



**PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO RIO GRANDE DO SUL  
FACULDADE DE BIOCÊNCIAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR E  
MOLECULAR**

**EFEITO ESTABILIZADOR DO GRUPO EM  
COMPORTAMENTO EXPLORATÓRIO, ANSIEDADE,  
COGNIÇÃO E NÍVEIS DE CORTISOL EM PEIXE  
ZEBRA**

**NATÁLIA PAGNUSSAT**

**Prof. Dr. DIOGO RIZZATO LARA  
(Orientador)**

**Porto Alegre, Fevereiro de 2011.**

**PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO RIO GRANDE DO SUL  
FACULDADE DE BIOCIÊNCIAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR E  
MOLECULAR**

**EFEITO ESTABILIZADOR DO GRUPO EM COMPORTAMENTO  
EXPLORATÓRIO, ANSIEDADE, COGNIÇÃO E NÍVEIS DE CORTISOL EM  
PEIXE ZEBRA**

Dissertação apresentada como requisito para obtenção do grau de Mestre pelo Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular da Faculdade de Biociências da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul.

**NATÁLIA PAGNUSSAT**  
**Prof. Dr. DIOGO RIZZATO LARA**  
**(Orientador)**

**Porto Alegre, Fevereiro de 2011.**

*Para minha mãe.*

## AGRADECIMENTOS

Agradeço

Ao meu querido orientador Diogo R. Lara, por estar sempre presente, me ajudando e me incentivando, e principalmente pela oportunidade, ensinamentos e amizade construída ao longo desses cinco anos de trabalho.

Às professoras Monica R.M. Vianna e Carla D. Bonan, pelo carinho, amizade e por todas as contribuições e ensinamentos ao longo do desenvolvimento desse trabalho.

Aos meus queridos colegas Ângelo e Isabel, por toda a ajuda, paciência, agradável companhia e amizade.

Aos demais colegas de laboratório, em especial Angélica e Laura G, pela ajuda e pela companhia em todos os momentos.

Ao CNPq pelo suporte financeiro.

Aos meus amigos, minha família e todos aqueles que eu amo, por darem um sentido especial pra minha vida, por sempre acreditarem em mim, pelo incentivo e pelo amor.

A minha mãe Lígia, por toda paciência, apoio e amor ao longo da minha existência.

## RESUMO

O peixe zebra (*Danio rerio*) vem sendo cada vez mais utilizado em estudos de biologia do desenvolvimento, genética, farmacologia e de comportamento, mas os dados comportamentais obtidos nessa espécie apresentam uma grande variabilidade. A maioria dos estudos vem sendo realizados utilizando animais isolados, apesar do seu comportamento natural de formar e viver em cardume. Nós comparamos alguns parâmetros comportamentais e também os níveis de cortisol de peixe zebra adultos após a exposição à novidade. Na tarefa de comportamento exploratório, os resultados dos animais testados individualmente ou em trios não foram significativamente diferentes, mas os resultados dos animais testados sozinhos foram mais dispersos do que os trios nos parâmetros avaliados (latência para explorar a parte superior do aquário, tempo gasto na parte superior do aquário e número de cruzamentos,  $p < 0,01$ ). Na tarefa de claro/escuro, não houve diferença no desempenho dos animais testados individualmente quando comparados com os testados em trios (latência para passar para o lado escuro, tempo no lado claro e número de cruzamentos), mas na latência para passar para o lado escuro os resultados foram mais dispersos quando os peixes foram testados isoladamente ( $p < 0,01$ ). Na tarefa de esquiva inibitória, apenas os peixes treinados individualmente, apresentaram aumento na latência do teste em relação à latência do treino ( $p < 0,05$ ). Novamente, a dispersão dos dados foi maior nos peixes testados sozinhos em comparação com os testados em trios ( $p < 0,001$ ). Os níveis de cortisol dos animais controle (aquário moradia) eram mais baixos do que os níveis de cortisol dos animais expostos ao teste exploratório durante 5 min ( $p < 0,05$ ). Comparado com trios, os níveis de cortisol dos peixes expostos ao teste individualmente foram mais variáveis ( $p < 0,001$ ) e maiores ( $P < 0,05$ ). Em resumo, utilizar peixe zebra individualmente em testes comportamentais aumenta a variabilidade dos dados, provavelmente por perturbar o seu comportamento natural de formação de cardume. Estes achados mostram que testar peixe zebra isolados pode ser benéfico ou prejudicial, dependendo dos objetivos do estudo mas, isso deve ser levado em consideração ao se estabelecer protocolos comportamentais e também na interpretação dos resultados obtidos.

**Palavras-chave:** coesão social, peixe zebra, comportamento, exploração, claro escuro, esquiva inibitória, cortisol.

## ABSTRACT

Zebrafish has been increasingly used in behavioral studies, but data can present high variability. Most studies have been performed using isolated zebrafish, despite their interactive nature and dependence on shoal counterparts. We compared adult zebrafish behavioral parameters and cortisol levels after exposure to novelty in animals tested individually or in groups of three (triplets). In the exploratory behavior task, data from single fish and triplets were not significantly different, but single fish data were more dispersed than in triplets in latency to and time spent in the tank upper part, and crossings ( $p < 0.01$ ). In the light dark task, latency to enter in the dark zone, time in the light zone, and number of crossings were not different between groups, but results were more variable in single fish's latency to enter the dark zone compared to triplets ( $p < 0.01$ ). In the inhibitory avoidance task, only fish trained individually showed increased test latencies compared to training ( $p < 0.05$ ). Again, data dispersion was higher in single fish than in triplets ( $p < 0.001$ ). Cortisol levels from animals in their housing tank were lower than in fish exposed to the exploratory tank for 5 min ( $p < 0.05$ ). Compared to triplets, cortisol levels of fish individually exposed to the test tank were higher ( $p < 0.001$ ) and more variable ( $p < 0.05$ ). Thus, using single zebrafish in behavioral studies increases data variability, probably by disrupting their natural shoal behavioral strategies. This feature can be beneficial or detrimental depending on study aims and should be considered when designing, analyzing and interpreting zebrafish behavioral data.

**Keywords:** shoaling, zebrafish, behavior, exploratory, light dark, inhibitory avoidance

## SUMÁRIO

<b>RESUMO.....</b>	<b>iii</b>
<b>ABSTRACT.....</b>	<b>iv</b>
<b>CAPÍTULO 1- INTRODUÇÃO E OBJETIVOS.....</b>	<b>1</b>
<b>1. INTRODUÇÃO.....</b>	<b>1</b>
<b>1.1. Características do peixe zebra .....</b>	<b>2</b>
<b>1.2. Estudos comportamentais utilizando peixe zebra.....</b>	<b>5</b>
<b>2. OBJETIVOS .....</b>	<b>9</b>
<b>2.1. Objetivo geral.....</b>	<b>9</b>
<b>2.2. Objetivos específicos .....</b>	<b>9</b>
<b>CAPÍTULO 2- ARTIGO CIENTÍFICO .....</b>	<b>10</b>
<b>CAPÍTULO 3- CONSIDERAÇÕES FINAIS.....</b>	<b>27</b>
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>31</b>
<b>ANEXO.....</b>	<b>36</b>

## **CAPÍTULO 1**

### **INTRODUÇÃO E OBJETIVOS**



## 1 – INTRODUÇÃO

### 1.1 – Características do peixe zebra

O peixe zebra ou *zebrafish*, *Danio rerio*, é um pequeno vertebrado de água doce, membro da família *Cyprinidae* (*Teleostei*). Nativo do sul e sudeste da Ásia é comumente encontrado em águas rasas de fluxo lento no norte da Índia, Bangladesh e Nepal (SPENCE *et al.*, 2008). Essa espécie é caracterizada pelo pequeno tamanho (3-5 cm de comprimento total) e um padrão de cores distintas alternadas em listras horizontais claras e escuras. Seus melanóforos (células de pigmentação) respondem a estímulos, tais como a intensidade da luz (PARICHY, 2006) dependendo do ambiente em que os animais se encontram (LOGAN *et al.*, 2006).

Muitas espécies de peixes apresentam um comportamento social e adaptativo de viver em grupos, ou cardumes (PITCHER & PARRISH, 1993). O peixe zebra também apresenta esse comportamento, ou seja, os animais formam um grupo que permanece unido por diversas razões, entre elas a busca por alimentos, acasalamento, defesa contra predadores e outras ameaças ambientais (REHNBERG & SMITH, 1988; LEVIN *et al.*, 2007; MILLER & GERLAI, 2007; SPENCE *et al.*, 2008). O cardume é coeso e os animais nadam juntos em uma mesma direção de forma coordenada. Mesmo quando os animais são criados em isolamento, eles rapidamente formam cardumes quando são postos juntos (KERR, 1963).

