Tukey; $p = 0,002$).

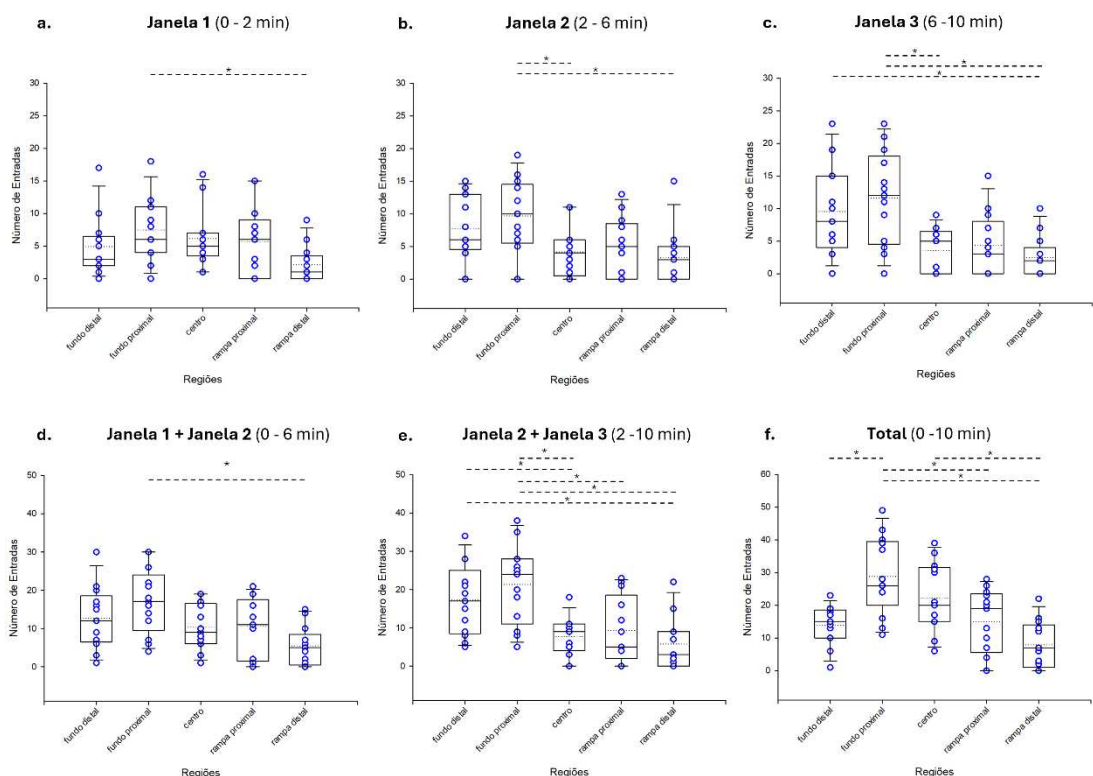


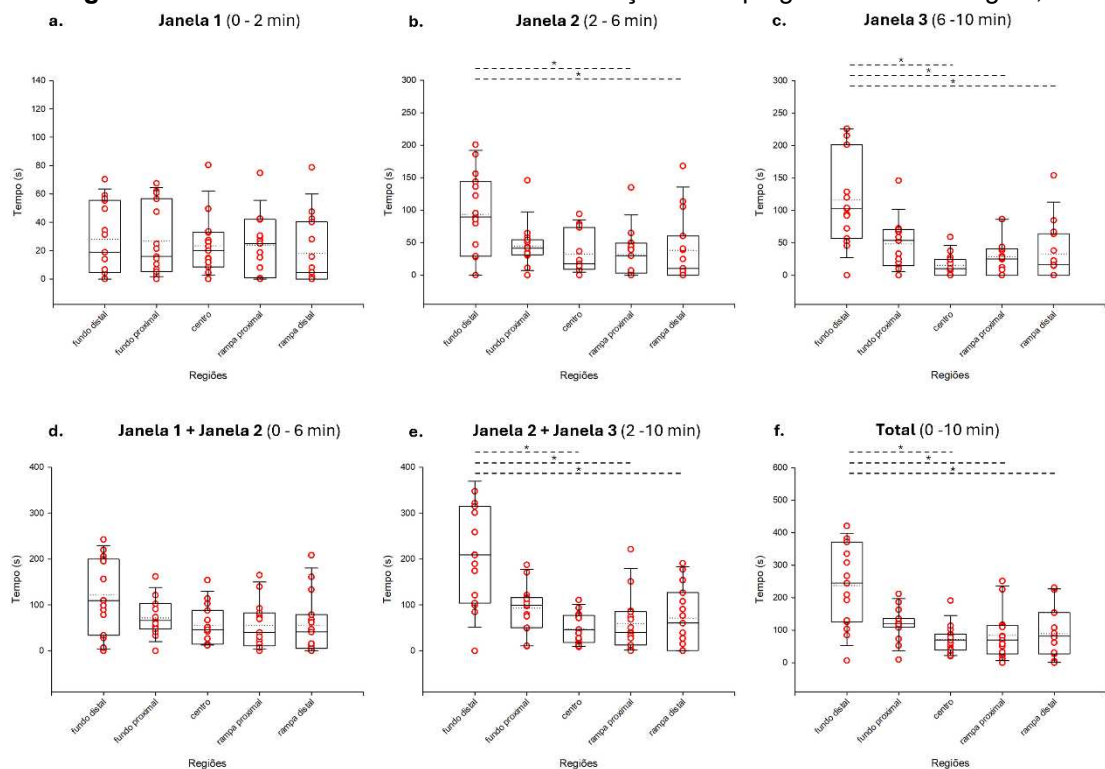
Figura 24. Número de entradas das larvas de 21dpf em cada região do aparato LCR na altura de 1.1cm de coluna d'água em diferentes intervalos. Houve diferença no número de entradas em cada região, sendo que na janela 1 (a) houve diferença entre o fundo proximal e rampa distal; na janela 2 (b) houve diferença entre o fundo proximal e rampa distal, e entre o fundo proximal e centro; na janela 3 (c) houve diferença entre o fundo proximal e rampa distal, fundo proximal e centro, e entre o fundo distal e rampa distal; na janela 1 + janela 2 (d) houve diferença entre o fundo proximal e rampa distal; na janela 2 + janela 3 (e) houve diferença entre o fundo proximal e rampa distal, fundo proximal e centro, fundo proximal e rampa proximal, fundo distal e rampa distal, e fundo distal e centro; e no total (f) houve diferença entre o fundo proximal e rampa distal, fundo proximal e fundo distal, fundo proximal e rampa proximal, e entre o centro e rampa distal. Os dados estão representados pelo valor da mediana, o intervalo interquartil e os valores mínimos e máximos; a linha pontilhada representa a média. Os dados foram analisados usando os testes ANOVA One-Way, Kruskal-Wallis e Tukey; * $p < 0.05$.

Tempo 1.3cm

Nas larvas de 21dpf em 1.3cm de coluna d'água no teste LCR durante o intervalo da janela 1 (Figura 25a) não identificamos diferença significativa entre o tempo gasto nas regiões. Na janela 2 (Figura 25b), observamos que as larvas passaram menos tempo na rampa distal (Kruskal-Wallis; $H = 11,740$; Tukey; $q = 4,069$; $p < 0,050$) e na rampa proximal (Kruskal-Wallis; $H = 11,740$; Tukey; $q = 3,892$; $p < 0,050$) em relação ao fundo distal. Na janela 3 (Figura 25c), observamos menor tempo gasto no centro (Kruskal-Wallis; $H = 25,602$; Tukey; $q = 6,504$; $p < 0,050$), na rampa distal (Kruskal-Wallis; $H = 25,602$; Tukey; $q = 5,189$; $p < 0,050$) e na rampa proximal (Kruskal-Wallis; $H = 25,602$;

Tukey; $q = 4,999$; $p < 0,050$) em relação ao fundo distal. No intervalo da janela 1 somada à janela 2 (Figura 25d) não identificamos diferença significativa entre o tempo gasto em cada região. No intervalo da janela 2 somada a janela 3 (Figura 25e), observamos menos tempo gasto no centro (Kruskal-Wallis; $H = 23,287$; Tukey; $q = 5,841$; $p < 0,050$), na rampa proximal (Kruskal-Wallis; $H = 23,287$; Tukey; $q = 5,485$; $p < 0,050$) e na rampa distal (Kruskal-Wallis; $H = 23,287$; Tukey; $q = 4,857$; $p < 0,050$) em relação ao fundo distal. Fazendo análise do tempo total (Figura 25f), observamos tempo gasto menor no centro (Kruskal-Wallis; $H = 22,847$; Tukey; $q = 5,687$; $p < 0,050$), na rampa proximal (Kruskal-Wallis; $H = 22,847$; Tukey; $q = 5,230$; $p < 0,050$) e na rampa distal (Kruskal-Wallis; $H = 22,847$; Tukey; $q = 4,804$; $p < 0,050$) em relação ao fundo distal.

Figura 25. Tempo gasto pelas larvas de 21dpf em cada região do aparato LCR na altura de 1.3cm de coluna d'água em diferentes intervalos. Houve diferença no tempo gasto em cada região, sendo



que na janela 2 (b) houve diferença entre o fundo distal e rampa distal, e entre o fundo distal e rampa proximal; na janela 3 (c) houve diferença entre fundo distal e centro, fundo distal e rampa distal, e entre o fundo distal e rampa proximal; na janela 2 + janela 3 (e) houve diferença entre fundo distal e centro, fundo distal e rampa proximal, e entre o fundo distal e rampa distal; e no total (f) houve diferença entre o fundo distal e centro, fundo distal e rampa proximal, fundo distal e rampa distal. Não houve diferença no tempo gasto em cada região durante o período da janela 1 (a) e janela 1 + janela 2. Os dados estão representados pelo valor da mediana, o intervalo interquartil e os valores mínimos e máximos; a linha

pontilhada representa a média. Os dados foram analisados usando os testes ANOVA One-Way, Kruskal-Wallis e Tukey; * $p < 0.05$.

