

MARCO ANTONIO DE CAMPOS JÚNIOR

**Comportamento Social e Memória em Zebrafish (*Danio rerio*) a partir da
utilização de estímulos virtuais**

**UBERLÂNDIA
2023**

MARCO ANTONIO DE CAMPOS JÚNIOR

Comportamento Social e Memória em Zebrafish (*Danio rerio*) a partir da utilização de estímulos virtuais.

Trabalho de Conclusão do Curso, apresentado ao Instituto de Psicologia da Universidade Federal de Uberlândia, como requisito parcial à obtenção do título de bacharel em Psicologia.

Orientador: Prof. Dr. Joaquim Carlos Rossini.

**UBERLÂNDIA
2023**

MARCO ANTONIO DE CAMPOS JÚNIOR

Comportamento Social e Memória em Zebrafish (*Danio rerio*) a partir da utilização de estímulos virtuais

Trabalho de Conclusão do Curso, apresentado ao Instituto de Psicologia da Universidade Federal de Uberlândia, como requisito parcial à obtenção do título de bacharel em Psicologia.

Orientador: Prof. Dr. Joaquim Carlos Rossini.

Banca Examinadora

Uberlândia, 23 de junho de 2023.

Prof. Dr. Joaquim Carlos Rossini

Universidade Federal de Uberlândia – Uberlândia/MG

Prof. Dr. Leonardo Gomes Bernardino

Universidade Federal de Uberlândia – Uberlândia/MG

Prof. Dr. Eduardo de Freitas Bernardes

Universidade Federal de Uberlândia – Uberlândia/MG

Uberlândia

2023

Agradecimentos

Este trabalho, ao mesmo tempo que é símbolo da finalização de um ciclo, é também o marco inicial de uma jornada que espero ser frutífera de contribuição à ciência pela qual escolhi dedicar minha vida e a todas as demais jornadas de seres humanos que terei o privilégio de conhecer durante este percurso. Sendo assim, faz-se necessário olhar para trás e tecer algumas palavras sobre as figuras importantes que contribuíram para esta empreitada.

De modo geral, sou grato a todas as contingências que se combinaram para fazer com que eu chegasse até aqui, principalmente os meus que vieram antes de mim e tornaram tudo isso possível.

Aos meus pais, Neide Costa e Marco Campos, pelo amor incondicional, pela liberdade de ser quem ou o que eu quiser, pelas abdições, por sempre me colocarem como prioridade. Por me permitirem voar e ao mesmo tempo serem meu chão.

Aos meus irmãos, Luisa e Matheus, por me mostrar que é possível.

Aos meus sobrinhos e afilhados, Julia, Lucca, Luana e Heitor, por me darem a força necessária para continuar, mesmo sem terem a menor ideia disso. O objetivo sempre foi proporcionar uma vida e um futuro melhor para vocês.

À Marina. Companheira é a definição perfeita do que você é. Obrigado por ser a responsável por (quase) tudo que há de bom em mim. Por ser a pessoa que – literalmente – esteve ao meu lado desde o primeiro dia e faz de tudo para que eu seja uma pessoa melhor. Acho lindo o que construímos e ainda vamos construir.

À Universidade Federal de Uberlândia, na figura dos docentes e amigos que fiz durante esta jornada, pelo espaço de desenvolvimento e crescimento proporcionado ao longo dos anos. Sem dúvida é um local do qual tenho muito carinho e lutarei para que muitos ainda possam desfrutá-lo de forma gratuita e com qualidade.

Ao professor orientador Dr. Joaquim Carlos Rossini, em especial, por proporcionar este ambiente acolhedor e seguro para a realização deste trabalho, além do investimento temporal, emocional e financeiro. Obrigado pela disponibilidade. É nítida a quantidade de amor depositado naquilo que você faz. O mundo precisa de mais cientistas como o senhor.

Ao Prof. Dr. Leonardo Gomes Bernardino, pela imensa contribuição durante o curso, não só como professor mas também pela postura enquanto profissional, e pelo aceite em participar da Banca Examinadora, assim como agradeço também o Prof. Dr. Eduardo de Freitas Bernardes, que apesar de termos nos encontrado em raros momentos, sem dúvida terá muito a contribuir para a finalização desta obra.

“Não considere nenhuma prática como imutável. Mude e esteja pronto a mudar novamente.

Não aceite verdade eterna. Experimente” Burrhus Frederic Skinner (1904-1990).

RESUMO

O peixe Zebrafish (*Danio rerio*) vem conquistando espaço como animal de pesquisa em diversas áreas do conhecimento, devido a diversos aspectos como: simplicidade anátomo-fisiológica e facilidade de aquisição, manutenção e experimentação. O objetivo deste estudo foi investigar se uma animação de 5 zebrafishes, idênticos ao peixe experimental, é capaz de eliciar comportamento social, ou seja, aproximação e permanência do peixe em relação ao estímulo apresentado. Para tanto, uma amostra de 22 animais foi utilizada em um experimento de 3 etapas: I) habituação; II) experimento; e III) memória. A variável dependente analisada foi a porcentagem temporal de permanência do animal nas zonas próximas à apresentação do estímulo visual virtual. Os resultados sugerem que o zebrafish é atraído pela animação de peixes da mesma espécie, permanecendo por um curto período próximo ao local de apresentação de estímulo após a sua apresentação. Tais achados corroboram com a literatura acerca do tema e dão subsídios para uma agenda de pesquisa sobre aspectos comportamentais associados à memória e comportamento grupal.

Palavras-chave: zebrafish; aprendizagem associativa; estímulos virtuais; Análise Etoexperimental do Comportamento

ABSTRACT

The Zebrafish fish (*Danio rerio*) has been conquering space as a research animal in several areas of knowledge, due to several aspects such as: anatomical-physiological simplicity and ease of acquisition, maintenance and experimentation. The objective of this study was to investigate whether an animation of 5 zebrafishes, identical to the experimental fish, is capable of eliciting social behavior, that is, approximation and permanence of the fish in relation to the stimulus presented. To this end, a sample of 22 animals carried out an experiment in 3 stages: I) habituation; II) experiment; and III) memory. The dependent variable analyzed was the temporal percentage of permanence of the animal in the zones close to the presentation of the virtual visual stimulus. The results suggest that the zebrafish is attracted by the animation of fish of the same species, remaining for a short period close to the place of presentation of the stimulus after its presentation. These findings corroborate other findings in the literature and provide subsidies for a future researchs on behavioral aspects associated with memory and group behavior.

Keywords: zebrafish; associative learning; virtual stimuli; Ethoexperimental Analysis of Behavior.

Introdução

Zebrafish (*Danio rerio*): um novo animal de pesquisa na análise etoexperimental do comportamento e na neurociência.

O Zebrafish (ZF) (ou peixe-zebra, no português brasileiro) é um peixe tropical teleósteo, cipriniforme, da família dos ciprinídeos encontrado majoritariamente no sul e sudeste asiático. Este vem se tornando uma importante opção como animal de pesquisa em neurociência comparativa, biologia experimental, neurofisiologia e biomedicina (Lopes, 2021; Spence et al., 2007).

Trata-se de um peixe altamente social (Al-Imari & Gerlai, 2008; Blaser & Rosemberg, 2012; Miller & Gerlai, 2007; Nunes et al., 2017; Pather & Gerlai, 2008), vivendo em cardumes que variam entre 5 a 20 indivíduos (Dammski et al., 2011). Na natureza, Spence et al. (2007) afirmam que os cardumes podem variar de 2 a 100 indivíduos e possuem uma grande capacidade reprodutiva, podendo chegar a centenas de ovos em cada fecundação.

