

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS

COMISSÃO DE GRADUAÇÃO DO CURSO DE BIOCÊNCIAS

TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO

**EFEITOS PROMOVIDOS PELO ETANOL SOBRE PARÂMETROS DO
COMPORTAMENTO DE GRUPO DE PEIXE-ZEBRA ADULTO**

CHARLES BUDASZEWSKI PINTO

Orientador: Prof. Dr. Diogo Losch de Oliveira

PORTO ALEGRE, 2012

Revista modelo: Behavioural Brain Research

Efeitos promovidos pelo etanol sobre parâmetros do comportamento de grupo em peixe-zebra adulto

Charles B. Pinto¹, Denis Brook Rosemberg¹, Ben Hur Marins Mussulini¹, Diogo Losch de Oliveira¹

¹Departamento de Bioquímica, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Brasil.

Endereço para correspondência:

Charles Budaszewski Pinto

Departamento de Bioquímica, ICBS, UFRGS.

Rua Ramiro Barcelos 2600-Anexo.

CEP: 90035-003

Porto Alegre, RS, BRASIL.

Tel: +55 51 3308-5555

E-mail: charlesbpinto@hotmail.com

Resumo

A utilização do peixe-zebra como modelo em pesquisas farmacológicas e comportamentais vem crescendo consideravelmente. Isto se deve ao fato da espécie possuir muitas vantagens quando comparada a outros modelos vertebrados. O repertório comportamental descrito é relativamente complexo permitindo a análise de uma série de parâmetros tanto individuais quanto sociais. O comportamento social em peixe-zebra reflete uma interação complexa entre número de animais que se movem juntos de maneira coordenada em um determinado ambiente. O etanol está entre uma das substâncias psicoativas mais ingeridas, exercendo diversos efeitos no sistema nervoso central (SNC). Apesar do número crescente de trabalhos investigando os mecanismos moleculares envolvidos nos efeitos do álcool sobre o SNC, poucos trabalhos avaliam os efeitos da exposição ao etanol sobre o comportamento social do peixe-zebra. Portanto, o objetivo deste trabalho foi avaliar os efeitos promovidos pela exposição aguda ao etanol sobre parâmetros do comportamento de grupo em peixe-zebra adulto. Foram utilizados peixes-zebra adultos expostos a concentrações de 0,5% de etanol durante uma hora. As análises comportamentais foram realizadas em um tanque circular e os parâmetros avaliados foram frequência das distâncias entre indivíduos, distância média entre indivíduos, área média e distância média dos animais em relação ao centro do aparato ao longo do tempo. Os animais tratados apresentaram maior porcentagem de frequência em intervalos de maiores distâncias, bem como um aumento das distâncias médias entre indivíduos e quando comparados ao grupo controle. Além disso, os animais expostos ao etanol apresentaram uma maior área formada pelo grupo ao longo

do tempo quando comparados ao grupo controle. Não houve alteração significativa nas distâncias em relação ao centro do aparato em ambos os grupos testados. Estes resultados nos indicam que as modificações comportamentais ocasionadas pelo etanol sobre o peixe-zebra levam a uma menor coesão do cardume.

Palavras-chave: peixe-zebra, etanol, comportamento de grupo.

1. Introdução

O peixe-zebra (*Danio rerio*) é um pequeno teleósteo (3 a 4 cm) de água doce pertencente a família Cyprinidae. Durante anos, foi amplamente utilizado como peixe ornamental e, a partir da década de 80, através dos trabalhos desenvolvidos por George Streisinger e seu grupo de pesquisa no Caltech (Pasadena, CA, USA), passou a ser utilizado como modelo experimental em estudos genéticos e de biologia do desenvolvimento. Atualmente, tornou-se um modelo experimental consolidado em diversas áreas do conhecimento, tais como, genética e genômica, teratologia e toxicologia [1].

A utilização do peixe-zebra como um organismo modelo em pesquisas farmacológicas e comportamentais vem crescendo consideravelmente nos últimos anos. Esta espécie vem se tornando um modelo animal complementar aos roedores principalmente para estudos translacionais em larga escala, o que favorece a descoberta de novos mecanismos envolvidos em diferentes aspectos fisiopatológicos relacionados à injúria cerebral, bem como na busca de estratégias terapêuticas inovadoras [2-6]. Isto se deve ao fato da espécie possuir muitas vantagens intrínsecas, tais como mecanismos bioquímicos e sistemas de neurotransmissão evolutivamente conservados, baixo custo requerido, fácil manuseio e manutenção simples quando comparada a outros modelos vertebrados [2, 6]. Além disso, o repertório comportamental descrito é relativamente complexo permitindo a análise de uma série de parâmetros tanto individuais quanto sociais. Estudos demonstram que o peixe-zebra possui uma preferência por co-específicos, ou seja, possui preferência por permanecer junto a indivíduos da mesma espécie [7-9]. O comportamento social em peixe-zebra reflete uma interação complexa entre número de animais que se movem

