

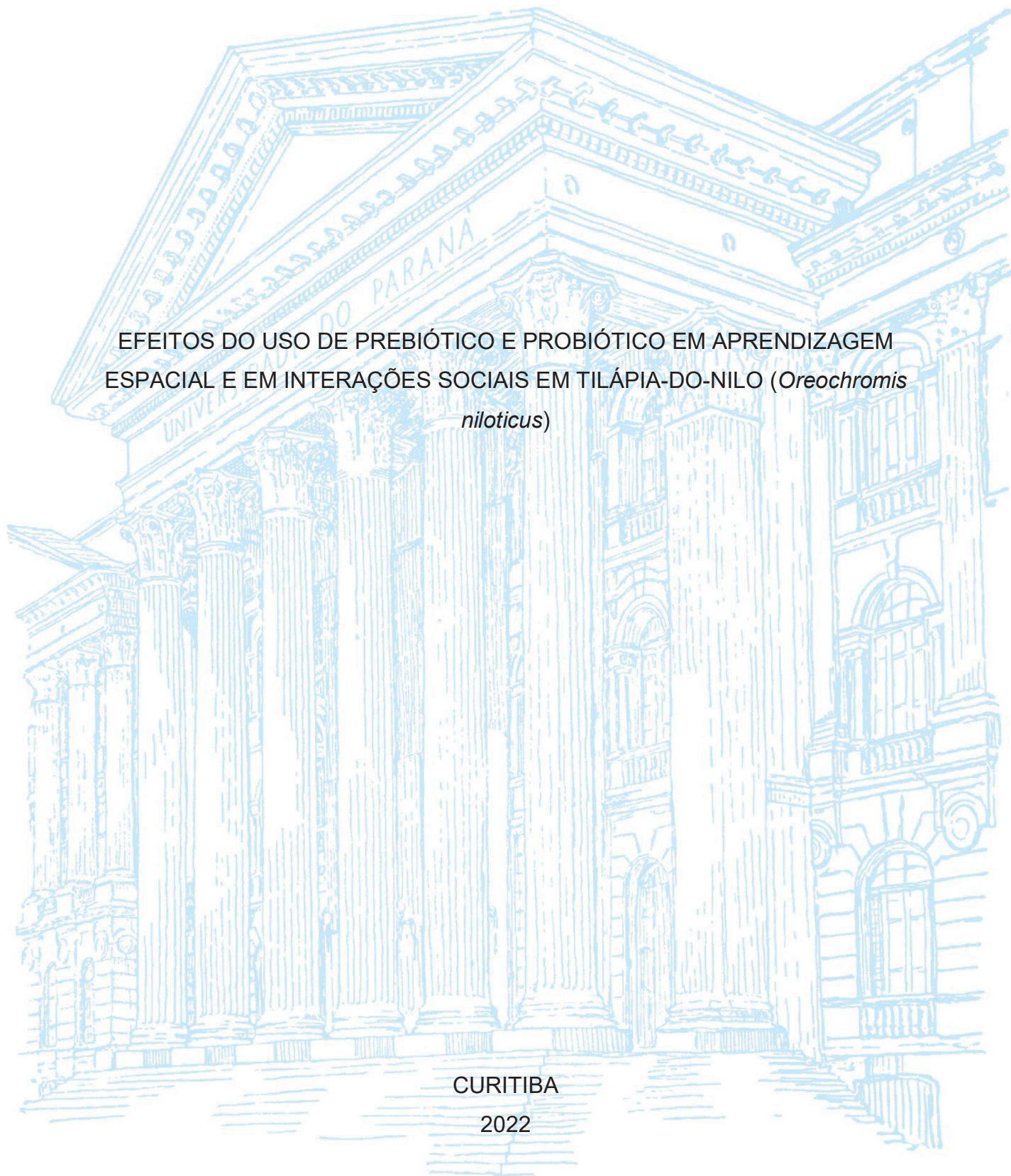
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

DÉBORA CHARNESKI ELIAS

EFEITOS DO USO DE PREBIÓTICO E PROBIÓTICO EM APRENDIZAGEM
ESPACIAL E EM INTERAÇÕES SOCIAIS EM TILÁPIA-DO-NILO (*Oreochromis
niloticus*)

CURITIBA

2022



DÉBORA CHARNESKI ELIAS

EFEITOS DO USO DE PREBIÓTICO E PROBIÓTICO EM APRENDIZAGEM
ESPACIAL E EM INTERAÇÕES SOCIAIS EM TILÁPIA-DO-NILO (*Oreochromis
niloticus*)

Dissertação apresentada ao curso de Pós-Graduação em Fisiologia, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Fisiologia.

Orientadora: Prof^a. Dra. Marisa Fernandes de Castilho

CURITIBA

2022

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
SISTEMA DE BIBLIOTECAS – BIBLIOTECA DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

Elias, Débora Charneski.

Efeitos do uso de prebiótico e probiótico em aprendizagem espacial e em interações sociais em tilápia-do-Nilo (*Oreochromis niloticus*). / Débora Charneski Elias. – Curitiba, 2022.

1 recurso on-line : PDF.

Orientadora: Marisa Fernandes de Castilho.

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

1. Microbiota. 2. Prebióticos. 3. Probióticos. 4. Comportamento espacial dos animais. 5. Interação social. 6. Tilápia. 7. Ciclídeos. I. Título. II. Castilho, Marisa Fernandes de. III. Universidade Federal do Paraná. Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Fisiologia.



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
SETOR DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO FISILOGIA -
40001016072P4

ATA Nº58

ATA DE SESSÃO PÚBLICA DE DEFESA DE MESTRADO PARA A OBTENÇÃO DO GRAU DE MESTRA EM FISILOGIA

No dia vinte e sete de julho de dois mil e vinte e dois às 09:00 horas, na sala Auditório do Departamento de Fisiologia (Sala 103), Setor de Ciências Biológicas - Departamento de Fisiologia, foram instaladas as atividades pertinentes ao rito de defesa de dissertação da mestranda **DÉBORA CHARNESKI ELIAS**, intitulada: "**Efeitos do uso de prebiótico e probiótico em aprendizagem espacial e em interações sociais em tilápia-do-Nilo (Oreochromis niloticus).**", sob orientação da Profa. Dra. MARISA FERNANDES DE CASTILHO. A Banca Examinadora, designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação FISILOGIA da Universidade Federal do Paraná, foi constituída pelos seguintes Membros: MARISA FERNANDES DE CASTILHO (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ), THAIS BILLALBA CARVALHO (UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS), GIORGI DAL PONT (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ). A presidência iniciou os ritos definidos pelo Colegiado do Programa e, após exarados os pareceres dos membros do comitê examinador e da respectiva contra argumentação, ocorreu a leitura do parecer final da banca examinadora, que decidiu pela APROVAÇÃO. Este resultado deverá ser homologado pelo Colegiado do programa, mediante o atendimento de todas as indicações e correções solicitadas pela banca dentro dos prazos regimentais definidos pelo programa. A outorga de título de mestra está condicionada ao atendimento de todos os requisitos e prazos determinados no regimento do Programa de Pós-Graduação. Nada mais havendo a tratar a presidência deu por encerrada a sessão, da qual eu, MARISA FERNANDES DE CASTILHO, lavrei a presente ata, que vai assinada por mim e pelos demais membros da Comissão Examinadora.