Entradas 1.3cm

Com relação ao número de entradas em cada região para mesma altura e idade, durante o intervalo da janela 1 (Figura 26a) não observamos diferença entre o número de entradas em cada região. Na janela 2 (Figura 26b), observamos número menor de entradas na rampa distal em relação ao fundo proximal (Kruskal-Wallis; $H = 12,636$; Tukey; $q = 4,531$; $p < 0,050$). Na janela 3 (Figura 26c), observamos menos entradas na rampa distal (Kruskal-Wallis; $H = 17,097$; Tukey; $q = 4,875$; $p < 0,050$) e no centro (Kruskal-Wallis; $H = 17,097$; Tukey; $q = 3,910$; $p < 0,050$) em relação ao fundo proximal; e menos entradas na rampa distal em relação ao fundo distal (Kruskal-Wallis; $H = 17,097$; Tukey; $q = 3,886$; $p < 0,050$). No intervalo da janela 1 somada à janela 2 (Figura 26d) não identificamos diferença significativa entre o número de entradas em cada região. No intervalo da janela 2 somada a janela 3 (Figura 26e), observamos menos entradas na rampa distal (Kruskal-Wallis; $H = 18,385$; Tukey; $q = 5,260$; $p < 0,050$) e no centro (Kruskal-Wallis; $H = 18,385$; Tukey; $q = 3,892$; $p < 0,050$) em relação ao fundo proximal; e menos entradas no centro em relação ao fundo proximal (Kruskal-Wallis; $H = 18,385$; Tukey; $q = 4,064$; $p < 0,050$). No tempo total (Figura 26f), observamos menos entradas na rampa distal ($F(4,70) = 4,460$; Tukey; $p = 0,002$) e no centro ($F(4,70) = 4,460$; Tukey; $p = 0,031$) em relação ao fundo proximal.

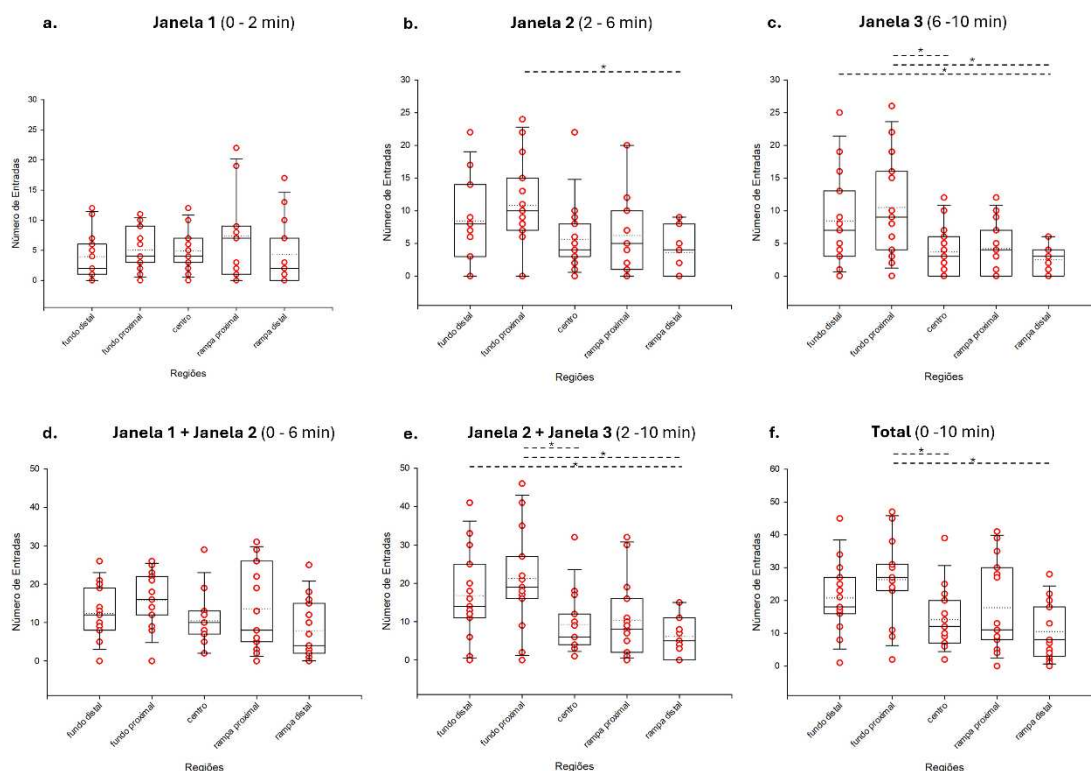


Figura 26. Número de entradas das larvas de 21dpf em cada região do aparato LCR na altura de 1.3cm de coluna d'água em diferentes intervalos. Houve diferença no número de entradas em cada região, sendo que na janela 2 (b) houve diferença entre o fundo proximal e rampa distal; na janela 3 (c) houve diferença entre o fundo proximal e rampa distal, fundo proximal e centro, e entre o fundo distal e rampa distal; na janela 2 + janela 3 (e), houve diferença entre o fundo proximal e rampa distal, fundo proximal e centro, e entre o fundo distal e rampa distal; e no total (f) houve diferença entre o fundo proximal e rampa distal, e entre o fundo proximal e centro. Não houve diferença no número de entradas nas regiões durante a janela 1 (a) e janela 1 + janela 2 (d). Os dados estão representados pelo valor da mediana, o intervalo interquartil e os valores mínimos e máximos; a linha pontilhada representa a média. Os dados foram analisados usando os testes ANOVA One-Way, Kruskal-Wallis e Tukey; * $p < 0.05$.

Tempo 1.5cm

Nas larvas de 21dpf em 1.5cm de coluna d'água no teste LCR durante o intervalo da janela 1 (Figura 27a) não observamos diferença entre o tempo gasto nas diferentes regiões do aparato. Na janela 2 (Figura 27b), identificamos que as larvas passaram menos tempo na rampa proximal (Kruskal-Wallis; $H = 23,604$; Tukey; $q = 5,364$; $p < 0,05$), no centro (Kruskal-Wallis; $H = 23,604$; Tukey; $q = 5,326$; $p < 0,05$) e na rampa distal (Kruskal-Wallis; $H = 23,604$; Tukey; $q = 4,592$; $p < 0,05$) em relação ao fundo distal. Na janela 3 (Figura 27b), observamos que as larvas passaram menos tempo na rampa distal (Kruskal-Wallis; $H = 34,006$; Tukey; $q = 5,975$; $p < 0,05$), no centro (Kruskal-Wallis; $H = 34,006$; Tukey; $q = 5,580$; $p < 0,05$) e na rampa proximal (Kruskal-

Wallis; $H = 34,006$; Tukey; $q = 5,401$; $p < 0,05$) em relação ao fundo distal. Além disso, passaram menos tempo na rampa distal (Kruskal-Wallis; $H = 34,006$; Tukey; $q = 5,241$; $p < 0,05$), no centro (Kruskal-Wallis; $H = 34,006$; Tukey; $q = 4,846$; $p < 0,05$) e na rampa proximal (Kruskal-Wallis; $H = 34,006$; Tukey; $q = 4,667$; $p < 0,05$) em relação ao fundo proximal. Na análise conjunta das janelas 1 e 2 (Figura 27d), identificamos menor tempo na rampa proximal (Kruskal-Wallis; $H = 20,067$; Tukey; $q = 5,006$; $p < 0,05$), na rampa distal (Kruskal-Wallis; $H = 20,067$; Tukey; $q = 4,630$; $p < 0,05$) e no centro (Kruskal-Wallis; $H = 20,067$; Tukey; $q = 4,103$; $p < 0,05$) em relação ao fundo distal. Já na análise da janela 2 somada à janela 3 (Figura 27e) observamos tempo gasto menor na rampa distal (Kruskal-Wallis; $H = 30,868$; Tukey; $q = 5,966$; $p < 0,05$), rampa proximal (Kruskal-Wallis; $H = 30,868$; Tukey; $q = 5,637$; $p < 0,05$) e centro (Kruskal-Wallis; $H = 30,868$; Tukey; $q = 4,987$; $p < 0,05$) em relação ao fundo distal. O tempo gasto também foi menor na rampa distal (Kruskal-Wallis; $H = 30,868$; Tukey; $q = 4,865$; $p < 0,05$), na rampa proximal (Kruskal-Wallis; $H = 30,868$; Tukey; $q = 4,536$; $p < 0,05$) e no centro (Kruskal-Wallis; $H = 30,868$; Tukey; $q = 3,886$; $p < 0,05$) em relação ao fundo proximal. No tempo total do teste (Figura 27f), observamos tempo gasto menor na rampa proximal (Kruskal-Wallis; $H = 30,887$; Tukey; $q = 5,853$; $p < 0,05$), na rampa distal (Kruskal-Wallis; $H = 30,887$; Tukey; $q = 5,740$; $p < 0,05$) e no centro (Kruskal-Wallis; $H = 30,887$; Tukey; $q = 5,401$; $p < 0,05$) em relação ao fundo distal. O tempo também foi menor na rampa proximal (Kruskal-Wallis; $H = 30,887$; Tukey; $q = 4,498$; $p < 0,05$), rampa distal (Kruskal-Wallis; $H = 30,887$; Tukey; $q = 4,385$; $p < 0,05$) e centro (Kruskal-Wallis; $H = 30,887$; Tukey; $q = 4,046$; $p < 0,05$) em relação ao fundo proximal.