juntos de maneira coordenada em um determinado ambiente [10]. Este fenômeno caracteriza-se por ser um comportamento mantido em níveis relativamente estáveis em animais adultos, sendo que o mesmo pode ser modulado por aprendizagem social e possui uma maturação ao longo do desenvolvimento [11, 12]. Sendo assim, a formação de um cardume coeso corresponde a uma unidade funcional em situações aversivas com a finalidade de proteção [8, 11]. O comportamento de grupo em peixe-zebra vem sendo abordado em estudos envolvendo aspectos ontogenéticos, efeito de estressores ambientais e de manipulações farmacológicas [13].

O etanol está entre uma das substâncias psicoativas mais ingeridas no mundo, a qual exerce diversos efeitos no sistema nervoso central (SNC). Com relação ao consumo de etanol, sabe-se que o álcool pode modificar diversos sistemas de neurotransmissão e sinalização celular, tais como glutamatérgico e gabaérgico, tendo ação ansiolítica em concentrações mais baixas e um efeito depressor/sedativo associado a um prejuízo motor em concentrações mais elevadas [14-16]. Esta resposta bifásica já foi verificada em peixe-zebra, sendo que os efeitos comportamentais observados aparentam estar relacionados aos níveis de etanol detectados no SNC [4, 17-19]. Além disso, foi demonstrado que o etanol pode influenciar os níveis cerebrais de dopamina, serotonina, regulação dos níveis de AMP cíclico e da via de sinalização das cinases reguladas por sinal extracelular (ERKs) em peixe-zebra adulto [20, 21]. Apesar do número crescente de trabalhos investigando os mecanismos celulares e moleculares envolvidos nos efeitos deletérios do álcool sobre o SNC, poucos trabalhos avaliam os efeitos da exposição aguda ao etanol sobre o comportamento social do peixe-zebra, por isso os efeitos desta substância no

comportamento social desta espécie ainda não são totalmente conhecidos. Portanto, a avaliação da interação social utilizando substâncias que sejam capazes de promover dependência, bem como alterar significativamente parâmetros relacionados à locomoção e ao comportamento do tipo ansiedade torna-se relevante a fim de elucidar potenciais mecanismos e características fenotípicas envolvidos no comportamento social da espécie.

Desta forma, o objetivo deste trabalho foi avaliar os efeitos promovidos pela exposição aguda ao etanol sobre parâmetros do comportamento de grupo em peixe-zebra adulto.

2. Material e métodos

2.1. Animais

Foram utilizados peixe-zebra (*Danio rerio*) adultos (com aproximadamente 4-7 meses de idade) de ambos os sexos da linhagem heterogênea do fenótipo *short-fin* (SF). Os animais foram obtidos de fornecedores especializados (Delphis, RS) e mantidos em aquários moradia de 50,0 L (com uma densidade de 80-100 animais por tanque) e aclimatados por duas semanas no biotério da Universidade em condições padrão de manutenção. Os aquários foram preenchidos com água de osmose reversa contendo 0,018g/1 L de sal marinho sintético (Instant Ocean®) e mantidos sob aeração, filtração química e mecânica constantes a uma temperatura de 26 ± 2°C e pH 7,0. Os animais foram mantidos sob ciclo claro/escuro de 14/10 (luzes acendem às 7 e desligavam às 21 h). Os animais foram alimentados duas vezes por dia com ração comercial flocada no turno da manhã (alcon BASIC®, Alcon, Brasil) e extrato de *Artemia nauplii*+ração flocada no turno da tarde. Após os experimentos comportamentais, os animais foram crioanestesiados e, em seguida, eutanasiados por decapitação.

2.2. Administração do etanol

O protocolo de exposição aguda ao etanol foi realizado conforme descrição feita por [7, 22]. Os animais foram removidos dos aquários moradia e colocados em grupos de 5 indivíduos em aquários de 2,0 L contendo água de osmose reversa+0,018g/1 L de sal marinho sintético (Instant Ocean®) e etanol na concentração de 0,5%. Os peixes foram expostos durante 60 min à solução de etanol. Os grupos controles consistiram de exposição dos animais à água

de osmose reversa+0,018g/1 L de sal marinho sintético (Instant Ocean®) durante o mesmo período.