CURITIBA, 27 de Julho de 2022.

Assinatura Eletrônica

03/08/2022 14:41:46.0

MARISA FERNANDES DE CASTILHO

Presidente da Banca Examinadora

Assinatura Eletrônica

03/08/2022 15:11:46.0

THAIS BILLALBA CARVALHO

Avaliador Externo (UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS)

Assinatura Eletrônica

03/08/2022 14:57:35.0

GIORGI DAL PONT

Avaliador Externo (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
SETOR DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO FISILOGIA -
40001016072P4

TERMO DE APROVAÇÃO

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação FISILOGIA da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da dissertação de Mestrado de **DÉBORA CHARNESKI ELIAS** intitulada: "**Efeitos do uso de prebiótico e probiótico em aprendizagem espacial e em interações sociais em tilápia-do-Nilo (*Oreochromis niloticus*)**", sob orientação da Profa. Dra. MARISA FERNANDES DE CASTILHO, que após terem inquirido a aluna e realizada a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua APROVAÇÃO no rito de defesa.

A outorga do título de mestra está sujeita à homologação pelo colegiado, ao atendimento de todas as indicações e correções solicitadas pela banca e ao pleno atendimento das demandas regimentais do Programa de Pós-Graduação.

CURITIBA, 27 de Julho de 2022.

Assinatura Eletrônica

03/08/2022 14:41:46.0

MARISA FERNANDES DE CASTILHO

Presidente da Banca Examinadora

Assinatura Eletrônica

03/08/2022 15:11:46.0

THAIS BILLALBA CARVALHO

Avaliador Externo (UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS)

Assinatura Eletrônica

03/08/2022 14:57:35.0

GIORGI DAL PONT

Avaliador Externo (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)

Dedico esta dissertação a meu pai, Regivaldo (in memoriam), a minha mãe, Vilma e a minha irmã, Flávia, por sempre me apoiarem e por acreditarem no meu potencial.

AGRADECIMENTOS

Agradeço, primeiramente, a Deus, por ter me abençoado com tantas oportunidades de crescimento.

Agradeço à professora Marisa Fernandes de Castilho, pela orientação e por ter me proporcionado tantos conhecimentos;

Agradeço aos professores Anderson Joel Martino Andrade e Bruno Jacson Martynhak, pelo auxílio nas análises estatísticas;

Agradeço aos funcionários e técnicos da UFPR, principalmente àqueles lotados no Departamento de Fisiologia, por sempre me auxiliarem em vários momentos;

Agradeço às colegas de Mestrado, pelo apoio e companheirismo;

Agradeço à Tabyta, pelo auxílio na questão das rações;

Agradeço à CAPES pela concessão da bolsa;

Agradeço a todos que, de alguma maneira, me auxiliaram com a construção desta dissertação;

E, por último, mas não menos importante, agradeço aos meus pais e à minha irmã, que sempre me mostraram o verdadeiro significado de família e de amor.

A educação   o poder das mulheres.

(Malala Yousafzai)

RESUMO

A microbiota é o conjunto de micro-organismos constituintes de uma comunidade heterogênea de bactérias, fungos, protozoários e vírus, desempenhando função crucial na fisiologia do organismo hospedeiro. As pesquisas sobre microbiota se tornaram importantes para os estudos da influência alimentar na saúde do organismo, através da dieta. A dieta pode ser modulada através da adição de probióticos e prebióticos na alimentação. Os probióticos são micro-organismos vivos; já os prebióticos são substratos seletivamente utilizados pelos micro-organismos. Tanto probióticos como prebióticos conferem benefícios à saúde do organismo hospedeiro. O presente estudo visa testar se a dieta modula aspectos comportamentais e de aprendizagem em peixes, com a utilização de prebióticos e probióticos em alevinos machos de tilápia-do-Nilo (*Oreochromis niloticus*). Para tanto, os grupos experimentais receberam dieta com uso de suplementação alimentar – com a utilização de prebióticos e probióticos. Os animais foram testados quanto aos aspectos cognitivos através de teste padrão de aprendizagem espacial e, quanto aos aspectos comportamentais, através da quantificação de confrontos agonísticos pelo paradigma do espelho. Os resultados encontrados apontam que a suplementação alimentar não compromete o padrão de interações sociais, entretanto, a suplementação com propriedade probiótica compromete a aprendizagem espacial nos peixes, com comprometimento no desempenho no referido teste.

Palavras-chave: Microbiota. Prebióticos. Probióticos. Aprendizagem espacial. Interação social. Tilápia-do-Nilo.

ABSTRACT

The microbiota is a set of microorganisms that constitute a heterogeneous community of bacteria, fungi, protozoa and viruses, performing a crucial role in the physiology of the host organism. Research of the microbiota has become important for studies of dietary influence on the body's health. Diet can be modulated by probiotics and prebiotics supplementation. Probiotics are living microorganisms, while prebiotics are substrates selectively used by microorganisms. Both probiotics and prebiotics confer health benefits to the host organism. The present study aims to test whether the diet modulates behavioral and learning aspects in fish, with the use of prebiotics and probiotics in male tilapia fry (*Oreochromis niloticus*). For this purpose, the experimental groups received a diet with the use of dietary supplementation – with the use of prebiotics and probiotics. The animals were tested for cognitive aspects through a standard spatial learning test, and for behavioral aspects through quantification of agonistic confrontations by the mirror test. The results found indicate that food supplementation does not interfere with the pattern of social interactions, however supplementation with probiotic property impairs spatial learning in fish, with compromised performance in the aforementioned test.

Keywords: Microbiota. Prebiotics. Probiotics. Spatial learning. Social interaction. Nile tilapia.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 - REPRESENTAÇÃO DO LABIRINTO PARA OS EXPERIMENTOS	21
FIGURA 2 - REPRESENTAÇÃO DO AQUÁRIO EXPERIMENTAL PARA O TESTE DO PARADIGMA DO ESPELHO.....	23

LISTA DE GRÁFICOS

GRÁFICO 1 - PORCENTAGEM DOS GRUPOS QUE ENCONTRARAM O ALVO.....	25
GRÁFICO 2 - TESTE DE APRENDIZAGEM ESPACIAL ENTRE OS GRUPOS PELO TEMPO TOTAL DECORRIDO EM ALCANÇAR O ALVO (EM S).....	26
GRÁFICO 3 - EXPRESSÃO DE CONFRONTO AGONÍSTICO LATERAL (EM %).....	27
GRÁFICO 4 - EXPRESSÃO DE CONFRONTO AGONÍSTICO FRONTAL (EM %).....	28
GRÁFICO 5 - NÚMERO DE INTERAÇÕES PARA CONFRONTO LATERAL E CONFRONTO FRONTAL DO TESTE PARADIGMA DO ESPELHO	29