O cardume de peixe zebra pode ser encontrado nadando na superfície da água para buscar alimentos, mas quando expostos a um novo ambiente (por exemplo, um aquário teste), eles modificam o seu comportamento. Durante os minutos iniciais eles permanecem mais tempo na parte inferior do aquário e, à medida que eles se familiarizam com o novo ambiente, passam a explorar a parte superior do aquário

gradualmente (CACHAT *et al.*, 2010; LEVIN *et al.*, 2007; EGAN *et al.*, 2009; STEWART *et al.*, 2010; WONG *et al.*, 2010).

O peixe zebra possui uma série de atributos que o tornam particularmente acessível à manipulação experimental. As fêmeas se reproduzem o ano todo e os animais podem ser mantidos e facilmente controlados em grande número a baixos custos. A desova das fêmeas geralmente ocorre a cada 2-3 dias e uma única desova pode conter centenas de ovos (SPENCE *et al.*, 2008). Seu desenvolvimento é rápido, sendo que no prazo de 36 horas os embriões apresentam precursores de todos os principais órgãos. Apenas cinco dias após a fertilização, as larvas de peixe zebra já apresentam capacidade de procurar por comida e evitar o perigo. Os animais adultos, com 3-4 meses atingem a maturidade sexual e podem gerar descendentes. Além disso, os ovos de peixe zebra são opticamente transparentes e a fecundação é externa, o que facilita os estudos de embriogênese nessa espécie já que todas as fases de desenvolvimento podem ser vistas e monitoradas através do uso de um microscópio (BEIS & STAINIER, 2006).

O número de publicações com peixe zebra tem aumentado consideravelmente a cada ano e essa espécie vem ganhando destaque como um animal modelo por ser um organismo vertebrado, característica que o torna mais próximo aos humanos do que modelo de espécies de invertebrados como a *Drosophila melanogaster* (POSTLETHWAIT *et al.*, 1998; 2000; BARBAZUK *et al.*, 2000). Ainda tem a vantagem de ser mais flexível para manipulação genética e para estudos de embriologia do que algumas espécies de mamíferos, como roedores, nos quais tais procedimentos são bem mais complicados e caros, além de fato que o desenvolvimento dos roedores é bastante lento e intra uterino, não podendo ser usado como um bom modelo para a visualização do desenvolvimento embrionário. Apesar dessa desvantagem, em roedores

os parâmetros comportamentais e resposta farmacológica são bem conhecidos (BARINAGA, 1994; KIMMEL, 1993; GUO, 2004).

O peixe zebra possui alta homologia genética (70-80%) com roedores e humanos (BARBAZUK *et al.*, 2000; MIKLÓSI & ANDREW, 2006) e tem sido utilizado como uma importante ferramenta para a realização de estudos toxicológicos, pesquisa transgênica, evolução do genoma vertebrado, teratologia (YANG *et al.*, 2009), mutagênese, neurociências (BECKER & BECKER, 2008) e mais recentemente também têm sido alvo de estudos farmacológicos (BENCAN *et al.*, 2009; EGAN *et al.*, 2009) e comportamentais (WONG *et al.*, 2010; MATHUR & GUO, 2010).

Além disso, seu cérebro é anatomicamente e funcionalmente semelhante aos dos mamíferos (GUO, 2004) e muitos sistemas de neurotransmissores já foram documentados nessa espécie, como dopaminérgico (BOEHMLER *et al.*, 2004; SCHWEITZER & DRIEVER, 2009), gabaérgico (KIM *et al.*, 2004), serotoninérgico (RINK & GUO, 2004, LILLESAAAR *et al.*, 2007), noradrenérgico (KASTENHUBER *et al.*, 2010), e purinérgico (ROSEMBERG *et al.*, 2007).

A utilização atual do peixe zebra como um organismo modelo deriva do trabalho de STREISINGER *et al.* (1981), que lançou o seu uso para aplicar a genética molecular em estudos de embriologia de vertebrados e KIMMEL (1989, 1993), que publicou uma descrição detalhada da diferenciação celular e organização do sistema nervoso de peixe zebra.

Depois disso, muitos estudos foram realizados com essa espécie e atualmente se sabe que o peixe zebra tem 25 cromossomos e seu genoma é composto por aproximadamente 1,5 bilhões de pares de bases. Ainda não se sabe quantos genes existem no peixe zebra, mas espera-se que o número total seja muito próximo do total existente no genoma de mamíferos. A grande maioria dos genes descobertos nesta

espécie são evolutivamente conservados e estão intimamente relacionados aos dos seres humanos (CERDA *et al.*, 1998; PARNG *et al.*, 2002), muitas vezes tendo as mesmas funções ou funções muito semelhantes durante o desenvolvimento, durante a vida adulta e até mesmo em uma situação patológica ([www.zf-models.org](http://www.zf-models.org)).

## 1.2 - Estudos comportamentais utilizando peixe zebra

Na última década, diversos grupos de pesquisa passaram a estudar o comportamento de peixe zebra. Gerlai *et al.* (2000; 2006; 2008) observaram o efeito agudo e crônico de etanol (0.25%, 0.5% e 1%) nessa espécie e constataram alterações em diversos parâmetros comportamentais: atividade locomotora, altura no aquário, cor e coesão social. GERLAI *et al.* (2000) mencionou que intensidade da cor está associada com o aumento da agressividade em peixe zebra, enquanto que o medo e ansiedade estão associados com diminuição da intensidade da cor. Além disso, a coesão do cardume parece reduzir em animais tratados com etanol (KURTA & PALESTIS, 2010)

LEVIN *et al.* (2004; 2007) utilizaram nicotina (50 e 100 mg/L) para verificar se a memória, o aprendizado e a ansiedade poderiam ser modelados no peixe zebra. Constataram que os peixes sob efeito da nicotina apresentaram melhora na memória e diminuição da “ansiedade” (tempo de permanência no fundo de um novo aquário).

Drogas ansiolíticas, tais como buspirona (6.25, 25 e 50 mg/L) e fluoxetina (100 µg/L), aumentaram o tempo no topo do tanque (*novel tank task*) além de diminuir a latência para sair do fundo do aquário, enquanto que drogas ansiogênicas, tais como a cafeína (100 mg/L) ou exposição ao feromônio de alarme, diminuíram o tempo no topo do tanque além de aumentar a latência para sair do fundo (BENCAN *et al.*, 2009; EGAN *et al.*, 2009). Olanzapina (100 µM) e LSD (250 µg/L) também aumentaram o tempo de permanência no topo do aquário (GROSSMAN *et al.*, 2010; SEIBT *et al.*,

2010). Além disso, EGAN *et al.* (2009) verificaram que o tratamento com fluoxetina reduz os níveis de cortisol em peixe zebra quando comparados aos controles.

SACKERMAN *et al.*, 2010 verificou o efeito de algumas drogas em peixe zebra. No tratamento com desipramina (25 mg/L) e citalopram (100 mg/L), os animais permaneceram mais tempo na parte superior do aquário (*dive tank*). No labirinto em cruz (*light/dark plus maze*), animais tratados com clordiazepóxido (25 mg/L), etanol (0.5%) e DMSO (0.05%) aumentaram o número de cruzamentos e gastaram mais tempo no lado branco do aquário.

STEWART *et al.* (2010) submeteram peixes zebra a diferentes aquários e demonstraram que esses animais, de modo semelhante aos roedores, apresentam um robusto comportamento de *homebase*, no qual escolhem uma determinada área do aquário como ponto de referência e passam mais tempo dentro dessa área.

Recentemente, alguns estudos tem se voltado para a coesão do cardume. GROSSMAN *et al.* (2010) examinaram os efeitos do LSD no comportamento de formar cardume de peixe zebra (*novel tank task*). O LSD (250 µg/L) compromete o comportamento normal de coesão social, aumentando significativamente a distância entre os peixes.

PIATO *et al.* (2010) desenvolveram um modelo de estresse crônico imprevisível em peixe zebra e, após submeterem os animais a 7 ou 14 dias de estresse, avaliaram parâmetros comportamentais e marcadores de estresse. Os animais estressados e submetidos ao *group behavior task* (em trios) permaneceram mais tempo na parte inferior do aquário, mostrando claro efeito ansiogênico do estresse. Além disso, quando submetidos a 7 dias de estresse aumentavam a coesão social, já quando submetidos a 14 dias de estresse diminuía a coesão social. Em relação aos marcadores fisiológicos e moleculares, animais submetidos ao protocolo de estresse apresentaram

hipercolesterolemia, aumento e diminuição da expressão gênica do fator liberador de corticotropina (CRF) e receptor de glicocorticóide (GR), respectivamente.

