

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

LAURA BATISTA

ESTRESSE CRÔNICO PREJUDICA APRENDIZADO  
EM PEIXES (*Geophagus brasiliensis*)

CURITIBA

2013

LAURA BATISTA

ESTRESSE CRÔNICO PREJUDICA APRENDIZADO  
EM PEIXES (*Geophagus brasiliensis*)

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Fisiologia, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Fisiologia.

Orientador: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Marisa Fernandes de Castilho

CURITIBA

2013

Universidade Federal do Paraná  
Sistema de Bibliotecas

Batista, Laura

Estresse crônico prejudica aprendizado em peixes (*Geophagus  
brasiliensis*). / Laura Batista. – Curitiba, 2013.

41 f.: il. ; 30cm.

Orientadora: Marisa Fernandes de Castilho

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal do Paraná, Setor de  
Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Fisiologia.

1. Stress (Fisiologia) 2. Aprendizagem animal 3. Hidrocortisona I.  
Título II. Fernandes, Marisa Fernandes. III. Universidade Federal do  
Paraná. Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em  
Fisiologia.

CDD (20. ed.) 574.1

## AGRADECIMENTOS

A minha família que sempre me deu todo o apoio possível, mesmo sem entender muito bem o que eu estava fazendo. Ao meu pai pela parceria nas coletas, pelo empréstimo das suas habilidades manuais na elaboração do aquário de teste e todas as outras engenhocas que foram necessárias no decorrer dos experimentos e pela prontidão em me ajudar sempre que precisei dele. A minha mãe pelo apoio moral e emocional em todas as fases do trabalho. Ao meu marido Bruno pela parceria em todos os momentos, pela compreensão em relação ao meu trabalho e pelo incentivo. A minha irmã Luiza e ao meu cunhado Leko pela parceria sempre.

Aos amigos remanescentes da graduação (Duane Fernandes, Juliana Kenski, Leandro Moreno, Eduardo Goulin e Débora Cestaro), que mesmo afastados devido aos trabalhos arrumavam um tempo para pôr o papo em dia e distrair um pouco.

Aos colegas de turma do mestrado por terem feito parte desta fase e em especial à Katlyn Meyer pela amizade. Aos alunos do laboratório de Neurofisiologia (Adriano Santos, Lais Rodrigues, Ana Nosedá, Mariana Fortes, Maíra Maturana, Ana Márcia, Bruno Carabeli, Marco Aurélio e Mariana Bordinhão) pelo acolhimento e por toda a ajuda. Especialmente ao Adriano e a Lais pela amizade e prontidão em me ajudar sempre que precisei e por serem bons ouvintes e amigos.

Aos amigos de fora da universidade. A Andréa Huy por estar ao meu lado no início do mestrado e por toda a troca de idéias sobre os experimentos. A Letícia Pereira pela ajuda para realizar a técnica de HPLC e pela amizade que tem se mantido a mesma na última década e a Erika Carvalho pelas visitas que me fizeram tão bem.

Aos professores Marcelo M. S. Lima por tudo, por ter se disposto a me orientar (mesmo sem nunca ter trabalhado com peixes), por ter me recebido tão bem em seu laboratório e por toda a atenção que me dedicou; professora Anete C. Ferraz, por ter me ensinado tudo que eu sei sobre memória; à professora Rosana N. de Moraes por ter analisado o cortisol dos meus peixes. Ao pessoal do departamento de Farmacologia (Suelen Boschen e a técnica Gisele) pela ajuda com o HPLC.

A Marisa pelo acolhimento em seu laboratório, por tudo que me ensinou e pela amizade.

A CAPES pela disposição a bolsa para que eu pudesse me dedicar integralmente a este trabalho.

## RESUMO

O objetivo do presente estudo foi testar o efeito da interação agonística na memória espacial da espécie de peixe cará (*Geophagus brasiliensis*), bem como se este efeito se relaciona à concentração de cortisol e/ou à atividade dos sistemas de neurotransmissão noradrenérgico, dopaminérgico e serotoninérgico. Animais adultos foram mantidos em interação agonística (através da presença de um espelho dentro do aquário) por três dias, sendo que no segundo e no terceiro dias foram submetidos ao teste de memória. O teste pretendeu avaliar a capacidade dos animais em se localizar no espaço para encontrar o local com a recompensa (ambiente familiar). Sabendo que o cortisol é o intermediador de processos prejudiciais no SNC é possível que o aumento da secreção de cortisol decorrente de condições de estresse durante a interação agonística se relacione com prejuízos no aprendizado. Conhecendo a contribuição dos neurotransmissores para os processos de aprendizagem e memória é possível que a ativação diferencial destes sistemas decorrente da interação agonística se relacione com benefícios no aprendizado. Os animais sob interação agonística, bem como do grupo controle (mantidos isolados) não aprenderam a tarefa proposta, provavelmente devido a falhas na metodologia do teste de aprendizado espacial. A liberação do cortisol indicou que na espécie utilizada o isolamento social não se constitui um agente estressor. Nem a liberação de cortisol e nem a atividade dos sistemas de neurotransmissão avaliados se relacionaram com o esperado em relação à condição de interação agonística bem como com o desempenho no teste de aprendizagem espacial.

**Palavras-chave:** Cortisol. Noradrenalina. Dopamina. Serotonina.

## ABSTRACT

The aim of this study was to test the effect of agonistic interactions on spatial learning of fish species (*Geophagus brasiliensis*), and whether this effect is related to the concentration of cortisol and / or activity of the noradrenergic, dopamine and serotonin neurotransmitter systems. Adult animals were kept in agonistic interactions (through the presence of a mirror inside the aquarium) for three days, and on the second and third days were tested. The test intended to evaluate the ability of animals to localize itself in space to find the place with the reward (family environment). Knowing that cortisol is the intermediary of harmful processes in the CNS is possible that the increased secretion of cortisol due to stress conditions during agonistic interactions relate to disruptions in learning. Knowing the contribution of neurotransmitters to the processes of learning and memory is possible that the differential activation of these systems due to the agonistic interaction relates to benefits in learning. The animals in agonistic interactions, as well as the control group (kept isolated) did not learn the task proposed, probably due to flaws in the methodology of spatial learning test. The release of cortisol indicated that for the species used social isolation is not considered a stressor. Neither the release of cortisol, nor the activity of neurotransmitter systems evaluated were related to expected in agonistic interactions as well as test performance of spatial learning.

**Key words:** Cortisol. Noradrenalin. Dopamin. Serotonin.

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO.....</b>	<b>6</b>
1.2	Objetivos.....	10
1.2.1	Objetivo geral.....	10
1.2.2	Objetivos específicos.....	10
<b>2</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>11</b>
2.1	Animais e aclimatação.....	11
2.2	Delineamento experimental.....	11
2.3	Grupos e manipulações.....	12
2.4	Aquário de teste de aprendizagem.....	13
2.5	Protocolo de teste de aprendizagem.....	14
2.6	Análises bioquímicas.....	16
2.6.1	Cortisol plasmático.....	16
2.6.2	Neurotransmissores.....	18
<b>3.</b>	<b>ANÁLISE ESTATÍSTICA.....</b>	<b>21</b>
<b>4.</b>	<b>RESULTADOS.....</b>	<b>22</b>
4.1	Teste de aprendizagem.....	22
4.2	Cortisol plasmático.....	23
4.3	Neurotransmissores.....	24
<b>5.</b>	<b>DISCUSSÃO.....</b>	<b>26</b>
5.1	Teste de aprendizagem.....	26
5.2	Cortisol e Neurotransmissores X Interação agonística.....	28
5.3	Cortisol e Neurotransmissores X Aprendizagem/memória.....	31
<b>6.</b>	<b>CONCLUSÕES.....</b>	<b>34</b>
	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>35</b>

## 1 INTRODUÇÃO

Comportamento social compreende as formas através das quais os animais interagem entre si (WERSINGER; MARTIN, 2009; BLUMSTEIN *et al.*, 2010). A interação social exibida pelas diferentes espécies varia em frequência e complexidade (DOODY; BURGHARDT; DINETS, 2012). Algumas espécies organizam-se em grupos, esta estratégia possui benefícios como a proteção contra predadores, divisão do trabalho, eficiência na busca pelo alimento e na reprodução; e custos como a divisão dos recursos (DEAG, 1981). Há espécies em que a divisão dos recursos não é igualitária entre os indivíduos. Algumas destas espécies exibem uma forma de organização social chamada hierarquia social ou hierarquia de dominância, na qual o grau hierárquico que cada indivíduo ocupa está relacionado ao seu *fitness*, e os indivíduos dominantes são aqueles que tem acesso prioritário aos recursos como parceiros e comida (SAPOLSKY, 2005; CREEL *et al.*, 2013).

O estresse decorrente do comportamento social é conhecido como estresse social. Ele está presente na vida de praticamente todas as espécies e é um estressor crônico e recorrente (BLANCHARD; MCKITTRICK; BLANCHARD, 2001). Nas espécies que se organizam em grupos, o estresse social advém das estratégias comportamentais expressas nas fases de definição e manutenção da hierarquia de dominância (CREEL, 2001; GOYMANN, 2003; ABBOTT *et al.*, 2003). A definição da hierarquia social pode ser transmitida entre as gerações ou estabelecida em interações/confrontos agonísticos (GOYMANN; WINGFIELD, 2004).

Os confrontos agonísticos que definem uma hierarquia social se constituem em agentes estressores para os indivíduos e estão associados a mudanças em algumas variáveis fisiológicas. Por se tratar de um indicador clássico de estresse o nível plasmático de cortisol sofre um aumento transiente nos indivíduos envolvidos em um confronto agonístico. Na maior parte das espécies, com o fim dos confrontos agonísticos e a definição da hierarquia, o nível de cortisol plasmático tende a voltar ao normal nos indivíduos que vencem o confronto (dominante), mas não nos perdedores (submissos ou subordinados) (SLOMAN; MONTPETIT; GILMOUR, 2002; FILBY *et al.*, 2010). As interações agonísticas também levam a uma rápida ativação de sistemas monoaminérgicos (WINBERG; NILSSON, 1993). Variações na



atividade noradrenérgica central já foram associadas a comportamentos agressivos em mamíferos (revisado por HALLER; MAKARA; KRUK, 1998; ratos e gatos ZAGRODZKA, 1995) e peixes (peixe elétrico - *Apteronotus leptorhynchus* MALER; ELLIS, 1987; peixe beta - *Betta splendens* BAENNINGER, 1968). O sistema dopaminérgico apresenta uma resposta semelhante àquela exibida pelo sistema noradrenérgico, uma vez que sua ativação também esta relaciona ao aumento do comportamento agressivo (MCINTYRE; HEALY; SAARI, 1979; WINBERG; NILSSON, 1993). A ativação do sistema serotoninérgico suprime a exibição de comportamentos ativos, o que permite a coexistência e inibe interações agressivas entre os indivíduos (JOHNSON; WINBERG; SLOMAN, 2005). Alguns autores demonstraram associação entre o aumento da atividade serotoninérgica e redução de comportamentos agressivos em peixes (MALER; ELLIS, 1987; WINBERG; NILSSON, 1993).