Apesar das variações entre linhagens, peixes selvagens e criados em cativeiro, pode-se dizer que, após a eclosão do ovo, que acontece três dias pós fertilização, o ZF passa pelos seguintes estágios desenvolvimentais: a) larval (até 30 dias pós fecundação [dpf]), em que já possui todos os órgãos mais importantes funcionais e nada livremente, tendo em média 6 mm de comprimento. É importante destacar que tanto o ovo quanto a larva do ZF são transparentes, o que permite melhor manipulação e análise experimentais; b) juvenil (até 90 dpf), período de intenso desenvolvimento no qual já se pode detectar o padrão de pigmentação e nadadeiras dos adultos, tendo por volta de 10 mm de comprimento; e c) adulto (após 90 dpf), em que o animal já se desenvolveu por completo e se encontra apto para a reprodução. Em média, o ZF adulto possui por volta de 30 mm de comprimento, sendo que as fêmeas são geralmente mais largas e possuem barbatanas menores que os machos (Dammski et al., 2011; Spence et al., 2007).

Experimentos com este animal são realizados desde os anos 1930. Porém, a partir da década de 1980, com o aumento das investigações genéticas, o ZF vem sendo cada vez mais utilizado em pesquisas nas áreas biomédicas (Lieschke & Currie, 2007). Howe et al. (2013), em um estudo publicado pela revista Nature a partir do sequenciamento do genoma do ZF, afirmam que 71,4% dos genes humanos possuem pelo menos um evidente ortólogo com o peixe. Com base nos mesmos autores, este sequenciamento justifica sua grande manipulação genética, o que além de auxiliar na compreensão da biologia e desenvolvimento dos animais vertebrados, suas patologias e deficiências em geral, permite também a investigação acerca do desenvolvimento de afecções humanas específicas a nível celular, molecular e funcional.

Assim, o ZF ocupa um lugar especial dentro de estudos translacionais. Isso porque, ao mesmo tempo em que é um animal vertebrado, o que garante similaridades importantes em pesquisas comparativas com humanos, este peixe, por sua simplicidade anatômico-fisiológica, possibilita investigações profundas e paralelos congruentes em pesquisas comparativas, o que é ainda mais favorável tendo em vista o fácil manuseio do animal (Gerlai, 2017; Lopes, 2021; Pather & Gerlai, 2010; Spence et al., 2007).

Tais fatores se tornam ainda mais relevantes ao se considerar pesquisas genéticas, pois como já citado, seus embriões são transparentes, organizados de maneira simples quando comparados com outros vertebrados, e são gerados por meio de fecundação externa. Isto facilita a visualização da experimentação e permite esforço e infraestrutura menores para tais investigações, pois a depender do que se pretende analisar, não há necessidade de cirurgias ou análises *post-mortem* (Detrich, Westerfield & Zon, 1999; Spence et al., 2007). Como já descrito, tais configurações permitem, inclusive, a modificação genética para a criação de linhagens específicas para o estudo de patologias humanas (Lieschke & Currie, 2007). MacRae e Peterson (2015) também descrevem como benéfica a possibilidade de trabalhar com o organismo vivo, pois isto proporciona análises mais complexas, tendo em vista que o

ZF possui um vasto repertório de processos biológicos e sistemas de órgãos totalmente integrados.

Motivações econômicas e espaciais podem também ser destacadas: quando comparado aos roedores, o ZF apresenta um custo baixo de aquisição, possui proles volumosas em cada fecundação, exige menor manutenção do seu meio e é possível agrupar diversos indivíduos em um espaço bastante reduzido. Essas combinações diminuem consideravelmente os custos e facilita seu manuseio, tanto para manter as condições excelentes e garantir seu bem-estar, quanto para utilizá-lo em estudos (Detrich, Westerfield & Zon, 1999; Gerlai, 2017; Lieschke & Currie, 2007).

Outro fator importante está relacionado com o fato de, diferentemente dos ratos e camundongos já amplamente estudados, o ZF é um animal diurno, de modo que seu sistema visual apresenta uma expressiva similaridade com o dos seres humanos, permitindo pesquisas mais congruentes neste segmento (Lopes, 2021; Gerlai, 2017; Qin et al., 2014). Porém, cabe destacar que, apesar das vantagens descritas, o ZF carece de estruturas complexas e órgãos que possuem um papel importante na gênese e manutenção de patologias humanas, o que se configura uma limitação deste modelo experimental (Lieschke & Currie, 2007).

Sumariamente, a combinação de numerosas mutações, baixo custo relativo de reprodução e manutenção, e fácil manipulação em praticamente todos os estágios desenvolvimentais torna este peixe um excelente animal para a realização de pesquisas nas mais diversas vertentes e com os mais diversos objetivos (Detrich, Westerfield & Zon, 1999). Dado o exposto, é correto concluir que a combinação entre seus aspectos desenvolvimentais e comportamentais fazem do ZF uma importante opção para um variado escopo de pesquisas comportamentais.

Zebrafish em tarefas de aprendizagem associativa e a presença de animais da mesma espécie como estímulo reforçador

Aprendizagem e memória são características presentes, em maior ou menor grau, em todos os animais. A aprendizagem associativa pode ser considerada um tema amplamente estudado e uma das formas mais complexas de aprendizagem, sendo caracterizada como a aquisição de uma relação causal e/ou temporal entre pelo menos dois estímulos, de modo que sua forma mais simples é a associação entre um estímulo incondicionado (EI) e um estímulo condicionado (EC) (Gerlai, 2011).

De acordo com Kalueff et. al. (2013), os chamados ‘comportamentos de agregação’ [*Aggregation behavior*] podem ser definidos como a procura de indivíduos da mesma espécie com base em pistas visuais, químicas e outras. Ainda de acordo com os mesmos autores, tais comportamentos podem ocasionar a formação de agrupamentos [*shoaling*], quando ocupam o mesmo espaço de forma relativamente não polarizada, e cardumes [*schooling*], quando passam a se locomover juntos e de forma coordenada. Comportamentos como estes são essenciais para a sobrevivência do ZF, pois facilitam a busca por alimento, proteção e encontro de parceiros sexuais (Miller & Gerlai, 2011; Saverino & Gerlai, 2008). Inclusive, métodos via *software* já foram desenvolvidos para quantificar o comportamento de shoaling deste animal (Miller & Gerlai, 2007).

Como já descrito, o ZF é altamente social, ou seja, vive majoritariamente em grupos, fazendo com que este comportamento inato seja utilizado para a investigação de variáveis comportamentais importantes que apresentam relações com uma série de transtornos mentais em humanos (Gerlai, 2017; Qin et al., 2014).

Neste sentido, Qin et al. (2014) definem comportamento social como a aproximação do indivíduo a um estímulo social a priori reforçador. Porém, diferentemente do comportamento exploratório, no comportamento social é pressuposto, além da aproximação

(diminuição da distância entre sujeito e estímulo) há também a permanência deste sujeito próximo ao estímulo eliciador.

Dado o exposto, pesquisadores que têm utilizado peixes da mesma espécie como recompensa para pesquisas relacionadas com aprendizagem associativa tiveram bons resultados. Fernandes et. al. (2016) argumentam que este estímulo não precisa de privação e não ocorre saciação (como no caso da comida, por exemplo), sendo estes pontos positivos para a sua utilização.

Al-Imari e Gerlai (2008) realizaram um estudo de aprendizagem associativa em que a presença de um cartão vermelho era o estímulo discriminativo para a presença de indivíduos da mesma espécie. Depois de 10 sessões de treinamento, os ZFs experimentais ficaram significativamente mais perto do cartão vermelho quando este era apresentado na ausência dos peixes. Esses resultados sugerem que o ZF é capaz de associar informações de forma consistente e a presença de indivíduos da mesma espécie pode ser considerada um estímulo reforçador.