KURTA & PALESTIS (2010) verificaram os efeitos do etanol na coesão social de peixe zebra e constataram que em baixas concentrações (0.125% e 0.25%) o etanol diminui a distância entre os animais, enquanto que em altas concentrações (1%) o etanol aumenta cerca de três vezes a distância entre os peixes testados em relação ao controle. Essa diminuição da coesão social através do tratamento com etanol já tinha sido vista anteriormente (GERLAI *et al.*, 2000; DLUGOS & RABIN, 2003).

Nosso grupo observou recentemente (dados não publicados) que o tratamento agudo com ansiolíticos clássicos, como os benzodiazepínicos (diazepam, clonazepam e bromazepam) ou etanol reduziram a coesão do cardume no *Group Behavior Task*. Em contrapartida, animais tratados com buspirona, fluoxetina, imipramina e escitalopram passaram mais tempo na parte superior do aquário.

Modelos experimentais de ansiedade têm sido utilizados com sucesso em roedores, baseados nas respostas comportamentais da exposição à novidade. Modelos similares de exposição à novidade têm sido recentemente desenvolvidos para peixe zebra (BLASER *et al.*, 2010; CACHAT *et al.*, 2010; CHAMPAGNE *et al.*, 2010; MAXIMINO *et al.*, 2010; STEWART *et al.*, 2010). A novidade (exposição a um novo ambiente) é considerada o principal fator ansiogênico em roedores (FILE, 2001; KIM *et al.*, 2005; POWELL *et al.*, 2004), e recentemente em peixe zebra (CACHAT *et al.*, 2010; EGAN *et al.*, 2009). A exposição a um novo ambiente acentua algumas respostas comportamentais tais como comportamento de defesa, avaliação de risco e o conflito entre as motivações para explorar e evitar.

Estudar o comportamento nessa espécie é um campo relativamente novo, e muitas vezes os testes utilizados são adaptações de protocolos já estabelecidos em roedores, como teste de campo aberto, claro-escuro, labirinto em cruz e testes de exposição ao predador (SAVERINO & GERLAI, 2008; SISON & GERLAI, 2010; CHAMPAGNE *et al.*, 2010; GROSSMAN *et al.*, 2010; LEVIN *et al.*, 2007; MAXIMINO *et al.*, 2010; STEWART *et al.*, 2010).

Ao estabelecer protocolos de comportamento para novos modelos animais, é fundamental levar em conta sua dinâmica social natural. Uma análise recente do comportamento do peixe zebra demonstrou que essa espécie apresenta coesão social já nas fases iniciais de vida (BUSKE & GERLAI, 2010). Ainda assim, a maioria dos testes comportamentais publicados até hoje são baseadas na análise de animais isolados (BENCAN, 2009; CACHAT *et al.*, 2009). O isolamento de indivíduos que são extremamente interativos e interdependentes a fim de executar tarefas específicas pode representar uma experiência estressante acima dos níveis esperados de estresse associado com a novidade da tarefa em si e, portanto, comprometer o desempenho dos animais. Isso talvez explique o elevado grau de variabilidade nos dados comportamentais de peixe zebra, que é bastante elevado mesmo entre os experimentos realizados sob as mesmas condições.

Dada a sua natureza ecológica e preferências inatas, nossa hipótese é de que os estudos comportamentais utilizando esta espécie poderiam ser representados de forma diferente quando os animais são testados em grupos de três em vez de individualmente.

## **2 – OBJETIVOS**

### **2.1 – Objetivo geral**

Analisar o comportamento e os níveis de cortisol de peixe zebra testados individualmente ou em grupos de três animais (trios).

### **2.2 – Objetivos específicos**

Avaliar o desempenho de peixe zebra adultos submetidos a três tarefas comportamentais (tarefa de exploração, claro escuro e esquiva inibitória) individualmente ou em grupos de três animais.

Verificar os níveis de cortisol nos animais submetidos ao teste de exploração, individualmente ou em grupos de três animais, assim como em animais retirados diretamente do aquário moradia.



**CAPÍTULO 2**

**ARTIGO CIENTÍFICO**

***ONE FOR ALL AND ALL FOR ONE:  
THE IMPORTANCE OF SHOALING ON BEHAVIORAL AND  
STRESS RESPONSES IN ZEBRAFISH***

**Natália Pagnussat, Ângelo L. Piato, Martina Blank, Isabel C. Schaefer, Angélica R.  
Tamborski, Laura D. Guerim, Carla D. Bonan, Mônica R.M. Vianna, Diogo R.  
Lara**

***Short communication***

**Submetido ao periódico Behavioural Brain Research (FI 3.2)**

## **One for all and all for one: the importance of shoaling on behavioral and stress responses in zebrafish.**

Natália Pagnussat<sup>a</sup>, Ângelo L. Piato<sup>a,b</sup>, Martina Blank<sup>c</sup>, Isabel C. Schaefer<sup>a</sup>, Angélica R. Tamborski<sup>c</sup>, Laura D. Guerim<sup>c</sup>, Carla D. Bonan<sup>a,d</sup>, Mônica R.M. Vianna<sup>c</sup>, Diogo R. Lara<sup>a,b,\*</sup>

<sup>a</sup>Laboratório de Neuroquímica e Psicofarmacologia, Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular. Faculdade de Biociências, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil.

<sup>b</sup>Programa de Pós-Graduação em Medicina e Ciências da Saúde, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil.

<sup>c</sup>Laboratório de Biologia e Desenvolvimento do Sistema Nervoso. Faculdade de Biociências, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil.

<sup>d</sup>Instituto Nacional de Medicina Translacional (INCT-TM), Porto Alegre, RS, Brazil

\*Communicating author

Av. Ipiranga, 6681, P12C. Porto Alegre, RS, Brazil  
90619-900. Tel: +55 51 3353 4158; fax: +55 51 3320 3568  
Email address: drlara@puers.br (D.R. Lara)

### **Disclosure/Conflict of interest**

The authors report no conflicts of interest.

### **Research Highlights**

- Single fish show more disperse behavioral responses than animals tested in groups.
- Animals individually exposed to a new environment show higher cortisol levels than triplets.
- Behavior of single zebrafish is rather unpredictable and variable.

## **Abstract**

Zebrafish has been increasingly used in behavioral studies, but data can present high variability. Most studies have been performed using isolated zebrafish, despite their interactive nature and dependence on shoal counterparts. We compared adult zebrafish behavioral parameters and cortisol levels after exposure to novelty in animals tested individually or in groups of three (triplets). In the exploratory behavior task, data from single fish and triplets were not significantly different, but single fish data were more dispersed than in triplets in latency to and time spent in the tank upper part, and crossings ( $p < 0.01$ ). In the light dark task, latency to enter in the dark zone, time in the light zone, and number of crossings were not different between groups, but results were more variable in single fish's latency to enter the dark zone compared to triplets ( $p < 0.01$ ). In the inhibitory avoidance task, only fish trained individually showed increased test latencies compared to training ( $p < 0.05$ ). Again, data dispersion was higher in single fish than in triplets ( $p < 0.001$ ). Cortisol levels from animals in their housing tank were lower than in fish exposed to the exploratory tank for 5 min ( $p < 0.05$ ). Compared to triplets, cortisol levels of fish individually exposed to the test tank were higher ( $p < 0.001$ ) and more variable ( $p < 0.05$ ). Thus, using single zebrafish in behavioral studies increases data variability, probably by disrupting their natural shoal behavioral strategies. This feature can be beneficial or detrimental depending on study aims and should be considered when designing, analyzing, and interpreting zebrafish behavioral data.

**Keywords:** shoaling, zebrafish, behavior, exploratory, cortisol.

## **1. Introduction**

Zebrafish represents an increasingly attractive animal model in developmental biology, genetics, pharmacology, and neuroscience [1,2,3,4] due to its straightforward breeding conditions, initial transparency, and rapid development [5,6]. Zebrafish is also suited for behavioral screenings [7,8], representing a cost effective and efficient alternative to rodents [9,10]. Despite these advantages, zebrafish behavioral data is highly variable, even when collected under the same conditions, as evident by baseline value discrepancies within the same study [7,8]. The usual approach to minimize this drawback has been limited to controlling environmental parameters (e.g., maintenance conditions), neglecting animals' natural ecological characteristics that may significantly impact behavioral performance and data gathering.

When establishing behavioral protocols to new animal models it is critical to take into account their natural social dynamics. Zebrafish develop shoaling behavior from early life stages [6], are extremely interactive and depend on their mutual responses to environmental cues and challenges. They visually rely on explicit behavioral signals from their counterparts to perceive and react adaptively. Still, most behavioral paradigms for zebrafish, larvae or adults, are based on analysis of individually isolated animals [11, 12], which facilitates data acquisition and analysis.

Stress arises when the negative influence of the stressor exceeds the individual's ability to cope and maintain homeostasis, producing what has been called an allostatic overload [13]. Therefore, even a mild agent may produce harm in a vulnerable individual, and may compromise performance. Single zebrafish just isolated from its group for experimentation become deprived from their default reference repertoire, which may underlie data variability and compromise data interpretation.