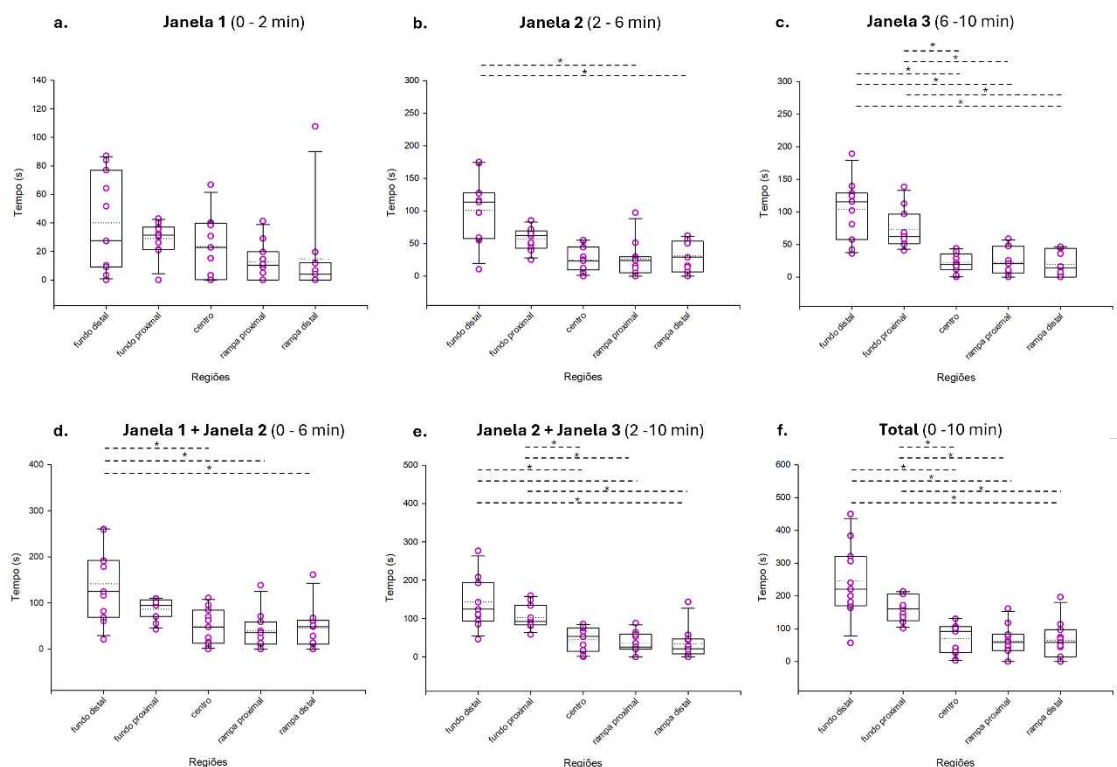


Figura 27. Tempo gasto pelas larvas de 21dpf em cada região do aparato LCR na altura de 1.5cm de coluna d'água em diferentes intervalos. Não houve diferença no tempo gasto em cada região durante a janela 1 (a). Houve diferença no número de entradas em cada região, sendo que na janela 2 (b) houve diferença entre o fundo distal e rampa proximal, fundo distal e centro, e entre o fundo distal e rampa distal; na janela 3 (c) houve diferença entre o fundo distal e rampa distal, fundo distal e centro, fundo distal e rampa proximal, fundo proximal e rampa distal, fundo proximal e centro, e entre o fundo proximal e rampa proximal; na janela 1 + janela 2 (d) houve diferença entre o fundo distal e rampa proximal, fundo distal e rampa distal, e entre fundo distal e centro; na janela 2 + janela 3 (e) houve diferença entre o fundo distal e rampa distal, fundo distal e rampa proximal, fundo distal e centro, fundo proximal e rampa distal, fundo proximal e rampa proximal, e fundo proximal e centro; e no tempo total (f) houve diferença entre fundo distal e rampa proximal, fundo distal e rampa distal, fundo distal e centro, fundo proximal e rampa proximal, fundo proximal e rampa distal, e fundo proximal e centro. Os dados estão representados pelo valor da mediana, o intervalo interquartil e os valores mínimos e máximos; a linha pontilhada representa a média. Os dados foram analisados usando os testes ANOVA One-Way, Kruskal-Wallis e Tukey; * $p < 0.05$.

Entradas 1.5cm

Com relação ao número de entradas em cada região para mesma altura e idade, no intervalo da janela 1 (Figura 28a) observamos menos entradas na rampa distal ($F(4,50) = 5,567$; Tukey; $p < 0,001$) e na rampa proximal ($F(4,50) = 5,567$; Tukey; $p = 0,046$) em relação ao fundo proximal. Observamos também, menos entradas na rampa distal em relação ao centro no mesmo intervalo ($F(4,50) = 5,567$; Tukey; p

0,046). Na janela 2 (Figura 28b) identificamos menos entradas na rampa distal ($F(4,50) = 8,329$; Tukey; $p < 0,001$), na rampa proximal ($F(4,50) = 8,329$; Tukey; $p = 0,001$) e no centro ($F(4,50) = 8,329$; Tukey; $p = 0,006$) em relação ao fundo proximal. Em relação ao fundo distal, há menos entradas na rampa distal ($F(4,50) = 8,329$; Tukey; $p = 0,023$). Na janela 3 (Figura 28c) identificamos menos entradas na rampa distal (Kruskal-Wallis; $H = 19,740$; Tukey; $q = 5,439$; $p < 0,05$), no centro (Kruskal-Wallis; $H = 19,740$; Tukey; $q = 4,319$; $p < 0,05$) e na rampa proximal (Kruskal-Wallis; $H = 19,740$; Tukey; $q = 4,075$; $p < 0,05$) em relação ao fundo proximal. No intervalo que compreende a janela 1 somada à janela 2 (Figura 28d), identificamos menos entradas na rampa distal ($F(4,50) = 8,088$; Tukey; $p < 0,001$), na rampa proximal ($F(4,50) = 8,088$; Tukey; $p = 0,003$) e no centro ($F(4,50) = 8,088$; Tukey; $p = 0,028$) em relação ao fundo proximal. O número de entradas na rampa distal foi menor em relação ao fundo distal ($F(4,50) = 8,088$; Tukey; $p < 0,026$). No intervalo que compreende a janela 2 e a janela 3 (Figura 28e), observamos número menor de entradas na rampa distal ($F(4,50) = 12,859$; Tukey; $p < 0,001$), na rampa proximal ($F(4,50) = 12,859$; Tukey; $p < 0,001$) e no centro ($F(4,50) = 12,859$; Tukey; $p < 0,001$) em relação ao fundo proximal. Em relação ao fundo distal, há menos entradas na rampa distal ($F(4,50) = 12,859$; Tukey; $p = 0,003$). No tempo total do teste (Figura 28f), observamos número menor de entradas na rampa distal ($F(4,50) = 13,245$; Tukey; $p < 0,001$), na rampa proximal ($F(4,50) = 13,245$; Tukey; $p < 0,001$), no centro ($F(4,50) = 13,245$; Tukey; $p < 0,001$) e no fundo distal ($F(4,50) = 13,245$; Tukey; $p = 0,049$) em relação ao fundo proximal. Além disso, observamos menos entradas na rampa distal em relação ao fundo distal ($F(4,50) = 13,245$; Tukey; $p = 0,002$).

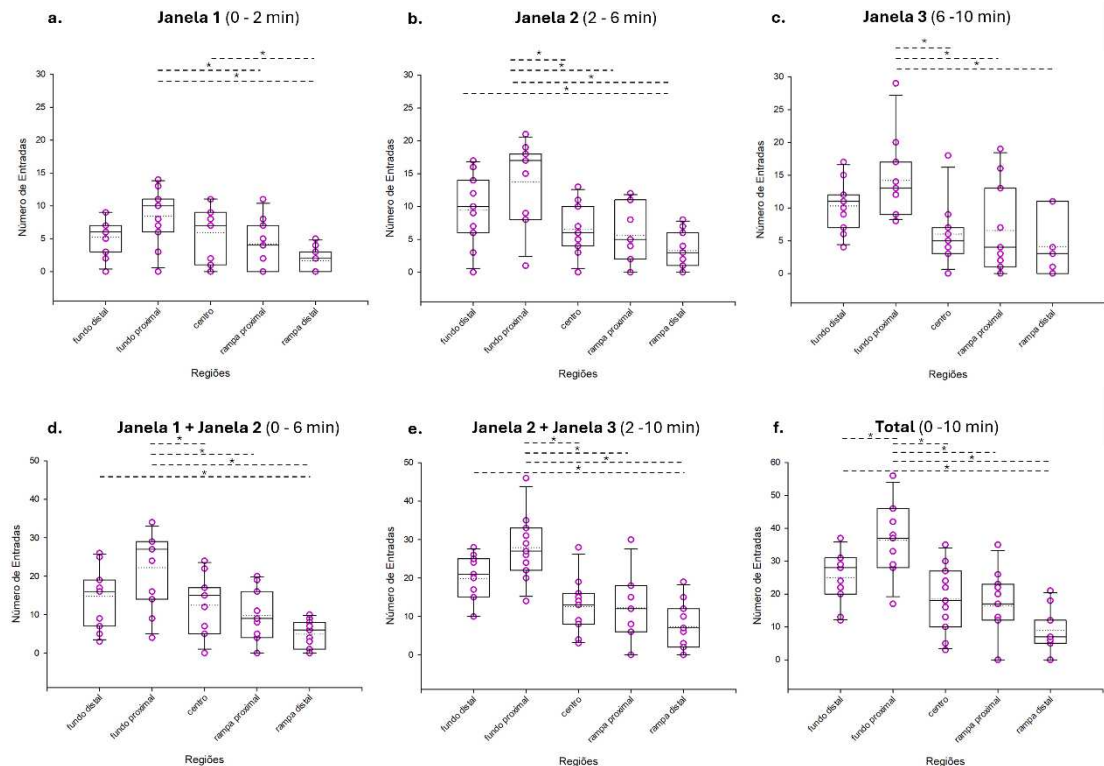


Figura 28. Número de entradas das larvas de 21dpf em cada região do aparato LCR na altura de 1.5cm de coluna d'água em diferentes intervalos. Houve diferença no número de entradas em cada região, sendo que na janela 1 (a) houve diferença entre o fundo proximal e rampa distal, fundo proximal e rampa proximal, e entre o centro e a rampa distal; na janela 2 (b) houve diferença entre o fundo proximal e rampa distal, fundo proximal e rampa proximal, fundo proximal e centro, e entre o fundo distal e rampa distal; na janela 3 (c) houve diferença entre o fundo proximal e rampa distal, fundo proximal e centro, fundo proximal e rampa proximal; na janela 1 + janela 2 (d) houve diferença entre o fundo proximal e rampa distal, fundo proximal e rampa proximal, fundo proximal e centro, e entre o fundo distal e rampa distal; na janela 2 + janela 3 (e) houve diferença entre o fundo proximal e a rampa distal, fundo proximal e rampa proximal, fundo proximal e centro, e entre o fundo distal e rampa distal; e no total (f) houve diferença entre o fundo proximal e rampa distal, fundo proximal e rampa proximal, fundo proximal e centro, fundo proximal e fundo distal, e entre o fundo distal e rampa distal. Os dados estão representados pelo valor da mediana, o intervalo interquartil e os valores mínimos e máximos; a linha pontilhada representa a média. Os dados foram analisados usando os testes ANOVA One-Way, Kruskal-Wallis e Tukey; * $p < 0.05$.