Sison e Gerlai (2010), em um experimento utilizando o labirinto em cruz, foram capazes de demonstrar que o ZF consegue realizar tanto uma associação visual (um cartão de plástico vermelho) quanto espacial (recompensa disponível em apenas um braço do labirinto) com o estímulo reforçador (comida). Em outro estudo, Karnik e Gerlai (2012) também demonstraram que o ZF é capaz de estabelecer associações visuais e espaciais, porém, desta vez o estímulo reforçador foi a proximidade com indivíduos da mesma espécie. Fernandes et al. (2016), apesar de algumas inconsistências paramétricas, como a presença dos peixes da mesma espécie dentro da arena (o que pode fornecer pistas químicas e auditivas ao peixe experimental), encontraram que a associação entre a câmara contendo estes peixes (estímulo espacial), a cor que a diferenciava das outras câmaras (estímulo visual) foi adquirida com sucesso.

Tais linhas de pesquisa não investigam apenas a aproximação do sujeito a um estímulo apetitivo a partir de pistas ambientais, mas também justamente o oposto, ou seja, a evitação de um estímulo aversivo. Aoki et al. (2015), utilizando a arena em Y, conseguiram em pouco tempo, quando comparado a outros estudos nesta temática, fazer o ZF associar a mudança de cor no fundo do aquário com um choque elétrico subsequente, de modo que a única forma de evitar este estímulo aversivo era alcançar uma área específica da arena, o que os peixes conseguiram realizar de forma consistente.

Dada sua facilidade de manejo, o ZF tem sido amplamente utilizado na investigação de efeitos de substâncias químicas na aprendizagem ou memória. Ruhl et. al. (2015), na tentativa de estudar o sistema endocanabinóide destes animais, testou o resultado da administração de substâncias agonistas e antagonistas em duas condições de aprendizagem associativa: uma com a consequência apetitiva (comida) e outra para fugir de uma condição aversiva (choque). Os achados sugerem que o sistema endocanabinóide do ZF é capaz de modular a aprendizagem associativa do animal.

Em uma revisão da literatura, Khan et al. (2017) afirmaram já existirem modelos comportamentais consistentes utilizando o ZF para a investigação de depressão e ansiedade, bem como a existência de trabalhos que conseguiram, com sucesso, diminuir a frequência de comportamentos considerados depressivos e ansiosos por meio da administração de substâncias químicas. Acerca do tratamento de epilepsia, pesquisadores já são capazes de induzir comportamentos epiléticos tanto no estágio larval quanto adulto do ZF, por meio de substâncias ou alterações genéticas, conseguindo suprimir sua manifestação por meio da administração de drogas antiepiléticas. Os autores também relataram sucesso na investigação da esquizofrenia, doença de Alzheimer e esclerose lateral amiotrófica. Os resultados são avaliados tanto de forma comportamental quanto a partir do monitoramento das respostas neurais.

Dado o exposto, é possível afirmar que o ZF, além de estar se tornando um ótimo animal de estudo em trabalhos fisiológicos, é também capaz de associar estímulos, o que estabelece uma boa perspectiva para os estudos da memória. Porém, muitos aspectos desse modelo ainda aguardam por melhores esclarecimentos, o que faz com que o estudo dos melhores arranjos possíveis para a investigação de parâmetros comportamentais seja um componente importante para sua consolidação.

Estudos envolvendo vídeos e/ou animações como estímulo ao zebrafish

Além disso, novos estudos visam trazer elementos para a investigação do comportamento social no ZF. Em dois estudos, Saverino e Gerlai (2008) investigaram o agrupamento do ZF em diversas condições. No primeiro, analisaram a distância entre o animal e um grupo de peixes experimentais da mesma espécie com fenótipos iguais, com fenótipos diferentes, peixes de outra espécie que possuem tendência a agrupamento e peixes de outra espécie que geralmente não se agrupam. Os resultados sugerem uma alta preferência do ZF em se agrupar com peixes idênticos da mesma espécie. Com peixes que apresentam fenótipos diferentes a preferência foi significativa, porém menor. Por fim, os peixes experimentais parecem não se agrupar com peixes de espécies diferentes de forma robusta.

No segundo estudo, os pesquisadores utilizaram animações que alteravam características do ZF, como cor (vermelho e amarelo), proporção do corpo, padrões de listras e local de apresentação, e comparam a preferência do peixe experimental com a animação inalterada do ZF, apresentadas em lados opostos do tanque experimental. Os resultados apontaram não haver alteração significativa de preferência em relação ao padrão de listras e o local de apresentação de estímulos, bem como a apresentação mais “achatada” do animal. Porém, o peixe apresentou ligeira preferência para com o peixe inalterado quando comparado com o vermelho, alta preferência para com o peixe amarelo e alta evitação para com o peixe

“alongado”. Esses achados corroboram para o entendimento de que o ZF possui padrões de agrupamento bastante complexos. Além disso, demonstra que diferentes apresentações de estímulos animados são capazes de eliciar respostas robustas do peixe experimental.

Qin et. al. (2014) investigaram quatro formas de apresentação de estímulo para a eliciação de comportamento social em ZF: animais animados via software (2D), gravação de peixes reais, apresentação de peixes vivos em outro tanque experimental e apresentação de peixes vivos no mesmo tanque experimental. A mensuração comportamental consistiu em medir a distância do peixe experimental e o vidro do aquário ou da tela de apresentação do estímulo. Com base nos resultados, os autores afirmaram não haver diferença significativa na eliciação de comportamento social entre as quatro formas de apresentação de estímulo; ou seja, todas as formas induziram um comportamento robusto de aproximação do estímulo por parte do peixe experimental. Deste modo, os resultados do estudo apontam não haver necessidade de animações complexas em 3D ou de interação entre o peixe experimental e o estímulo para eliciar um comportamento social.

Além deste estudo, Pather e Gerlai (2010) substituíram os peixes reais pela apresentação de animais virtuais animados como estímulo para a eliciação de comportamento social. De modo geral, o delineamento experimental consistiu na apresentação de 6 peixes virtuais com a configuração de fêmeas – por se tratar de uma preferência da espécie – em três situações experimentais: estímulos apresentados em lados opostos da arena em um intervalo fixo de tempo; estímulos apresentados do mesmo lado da arena em intervalos fixos, com o intuito de verificar se o peixe é capaz de aprender esse padrão de apresentação e a situação final em que os estímulos eram apresentados em ambos os lados aleatoriamente. O primeiro grupo compreendeu o padrão, de modo que, progressivamente, à medida que o estímulo de um lado da arena era encerrado eles já se dirigiam para o lado oposto. O segundo obteve resultados inconclusivos, pois não foram detectadas diminuições de latência para os animais

se direcionarem ao estímulo. Por fim, a última situação (linha de base) não apresentou mudança significativa no comportamento do grupo.

Sendo assim, uma questão da presente investigação é: quais seriam as vantagens de realizar este tipo de estudo utilizando peixes animados em detrimento de peixes vivos? Ambas as formas de apresentação possuem seus prós e contras.

Chouinard-Thuly et al. (2017), em um artigo com orientações técnicas e conceituais acerca do uso de estímulos animados no estudo do comportamento animal, argumentaram que animações permitem a padronização e repetição exata do estímulo a ser apresentado, algo difícil de realizar com organismos vivos ou em ambientes naturais. A fácil alteração de parâmetros e padrões, podendo moldar o estímulo e o ambiente também foi um aspecto citado.

Além disso, os autores afirmaram que a utilização de estímulos animados contribui para os 3Rs: substituição [*replacement*] e redução [*reduction*] dos animais a serem utilizados, bem como o refinamento [*refinement*] do delineamento experimental, o que se faz de extrema importância em termos metodológicos e éticos.

No entanto, de acordo com os mesmos autores, a criação das animações pode ser um processo que demanda tempo considerável, o que faz com que os pesquisadores devam pensar em linhas de pesquisa utilizando animações ou as disponibilizem para outros trabalhos.