Thus, we hypothesized that behavior responses would differ when zebrafish are tested in groups instead of individually. We compared behavioral parameters and cortisol levels of adult zebrafish tested individually or in groups of three (triplets).

## **2. Material and Methods**

### **2.1 Animals and Housing**

Adult male “wild type” short fin zebrafish (*Danio rerio*), 2-3 cm long, were obtained from a commercial supplier (Red Fish Agroloja, Porto Alegre, Brazil). All fish were acclimated for at least two weeks prior to the experiments. Animals were housed in continuously aerated (7.2 mg O<sub>2</sub>/l) glass tanks in groups of five animals per liter with Tetra’s AquaSafe® conditioned water, pH 7.2 and conductivity 500 µS. Fish were kept on a 14-10 h light/dark cycle and fed three times a day with commercial flakes and supplement with live brine shrimp. All experimental procedures were performed during the morning. On each session animals were gently captured from the temporary housing tank using a 6 cm wide fine nylon mesh fish net.

All protocols were previously reviewed and approved by the Institutional Animal Care Committee (110/08 and 08/00037 CEUA–PUCRS) and followed Brazilian Legislation, the guidelines of the Brazilian Collegium of Animal Experimentation (COBEA), and the Canadian Council for Animal Care (CCAC) Guide on the Care and Use of Fish in Research, Teaching, and Testing.

### **2.2 Behavioral Experiments**

All procedures were performed in a dedicated room to which animals were acclimated and camera recorded for later analysis. To reduce the environmental variance, before starting the experiments animals were divided in two separate tanks

according to their assigned experimentation groups, namely i) fish tested individually (single) and ii) fish tested in groups of three (triplets).

### 2.2.1 Experiment 1: Exploratory Behavior Task

The exploratory behavior task was adapted from protocol previously described [14]. Test tanks (24 x 8 x 20 cm, length x width x height) with 2.7 L of water (15 cm high) divided into 9 equal zones were used for evaluation of behavioral parameters. Water temperature ( $28 \pm 2$  °C) was maintained with heaters. The tank lateral and back sides were visually blocked with white opaque self-adhesive plastic film to reduce the influence of the surrounding area and to facilitate observation and recording.

Time spent at the top and the latency to top was measured with stopwatch for each fish. The locomotion activity was evaluated counting the number of transitions in squares.

### 2.2.2 Experiment 2: Light/Dark Task

To evaluate animals' preference for light or dark environments, we used a glass tank (15 cm height × 10 cm width × 45 cm length) divided by a sliding guillotine-type partition (14 x 9.5 cm) in two equally sized dark and white areas, adapted from protocol previously described [15]. Compartments were defined by opaque plastic self-adhesive films in black or white colors externally covering walls, floor, and the corresponding sides of the sliding partition. The tank water level was 3 cm high and the partition was raised 2 cm above the tank floor to allow zebrafish to swim freely from one side of the tank to the other.

Fish were placed individually or in triplets in the light zone of the apparatus and the following measures were recorded for 5 min: latency to first entry in the dark

compartment, time spent in the light compartment and number of crossings between compartments. For triplets, data was counted only when all 3 fish crossed sides.

### 2.2.3 Experiment 3: Inhibitory Avoidance Task

For this task, the same apparatus of experiment 2 was used, with two electrodes extending through the wall height placed on each far side of the opposing lateral walls of the dark compartment. These electrodes were attached to an 8 V stimulator and, when manually activated, administered a final  $3 \pm 0.2$  V AC shock (intensity measured between electrodes and the center of the dark compartment). Zebrafish were trained and tested individually or in triplets in the inhibitory avoidance apparatus as described previously [15]. Animals were gently placed in the white side of the task tank while the partition between compartments was closed. After 1 min of acclimation with the new environment the partition was raised, allowing fish to cross to the dark side of the tank through the 2 cm high opening.

On the training session, after animals crossed to the dark environment the sliding partition was closed and a pulsed electric shock administered for 5 s. Animals were then removed from the apparatus and placed in the dedicated compartment of the temporary housing tank. For triplets, data in both training and test sessions were counted only when all 3 fish crossed to the dark side.

Animals' long-term memory retention was tested 24 h after training. The test session repeated the training protocol except that no shock was administered. The latency to completely enter the dark compartment was measured on both sessions and the test latencies used as an index of retention.

#### 2.2.4 Experiment 4: Whole-Body Cortisol Dosage

Three groups of fish were tested: 1) fish directly taken from the housing tank (control); 2) single and 3) triplets after 5 min exploration in the test tank. Fish were then captured and quickly frozen in liquid nitrogen and stored at  $-80^{\circ}\text{C}$  until the cortisol extraction [14,16]. Each zebrafish was weighed, and 5 pools of three fish from each group were minced and placed into a disposable stomacher bag with 2 ml of phosphate buffered saline (PBS, pH 7.4) for 6 min. The contents were transferred to a 10 ml screw top disposable test tube, 5 ml of laboratory grade ethyl ether were added, vortexed for 1 min and centrifuged for 10 min at  $1000 \times g$ . After that, the tube was frozen at liquid nitrogen and the unfrozen portion (ethyl ether containing cortisol) was decanted. The ethyl ether was transferred to a new tube and completely evaporated under a gentle stream of nitrogen for 2 h, yielding a lipid extract containing the cortisol. The extract was stored at  $-20^{\circ}\text{C}$  until the ELISA was conducted on the samples suspended with 1 ml of PBS buffer. To prevent a possible stress response induced by manipulation, the time elapsed between capturing and sacrificing was less than 10s. Whole-body cortisol was measured in triplicate samples of tissue extract with a commercially available High Sensivity Salivary Cortisol– enzyme immunoassay kit (Salimetrics®, USA). The specificity of the test was evaluated by comparing the parallelism between the standard curve and serial dilutions in PBS (pH 7.4) of the tissue extracts. The standard curve constructed with the human standards ran parallel to that obtained using serial dilutions of zebrafish tissue extracts. In the linear regression test, a high positive correlation ( $R^2=0.98$ ) was found between the curves. The intra-assay coefficient of variation was 3.3-3.6%.



### 2.3 Statistical analysis

Data from the exploratory behavior task (time in the top, latency to the top and number of transitions), light/dark task (time in the light zone, number of crossings and latency to dark zone) and inhibitory avoidance training and test latencies within groups were compared using Mann-Whitney test and data were expressed as median  $\pm$  interquartile range. Cortisol levels were analyzed by ANOVA followed by Student-Newman-Keuls multiple comparison test. Levene's test was used to evaluate differences in data dispersion of groups. SPSS 16.0 for Windows was used, and a significance level of  $p < 0.05$  was adopted.

### 3. Results

In the exploratory behavior task, data from single fish and triplets were not significantly different in latency to the top (Figure 1A), number of transitions (Figure 1B), , and time spent in the top (Figure 1C) However, the data for single fish were significantly more disperse than in triplets in all these parameters ( $p < 0.01$ , Levene's test).

Single fish or triplets showed no difference in time in the light zone (Figure 2A), number of crossings (Figure 2B), latency to enter the dark zone in the light dark task (Figure 2C).. However, data dispersion was higher in single fish compared to triplets in latency to enter the dark zone ( $p < 0.01$ , Levene's test, Figure 2C).

In the inhibitory avoidance task, only fish trained individually showed increased test latencies compared to training latencies ( $p < 0.05$ , Figure 2D). However, only four of the 14 animals showed clearly higher test latency. Again, data dispersion was statistically higher in single fish than in triplets ( $p < 0.001$ ).

Animals exposed to the exploratory test tank for 5 min showed increased cortisol levels compared to fish remaining in their housing tank ( $F_{(2,13)}=19.0$ ,  $p<0.001$ , ANOVA, Figure 3). Compared to triplets, cortisol levels of fish individually exposed to the test tank were higher ( $p<0.001$ , Student Newman-Keuls *post hoc*) and more variable ( $p<0.05$ , Levene's test).

#### **4. Discussion**

The main finding of this study was that data variability was higher within zebrafish tested individually compared to triplets in all behavioral tests and whole-body cortisol levels. On the other hand, overall performance was mostly similar between single fish and triplets, except for test latency in the inhibitory avoidance task.

Our results on the exploratory behavior test show that the wide data dispersion in single fish may not be attributed only to the stress resulting from novelty exposure. When triplets are placed in a new tank, the main stressful factor is the new environment, but their cohesion and cooperative function as a group is preserved. When animals previously housed in groups are individually introduced to a new environment, in addition to the novelty-induced stress, they experience the anxiety of being separated from their shoal and become deprived from their default reference repertoire. This interpretation is supported by the higher cortisol levels in single fish exposed to a new tank in relation to triplets. The changes in cortisol levels may have influenced the difference found between single fish and triplets in the inhibitory avoidance test latencies.