2.3. Avaliação do comportamento de grupo

As análises comportamentais foram realizadas em um tanque circular, similar ao descrito por [23]. O tanque consistiu de um aparato cilíndrico transparente (30 cm de diâmetro), contendo uma lâmina de 3 cm de água de osmose reversa+0,018g/1 L de sal marinho sintético (Instant Ocean®). Após a exposição ao etanol ou água, os grupos de 5 animais foram transferidos ao centro do aquário teste e filmados por um período de 6 min. Os vídeos foram analisados individualmente com a utilização de *screenshots* realizados a cada 15 s de teste, totalizando 25 *screenshots* (0 a 360s) para cada *n* experimental (grupo de 5 indivíduos). Os parâmetros comportamentais avaliados foram: frequência média das distâncias entre os peixes (frequência relativa); distância média entre os peixes do grupo ao longo do tempo; área formada pelo grupo (ao longo do tempo); e distância média dos indivíduos em relação ao centro do aparato. O centro do aparato foi definido através de duas linhas transversais com intersecção de 90°. Para a quantificação das medidas de distância e de área citadas acima, cada *screenshot* foi analisado no software Image J 1.37 for Windows® com a imagem previamente calibrada em relação às dimensões do aparato.

2.4. Análise estatística

Os dados de frequência média das distâncias entre indivíduos foram expressos como média±erro padrão e analisados por ANOVA de duas vias seguida do teste de Bonferroni. Os dados de distância média entre os indivíduos, distância do centro e área ao longo do tempo foram expressos

como média±erro padrão e analisados por ANOVA de duas vias com medidas repetidas, seguida pelo teste de Bonferroni. O dado de correlação (distância média entre indivíduos versus área média) foi analisado segundo o teste de correlação de Pearson. Para todas as análises, $P \leq 0,05$ foi considerado significativo. As análises estatísticas e os gráficos foram realizados utilizando o programa GraphPad® (San Diego, CA, USA, versão 5.0).

2.5. Considerações éticas

Todos os procedimentos descritos no presente projeto foram previamente aprovados pelo Comitê de Ética em Uso de Animais da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (CEUA-UFRGS) sob o número 22446.

3. Resultados

3.1. Frequência média das distâncias entre indivíduos (Frequência relativa).

Foi observada uma forte interação entre o tratamento X tempo com relação à frequência relativa das distâncias entre indivíduos ($F(5) = 31,02$; $p < 0,0001$) (Fig. 1A).

No grupo controle observou-se que conforme o intervalo das distâncias aumenta, ocorre uma diminuição da frequência relativa das mesmas. Já o grupo tratado, apresentou uma maior frequência no intervalo de distâncias entre 5-10 cm, apresentando uma diminuição das frequências nos próximos intervalos de distância. O intervalo de 0-5 cm apresentou menor frequência que o intervalo de 5-10 cm não apresentando diferença estatística dos intervalos de 10-15, 15-20 e 20-25 cm. Também houve diferença estatística quando comparado o grupo controle x etanol nos intervalos de 0-5 cm (grupo etanol apresentou menor frequência comparado ao controle) e grupos 10-15, 15-20 e 20-25 cm (grupo etanol apresentou maior frequência comparado aos controles).

Por apresentar as maiores diferenças entre grupo controle x tratado o intervalo de 0-5 cm avaliamos de forma mais detalhada o intervalo de distâncias entre 0 a 10 cm, expressando estes resultados em intervalos menores (a cada 2 cm).

Foi observada uma forte interação entre o tratamento X tempo com relação à frequência relativa das distâncias entre indivíduos ($F(4) = 11,42$; $p < 0,0001$) (Fig. 1B). O grupo controle apresentou o intervalo entre 2-4 cm como sendo o de maior frequência de distâncias entre indivíduos onde os intervalos

de 0-2, 4-6 e 6-8 cm (não apresentando diferenças estatísticas entre si) apresentaram frequências menores quando comparados ao intervalo 2-4 cm e apresentou uma diminuição no último intervalo 8-10 cm quando comparado aos intervalos restantes.

3.2. Distância média entre indivíduos ao longo do tempo de teste.

Foi observada uma forte interação entre tratamento X tempo com relação à distância média entre indivíduos ($F(24) = 3,043$; $p < 0,0001$). Verificou-se um aumento nas distâncias entre os indivíduos do grupo etanol quando comparados aos respectivos controles principalmente a partir do tempo 120 s, onde encontrou-se diferença estatística na maior parte dos tempos até o final do teste entre o intervalo de 120 a 360 s (Fig. 2).

3.3. Área média ao longo do tempo de teste.

Houve uma forte interação entre tratamento X tempo com relação à área média ($F(24) = 3,246$; $p < 0,0001$). Observa-se um aumento na área média formada pelos 5 peixes do grupo etanol quando comparados aos respectivos controles a partir do tempo 150 s, após persistindo esta diferença estatística até o final do teste na maior parte dos tempos entre o intervalo de 150 a 360 s (Fig. 3).