O processo cognitivo compreende uma série de fenômenos que se sucedem e são interconectados, por meio dos quais os animais internalizam informações sobre experiências vividas, através de seus sistemas sensitivos, aprendem tal informação e se lembram da experiência (memória) (BRAITHWAITE, 2005). Diversos aspectos do dia-a-dia dos animais estão relacionados com a habilidade de localização no espaço. A forma como um organismo recolhe e processa a informação sensorial do seu entorno e registra sua orientação espacial no ambiente é definida como memória espacial (CHUNG, 2008; BRAITHWAITE, 2005). É a memória espacial que permite aos animais de espécies territoriais definirem o território que irão ocupar e, as demais espécies, localizarem abrigo e alimentação em um ambiente conhecido. Considerando a importância da habilidade espacial no dia-a-dia de muitas espécies, o aprendizado e a memória espacial são parâmetros ideais para acessar a habilidade cognitiva dos animais (BRAITHWAITE, 2005).

As variáveis fisiológicas que podem ser alteradas pelos confrontos agonísticos participam de mecanismos no sistema nervoso central (SNC) que estão relacionados, direta ou indiretamente, a processos cognitivos envolvidos na aprendizagem. Considerando que áreas relevantes para a aprendizagem (hipocampo em mamíferos e telencéfalo em peixes) possuem grandes concentrações de glicoproteínas, o cortisol pode atuar de forma direta na modulação de mudanças estruturais nestas regiões, cujas conseqüências podem ser

relacionadas a prejuízos nas funções cognitivas associadas a tais regiões. A neurogênese compreende a multiplicação celular que acontece no sistema nervoso e pode culminar com a origem de novos neurônios. Nos mamíferos adultos a neurogênese é restrita à parte anterior da zona subventricular dos ventrículos laterais e a zona subgranular do giro dentado de onde os novos neurônios migram para o bulbo olfatório e hipocampo respectivamente (ZUPANC, 2008), enquanto que em peixes, a neurogênese ocorre ao longo de toda a vida e em todo o sistema nervoso central (ZUPANC *et al.*, 2005). A redução neurogênese hipocampal já foi associada a experiências estressantes em *tree shrew* (GOULD *et al.*, 1997) e em primatas (GOULD *et al.*, 1998). Estudos conduzidos por Sorensen e colaboradores (2011) em truta arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*) demonstraram que a taxa de proliferação neuronal esta inversamente relacionada à concentração de cortisol nos animais estressados, sugerindo que o cortisol tenha uma ação inibitória da atividade proliferativa neuronal. Enquanto que os altos níveis de cortisol, geralmente exibidos em resposta a experiências estressoras, estão associados à redução da neurogênese a atividade serotoninérgica promove a neurogênese no giro dentado do hipocampo em ratos (GOULD, 1999). Os novos neurônios podem, potencialmente, integrar-se a redes neurais já existentes e participar das funções hipocampais como os processos de aprendizado e memória (BECKER; WOJTOWICZ, 2006), embora ainda não haja um consenso sobre de que forma isso ocorra (EHNINGER; KEMPERMANN, 2008; WINOCUR *et al.*, 2012). A conectividade entre os neurônios é prejudicada quando estes exibem atrofia dentrítica apical que é observada nos dendritos hipocampais após eventos estressores e pode ser causada pela liberação e ação pós-sináptica dos aminoácidos excitatórios, cuja modulação se dá através da ação do cortisol sob os receptores específicos (LUINE *et al.*, 1994; MAGARINOS; MCEWEN, 1995a,b; MAGARINOS *et al.*, 1996). A potenciação e a depressão de longa duração (LTP e LTD) são os mecanismos moleculares que se acredita estarem relacionados aquisição de novas informações (aprendizagem) e evocação das informações em um momento posterior ao aprendizado (memória) (MALENKA; NICOLL, 1999). Enquanto o cortisol tem uma ação inibitória (YAMADA; MCEWEN; PAVLIDES, 2003), os neurotransmissores participam promovendo tais processos. Portanto, os altos níveis de cortisol são associados à redução da proliferação neuronal,

alterações estruturais prejudiciais às conexões dendríticas e inibição da LTP e da LTD, podendo levar a prejuízos no aprendizado. De fato, altos níveis de cortisol já foram associados a prejuízos cognitivos (LUINE *et al.*, 1994; OHL; FUCHS, 1998, 1999; OHL *et al.*, 2000). Enquanto que uma alta atividade dos sistemas de neurotransmissão noradrenérgico, dopaminérgico e serotoninérgico é associada à indução da LTP e da LTD e, portanto promove o aprendizado.

O papel de diferentes agentes estressores no aprendizado tem sido investigado, dentre estes, o estresse social. Dentre os trabalhos que utilizam como agente estressor o estresse social, o enfoque é dado para a investigação do papel das diferenças decorrentes dos distintos perfis fisiológicos exibidos por indivíduos dominantes e submissos. Ohl e Fuchs (1998,1999) trabalhando com tree shrew (*Tupaia belangeri* - mamíferos placentários da ordem Escandentia) observaram que as respostas fisiológicas de estresse decorrentes da ocupação de uma posição social de submissão resultam em prejuízos nos processos cognitivos dependentes do hipocampo e que estes prejuízos podem ser vistos mesmo longos períodos após e retirada do agente estressor, sugerindo um efeito mediado indiretamente pelo glicocorticoide. Com o foco nas diferenças exibidas por indivíduos dos distintos graus hierárquicos, quando a hierarquia já está definida, os efeitos dos confrontos agonísticos que ocorrem durante a definição da hierarquia social no aprendizado não tem sido investigados.

Portanto, considerando que as interações agonísticas levam ao aumento dos níveis de glicocorticóides plasmáticos e a ativação diferencial de alguns sistemas de neurotransmissores no sistema nervoso central, é possível que estas respostas exerçam algum efeito sobre o processo de aprendizagem dos animais. Neste estudo, portanto, testaremos a hipótese de que animais submetidos à interação agonística apresentam comprometimento do aprendizado e que essa resposta esteja associada ao aumento na taxa de cortisol e a variação na concentração de neurotransmissores associados à aquisição e consolidação de informações.

A espécie escolhida para estudo é o Cará, *Geophagus brasiliensis* (Quoy & Gaimard, 1824). Tratar-se de uma espécie nativa pertencente à Família Ciclidae, cujos indivíduos se organizam socialmente em uma hierarquia de dominância. Embora saibamos que nesta espécie a definição da hierarquia social se dá por meio

de confrontos agonísticos, não há na literatura a descrição dos comportamentos exibidos pela espécie quando em uma condição de interação agonística.

## 1.2 OBJETIVOS

### 1.2.1 OBJETIVO GERAL

Testar as seguintes hipóteses:

1. A interação agonística prejudica o aprendizado em *Geophagus brasiliensis*;
2. O prejuízo no aprendizado em *Geophagus brasiliensis* está relacionado à concentração de cortisol e/ou à atividade dos sistemas de neurotransmissão noradrenérgico, dopaminérgico e serotoninérgico.

### 1.2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Adaptar um protocolo de teste de aprendizado espacial à espécie *Geophagus brasiliensis*.
- Avaliar o desempenho de *Geophagus brasiliensis* em interação agonística no teste de aprendizado espacial.
- Monitorar o estresse de *Geophagus brasiliensis* através do nível de cortisol plasmático.
- Monitorar a atividade dos sistemas de neurotransmissão dopaminérgico, noradrenérgico e serotoninérgico em todo o encéfalo de *Geophagus brasiliensis*.

## 2 MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1 ANIMAIS E ACLIMATAÇÃO

Os procedimentos realizados no trabalho foram aprovados pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná (certificado nº 592, 28/02/2012).

Exemplares da espécie *Geophagus brasilienses* foram coletados com o auxílio de um puçá em lagoas de uma propriedade particular no município de Araucária. Os experimentos foram realizados no Laboratório de Estudos em Estresse Animal, localizado ao Departamento de Fisiologia do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná. Os animais foram aclimatados em um tanque de 100 litros com cascalho, filtro, aeração contínua, temperatura mantida a 25°C e ciclo de luz de 12 horas (luz das 7h às 19h). Durante a aclimatação a alimentação foi à base de ração comercial em flocos Alcon Basic® (44% proteína bruta) e/ou Alcon Colours® (42% proteína bruta) *ad libitum*. A comida foi fornecida em horários variados ao longo do período de luz. O horário da alimentação variado tinha como objetivo impedir que os animais que seriam submetidos ao teste de aprendizado fizessem algum tipo de associação entre o horário de alimentação e o de teste. Os animais permaneceram nestas condições por duas semanas antes de serem utilizados no experimento. Ao final do experimento os animais tinham  $12,11 \pm 7,15$  g e  $8,61 \pm 1,61$  cm.

### 2.2 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

Após as duas semanas de aclimatação às condições do laboratório, teve início o experimento. Os animais foram então coletados aleatoriamente do tanque de aclimatação e mantidos isolados por três dias. Os aquários de isolamento eram de vidro (25 cm de comprimento, 20 cm de altura e 20 cm de largura, preenchidos com 18 cm de coluna d'água) com cascalho, aeração contínua, aquecedor e revestimento

externo preto para evitar contato visual com outros indivíduos. Durante a fase de isolamento os animais foram mantidos sob os mesmos parâmetros de temperatura, luminosidade e alimentação da fase de aclimação. Para avaliar os efeitos da interação agonística no aprendizado os animais dos grupos sob interação agonística continham um espelho (20 cm x 20 cm) dentro do aquário para simular a presença de outro indivíduo, adaptado de Merigue *et al.* (2004) e Craft, Velkey e Pretree (2003). Os animais que realizaram o teste de aprendizado espacial o fizeram no segundo e no terceiro dia do período de isolamento.