Behavioral responses elicited by a new environment, such as defensive behaviors (e.g. freezing), risk assessment, and approach-avoidance conflict may be compromised by the abrupt absence of the group. Such stress load may underlie

aberrant behaviors, such as freezing, swim bouts, and erratic movements previously reported in individually tested animals [3,7]. In our observations, these aberrant behaviors were more prevalent in single than triplets (data not shown) and may underlie the significantly higher behavioral and cortisol data dispersion in individually tested animals.

The high behavioral variability observed in zebrafish individually submitted to novel environments has been attributed to animal facility-induced stress or genetic influences [4]. Our results suggest that test conditions, specifically being alone or in group, are critically involved in the experiment outcome and data dispersion and should be carefully considered when designing experimental protocols. Individually testing fish facilitates automated data acquisition and analysis at the expense of corrupting animals' natural behavioral and cognitive strategies. Such conditions may be advantageously explored in studies evaluating stress and behavior despair, but may be considered a limitation for cognitive studies. On the other hand, testing grouped zebrafish produces more homogeneous data and preserves their behavioral repertoire, but requires more laborious data analysis. Such condition favors the study of more complex behaviors such as those involved in more sophisticated cognitive skills.

In conclusion, the natural social dynamics and interdependence of zebrafish is a major factor regarding its responses to new environments. Our data shows that the behavior of single zebrafish is rather unpredictable and variable. This reinforces the notion that a shoal is more than the sum of its parts and works as a single coherent entity [17]. The manipulation of this characteristic can be beneficial or detrimental depending on study aims and should not be overlooked when designing, analyzing, and interpreting zebrafish behavioral data.

## Acknowledgments

This work was supported by CNPq (Conselho Nacional de Pesquisa e Desenvolvimento – Brasil) and by DECIT/SCTIE-MS through CNPq and Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS, Proc. 10/0055-0 and 10/0036-5–PRONEX/Conv. 700545/2008).

## References

- [1] 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(4):773–82.
- [2] Guo S. Linking genes to brain, behavior and neurological diseases: What can we learn from zebrafish? *Genes Brain Behav* 2004;3(2):63-74.
- [3] Grossman L, Utterback E, Stewart A, Gaikwad S, Chung KM, Suciú C, Wong K, Elegante M, Elkhayat S, Tan J, Gilder T, Wu N, Dileo J, Cachat J, Kalueff AV. Characterization of behavioral and endocrine effects of LSD on zebrafish. *Behav Brain Res* 2010;214(2):277-84.
- [4] Cachat J, Stewart A, Grossman L, Gaikwad S, Kadri F, Chung KM, Wu N, Wong K, Roy S, Suciú C, Goodspeed J, Elegante M, Bartels B, Elkhayat S, Tien D, Tan J, Denmark A, Gilder T, Kyzar E, Dileo J, Frank K, Chang K, Utterback E, Hart P, Kalueff AV. Measuring behavioral and endocrine responses to novelty stress in adult zebrafish. *Nat Protoc* 2010;5(11):1786-99.
- [5] Spence R, Gerlach G, Lawrence C, Smith C. The behaviour and ecology of the zebrafish, *Danio rerio*. *Biol Rev Camb Philos Soc* 2008;83(1):13-34.
- [6] Buske C, Gerlai R. Shoaling develops with age in Zebrafish (*Danio rerio*). *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 2010 [Epub ahead of print].

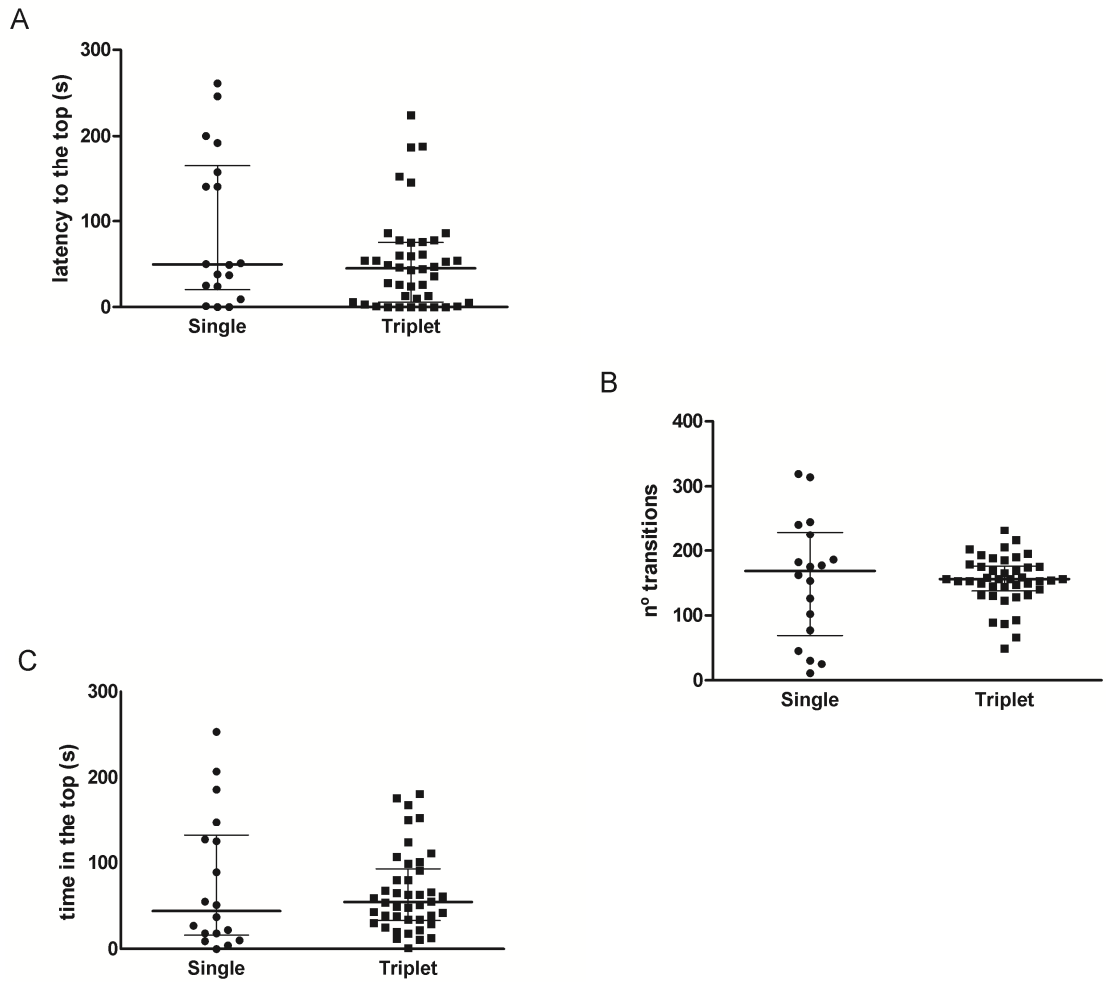
- [7] Egan R, Bergner CL, Hart PC, Cachat JM, Canavello PR, Elegante MF, *et al.* Understanding behavioral and physiological phenotypes of stress and anxiety in zebrafish. *Behav Brain Res* 2009;205(1):38-44.
- [8] Sackerman J, Donegan JJ, Cunningham CS, Nguyen NN, Lawless K, Long A, Benno RH, Gould GG. Zebrafish Behavior in Novel Environments: Effects of Acute Exposure to Anxiolytic Compounds and Choice of *Danio rerio* Line. *Int J Comp Psychol* 2010; 23(1):43-61.
- [9] Barbazuk WB, Korf I, Kadavi C, Heyen J, Tate S, Wun E, Bedell JA, Mcpherson JD, Johnson SL. The syntenic relationship of the zebrafish and human genomes. *Genome Res* 2000;10:1351-1358.
- [10] Postlethwait JH, Woods IG, Ngo-Hazelett P, Yan YL, Kelly PD, Chu F, *et al.* *Zebrafish* comparative genomics and the origins of vertebrate chromosomes. *Genome Res* 2000;10:1890–1902.
- [11] Bencan Z, Sledge D, Levin ED. Buspirone, chlordiazepoxide and diazepam effects in a zebrafish model of anxiety. *Pharmacol Biochem Behav* 2009;94(1):75-80.
- [12] Cachat J, Canavello P, Elegante M, Bartels B, Hart P, Bergner C, Egan R, Duncan A, Tien D, Chung A, Wong K, Goodspeed J, Tan J, Grimes C, Elkhayat S, Suciuc C, Rosenberg M, Chung KM, Kadri F, Roy S, Gaikwad S, Stewart A, Zapolsky I, Gilder T, Mohnot S, Beeson E, Amri H, Zukowska Z, Soignier RD, Kalueff AV. Modeling withdrawal syndrome in zebrafish. *Behav Brain Res* 2009;208(2):371-6.
- [13] McEwen, BS, Wingfield, JC. The concept of allostasis in biology and biomedicine. *Horm Behav* 2003;43(1):2-15.
- [14] Piato AL, Capiotti KM, Tamborski AR, Osés JP, Barcellos LJ, Bogo MR, Lara DR, Vianna MR, Bonan CD. Unpredictable chronic stress model in zebrafish (*Danio*

*rerio*): Behavioral and physiological responses. Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry 2010 [Epub ahead of print].