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	12
2 REVISÃO DE LITERATURA	15
2.1 HISTÓRICO	15
2.2 MICROBIOTA INTESTINAL E SAÚDE DO ORGANISMO HOSPEDEIRO	16
2.3 PREBIÓTICOS E PROBIÓTICOS.....	17
3 OBJETIVOS	19
3.1. OBJETIVO GERAL.....	19
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	19
4 MATERIAIS E MÉTODOS	19
4.1 ANIMAIS EXPERIMENTAIS.....	19
4.2 TESTE DE APRENDIZAGEM ESPACIAL	20
4.3 TESTE DO PARADIGMA DO ESPELHO	22
4.4 ANÁLISES ESTATÍSTICAS	24
5 RESULTADOS	25
5.1 TESTE DE APRENDIZAGEM ESPACIAL	25
5.2 TESTE DO PARADIGMA DO ESPELHO	27
6 DISCUSSÃO	30
7 CONCLUSÃO	33
REFERÊNCIAS	34

1 INTRODUÇÃO

O interesse pelo estudo da microbiota intestinal tanto em seres humanos como em animais se tornou crescente nos últimos anos. Em humanos, a microbiota é considerada como o “último órgão” a ser pesquisado, com a capacidade de se tornar uma nova especialidade médica, chamada pelos pesquisadores de “microbiomologia” (BAQUERO; NOMBELA, 2012). Mas o que seria a microbiota? A microbiota pode ser definida como um conjunto de micro-organismos constituintes de uma comunidade heterogênea de bactérias, fungos, protozoários e vírus, objetivando desempenhar função crucial na fisiologia do organismo hospedeiro (BELKAID; HARRISON, 2017).

Desses micro-organismos, os mais estudados são as bactérias, graças ao desenvolvimento de tecnologias de estudo modernas, como a metagenômica (estudo genômico de sequenciamento de 16S rRNA da comunidade microbiana de determinada amostra) e *culturomics* (método de cultura para rápida identificação de cepas ou espécies bacterianas em amostras), em união com métodos analíticos como separação de células ativadas por fluorescência (FACS) (IKEDA-OHTSUBO et al., 2018). A expressão microbioma é relativa ao conjunto de genomas de microbiotas, pertencentes à colônia de bactérias contidas no organismo, situadas no trato gastrointestinal (GILL et al., 2006). Aproximadamente 10 a 100 trilhões de micro-organismos habitam o trato gastrointestinal humano, sendo a grande maioria encontrada no intestino distal, onde sintetizam aminoácidos e vitaminas e processam componentes polissacarídeos provenientes de plantas (BÄCKHED et al., 2005). Cálculos recentes estimam que a quantidade total de micro-organismos presentes no corpo humano iguala à de células somáticas (SENDER; FUCHS; MILO, 2016).

A colonização da microbiota intestinal em peixes se inicia no estágio larval e é dependente do tipo de peixe, do aporte nutricional e das condições ambientais (VOVERIENĖ; MICKĖNIENĖ; ŠYVOKIENĖ, 2002). A composição e a densidade da microbiota variam de acordo com a região do trato gastrointestinal (NAYAK, 2010). A diversidade na microbiota aumenta de acordo com o tipo de dieta preferida pelo animal, sendo encontrada uma maior diversidade em dietas herbívoras, em seguida em dietas onívoras e apresentando a menor diversidade microbiana nas dietas carnívoras (LIU et al.,

2016). A prevalência da composição de microbiota intestinal em peixes de água doce é de *Acinetobacter*, *Aeromonas*, *Flavobacterium*, *Lactococcus*, *Pseudomonas*, *Bacteroides*, *Clostridium*, *Fusobacterium* e membros representativos da família Enterobacteriaceae (GÓMEZ; BALCÁZAR, 2008). A utilização de suplementos alimentares na dieta em peixes, como probióticos e prebióticos, confere benefícios ao organismo hospedeiro, como aumento do crescimento corporal, melhora na saúde e é considerada uma alternativa ecologicamente correta para substituição ao uso desenfreado de antibióticos na aquicultura (YUKGEHNAISH et al., 2020).

A microbiota intestinal influencia no comportamento em animais, acarretando em mudanças na frequência alimentar, no medo e no estresse (ALLEN et al., 2017; DINAN et al., 2015). Em humanos, as interações sociais tendem a modular a microbiota, selecionando positivamente os microorganismos que trazem benefícios ao organismo hospedeiro (JOHNSON, 2020). Ainda de acordo com Johnson (2020), a diversidade e composição da microbiota estão relacionadas com as variações de personalidade encontradas no comportamento social em humanos – tais como sociabilidade, tendências a neuroses, estresse, prevalência de autismo-, sendo que redes sociais amplas apresentaram uma diversidade maior da comunidade microbiana, revelando que o comportamento social acaba promovendo a diversidade da microbiota intestinal em humanos, através de interações bidirecionais entre a microbiota intestinal e comportamento.

Em estudos com modelos animais, a sociabilidade muda de acordo com a espécie e se relaciona com as diferenças comportamentais e de estilo de vida entre animais (ASHTON et al., 2018; SHERWIN et al., 2019). Por isso, a interação entre microbiota e organismo hospedeiro tem um impacto na evolução de comportamentos sociais, já que a microbiota do trato gastrointestinal é vista como uma extensão de comunicação entre coespecíficos (SHERWIN et al., 2019).

A microbiota intestinal também causa efeitos no aprendizado em animais. A memória espacial permite que os animais consigam se lembrar de locais chave importantes para a sobrevivência dos mesmos, tais como abrigo, locais de alimentação, locais para acasalamento e áreas onde os predadores se encontram (WHITE; BROWN, 2014). O uso de suplementos alimentares como

probióticos e psicobióticos (outra classe de probióticos que, após a ingestão, influenciam de maneira positiva na saúde mental do organismo hospedeiro) ocasionam mudanças nas vias de sinalizações neurológicas, metabólicas e imunológicas, podendo gerar alterações comportamentais e cognitivas, com destaque para os processos de aprendizagem e memória em roedores e humanos (BERMÚDEZ-HUMARÁN et al., 2019; DINAN; STANTON; CRYAN, 2013).

De acordo com Novotný, Klimova e Valis (2019), mudanças positivas na microbiota intestinal em humanos podem interferir no surgimento e desenvolvimento de atrasos cognitivos e ocasionar melhoria nos processos de aprendizagem, com ênfase em dietas específicas, como as de baixo índice de fermentação de oligossacarídeos, dissacarídeos, monossacarídeos e polióis (*low-FODMAPs*) e as sem glúten. A dieta e hábitos alimentares apropriados influenciam as funções cognitivas já no período perinatal, apresentando papel fundamental na maturação de órgãos vitais e na implantação de conexões neuronais em modelos animais e humanos. O consumo de uma dieta rica em colesterol (5%) por cinco meses acarreta em uma diminuição da memória espacial em roedores, quando expostos ao teste de labirinto com oito braços (EHRLICH; HUMPEL, 2012). Dieta com suplemento alimentar probiótico ameniza comportamentos semelhantes a ansiedade provocados pela exposição à triclosan (bactericida), causando um aumento na atividade locomotora e na capacidade de aprendizagem em *zebrafish* (ZANG et al., 2019).