3.5. Teste de correlação entre distância média entre indivíduos e área média ao longo do tempo.

Na (Fig. 4) os parâmetros distância média entre indivíduos e área média formada pelos peixes ao longo do tempo apresentaram uma forte correlação em ambos os grupos (controle e etanol).

3.6. Distância média do centro do aparato de teste ao longo do tempo de teste.

Houve interação entre tratamento X tempo com relação à distância média dos peixes ao centro do aparato ($F(24) = 1,817$; $p < 0,0119$). O grupo etanol apresentou diferença estatística quando comparado ao grupo controle apenas nos tempos 60, 90, 150 e 165 s. Nestes tempos o grupo etanol apresentou menores distâncias em relação ao centro do aparato de teste (Fig. 5).

4. Discussão

Os resultados deste estudo demonstraram o importante efeito do etanol sobre o comportamento de grupo em peixe-zebra. Com relação à distância média entre os indivíduos, a exposição aguda ao etanol na concentração de 0,5% aumentou o nível de dispersão dos animais a partir de 120 s (Fig. 2) quando comparado ao grupo controle. Um perfil semelhante foi observado quando analisou-se a área média formada pelo grupo ao longo do tempo (Fig. 3). As medidas de distância média entre indivíduos e área média do grupo apresentaram uma forte correlação positiva (Fig. 4), indicando que ambas as medidas podem ser utilizadas na avaliação do comportamento de grupo nesta espécie. Assim, pode-se sugerir que os indivíduos tratados com etanol apresentaram uma diminuição significativa na coesão de grupo quando avaliados na tarefa do *open field* para peixe-zebra. Nos tempos iniciais, não houve diferença entre os grupos nestas duas medidas, demonstrando que os animais não diferem em relação ao comportamento de coesão durante o início do teste. Isto pode estar relacionado a um aumento do comportamento aversivo a novidade [24] apresentado pelo peixe-zebra quando exposto a ambientes novos. Nos primeiros 120 s, o grupo EtOH 0.5% pode estar apresentando uma resposta a novidade similar ao grupo controle, contudo ao decorrer do tempo, o último torna-se mais habituado ao ambiente ficando mais coeso, enquanto o grupo EtOH aumenta a exploração do ambiente de forma dispersa.

A concentração de etanol de 0,5% foi utilizada baseada em estudos prévios [7] que demonstraram alterações no comportamento emocional do peixe-zebra quando exposto ao etanol. Além disso, [25] demonstrou que a

exposição crônica do peixe-zebra ao etanol aumenta as distâncias entre os animais, diminuindo a coesão do grupo.

Atualmente, praticamente todos os trabalhos que avaliam a coesão do grupo em peixe-zebra fazem uso da distância média entre os indivíduos [13]. Em nosso trabalho, podemos observar que tanto a distância média entre os indivíduos quanto a área formada pelo grupo podem ser utilizados como parâmetros para avaliação da coesão do cardume, visto que observamos uma forte correlação entre estes dois parâmetros (Fig. 4). Além disso, no intuito de compreender melhor a dispersão dos animais no teste de *open field*, avaliamos também a frequência relativa das distâncias médias entre os indivíduos ao longo do teste. Esta avaliação possibilitou observar que as distâncias médias entre indivíduos, compreendidas entre o intervalo de 0-10 e 10-15 cm, possuem uma maior frequência no grupo controle. Com isso, é possível observar que o grupo controle apresentou uma maior frequência em curtas distâncias (0-5 cm), apresentando este grupo um total de aproximadamente 40% das distâncias médias entre os indivíduos entre o intervalo de 0-10 cm. No entanto, o grupo etanol apresentou um perfil bastante distinto neste mesmo intervalo de distâncias (20% de frequência) (Fig. 1A). Isto corrobora com os dados apresentados na Fig. 1, indicando que o tratamento agudo com etanol altera o comportamento de grupo do peixe-zebra na tarefa de *open field*.

No intuito de avaliar em maior detalhe o perfil da distribuição das frequências neste primeiro intervalo de distância (0-10 cm), realizamos uma análise da distribuição das frequências em intervalos menores de distância entre os animais (0-2, 2-4, 4-6, 6-8 e 8-10 cm) (Fig. 1B). Nesta análise, a diferença entre os grupos controle e tratado tornou-se mais evidente,

mostrando que o grupo tratado com etanol apresenta menores frequências das distâncias compreendidas entre os intervalos de 0-2 até 4-6, não havendo diferenças nos intervalos de 6-8 e 8-10.