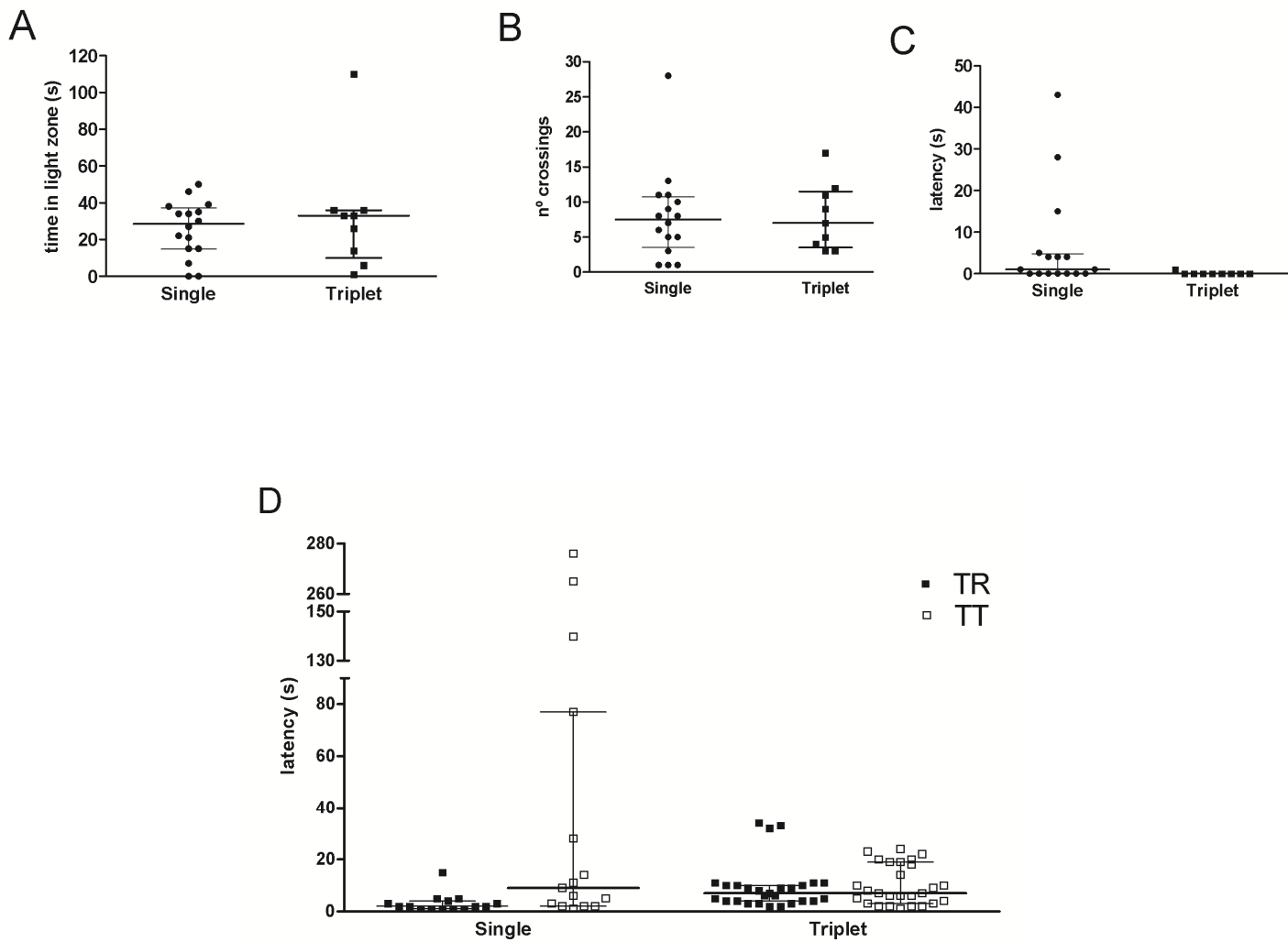
[15] Blank M, Guerim LD, Cordeiro RF, Vianna MR. A one-trial inhibitory avoidance task to zebrafish: rapid acquisition of an NMDA-dependent long-term memory. Neurobiol Learn Mem 2009;92(4):529–34.

[16] Barcellos LJ, Ritter F, Kreutz LC, Quevedo RM, Silva LB, Bedin AC, Finco J, Cericato L. Whole-body cortisol increases after direct and visual contact with a predator in zebrafish, *Danio rerio*. Aquaculture 2007;272:774–8.

[17] Couzin ID, Krause J. Self-Organization and Collective Behavior in Vertebrates. Adv Study Behav 2003;32:1-75.

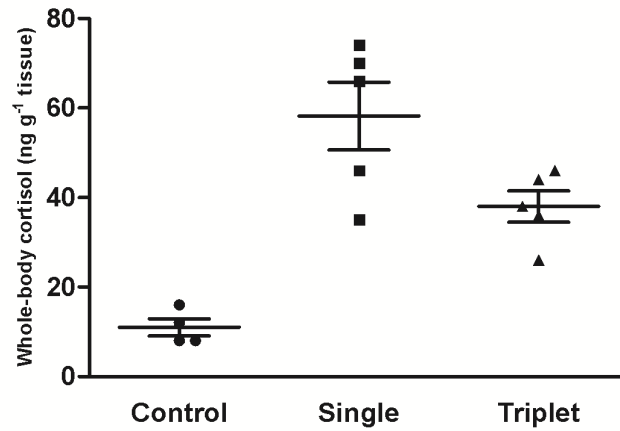


**Figure 1.** Behavior of single and triplet fish in exploratory behavior task. The parameters evaluated were latency to enter in the top portion of the tank (A), n° of transitions (B), and time in the top (C). All figures show dot plot and means ( $-$ )  $\pm$  S.E.M. ( $n=18-42$ ), where each dot represents one fish. The means were compared using unpaired  $t$ -test ( $p>0.05$ ). Levene's test was used to verify differences in data dispersion of groups ( $p<0.001$ ,  $p<0.001$ ,  $p<0.005$ , respectively for A, B and C figures).



**Figure 2.** Behavior of single and triplet fish in light/dark (A, B, C) and inhibitory avoidance tasks (D). In the light/dark the parameters evaluated were time in the light zone (A), n° of crossings (B), and latency for the first crossing to the dark zone (C). In the inhibitory avoidance (D) the parameter evaluated was latency to cross to dark compartment in training and long-term memory test sessions. All figures show dot plot and means ( $-$ )  $\pm$  S.E.M. (n=9-27), where each dot represents one fish. The means were compared using unpaired *t*-test ( $p > 0.05$ , except for figure D). Levene's test was used to verify differences in data dispersion of groups ( $p < 0.01$ ,  $p > 0.05$ ,  $p > 0.05$ ,  $p < 0.001$ , respectively for A, B, C and D figures).





**Figure 3.** Whole-body cortisol of different fish groups: 1) fish directly taken from the housing tank (control); 2) single and 3) triplets after 5 min exploration in the test tank. Figure shows dot plot and means ( $-$ )  $\pm$  S.E.M. ( $n=12-15$ ), where each dot represents a pool of 3 fish. One-way ANOVA followed by Student Newman-Keuls *post hoc* test.

## **CAPÍTULO 3**

### **CONSIDERAÇÕES FINAIS**

### **3- CONSIDERAÇÕES FINAIS**

O presente estudo demonstrou que os dados comportamentais de peixes zebra testados individualmente apresentam uma maior variabilidade em todos os testes comportamentais realizados (comportamento exploratório, claro/escuro e esquiva inibitória). De forma semelhante, os níveis de cortisol corporais de animais individualmente expostos a um novo ambiente, um evento naturalmente estressante, são mais elevados e mais dispersos do que os níveis de cortisol daqueles animais testados em trios. Por outro lado, o desempenho geral de animais isolados e em trios foi similar em todos os parâmetros avaliados nas tarefas comportamentais, com exceção da latência entre treino e teste na tarefa de esquiva inibitória (em animais testados individualmente).