O objetivo deste estudo visa testar se a dieta modula aspectos cognitivos e comportamentais em peixes, com utilização de suplementos alimentares como prebióticos e probióticos em machos de alevinos de tilápia-do-Nilo (*Oreochromis niloticus*). Para tanto, os grupos experimentais receberam dieta com adição de prebiótico e probiótico, sendo posteriormente testados quanto aos parâmetros cognitivos através do teste padrão de aprendizagem espacial e, quanto aos parâmetros comportamentais, através da quantificação de confrontos agonísticos pelo paradigma do espelho.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 HISTÓRICO

Antonie van Leeuwenhoek, considerado o pai da Microbiologia, no século XVII, possibilitou a descoberta de diversas bactérias, fungos e protozoários, chamados por ele de “*animalcules*” (do latim, “pequenos animais”), observando a interação de diversos micro-organismos em comunidades complexas em biofilmes (BERG et al., 2020). Já a primeira evidência científica de que micro-organismos fazem parte de um corpo humano normal data da metade do século XIX, através da identificação da bactéria simbiote *Escherichia coli* pelo médico alemão Theodor Escherich em estudos bacteriológicos nos intestinos de crianças saudáveis e doentes (SHULMAN; FRIEDMANN; SIMS, 2007). A descoberta do bacilo de *E. coli* abriu portas para o estudo da microbiota intestinal (LU, 2020).

No século XIX, o bacteriologista alemão Robert Koch desenvolveu o conceito de patogenicidade e afirmou que as doenças humanas e animais eram consequências de infecções microbianas, mudando a percepção de que a comunidade de micro-organismos presentes no corpo humano é danosa à saúde (BERG et al., 2020).

No século XX diversos estudos consolidaram a concepção que apenas uma proporção diminuta de micro-organismos são associados a doenças ou patogenicidade; em contrapartida, a maior parte da comunidade de micro-organismos são essenciais para o funcionamento adequado do ecossistema e são conhecidos por apresentarem interações harmoniosas com outros micro-organismos e macro-organismos (BERG et al., 2020). O Projeto Microbioma Humano (*The Human Microbiome Project*, HMP), uma extensão do Projeto Genoma Humano, foi criado em 2007 com o objetivo de caracterizar as distribuições e evoluções dos micro-organismos constituintes da microbiota humana (TURNBAUGH et al., 2007).

A primeira fase do projeto procurou determinar se havia elementos em comum que caracterizariam uma microbiota saudável e, como resultado, concluíram que a composição taxonômica do microbioma não seria suficiente para correlacionar com o fenótipo do hospedeiro, o que levou a uma segunda

fase de estudos (“The Integrative Human Microbiome Project”, 2019). A segunda fase de estudos - conhecida como Projeto Microbioma Humano Integrativo (*Integrative HMP*) – tem como foco a interação hospedeiro-microbiota de forma holística (“The Integrative Human Microbiome Project”, 2019). Após os avanços obtidos com o HMP, pesquisas foram desenvolvidas para entender as interações da microbiota intestinal em outros modelos animais, como peixes.

2.2 MICROBIOTA INTESTINAL E SAÚDE DO ORGANISMO HOSPEDEIRO

Diversas descobertas relacionam a microbiota intestinal com a saúde do organismo hospedeiro. Algumas das interações descritas na literatura entre o eixo microbiota, cérebro e trato gastrointestinal que podem ser relatadas em outros modelos animais são: animais sem microbiota (*germ free*) apresentaram mudanças nas atividades cerebrais devido à ausência de micro-organismos no trato gastrointestinal, como alterações nos níveis de expressão de genes e proteínas, com influência direta no sistema serotoninérgico campal (CLARKE et al., 2013); alterações comportamentais também foram relatadas, como comorbidades psiquiátricas, comportamentos emocionais, ansiedade e redução de comportamentos estressantes (BERCIK et al., 2011; BRAVO et al., 2011; DESBONNET et al., 2015; MCKERNAN et al., 2010; SAVIGNAC et al., 2014); administração de antibióticos no início da vida e na vida adulta mostraram efeitos de longa duração no cérebro, na medula espinhal e no sistema nervoso entérico (O’MAHONY et al., 2014; VERDU et al., 2008). Segundo pesquisas de Mohajeri et al. (2018) acredita-se que a microbiota esteja relacionada à ansiedade, comportamento, cognição e dor. Outros estudos relacionam a microbiota à depressão, obesidade, autismo, esquizofrenia, mal de Parkinson e doença de Alzheimer (CRYAN et al., 2019). Em animais, a microbiota intestinal desempenha um papel fundamental para o desenvolvimento e maturação do epitélio intestinal e do sistema imune do organismo hospedeiro (SOMMER; BÄCKHED, 2013). A diferenciação do epitélio intestinal está intimamente relacionada com o fortalecimento do sistema imune, pois atua como uma espécie de barreira protetiva, impedindo a instalação de agentes infecciosos na mucosa intestinal e, ao mesmo tempo, permitindo a entrada de nutrientes, água e

eletrólitos para a absorção do organismo (BELKAID; HARRISON, 2017; SYLVIA; DEMAS, 2018).

2.3 PREBIÓTICOS E PROBIÓTICOS

Devido a sua importância para a saúde do organismo, a microbiota se tornou um dos assuntos mais relevantes a serem esmiuçados, devido ao fato de estar relacionada com as disbioses, ou seja, os desequilíbrios da composição e diversidade da microbiota, implicados em doenças no organismo. Para prevenção de disbioses, estudos estão sendo desenvolvidos sobre os efeitos da adição de prebióticos e probióticos na dieta (IEBBA et al., 2016; MARKOWIAK; ŚLIZEWSKA, 2017). Prebióticos são substratos seletivamente utilizados pelos microrganismos, conferindo benefícios na saúde do organismo hospedeiro; já os probióticos são bactérias que teriam um papel simbiótico no organismo hospedeiro (MOHAJERI et al., 2018). Para a Organização das Nações Unidas para a Alimentação e a Agricultura (FAO) e a Organização Mundial da Saúde (OMS), probióticos são “microrganismos vivos que, quando administrados em quantidades adequadas, conferem benefício à saúde do hospedeiro” (ARAYA et al., 2002).

Alguns benefícios no uso de probióticos já foram relatados, como redução na resposta comportamental de estresse em ratos (BERCIK et al., 2011), diminuição na produção de citocinas, conectadas à resposta inflamatória (MCCARTHY et al., 2003), regulação na expressão de receptor GABA em ratos, sendo que alterações neste receptor implicam em patologias como ansiedade e depressão (BRAVO et al., 2011), normalização de resposta imune e concentração de noradrenalina em ratos após separação materna (DESBONNET et al., 2015). A dieta apresenta-se assim como fator crucial na modulação da composição da microbiota (CLARK; MACH, 2016). Por este motivo, a pesquisa sobre microbiota se tornou importante para os estudos da influência alimentar na saúde do organismo. O uso de probióticos é visto como uma alternativa eficaz e ecológica ao uso de antibióticos em peixes, por apresentarem micro-organismos benéficos ao hospedeiro; prebióticos, por sua vez, possuem a capacidade de diminuir a instalação de patógenos no trato

gastrointestinal e/ou modular o desenvolvimento de metabólitos bacterianos relacionados à saúde do organismo hospedeiro (YUKGEHNAISH et al., 2020).