### 2.3 GRUPOS E MANIPULAÇÕES

Um resumo dos grupos e das manipulações que cada grupo passou encontra-se na TABELA 1. Para avaliar o papel da interação agonística no aprendizado espacial utilizamos animais que permaneceram isolados por três dias com o espelho dentro do aquário e no segundo e terceiro dia de isolamento foram submetidos ao teste, grupo “Interação agonística”. Para controlar os efeitos da interação agonística, utilizamos animais que também permaneceram isolados por três dias e no segundo e no terceiro dia eram submetidos ao teste, entretanto estes animais permaneceram isolados sem a presença do espelho, grupo “Isolado”. Para controlar os possíveis efeitos do teste nos parâmetros fisiológicos que seriam analisados utilizamos animais isolados por três que não foram submetidos ao teste. O grupo “Controle teste interação” ficou com o espelho no aquário e o grupo “Controle teste isolado” ficou sem o espelho. Para controlar os efeitos de toda a manipulação do experimento amostramos animais coletados diretamente do tanque estoque a fim de obtermos níveis normais das variáveis fisiológicas que iríamos avaliar, grupo “Controle manipulação”.

Grupos Manipulação	Interação agonística	Isolado	Controle teste Interação	Controle teste Isolado	Controle
Isolamento	Sim	Sim	Sim	Sim	Não
Presença de espelho	Sim	Não	Sim	Não	-
Teste de memória	Sim	Sim	Não	Não	-

Tabela 1: Esquema dos grupos e das manipulações que cada grupo recebeu.

## 2.4 AQUÁRIO DO TESTE DE APRENDIZAGEM

O teste de aprendizagem espacial teve como objetivo avaliar a habilidade dos animais em se localizar no espaço e encontrar o local com a recompensa e baseou-se no protocolo descrito por Arthur e Levin (2001) e adaptado por Levin *et al.* (2003). O protocolo de teste foi modificado em relação a sua versão original como mostrado na TABELA 2.

Arthur e Levin (2001)	Presente trabalho
Animais de criação	Animais do ambiente natural
Testes agrupados em seções	Testes agrupados em seções
3 testes por seção	3 testes por seção
18 seções, 3 por semana	4 seções em 2 dias
Média 3,6 seções por semana	Média 2 seções por dia

Tabela 2: Comparação dos protocolos de teste de Arthur e Levin (2001) e o utilizado neste trabalho.

O aquário de teste (FIGURA 1) foi retangular (60 cm de comprimento, 20 cm de largura e 20 cm de altura, preenchido com 16 cm de coluna d'água), dividido em três compartimentos. Os dois compartimentos laterais tiveram o mesmo tamanho (23 cm de comprimento) e o compartimento do meio foi menor que os laterais (13 cm de comprimento). O compartimento do meio foi separado dos laterais por divisórias opacas. Em cada divisória houve uma janela retangular que poderia estar aberta permitindo que os animais transitassem entre os compartimentos ou fechada por placas retangulares adjacentes às divisórias que eram erguidas por um sistema de roldanas. Um dos compartimentos laterais possuiu as mesmas características do aquário onde os animais foram mantidos durante o experimento (revestimento externo preto, cascalho, aeração contínua e aquecedor), considerado o ambiente familiar. O outro compartimento lateral foi um ambiente inóspito contando apenas com revestimento externo branco, considerado o ambiente não familiar. O ambiente familiar foi utilizado como recompensa, portanto esperava-se que os animais aprendessem a entrar no lado que lhes era familiar. Para controlar possíveis efeitos de preferência pelo lado do aquário, metade dos animais foi colocada no aquário com ambiente familiar para a esquerda e metade para a direita. As divisórias que continham as janelas e as placas retangulares que as bloqueavam foram distintas

entre os compartimentos laterais. No lado não familiar as paredes foram brancas, enquanto que no lado familiar elas possuíam listras verticais pretas e brancas (1 cm largura cada) intercaladas. Estas listras consistiram em uma dica visual que os animais poderiam, ou não, associar ao lado com a recompensa, dependendo da estratégia que eles utilizariam para resolver a tarefa.

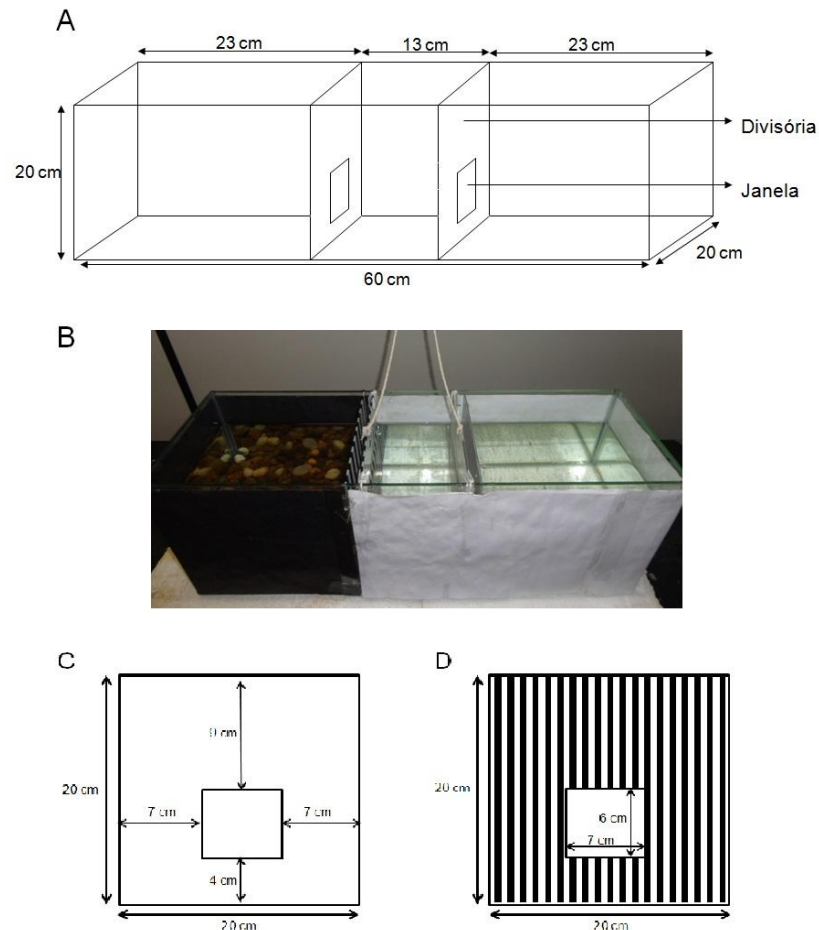


FIGURA 1: Aquário de teste. A: Esquema com vista lateral. B: Foto com vista lateral/superior (Autor: Laura Batista). C: Divisória do compartimento não familiar. D: Divisórias do compartimento familiar (com dica visual – listras verticais).

## 2.5 PROTOCOLO DO TESTE DE APRENDIZAGEM

O teste teve duração de dois dias (no 2º e 3º dias de isolamento), nos quais os animais realizaram duas seções de testes, uma pela manhã e uma pela tarde (com seis horas de intervalo entre elas). Cada sessão consistiu de três testes de cinco minutos com 15 minutos de intervalo. Cada teste consistia de um período de



aclimação (dez segundos), um período de teste (quatro minutos) e um período de recompensa (um minuto). Na aclimação o peixe era colocado no compartimento do meio com as duas janelas fechadas. Passados dez segundos as janelas eram abertas simultaneamente e tinha início o período de teste. Ao final do quarto minuto do período de teste havia três possibilidades de localização do peixe, o que levava as seguintes possibilidades de manipulações pelo experimentador:

1. Peixe no compartimento do meio: o experimentador conduzia o animal cuidadosamente para o compartimento familiar com a ajuda de um puçá.
2. Compartimento lateral não familiar: o experimentador conduzia o animal para o compartimento familiar com a ajuda de um puçá.
3. Compartimento lateral familiar: o experimentador deveria deixa-o lá.

Quando o peixe estivesse dentro do compartimento familiar tinha início o período de recompensa com duração de um minuto. Ao final dos cinco minutos o animal era retirado do aquário de teste (sempre do compartimento familiar) com a ajuda de um puçá e recolocado em seu aquário de isolamento. Foram coletados dados referentes ao lado em que o animal entrou e a latência (segundos), que é o tempo entre a abertura das portas e a entrada do animal no lado com recompensa (ambiente familiar).

O último teste (décimo segundo teste), no período da tarde do segundo dia consistiu de um probe teste, cujo objetivo era testar se os animais estavam utilizando a pista visual fornecida (parede com listras) para realizar o teste. Para tanto, as paredes que dividiam o aquário eram trocadas de posição: o lado familiar ficava então com paredes lisas e o lado não familiar tinha paredes listradas. O procedimento do teste era o mesmo. Caso os animais tivessem utilizado a pista visual para se localizarem durante os testes era esperado que no probe test os mesmos entrassem no lado não familiar que estava sinalizado pela parede com listras.

Foram submetidos ao teste 12 animais em cada grupo (Experimental e Controle Social). Foi considerado que o animal respondeu ao teste quando ele entrou, ao menos uma vez, em um dos compartimentos laterais ao longo dos 12 testes. Aqueles animais que não entraram em nenhum compartimento lateral durante os testes foram excluídos das análises do teste de aprendizagem.

## 2.6 ANÁLISES BIOQUÍMICAS

Ao final do teste os animais foram anestesiados (benzocaína 8mg/L) até a perda da postura corporal. Após a anestesia os animais foram pesados e medidos e o sangue foi coletado com uma seringa 1.0 ml heparinizada a partir da veia caudal. Imediatamente após, o sangue foi centrifugado a 6200 rpm por vinte minutos, o plasma foi separado e congelado a -15°C até a sua utilização. Foi feita a secção medular dos animais e o encéfalo foi dissecado (FIGURA 2) e congelado em freezer -80°C para posterior quantificação da concentração de neurotransmissores.

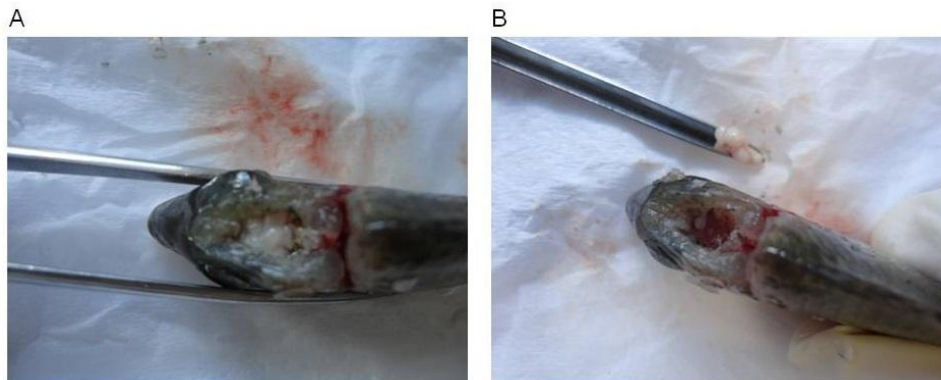


FIGURA 2: Dissecção do encéfalo de *Geophagus brasiliensis*. Autor: Laura Batista. A: Vista superior do encéfalo na caixa craniana. B: Encéfalo retirado.