Na tarefa de comportamento exploratório a maior dispersão dos dados nos animais testados individualmente não pode ser atribuída somente ao estresse resultante da exposição à novidade. Quando os trios são colocados em um aquário teste (novidade), o principal fator de estresse é o novo ambiente, mas a coesão e a cooperação com o grupo é preservada. Quando os animais que vivem em grupos (aquário moradia) são introduzidos, individualmente, em um novo ambiente, eles sofrem esse estresse induzido pela novidade, mas, além disso, deve-se levar em consideração a separação desse animal do grupo, o que pode levar o peixe a perder suas referências e gerar um maior nível de estresse. Esta interpretação é sustentada pelos resultados desse trabalho, no qual os níveis de cortisol dos animais controle (aquário moradia) foram mais baixos do que os níveis de cortisol dos animais expostos ao teste exploratório durante 5 min (individualmente ou em trios), sendo que os peixes expostos individualmente ao teste de comportamento exploratório apresentaram níveis mais altos de cortisol quando comparados com os trios e com os controles.

O isolamento dos animais pode ter influenciado na diferença entre as latências de treino e teste na tarefa de esQUIVA inibitória, pois as respostas comportamentais tais como comportamento de defesa (congelamento, por exemplo), avaliação de risco e o conflito entre as motivações para explorar e evitar podem ser comprometidas pela ausência abrupta do grupo. A carga de estresse pode estar por trás de comportamentos aberrantes, como o congelamento e movimentos erráticos relatado anteriormente em animais testados individualmente (EGAN *et al.*, 2009; GROSSMAN *et al.*, 2010). Em nossas observações, esses comportamentos aberrantes foram mais prevalentes nos animais isolados do que nos trios (dados não mostrados) e podem estar relacionados com a alta dispersão dos dados de comportamento e pelos níveis elevados de cortisol nos animais testados individualmente.

Testar peixe zebra individualmente facilita a análise automatizada dos dados, à custa de corromper as estratégias comportamentais e cognitivas natural dos animais. Essas condições podem ser exploradas positivamente em estudos de avaliação de estresse e desamparo aprendido, mas pode ser considerada uma limitação para estudos cognitivos. Por outro lado, testar peixe zebra em grupos de três animais produz resultados mais homogêneos e preserva seu repertório comportamental, além de favorecer o estudo de comportamentos mais complexos como das habilidades cognitivas, mas requer uma análise mais trabalhosa dos dados.

Em conclusão, a dinâmica natural, social e interdependência do peixe zebra é um fator importante em relação as suas respostas a novos ambientes. Nossos dados mostram que o comportamento do peixe zebra isolado é bastante imprevisível, enquanto que os resultados dos grupos de três animais são mais homogêneos. A manipulação dessas características pode ser benéfica ou prejudicial, dependendo dos objetivos do estudo e não devem ser negligenciadas ao se estabelecer protocolos comportamentais em peixe

zebra.

## REFERÊNCIAS

- Barbazuk WB, Korf I, Kadavi C, Heyen J, Tate S, Wun E, Bedell JA, Mcpherson JD, Johnson SL. The syntenic relationship of the zebrafish and human genomes. *Genome Res.* 2000;10:1351-1358.
- Barinaga M. Looking into development's future. *Science.* 1994;266:561-64.
- Becker CG, Becker T. Adult zebrafish as a model for successful central nervous system regeneration. *Restor Neurol Neurosci* 2008;26(2-3):71-80.
- Beis D, Stainier DY. In vivo cell biology: following the zebrafish trend. *Trends Cell Biol.* 2006;16(2):105-112.
- Bencan Z, Sledge D, Levin ED. Buspirone, chlordiazepoxide and diazepam effects in a zebrafish model of anxiety. *Pharmacol Biochem Behav.* 2009;94(1):75-80.
- Blaser RE, Chadwick L, Mcginnis GC. Behavioral measures of anxiety in zebrafish (*Danio rerio*). *Behav Brain Res.* 2010;208(1):56-72.
- Boehmler W, Obrecht-Pflumio S, Canfield V, Thisse C, Thisse B, Levenson R. Evolution and expression of D2 and D3 dopamine receptor genes in zebrafish. *Dev Dyn.* 2004;230(3):481-493.
- Buske C, Gerlai R. Shoaling develops with age in Zebrafish (*Danio rerio*). *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry.* 2010 [Epub ahead of print].
- Cachat J, Canavello P, Elegante M, Bartels B, Hart P, Bergner C, Egan R, Duncan A, Tien D, Chung A, Wong K, Goodspeed J, Tan J, Grimes C, Elkhayat S, Suci C, Rosenberg M, Chung KM, Kadri F, Roy S, Gaikwad S, Stewart A, Zapolsky I, Gilder T, Mohnot S, Beeson E, Amri H, Zukowska Z, Soignier RD, Kalueff AV. Modeling withdrawal syndrome in zebrafish. *Behav Brain Res.* 2009;208(2):371-6.
- Cachat J, Stewart A, Grossman L, Gaikwad S, Kadri F, Chung KM, Wu N, Wong K, Roy S, Suci C, Goodspeed J, Elegante M, Bartels B, Elkhayat S, Tien D, Tan J, Denmark A, Gilder T, Kyzar E, Dileo J, Frank K, Chang K, Utterback E, Hart P, Kalueff AV. Measuring behavioral and endocrine responses to novelty stress in adult zebrafish. *Nat Protoc.* 2010;5(11):1786-99.
- Cerda J, Conrad M, Markl J, Brand M, Herrmann H. Zebrafish vimentin: molecular characterisation, assembly properties and developmental expression. *Anal Cell Pathol* 1998;77(3):175-187.
- Champagne DL, Hoefnagels CC, de Kloet RE, Richardson MK. Translating rodent behavioral repertoire to zebrafish (*Danio rerio*): relevance for stress research. *Behav Brain Res.* 2010;214(2):332-42.
- Dlugos CA, Rabin RA. Ethanol effects on three strains of zebrafish: model system for genetic investigations. *Pharmacol Biochem Behav.* 2003;74(2):471-80.

Egan R, 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(1):38-44.

File SE. Factors controlling measures of anxiety and responses to novelty in the mouse. *Behav Brain Res* 2001;125:151-7.

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(4):773-782.

Gerlai R, Lee L, Blaser R. Effects of acute and chronic ethanol exposure on the behavior of adult zebrafish. *Pharmacol Biochem Behav.* 2006;85(4):752-761.

Gerlai R, Ahmad F, Prajapati S. Differences in acute alcohol-induced behavioral responses among zebrafish populations. *Alcohol Clin Exp Res.* 2008;32(10):1763-73.

Grossman L, Utterback E, Stewart A, Gaikwad S, Chung KM, Suciuc C, Wong K, Elegante M, Elkhayat S, Tan J, Gilder T, Wu N, Dileo J, Cachat J, Kalueff AV. Characterization of behavioral and endocrine effects of LSD on zebrafish. *Behav Brain Res.* 2010;214(2):277-84.

Guo S. Linking genes to brain, behavior and neurological diseases: What can we learn from zebrafish? *Genes Brain Behav.* 2004;3(2):63-74.

Kastenhuber E, Kratochwil CF, Ryu S, Schweitzer J, Driever W. Genetic dissection of dopaminergic and noradrenergic contributions to catecholaminergic tracts in early larval zebrafish. *J Comp Neurol* 2010;518(4):439-58.

Kerr JP. Grouping behaviour of the zebrafish as influenced by social isolation. *American Zoologist.* 1963;2:532-33.

Kim YJ, Nam RH, Yoo YM, Lee CJ. Identification and functional evidence of GABAergic neurons in parts of the brain of adult zebrafish (*Danio rerio*). *Neurosci Lett.* 2004;355(1-2):29-32.

Kim D, Chae S, Lee J, Yang H, Shin HS. Variations in the behaviors to novel objects among five inbred strains of mice. *Genes Brain Behav* 2005;4:302-6.

Kimmel CB. Genetics and early development of zebrafish. *Trends in Genetics.* 1989;5:283-288.

Kimmel CB. Patterning the brain of the zebrafish embryo. *Annual Review of Neuroscience.* 1993;1:707-32.

Kurta A, Palestis BG. Effects of ethanol on the shoaling behavior of zebrafish (*Danio rerio*). *Dose Response.* 2010;8(4):527-33.

Levin ED, Chen E. Nicotinic involvement in memory function in zebrafish. *Neurotoxicol Teratol.* 2004;26(6):731-735.