Em peixes, a microbiota modulada por probióticos produz efeitos no comportamento em cardumes, alterando tanto a capacidade de exploração ao ambiente como sociais, apresentando aumento na exploração ambiental e aumento nos níveis de alerta/atenção no grupo experimental, mostrando com isso que existe um caminho bidirecional entre a microbiota e o cérebro (BORRELLI et al., 2016). Ainda de acordo com Borrelli et al. (2016), a microbiota modulada pode provocar mudanças moleculares, através do aumento na produção de gene *bndf* (*brain-derived neurotrophic factor*, fator neurotrófico derivado no cérebro), conhecido pelo aumento nas habilidades cognitivas. Peixes *zebrafish* (*Danio rerio*) *germ free* (sem microbiota) demonstraram mudanças comportamentais na locomoção e comportamentos similares a ansiedade, que foram posteriormente revertidas através da aplicação de probióticos na água, mostrando a importância da dieta no comportamento em modelos animais (DAVIS et al., 2016). Estudos mais recentes demonstram que componentes tóxicos presentes em grandes quantidades nos ambientes aquáticos, como microplásticos e nanoplásticos, também afetam a microbiota intestinal de peixes, alterando neurotransmissores cerebrais e intestinais e diminuindo atividades de natação, de performance de predação e de crescimento corporal, indicando uma ligação entre a microbiota e a anatomia/fisiologia cerebrais em animais, que pode, como consequência, provocar alterações comportamentais e mostram o impacto profundo que a poluição em sistemas aquáticos ocasionam a curto e longo prazo em animais (HUANG et al., 2022).

3 OBJETIVOS

3.1. OBJETIVO GERAL

Testar se dietas com propriedades prebióticas e probióticas modulam aspectos cognitivos e comportamentais dos animais, usando como modelo animal a espécie de peixe tilápia-do-Nilo, *Oreochromis niloticus* (Linnaeus, 1759).

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Testar se suplementos alimentares prebióticos e probióticos modulam o padrão de aprendizagem espacial dos animais;
- Testar se suplementos alimentares prebióticos e probióticos modulam o padrão de interação social dos animais.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 ANIMAIS EXPERIMENTAIS

O estudo foi desenvolvido empregando-se como modelo animal exemplares de alevinos machos de tilápia-do-Nilo, *Oreochromis niloticus* (Linnaeus, 1759), acondicionados por 3 semanas em tanque de 300 L. A tilápia-do-Nilo (*Oreochromis niloticus*), originária da África, pertence à família dos ciclídeos e é utilizada como modelo animal para estudos científicos devido ao fato de se reproduzir rapidamente, pela fácil adaptação à diversas dietas, por resistir à baixa qualidade de água e por ter crescimento mais acelerado em águas quentes (VAJARGAH, 2021). Bastante utilizada para produção, a tilápia é o segundo peixe mais cultivado no mundo, atrás apenas das carpas, sendo a espécie mais importante para Aquicultura no mundo (FAO, 2020; FITZSIMMONS; MENAGA, 2017).

Após período de aclimação, os animais foram distribuídos em aquários individuais, de medidas 45 cm X 15 cm X 12 cm (volume = 8,1 L), revestidos lateralmente por papel na cor azul, com o propósito de minimizar o estresse

provocado pela observação de outro coespecífico (VOLPATO; BARRETO, 2001). A temperatura dos aquários foi controlada (23°C à 25°C) e a alimentação foi ofertada em função da porcentagem do peso de cada animal, duas vezes ao dia, em intervalo de 4 horas. Os aquários apresentaram aeração constante e ciclo de luz de 12h/12h. Os animais foram distribuídos aleatoriamente em três grupos, denominados grupo 1 (n = 18 machos; controle), grupo 2 (n = 18 machos; experimental prebiótico) e grupo 3 (n = 18 machos; experimental probiótico). Os grupos experimentais apresentaram alimentações diferenciadas, com uso de suplementos na ração comercial extrusada apresentando as seguintes composições: grupo 2 com mistura de leveduras (*Saccharomyces cerevisiae*, com propriedades prebióticas) com a ração; grupo 3 com mistura da bactéria *Bacillus subtilis*, com propriedades probióticas, com a ração. O grupo controle foi alimentado apenas com ração comercial, sem uso de suplementos, apresentando a seguinte composição: ácido pantotênico, cobalto, cobre, colina, ferro, iodo, lisina, manganês, niacina, selênio, treonina, zinco, milho integral moído, levedura, farelo de soja, farinha de carne e ossos, farinha de vísceras de aves, óleo de aves, cloreto de sódio (sal comum), BHT, DL-metionina, inositol, ácido fólico, biotina, vitamina A, vitamina C, vitamina D3, vitamina E, vitamina K3, ácido fórmico, farinha de penas, propionato de cálcio, ácido fumárico, tiamina, riboflavina, piridoxina e cianocobalamina.

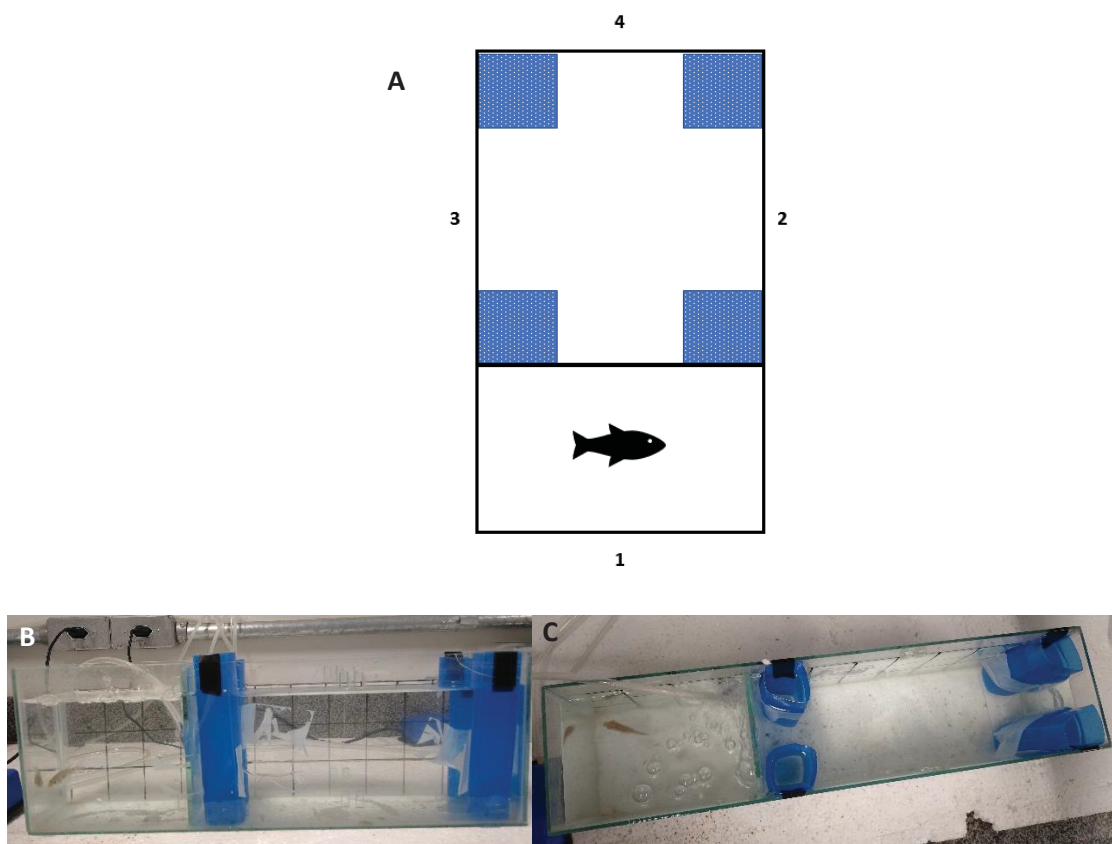
Os grupos experimentais, após o período de aclimação nos aquários individuais, foram alimentados por um mês com as dietas com suplementos até o início dos testes. Dietas contendo prebióticos e probióticos podem modular a microbiota intestinal em alevinos em torno de 30 dias (GONÇALVES; GALLARDO-ESCÁRATE, 2017). O total de animais utilizados neste trabalho foi de 54 indivíduos. Os protocolos experimentais foram aprovados pelo Comitê de Ética para Uso Animal (CEUA) da UFPR (número do protocolo 23075.060810/2020-07).