### 2.6.1 CORTISOL PLASMÁTICO

O cortisol plasmático foi dosado através do método de enzimaímmunoensaio (ELISA - Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay) como descrito por Brown, Walker e Steinmain (2004).

Como a concentração de cortisol para a espécie utilizada neste estudo ainda não havia sido dosada no laboratório de Laboratório de Fisiologia da Reprodução (UFPR), foi feita a validação das amostras, através do ensaio de paralelismo que verifica a existência de similaridade imunogênica entre o antígeno utilizado como padrão no ensaio e o antígeno a ser dosado na amostra. Nesse ensaio também determina-se qual a diluição mais apropriada das amostras para a dosagem. Para tanto, uma mistura (“pool”) de todas as amostras de plasma a serem testadas, foram

diluídas 1:1 (extrato:solução de diluição de ELISA) de forma seriada até se chegar à diluição final de 1:512. A curva da concentração em relação ao percentual de ligação, assim obtida, é chamada curva de validação da amostra. Se esta curva for paralela à curva padrão do ensaio isto é interpretado como similaridade imunogênica entre os dois antígenos e o método de dosagem pode ser utilizado. Entretanto, se a curva de validação das amostras não for paralela, não existe similaridade (ou a similaridade é baixa) e o método não pode ser utilizado (BROWN; WALKER; STEINMAIN, 2004).

Para a realização dos ensaios, microplacas (NUNC Immuno TM plates, Maxisorp) foram cobertas com 50µl de anticorpo anti-cortisol (Polyclonal; Coralie Munro – Universidade da Califórnia, Davis, CA, USA) diluído e acondicionada a 4°C, por pelo menos 12 horas. A curva padrão foi preparada a partir de cortisol diluído 1:1 com solução de ensaio de ELISA (NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; NaCl; BSA; pH ajustado para 7,00). O hormônio conjugado cortisol-HRP (Coralie Munro – Universidade da Califórnia, Davis, CA, USA) foi diluído e mantido em 4°C até o momento do ensaio. A solução do substrato enzimático foi preparada imediatamente antes de sua adição na microplaca e consistia de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a 0,5M; ABTS (Calbiochem, ABTSTM Chromophore, Diammonium Salt) e solução de substrato para ELISA (ácido cítrico; pH ajustado para 4,00). A microplaca já coberta com anticorpos foi lavada por cinco vezes com solução de lavagem de ELISA (NaCl; Tween 20) e o excesso de solução foi retirado batendo-se a placa em papel toalha. Após a lavagem foram pipetados 50µl das soluções dos padrões, em duplicata; 50µl dos controles e das amostras, em duplicatas e 50µl da solução do marcado enzimático cortisol – HRP em todos os poços, exceto nos poços considerados como branco. A microplaca foi incubada durante uma hora, em temperatura ambiente, com agitação (Multi-Pulse Vortexer, Glas-Col®, Terre Haut, EUA). Todo o processo de pipetagem levou, em média, 6 minutos, não ultrapassando 10 minutos. Após a incubação, a microplaca foi lavada novamente e foram adicionados 100µl da solução do substrato enzimático em cada poço, exceto nos poços considerados como branco. A microplaca foi agitada em agitador Multi-Pulse Vortexer (modelo 099<sup>a</sup> VB4, 50/60Hz – Glass-Col\_), sem pulso e em 300 rpm até que os poços considerados como zeros chegassem em densidade óptica (OD) de 1,0, quando era feita a leitura da absorbância em 405 nm, no leitor de microplaca TECAN. Para determinar a concentração da amostra, os valores da

absorbância das mesmas foram comparados aos valores de absorbância da curva padrão.

O ensaio de validação (paralelismo) demonstrou similaridade imunogênica entre o cortisol plasmático da espécie estudada e o cortisol utilizado como padrão (FIGURA 3) e o fator de diluição ideal para as dosagens foi determinado como sendo 1:63 e 1:123, já que foram as diluições que mais se aproximaram do ponto central da curva padrão (~50% de ligação).

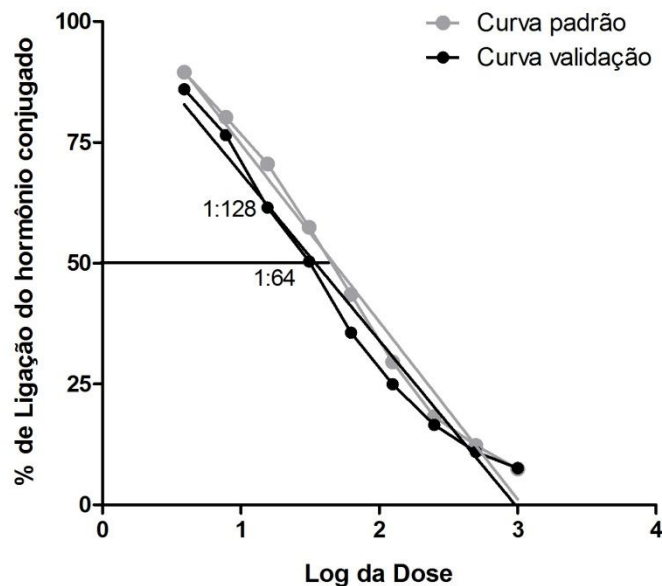


FIGURA 3: Concentração hormonal em relação ao percentual de ligação para as curvas padrão e de validação para cortisol plasmático de *Geophagus brasiliensis*, mostrando paralelismo entre elas. O percentual de ligação do hormônio conjugado se refere ao percentual de hormônio conjugado (cortisol-HRP) ligada aos anticorpos e é inversamente proporcional a concentração do hormônio a ser quantificado.

Para determinar o grau de erro associado aos procedimentos técnicos da dosagem calculou-se o coeficiente de variação intra-ensaio (CV), feito individualmente para cada amostra, e o CV inter-ensaios, utilizando-se dos valores médios das duplicatas das amostras controles, obtidos em cada ensaio. O coeficiente de variação intra e inter-ensaio foi menor que 10%. Os resultados foram corrigidos para o fator de diluição e são expressos em ng/ml de soro.

## 2.6.2 NEUROTRANSMISSORES

As concentrações encefálicas de dopamina (DA) e seu metabólito 3,4-ácido diidroxifenilacético (DOPAC), bem como da noradrenalina (NA) e seu metabólito 3,5-diidroxifenilglicina (DHPG) e da serotonina (5-HT) foram determinadas por cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a detector eletroquímico (HPLC-ED) por meio de coluna C-18 de fase reversa.

O sistema consiste de uma coluna de fase reversa Synergi Fusion-RP C-18 (150 x 4.6 mm i.d., 4 µm de tamanho de partícula) acoplada a pré-coluna Security Guard Cartridges Fusion-RP (4 x 3.0 mm) e detector eletroquímico (ED) ESA Coulochem III Electrochemical equipado com célula guarda de 350 mV ESA 5011A. e bomba injetora LC-20AT manual Shimadzu (Rheodyne 7725) e loop de 20 µL. A coluna será mantida em forno de temperatura controlada (25°C; Shimadzu). A célula contém duas câmaras em série: cada câmara incluindo um eletrodo coulométrico de grafite, um eletrodo duplo de contagem e um eletrodo duplo de referência. Os potenciais de oxidação serão ajustados para 100 mV para o primeiro eletrodo e a 450 mV para o segundo eletrodo. As amostras de tecido serão homogeneizadas por meio de sonicador (Sonics) em 0,1 M de ácido perclórico contendo 0,02% de metabisulfito de sódio como padrão interno. Após centrifugação a 10.000 x g por 30 min a 4°C, injeta-se 20 µL de sobrenadante no cromatografo.

A fase móvel utilizada foi injetada numa razão de 1 mL/min e apresentou a seguinte composição: 20 g ácido cítrico monoidratado (Merck), 200 mg ácido 1-octano sulfônico (Merck), 40 mg de ácido etilenediaminetetraacético (EDTA) (Sigma) em 900 mL de água HPLC-grade. O pH do tampão de corrida foi ajustado para 4.0, depois filtrado em filtro de poro com 0.45 µm de diâmetro. Em seguida, foi adicionado metanol (Merck) até atingir-se uma concentração final de 10% (v/v). As concentrações dos neurotransmissores e seus metabólitos foram calculadas usando-se uma curva padrão que foi gerada por meio de um ensaio em triplicata, utilizando-se uma razão entre as diferentes concentrações obtidas e os padrões internos. A unidade utilizada para expressar essas quantificações foi ng/g de peso seco de tecido.

Conhecendo-se as concentrações dos neurotransmissores e dos metabólitos é possível calcular o turnover do sistema, que representa a taxa de atividade do mesmo, através da divisão da concentração do metabólito pela do neurotransmissor.

Devido a problemas técnicos não pudemos avaliar a concentração do metabólito da serotonina e, portanto, não pudemos determinar o turnover deste sistema.

### 3ANÁLISE ESTATÍSTICA

Todos os dados foram testados quanto à normalidade através do teste Kolmogorov-Smirnov e as análises seguintes foram realizadas com os testes mais adequados a cada distribuição encontrada. Foram considerados significativamente diferentes os valores de  $p \leq 0,05$ .

A latência (tempo para entrar no lado familiar) nos 12 testes foi comparada entre os grupos através do teste Two Way ANOVA de medidas repetidas com pós-teste de Bonferroni. Para cada grupo a latência nos três testes de uma mesma seção foram comparados entre si através do teste Friedman e pós teste de Dunn e como não houve diferença significativa os testes foram agrupados em quatro seções. A latência nas quatro seções foi comparada entre os grupos através do teste Two Way ANOVA de medidas repetidas com pós-teste de Bonferroni. Para cada grupo a latência nas duas seções de cada dia foram comparadas entre si separadamente através do teste Wilcoxon.

Os níveis de cortisol foram comparados entre os grupos com o teste Kruskal-Wallis e pós teste de Dunn. As concentrações dos neurotransmissores, dos metabólitos e o turnover foram comparados entre os grupos através do teste One Way ANOVA com pós teste de Newman-Keuls.

