

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

LAURA BATISTA

**PAPEL DO ENRIQUECIMENTO AMBIENTAL NA COGNIÇÃO DE
TILÁPIA-DO-NILO (*Oreochromis niloticus*)**

CURITIBA

2010

LAURA BATISTA

**PAPEL DO ENRIQUECIMENTO AMBIENTAL NA COGNIÇÃO DE
TILÁPIA-DO-NILO (*Oreochromis niloticus*)**

Monografia apresentada ao Departamento de Fisiologia, Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial para obtenção do título de bacharel em Ciências Biológicas.

Orientador: Prof^a. Dr^a. Marisa Fernandes de Castilho

CURITIBA

2010

Ao meu avô Nêno (*in memoriam*)

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, que estiveram sempre ao meu lado, desde o vestibular até a conclusão deste trabalho, principalmente pelo patrocínio dos aquários e pela companhia durante as idas ao laboratório duas vezes ao dia nos finais de semana. A minha irmã Luiza e ao Leko pelos bons momentos juntos e pelo incentivo. Aos meus tios Eloir e Eliete pela ajuda com os aquários e pelo interesse que sempre demonstraram pelo meu trabalho.

Ao Bruno que, às vezes, confia mais no meu potencial do que eu mesma e que também me fez companhia algumas vezes no laboratório durante os finais de semana. Aos amigos da biologia, que estiveram comigo nestes quatro anos e que fizeram destes, os melhores anos da minha vida.

Á Juliana Albuquerque pela valiosa idéia para resolver o problema dos canos de aeração, por ter alimentado os peixes quando eu viajei e pelas discussões sobre o trabalho.

A Marisa por te me aceito em seu laboratório, pela amizade, pela orientação e por todos os ensinamentos, sejam eles de fisiologia ou não.

Quando uma criatura humana desperta para um grande sonho
e sobre ele lança toda a força de sua alma,
todo o universo conspira a seu favor.
(Goethe)

RESUMO

O objetivo do presente estudo foi testar o efeito do enriquecimento ambiental na memória e no aprendizado de tilápias-do-Nilo (*Oreochromis niloticus*). Tilápias pós-larva (quatro grupos) foram mantidos durante seis meses nas condições: a) dois grupos com enriquecimento (cascalho, plantas e abrigos, além dos equipamentos de controle da água) b) dois grupos sem enriquecimento (apenas com equipamentos para manutenção das condições da água). Após esse período, cinco animais de cada aquário foram submetidos a um tipo de teste cognitivo. O teste de associação espaço-temporal pretendeu avaliar a capacidade dos animais em associar determinado local com o horário em que o alimento estaria disponível neste local, através da frequência de visitação do local correto no momento em que haveria disponibilização de alimento neste local. O teste de memória associativa objetivou avaliar a capacidade dos animais em associar pistas visuais ao local de alimentação para prever onde ocorreria a oferta de alimento. No teste de associação espaço-temporal nenhum dos grupos aprendeu a associação proposta, mas o grupo com enriquecimento apresentou mudança comportamental sugestiva de aprendizado. No teste de memória associativa o grupo com enriquecimento apresentou variação no desempenho entre as diferentes fases do teste. Estes resultados sugerem algum tipo de interação entre o enriquecimento ambiental e melhora na memória e no aprendizado. Falhas metodológicas podem ter influenciado nos testes mascarando o possível efeito benéfico do enriquecimento ambiental nas variáveis avaliadas.

Palavras-chave: aprendizado, memória, *Oreochromis niloticus*.

ABSTRACT

This study aimed to test the effect of environmental enrichment on memory and learning in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). Tilapia post-larvae (four groups) were maintained for six months under the conditions: a) two groups in aquariums with environmental enrichment (gravel, plants, shelters and equipment for maintenance of water conditions) b) two groups without environmental enrichment (with only the equipment for maintenance of water conditions). After this period, five animals from each tank were subjected to a type of cognitive test. The test of spatial-temporal association aimed to assess the ability of animals to associate a certain place with the time that the food would be available at this site, by the frequency of visitation of the right location at the time that there would be food available at this site. The associative memory test was aimed to evaluate the ability of animals to associate visual cues to the feeding site as they should be able to predict the supply of food. In the test of spatial-temporal association none of the groups learned the association proposed, but the group with environmental enrichment showed a behavioral change that is suggestive of learning. In the test of associative memory the group with environmental enrichment showed variations in performance between the different phases of the test. These results suggest some interaction between the environmental enrichment and improvement in memory and learning. Methodological flaws may have influenced the results masking the possible beneficial effect of environmental enrichment in the variables studied.

Palavras-chave: learning, memory, *Oreochromis niloticus*.

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO.....	1
1.2	Objetivos.....	3
1.2.1	Objetivo geral.....	3
1.2.2	Objetivos específicos.....	3
2.	MATERIAL E MÉTODOS.....	4
2.1	Local de trabalho.....	4
2.2	Material biológico.....	4
2.3	Testes.....	4
2.3.1	ETAPA I.....	4
2.3.1.1	Sem enriquecimento.....	5
2.3.1.2	Com enriquecimento.....	5
2.3.2	ETAPA II.....	5
2.3.2.1	Associação espaço-temporal.....	6
2.3.2.2	Memória associativa.....	8
3.	RESULTADOS.....	12
3.1	Associação espaço temporal.....	12
3.2	Memória associativa.....	13
4.	DISCUSSÃO.....	16
4.1	Associação espaço-temporal.....	16
4.2	Memória associativa.....	19
5.	CONCLUSÕES.....	21
6.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	22

1 INTRODUÇÃO

Para PEDRAZZANI *et al.* (2007) os peixes teleósteos, apesar de apresentarem diferenças em alguns aspectos da estrutura cerebral se comparados aos tetrápodos, possuem similaridades funcionais e habilidades cognitivas sugestivas de consciência. Os mesmos autores afirmam que dados anatômicos, fisiológicos, comportamentais, evolutivos e farmacológicos evidenciam que os peixes experimentam sentimentos como dor e medo de maneira similar aos demais vertebrados. Isso sugere que os peixes têm a capacidade de sofrer e que, portanto, estes animais devem ser incluídos nas considerações éticas acerca de não serem submetidos a sofrimento (BRAITHWAITE, 2010). Para VOLPATO *et al.* (2007) a ciência ainda não é capaz de determinar objetivamente se os peixes são ou não animais sencientes, ainda assim estes autores sugerem que os peixes possam sentir algum tipo de desconforto quando não são tratados corretamente e propõem uma posição de precaução ética segundo a qual, na ausência de evidências contrárias, os peixes são sencientes.

As principais atividades humanas com implicações para o bem-estar dos peixes incluem a sua captura em pesca comercial e desportiva, produção intensiva em aquicultura, utilização como animais de companhia, manutenção em aquários públicos para educação ambiental e recreação, degradação ambiental antropogênica e sua utilização na investigação científica (OLIVEIRA & GALHARDO, 2007).

As condições de alojamento de peixes utilizados em laboratórios de pesquisa são pobres e podem restringir ou alterar o comportamento dos animais, comprometendo seu bem-estar e a validade dos dados obtidos nas pesquisas (BRYDGES & BRAITHWAITE 2009).

Uma forma de aumentar o nível de bem-estar de animais cativos, e evitar que ocorram alterações comportamentais desencadeadas pela pobreza dos ambientes em que os animais são mantidos é através do enriquecimento ambiental. De acordo com BOERE (2001) o enriquecimento ambiental é um conjunto de técnicas que modificam o ambiente, resultando em uma melhora na qualidade de vida dos animais, ao satisfazer as suas necessidades comportamentais.