5.2. Larvas de 5 e 21 dpf evitam região escura no teste Claro/Escuro

Nas larvas de 5dpf no teste CE (Fig. 29a) durante o período do teste observamos diferença entre o tempo gasto nas diferentes regiões do aparato. Identificamos que as larvas passaram em média menos tempo no escuro em relação ao claro (Teste t one-sample; média_{claro} = 251,740 seg; média_{escuro} = 49,059 seg; SD = 110,326; $p < 0,001$). Nas larvas de 21dpf no teste CE (Fig. 29b) durante o período total de aplicação

também observamos diferença significativa entre as médias de tempo gasto nas diferentes regiões do aparato (Teste t one-sample; média_{claro} = 286,984 seg; média_{escuro} = 13,765 seg; SD = 26,709; $p < 0,001$).

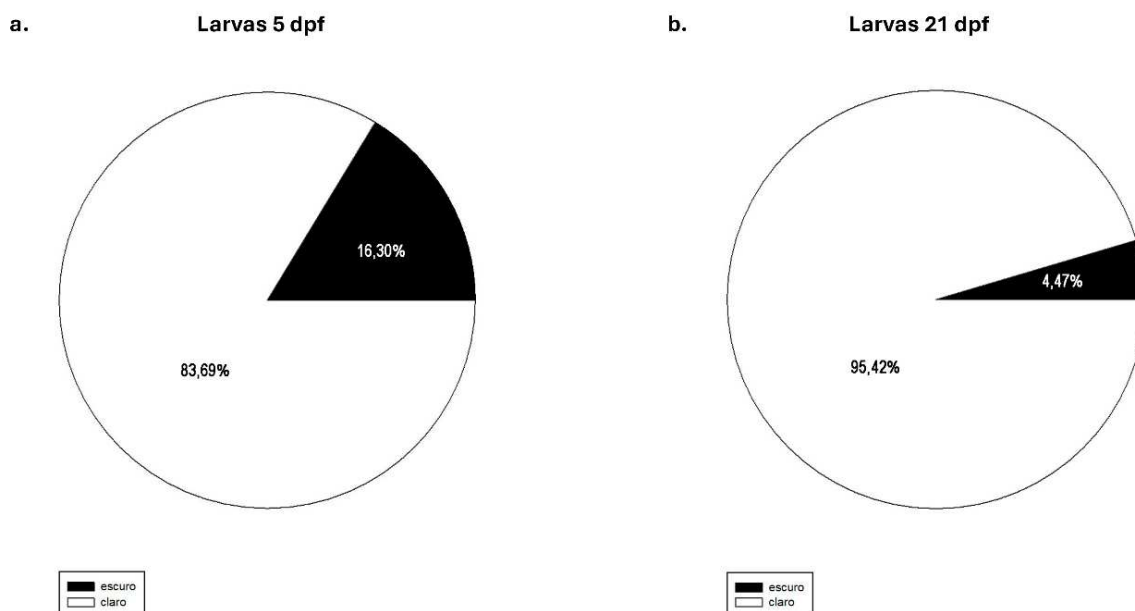


Figura 29. Tempo gasto pelas larvas em cada região do aparato do teste claro/escuro aos 5 dpf e 21 dpf. As larvas de 5dpf (a) passaram em média 83,69% do tempo do teste na região clara e 16,30% na região escura. As larvas de 21dpf (b) passaram em média 95,42% do tempo do teste na região clara e 4,47% na região escura. Os dados estão representados em gráfico de pizza e foram analisados usando o teste t Student.

6. Discussão

Os transtornos de ansiedade são condições complexas e multifatoriais que afetam milhões de pessoas em todo o mundo. Compreender a emergência e os mecanismos subjacentes a esses transtornos é fundamental para o desenvolvimento de tratamentos eficazes. Tradicionalmente, os estudos sobre ansiedade têm utilizado modelos animais como camundongos, que permitem a investigação de comportamentos tipo-ansiosos em paradigmas como o labirinto em cruz elevado e o teste de campo aberto (Crawley, 2007). No entanto, o zebrafish (*Danio rerio*) tem se destacado como um bom modelo para estudos de comportamento, desenvolvimento e neurociência (Kalueff et al., 2014).

Neste estudo, investigamos a capacidade do teste LCR em detectar comportamentos tipo-ansiosos em larvas de zebrafish em diferentes estágios do desenvolvimento (5, 14 e 21 dpf), visando investigar a ontogenia do comportamento tipo ansioso em larvas de zebrafish, testando os parâmetros de altura de coluna d'água e duração do teste

para cada estágio do desenvolvimento. Para isso, analisamos o comportamento das larvas no LCR e no teste CE, já validado para avaliação de ansiedade em zebrafish.

A idade de 5 dpf foi selecionada por representar um estágio crítico do desenvolvimento larval, anterior à alimentação exógena, o que permite eliminar variáveis relacionadas à microbiota intestinal. A colonização microbiana influencia significativamente respostas comportamentais através do eixo intestino-cérebro (Davis et al., 2016). Assim, a escolha de larvas não alimentadas assegura que os fenótipos observados refletem primariamente mecanismos neurodesenvolvimentais inatos, e não variações induzidas por fatores externos.

Nossos resultados demonstraram que a altura da coluna d'água influencia significativamente a exploração das larvas no LCR. Para larvas de 5dpf, a altura de 1,3 cm foi a mais adequada, enquanto para larvas de 14 e 21 dpf, a altura de 1,5 cm permitiu uma distinção mais clara entre a exploração dos braços com rampa e as demais regiões do aparato. Essas alturas foram escolhidas por representarem uma condição em que o comportamento tipo-ansioso se manifesta de forma mais evidente nas janelas de tempo analisadas, enquanto nas demais a aversão aos braços com rampa ficava menos evidente, reduzindo a sensibilidade do teste.

Para larvas de 5 dpf, a menor altura da coluna d'água (1,3 cm) mostrou ser mais adequada, possivelmente devido ao desenvolvimento incompleto da bexiga natatória, uma estrutura essencial para a flutuabilidade e controle de profundidade em peixes (Venuto et al., 2023). Nesta fase, as larvas dependem mais de movimentos corporais ativos para nadar, e alturas excessivas podem comprometer sua capacidade de explorar o ambiente de forma diferenciada. A escolha de 1,3 cm otimiza a percepção do gradiente de profundidade sem sobrecarregar mecanismos natatórios imaturos, permitindo que a aversão a áreas rasas (associadas a risco) seja expressa de forma mensurável. Assim, escolhemos as alturas que ofereceram condições em que as larvas passaram significativamente menos tempo nos braços com rampa, um comportamento consistente com a evitação de risco e, portanto, indicativo de um estado tipo-ansioso (Maximino et al., 2010). Essa abordagem está alinhada com as recomendações metodológicas para validação de testes comportamentais em modelos animais, que enfatizam a importância de calibrar cuidadosamente os parâmetros experimentais para otimizar a sensibilidade e especificidade dos testes (Meshalkina et al., 2017).

Do ponto de vista etológico, as alturas selecionadas (1,3 cm para 5 dpf; 1,5 cm para 14/21 dpf) representam um "desafio ótimo", um conceito que define condições experimentais onde o animal é exposto a estímulos ecologicamente relevantes que eliciam respostas adaptativas sem induzir imobilidade ou pânico (Gerlai, 2017). Esse equilíbrio é crucial para discriminar comportamentos ao simular situações ecologicamente relevantes onde o animal precisa balancear a motivação de explorar com a percepção do risco. Nesse contexto, observamos uma resposta caracterizada pela redução seletiva na exploração dos braços com rampa, refletindo um mecanismo adaptativo de avaliação de risco, onde o potencial perigo (exposição a predadores) supera a motivação de explorar. Essa interpretação é consistente com estudos prévios em larvas de zebrafish que demonstraram a capacidade de resposta a estímulos aversivos já a partir de 5 dpf (Richendrfer et al., 2012), bem como trabalhos que estabeleceram parâmetros ótimos para avaliação comportamental em diferentes estágios de desenvolvimento (MacPhail et al., 2009; Schnörr et al., 2012).

A habituação é um processo comportamental fundamental que permite aos animais reduzirem sua resposta a estímulos repetidos ou contínuos, facilitando a adaptação a novos ambientes (Rankin et al., 2009). Em modelos animais como camundongos, a habituação é frequentemente utilizada em testes comportamentais para minimizar o impacto do estresse inicial e garantir que os comportamentos observados reflitam o estado basal do animal (Crawley, 2007). No entanto, em zebrafish, especialmente em larvas, a necessidade de um período de habituação ainda é debatida.