A questão da generalização para o ambiente natural também foi um aspecto importante, de modo que a orientação é de cautela na interpretação dos resultados sem que validações ecológicas sejam conduzidas. Por fim, também houveram comentários acerca da não-interação entre a animação e o animal experimental, o que pode ser um problema a depender da variável a ser estudada, mas pode ser algo que futuramente pode ser sanado, com a criação de animações que possam responder ao sujeito de pesquisa ou com a utilização de robôs, algo que tem sido colocado em prática com maior ênfase nos últimos anos.

Velkey et al., (2019) compararam em pares a preferência do peixe experimental a partir de três condições: peixes vivos, réplicas móveis motorizadas e a apresentação de um vídeo. Os achados demonstram uma preferência significativa do ZF em relação aos peixes vivos, seguido das réplicas motorizadas e o vídeo. Ou seja, o estudo demonstra que o ZF é capaz de discriminar estímulos de diferentes níveis de realismo, o que deve ser uma variável importante na elaboração do aparato experimental.

Por outro lado, Ladu et al. (2015) compararam o comportamento de afastamento do peixe experimental em relação a três estímulos: o peixe Acará-Açu Vermelho [*Red Oscar*] vivo, um predador alopatrico (ou seja, não encontrado naturalmente nas regiões que o ZF habita), sua réplica robótica e uma animação. Tanto o peixe vivo quanto o robô foram capazes de eliciar respostas robustas de afastamento, ao passo que a animação falhou nesse aspecto. Convém destacar que os próprios autores destacaram que este resultado pode estar envolvido tanto com animação não apresentar perigo para o ZF experimental quanto com o peixe não ter percebido a animação.

Sendo assim, pode-se dizer que a utilização de animações para a eliciação de comportamento social ainda pode ser considerada uma área que precisa de maior investigação, de modo que este trabalho visa contribuir para a construção de conhecimento neste segmento.

Dado o exposto, este estudo teve por objetivo principal investigar se animações de peixes da mesma espécie são capazes de evocar o comportamento social no peixe experimental. O objetivo secundário foi verificar se o peixe é capaz de reter a informação do local onde o estímulo (peixes virtuais) se encontrava por um curto período de tempo após sua supressão.

Método

Animais, viveiro e arena experimental

Foram utilizados 32 animais, peixes ZF wt, aproximadamente 50/50 macho/fêmea, adquiridos em um viveiro comercial da cidade de Uberlândia, Minas Gerais. Durante o período dos testes os animais apresentavam o tamanho médio de 3,7 cm (cabeça/cauda) e idade média de 5 meses. Foi realizada uma análise para verificar se o tamanho dos animais experimentais seguia uma distribuição normal e homogênea, o que foi confirmado pelo teste de normalidade de D'Agostino-Pearson e teste t, ou seja, a amostra seguia uma distribuição normal e os animais não diferiram significativamente quanto ao tamanho.

Durante todo o seu desenvolvimento eles foram mantidos em viveiros de 35L (aproximadamente 15 indivíduos por tanque). Os parâmetros da água foram mantidos constantes: temperatura = 28° C, pH = 7~7,4, concentração de amônia = 0 (zero). O ciclo claro/escuro foi controlado e definido em 12 horas claro e 12 horas escuro (período claro das 6h às 18h). O viveiro era iluminado por uma lâmpada LED de 18W ativada e desativada por um temporizador. Os animais eram alimentados duas vezes ao dia (8h e 17h) por meio de um alimentador automático com ração comercial peletizada (Gold Neon®, Alcon). Da amostra inicial de 32 animais, 10 foram excluídos da análise final em razão de problemas técnicos de filmagem (três animais) ou pela expressão de um comportamento de congelamento (freezing) prolongado (períodos superiores a 95% do tempo em qualquer uma das etapas do protocolo experimental) (sete animais). Assim, a amostra final foi composta por 22 animais.

A arena experimental, na qual os animais eram testados individualmente, foi especialmente construída para esse fim, medindo 70 cm x 15 cm x 12 cm (CxAxL), iluminada por cima por uma luminária LED. Na parte central da arena foi colocada uma peça de policarbonato de 15x7 cm, em formato “U”, com uma espessura de 1 cm em relação às paredes da arena. Essa peça tinha a finalidade de proporcionar uma divisória, a fim de evitar o

comportamento de *thrashing*, no qual o animal colide repetidamente com as paredes da arena, atraído, provavelmente, pelo seu próprio reflexo (Kalueff et al., 2013). O experimento foi conduzido com uma coluna d'água de 7 cm.

A arena foi colocada sobre um cavalete com uma superfície de vidro especialmente projetada para permitir a filmagem através do fundo da arena experimental. A gravação foi realizada por meio de uma WebCam Full HD 1080p (C3 Tech WB-100BK), posicionada a 70 centímetros do fundo da arena. Em cada extremidade da arena foram colocados dois monitores 15" (Flatron LG) (1280 x 1024 p, 60 Hz), utilizados para a apresentação dos estímulos visuais (vídeo animado do grupo de ZF), como mostra a Figura 1. A apresentação e sincronização dos estímulos visuais foi realizada por meio do software E-Prime 2.0.



Figura 1: Aparato experimental utilizado nos experimentos.

Animação

Desde o início, este estudo teve como intenção desenvolver um trabalho que fosse de fácil acesso, replicação e modificação. Para este propósito, foi utilizado o software de animação e modelagem 3D Blender, que por ser de código aberto, até o momento da escrita deste artigo pode ser adquirido gratuitamente.

Neste sentido, optou-se por utilizar uma modelagem 3D que já estivesse disponível na internet, o que foi realizado com êxito. Com o objeto já texturizado e dentro do software, deu-se início a realização da animação.

Depois de alguns modelos e testagens pilotos, chega-se a uma animação em que cinco ZFs machos, com 4,3 cm cada, nadam na horizontal em velocidades diferentes. Houve a adição de um fundo verde em uma área equivalente à superfície lateral da arena, de modo que os ZF virtuais se movimentam de um lado para o outro do fundo e giram 180° ao chegar em cada extremidade. O restante do espaço do monitor foi preenchido com um fundo branco, a fim de favorecer a gravação. A Figura 2 ilustra a animação programada.

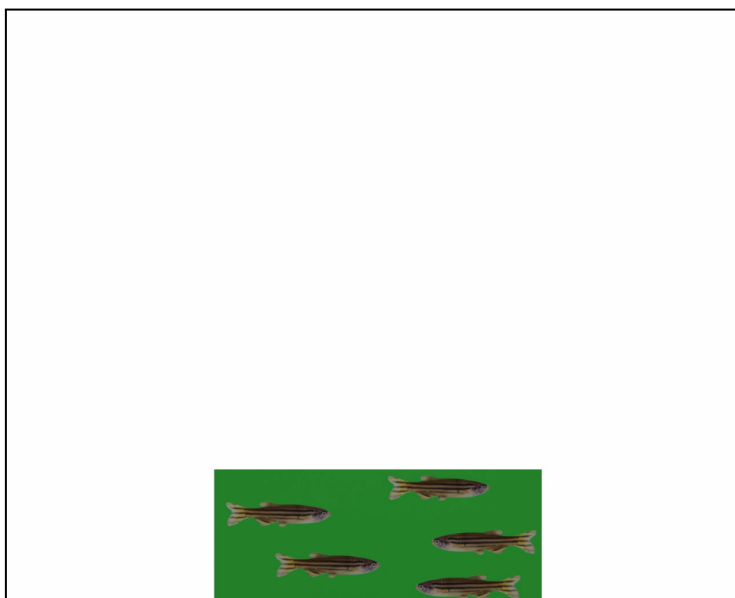


Figura 2: Captura de um frame da animação.