Diversos autores já encontraram interferência positiva de alguma forma de enriquecimento em diferentes comportamentos de animais. BROWN *et al.* (2003)

encontraram que o enriquecimento ambiental com plantas, pedras e objetos novos aliado a prévia exposição a presas vivas promove melhora no desempenho do forrageamento (reduzindo o período de latência para alimentação) em salmão do Atlântico. Trabalhando com filhotes de ratos, LEGGIO *et al.* (2005) encontraram que animais que se desenvolveram em grupos, em gaiolas com brinquedos obtiveram melhores resultados no labirinto radial e no labirinto aquático de Morris que animais criados aos pares em gaiolas sem objetos. WOODCOCK & RICHARDSON (2000) encontraram que filhotes de ratos expostos por uma hora ao dia a estímulos sensoriais (auditório, visual, tátil e olfatório) até o 21º dia de vida e então mantidos em gaiolas com vários objetos cuja posição era modificada diariamente formam representações mais complexas mais rapidamente que animais que não tiveram nenhum tipo de enriquecimento. DE JONG *et al.* (2000) trabalhando com porcos encontraram que animais mantidos em ambientes sem enriquecimento apresentaram comprometimento da memória de longo prazo .

Segundo SALE *et al.* (2009) foram Rosenzweig e colaboradores (1966 e 1969) que introduziram o enriquecimento ambiental como um protocolo experimental direcionado especificamente para investigar a influência do ambiente no cérebro e no comportamento, mostrando que a morfologia, a química e a fisiologia do cérebro podem ser consideravelmente alteradas pela modificação da qualidade e intensidade da estimulação ambiental. BROOM (2010) complementa as características que podem ser influenciadas pelo ambiente, citando o aprendizado.

BRAITHWAITE (2005) afirma que 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 sensoriais (percepção), como esta informação é aprendida e como se lembram da experiência através da evocação (memória).

KIHSLINGER & NEVITT (2006) afirmam que uma vez que o cérebro dos peixes cresce continuamente ao longo da vida, estes animais podem ser particularmente responsivos as condições ambientais que experimentam ao longo de seu desenvolvimento.

Segundo EL-SAYED (2006) a tilápia-do-Nilo vem sendo amplamente utilizada em aquicultura por apresentar altas taxas de crescimento, adaptabilidade a vários tipos de condições ambientais, habilidade de crescer e se reproduzir em cativeiro e alimentação onívora. É possível dizer que os mesmos motivos levam a ampla

utilização desta espécie em pesquisas científicas como modelo para vários parâmetros fisiológicos, comportamentais, entre outros.

1.2 OBJETIVOS

1.2.1 OBJETIVO GERAL

Testar o efeito do enriquecimento ambiental no aprendizado e na memória tilápia-do-Nilo (*Oreochromis niloticus*).

1.2. 2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Verificar o papel do enriquecimento ambiental nos comportamentos de associação espaço-temporal e de memória associativa.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 LOCAL DE TRABALHO

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 procedimentos realizados no trabalho foram aprovados pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal (CEEA) do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná (certificado nº 478).

2.2 ANIMAIS

Alevinos de tilápia-do-Nilo (*Oreochromis niloticus*) foram adquiridos na Granja Piracema de Piscicultura no município de Maringá, em fase larval de flexão de acordo com as características relatadas por NAKATANI *et al.* (2001).

2.3 TESTES

2.3.1 ETAPA I

Os peixes foram separados em quatro grupos com aproximadamente 60 indivíduos cada um. Os animais foram mantidos no laboratório durante seis meses sob ciclo de luz de 12 horas (com o período de luz sendo das 7:00 às 19:00h - controlado por temporizador) e a temperatura ambiente foi mantida em 28°C. Os peixes permaneceram em aquários de vidro com 50 cm de comprimento, 30 cm de largura e 35 cm de altura, preenchidos com 45 litros de água. Os aquários foram equipados com um filtro, aeração contínua através de bomba mecânica e a temperatura da água foi mantida em $25 \pm 2,61^{\circ}\text{C}$ por meio de um termostato e um aquecedor. Os aquários foram dispostos lado a lado no laboratório a fim de igualar a incidência luminosa sob eles. Todos os aquários foram revestidos externamente por cartolina para isolamento visual. VOLPATO & BARRETO (2001) observaram que a coloração azul previne o estresse em tilápias-do-Nilo, portanto as cartolinas utilizadas para o isolamento visual foram azuis. Os aquários foram limpos uma vez

por semana e um terço da água foi trocado. A alimentação foi à base de ração extrusada (37,5% de proteína; laudo de análise química do Laboratório de Nutrição Animal da Universidade Federal do Paraná nº 100920016), *ad libitum*, fornecida uma vez ao dia em horários variados. Os níveis de amônia (0,010ppm) e nitrito (0,125ppm) e o pH (6,25) foram mantidos estáveis nos aquários de manutenção.

2.3.1.1 SEM ENRIQUECIMENTO – Dois grupos permaneceram em aquários sem enriquecimento (Sem enriquecimento 1 – SE1; Sem enriquecimento 2 – SE2). Estes aquários apresentaram apenas os equipamentos necessários para limpeza, aeração e manutenção da temperatura.

2.3.1.2 COM ENRIQUECIMENTO - Dois grupos permaneceram em aquários enriquecidos (Com enriquecimento 1 – CE1; Com enriquecimento 2 – CE2). Tais aquários apresentaram além dos equipamentos para limpeza, aeração e manutenção da temperatura, cascalho sob o fundo, vegetação (um exemplar do gênero *Echinodorus*), abrigos compostos por: uma conexão de PVC rígido na cor marrom em T, uma conexão de PVC rígido na cor marrom em cotovelo, meio tijolo de quatro furos e dois pedaços de madeira próprios para aquário.

2.3.2 ETAPA II

Os testes descritos abaixo foram realizados após os peixes terem passado seis meses no laboratório em seus respectivos aquários nas condições descritas acima. Os testes foram realizados na mesma sala em que foram mantidos na ETAPA I, e nas mesmas condições de temperatura e luminosidade da fase anterior. Os níveis de amônia (0,002ppm) e nitrito (0,81ppm) e o pH (6,5) foram mantidos estáveis.

Cada teste utilizou 20 peixes (escolhidos por tamanho), sendo cinco provenientes de cada aquário de manutenção. Os 20 indivíduos de cada teste foram isolados em aquários revestidos externamente, como os aquários de manutenção, por cartolina azul. Durante todo o período em que os peixes estiveram isolados nos aquários de teste, estes foram mantidos com aeração constante. Metade dos aquários possuía o aerador na extremidade do compartimento da direita e a outra metade na extremidade do compartimento da esquerda. A troca de água também foi

feita uma vez por semana, como na fase anterior. Nesta fase 90% da água era trocada, diferentemente do que ocorreu na ETAPA I, na qual aproximadamente 75% da água era trocada. Isso se deveu a rápida piora na condição da água devido à inexistência de filtros nos aquários usados na ETAPA II.

Nos dois testes realizados no presente trabalho a oferta de alimento foi utilizada como estímulo ao aprendizado, uma vez que REEBB (1999) considera este um estímulo melhor do que a presença de um predador. Este autor, utilizando grupos de peixes *Galaxias maculatus*, evidenciou a presença da associação entre local e período do dia, após 14 dias de treinamentos, apenas quando o estímulo era a alimentação e não quando era o risco de predação ou alimentação associada ao risco de predação. O autor afirma que a alimentação é um estímulo melhor para este tipo de avaliação, uma vez que o risco de predação pode ser evitado utilizando mecanismos inatos em detrimento de associações aprendidas.