Foi demonstrado que a habituação prévia pode ser contraproducente em testes que dependem da resposta à novidade, como o teste de preferência por novidade ou paradigmas de aprendizagem espacial (Stewart et al., 2015). Nestes casos, a exposição inicial não-habituada captura respostas mais robustas aos estímulos novos, que são fundamentais para avaliar comportamentos exploratórios e de avaliação de risco (Wong et al., 2010). Contudo, para testes que avaliam a ansiedade basal ou respostas a longo prazo, períodos curtos de habituação mostraram melhorar a confiabilidade dos resultados (Cachat et al., 2011).

Nossos resultados demonstraram que, mesmo sem um período de habituação prévia, o LCR foi capaz de detectar diferenças significativas na exploração das regiões do aparato já nos primeiros minutos do teste. Esse achado está em consonância com estudos que sugerem que larvas de zebrafish respondem rapidamente a novos

estímulos e podem não exigir um período prolongado de habituação (Colwill & Creton, 2011; Wong et al., 2010). Isso pode estar relacionado a características neurocomportamentais específicas do estágio larval de zebrafish (Rihel et al., 2010), repertório comportamental mais limitado, sua rápida capacidade de adaptação a novos ambientes (Maximino et al., 2010), bem como ao próprio design do aparato, que parece induzir uma exploração imediata e com diferenças entre os braços.

O período de 6 minutos pode ser suficiente para a avaliação do comportamento tipo-ansioso nas larvas tendo como base a análise por intervalos, que revelou que os padrões comportamentais característicos já estavam estabelecidos nos primeiros minutos, além de que períodos mais longos podem introduzir ruídos aos resultados por interferências de outras variáveis, como habituação excessiva (MacPhail et al., 2009). Essa duração permite capturar respostas comportamentais robustas enquanto minimiza o estresse cumulativo.

Outro ponto é que esses testes comportamentais utilizados para avaliar ansiedade em modelos animais, como o labirinto em cruz com rampa (LCR) e o teste de claro/escuro (CE), são baseados em paradigmas de conflito aproximação-evitação, onde o animal é exposto a uma escolha entre explorar um ambiente potencialmente perigoso (aproximação) ou evitar riscos (evitação) (Blanchard et al., 2003). Esses comportamentos podem ser classificados em dois tipos principais: evitação ativa e evitação passiva. A evitação ativa ocorre quando o animal se afasta ativamente de um estímulo ou ambiente aversivo, como a fuga de um predador. Esse tipo de comportamento é mediado por circuitos neurais associados ao medo e à resposta de luta ou fuga, envolvendo estruturas como a amígdala e o hipotálamo (LeDoux, 2000). Em contraste, a evitação passiva envolve a contenção da exploração ou a imobilidade em resposta a um estímulo aversivo, como a preferência por áreas claras no teste de claro/escuro ou a redução da exploração de braços abertos no labirinto em cruz elevado (Rodgers & Dalvi, 1997). A evitação passiva está mais associada a estados de ansiedade, onde o animal avalia o risco antes de agir, e envolve circuitos neurais como o córtex pré-frontal e o hipocampo (Graeff, 2004).

No presente estudo, observamos comportamentos que podem ser interpretados como evitação passiva no LCR, uma vez que observamos um tempo maior e maior número de entradas nos braços fundo em comparação com os braços com rampa. Esse padrão de comportamento é consistente com a ideia de que os animais estão

avaliando o risco associado à exploração de áreas rasas, que podem ser percebidas como mais perigosas devido ao maior risco de predação ou exposição (Maximino et al., 2010). Além disso, no teste de claro/escuro, a preferência pela área clara também reflete um comportamento de evitação passiva, onde a contenção da exploração é interpretada como um indicador de ansiedade (Stewart et al., 2014).

A distinção entre evitação ativa e passiva é particularmente relevante para a interpretação dos resultados de testes comportamentais, pois permite diferenciar respostas mediadas por medo (evitação ativa) daquelas mediadas por ansiedade (evitação passiva) (Blanchard et al., 2003). No caso do LCR, a evitação passiva observada sugere que o teste é sensível a comportamentos tipo-ansiosos, enquanto a ausência de respostas de fuga ou esquiva ativa indica que o paradigma pode não ser adequado para avaliar comportamentos mediados por medo. Essa distinção é importante para a validação do LCR como uma ferramenta específica para o estudo da ansiedade em larvas de zebrafish.

Este estudo representa um avanço importante na compreensão da ontogenia do comportamento tipo-ansioso em larvas de zebrafish, utilizando da validação do LCR como uma ferramenta para avaliação comportamental, mas também como um meio de investigar o desenvolvimento de respostas a contextos aversivos durante as fases iniciais do desenvolvimento. A padronização dos parâmetros de altura da coluna d'água e duração do teste facilita a replicação do método e possibilita a análise de perfis comportamentais distintos ao longo do desenvolvimento. Além disso, a comparação com o teste de claro/escuro reforça a validade do LCR como um paradigma complementar para estudos de ansiedade.

Nossos resultados transcendem o aspecto técnico e metodológico, indicando os próximos passos da pesquisa, que consistem na validação farmacológica do teste, investigando como fármacos ansiolíticos e ansiogênicos modulam diferencialmente o comportamento em cada estágio desenvolvimental; marcação celular em diferentes regiões cerebrais que são ativadas durante a aplicação do teste; e a caracterização temporal da maturação e influência da atividade de sistemas neurotransmissores (ex.: dopaminérgico) que podem estar intimamente relacionados com a manifestação desses comportamentos.

7. Conclusão

Os dados apresentados neste estudo demonstram evidências iniciais importantes sobre a possibilidade de investigar a ontogenia do comportamento tipo-ansioso em larvas de zebrafish, por meio de um novo paradigma comportamental: o labirinto em cruz com rampa (LCR). Nossos resultados sugerem que, mesmo em estágios precoces do desenvolvimento (5, 14 e 21 dpf), as larvas demonstram padrões comportamentais compatíveis com evitação passiva — característica associada ao estado tipo-ansioso. Tais achados reforçam a ideia de que componentes do comportamento tipo-ansioso emergem precocemente durante o desenvolvimento neurocomportamental do zebrafish.

Este estudo constitui a etapa inicial do processo de validação do LCR, centrada na análise da adequação dos parâmetros físicos e comportamentais do aparato, bem como na consistência dos padrões observados ao longo do desenvolvimento larval. Embora os resultados sejam promissores, reconhece-se a necessidade de validações adicionais — farmacológica, convergente e preditiva — que deverão ser conduzidas em etapas futuras, a fim de estabelecer com rigor a sensibilidade e especificidade do LCR para avaliação de estados ansiosos.

Ao estabelecer um protocolo acessível e replicável para a análise de traços tipo-ansiosos em fases iniciais da vida, o nosso trabalho avança no estudo e caracterização da emergência e desenvolvimento do comportamento tipo-ansioso nos estágios iniciais do neurodesenvolvimento. Tal abordagem abre caminho para investigações mais abrangentes sobre os mecanismos neurobiológicos e ambientais que modulam a vulnerabilidade a transtornos de ansiedade desde os primeiros estágios do neurodesenvolvimento.

8. Referências

- ABELA, A. R. et al. Median raphe serotonin neurons promote anxiety-like behavior via inputs to the dorsal hippocampus. **Neuropharmacology**, v. 168, n. 107985, p. 107985, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2020.107985>
- ADAM, D. Mental health: On the spectrum. **Nature**, v. 496, n. 7446, p. 416–418, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/496416a>

ADHIKARI, A. et al. Basomedial amygdala mediates top-down control of anxiety and fear. **Nature**, v. 527, n. 7577, p. 179–185, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/nature15698>

AHEARN, E. P. et al. Fear, anxiety, and the neuroimaging of PTSD. **Psychopharmacology bulletin**, v. 40, n. 3, p. 88–103, 2007. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18007571/>

ALLGULANDER, C. Generalized anxiety disorder: A review of recent findings. **Journal of experimental and clinical medicine**, v. 4, n. 2, p. 88–91, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jecm.2012.01.006>

ANASTASSIOU-HADJICHARALAMBOUS, X.; ESSAU, C. A. **Social anxiety disorder (social phobia)**. Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, Inc., , 23 Jan. 2015. (Nota técnica). Disponível em: <https://doi.org/10.1002/9781118625392.wbecp313>

ANGELOSANTE, A. G.; OSTROWSKI, M. A.; CHIZKOV, R. R. Separation Anxiety Disorder. In: **Pediatric Anxiety Disorders**. New York, NY: Springer New York, 2013. p. 129–142. Disponível em: https://doi.org/10.1007/978-1-4614-6599-7_7

BAUMGART, E. V. et al. Stab wound injury of the zebrafish telencephalon: a model for comparative analysis of reactive gliosis. **Glia**, v. 60, n. 3, p. 343–357, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/glia.22269>

BERNABE, C. S. et al. Identification of a novel perifornical-hypothalamic-area-projecting serotonergic system that inhibits innate panic and conditioned fear responses. **Translational psychiatry**, v. 14, n. 1, p. 60, 2024. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/s41398-024-02769-3>

BERTOLETE, J. M.; FLEISCHMANN, A. Suicide and psychiatric diagnosis: a worldwide perspective. **World psychiatry: official journal of the World Psychiatric Association (WPA)**, v. 1, n. 3, p. 181–185, 2002. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16946849/>

BEST, J. D. et al. Non-associative learning in larval zebrafish. **Neuropsychopharmacology: official publication of the American College of Neuropsychopharmacology**, v. 33, n. 5, p. 1206–1215, 2008. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/sj.npp.1301489>