## 4 RESULTADOS

### 4.1 TESTE DE APRENDIZAGEM

Apenas 50% de cada grupo respondeu ao teste e, portanto, somente estes foram utilizados para as análises. A FIGURA 4 mostra a latência (segundos) para os animais entrarem no lado com a recompensa (ambiente familiar) ao longo dos doze testes, agrupados em quatro seções com três testes cada. Ao compararmos os dois grupos através do Two Way ANOVA de medidas repetidas houve diferença significativa no fator tempo ao longo dos doze testes ( $p=0,0411$ ) e das quatro seções ( $p=0,0318$ ). Ao comparar as duas seções de cada dia entre si através do teste Wilcoxon, o grupo Isolado apresentou redução significativa entre as duas seções do primeiro dia ( $p=0,0039$ ) e o grupo Interação agonística apresentou aumento significativo entre as duas seções do segundo dia ( $p=0,0087$ ). No probe test, somando-se os grupos, apenas 25% dos animais que participou do teste entrou em um dos compartimentos laterais, os demais permaneceram no compartimento do meio. Portanto não foi possível inferir se os animais utilizaram ou não a dica visual fornecida para completar a tarefa.



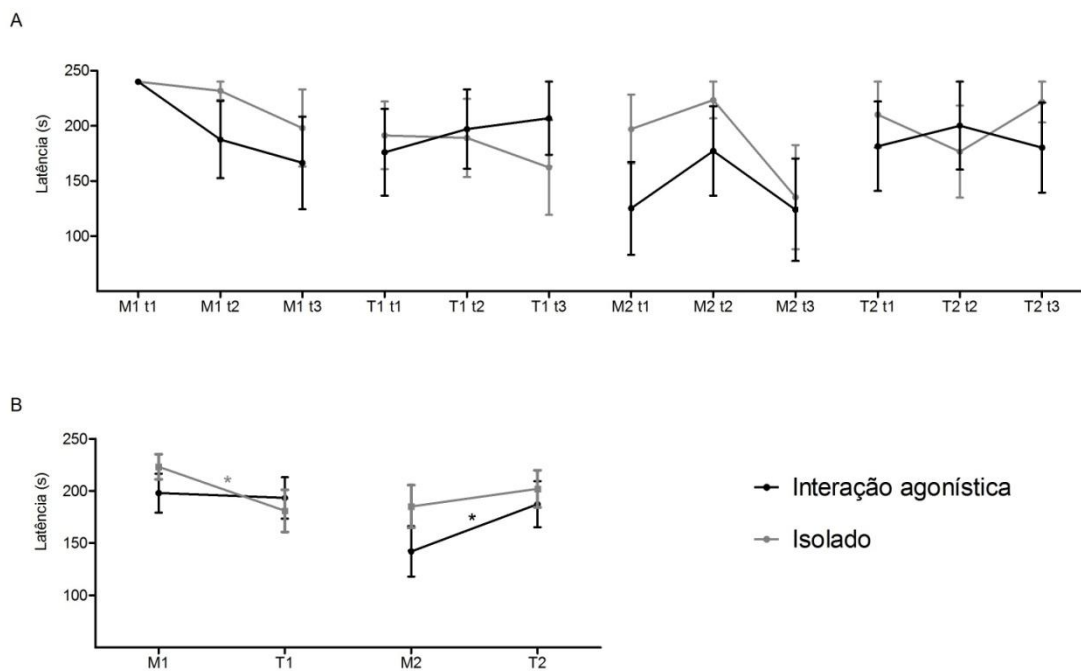


FIGURA 4: Teste de aprendizagem. Latência para entrar no lado com recompensa (ambiente familiar). M: manhã, T: tarde, seguidos pelo dia do teste (1 e 2), t1: teste 1, t2: teste 2, t3: teste 3. A: Doze testes. B: Doze testes agrupados em quatro sessões. Two Way ANOVA de medidas repetidas. Média  $\pm$  SEM. \* indica diferença significativa entre as duas seções do mesmo dia para os grupos Isolado (redução entre seções do dia 1,  $p=0,0039$ ) e Interação agonística (aumento entre seções do dia 2,  $p=0,0087$ ).

## 4.2 CORTISOL PLASMÁTICO

A comparação entre todos os grupos apresentou diferença significativa ( $p=0,0003$ ), FIGURA 5. As análises com o teste Kruskal-Wallis mostraram que os grupos C. manipulação (animais amostrados imediatamente após a retirada do tanque de aclimatação) e Isolado (animais mantidos isolados e que foram submetidos ao teste) apresentaram maior concentração de cortisol que o grupo C. teste isolado (animais mantidos isolados que não realizaram o teste).

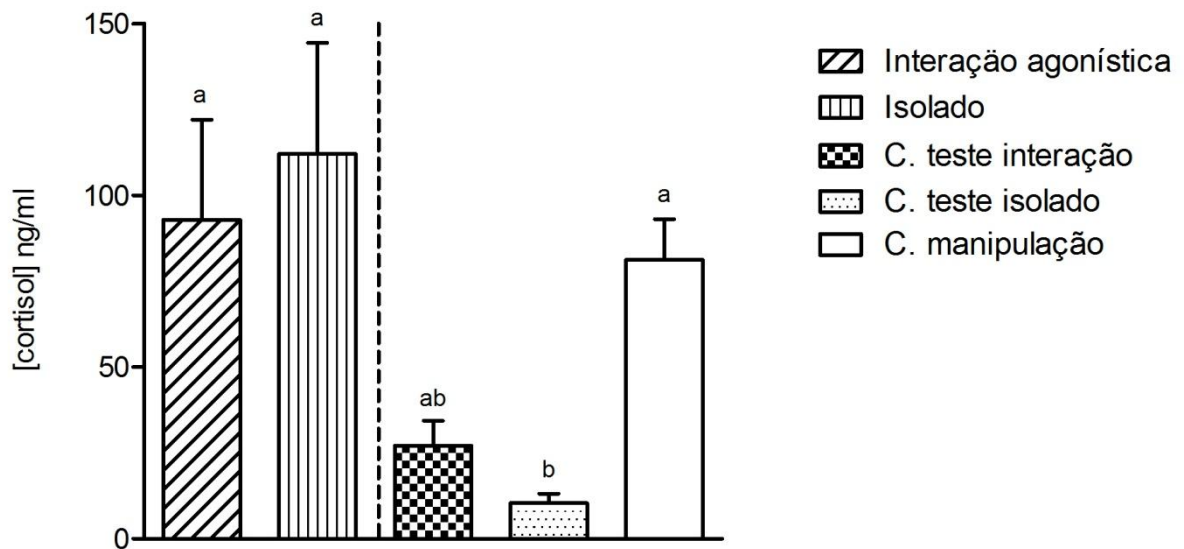


FIGURA 5: Níveis plasmáticos de cortisol em *Geophagus brasiliensis*. Kruskal-Wallis com pós teste Dunn's ( $p=0,0003$ ). Média  $\pm$  SEM. Letras diferentes indicam diferença significativa. Grupos: Interação agonística ( $n=4$ ), Isolado ( $n=8$ ), C. teste interação ( $n=6$ ), C. teste isolado ( $n=4$ ) e C. manipulação ( $n=9$ ).

### 4.3 NEUROTRANSMISSORES

A FIGURA 6 mostra os resultados obtidos com o teste One Way ANOVA e pós-teste de Newman-Keuls para as concentrações encefálicas de DA, NA, 5-HT, DHPG, DOPAC e o turnover da NA e da DA. As concentrações NA e DHPG foram iguais entre os grupos. O turnover da noradrenalina foi menor ( $p=0,0171$ ) no grupo Isolado em relação ao grupo Interação agonística. A concentração de DA foi maior ( $p=0,0017$ ) no grupo Isolado em relação a todos os outros grupos. A concentração de DOPAC diferiu entre os grupos ( $p=0,003$ ), sendo maior no grupo Isolado em relação ao grupo C. teste isolado e maior no grupo Interação agonística em relação ao grupo C. teste interação. O turnover da dopamina foi maior ( $p=0,0004$ ) nos grupos Interação agonística e Isolado em relação aos grupos C. teste interação e C. teste isolado. A concentração de serotonina diferiu entre os grupos ( $p<0,0001$ ), sendo menor no grupo Isolado em relação a todos os outros grupos e menor no grupo C. manipulação em relação ao grupo C. teste interação.