Experimento

Para testar a hipótese de que peixes animados servem de estímulo para a aproximação do peixe experimental, delineou-se um experimento que possui 3 etapas: I – habituação: o animal era colocado na arena por 10 minutos, e durante este tempo os dois monitores exibiriam a mesma imagem do fundo verde, sem a presença dos peixes; II – experimento: a animação era exibida em um dos monitores, por 10 minutos; e III – memória: o estímulo

desaparece e, pelos próximos 2 minutos a imagem do fundo verde volta a ser exibida. Esta terceira etapa serviu para testar a hipótese de que o peixe “retém” na memória de curta duração a informação de que naquele local havia um estímulo reforçador. Para cada animal, durante o experimento, o lado em que o estímulo foi apresentado se alternava, a fim de eliminar possíveis vieses de posição ou preferência da arena.

O ZF era, então, retirado do viveiro utilizando-se uma rede (rede boyu) e rapidamente era colocado na arena experimental, sempre tomando as devidas precauções para que este fosse depositado no centro da arena. Sendo assim, o experimento como um todo teve uma duração de 22 minutos e foi programado e controlado pelo software E-prime 2.0. Ou seja, após o peixe ser colocado na arena e os parâmetros de iluminação e gravação serem ajustados, este ocorreu de forma totalmente automatizada. A variável dependente registrada, em todas as três etapas experimentais, foi a porcentagem temporal de permanência do animal nas zonas 1 (Z1) e 2 (Z2) conforme ilustrado na Figura 3.

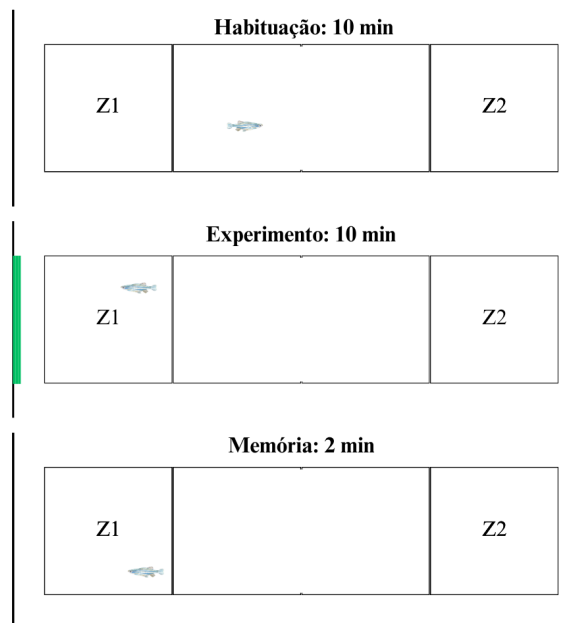


Figura 3: Esquemática das etapas do experimento. Os traços na lateral das arenas e o retângulo verde representam os monitores e o estímulo, respectivamente.

A cada 2 sessões experimentais a água do aquário era trocada. Além disso, após 4 sessões o aquário era lavado com sabão neutro em concentrações baixas. Tais ações tinham como objetivo eliminar possíveis elementos químicos secretados pelos ZFs durante o experimento, fator que poderia enviesar o comportamento dos ZFs seguintes.

As gravações foram realizadas utilizando o software de Câmera nativo do sistema operacional Windows, sendo armazenadas em um disco rígido e rastreadas por meio do software ToxTrac, também gratuito. Após o rastreamento, os dados foram analisados via BioEstat 5.0 e serão discutidos a seguir.

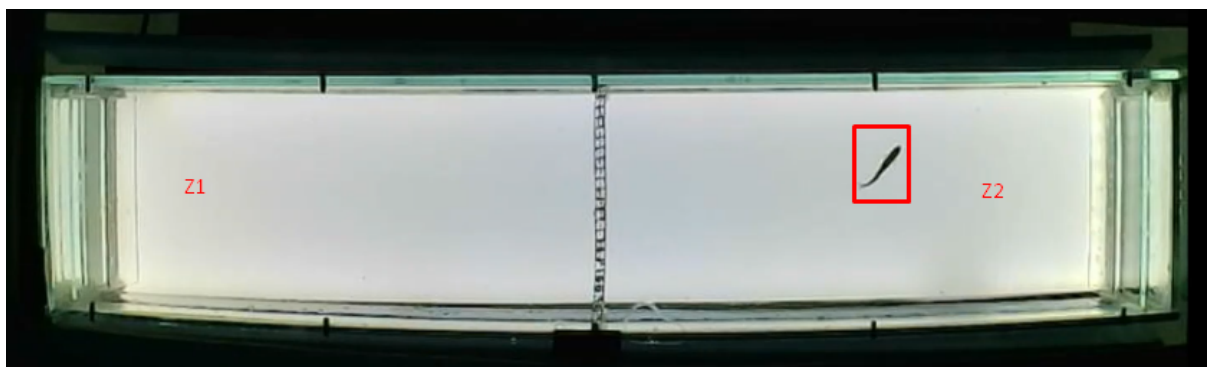


Figura 4: Captura da gravação. O ZF experimental se encontra destacado dentro do retângulo vermelho. As marcações nas bordas da arena representam as áreas de interesse (Z1 e Z2). A gravação era, então, submetida ao software de rastreamento que forneceu os dados para análise.

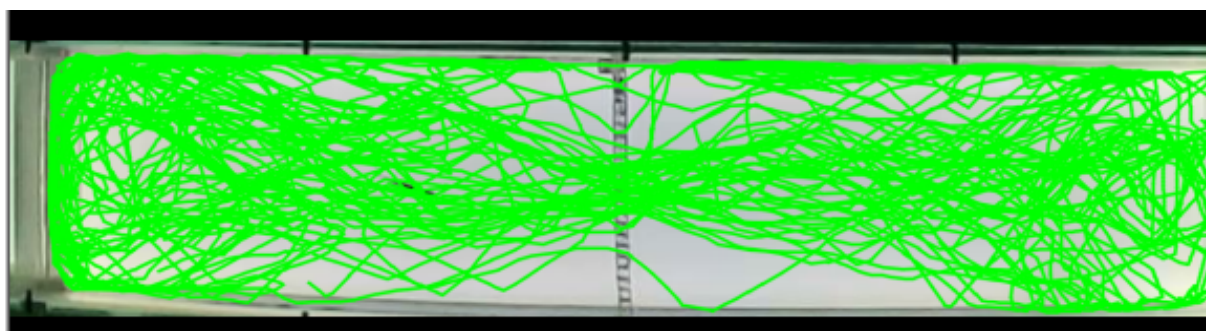


Figura 5: Captura de um rastreamento realizado na fase Habituação (10 min), em que não há apresentação do estímulo.

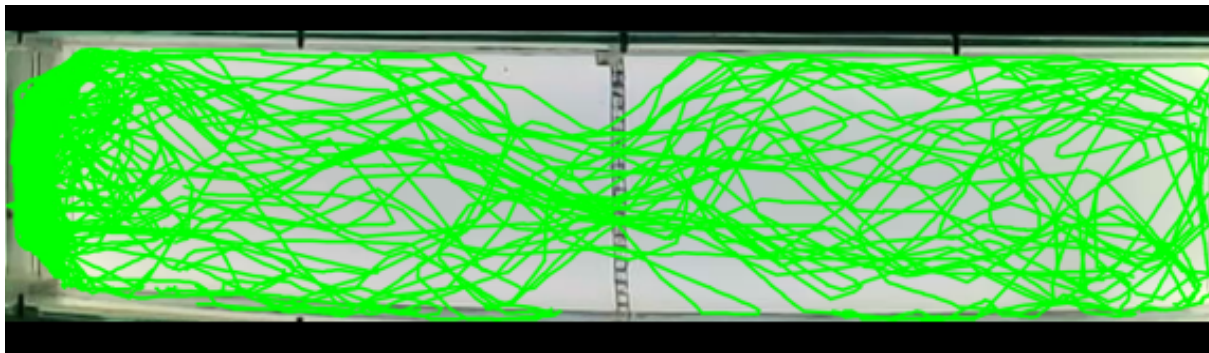


Figura 6: Captura de um rastreamento realizado na fase Experimento (10 min), em que o estímulo foi apresentado na extremidade próxima à Z1.