4.2 TESTE DE APRENDIZAGEM ESPACIAL

Para a quantificação de comportamentos, o aquário de teste foi adaptado, formando um labirinto. Este tipo de teste de aprendizagem é largamente utilizado na comunidade científica, pois demonstra aprendizagem

espacial (TIERNEY; LEE, 2011). O aquário de teste adaptado teve como modelo o desenvolvido pelos estudos de Odling-Smee e Braithwaite (2003), apresentando um compartimento em um dos braços do labirinto com o objetivo de aclimação do animal e como ponto de partida para início do teste (FIGURA 1). Na FIGURA 1 os braços do labirinto são identificados por algarismos arábicos. O braço de número 1 corresponde à área de aclimação de início dos testes. Os braços de números 2, 3 e 4 eram os locais onde as rações eram depositadas de forma aleatória para o teste.

FIGURA 1 - REPRESENTAÇÃO DO LABIRINTO PARA OS EXPERIMENTOS



NOTA: Representação do aquário experimental adaptado para o teste de aprendizagem espacial (A). Áreas em azul indicam colunas onde o animal não tinha acesso. Algarismos arábicos indicam áreas que o animal poderia encontrar ração (alvo). Área de aclimação localizada na indicação por algarismo arábico 1, contendo barreira removível. Possíveis braços onde o animal poderia encontrar o alvo são indicados pelos números 2, 3 e 4. Fotos do aquário experimental adaptado (B e C).

FONTE: Adaptado pela autora (2022).

Os testes de quantificação de comportamentos foram divididos em três momentos: aclimação, pré-teste e teste final, adaptados do protocolo de

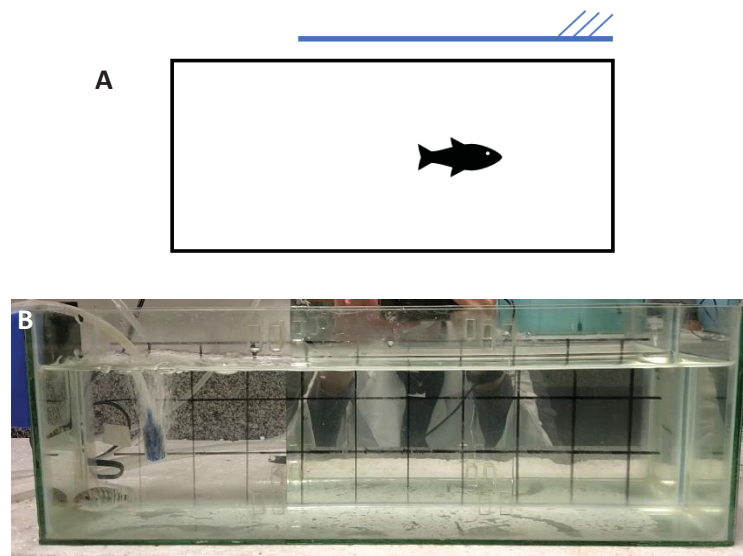
Odling-Smee e Braithwaite (2003). Todos estes momentos foram cronometrados e gravados para análises. No dia anterior aos testes, os animais não foram alimentados.

Para início dos testes, o animal foi acondicionado na cabine de aclimatação no braço 1 do labirinto. O tempo total de aclimatação era de dois minutos. Após este período de tempo teve início o pré-teste, que tem como objetivo a familiarização do peixe ao procedimento, com duração de 10 minutos. Para tanto, após decorridos os dois minutos da aclimatação, o aparato era removido e o peixe pôde explorar livremente o aquário, sem a colocação de pellets de ração nos braços do labirinto. Decorrido o tempo total do pré-teste, o animal era reinserido na cabine de aclimatação por dois minutos para o início do teste propriamente dito. Passado o tempo de aclimatação, o aparato que separa o animal do restante do labirinto era retirado, marcando-se o tempo total que o animal percorrerá até o objetivo final. O braço correspondente ao objetivo final foi escolhido aleatoriamente e o alvo consiste em pellets de ração. A localização de comida, sem pistas indicando sua posição correta, configura em aprendizado espacial (SISON; GERLAI, 2010). Se o animal não localizou o objetivo final em até 10 minutos, o experimento era encerrado. Os testes de quantificação de comportamentos foram realizados com os 54 animais (grupo controle: n = 18 machos; grupo experimental 1 prebiótico: n = 18 machos; grupo experimental 2 probiótico: n = 18 machos), sendo gravados e posteriormente analisados quanto aos aspectos cognitivos.

4.3 TESTE DO PARADIGMA DO ESPELHO

Para avaliação do comportamento social foi utilizado o paradigma do espelho, que consiste na colocação de um espelho, na lateral do aquário, para observação de comportamentos agonísticos (DESJARDINS; FERNALD, 2010) (FIGURA 2).

FIGURA 2 - REPRESENTAÇÃO DO AQUÁRIO EXPERIMENTAL PARA O TESTE DO PARADIGMA DO ESPELHO



NOTA: Representação do aquário experimental para o teste do paradigma do espelho (A). Espelho posicionado lateralmente ao aquário experimental, no lado direito. Foto do aquário experimental (B).

FONTE: Autora (2022).

Comportamentos agonísticos ou competitivos são caracterizados como demonstrações de agressão e submissão em situações de conflitos (KUDRYAVTSEVA, 2000). Peixes apresentam comportamentos agressivos quando refletidos pelo espelho, sugerindo que não há reconhecimento de si mesmo pelo reflexo, e sim a percepção da presença de um coespecífico (DESJARDINS; FERNALD, 2010). A análise de agressão comportou em observação das interações presentes de acordo com protocolo adaptado estabelecido por Alvarenga e Volpato (1995), através de expressões de comportamentos como confronto lateral e confronto frontal. O confronto lateral é determinado quando os indivíduos se posicionam lado a lado, apresentando as caudas na mesma direção ou em direções opostas. O confronto frontal é caracterizado através de agressão com uso da boca, na tentativa de morder o coespecífico. Os testes de interação social foram realizados com os 54 animais (grupo controle: n = 18 machos; grupo experimental 1 probiótico: n = 18 machos; grupo experimental 2 probiótico: n = 18 machos), sendo gravados e

posteriormente analisados quanto aos aspectos sociais. O tempo de duração do teste foi de 10 minutos.