BLANCHARD, D. C.; GRIEBEL, G.; BLANCHARD, R. J. The Mouse Defense Test Battery: pharmacological and behavioral assays for anxiety and panic. **European journal of pharmacology**, v. 463, n. 1–3, p. 97–116, 2003. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/S0014-2999\(03\)01276-7](https://doi.org/10.1016/S0014-2999(03)01276-7)

BLISS-MOREAU, E.; RUDEBECK, P. H. Animal models of human mood. **Neuroscience and biobehavioral reviews**, v. 120, p. 574–582, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2020.06.024>

BOURIN, M. Experimental anxiety model for anxiety disorders: Relevance to drug discovery. **Advances in experimental medicine and biology**, v. 1191, p. 169–184, 2020. Disponível em: https://doi.org/10.1007/978-981-32-9705-0_11

BUFF, C. et al. Activity alterations in the bed nucleus of the stria terminalis and amygdala during threat anticipation in generalized anxiety disorder. **Social cognitive and affective neuroscience**, v. 12, n. 11, p. 1766–1774, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/scan/nsx103>

BURGESS, H. A.; GRANATO, M. **Modulation of locomotor activity in larval zebrafish during light adaptation. The journal of experimental biology**. 2007. Disponível em: DOI: 10.1242/jeb.003939

BURKAUSKAS, J. et al. Specific Phobias. In: **Seminars in General Adult Psychiatry**. Cambridge, England: Cambridge University Press, 2024. p. 324–333. Disponível em: <https://doi.org/10.1017/9781911623861.016>

CACHAT, J. M. et al. Modeling Stress and Anxiety in Zebrafish. In: **Neuromethods**. Totowa, NJ: Humana Press, 2011. p. 73–88. Disponível em: https://doi.org/10.1007/978-1-60761-922-2_3

CARVALHO, A. C. C. DE et al. Parametric analysis of anxiety-like behavior in guppy (*Poecilia reticulata*) larvae and juveniles using the plus maze with ramp. **Psychology & neuroscience**, 2024. Disponível em: <https://doi.org/10.1037/pne0000343>

CASTILLO, A. R. G. L. et al. Transtornos de ansiedade. **Revista brasileira de psiquiatria (Sao Paulo, Brazil: 1999)**, v. 22, n. suppl 2, p. 20–23, 2000. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/S1516-44462000000600006>

CHASSON, G. S.; WILHELM, S. **Obsessive-Compulsive Disorder. Em: Encyclopedia of Movement Disorders**. [s.l.] Elsevier, 2010. p. 319–323. Disponível em: https://link.springer.com/chapter/10.1007/978-3-319-13060-6_4

CHEN, M. Research progress on mechanisms in regulating anxiety-related neural circuits. **Journal of clinical and nursing research**, v. 7, n. 1, 2023. Disponível em: 10.26689/jcnr.v7i1.4573

CLAUSS, J. **Extending the neurocircuitry of behavioural inhibition: a role for the bed nucleus of the stria terminalis in risk for anxiety disorders. General psychiatry**. 2023.

COLWILL, R. M.; CRETON, R. Imaging escape and avoidance behavior in zebrafish larvae. **Reviews in the neurosciences**, v. 22, n. 1, p. 63–73, 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.1515/RNS.2011.008>

CRASKE, M. G. et al. Anxiety disorders. **Nature reviews. Disease primers**, v. 3, n. 1, p. 17024, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/nrdp.2017.24>

CRASKE, M. G.; SIMOS, G. Panic Disorder and Agoraphobia. In: **CBT for Anxiety Disorders**. Oxford, UK: John Wiley & Sons Ltd, 2013. p. 3–24. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/9781118330043.ch1>

CRAWLEY, J. N. **What's wrong with my mouse?: Behavioral phenotyping of transgenic and knockout mice**. 2. ed. New York, NY: Wiley-Liss, 2010.

CREMERS, H. R.; ROELOFS, K. Social anxiety disorder: a critical overview of neurocognitive research: Social anxiety disorder. **Wiley interdisciplinary reviews. Cognitive science**, v. 7, n. 4, p. 218–232, 2016. Disponível em:

<https://doi.org/10.1002/wcs.1390>

DAVEY, G. C. L. Psychopathology of specific phobias. **Psychiatry (Abingdon, England)**, v. 3, n. 6, p. 83–86, 2004. Disponível em: <https://doi.org/10.1383/psyt.3.6.83.38209>

DAVIS, D. J., Bryda, E. C., Gillespie, C. H., & Ericsson, A. C. (2016). Microbial modulation of behavior and stress responses in zebrafish larvae. **Behavioural brain research**, 311, 219–227. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2016.05.040>

DE SOUZA LIMA, A. C. M. et al. Impairment of motor but not anxiety-like behavior caused by the increase of dopamine during development is sustained in zebrafish larvae at later stages. **International journal of developmental neuroscience: the official journal of the International Society for Developmental Neuroscience**, v. 80, n. 2, p. 106–122, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/jdn.10009>

Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders, Fifth Edition (DSM-V). **American Psychiatric Association**. Arlington, VA: American Psychiatric Association, 2013

DIAS, G. P.; THURET, S. The hippocampus and panic disorder: Evidence from animal and human studies. In: **Panic Disorder**. Cham: Springer International Publishing, 2016. p. 79–91. Disponível em: https://doi.org/10.1007/978-3-319-12538-1_3

EGAN, R. J. et al. Understanding behavioral and physiological phenotypes of stress and anxiety in zebrafish. **Behavioural brain research**, v. 205, n. 1, p. 38–44, 2009. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2009.06.022>

ERAZO, E. C.; HAZLETT-STEVENSON, H. Generalized anxiety disorder. In: **Principle-Based Stepped Care and Brief Psychotherapy for Integrated Care Settings**. Cham: Springer International Publishing, 2018. p. 203–213. Disponível em: https://doi.org/10.1007/978-3-319-70539-2_18

FELIX-ORTIZ, A. C.; BURGOS-ROBLES, A.; BHAGAT, N. D. Bidirectional Modulation of Anxiety- Related and Social Behaviors by Amygdala Projections to the Medial Prefrontal Cortex. **Neuroscience**, v. 321, p. 197–209, 2016.

FEOLA, B. et al. Altered bed nucleus of the stria terminalis and amygdala responses to threat in combat veterans with posttraumatic stress disorder. **Journal of traumatic stress**, v. 36, n. 2, p. 359–372, 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/jts.22918>

FONTANA, B. D. et al. The developing utility of zebrafish models of neurological and neuropsychiatric disorders: A critical review. **Experimental neurology**, v. 299, n. Pt A, p. 157–171, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2017.10.004>

FRIED, E. I. Studying mental health problems as systems, not syndromes. **Current directions in psychological science**, v. 31, n. 6, p. 500–508, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1177/09637214221114089>

FRIEDRICH, R. W.; JACOBSON, G. A.; ZHU, P. Circuit neuroscience in zebrafish. **Current biology: CB**, v. 20, n. 8, p. R371-81, 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.cub.2010.02.039>

GANZ, J. et al. Subdivisions of the adult zebrafish pallium based on molecular marker analysis. **F1000Research**, v. 3, p. 308, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.12688/f1000research.5595.1>

GEBAUER, D. L. et al. Effects of anxiolytics in zebrafish: similarities and differences between benzodiazepines, buspirone and ethanol. **Pharmacology, biochemistry, and behavior**, v. 99, n. 3, p. 480–486, 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.pbb.2011.04.021>

GENCTURK, S.; UNAL, G. Rodent tests of depression and anxiety: Construct validity and translational relevance. **Cognitive, affective & behavioral neuroscience**, v. 24, n. 2, p. 191–224, 2024. Disponível em: <https://doi.org/10.3758/s13415-024-01171-2>

GERLAI, R. et al. Drinks like a fish: zebra fish (*Danio rerio*) as a behavior genetic model to study alcohol effects. **Pharmacology, biochemistry, and behavior**, v. 67, n. 4, p. 773–782, 2000. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/S0091-3057\(00\)00422-6](https://doi.org/10.1016/S0091-3057(00)00422-6)

GERLAI R. Zebrafish and relational memory: Could a simple fish be useful for the analysis of biological mechanisms of complex vertebrate learning? **Behavioural processes**, 141(Pt 2), 242–250, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.beproc.2017.01.016>

GESI, C. et al. Adult separation anxiety disorder in complicated grief: an exploratory study on frequency and correlates. **Comprehensive psychiatry**, v. 72, p. 6–12, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.comppsy.2016.09.002>

GIACOMINI, A. C. V. V. et al. Fluoxetine and diazepam acutely modulate stress induced-behavior. **Behavioural brain research**, v. 296, p. 301–310, 2016. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S016643281530200X?via%3Dihub>

GIDDAN, J. J. et al. Selective mutism in elementary school: Multidisciplinary interventions. **Language, speech, and hearing services in schools**, v. 28, n. 2, p. 127–133, 1997. Disponível em: <https://pubs.asha.org/doi/abs/10.1044/0161-1461.2802.127>

GORBIS, E.; JAJOO, A. Panic disorder: Epidemiology, etiology, and treatment strategies. **Journal of Medical and Clinical Nursing Studies**, p. 1–5, 2024. Disponível em: <https://doi.org/10.61440/jmcns.2024.v2.59>

GRAEFF, F. G. et al. Role of the amygdala and periaqueductal gray in anxiety and panic. **Behavioural brain research**, v. 58, n. 1–2, p. 123–131, 1993. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/0166-4328\(93\)90097-a](https://doi.org/10.1016/0166-4328(93)90097-a)

GRAEFF, F. G. Serotonin, the periaqueductal gray and panic. **Neuroscience and biobehavioral reviews**, v. 28, n. 3, p. 239–259, 2004. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2003.12.004>

GRIESSNER, J. et al. Central amygdala circuit dynamics underlying the benzodiazepine anxiolytic effect. **Molecular psychiatry**, v. 26, n. 2, p. 534–544, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/s41380-018-0310-3>

GRÖS, D. F.; ANTONY, M. M. The assessment and treatment of specific phobias: a review. **Current psychiatry reports**, v. 8, n. 4, p. 298–303, 2006. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s11920-006-0066-3>

GRUPP, L.; WOLBURG, H.; MACK, A. F. Astroglial structures in the zebrafish brain. **The Journal of comparative neurology**, v. 518, n. 21, p. spc1–spc1, 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/cne.22511>

HALLIDAY, M. S. Exploratory behaviour in elevated and enclosed mazes. **The Quarterly journal of experimental psychology**, v. 19, n. 3, p. 254–263, 1967. Disponível em: <https://doi.org/10.1080/14640746708400100>

HERCULANO-HOUZEL, S. **The human advantage: How our brains became remarkable**. London, England: MIT Press, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.7551/mitpress/9780262034258.001.0001>

HOFER, M. A. An evolutionary perspective on anxiety. In: ROOSE R, S. P. A. (Ed.). **Anxiety as symptom and signal**. [s.l: s.n.].