Apesar de a competição pelo alimento com co-específicos ser um estímulo relevante neste tipo de teste, os indivíduos foram testados individualmente, uma vez que a tilápia-do-Nilo é uma espécie agressiva e territorialista e que por isso, quando é testada em grupos, o indivíduo dominante tem maior acesso ao alimento e os indivíduos de baixo nível social têm acesso dificultado ao alimento ou podem ser vítimas de canibalismo (DELICIO *et al.* 2006a). BARRETO *et al.* (2006) ressalta que quando testados em grupos, os peixes podem estar no lado correto apenas por seguir o indivíduo dominante e não por terem aprendido a associação entre local e horário de alimentação.

2.3.2.1 ASSOCIAÇÃO ESPAÇO-TEMPORAL

A metodologia utilizada foi adaptada de DELICIO *et al.* (2006a), BARRETO *et al.* (2006) e DELICIO & BARRETO (2008). Segundo DELICIO *et al.* (2006a) este teste refere-se à habilidade de associar determinados locais a períodos do dia específicos. Em geral tal fenômeno consiste em visitar um local no período em que haverá alimento disponível ali.

Vinte aquários com peixes isolados foram dispostos em fileiras sob duas bancadas paralelas (igualando a incidência luminosa entre eles). Os aquários de teste (Figura 1) possuíam 45 cm de comprimento, 11 cm de largura e 15 cm de altura, com 14 cm de coluna d'água e eram divididos em três compartimentos iguais

(15 cm de comprimento) por divisórias opacas. Nessas divisórias havia uma janela com 3 cm de diâmetro que permitia que os animais circulassem entre os três compartimentos sem que tivessem acesso visual entre eles.

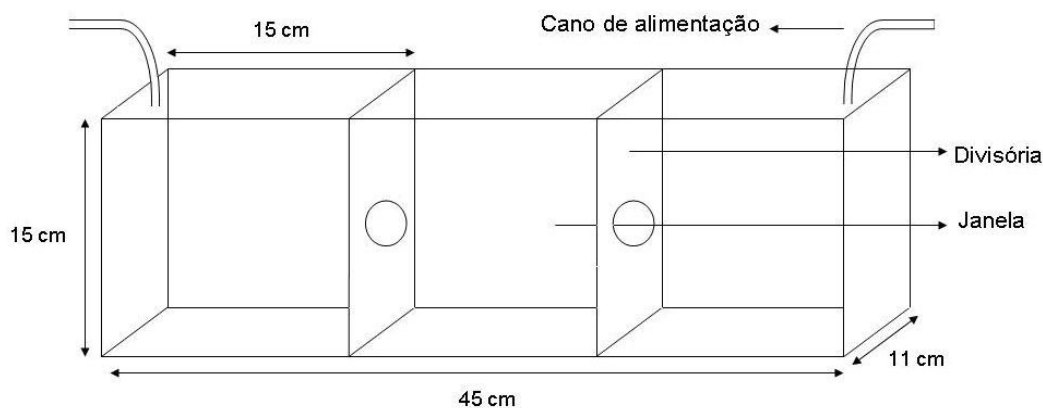


Figura 1: Aquário utilizado no teste de associação entre local e hora da alimentação em vista frontal.

Os aquários foram envoltos por uma cortina preta para impedir que os animais vissem o pesquisador nos momentos em que fossem alimentados, e utilizassem esta pista para saber em qual lado ocorreria a deposição do alimento. Canos de plástico flexível de 1 cm de diâmetro foram dispostos nos dois compartimentos laterais de cada aquário, através dos quais foi introduzido o alimento.

Inicialmente os indivíduos isolados foram mantidos por sete dias nos aquários de teste para aclimatação, recebendo comida uma vez ao dia, *ad libitum*, em horários variados e no compartimento do meio. Após este período os animais passaram uma semana em jejum. O período de jejum atua como um estímulo ao aprendizado e como relatado por DELICIO & BARRETO (2008), para tilápia-do-Nilo, a restrição alimentar antes de testes como este é relevante no desempenho. Após tal período, os animais foram alimentados (entre 0,5% e 1% da massa corporal) duas vezes ao dia, em um dos lados do aquário pela manhã (9:00) e no lado oposto, pela tarde (17:00). STICKNEY (1994) considera esta porcentagem de alimento um regime restritivo para a espécie em questão, o que também poderia atuar como um estímulo ao aprendizado. O alimento restante era removido após uma hora. Metade dos aquários recebeu alimento pela manhã do lado esquerdo e pela tarde do lado direito e a outra metade teve os lados invertidos em relação ao horário, esta distribuição foi aleatória e se manteve igual ao longo de todo o teste. Este

procedimento ocorreu por 30 dias consecutivos sendo que ao 10º, 20º e 30º dias os animais não foram alimentados e sua localização foi registrada através da filmagem dos aquários. Foi identificada a posição de cada animal a cada 30 segundos durante 30 minutos (15 minutos antes e 15 minutos após o horário de alimentação: das 8:45 às 9:15 e das 16:45 às 17:15) totalizando 61 registros por animal por período de filmagem. A aprendizagem da associação entre o local e o período da alimentação foi inferida a partir da média do número de registros feitos dos animais provenientes das duas condições de enriquecimento. Foi considerado como lado correto aquele em que seria oferecida a alimentação num determinado momento do teste, este lado recebeu no nome do respectivo período do dia (manhã/tarde).

O teste de associação espaço-temporal visa comparar a capacidade dos animais criados em ambiente com e sem enriquecimento ambiental em associar determinado local com o horário em que o alimento estará disponível neste local, através da frequência de visitação do local correto no momento em que haverá disponibilização de alimento neste local.

2.3.2.2 MEMÓRIA ASSOCIATIVA

A metodologia utilizada neste teste foi adaptada de BRYDGES *et al.* (2008) e BRYDGES & BRAITHWAITE (2009).

Os aquários de teste (Figura 2) possuíam 25 cm de comprimento, 20 cm de altura e 20 cm de largura, com 18 cm de coluna d'água, e eram divididos em três compartimentos. Os dois compartimentos menores foram os locais onde foi fornecida a alimentação. As divisórias eram opacas e duas delas possuíam janelas com 3 cm de diâmetro que permitiram que o animal circulasse entre os compartimentos de alimentação e o compartimento maior a qualquer momento, exceto quando estava sendo fornecida a alimentação.

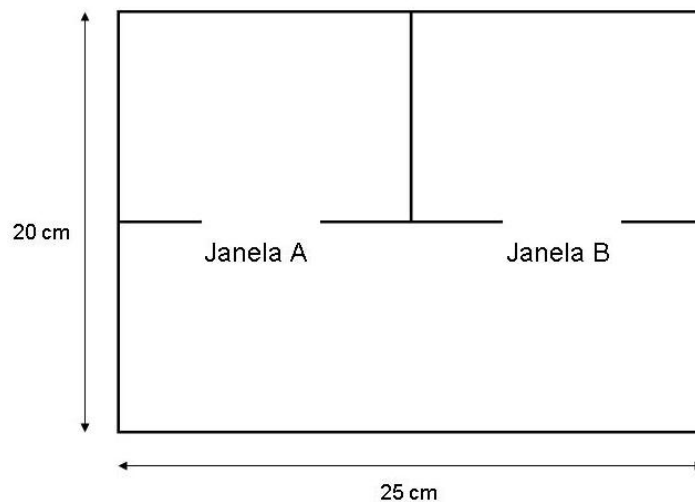


Figura 2: Aquário utilizado nos teste de aprendizado e memória em vista superior

Cada janela estava em uma parede branca ou preta que servia como pista para o animal distinguir os lados. Metade dos indivíduos teve a janela **A** em uma parede branca e a janela **B** em uma parede preta, a outra metade dos indivíduos teve as cores invertidas em relação aos lados (Figura 3) a fim de controlar a possibilidade de a associação estar relacionada à determinada cor.