No intuito de avaliar a dispersão do grupo no aparato, ou seja, se os peixes estão localizados mais ao centro ou mais na periferia do tanque, avaliou-se as distâncias dos animais em relação ao centro do aparato. Além disso, gostaríamos de saber se esta possível tigmotaxia apresentada pelo peixe-zebra em outras tarefas comportamentais [26] poderia ser avaliada neste aparato. A Fig. 5 mostra a preferência pelos animais ficarem mais afastados do centro em relação ao grupo controle, demonstrando o comportamento tigmotático do peixe-zebra neste aparato. Frente ao tratamento agudo de etanol, podemos ver em alguns momentos do teste uma maior preferência pelo centro, mas não uma preferência constante no decorrer de todo o teste (Fig. 5). Futuras varreduras envolvendo outros fármacos com características ansiolíticas ou ansiogênicas, ou até mesmo uma curva de outras concentrações de etanol, poderá vir a contribuir para melhor compreender este comportamento no aparato de campo aberto.

Com este trabalho, podemos concluir que o etanol foi capaz de alterar a coesão de grupo em peixe-zebra adulto. Além disso, podemos ressaltar que as medidas já abordadas na literatura e em nosso trabalho, como distância média entre os animais, são bons parâmetros para se avaliar a coesão de grupo em peixe-zebra na tarefa de *open field*. Porém, acreditamos que a medida de frequência de distâncias seria uma ferramenta auxiliar e complementar na avaliação do comportamento de cardume. Contudo, futuros estudos são

necessários para uma melhor validação e entendimento destes parâmetros para medida de coesão de grupo.

5. Referências

- [1] Vascotto SG, Beckham Y, Kelly GM. The zebrafish's swim to fame as an experimental model in biology. *Biochem Cell Biol.* 1997;75:479-85.
- [2] Barbazuk WB, Korf I, Kadavi C, Heyen J, Tate S, Wun E, et al. The syntenic relationship of the zebrafish and human genomes. *Genome Res.* 2000;10:1351-8.
- [3] Ebarasi L, Oddsson A, Hultenby K, Betsholtz C, Tryggvason K. Zebrafish: a model system for the study of vertebrate renal development, function, and pathophysiology. *Curr Opin Nephrol Hypertens.* 2011;20:416-24.
- [4] Gerlai R, Lee V, Blaser R. Effects of acute and chronic ethanol exposure on the behavior of adult zebrafish (*Danio rerio*). *Pharmacol Biochem Behav.* 2006;85:752-61.
- [5] Goldsmith P. Zebrafish as a pharmacological tool: the how, why and when. *Curr Opin Pharmacol.* 2004;4:504-12.
- [6] Lieschke GJ, Currie PD. Animal models of human disease: zebrafish swim into view. *Nat Rev Genet.* 2007;8:353-67.
- [7] Gerlai R, Lahav M, Guo S, Rosenthal A. Drinks like a fish: zebra fish (*Danio rerio*) as a behavior genetic model to study alcohol effects. *Pharmacol Biochem Behav.* 2000;67:773-82.
- [8] Miller NY, Gerlai R. Shoaling in zebrafish: what we don't know. *Rev Neurosci.* 2011;22:17-25.
- [9] Wright D, Krause J. Repeated measures of shoaling tendency in zebrafish (*Danio rerio*) and other small teleost fishes. *Nat Protoc.* 2006;1:1828-31.

- [10] Krause J, Butlin RK, Peuhkuri N, Pritchard VL. The social organization of fish shoals: a test of the predictive power of laboratory experiments for the field. *Biol Rev Camb Philos Soc.* 2000;75:477-501.
- [11] Buske C, Gerlai R. Shoaling develops with age in Zebrafish (*Danio rerio*). *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry.* 2011;35:1409-15.
- [12] Engeszer RE, Ryan MJ, Parichy DM. Learned social preference in zebrafish. *Curr Biol.* 2004;14:881-4.
- [13] Green J, Collins C, Kyzar EJ, Pham M, Roth A, Gaikwad S, et al. Automated high-throughput neurophenotyping of zebrafish social behavior. *J Neurosci Methods.* 2012;210:266-71.
- [14] Camarini R, Pautassi RM, Mendez M, Quadros IM, Souza-Formigoni ML, Boerngen-Lacerda R. Behavioral and neurochemical studies in distinct animal models of ethanol's motivational effects. *Curr Drug Abuse Rev.* 2010;3:205-21.
- [15] Deitrich RA. Acetaldehyde: deja vu du jour. *J Stud Alcohol.* 2004;65:557-72.
- [16] Quertemont E, Tambour S, Tirelli E. The role of acetaldehyde in the neurobehavioral effects of ethanol: a comprehensive review of animal studies. *Prog Neurobiol.* 2005;75:247-74.
- [17] Dlugos CA, Rabin RA. Ethanol effects on three strains of zebrafish: model system for genetic investigations. *Pharmacol Biochem Behav.* 2003;74:471-80.
- [18] Echevarria DJ, Toms CN, Jouandot DJ. Alcohol-induced behavior change in zebrafish models. *Rev Neurosci.* 2011;22:85-93.
- [19] Rosemberg DB, Braga MM, Rico EP, Loss CM, Cordova SD, Mussulini BH, et al. Behavioral effects of taurine pretreatment in zebrafish acutely exposed to ethanol. *Neuropharmacology.* 2012;63:613-23.