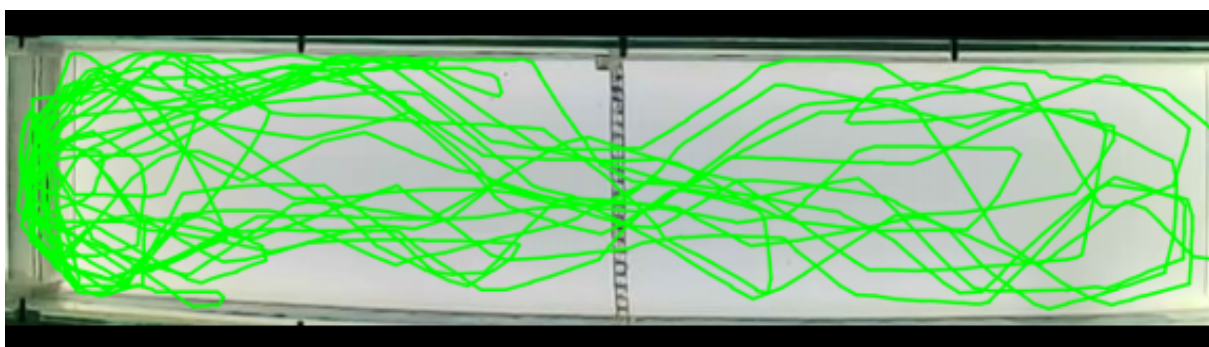


Figura 7: Captura de um rastreamento realizado na fase Memória (2 min), em que não há a apresentação do estímulo. Todas as imagens de rastreio correspondem ao mesmo ZF.

Resultados

As três etapas do protocolo experimental (habituação, experimento e memória) foram analisadas separadamente quanto ao tempo de permanência do animal nas zonas 1 e 2. A medida de tendência central adotada foi a mediana e o teste estatístico apropriado foi o teste de Wilcoxon. A variável dependente analisada foi a porcentagem de tempo que o animal permaneceu na zona 1 e na zona 2 no período de habituação (10 minutos), no período de apresentação do estímulo visual (experimento) (10 minutos) e o período de permanência na zona proximal após a apresentação do estímulo (memória) (2 minutos).

Durante o período de habituação, a análise não revelou diferença significativa na percentagem de tempo de permanência do animal na zona 1 e zona 2, com uma mediana de permanência em Z1 igual a 0,2861 e Z2 igual a 0,3318 ($z = 0,7629$, $p = 0,4455$, $r = 0,16$), como mostra a Figura 4. No período de apresentação do estímulo visual, o teste de Wilcoxon confirmou uma diferença significativa no tempo de permanência do animal na zona proximal compatível com a apresentação da animação (zona estímulo), com uma mediana igual a 0,4701, em comparação a permanência na zona sem a apresentação do estímulo com uma mediana igual a 0,2628 ($z = 2,8407$, $p = 0,0045$, $r = 0,60$), o que sugere um efeito significativo do estímulo visual na atração do animal experimental, como mostra a Figura 5. A mesma análise confirmou uma diferença significativa no tempo de permanência na zona proximal de apresentação da animação, após o fim da apresentação do grupo virtual (2 minutos) ($z = 2,0616$, $p = 0,0392$, $r = 0,44$), como mostra a Figura 6.

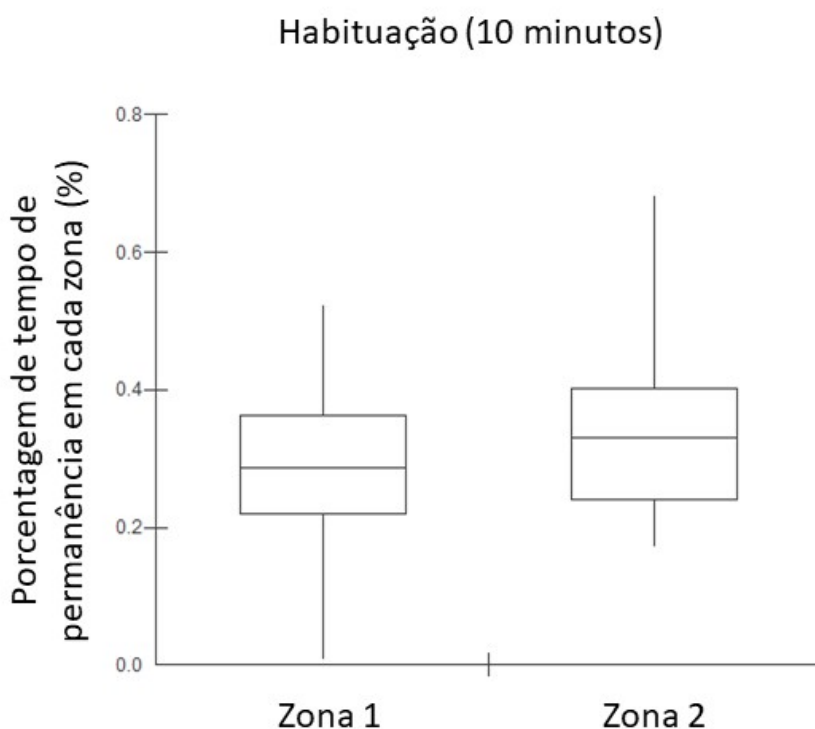


Figura 8: Porcentagem de tempo de permanência em cada zona na etapa Habituação.

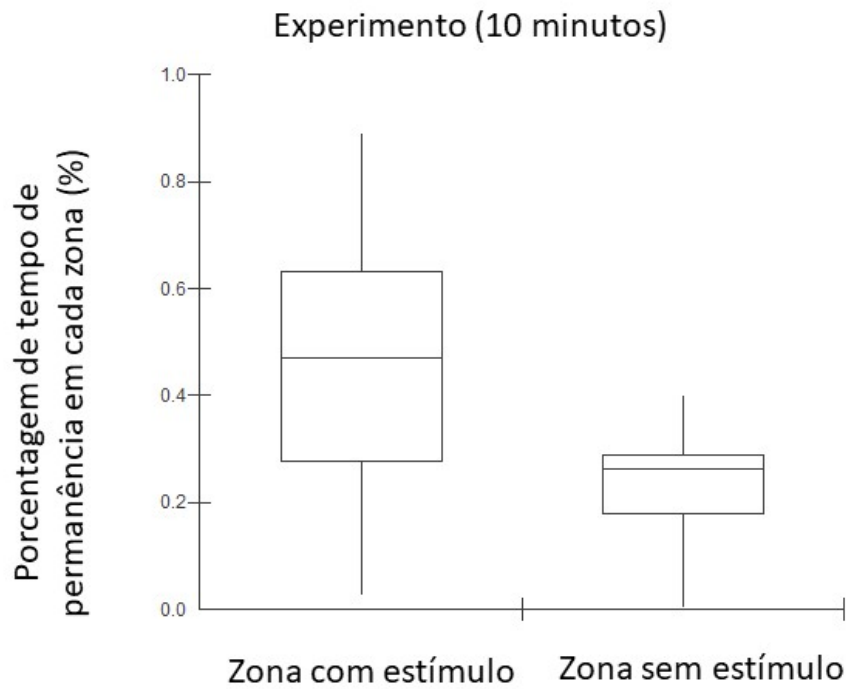


Figura 9: Porcentagem de tempo de permanência em cada zona na etapa Experimento.