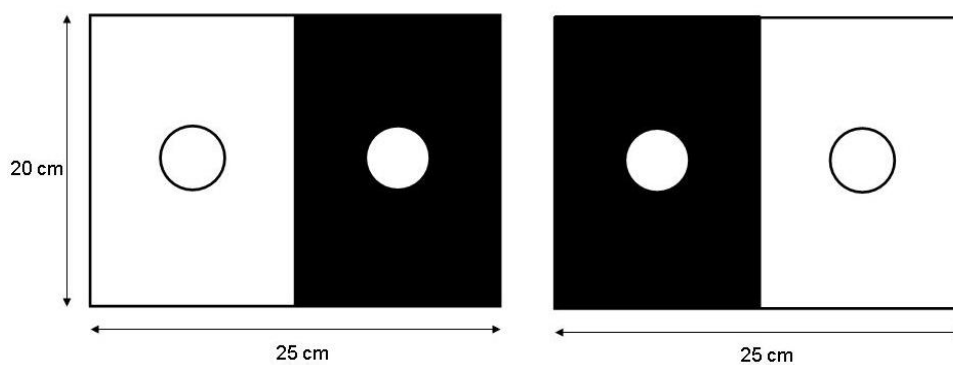


Figura 3: Aquário utilizado nos teste de aprendizado e memória em vista frontal mostrando as combinações de cores das paredes onde se localizavam as janelas.

O alimento fornecido tinha a mesma composição daquele fornecido na ETAPA I, porém ele foi umidificado, o que garantiu que ele afundasse imediatamente após ser oferecido. Antes de fornecer o alimento, as janelas eram simultaneamente bloqueadas com placas de PVC das respectivas cores das paredes. O alimento era manualmente depositado em apenas um dos compartimentos de alimentação. Para que a deposição manual do alimento no compartimento certo não fosse utilizada como pista para os animais de qual lado estava recebendo o alimento, a deposição

do mesmo se dava como segue: as duas mãos eram levadas juntas, uma sob cada compartimento, sendo que apenas uma delas continha a ração que era depositada no compartimento correto, então ambas as mãos eram retiradas simultaneamente. Após a deposição da ração, um minuto era aguardado antes que as janelas fossem desbloqueadas. Para padronizar a quantidade de ração recebida pelos animais foi fornecido entre 0,5 e 1% da massa corporal por período de alimentação. Cada período de alimentação foi gravado por câmeras de vídeo e através das filmagens foi registrado: a) em qual compartimento de alimentação os peixes entraram primeiro e b) o tempo despendido até entrarem no lado onde foi depositada a comida (lado correto). Quando o animal não entrava primeiro no lado correto continuou-se a observar seu comportamento até que ele tivesse entrado no lado correto ou até que 10 minutos tivessem passado. Este teste ocorreu em três fases, sendo elas:

1. Fase de Aquisição 1 (Fase 1)

Nesta fase a alimentação foi fornecida duas vezes ao dia, do mesmo lado do aquário, até que o animal entrasse primeiramente no lado correto (onde havia sido depositada a ração) nove em 10 vezes ou até que 45 tentativas tivessem transcorrido. Neste caso, foi assumido que o animal não foi capaz de aprender o teste.

2. Fase de Aquisição 2 (Fase 2)

Após ser atingida a marca de acertos estabelecida na Fase 1, os animais foram alimentados duas vezes ao dia no lado oposto ao lado que foram alimentados na fase anterior até que atingissem o mesmo critério (nove acertos em 10 tentativas) ou até que 45 tentativas tivessem transcorrido. Neste caso também foi assumido que o animal não foi capaz de aprender o teste.

3. Fase de retorno ao lado anterior (Fase 3)

Após atingir o critério estabelecido na Fase 2, as divisórias foram removidas e os animais permaneceram por sete dias sendo alimentados uma vez ao dia no local que corresponderia ao compartimento maior. Após uma semana as divisórias foram recolocadas e um teste foi feito para verificar se os animais

entrariam no compartimento em que haviam sido treinados a receber o alimento na Fase 2.

O teste de memória associativa objetiva comparar a capacidade dos animais criados em ambiente com e sem enriquecimento ambiental em associar pistas visuais ao local de alimentação para prever onde ocorrerá a oferta de alimento.

3 RESULTADOS

3.1 ASSOCIAÇÃO ESPAÇO-TEMPORAL

Os resultados obtidos foram comparados entre os animais provenientes dos dois aquários com o mesmo tipo de ambiente - réplicas (SE1 e SE2; CE1 e CE2) através do Teste T e todos apresentaram $p > 0,05$, mostrando que não houve diferença significativa e por isso os dados foram agrupados em: Com Enriquecimento (CE) e Sem Enriquecimento (SE). A Figura 4 mostra os resultados obtidos.

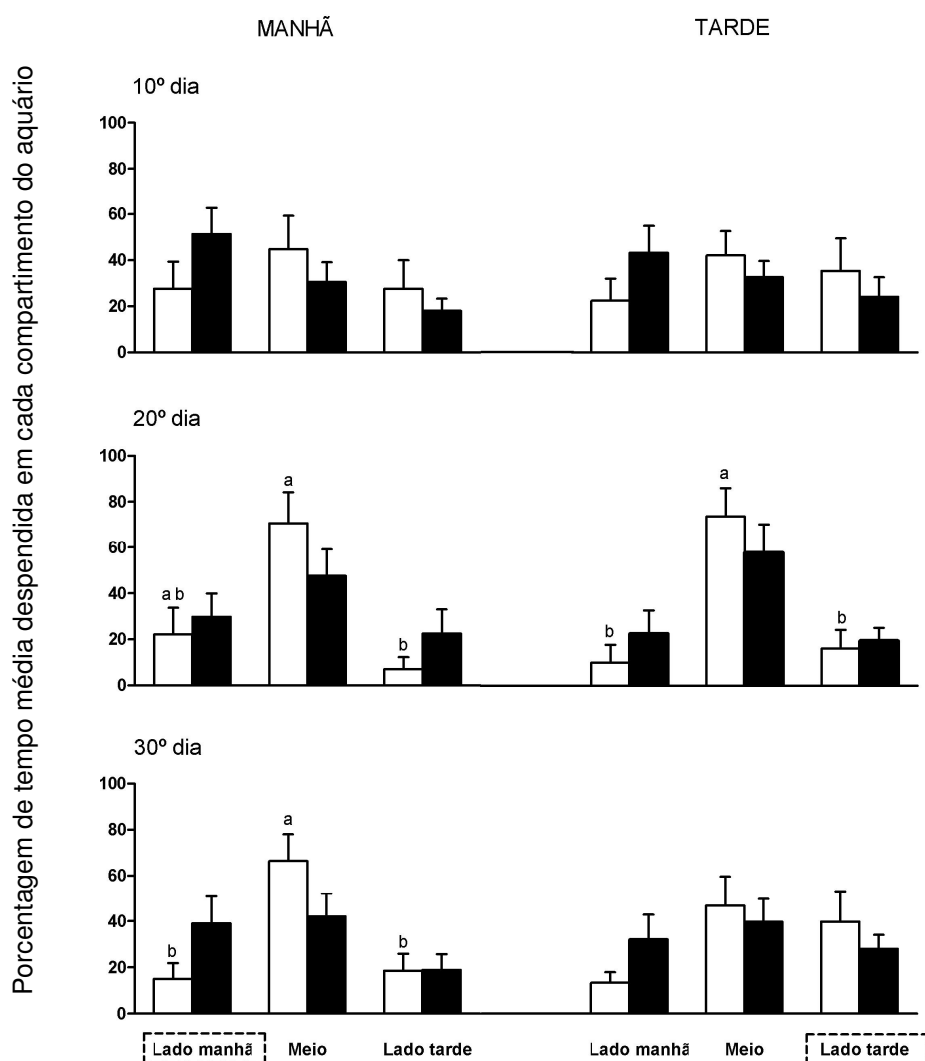


Figura 4: Média \pm EP da porcentagem de tempo despendido em cada compartimento pela tilápia-do-Nilo em cada período de observação (8:45 às 9:15; 16:45 às 17:15) de cada dia de teste (10º, 20º, 30º). Compartimentos: Lado manhã (lado em que o alimento era ofertado no período da manhã), M (compartimento do meio) e Lado tarde (lado em que o alimento era ofertado no período da tarde). Compartimentos em destaque: locais corretos para cada período do dia. Grupos: CE (□) e SE (■). Dentro de cada dia/período de teste: letras diferentes representam diferença significativa entre as colunas ($p < 0,05$), letras iguais representam que não houve diferença significativa.