- [20] Chatterjee D, Gerlai R. High precision liquid chromatography analysis of dopaminergic and serotonergic responses to acute alcohol exposure in zebrafish. *Behav Brain Res.* 2009;200:208-13.
- [21] Peng J, Wagle M, Mueller T, Mathur P, Lockwood BL, Bretau S, et al. Ethanol-modulated camouflage response screen in zebrafish uncovers a novel role for cAMP and extracellular signal-regulated kinase signaling in behavioral sensitivity to ethanol. *J Neurosci.* 2009;29:8408-18.
- [22] Egan RJ, Bergner CL, Hart PC, Cachat JM, Canavello PR, Elegante MF, et al. Understanding behavioral and physiological phenotypes of stress and anxiety in zebrafish. *Behav Brain Res.* 2009;205:38-44.
- [23] Grossman L, Utterback E, Stewart A, Gaikwad S, Chung KM, Suci C, et al. Characterization of behavioral and endocrine effects of LSD on zebrafish. *Behav Brain Res.* 2010;214:277-84.
- [24] Roseberg DB, Rico EP, Mussulini BH, Piato AL, Calcagnotto ME, Bonan CD, et al. Differences in spatio-temporal behavior of zebrafish in the open tank paradigm after a short-period confinement into dark and bright environments. *PLoS One.* 2011;6:e19397.
- [25] Dlugos CA, Brown SJ, Rabin RA. Gender differences in ethanol-induced behavioral sensitivity in zebrafish. *Alcohol.* 2011;45:11-8.
- [26] Blaser RE, Roseberg DB. Measures of anxiety in zebrafish (*Danio rerio*): dissociation of black/white preference and novel tank test. *PLoS One.* 2012;7:e36931.

Legendas das figuras

Fig. 1. (A) Efeito do etanol sobre a frequência média das distâncias entre indivíduos (intervalo de 0-30 cm) no teste do open-field ao longo de 360 s. (B) Efeito do etanol sobre a frequência média das distâncias entre indivíduos (intervalo de 0-10 cm) no teste do open-field ao longo de 360s. Os dados estão expressos como porcentagem das frequências médias \pm E.P.M. $n = 8$ grupos com 5 indivíduos em cada grupo. Símbolos indicam diferença estatística entre os grupos controle e tratado (ANOVA de duas vias seguida do teste de Bonferroni, **= $p < 0,01$; *** = $p < 0,001$). Letras minúsculas indicam diferença dentro do grupo controle. Letras maiúsculas indicam diferença dentro do grupo tratado. Letras diferentes indicam diferença estatística (ANOVA de duas vias seguida do teste de Bonferroni, $p < 0,05$).

Fig. 2. Efeito do etanol sobre a distância média entre indivíduos ao longo de 360 s. Os dados estão expressos como média \pm E.P.M. Os símbolos indicam diferença estatística entre o grupo controle e o grupo tratado no respectivo tempo. Os dados foram analisados por ANOVA de duas vias com medidas repetidas seguida do teste de Bonferroni; * = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$; *** = $p < 0,001$.

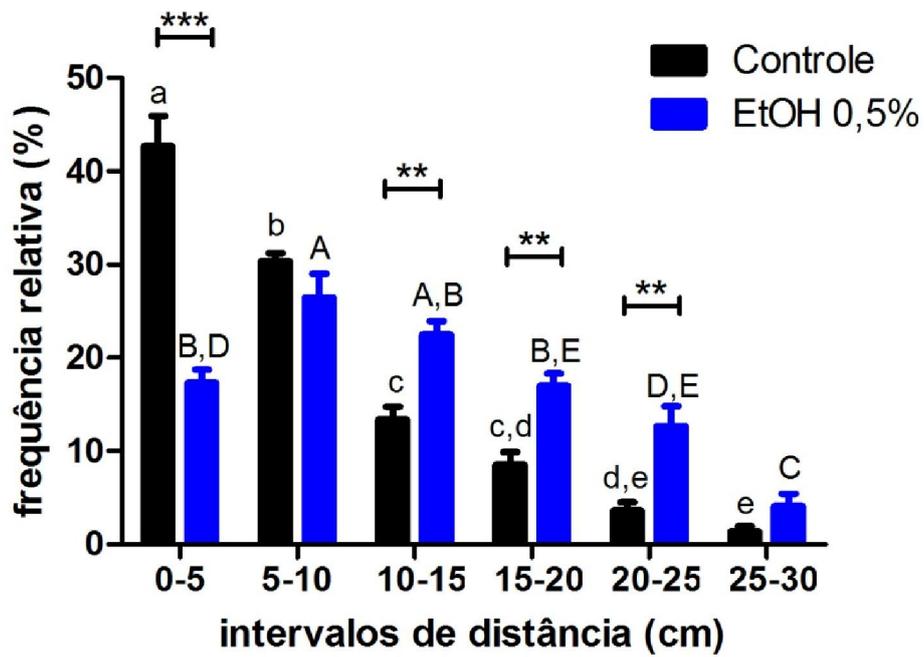
Fig. 3. Efeito do etanol sobre a área média do grupo ao longo de 360 s. Os dados estão expressos como média \pm E.P.M. Os símbolos indicam diferença estatística entre o grupo controle e o grupo tratado no respectivo tempo. Os dados foram analisados por ANOVA de duas vias com medidas repetidas seguida do teste de Bonferroni; * = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$; *** = $p < 0,001$.