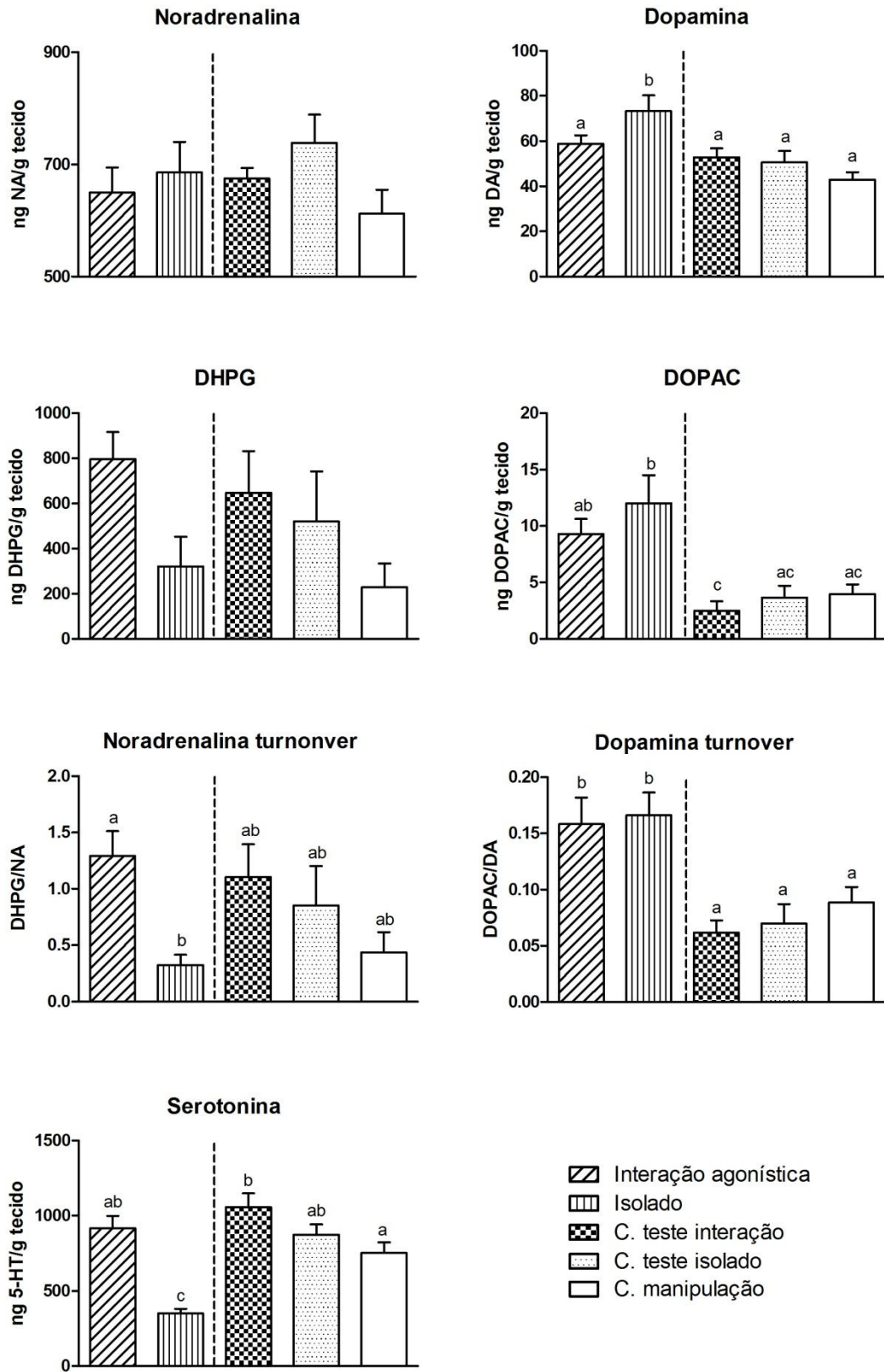


FIGURA 6: Níveis encefálicos de NA, DHPG, 5-HT, DA, DOPAC e turnover de NA e DA em *Geophagus brasiliensis*. One Way ANOVA com pós teste Newman-Keuls. Média ± SEM. Letras diferentes indicam diferença significativa. Grupos: Interação agonística (n=11), Isolado (n=11), C. teste interação (n=9), C. teste isolado (n=8), C. manipulação (n=8).

## 5 DISCUSSÃO

### 5.1 TESTE DE APRENDIZAGEM

No teste de aprendizagem espacial os animais deveriam aprender a localizar-se espacialmente a fim de entrar no lado do aquário que continha a recompensa (um ambiente familiar ao que eles estavam sendo mantidos no aquário de isolamento). Caso houvesse aprendizagem da tarefa isso seria observado através da redução significativa da latência ao longo dos doze testes. Nenhum dos grupos submetidos ao teste (Interação agonística e Isolado) aprendeu a tarefa proposta. O desempenho dos grupos foi semelhante e nenhum deles apresentou redução significativa da latência ao longo dos doze testes. Após o agrupamento dos testes em quatro seções foram encontradas duas diferenças significativas. Houve uma redução na latência, o que indica melhora no desempenho, para o grupo Isolado entre as seções do primeiro dia. Houve também um aumento na latência, o que indica prejuízo no desempenho, para o grupo Interação agonística entre as seções do segundo dia.

Os testes da manhã do primeiro dia consistiam em uma primeira exposição dos animais ao teste, ou seja, neste momento os animais ainda não conheciam o aparato e a tarefa a ser realizada, enquanto que na seção seguinte já estavam familiarizados, o que pode ter levado a redução na latência no primeiro dia observada no grupo Isolado. Estudos desenvolvidos por Craft, Velkey e Pretree (2003), demonstraram aprendizagem dos animais (*Betta splendens*) em teste de aprendizagem espacial quando os animais foram mantidos, ao longo de todo o experimento, nos próprios aquários de teste. Estes dados indicam que devemos considerar a neofobia como um potencial modulador comportamental durante a exposição dos animais ao aparato de teste. Portanto, devemos eliminar este fator ao realizar o teste em um ambiente que seja familiar aos animais. O aumento da latência observado no segundo dia no grupo Interação agonística pode ter sido devido ao estresse gerado pela manipulação que o teste requeria.

O teste de aprendizagem utilizado aqui foi baseado no trabalho de Arthur e Levin (2001) cujo objetivo era elaborar um protocolo eficaz para avaliar a aprendizagem em peixes que pudesse ser replicado em futuros trabalhos com o

intuito de compreender os mecanismos moleculares envolvidos no desenvolvimento neural. Posteriormente o teste proposto por Arthur e Levin (2001) foi adaptado e utilizado por Levin *et al.* (2003) para determinar o efeito da exposição ao inseticida clorpirifós na discriminação espacial em longo prazo. Ambos trabalharam com zebrafish (*Danio rerio*) e observaram aprendizado ao longo das seções (considerando nos trabalhos de Levin *et al.* (2003) os animais não expostos ao inseticida). Uma vez que o teste proposto por Arthur e Levin (2001) foi eficaz para avaliar e aprendizagem em peixes e que o aparato necessário era de fácil elaboração optamos por utilizar o mesmo teste. Para isso, realizamos alguns estudos piloto em nosso laboratório com a intenção de determinar a necessidade de adaptações, considerado que trabalharíamos com uma espécie distinta. Nestes estudos piloto, observamos que a partir do terceiro dia de teste os animais passaram a apresentar comportamentos anormais (ex. freezing) e o número de animais mortos aumentou gradativamente com o passar dos dias. Além disso, os resultados destes estudos piloto demonstraram que os animais apresentaram as melhores respostas ao teste no segundo dia, por isso optamos por realizar os testes em dois dias. Similarmente aos trabalhos originais, agrupamos os testes em seções, cada uma delas com três testes, portanto a quantidade de testes por seção não deve ter sido o fator determinante para a ausência de aprendizado observada no presente trabalho. Enquanto Arthur e Levin (2001) e Levin *et al.* (2003) realizaram até 18 seções de testes, sendo no máximo três por semana, realizamos quatro seções de teste em dois dias. Considerando as diferenças entre os protocolos utilizados por Arthur e Levin (2001) e Levin *et al.* (2003) e aquele utilizado no presente trabalho é possível que o menor número de seções de teste, bem como o reduzido tempo de intervalo entre as seções utilizados neste trabalho possam ter prejudicado o desempenho dos animais no teste.

No presente trabalho optamos por utilizar animais provenientes do ambiente natural. Com isso, esperávamos obter respostas comportamentais e fisiológicas mais representativas das respostas exibidas por animais nascidos e criados em ambiente natural, em comparação aos animais provenientes de criadouros que estão submetidos a algum tipo de seleção artificial imposta pelo homem, que pode levar a homogeneização das respostas. Nos trabalhos de Arthur e Levin (2001) e Levin *et al.* (2003) os autores utilizaram animais provenientes de criadouros. Embora

haja algum tipo de seleção nestes animais eles são, provavelmente, mais habituados a qualquer tipo de manipulação feita pelo homem, enquanto que animais oriundos do ambiente natural apresentam maior dificuldade em se ajustar às condições do laboratório, bem como a qualquer tipo de manipulação. A origem dos animais utilizados no presente estudo pode ter influenciado negativamente nos resultados obtidos no teste de aprendizagem.

## 5.2 CORTISOL E NEUROTRANSMISSORES X INTERAÇÃO AGONÍSTICA

Considerando o papel do cortisol no ajuste dos indivíduos às condições de estresse, era esperado que os altos níveis de cortisol fossem vistos nos animais que passaram por condições e/ou manipulações estressoras. O nível de cortisol plasmático exibido pelo grupo C. manipulação foi considerado como sendo o nível basal e foi igual aos grupos C. teste interação, Isolado e Interação agonística. O nível de cortisol plasmático exibido pelo grupo C. teste isolado foi menor que o grupo C. manipulação e C. teste interação. Ao serem submetidos ao teste os animais que estavam isolados responderam com um aumento significativo nos níveis de cortisol, enquanto que os animais que estavam em interação agonística, não. O isolamento social somado ao teste foi mais estressor do que a interação agonística somada ao teste, ou seja, o teste representou um agente estressor mais potente para aqueles animais que estavam isolados do que para os que estavam em interação agonística.

A espécie utilizada no presente trabalho faz parte da família dos ciclídeos e, portanto, se organiza socialmente em uma hierarquia de dominância que é estabelecida por meio de confrontos agonísticos, que elevam os níveis de cortisol dos indivíduos. Considerando esta característica da espécie era esperado que os animais que permaneceram isolados apresentassem uma menor concentração de cortisol em relação àqueles que estavam em interação agonística, o que não foi observado. Foi observada diferença significativa apenas entre os animais que permaneceram isolados em comparação àqueles que estavam no tanque estoque, sendo que os isolados apresentaram os menores níveis. Os dados indicam que para a espécie utilizada o isolamento representou uma condição menos estressora do que a permanência em grupo, como observado por outros autores com diferentes

espécies. Ohl e Fuchs (1998) trabalhando com mamíferos (treeshrew) observaram que os animais isolados apresentavam menor concentração de cortisol na urina do que aqueles mantidos em pares. Em peixes, Medeiros e McDonald (2013) trabalhando com gulf toadfish (*Opsanus beta*) observaram as menores concentrações de cortisol plasmático nos animais mantidos isolados em relação àqueles mantidos em grupo. O isolamento consistir em um agente estressor é uma característica de cada espécie e deve ser considerado ao elaborar protocolos experimentais que tenham como objetivo avaliar os efeitos do estresse. Os dados obtidos indicam que para a espécie utilizada o protocolo de isolamento prévio ao teste é adequado, pois representa uma condição menos estressora que a permanência em grupo.

Segundo Haller, Makara e Kruk (1997) o sistema noradrenérgico central tem papel importante na expressão de comportamentos agressivos, uma vez que prepara o organismo para a luta através suas ações na redução da percepção da dor, aumento do estado de atenção e efeitos diretos no comportamento agressivo. No entanto, Zagrodzka (1995) trabalhando com ratos encontrou que a destruição os neurônios noradrenérgicos do locus coeruleus esta associada ao aumento os comportamentos agressivos e Baenninger (1968) trabalhando com peixe beta (*Betta splendens*) ao adicionar noradrenalina na água do aquário observou uma redução nos comportamentos agressivos exibidos frente ao espelho colocado no aquário. Embora estes dados contrários tenham sido observados, de forma geral a literatura aponta uma relação direta entre a ativação noradrenérgica e o aumento dos comportamentos agressivos Haller, Makara e Kruk (1998), relação esta que já foi observada em peixes; Maler e Ellis (1987) trabalhando com peixe elétrico (*Apteronotus leptorhynchus*) observou o aumento os comportamentos agressivos ao injetar noradrenalina intracerebroventricularmente. Considerando o papel o sistema noradrenérgico em estimular a exibição de comportamentos agressivos era esperado que os animais sob interação agonística exibissem alta atividade deste sistema de neurotransmissão quando comparados aos animais isolados. Não foi observada diferença na concentração da noradrenalina nem do metabolito HPG entre os grupos; entretanto, houve diferença no turnover, ao considerarmos os grupos que foram submetidos ao teste, com os animais em interação agonística apresentando valores significativamente maiores que os animais isolados. Porém,

não conseguimos determinar o que levou à diminuição no turnover da noradrenalina neste caso. O isolamento por si só não deve ter causado essa redução, nesse caso seria esperado que o grupo Isolado apresentasse níveis menores que os exibidos pelo grupo C. teste interação. Também não deve ter sido o teste, nesse caso seria esperado que o grupo Interação agonística exibisse os mesmos níveis.