4.4 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

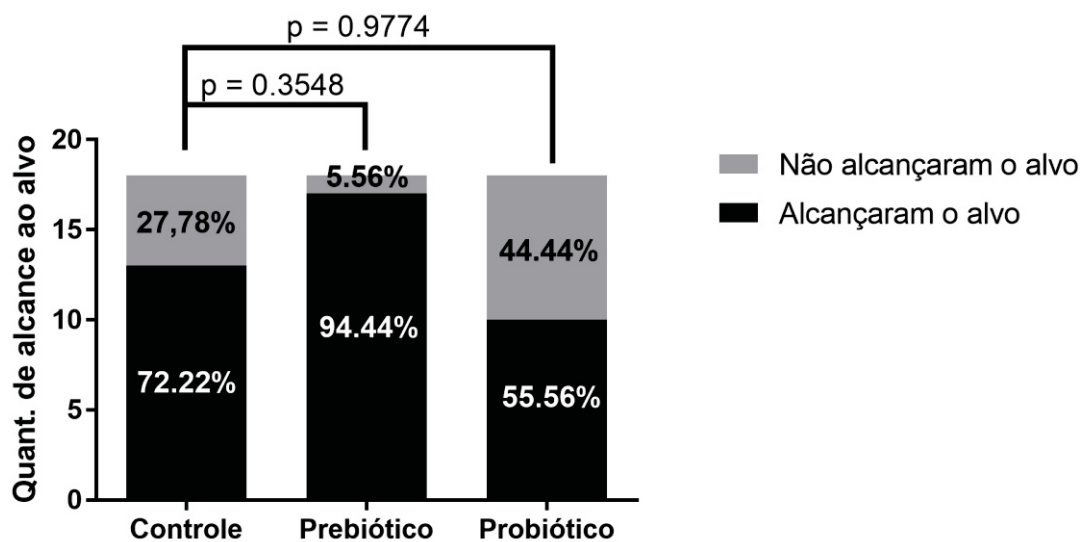
Para análises estatísticas para o Teste de Aprendizagem Espacial e para o Teste do Paradigma do Espelho foram utilizados o teste exato de Fisher, com posterior correções de Bonferroni, para verificar a diferença de proporção entre os grupos (entre grupo controle e grupo experimental prebiótico e entre grupo controle e grupo experimental probiótico). Posteriormente foi realizado o teste não paramétrico de Kruskal-Wallis, seguido de *post-hoc* de Dunn, entre grupo controle e grupo experimental prebiótico e entre grupo controle e grupo experimental probiótico. Seriam considerados diferenças significativas os valores de $p < 0,05$. O software utilizado para as análises estatísticas foi *GraphPad Prism*, versão 7.04.

5 RESULTADOS

5.1 TESTE DE APRENDIZAGEM ESPACIAL

Para o teste de aprendizagem espacial, 72,22% dos indivíduos do grupo controle encontraram o alvo; 94,44% dos indivíduos do grupo experimental prebiótico tiveram êxito em alcançar o alvo; por último, 55,56% dos indivíduos do grupo experimental probiótico chegaram ao alvo (GRÁFICO 1). O teste exato de Fisher foi realizado para verificar a diferença de proporção entre os grupos. Com isso, o valor de p para análise de Fisher entre grupo controle e grupo experimental prebiótico foi de 0,3548 após correção de Bonferroni, não apresentando diferenças significativas entre os grupos. Já o resultado do teste de Fisher para grupo controle e grupo experimental probiótico resultou em $p = 0,9774$, após correção de Bonferroni, não havendo diferença significativa entre os grupos analisados (GRÁFICO 1).

GRÁFICO 1 - PORCENTAGEM DOS GRUPOS QUE ENCONTRARAM O ALVO

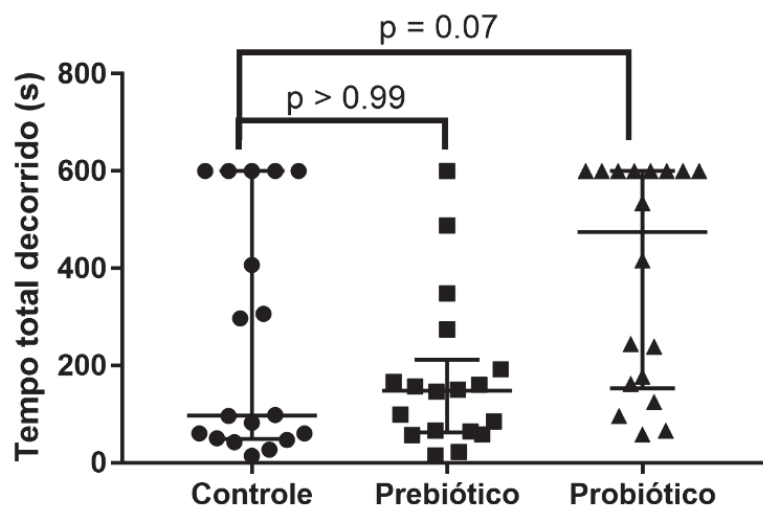


NOTA: Porcentagem dos grupos que encontraram o alvo. Dados analisados pelo teste exato de Fisher entre o grupo controle e experimental prebiótico ($p = 0,3548$) e entre grupo controle e experimental probiótico ($p = 0,9774$), ambos não significativos. Valores de p obtidos após correção de Bonferroni.

FONTE: A autora (2022).

Após a análise estatística pelo teste não paramétrico de Kruskal-Wallis, o valor de p encontrado foi de 0,0226, indicando que há diferenças significativas entre os grupos controle e experimentais. Em seguida, foi realizado *post-hoc* de Dunn, constatando-se que não há diferenças significativas entre os grupos controle e o grupo experimental prebiótico ($p > 0,9999$) e entre grupo controle e grupo experimental probiótico ($p = 0,0696$) (GRÁFICO 2). Pelo fato do valor de p encontrado entre o grupo controle e grupo experimental probiótico ser relativamente próximo ao patamar significativo de 0,05, é possível constatar que a suplementação com probiótico pode apresentar variação no teste de aprendizagem espacial e possível significância biológica, sendo necessário mais estudos para este fator, com maior valor amostral. Sendo assim, é possível inferir que o uso de suplementação alimentar provocou mudanças no comportamento exploratório no teste de aprendizagem espacial, com destaque ao uso de probiótico, que apresentou comprometimento no desempenho no referido teste.