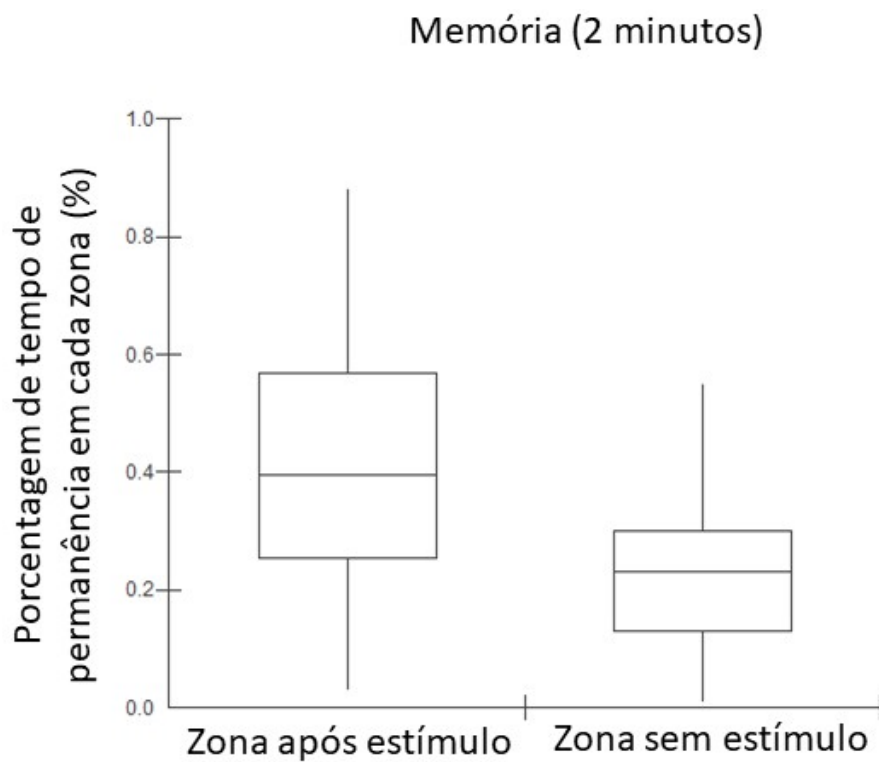


Figura 10: Porcentagem de tempo de permanência em cada zona na etapa Memória.

Discussão e Conclusão

De acordo com os dados analisados, a animação desenvolvida, além de demonstrar o quanto a visão de peixes da mesma espécie é um estímulo reforçador a ação de aproximação do peixe experimental (um achado que oferece sustentação para estudos nesta mesma linha), foi também capaz de induzir comportamento social no ZF.

A presente pesquisa corrobora os achados de Pather e Gerlai (2010) à medida em que houve a conclusão de que não apenas o estímulo virtual é capaz de eliciar comportamento social mas também que o ZF é capaz de estabelecer uma associação entre o local em que o estímulo foi apresentado e o estímulo em si, permanecendo tempo significativo próximo ao local de apresentação após sua supressão. Convém ressaltar que a arena do presente estudo é mais comprida, o que oferece conclusões mais seguras acerca do comportamento de aproximação emitido pelo ZF, algo, inclusive, discutido pelos autores do artigo citado. Além disso, outro ponto divergente é que os autores utilizaram ZFs fêmeas na animação, e embora tenham afirmado se tratar de uma preferência da espécie, os ZFs machos utilizados na animação deste estudo foram capazes de eliciar comportamento social nos ZFs experimentais. No entanto, vale ressaltar que, embora sejam machos, a animação apresentou tamanho um pouco maior do que a média amostral, e pelo fato das fêmeas serem maiores que os machos, pode ser que este seja um fator considerável para o comportamento eliciado, e que pode ser melhor investigado em estudos futuros.

A discussão sobre o tamanho da arena também aparece na obra de Saverino e Gerlai (2008). Porém, chegou-se à mesma conclusão de que animações são capazes de produzir comportamento social em ZF. A utilização de 5 peixes virtuais nadando lentamente foi um ponto em comum encontrado nos dois estudos, mas a diferença se encontra no fundo em que estes animais foram apresentados, que no estudo citado é totalmente preto e neste é verde e branco.

Qin et al. (2017) também utilizam ZFs fêmeas como estímulo em uma arena menor e concluem que animações eliciam comportamento social de forma tão robusta quanto ZFs reais. Uma diferença importante presente neste estudo é uma etapa de habituação anterior ao experimento, que consistiu em 4 sessões em grupos de 10 ZFs, por 30 minutos, na arena experimental. Este procedimento parece ter contribuído para a diminuição da manifestação de comportamentos ansiosos por parte do ZF experimental, fator que deve ser levado em conta em estudos futuros, levando em consideração que uma parcela considerável dos ZFs utilizados no presente estudo apresentaram estes comportamentos e tiveram que ser eliminados da análise.

É importante destacar que não foram necessárias respostas de outros sentidos (estímulos táteis e auditivos, como oscilações na água, e químicos, como substâncias secretadas por outros peixes) para a emissão da resposta de agrupamento, dadas as devidas precauções de higienização da arena tomadas durante a realização do experimento. Ou seja, apenas a estimulação do aparato visual parece ser suficiente para a eliciação de respostas robustas neste sentido.

Em conformidade com as análises, é possível afirmar que o peixe parece reter a informação do local em que o estímulo foi apresentado, pois permanece tempo considerável na zona de interesse quando este é retirado. Um achado que oferece sustentação para estudos futuros que visam investigar a aprendizagem e memória associativa deste animal.

Esses resultados contribuem para uma utilização mais sustentável e ética desses animais enquanto sujeitos de pesquisa, além de promover maior controle experimental na apresentação de estímulos e gerar mais agilidade para estudos acontecerem em paralelo, dado que a animação pode ser utilizada ao mesmo tempo em diferentes locais, algo impossível em relação à utilização de peixes reais. Porém, como já explicitado neste trabalho, se faz necessária uma série de ponderações em relação a o que se pretende investigar para lançar

mão deste recurso, que possui suas limitações e possibilidades. Por exemplo, não se sabe até que ponto estudos que pretendem investigar o comportamento de agressividade ou reprodução do ZF irão se beneficiar de estímulos virtuais, o que não impede que hipóteses neste segmento sejam testadas.

Convém destacar a relativa rapidez na realização do experimento, levando em consideração que os animais não necessitaram de nenhum treinamento prévio e em apenas 22 minutos já foram capazes de eliciar uma resposta robusta dos comportamentos que se pretendia investigar. Ainda neste sentido, é importante evidenciar a relativa facilidade de medir e quantificar o comportamento alvo (percentagem de tempo em determinada área) do peixe experimental de forma automática, o que implica em uma maior rapidez e confiabilidade na aquisição e, conseqüentemente, na análise destes dados.

Outro ponto que merece atenção está relacionado com as possíveis manifestações ansiogênicas emitidas pelos animais. Como a filmagem foi realizada através do fundo da arena, não foi possível o registro de comportamentos de mergulho e/ou permanência no fundo da arena. No entanto, destaca-se que a arena continha uma coluna de 7 cm de água, o que dificulta a emissão e detecção destas manifestações.

Como orientações para estudos futuros destaca-se a realização do estudo com uma amostra maior, a fim de verificar se os achados são semelhantes, bem como propor experimentos com animais reais para verificar se, no mesmo aparato experimental, os resultados serão semelhantes. Além disso, é possível testar outras configurações do estímulo, como alterações de cor e/ou formato do peixe, bem como a adição de outras espécies ou predadores, para que se possa ter uma investigação mais detalhada acerca de qual seria o estímulo ideal e quais são os fatores que contribuem para a eliciação do comportamento social no peixe experimental.

Pode-se considerar também a construção de uma arena mais estreita, para que a gravação possa ser realizada lateralmente, de modo que se torne viável registrar e observar os comportamentos natatórios também na vertical. Neste mesmo sentido, é plausível realizar o registro utilizando uma segunda filmadora, e por meio do cruzamento dos dados no software de rastreamento é possível gerar uma trajetória em 3D do peixe experimental, o que pode trazer mais elementos para análise e debate.