A atividade dopaminérgica esta associada ao aumento dos comportamentos agressivos (MCINTYRE; HEALY; SAARI, 1979; WINBERG; NILSSON, 1993), portanto seria esperado que os animais sob interação agonística apresentassem maior atividade deste sistema. Os dados obtidos não apresentam relação entre a interação social e os níveis de atividade dopaminérgica. Comparando os grupos observamos que a atividade dopaminérgica foi influenciada pelo teste e não pela condição social dos animais. O comportamento agressivo exibido em condição de interação social é complexo e esta sob a regulação de vários sistemas, portanto é possível que tenha havido uma interação entre estes sistemas na exibição dos comportamentos agressivos e por isso não tenha sido possível observar uma relação direta entre a atividade de cada um deles e a condição de interação social.

A interação social, ou o estresse social decorrente, já foi demonstrado ativar o sistema serotoninérgico diferentemente em indivíduos dominantes e submissos em uma hierarquia social (ELOFSOON *et al.*, 2000; SLOMAN, 2005), o que se reflete nos diferentes padrões comportamentais exibidos pelos animais que ocupam diferentes posições na hierarquia social. Embora dados controversos já tenham sido encontrados (LORENZI *et al.*, 2009; MCDONALD; GONZALEZ; SLOMAN, 2011), de forma geral a alta atividade deste sistema é correlacionada com comportamentos passivos, como redução da locomoção e da agressividade (MALER; ELLIS, 1987; WINBERG; NILSSON, 1993) e a baixa atividade serotoninérgica resulta em altos níveis de agressividade (MCINTYRE; HEALY; SAARI, 1979; ELOFSOON *et al.*, 2000). A partir da relação do sistema serotoninérgico com o estresse social e o comportamento agressivo, era esperado que os animais sob interação agonística apresentassem baixa liberação de serotonina comparados aos animais isolados, o que inibiria a exibição de comportamentos passivos, portanto, promoveria a exibição de comportamentos agressivos. Estes padrões de resposta não foram observados. Quanto aos animais submetidos ao teste, obtivemos uma resposta inversa da esperada, com os animais isolados exibindo os menores níveis de serotonina em



relação aos animais em interação agonística. McDonald, Gonzalez e Sloman (2011) trabalhando com gulf toadfish (*Opsanus beta*) também não observaram a relação esperada entre alta atividade serotoninérgica e redução da agressão. Estes autores trataram os animais com fluoxetina, que é um inibidor da recaptação da serotonina e portanto, permite que a serotonina liberada permaneça disponível por mais tempo na fenda sináptica, aumentando sua atividade. Os autores esperavam que os animais dominantes tratados com fluoxetina apresentassem menos comportamentos agressivos que os dominantes tratados com o veículo. Os dados obtidos indicaram que os animais tratados com fluoxetina, ou seja, os animais com maior atividade serotoninérgica ficaram mais agressivos, diferentemente do esperado. Considerando os grupos que não fizeram o teste observamos que a concentração de serotonina dos animais sob interação agonística foi semelhante a dos animais que estavam isolados e que os animais mantidos no tanque estoque apresentaram níveis menores de serotonina que os animais em interação agonística. Este resultado indica que a condição de interação agonística foi mais potente em promover a liberação de serotonina do que a permanência em grupo. As respostas exibidas à condição de estresse social estão relacionadas com a estabilidade da hierarquia estabelecida, sendo que nas hierarquias estáveis as respostas ao estresse social são menos intensas quando comparadas as exibidas nas hierarquias instáveis (FOX *et al.*, 1997; OVERLI, 1999). A interação agonística não culminava com a definição das posições hierárquicas, ou seja, era instável se comparada à hierarquia estabelecida entre os animais que estavam em grupo. É possível que a maior liberação de serotonina nos animais em grupo Interação agonística, em comparação aos animais em grupo, esteja relacionada à instabilidade da interação promovida pelo espelho. Também observamos que a concentração de serotonina foi significativamente menor nos animais do grupo Isolado em comparação a todos os outros grupos, com isso, podemos inferir que a soma dos fatores isolamento mais teste é que determinou esta menor concentração de serotonina observada.

### 5.3 CORTISOL E NEUROTRANSMISSORES X APRENDIZAGEM/MEMÓRIA

Os grupos submetidos ao teste de aprendizagem apresentaram níveis de cortisol plasmático semelhantes a outros grupos, entre estes o grupo C. manipulação, considerado como sendo o grupo que nos forneceria os níveis basais das variáveis fisiológicas mensuradas. Neste caso não é possível afirmar que o cortisol tenha influenciado negativamente o desempenho dos animais no teste através de suas ações prejudiciais no SNC.

O sistema noradrenérgico tem importante papel na formação e consolidação da aprendizagem de longo através de seu papel na sinalização intracelular responsável pela estimulação da síntese protéica necessária para a LTP (KOBAYASHI; YASOSHIMA, 2001). A dopamina contribui para a formação da aprendizagem de longo prazo ao ter sua liberação estimulada por informações a cerca do estado motivacional durante o aprendizado de determinada tarefa, esta liberação contribui para a formação da LTP nos neurônios hipocampais (LISMAN; GRACE; DUZEL, 2011). O sistema serotoninérgico parece ser evolutivamente antigo e consideravelmente conservado, uma vez que já foi identificado em diversos grupos de vertebrados e apresenta similaridades entre eles, entre outros fatores, quanto à densa inervação no hipocampo ou no núcleo dorso lateral do telencéfalo feita pelas aferências dos núcleos da rafe. A presença desta inervação serotoninérgica sugere que a serotonina esteja envolvida na modulação das funções telencefálicas, como aprendizado e aprendizagem em mamíferos e em peixes (LILLESAAR, 2011). Gould (1999) revê as bases que apoiam a ideia de que a serotonina promove a neurogênese no giro dentado do hipocampo em ratos. Juntas, as ações da serotonina parecem contribuir positivamente para os processos cognitivos.

De forma geral, os neurotransmissores analisados então envolvidos positivamente com o desempenho de tarefas cognitivas. Portanto era esperado que os grupos que apresentassem alta atividade dos sistemas dopaminérgico e/ou noradrenérgico ou alta liberação serotoninérgica apresentassem melhor desempenho no teste cognitivo. Considerando apenas os animais que fizeram o teste, foi observada uma liberação e atividade significativamente menor de serotonina e noradrenalina, respectivamente, nos animais isolados em comparação aos que estavam sob interação social. Os dois grupos que realizaram o teste apresentaram turnover da dopamina semelhante e mais alto que os demais grupos.

Estes dados não apresentam a correlação positiva esperada entre a atividade destes sistemas de neurotransmissão com o desempenho positivo no teste.

## 6 CONCLUSÕES

Embora tenham sido feitas adaptações no protocolo de teste, alguns ajustes ainda precisam ser feitos para permitir o aprendizado dos animais, como o aumento no número de testes e um intervalo de tempo maior entre os testes. Ao encontrarmos o protocolo ideal, nos quais os animais sejam capazes de aprender a tarefa quando em condições de isolamento social, poderemos então submeter animais em interação agonística para observar seus efeitos sobre o aprendizado. para então podermos avaliar o efeito o estresse social sob o desempenho dos animais.

Os níveis de cortisol indicaram que, para a espécie utilizada, o isolamento prévio ao teste se constitui em uma estratégia adequada para reduzir o estresse.

Os níveis de cortisol, bem como a atividade e/ou liberação dos neurotransmissores apresentaram padrões diferentes de resposta frente às condições expostas, entretanto não foi encontrada relação com as condições de interação agonística, bem como com o desempenho no teste.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABBOTT, D. H. *et al.* Are subordinates always stressed? A comparative analysis of rank differences in cortisol levels among primates, **Hormones and Behavior**, v. 43, p. 67–82, 2003.
- ARTHUR, D.; LEVIN, E. D. Spatial and non-spatial visual discrimination learning in zebrafish (*Danio rerio*), **Animal Cognition**, v. 4, p. 125–131, 2001.
- BAENNINGER, R. Catechol amines and social relations in siamese fighting fish **Animal Behavior**, v. 16, p. 442-447, 1968.
- BECKER, S.; WOJTOWICZ, J. M. A model of hippocampal neurogenesis in memory and mood disorders, **TRENDS in Cognitive Sciences**, v.11, n. 2, p. 70-76, 2006.
- BLANCHARD, R. J.; MCKITTRICK, C. R.; BLANCHARD, D. C. Animal models of social stress: Effects on behavior and brain neurochemical systems, **Physiology & Behavior**, v. 73, p. 261-271, 2001.
- BLUMSTEIN, D. T. *et al.* Toward an integrative understanding of social behavior: new models and new opportunities, **Frontiers in Behavioral Neuroscience**, v. 4, p. 1-9, 2010.
- BRAITHWAITE, V. A. Cognitive Ability. In: SLOMAN, K. A.; WILSON, R. W.; BALSHINE, S. **Behaviour and physiology of fish**. California- EUA: Elsevier, 2005. p.1-29.
- BROWN, J.; WALKER, S. E.; STEINMAIN, K. **Endocrine manual for the reproductive assessment of domestic and non-domestics species**. Conservation and Research Center, Smithsonian's National Zoological Park, Front Royal, Virginia – EUA, 2004.
- CAMERON, H. A.; GOULD, E. Adult neurogenesis is regulated by adrenal steroids in the dentate gyrus, **Neuroscience**, v. 61, n. 2, p. 203-209, 1994.
- CAMERON, H. A.; MCEWEN, B. S.; GOULD, E. Regulation of Adult Neurogenesis by Excitatory Input and NMDA Receptor Activation in the Dentate Gyrus, **The Journal of Neuroscience**, v. 75, p. 4687-4692, 1995.

CHUNG, S. Appropriate maze methodology to study learning in fish, **Journal of Undergraduate Life Sciences**, v. 2, n. 1, p. 52-55, 2008.

COOLS, R.; D'ESPOSITO, M. Inverted-U-Shaped Dopamine Actions on Human Working Memory and Cognitive Control, **Biological Psychiatry**, v. 69, p. 113–125, 2011.