Os dados dos dois grupos (CE e SE) foram comparados para cada dia e período utilizando Two-way ANOVA e nenhuma diferença significativa no desempenho dos grupos foi encontrada.

Utilizando o Teste T pareado não foi encontrada diferença significativa na porcentagem de tempo despendido pelo grupo SE em cada um dos três compartimentos do aquário em nenhum dos dias e períodos de teste. O grupo CE também não apresentou diferença na porcentagem de tempo despendido em cada um dos três compartimentos do aquário nos dois períodos do 10^a dia e no período da tarde do 30^o dia. Os animais provenientes do grupo CE passaram a apresentar um padrão comportamental diferenciado no período da manhã do 20^o dia quando o grupo permaneceu significativamente mais no compartimento do meio que no compartimento da tarde ($p=0,0159$). No 20^o dia pela tarde o grupo CE permaneceu mais no compartimento do meio que nos outros dois (lado manhã/meio: $p=0,0219$; lado tarde/meio: $p=0,0318$), sendo que a permanência nos compartimentos laterais foi igual. No 30^o dia no período da manhã o grupo CE também permaneceu mais no compartimento do meio que nos compartimentos laterais, que também tiveram tempo de permanência semelhante (lado manhã/meio: $p=0,0332$; lado tarde/meio $p=0,0456$).

Nem o período de jejum e nem a restrição alimentar promoveram redução de peso dos animais ao longo do teste. Antes do início da ETAPA II os animais apresentaram peso médio de $8,57 \pm 2,97g$, após o jejum o valor aumentou para $9,13 \pm 2,95g$ e após o teste (período posterior a restrição alimentar) também aumentou para $10,48 \pm 3,59g$. Os animais apresentaram comprimento total médio de $8,09 \pm 0,95$ cm no dia anterior ao início dos testes.

3.2 MEMÓRIA ASSOCIATIVA

A média do número de tentativas utilizadas pelos animais de cada grupo para atingir o critério de acerto foi comparado entre as réplicas (CE1 e CE2; SE1 e SE2) nas duas fases através do Teste T e não apresentaram diferença significativa (Fase 1: CE1/CE2 $p=0,1288$ e SE1/SE2 $p=0,8433$; Fase 2: CE1/CE2 $p=0,7148$ e SE1/SE2 $p=0,7157$) e por isso os dados foram agrupados em: Com Enriquecimento (CE) e Sem Enriquecimento (SE).

Todas as análises foram feitas utilizando-se Teste T pareado e como mostra a Figura 5, nas Fases 1 e 2 do teste, os grupos CE e SE não apresentaram diferença no número médio de tentativas utilizadas para atingir o critério de acerto e passar para a fase seguinte (Fase 1: $p=0,2228$; Fase 2: $p=0,6602$). O desempenho do grupo CE foi significativamente melhor na Fase 1 que na Fase 2 ($p=0,0090$), enquanto que o grupo SE não variou significativamente seu desempenho ao longo das fases ($p=0,4542$).

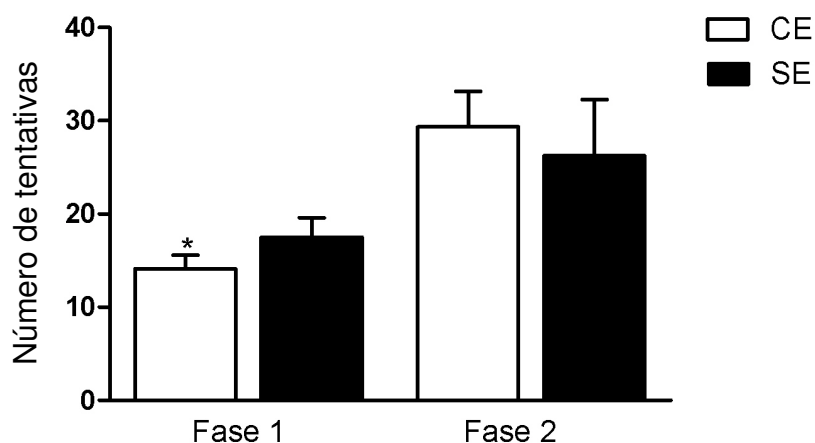


Figura 5: Média e DP do número de tentativas usadas para atingir o critério (entrar primeiro no lado correto nove em 10 vezes) em peixes dos diferentes tipos de ambiente (CE: Com Enriquecimento ambiental; SE: Sem Enriquecimento ambiental) nas fases 1 e 2 do teste.; * representa diferença significativa entre o desempenho do grupo CE nas fases 1 e 2 .

Participaram da Fase 3 apenas os animais que obtiveram sucesso nas Fases 1 e 2. O número de animais que conseguiram chegar a Fase 3 ($n= 9$) foi reduzido, sendo menor que a metade dos animais que iniciaram o teste e por isso análises estatísticas foram inviáveis. A Figura 6 mostra os resultados considerados em termos de acerto (peixe entrou primeiro no lado em que havia sido treinado a se alimentar na Fase 2), erro (peixe entrou primeiro no lado oposto ao que havia sido treinado a se alimentar na Fase 2) e ausência de retorno (peixe não entrou em nenhum dos compartimentos de alimentação durante os 10 minutos posteriores a oferta de alimento).

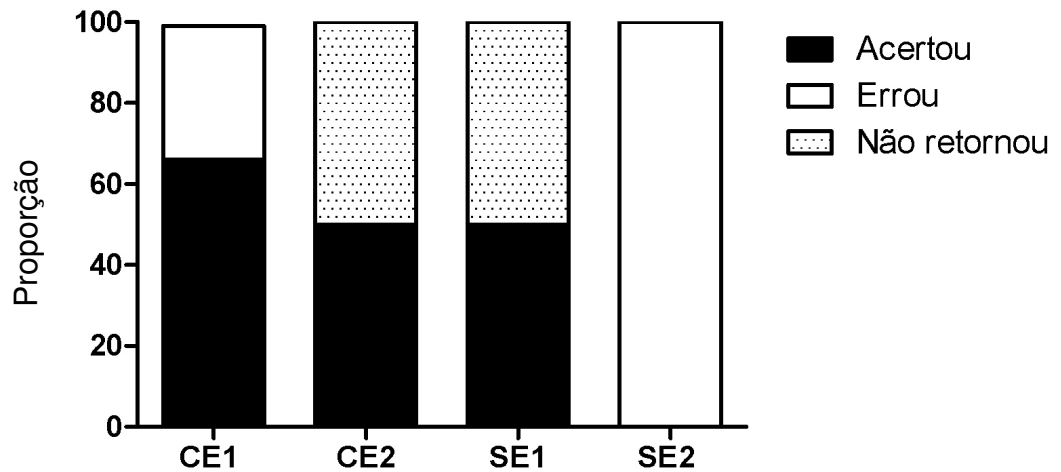


Figura 6: Proporção de peixes de cada grupo (CE1: Com enriquecimento 1, n=3; CE2: Com Enriquecimento 2, n=2; SE1: Sem enriquecimento 1, n=2; SE2: Sem enriquecimento 2, n=2) que acertaram, erraram ou não retornaram ao lado em que foram treinados na fase 2.