KALUEFF, A. V.; NUTT, D. J. Role of GABA in anxiety and depression. **Depression and anxiety**, v. 24, n. 7, p. 495–517, 2007. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/da.20262>

KALUEFF, A. V.; STEWART, A. M.; GERLAI, R. Zebrafish as an emerging model for studying complex brain disorders. **Trends in pharmacological sciences**, v. 35, n. 2, p. 63–75, 2014. Disponível em: [doi: 10.1016/j.tips.2013.12.002](https://doi.org/10.1016/j.tips.2013.12.002)

KASLIN, J. et al. Distinct roles of neuroepithelial-like and radial glia-like progenitor cells in cerebellar regeneration. **Development (Cambridge, England)**, v. 144, n. 8, p. 1462–1471, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1242/dev.144907>

KESSLER, R. C. et al. Lifetime prevalence and age-of-onset distributions of DSM-IV disorders in the National Comorbidity Survey Replication. **Archives of general psychiatry**, v. 62, n. 6, p. 593–602, 2005. Disponível em: <https://jamanetwork.com/journals/jamapsychiatry/fullarticle/208678>

KHAN, F. R.; ALHEWAIRINI, S. S. Zebrafish (Danio rerio) as a model organism. **Curr. Trends Cancer Manag.** [s.l: s.n.]. Disponível em: [doi:10.5772/intechopen.81517](https://doi.org/10.5772/intechopen.81517)

KIMMEL, C. B. et al. Stages of embryonic development of the zebrafish. **Developmental dynamics: an official publication of the American Association of Anatomists**, v. 203, n. 3, p. 253–310, 1995.

KOCH, E. I.; FERNANDO, M. A. Panic Disorder and Agoraphobia. In: **Principle-Based Stepped Care and Brief Psychotherapy for Integrated Care Settings**.

Cham: Springer International Publishing, 2018. p. 303–320. Disponível em: https://link.springer.com/chapter/10.1007/978-3-319-70539-2_27

LAU, B. Y. B. et al. Identification of a brain center whose activity discriminates a choice behavior in zebrafish. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 108, n. 6, p. 2581–2586, 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.1073/pnas.1018275108>

LEDOUX, J. E. Emotion circuits in the brain. **Annual review of neuroscience**, v. 23, n. 1, p. 155–184, 2000. Disponível em: <https://doi.org/10.1146/annurev.neuro.23.1.155>

LEVIN, E. D.; BENCAN, Z.; CERUTTI, D. T. Anxiolytic effects of nicotine in zebrafish. **Physiology & behavior**, v. 90, n. 1, p. 54–58, 2007. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2006.08.026>

LILLESAAR, C. et al. Axonal projections originating from raphe serotonergic neurons in the developing and adult zebrafish, *Danio rerio*, using transgenics to visualize raphe-specific *pet1* expression. **The Journal of comparative neurology**, v. 512, n. 2, p. 158–182, 2009. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/cne.21887>

LINDSEY, B. W.; DARABIE, A.; TROPEPE, V. The cellular composition of neurogenic periventricular zones in the adult zebrafish forebrain. **The Journal of comparative neurology**, v. 520, n. 10, p. 2275–2316, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/cne.23065>

LIU, G.-Y. et al. Frontiers and hotspots in anxiety disorders: A bibliometric analysis from 2004 to 2024. **Heliyon**, v. 10, n. 16, p. e35701, 2024. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2024.e35701>

LLERA, S. J.; NEWMAN, M. G. **Generalized anxiety disorder**. Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, Inc., 23 Jan. 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/9781118625392.wbecp161>

MACPHAIL, R. C. et al. Locomotion in larval zebrafish: Influence of time of day, lighting and ethanol. **Neurotoxicology**, v. 30, n. 1, p. 52–58, 2009. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.neuro.2008.09.011>

MAXIMINO, C. et al. Measuring anxiety in zebrafish: a critical review. **Behavioural brain research**, v. 214, n. 2, p. 157–171, 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2010.05.031>

MAXIMINO, C. Modulation of nociceptive-like behavior in zebrafish (*Danio rerio*) by environmental stressors. **Psychology & neuroscience**, v. 4, n. 1, p. 149–155, 2011. Disponível em: <https://psycnet.apa.org/fulltext/2011-14236-017.html>

MAXIMINO, C. et al. Pharmacological analysis of zebrafish (*Danio rerio*) scototaxis. **Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry**, v. 35, n. 2, p. 624–631, 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.pnpbp.2011.01.006>

MENDES DA MOTTA, C. Análise Paramétrica do comportamento do zebrafish no Labirinto em Cruz com Rampa. **Dissertação (Mestrado em Teoria e Pesquisa do Comportamento) - Núcleo de Teoria e Pesquisa do Comportamento**, Universidade Federal do Pará, Belém, 2021. Disponível em: <http://repositorio.ufpa.br:8080/jspui/handle/2011/13812>.

MESHALKINA, D. A. et al. Adult zebrafish in CNS disease modeling: a tank that's half-full, not half-empty, and still filling. **Lab animal**, v. 46, n. 10, p. 378–387, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/labani.1345>

MILLER, N. E.; KRAELING, D. Displacement: greater generalization of approach than avoidance in a generalized approach avoidance conflict. **Journal of experimental psychology**, v. 43, n. 3, p. 217–221, 1952. Disponível em: <https://doi.org/10.1037/h0063057>

MOHAMED, W. M. Y.; EKKER, M. Editorial: Zebrafish as a translational neuroscience model: today's science and tomorrow's success. **Frontiers in physiology**, v. 14, p. 1202198, 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.3389/fphys.2023.1202198>

MOLDAN, M. B. Selective mutism and self-regulation. **Clinical social work journal**, v. 33, n. 3, p. 291–307, 2005. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s10615-005-4945-6>

MONTGOMERY, K. C. The relation between fear induced by novel stimulation and exploratory behavior. **Journal of comparative and physiological psychology**, v. 48, n. 4, p. 254–260, 1955. Disponível em: <https://doi.org/10.1037/h0043788>

MORAES, A. C. N. et al. Neurochemical and genetic factors in panic disorder: a systematic review. **Translational psychiatry**, v. 14, n. 1, p. 294, 2024. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/s41398-024-02966-0>

MOREL, C. et al. Midbrain projection to the basolateral amygdala encodes anxiety-like but not depression-like behaviors. **Nature communications**, v. 13, n. 1, p. 1532, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/s41467-022-29155-1>

MUELLER, T.; VERNIER, P.; WULLIMANN, M. F. The adult central nervous cholinergic system of a neurogenetic model animal, the zebrafish *Danio rerio*. **Brain research**, v. 1011, n. 2, p. 156–169, 2004. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2004.02.073>

MUELLER, T.; WULLIMANN, M. F. An evolutionary interpretation of teleostean forebrain anatomy. **Brain, behavior and evolution**, v. 74, n. 1, p. 30–42, 2009. Disponível em: <https://doi.org/10.1159/000229011>

MUELLER, T.; WULLIMANN, M. F. **Atlas of early zebrafish brain development: A tool for molecular neurogenetics**. Philadelphia, PA: Elsevier Science Publishing, 2016. Disponível: <https://doi.org/10.1016/C2013-0-00639-1>

MUNSHI, S. et al. Repeated stress induces a pro-inflammatory state, increases amygdala neuronal and microglial activation, and causes anxiety in adult male

rats. **Brain, behavior, and immunity**, v. 84, p. 180–199, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2019.11.023>

MURIS, P.; OLLENDICK, T. H. Current challenges in the diagnosis and management of selective mutism in children. **Psychology research and behavior management**, v. 14, p. 159–167, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.2147/PRBM.S274538>

NORTON, W. H. J. Toward developmental models of psychiatric disorders in zebrafish. **Frontiers in neural circuits**, v. 7, p. 79, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.3389/fncir.2013.00079>

O'CONNELL, L. A.; HOFMANN, H. A. The vertebrate mesolimbic reward system and social behavior network: a comparative synthesis. **The Journal of comparative neurology**, v. 519, n. 18, p. 3599–3639, 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/cne.22735>

OHMURA, Y. et al. Different roles of distinct serotonergic pathways in anxiety-like behavior, antidepressant-like, and anti-impulsive effects. **Neuropharmacology**, v. 167, n. 107703, p. 107703, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2019.107703>

OSMAN, H. I. Obsessive-Compulsive Disorder. **International Journal of Research Publications**, v. 50, n. 1, 2024. Disponível em: <https://doi.org/10.471119/ijrp1001501620246668>

PAISIOS, E. et al. Common microbehavioral “footprint” of two distinct classes of conditioned aversion. **Learning & memory (Cold Spring Harbor, N.Y.)**, v. 24, n. 5, p. 191–198, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1101/lm.045062.117>