Referências

- Al-Imari, L., & Gerlai, R. (2008). Sight of conspecifics as reward in associative learning in zebrafish (*Danio rerio*). *Behavioural Brain Research*, *189*(1), 216–219. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2007.12.007>
- Aoki, R., Tsuboi, T., & Okamoto, H. (2015). Y-maze avoidance: an automated and rapid associative learning paradigm in zebrafish. *Neuroscience Research*, *91*, 69–72. <https://doi.org/10.1016/j.neures.2014.10.012>
- Blaser, R. E., & Rosemberg, D. B. (2012). Measures of anxiety in zebrafish (*Danio rerio*): dissociation of black/white preference and novel tank test. *PloS One*, *7*(5), e36931. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0036931>
- Chouinard-Thuly, L., Gierszewski, S., Rosenthal, G. G., Reader, S. M., Rieucan, G., Woo, K. L., Gerlai, R., Tedore, C., Ingle, S. J., Stowers, J. R., Frommen, J. G., Dolins, F. L., & Witte, K. (2017). Technical and conceptual considerations for using animated stimuli in studies of animal behavior. *Current Zoology*, *63*(1), 5–19. <https://doi.org/10.1093/cz/zow104>

- Dammski, A. P., Müller, B. R., Gaya, C., & Regonato, D. (2011). *Zebrafish: Manual de Criação em Biotério*.
<https://gia.org.br/portal/wp-content/uploads/2013/06/ZEBRAFISH.pdf>
- Detrich, H. W., 3rd, Westerfield, M., & Zon, L. I. (1999). Overview of the zebrafish system. *Methods in Cell Biology*, 59, 3–10.
[https://doi.org/10.1016/s0091-679x\(08\)61816-6](https://doi.org/10.1016/s0091-679x(08)61816-6)
- Fernandes, Y. M., Rampersad, M., Luchiari, A. C., & Gerlai, R. (2016). Associative learning in the multichamber tank: A new learning paradigm for zebrafish. *Behavioural Brain Research*, 312, 279–284.
<https://doi.org/10.1016/j.bbr.2016.06.038>
- Gerlai, R. (2011). Associative learning in zebrafish (*Danio rerio*). *Methods in Cell Biology*, 101, 249–270. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-387036-0.00012-8>
- Gerlai, R. (2017). Animated images in the analysis of zebrafish behavior. *Current Zoology*, 63(1), 35–44. <https://doi.org/10.1093/cz/zow077>
- Howe, K., Clark, M. D., Torroja, C. F., Torrance, J., Berthelot, C., Muffato, M., Collins, J. E., Humphray, S., McLaren, K., Matthews, L., McLaren, S., Sealy, I., Caccamo, M., Churcher, C., Scott, C., Barrett, J. C., Koch, R., Rauch, G.-J., White, S., ... Stemple, D. L. (2013). The zebrafish reference genome sequence and its relationship to the human genome. *Nature*, 496(7446), 498–503.
<https://doi.org/10.1038/nature12111>
- Kalueff, A. V., Gebhardt, M., Stewart, A. M., Cachat, J. M., Brimmer, M., Chawla, J. S., Craddock, C., Kyzar, E. J., Roth, A., Landsman, S., Gaikwad, S., Robinson, K., Baatrup, E., Tierney, K., Shamchuk, A., Norton, W., Miller, N., Nicolson,

- T., Braubach, O., ... Zebrafish Neuroscience Research Consortium. (2013). Towards a comprehensive catalog of zebrafish behavior 1.0 and beyond. *Zebrafish*, *10*(1), 70–86. <https://doi.org/10.1089/zeb.2012.0861>
- Karnik, I., & Gerlai, R. (2012). Can zebrafish learn spatial tasks? An empirical analysis of place and single CS-US associative learning. *Behavioural Brain Research*, *233*(2), 415–421. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2012.05.024>
- Khan, K. M., Collier, A. D., Meshalkina, D. A., Kysil, E. V., Khatsko, S. L., Kolesnikova, T., Morzherin, Y. Y., Warnick, J. E., Kalueff, A. V., & Echevarria, D. J. (2017). Zebrafish models in neuropsychopharmacology and CNS drug discovery: Zebrafish models in neuropsychopharmacology. *British Journal of Pharmacology*, *174*(13), 1925–1944. <https://doi.org/10.1111/bph.13754>
- Ladu, F., Bartolini, T., Panitz, S. G., Chiarotti, F., Butail, S., Macrì, S., & Porfiri, M. (2015). Live predators, robots, and computer-animated images elicit differential avoidance responses in zebrafish. *Zebrafish*, *12*(3), 205–214. <https://doi.org/10.1089/zeb.2014.1041>
- Lieschke, G. J., & Currie, P. D. (2007). Animal models of human disease: zebrafish swim into view. *Nature Reviews. Genetics*, *8*(5), 353–367. <https://doi.org/10.1038/nrg2091>
- Lopes, F. F. (2021). *O zebrafish (Danio rerio) como modelo translacional para estudos comportamentais: uma revisão sistemática integrativa* [Universidade Federal de Uberlândia]. <https://repositorio.ufu.br/handle/123456789/34481>

- MacRae, C. A., & Peterson, R. T. (2015). Zebrafish as tools for drug discovery. *Nature Reviews. Drug Discovery*, *14*(10), 721–731. <https://doi.org/10.1038/nrd4627>
- Miller, N., & Gerlai, R. (2007). Quantification of shoaling behaviour in zebrafish (*Danio rerio*). *Behavioural Brain Research*, *184*(2), 157–166. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2007.07.007>
- Miller, N. Y., & Gerlai, R. (2011). Shoaling in zebrafish: what we don't know. *Reviews in the Neurosciences*, *22*(1), 17–25. <https://doi.org/10.1515/RNS.2011.004>
- Nunes, A. R., Ruhl, N., Winberg, S., & Oliveira, R. F. (2017). Social Phenotypes in Zebrafish. In *The rights and wrongs of zebrafish: Behavioral phenotyping of zebrafish* (p. 95–130). Springer International Publishing.
- Pather, S., & Gerlai, R. (2009). Shuttle box learning in zebrafish (*Danio rerio*). *Behavioural Brain Research*, *196*(2), 323–327. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2008.09.013>
- Qin, M., Wong, A., Seguin, D., & Gerlai, R. (2014). Induction of social behavior in zebrafish: live versus computer animated fish as stimuli. *Zebrafish*, *11*(3), 185–197. <https://doi.org/10.1089/zeb.2013.0969>
- Ruhl, T., Moesbauer, K., Oellers, N., & von der Emde, G. (2015). The endocannabinoid system and associative learning and memory in zebrafish. *Behavioural Brain Research*, *290*, 61–69. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2015.04.046>

- Saverino, C., & Gerlai, R. (2008). The social zebrafish: behavioral responses to conspecific, heterospecific, and computer animated fish. *Behavioural Brain Research, 191*(1), 77–87. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2008.03.013>
- Sison, M., & Gerlai, R. (2010). Associative learning in zebrafish (*Danio rerio*) in the plus maze. *Behavioural Brain Research, 207*(1), 99–104. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2009.09.043>
- Spence, R., Gerlach, G., Lawrence, C., & Smith, C. (2007). The behaviour and ecology of the zebrafish, *Danio rerio*. *Biological Reviews of the Cambridge Philosophical Society, 83*(1), 13–34. <https://doi.org/10.1111/j.1469-185x.2007.00030.x>
- Velkey, A. J., Boles, J., Betts, T. K., Kay, H., Henenlotter, R., & Wiens, K. M. (2019). High fidelity: Assessing zebrafish (*Danio rerio*) responses to social stimuli across several levels of realism. *Behavioural Processes, 164*, 100–108. <https://doi.org/10.1016/j.beproc.2019.04.012>