Fazendo uma análise descritiva dos dados, é possível observar que um grupo proveniente de cada tipo de ambiente (CE2 e SE1) obteve o mesmo desempenho, enquanto que os outros dois grupos apresentaram desempenhos bem distintos, uma vez que os dois animais que fizeram o teste do grupo SE2 erraram o lado enquanto que os dois animais do grupo CE1 acertaram o lado e apenas um errou.

A comparação entre as medidas de massa dos animais antes e depois do teste mostra que a quantidade de alimentação não foi restritiva. Antes dos testes os animais apresentaram em média massa de $8,60 \pm 4,20\text{g}$ e ao final dos testes apresentaram em média $10,68 \pm 4,82\text{g}$. Os animais apresentaram comprimento total médio de $7,67 \pm 1,46\text{ cm}$ no dia anterior ao início dos testes.

4 DISCUSSÃO

A restrição alimentar imposta aos animais durante os testes, juntamente com o jejum anterior ao teste de associação espaço-temporal, tinham como objetivo transformar o alimento em um estímulo ao aprendizado. O que se obteve a partir da pesagem dos animais foi que durante os testes eles aumentaram seu peso. É importante ressaltar que não havia nenhuma outra forma de alimento disponível. Uma possibilidade para o aumento de peso dos animais sob jejum e/ou dieta restritiva é a ausência de estresse social provida pelo isolamento dos animais durante os testes. Quando sob estresse social (na presença de indivíduos dominantes) os subordinados investem mais energia em atividades necessárias à manutenção da homeostase em detrimento do crescimento levando a um crescimento heterogêneo da população (VOLPATO & FERNANDES, 1994). Quando o estresse social cessa devido à ausência de dominantes (isolamento) os subordinados apresentam crescimento compensatório exibindo taxas de crescimento maiores que os próprios dominantes devido à redistribuição da energia (FERNANDES-DE-CASTILHO *et al.*, 2008). FERNANDES & VOLPATO (1993) evidenciaram crescimento heterogêneo em tilápia-do-Nilo e FERNANDES-DE-CASTILHO *et al.* (2008) trabalhando com Truta-Arco-Íris encontraram evidências do crescimento compensatório nos indivíduos subordinados.

4.1 ASSOCIAÇÃO ESPAÇO-TEMPORAL

Diferentes grupos taxonômicos já foram testados quanto ao aprendizado da associação entre local e período da alimentação, como por exemplo, abelhas: Wahl (1932), Gould (1987); formigas: Schatz *et al.* (1994); aves: Daan (1981), Biebach *et al.* (1989); ratos: Boulos & Logothetis (1990) e Carr & Wilkie (1997) *apud* REEBS (1999). Em peixes, diferentes autores já encontraram evidências deste tipo de aprendizado para testes em grupos: REEBS (1996) utilizando *Notemigonus crysoleucas* argumenta que esta espécie apresenta deslocamentos diários regulares e isso deve ter atuado como um facilitador do aprendizado da associação, uma vez que naturalmente os animais forrageiam em diferentes locais em períodos diferentes; GÓMEZ-LAPLAZA & MORGAN (2005) utilizando *Pterophyllum scalare* também encontraram evidências deste tipo de aprendizado. Para peixes testados

isoladamente, a fim de eliminar os problemas advindos do teste em grupo citados anteriormente; BARRETO *et al.* (2006) trabalhando com *Pterophyllum scalare*, DELICIO & BARRETO (2008) utilizando *Oreochromis niloticus* e CHEN & TABATA (2002) utilizando *Oncorhynchus mykiss* conseguiram evidenciar a associação proposta no teste.

Teriam sucesso no teste os animais que permanecessem mais tempo no compartimento em que seria oferecida alimentação em determinado período do dia, considerando assim, que haviam aprendido a associação entre local e período em que o alimento estaria disponível. Nenhum dos grupos obteve este resultado, porém, houve uma mudança no comportamento do grupo CE, que no 10º dia não apresentou diferença no tempo de permanência entre os compartimentos e no 20º dia passou a permanecer mais tempo no compartimento do meio. Apesar de não terem atingido o objetivo proposto no teste, os animais do grupo CE apresentaram uma mudança de comportamento indicativa de aprendizado, ao permanecerem mais tempo no compartimento do meio. Ao permanecer no compartimento do meio os peixes tinham acesso rápido a qualquer um dos lados e também poderiam monitorar constante e rapidamente as janelas que davam acesso aos compartimentos laterais para verificar se havia alimento disponível.

BARRETO *et al.* (2006) realizaram o mesmo tipo de teste associação entre local e período da alimentação com duas espécies (*Pterophyllum scalare* e *Geophagus brasiliensis*) e viram que apenas *P. scalare* aprendeu a associação após 30 dias de treinamento, enquanto que *Geophagus brasiliensis* não demonstrou nenhum tipo de aprendizado. Os autores argumentam que tal diferença pode ser devido às diferentes formas de alimentação das duas espécies. Enquanto *Geophagus brasiliensis* é uma espécie onívora, para a qual a disponibilidade de alimento é maior e a relevância de aprender a associação é menor, *P. scalare* é uma espécie com alimentação restrita ao zooplâncton para a qual é ecologicamente mais relevante associar sua atividade forrageadora com a movimentação de sua presa, refletindo em um resultado positivo na associação proposta no teste. REEBS (1993) sugere que a ausência de associação entre local e período de alimentação em grupos de *Cichlasoma nigrofasciatum* também se deva a alimentação onívora da espécie. A tilápia-do-Nilo é uma espécie onívora e apresenta baixa seletividade para os itens alimentares, alimentando-se de fitoplâncton, zooplâncton e detritos bênticos (EL-SAYED, 2006). A dieta onívora poderia ser um dos fatores que levou os animais

testados no presente trabalho a não fazerem a associação proposta, uma vez que em ambiente natural, quando ocorre escassez de um item, esta espécie tende a mudar o item alimentar ao invés de forragear em outros locais, mas tilápia-do-Nilo apresentou comportamento de associação entre local e período de alimentação no trabalho realizado por DELICIO & BARRETO (2008), mostrando que este tipo de aprendizado está presente nesta espécie mesmo se tratando de uma espécie onívora.

Testando alguma forma de associação espaço-temporal em peixes, REEBS (1993), com grupos de *Cichlasoma nigrofasciatum* propôs que a ausência de aprendizado possa estar relacionada, entre outros fatores, ao pequeno número de vezes em que a alimentação foi fornecida (quatro) e que a utilização de um sinal anterior à entrega do alimento pode ter comprometido o aprendizado, pois os animais podem ter associado o sinal à entrega do alimento em detrimento da associação entre local e período da alimentação. No teste aqui descrito nenhum tipo de sinal foi associado ao momento da disponibilização do alimento e todos os cuidados foram tomados para que os animais não percebessem a presença da experimentadora no laboratório nos momentos da alimentação. Além disso, o número de vezes em que a alimento foi fornecido (duas vezes) foi o mesmo foi utilizado por DELICIO & BARRETO (2008), que obtiveram resultados positivos com a mesma espécie.

REEBS (1993) e DELICIO *et al.* (2006a) sugerem que um treinamento de 30 dias seria insuficiente para o aprendizado nas espécies utilizadas por eles, respectivamente *Cichlasoma nigrofasciatum* e *Oreochromis niloticus*. O período de 30 dias para o aprendizado de tilápias-do-Nilo foi testado com sucesso por DELICIO & BARRETO (2008) e por isso foi utilizado no presente trabalho.