PANULA, P. et al. The comparative neuroanatomy and neurochemistry of zebrafish CNS systems of relevance to human neuropsychiatric diseases. **Neurobiology of disease**, v. 40, n. 1, p. 46–57, 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2010.05.010>

PORTAVELLA, M. et al. The effects of telencephalic pallial lesions on spatial, temporal, and emotional learning in goldfish. **Brain research bulletin**, v. 57, n. 3–4, p. 397–399, 2002. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/S0361-9230\(01\)00699-2](https://doi.org/10.1016/S0361-9230(01)00699-2)

PORTMAN, M. E.; RISKIND, J. H.; RECTOR, N. A. Generalized anxiety disorder. In: **Encyclopedia of Human Behavior**. [s.l.] Elsevier, 2012. p. 215–220. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-375000-6.00175-0>

POWERS, D. A. Fish as model systems. **Science (New York, N.Y.)**, v. 246, n. 4928, p. 352–358, 1989. Disponível em: <https://www.science.org/doi/10.1126/science.2678474>

QI, G. et al. NAc-VTA circuit underlies emotional stress-induced anxiety-like behavior in the three-chamber vicarious social defeat stress mouse model. **Nature communications**, v. 13, n. 1, p. 577, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/s41467-022-28190-2>

RANKIN, C. H. et al. Habituation revisited: an updated and revised description of the behavioral characteristics of habituation. **Neurobiology of learning and memory**, v. 92, n. 2, p. 135–138, 2009. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.nlm.2008.09.012>

RAUCH, S. L.; CARLEZON, W. A., Jr. Neuroscience. Illuminating the neural circuitry of compulsive behaviors. **Science (New York, N.Y.)**, v. 340, n. 6137, p. 1174–1175, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1126/science.1239652>

REIS, H. J. et al. Is DARPP-32 a potential therapeutic target? **Expert opinion on therapeutic targets**, v. 11, n. 12, p. 1649–1661, 2007. Disponível em: <https://doi.org/10.1517/14728222.11.12.1649>

RICHENDRFER, H. et al. On the edge: pharmacological evidence for anxiety-related behavior in zebrafish larvae. **Behavioural brain research**, v. 228, n. 1, p. 99–106, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2011.11.041>

RICHENDRFER, H.; CRÉTON, R. Automated high-throughput behavioral analyses in zebrafish larvae. **Journal of visualized experiments: JoVE**, n. 77, p. e50622, 2013. Disponível em: <https://dx.doi.org/10.3791/50622>

RIHEL, J. et al. Zebrafish behavioral profiling links drugs to biological targets and rest/wake regulation. **Science (New York, N.Y.)**, v. 327, n. 5963, p. 348–351, 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.1126/science.1183090>

RINK, E.; WULLIMANN, M. F. Connections of the ventral telencephalon and tyrosine hydroxylase distribution in the zebrafish brain (*Danio rerio*) lead to identification of an ascending dopaminergic system in a teleost. **Brain research bulletin**, v. 57, n. 3–4, p. 385–387, 2002. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/S0361-9230\(01\)00696-7](https://doi.org/10.1016/S0361-9230(01)00696-7)

RINK, E.; WULLIMANN, M. F. Connections of the ventral telencephalon (subpallium) in the zebrafish (*Danio rerio*). **Brain research**, v. 1011, n. 2, p. 206–220, 2004. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2004.03.027>

RODGERS, R. J.; DALVI, A. Anxiety, defence and the elevated plus-maze. **Neuroscience and biobehavioral reviews**, v. 21, n. 6, p. 801–810, 1997. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/S0149-7634\(96\)00058-9](https://doi.org/10.1016/S0149-7634(96)00058-9)

RODRIGUES-RIBEIRO, L. et al. Neuroproteomics: Unveiling the molecular insights of psychiatric disorders with a focus on anxiety disorder and depression. **Advances in experimental medicine and biology**, v. 1443, p. 103–128, 2024. Disponível em: https://doi.org/10.1007/978-3-031-50624-6_6

ROSA, L. V. et al. Different effects of caffeine on behavioral neurophenotypes of two zebrafish populations. **Pharmacology, biochemistry, and behavior**, v. 165, p. 1–8, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.pbb.2017.12.002>

RUSSELL, P. A. Relationships between exploratory behaviour and fear: a review. **British journal of psychology (London, England: 1953)**, v. 64, n. 3, p. 417–433, 1973. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/j.2044-8295.1973.tb01369.x>

SCHNÖRR, S. J. et al. Measuring thigmotaxis in larval zebrafish. **Behavioural brain research**, v. 228, n. 2, p. 367–374, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2011.12.016>

SOUZA, B. R.; TROPEPE, V. The role of dopaminergic signalling during larval zebrafish brain development: a tool for investigating the developmental basis of neuropsychiatric disorders. **Reviews in the neurosciences**, v. 22, n. 1, p. 107–119, 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.1515/rns.2011.012>

SPENCE, R. et al. The behaviour and ecology of the zebrafish, *Danio rerio*. **Biological reviews of the Cambridge Philosophical Society**, v. 83, n. 1, p. 13–34, 2007. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/j.1469-185X.2007.00030.x>

STEIN, D. J.; BOUWER, C. A neuro-evolutionary approach to the anxiety disorders. **Journal of anxiety disorders**, v. 11, n. 4, p. 409–429, 1997. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/S0887-6185\(97\)00019-4](https://doi.org/10.1016/S0887-6185(97)00019-4)

STEWART, A. M. et al. Zebrafish models for translational neuroscience research: from tank to bedside. **Trends in neurosciences**, v. 37, n. 5, p. 264–278, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.tins.2014.02.011>

STEWART, A. M. et al. Cytokine and endocrine parameters in mouse chronic social defeat: implications for translational “cross-domain” modeling of stress-related brain disorders. **Behavioural brain research**, v. 276, p. 84–91, 2015. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbr.2014.08.037>

SUBRAMANIAM, M. et al. Obsessive--compulsive disorder: prevalence, correlates, help-seeking and quality of life in a multiracial Asian population. **Social psychiatry and psychiatric epidemiology**, v. 47, n. 12, p. 2035–2043, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s00127-012-0507-8>

TAN, J. X. M.; ANG, R. J. W.; WEE, C. L. Larval zebrafish as a model for mechanistic discovery in mental health. **Frontiers in molecular neuroscience**, v. 15, p. 900213, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.3389/fnmol.2022.900213>

TIERNEY, K. B. Behavioural assessments of neurotoxic effects and neurodegeneration in zebrafish. **Biochimica et biophysica acta**, v. 1812, n. 3, p. 381–389, 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2010.10.011>

TSEILIKMAN, V. E. et al. Resveratrol: A multifaceted guardian against anxiety and stress disorders-an overview of experimental evidence. **Nutrients**, v. 16, n. 17, p. 2856, 2024. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/nu16172856>

VAN DE POLL, Y.; CRAS, Y.; ELLENDER, T. J. The neurophysiological basis of stress and anxiety - comparing neuronal diversity in the bed nucleus of the stria terminalis (BNST) across species. **Frontiers in cellular neuroscience**, v. 17, p. 1225758, 2023. Disponível: <https://doi.org/10.3389/fncel.2023.1225758>

VARGA, Z. K. et al. The swimming plus-maze test: a novel high-throughput model for assessment of anxiety-related behaviour in larval and juvenile zebrafish (*Danio rerio*). **Scientific reports**, v. 8, n. 1, p. 16590, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/s41598-018-34989-1>

- VENUTO, A., Thibodeau-Beganny, S., Trapani, J. G., & Erickson, T. (2023). A sensation for inflation: initial swim bladder inflation in larval zebrafish is mediated by the mechanosensory lateral line. **The Journal of Experimental Biology**, 226(11). Disponível em: <https://doi.org/10.1242/jeb.245635>
- WALSH-MONTEIRO, A. et al. A new anxiety test for zebrafish: Plus maze with ramp. **Psychology & neuroscience**, v. 9, n. 4, p. 457–464, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1037/pne0000067>
- WAR, R. et al. Zebrafish as an emerging alternative tool for studying anxiety disorders. **Journal of advanced scientific research**, v. 13, n. 11, p. 13–20, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.55218/jasr.2022131103>
- WILLNER, P. Behavioural models in psychopharmacology. In: WILLNER, P. (Ed.). **Behavioural models in psychopharmacology: Theoretical, industrial and clinical perspectives** (pp. New York, NY, US: Cambridge University Press, xiii, 1991. v. 540p. 3–18. Disponível em: <https://psycnet.apa.org/record/1991-98097-001>
- WONG, K. et al. Analyzing habituation responses to novelty in zebrafish (*Danio rerio*). **Behavioural brain research**, v. 208, n. 2, p. 450–457, 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2009.12.023>
- WULLIMAN, M. F.; RUPP, B.; REICHERT, H. **Neuroanatomy of the zebrafish brain: A topological atlas**. 1996. ed. Basel, Switzerland: Birkhäuser Basel, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/978-3-0348-8979-7>
- WULLIMANN, M. F. Secondary neurogenesis and telencephalic organization in zebrafish and mice: a brief review. **Integrative zoology**, v. 4, n. 1, p. 123–133, 2009. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/j.1749-4877.2008.00140.x>
- YAMAMOTO, K. et al. Two tyrosine hydroxylase genes in vertebrates New dopaminergic territories revealed in the zebrafish brain. **Molecular and cellular neurosciences**, v. 43, n. 4, p. 394–402, 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.mcn.2010.01.006>
- YUEN, E. Y. et al. Synergistic regulation of glutamatergic transmission by serotonin and norepinephrine reuptake inhibitors in prefrontal cortical neurons. **The journal of biological chemistry**, v. 289, n. 36, p. 25177–25185, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1074/jbc.M114.567610>
- ZARRINDAST, M.-R.; KHAKPAI, F. The modulatory role of dopamine in anxiety-like behavior. **Archives of iranian medicine**, v. 18, n. 9, p. 591–603, 2015. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26317601/>