CRAFT, B. B.; VELKEY, A. J.; SZALDA-PETREE, A. Instrumental conditioning of choice behavior in male Siamese fighting fish (*Betta splendens*), **Behavioural Processes**, v. 63, p. 171–175, 2003.

CREEL, S. Social dominance and stress hormones, **TRENDS in Ecology & Evolution**, v.16, n.9, p. 491-497, 2001.

CREEL, S. *et al.* The ecology of stress: effects of the social environment, **Functional Ecology**, v. 27, p. 66–80, 2013.

DEAG, J. M. **O comportamento social dos animais**. São Paulo: Editora Pedagógica e Universitária Ltda.: Ed. da Universidade de São Paulo, 1981.

DOODY, J. S.; BURGHARDT, G. M.; DINETS, V. Breaking the Social–Non-social Dichotomy: A Role for Reptiles in Vertebrate Social Behavior Research? **Ethology**, v. 119. p. 95–103, 2012.

EHNINGER, D.; KEMPERMANN, G. Neurogenesis in the adult hippocampus, **Cell Tissue Research**, v. 331, p. 243–250, 2008.

ELOFSSON, U. O. E *et al.* Intermale Competition in Sexually Mature Arctic Charr: Effects on Brain Monoamines, Endocrine Stress Responses, Sex Hormone Levels, and Behavior, **General and Comparative Endocrinology**, v. 118, p. 450–460, 2000.

FERNANDES-DE-CASTILHO, M.; POTTINGER, T. G.; VOLPATO, G. L. Chronic social stress in rainbow trout: Does it promote physiological habituation? **General and Comparative Endocrinology**, v. 155, p. 141–147, 2008.

FILBY, A. L. *et al.* Physiological and health consequences of social status in zebrafish (*Danio rerio*), **Physiology & Behavior**, v. 101, p. 576–587, 2010.

FOX, H. E. *et al.* Stress and Dominance in a Social Fish, **Science**, v. 17, p. 6463–6469, 1997.

GOULD, E. *et al.* Adrenal hormones suppress cell division in the adult rat dentate gyrus, **The Journal of Neuroscience**, v. 9, p. 3642-3650, 1992.

GOULD, E. *et al.* Neurogenesis in the Dentate Gyrus of the Adult Tree Shrew Is Regulated by Psychosocial Stress and NMDA Receptor Activation, **Neuroscience**, v. 17, p. 2492–2498, 1997.

GOULD, E. *et al.* Proliferation of granule cell precursors in the dentate gyrus of adult monkeys is diminished by stress. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 95, p. 3168-3171, 1998.

GOULD, E. Serotonin and Hippocampal Neurogenesis, **Neuropsychopharmacology**, v. 21, p. 46–51, 1999.

GOYMANN, W. Social status does not predict corticosteroid levels in postdispersal male spotted hyenas, **Hormones and Behavior**, v. 43, p. 474–479, 2003.

GOYMANN, W.; WINGFIELD, J. C. Allostatic load, social status and stress hormones: the costs of social status matter, **ANIMAL BEHAVIOUR**, v. 67, p. 591-602, 2004.

HALLER, J.; MAKARA, G. B.; KRUK, M. R. Catecholaminergic Involvement in the Control of Aggression: Hormones, the Peripheral Sympathetic, and Central Noradrenergic Systems. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, v. 22, n. 1, p. 85–97, 1998.

JOHNSON, J. I.; WINBERG, S.; SLOMAN, K. A. Social Interactions. In: SLOMAN, K. A.; WILSON, R. D.; BALSHINE, S. **Behaviour and physiology of fish**. California-EUA: Elsevier, 2005, p. 151-183.

KANETO, H. Learning/memory processes under stress conditions, **Behavioural Brain Research**, v. 83, p. 71-74, 1997.

KOBAYASHI, K.; YASOSHIMA, Y. The Central Noradrenaline System and Memory Consolidation, **Neuroscientist**, v. 7, p. 371-376 , 2001.

LEVIN, E. D. *et al.* Chlorpyrifos exposure of developing zebrafish: effects on survival and long-term effects on response latency and spatial discrimination, **Neurotoxicology and Teratology**, v. 25, p. 51–57, 2003.

LILLESAAR, C. The serotonergic system in fish, **Journal of Chemical Neuroanatomy**, v. 41, p. 294–308, 2011.

LISMAN, J.; GRACE, A. A.; DUZEL, E. A neoHebbian framework for episodic memory: role of dopamine-dependent late LTP, **Neurosciences**, v. 34, n.10, p. 536-547, 2011.

LORENZI, V. *et al.* Serotonin, social status and sex change in the bluebanded goby (*Lythrypnus dalli*), **Physiology & Behavior**, v. 97, p. 476–483, 2009.

LUINE *et al.* Repeated stress causes reversible impairments of spatial memory performance, **Brain Research**, v. 639, p. 167-170, 1994.

MAGARINOS, A. M.; MCEWEN, B. S. Stress-induced hippocampal atrophy of apical dendrites of CA3C neurons: comparison of stressors, **Neuroscience**, v. 69, p. 83-88, 1995a.

MAGARINOS, A. M.; MCEWEN, B. S. Stress-induced atrophy of apical dendrites of hippocampal CA3C neurons: involvement of glucocorticoid secretion and excitatory Amino acid receptors, **Neuroscience**, v. 69, p. 89-98, 1995b.

MAGARINOS, A. M. *et al.* Chronic Psychosocial Stress Causes Apical Dendritic Atrophy of Hippocampal CA3 Pyramidal Neurons in Subordinate Tree Shrews, **The Journal of Neuroscience**, v. 76, p. 3534-3540, 1996.

MALENKA, R. C.; NICOLL, R. A. Long-Term Potentiation--A Decade of Progress? **Science**, v. 285, p. 1870-1874, 1999.

MALER, L.; ELLIS, W. G. Inter-male aggressive signals in weakly electric fish are modulated by monoamines, **Behavioural Brain Research**, v. 25, p. 75-81, 1987.

MCDONALD, M. D.; GONZALEZ, A.; SLOMAN, K. A. Higher levels of aggression are observed in socially dominant toadfish treated with the selective serotonin reuptake inhibitor, fluoxetine, **Comparative Biochemistry and Physiology**, v. 153, p. 107–112, 2011.



MCINTYRE, D. C.; HEALY, L. M.; SAARI, M. Intraspecies Aggression and Monoamine Levels in Rainbow Trout (*Salmo gairdneri*) fingerlings, **Behavioral and Neural Biology**, v. 25, p. 90-98, 1979.

MEDEIROS, L. R.; MCDONALD, M. D. Cortisol-mediated downregulation of the serotonin 1A receptor subtype in the Gulf toadfish, *Opsanus beta*, **Comparative Biochemistry and Physiology**, v. 164, p. 612–621, 2013.

MERIGUE, G. K. F. Efeito da Cor do Ambiente sobre o Estresse Social em Tilápias do Nilo (*Oreochromis niloticus*), **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.33, n.4, p.828-837, 2004.

OHL, F.; FUCHS, E. Memory performance in tree shrews: effects of stressful experiences, **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, v. 23, p. 319–323, 1998.

OHL, F.; FUCHS, E. Differential effects of chronic stress on memory processes in the tree shrews, **Cognitive Brain Research**, v. 7, p. 379–387, 1999.

OHL, F. *et al.* Effect of chronic psychosocial stress and long-term cortisol treatment on hippocampus-mediated memory and hippocampal volume: a pilot-study in tree shrews, **Psychoneuroendocrinology**, v. 25, p. 357–363, 2000.

OVERLI *et al.* Dominance hierarchies in Arctic charr, *Salvelinus alpinus* L.: differential cortisol profiles of dominant and subordinate individuals after handling stress, **Aquaculture Research**, v. 30, p. 259-264, 1999.

PAVLIDES, C. *et al.* Role of adrenal steroid mineralocorticoid and glucocorticoid receptors in long-term potentiation in the CA1 field of hippocampal slices, **Brain Research**, v. 738, p. 229-235, 1996.

SAPOLSKY, R. M. The Influence of Social Hierarchy on Primate Health, **Science**, v. 308, p. 648-652, 2005.

SCHWABE, L. *et al.* Stress effects on memory: An update and integration, **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, v. 36, p. 1740–1749, 2012.

SLOMAN, K. A.; MONTPETIT, C. J.; GILMOUR, K. M. Modulation of catecholamine release and cortisol secretion by social interactions in the rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. **General and Comparative Endocrinology**, v. 127, p. 136–146, 2002.

SLOMAN, K. A. *et al.* Socially-mediated differences in brain monoamines in rainbow trout: effects of trace metal contaminants, **Aquatic Toxicology**, v. 71, p. 237–247, 2005.

SORENSEN, C. *et al.* Cortisol reduces cell proliferation in the telencephalon of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*), **Physiology & Behavior**, v. 102, p. 518–523, 2011.

STANFORD, S. C. Central noradrenergic neurones and stress, **Pharmac .Ther.**, v. 68, n. 2, p. 291-342, 1995.

SURI, D.; VAIDYA, V. A. Glucocorticoid regulation of brain-derived neurotrophic factor: relevance to hippocampal structural and functional plasticity, **Neuroscience**, v. 239, p. 196–213, 2013.

WERSINGER, S. R.; MARTIN, L. B. Optimization of Laboratory Conditions for the Study of Social Behavior, **Oxford Journals ILAR Journal**, v. 50, I. 1, p. 64-80, 2009.

WINBERG, S.; NILSSON, G. E. Roles of brain monoamine neurotransmitters in agonistic behaviour and stress reactions, with particular reference to fish, **Comparative Biochemistry and Physiology**, v. 106, n. 3, p. 597-614, 1993.

WINOCUR, G. *et al.* Adult hippocampal neurogenesis and memory interference, **Behavioural Brain Research**, v. 227, p. 464–469, 2012.

YAMADA, K.; MCEWEN, B. S.; PAVLIDES, C. Site and time dependent effects of acute stress on hippocampal long-term potentiation in freely behaving rats, **Experimental Brain Research**, v. 152, p. 52–59, 2003.

ZAGRODZKA, J. Responsiveness to Environmental Stimuli After Destruction of the Locus Coeruleus Noradrenergic System: A review, **Homan psychopharmacology**, v. 10, p. 467-473, 1995.

ZUPANC, G. K. H. *et al.* Proliferation, migration, neuronal differentiation, and long-term survival of new cells in the adult zebrafish brain, **Journal of Comparative Neurology**, v. 488, p. 290-319, 2005.

ZUPANC, G. K. H. Adult neurogenesis and neuronal regeneration in the brain of teleost fish, **Journal of Physiology**, v. 102, p. 357–373, 2008.