Os resultados negativos obtidos neste teste podem estar relacionados ao curto período de jejum a que os animais foram expostos. DELICIO *et al.* (2006a) ao utilizar tilápias-do-Nilo e o mesmo tipo de teste não encontraram evidências de aprendizado e sugeriram que a alimentação não tivesse atuado como estímulo eficaz, uma vez que a quantidade de comida oferecida durante os testes (1,5% da massa corporal) não foi restritiva. Os mesmos autores, em trabalho posterior (DELICIO & BARRETO, 2008) utilizando a mesma espécie e o mesmo teste, conseguiram resultados positivos e atribuem tais resultados a restrição alimentar imposta aos animais. Esta restrição foi promovida por um período de jejum de 17

dias antes dos testes, uma alimentação com 1% da massa corporal durante 20 dias e uma redução deste valor para 0,5% nos últimos 10 dias de teste. Os autores afirmam que esta conclusão pôde ser corroborada através da variação no peso dos animais antes e depois do período de jejum. Neste trabalho foi utilizado um período de jejum de sete dias e os animais não apresentaram redução do peso corporal depois deste período. A utilização da restrição alimentar como estímulo ao aprendizado também surtiu efeito nos trabalhos YANAI *et al.* (2008) e LUKOYANOV *et al.* (2002) utilizando ratos, mas em nenhum dos casos houve período de jejum, apenas restrição da quantidade de alimento disponível durante o teste.

Outro fator que pode ter levado aos resultados negativos obtidos neste estudo pode estar relacionado ao tamanho do aquário de teste. O aquário utilizado nos testes realizados por DELICIO *et al.* (2006a) possuíam compartimentos sete vezes maiores que a média do comprimento dos animais, enquanto que os compartimentos dos aquários aqui utilizados possuíam pouco mais que o dobro do comprimento total médio dos animais. Esta pequena relação métrica entre o comprimento total dos animais e o comprimento de cada compartimento pode ter comprometido o aprendizado, pois o custo de não aprender a associação era pequeno, uma vez que o acesso entre os compartimentos era rápido e não envolvia um grande gasto energético, então caso o peixe estivesse no lado errado em um determinado momento de alimentação ele poderia passar algum tempo ali e então mudar de compartimento a procura do alimento, sem ser prejudicado, uma vez que o alimento estava disponível por uma hora. O problema advindo da pequena relação métrica entre os animais e os compartimentos pode explicar porque os indivíduos do grupo CE, apesar não terem atingido o objetivo proposto no teste, aprenderam a permanecer mais tempo no compartimento do meio.

4.2 MEMÓRIA ASSOCIATIVA

Ambos os grupos (CE e SE) não apresentaram diferenças significativas no desempenho nas Fases 1 e 2, evidenciando que o enriquecimento não promoveu melhora nas variáveis avaliadas. O grupo CE apresentou melhor desempenho na Fase1 em relação à Fase 2, mostrando que o aprendizado foi adquirido mais rapidamente quando o animal foi exposto pela primeira vez ao teste.

BRYDGES & BRAITHWAITE (2009) testando a influência no enriquecimento ambiental na cognição de esgana-gato (*Gasterosteus aculeatus*) não encontraram diferenças no aprendizado e na memória entre indivíduos mantidos durante dez meses nas condições sem enriquecimento ambiental comparativamente aos com enriquecimento ambiental. Os autores sugerem que o tipo de enriquecimento por eles fornecido (plantas de plástico, substrato pedregoso e potes de plantas que serviam como abrigo) pode não ter sido o mais apropriado para estimular os animais. BRACKE *et al.* (2006) em uma revisão sobre diferentes formas de enriquecimento ambiental para porcos afirmam que objetos de metal não são adequados para este fim, e que o enriquecimento com palha provê melhores resultados. DELICIO *et al.* (2006b) testando a preferência de tilápia-do-Nilo em relação a três tipos de ambientes (a. vazio; b. com abrigo; c. com cascalho) verificou a preferência por ambiente enriquecido quando comparados a ambiente vazio. Uma vez que os animais mostraram preferência pelos ambientes enriquecidos é possível dizer que os itens utilizados no presente trabalho são apropriados para a espécie.

Outro fator levantado por BRYDGES & BRAITHWAITE (2009) para a ausência de diferença no aprendizado e na memória de animais mantidos em ambientes com ou sem enriquecimento ambiental é que na espécie testada (*Gasterosteus aculeatus*), tais comportamentos tenham um componente genético mais relevante, sofrendo assim, menos influência do meio.

5 CONCLUSÕES

Para a aplicação de testes que objetivem evidenciar a interação entre o ambiente e as habilidades cognitivas em peixes é necessário considerar fatores inerentes a biologia, história evolutiva e relações ecológicas da espécie na escolha da metodologia mais adequada à espécie em questão.

Para utilizar o alimento como estímulo em testes de aprendizado é importante utilizar a restrição alimentar associada ao jejum. Também é importante submeter os animais ao jejum e acompanhar a variação no peso até que eles apresentem redução no mesmo, garantindo que a privação tenha sido efetiva. Ao utilizar o alimento como estímulo também é importante reduzir o tempo que ele esteja acessível aos animais, para aumentar a relevância do aprendizado.

Os resultados obtidos mostraram que o grupo submetido ao ambiente enriquecido (CE) apresentou melhor desempenho na primeira fase do teste de memória associativa bem como algum tipo de aprendizado no teste de associação espaço-temporal, embora não tenha atingido o objetivo proposto pelo teste. Estes resultados indicam uma possível interação positiva do enriquecimento ambiental nas variáveis avaliadas, entretanto, falhas metodológicas podem ter influenciado os resultados.

Mais estudos são necessários para verificar as relações entre as habilidades cognitivas avaliadas e a ecologia da espécie.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BARRETO, R.E.; RODRIGUES, P.; LUCHIARI, A.C.; DELICIO, H.C.; Time-place learning in individually reared angelfish, but not in pearl cichlid; **Behavioural Processes**; v. 73, p. 367-372, 2006.

BIEBACH, H.; GORDIJN, M.; KREBS, J.R.; Time-and-place learning by garden warblers, *Sylvia borin*; **Animal Behaviour**; v. 37, p. 353-360, 1989 apud REEBS, S.G.; Time-place learning based on food but not on predation risk in a fish, the Inanga (*Galaxias maculatus*); **Ethology**, v. 105, p. 361-371, 1999.

BOERE, V.; Environmental enrichment for neotropical primates in captivity; **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 31, n. 3, p. 543-551, 2001.

BOULOS, Z. & LOGOTHETIS, D.E.; Rats anticipate and discriminate between two daily feeding times; **Physiol. Behav.**; v. 78, p. 523-529, 1990 apud REEBS, S.G.; Time-place learning based on food but not on predation risk in a fish, the Inanga (*Galaxias maculatus*); **Ethology**, v. 105, p. 361-371, 1999.

BRACKE, M.B.M.; ZONDERLAND, J.J.; LENSSENS, P.; SCHOUTEN, W.G.P.; VERMEER, H.; SPOOLDER, H.A.M.; HENDRIKS, H.J.M.; HOPSTER, H.; Formalised review of environmental enrichment for pigs in relations to political decision making; **Applied Animal Behaviour Science**; v. 98, p. 165-182, 2006.

BRAITHWAITE, V.A.; Cognitive ability in fish; In: Série **Fish Physiology**, v. 24: Behaviour and Physiology of Fish SLOMAN K. A.; BALSHINE, S.; WILSON, R. W.; Academic Press Inc, United Kingdom, 2005.

BRAITHWAITE, V.A.; **Do fish feel pain?**; Oxford University Press, USA, 2010.

BROOM, D.M.; Review Cognitive ability and awareness in domestic animals and decisions about obligations to animals; **Applied Animal Behaviour Science**; v.123, p. 1-11, 2010.

BROWN, C.; DAVIDSON, T.; LALAND, K.; Environmental enrichment and prior experience of live prey improve foraging behaviour in hatchery-reared Atlantic salmon; **Journal of Fish Biology**; v. 63 (Suplemento A), p. 187-196, 2003.