- Levin ED, Bencan Z, Cerutti DT. Anxiolytic effects of nicotine in zebrafish. *Physiol Behav.* 2007;90(1):54-58.
- Lillesaar C, Tannhäuser B, Stigloher C, Kremmer E, Bally-Cuif L. The serotonergic phenotype is acquired by converging genetic mechanisms within the zebrafish central nervous system. *Dev Dyn* 2007;236(4):1072–84.
- Logan DW, Burn SF, Jackson IJ. Regulation of pigmentation in zebrafish melanophores. *Pigment Cell Res.* 2006;19(3):206-13.
- Mathur P, Guo S. Use of zebrafish as a model to understand mechanisms of addiction and complex neurobehavioral phenotypes. *Neurobiol Dis* 2010;40(1):66–72.
- Maximino C, de Brito TM, Dias CA, Gouvea Jr A, Morato S. Scototaxis as anxiety-like behavior in fish. *Nat Protocol.* 2010;5(2):221-228.
- Miklósi A, Andrew R. The zebrafish as a model for behavioral studies. *Zebrafish.* 2006;3(2):227-234.
- Miller N, Gerlai R. Quantification of shoaling behavior in zebrafish (*Danio rerio*). *Behav Brain Res.* 2007;184(2):157-166.
- Parichy DM. Evolution of *Danio* pigment pattern development. *Heredity.* 2006;97(3):200–210.
- Parng C, Seng WL, Semino C, McGrath P. Zebrafish: a preclinical model for drug screening. *Assay Drug Dev Technol.* 2002;1(1 Pt 1):41–48.
- Piato AL, Capiotti KM, Tamborski AR, Oses JP, Barcellos LJ, Bogo MR, Lara DR, Vianna MR, Bonan CD. Unpredictable chronic stress model in zebrafish (*Danio rerio*): Behavioral and physiological responses. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry.* 2010; [Epub ahead of print].
- Pitcher TJ, Parrish JK. Functions of shoaling behaviour in teleosts. In: T. J. Pitcher, Editor, *The Behaviour of Teleost Fishes*, Chapman & Hall., London. 1993;63–439.
- Postlethwait JH, Yan YL, Gates MA, Horne S, Amores A, Brownlie A, Donovan A, Egan ES, Force A, Gong Z, Goutel C, Fritz A, Kelsh R, Knapik E, Liao E, Paw B, Ransom D, Singer A, Thomson M, Abduljabbar TS, Yelick P, Beier D, Joly JS, Larhammar D, Rosa F, Westerfield M, Zon LI, Johnson SL, Talbot WS. Vertebrate genome evolution and the zebrafish gene map. *Nat Genet.* 1998; 18(4):345-9. Erratum in: *Nat Genet* 1998 Jul;19(3):303.
- Postlethwait JH, Woods IG, Ngo-Hazelett P, Yan YL, Kelly PD, Chu F, *et al.* Zebrafish comparative genomics and the origins of vertebrate chromosomes. *Genome Res.* 2000;10:1890–1902.
- Powell SB, Geyer MA, Gallagher D, Paulus MP. The balance between approach and



avoidance behaviors in a novel object exploration paradigm in mice. *Behav Brain Res* 2004;152:341–9.

Rehnberg BG, Smith RJF. The influence of alarm substance and shoal size on the behaviour of zebra danios, *Brachydanio rerio* (Cyprinidae). *J Fish Biol.* 1988;33:155–163.

Rink E, Guo S. The too few mutant selectively affects subgroups of monoaminergic neurons in the zebrafish forebrain. *Neurosci.* 2004;127:147-54.

Rosemberg DB, Rico EP, Guidotti MR, Dias RD, Souza DO, Bonan CD, Bogo MR. Adenosine deaminase-related genes: molecular identification, tissue expression pattern and truncated alternative splice isoform in adult zebrafish (*Danio rerio*). *Life Sci.* 2007; 81(21-22):1526-34.

Rubinstein AL. Zebrafish assays for drug toxicity screening. *Expert Opin Drug Metab Toxicol.* 2006; 2(2):231-40. Review.

Sackerman J, Donegan JJ, Cunningham CS, Nguyen NN, Lawless K, Long A, Benno RH, Gould GG. Zebrafish Behavior in Novel Environments: Effects of Acute Exposure to Anxiolytic Compounds and Choice of *Danio rerio* Line. *Int J Comp Psychol.* 2010; 23(1):43-61.

Saverino C, Gerlai R. The social zebrafish: Behavioral responses to conspecific, heterospecific, and computer animated fish. *Behav Brain Res.* 2008;191(1):77-87.

Schweitzer J, Driever W. Development of the dopamine systems in zebrafish. *Adv Exp Med Biol* 2009;651:1-14.

Seibt KJ, Oliveira RL, Zimmermann FF, Capiotti KM, Bogo MR, Ghisleni G, Bonan CD. Antipsychotic drugs prevent the motor hyperactivity induced by psychotomimetic MK-801 in zebrafish (*Danio rerio*). *Behav Brain Res.* 2010;214(2):417-22.

Sison M, Gerlai R. Associative learning in zebrafish (*Danio rerio*) in the plus maze. *Behav Brain Res.* 2010;207(1):99-104.

Spence R, Gerlach G, Lawrence C, Smith C. The behaviour and ecology of the zebrafish, *Danio rerio*. *Biol Rev Camb Philos Soc.* 2008;83(1): 13-34.

Stewart A, Wu N, Cachat J, Hart P, Gaikwad S, Wong K, Utterback E, Gilder T, Kyzar E, Newman A, Carlos D, Chang K, Hook M, Rhymes C, Caffery M, Greenberg M, Zadina J, Kalueff AV. Pharmacological modulation of anxiety-like phenotypes in adult zebrafish behavioral models. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry.* 2010; [Epub ahead of print].

Streisinger G, Walker C, Dower N, Knauber D, Singer F. Production of clones of homozygous diploid zebrafish (*Brachydanio rerio*). *Nature.* 1981;291:293–296.

Yang L, Ho NY, Alshut R, Legradi J, Weiss C, Reischl M, *et al.* Zebrafish embryos as models for embryotoxic and teratological effects of chemicals. *Reprod Toxicol* 2009;28(2):245–53.

Wong K, Elegante M, Bartels B, Elkhayat S, Tien D, Roy S, Goodspeed J, Suci C, Tan J, Grimes C, Chung A, Rosenberg M, Gaikwad S, Denmark A, Jackson A, Kadri F, Chung KM, Stewart A, Gilder T, Beeson E, Zapolsky I, Wu N, Cachat J, Kalueff AV. Analyzing habituation responses to novelty in zebrafish (*Danio rerio*). *Behav Brain Res.* 2010; 208(2):450-7.

**ANEXO**  
**COMPROVANTE DE SUBMISSÃO DO ARTIGO**

# COMPROVANTE DE SUBMISSÃO DO ARTIGO

Elsevier Editorial System(tm) for Behavioural Brain Research  
Manuscript Draft

Manuscript Number:

Title: One for all and all for one: the importance of shoaling on behavioral and stress responses in zebrafish.

Article Type: Short Communication

Corresponding Author: Dr. Diogo R Lara, PhD MD

Corresponding Author's Institution: Pontificia Universidade Catolica do Rio Grande do Sul

First Author: Natália Pagnussat

Order of Authors: Natália Pagnussat; Ângelo L Piato; Martina Blank; Isabel C Schaefer; Angélica R Tamborski; Laura D Guerin; Carla D Bonan; Mônica R Vianna; Diogo R Lara, PhD MD

Abstract: Zebrafish has been increasingly used in behavioral studies, but data can present high variability. Most studies have been performed using isolated zebrafish, despite their interactive nature and dependence on shoal counterparts. We compared adult zebrafish behavioral parameters and cortisol levels after exposure to novelty in animals tested individually or in groups of three (triplets). In the exploratory behavior task, data from single fish and triplets were not significantly different, but single fish data were more dispersed than in triplets in latency to and time spent in the tank upper part, and crossings ( $p < 0.01$ ). In the light dark task, latency to enter in the dark zone, time in the light zone, and number of crossings were not different between groups, but results were more variable in single fish's latency to enter the dark zone compared to triplets ( $p < 0.01$ ). In the inhibitory avoidance task, only fish trained individually showed increased test latencies compared to training ( $p < 0.05$ ). Again, data dispersion was higher in single fish than in triplets ( $p < 0.001$ ). Cortisol levels from animals in their housing tank were lower than in fish exposed to the exploratory tank for 5 min ( $p < 0.05$ ). Compared to triplets, cortisol levels of fish individually exposed to the test tank were higher ( $p < 0.001$ ) and more variable ( $p < 0.05$ ). Thus, using single zebrafish in behavioral studies increases data variability, probably by disrupting their natural shoal behavioral strategies. This feature can be beneficial or detrimental depending on study aims and should be considered when designing, analyzing, and interpreting zebrafish behavioral data.

Suggested Reviewers: Allan Kalueff  
Tulane University Medical Center  
avkalueff@gmail.com

The author has published several papers on zebrafish and behavior. There is no conflict of interest.

Rachel Blaser  
University of San Diego  
rblaser@sandiego.edu

The author has published works with zebrafish and behavior. There is no conflict of interest.

Leonardo Barcellos  
Universidade de Passo Fundo  
lbarcellos@upf.br