Fig. 4. Correlação entre a distância média entre indivíduos e a área média formada pelos peixes ao longo do tempo. R^2 grupo controle= 0,8355 ($P < 0,0001$); R^2 grupo EtOH= 0,9368 ($P < 0,0001$).

Fig. 5. Efeito do etanol sobre as distâncias médias em relação ao centro do aparato ao longo de do tempo. Os dados estão expressos como média \pm E.P.M. Os símbolos indicam diferença estatística entre o grupo controle e o grupo tratado no respectivo tempo. Os dados foram analisados por ANOVA de duas vias com medidas repetidas seguida do teste de Bonferroni; * = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$.

Figura 1

A



B

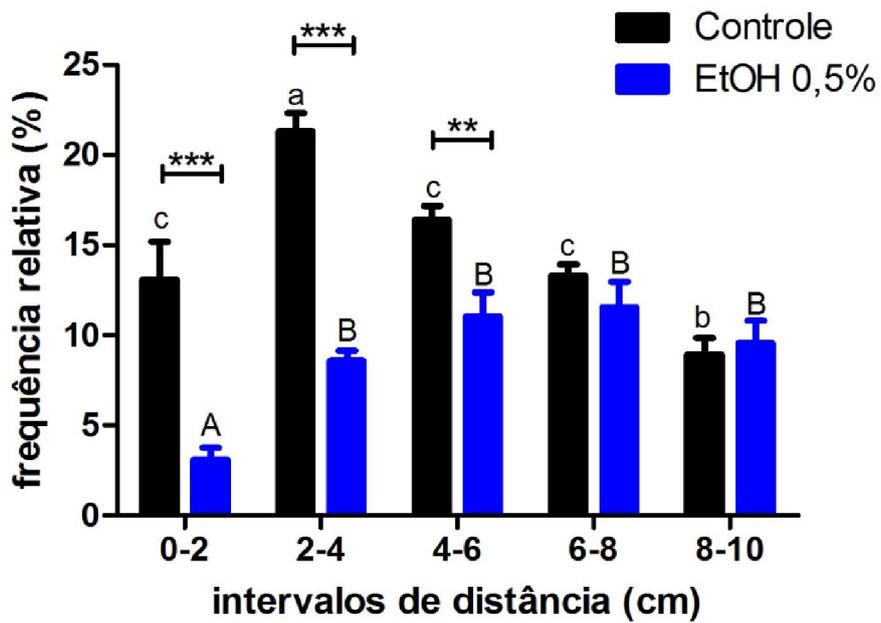


Figura 2

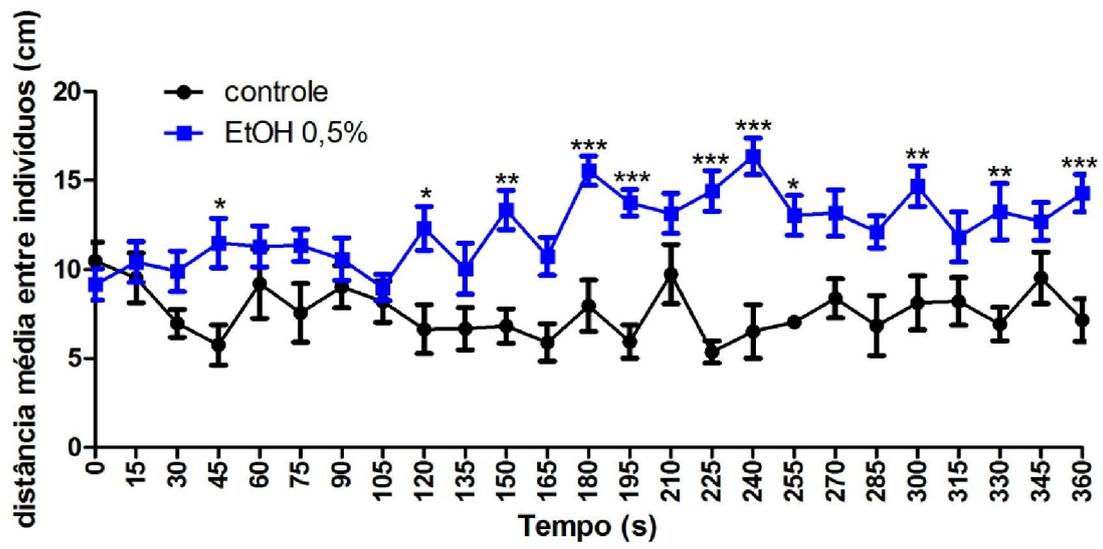


Figura 3

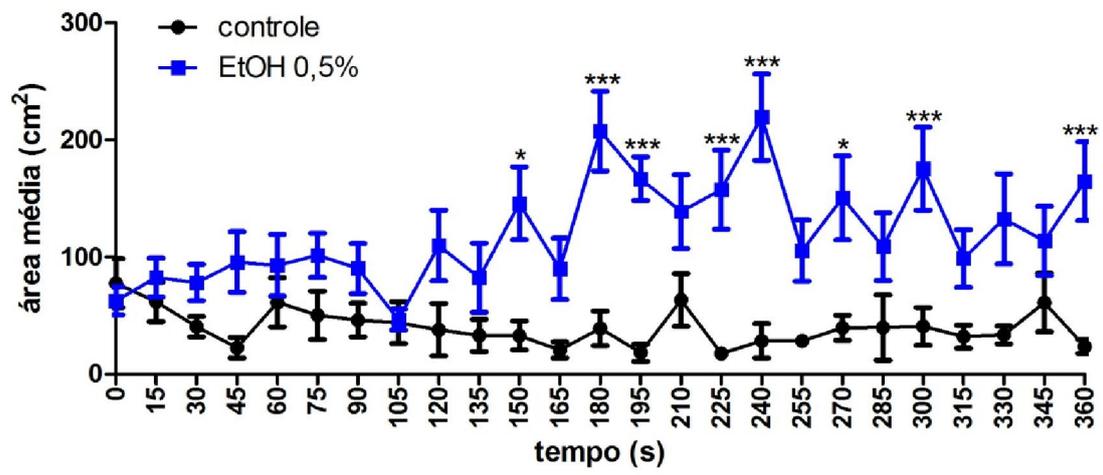


Figura 4

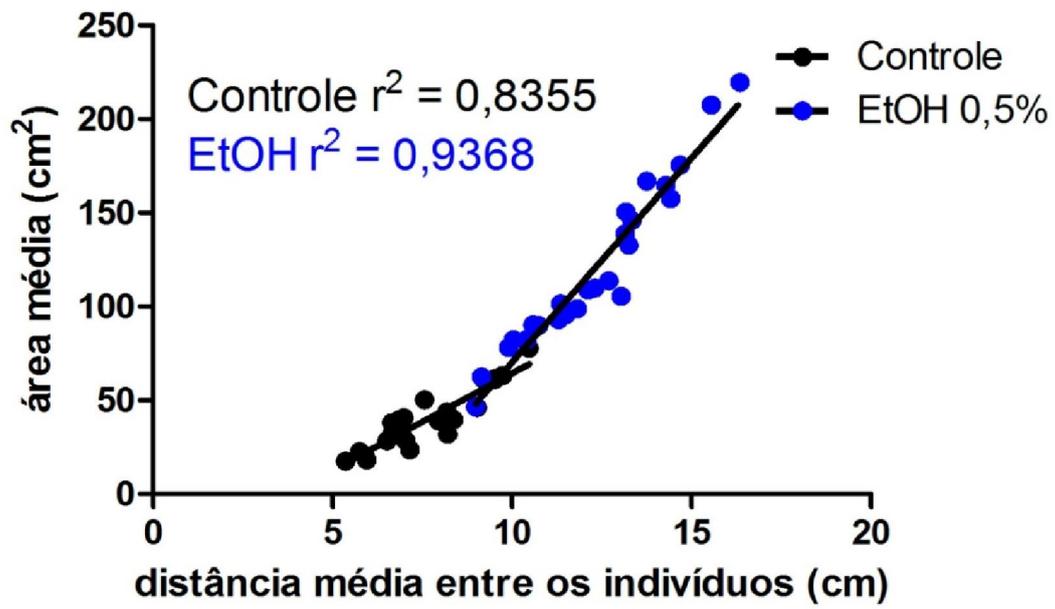


Figura 5