BRYDGES, N.M.; HEATHCOTE, R.J.P.; BRAITHWAITE, V.A.; Habitat stability and predation pressure influence learning and memory in populations of three-spined sticklebacks; **Animal Behaviour**; v. 75, p. 935-342, 2008.

BRYDGES, N.M.; BRAITHWAITE, V.A.; Does environmental enrichment affect the behaviour of fish commonly used in laboratory work?; **Applied Animal Behaviour Science**; v. 118, p. 137-143, 2009.

CARR, J.A.R. & WILKIE, D.M.; Rats use an ordinal timer in a daily time-place learning task; **J. Exp. Psych. Anim. Behav. Proces.**; v. 23, p. 232-247, 1997, apud REEBS, S.G.; Time-place learning based on food but not on predation risk in a fish, the Inanga (*Galaxias maculatus*); **Ethology**, v. 105, p. 361-371, 1999.

CHEN, W.-M. & TABATA, M.; Individual rainbow trout can learn and anticipate multiple daily feeding times; **Journal of Fish Biology**, v.61, p.1410-1422, 2002.

DAAN, S.; Adaptive daily strategies in behavior; In: **Handbook of Behavioral Neurobiology v.4: Biological Rhythms** (Aschoff, J., ed.); Plenum Press, New York, p. 275-298, 1981 apud REEBS, S.G.; Time-place learning based on food but not on predation risk in a fish, the Inanga (*Galaxias maculatus*); **Ethology**, v. 105, p. 361-371, 1999.

DE JONG, I.C.; PRELLE, I.T.; BRUGWALL, J.A.VAN DE.; LAMBOOIJ, E.; KORTE, S.M.; BLOKHUIS, H.J.; KOOLHAAS, J.M.; Effects of environmental enrichment on behavioral responses to novelty, learning and memory, and the circadian rhythm in cortisol in growing pigs; **Physiology & Behavior**, v. 68, p. 571-578, 2000.

DELICIO, H.C.; LUCHIARI, A.C.; BARRETO, R.E.; MARCONDES, A.L.; Testing time-place learning in the cichlid fish Nile tilapia; **J. Ethol**; v. 24, p. 195-200, 2006a.

DELICIO H.C.; BARRETO, R.E.; NORMANDES, E.B.; LUCHIARI, A.C.; MARCONDES, A.L.; A place preference test in the fish Nile tilapia; **Journal of Experimental Animal Science**; v. 43, p. 141-148, 2006b.

DELICIO, H.C.; BARRETO, R.E.; Time-place learning in food-restricted Nile tilapia; **Behavioural Processes**; v. 77, p. 126-130, 2008.

EL-SAYED ABDEL-FATTAH M.; **Tilapia culture**, CABI Publishing, UK, 2006.

FERNANDES, M.O.; VOLPATO, G.L.; Heterogeneous Growth in the Nile Tilapia: Social Stress and Carbohydrate Metabolism; **Physiology and Behavior**; v. 54, p. 319-323, 1993.

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.

GÓMES-LAPLAZA, L. M.; MORGAN, E.; Time-place learning in the cichlid angelfish *Pterophyllum scalare*; **Behavioural Process**, v. 70, p. 177-181, 2005.

GOULD, J.L.; Honey bees store learned flower-landing behaviour according to time of day; **Animal Behaviour**; v. 35, p. 1579-1581, 1987 apud REEBS, S.G.; Time-place learning based on food but not on predation risk in a fish, the Inanga (*Galaxias maculatus*); **Ethology**, v. 105, p. 361-371, 1999.

KIHSLINGER, R.L.; NEVITT, G.A.; Early rearing environment impacts cerebellar growth in juvenile salmon; **The Journal of Experimental Biology**; v. 209, p.504-509, 2006.

LEGGIO, M.G.; MANDOLESI, L.; FEDERICO, F.; SPIRITO, F.; RICCI, B.; GELFO, F.; PETROSINI, L.; Environmental enrichment promotes improved spatial abilities and enhanced dendritic growth in the rat; **Behavioural Brain Research**; v. 163, p. 78-90, 2005.

LUKOYANOV, N.V.; PEREIRA, P.A.; MESQUITA, R.M.; ANDRADE, J.A.; Restricted feeding facilitates time-place learning in adult rats; **Behavioural Brain Research**, v. 134, p. 283-290, 2002.

NAKATANI, K. AGOSTINHO, A.A.; BAUMGARTNER, G.; BIALETZKI, A.V.S.; SANCHES, P.V.; MAKRAKIS, M.C.; PAVANELLI, C.S.; **Ovos e larvas de peixes de água doce: desenvolvimento e manual de identificação**; Maringá, EDUEM, 2001.

OLIVEIRA, R.F.; GALHARDO, L.; Sobre a aplicação do conceito de bem-estar a peixes teleósteos e implicações para a piscicultura; **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 36, suplemento especial, p. 77-86, 2007.

PEDRAZZANI, A.S.; FERNANDES-DE-CASTILHO, M.; CARNEIRO, P.C.F.; MOLENTO, C.F.M.; Bem-estar de peixes e a questão da senciência; **Archives of Veterinary Science**; v. 11, n. 3, p. 60-70, 2007.

REEBS, S.G.; A test of time-place learning in a cichlid fish; **Behavioural Processes**; v. 30, p. 273-282, 1993.

REEBS, S.G.; Time-place learning in golden shiners (Pisces: Cyprinidae); **Behavioural Processes**, v. 36, p. 253-262, 1996.

REEBS, S.G.; Time-place learning based on food but not on predation risk in a fish, the Inanga (*Galaxias maculatus*); **Ethology**, v. 105, p. 361-371, 1999.

SALE, A.; BERARDI, N.; MAFFEI, L.; Enrich the environment to empower the brain; **Trends in Neurosciences**; v. 32, n. 4, p. 233-239, 2009.

SCHATZ, B.; BEUGNON, G.; LACHAUD, J.-P.; Time-place learning by an invertebrate, the ant *Ectatomma ruidum* Roger.; **Anim. Behav.**; v.48, p. 236-238, 1994 apud REEBS, S.G.; Time-place learning based on food but not on predation risk in a fish, the Inanga (*Galaxias maculatus*); **Ethology**, v. 105, p. 361-371, 1999.

STICKNEY, R.R. **Principles of aquaculture**. Wiley-Interscience/John Wiley and Sons, New York, NY, USA, 1994.

VOLPATO, G.L.; BARRETO, R.E.; Environmental blue light prevents stress in the fish Nile tilapia; **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**; v. 34, p. 1041-1045, 2001.

VOLPATO, G.L.; FERNANDES, M.O.; Social control of growth in fish; **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**; v. 27, p. 797-810, 1994.

VOLPATO, G.L.; GOLÇALVES-DE-FREITAS, E.; FERNANDES-DE-CASTILHO, M.; Insights into the concept of fish welfare; **Diseases of Aquatic Organisms**; v. 75, p. 165-141, 2007.

WAHL, O.; Neue Untersuchungen über das Zeitgedächtnis der Bienen; **Z. Vergl. Physiol.**, v. 16, p. 529-589, 1932 apud REEBS, S.G.; Time-place learning based on food but not on predation risk in a fish, the Inanga (*Galaxias maculatus*); **Ethology**, v. 105, p. 361-371, 1999.

WOODCOCK, E.A. & RICHARDSON, R.; Effects of Environmental enrichment on rate of contextual processing and discriminative ability in adult rats; **Neurobiology of Learning and Memory**; v. 73, p. 1-10, 2000.

YANAI, S.; OKAICHI, H.; SUGIOKA, K.; Dietary restriction inhibits spatial learning ability and hippocampal cell proliferation in rats; **Japanese Psychological Research**, v. 50, n. 1, p.36-48, 2008.