GRÁFICO 2 - TESTE DE APRENDIZAGEM ESPACIAL ENTRE OS GRUPOS PELO TEMPO TOTAL DECORRIDO EM ALCANÇAR O ALVO (EM S)



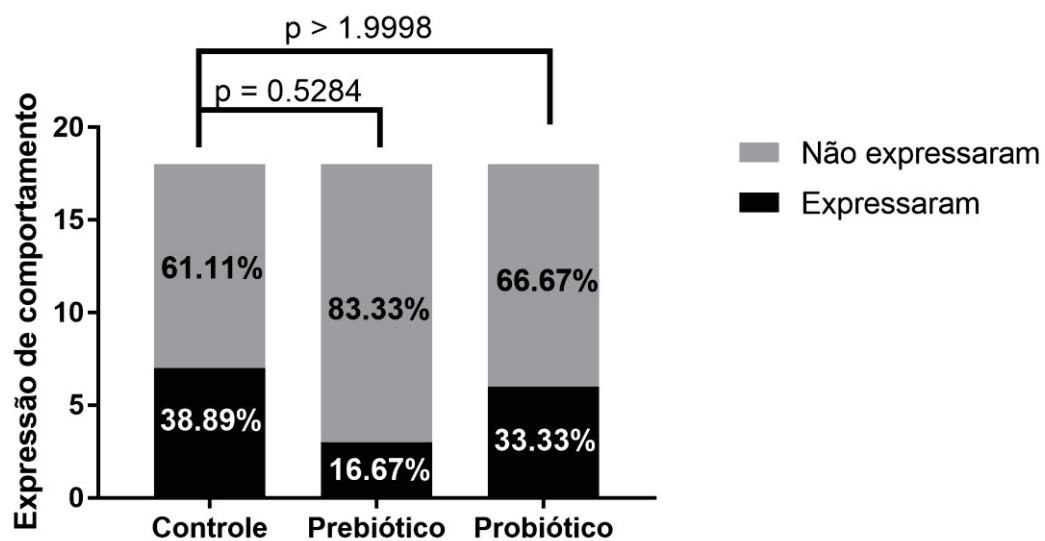
NOTA: Dados sobre teste de aprendizagem espacial para cada grupo, feito por análise de Kruskal-Wallis ($p = 0,0226$), seguido de teste de comparações múltiplas de Dunn, sendo $p > 0,99$ entre grupo controle e grupo experimental prebiótico e $p = 0,07$ (valor aproximado) entre grupo controle e grupo experimental probiótico.

FONTE: A autora (2022).

5.2 TESTE DO PARADIGMA DO ESPELHO

Para o teste do Paradigma do Espelho, expressaram confronto lateral 38,89% dos animais do grupo controle, 16,67% dos animais do grupo experimental prebiótico e 33,33% dos animais do grupo experimental probiótico (GRÁFICO 3).

GRÁFICO 3 - EXPRESSÃO DE CONFRONTO AGONÍSTICO LATERAL (EM %)

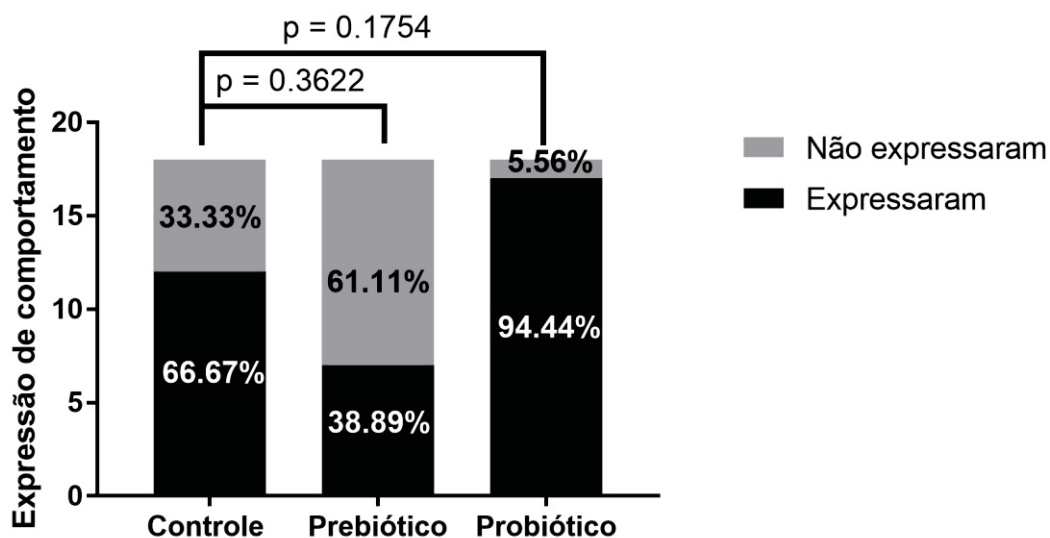


NOTA: Porcentagem dos grupos que expressaram comportamento agonístico do tipo lateral. Dados analisados pelo teste exato de Fisher entre o grupo controle e experimental prebiótico ($p = 0.5284$) e entre grupo controle e experimental probiótico ($p > 1.9998$). Valores de p obtidos após correção de Bonferroni.

FONTE: A autora (2022).

Para confronto frontal, expressaram comportamentos agonísticos 66,67% dos animais do grupo controle, 38,89% dos animais do grupo experimental prebiótico e 94,44% dos animais do grupo experimental probiótico (GRÁFICO 4).

GRÁFICO 4 - EXPRESSÃO DE CONFRONTO AGONÍSTICO FRONTAL (EM %)



NOTA: Porcentagem dos grupos que expressaram comportamento agonístico do tipo frontal. Dados analisados pelo teste exato de Fisher entre o grupo controle e experimental prebiótico ($p = 0.3622$) e entre grupo controle e experimental probiótico ($p = 0.1754$). Valores de p obtidos após correção de Bonferroni.

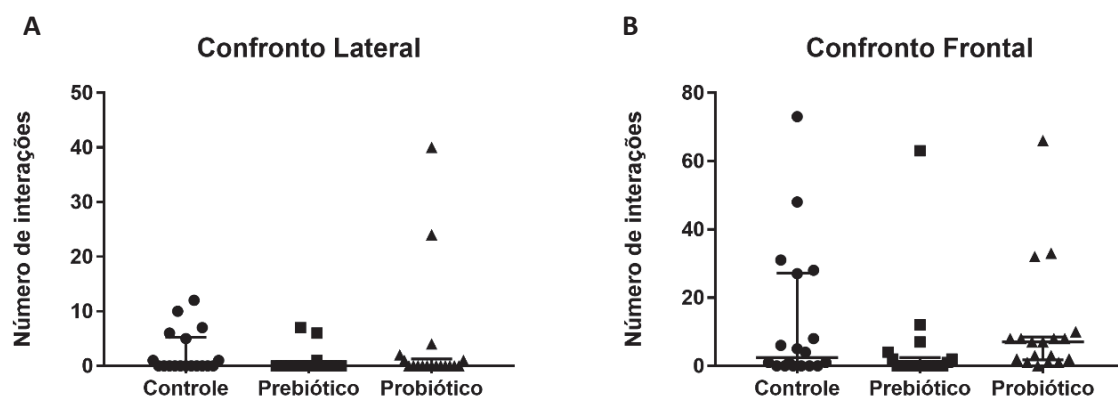
FONTE: A autora (2022).

O teste exato de Fisher foi realizado para verificar a diferença de proporção entre os grupos para cada tipo de confronto. Para confronto lateral, o valor de p para o teste de Fisher entre grupo controle e grupo experimental prebiótico foi de 0,5284, após correção de Bonferroni, não apresentando diferenças significativas entre os grupos (GRÁFICO 3). Já o resultado do teste de Fisher para confronto lateral entre grupo controle e grupo experimental probiótico resultou em $p > 1,9998$, feita a correção de Bonferroni, não havendo diferença significativa entre os grupos analisados (GRÁFICO 3). Com relação ao confronto frontal, o teste exato de Fisher indicou $p = 0,3622$, após correção de Bonferroni, entre grupo controle e grupo experimental prebiótico e valor de $p = 0,1754$, após correção de Bonferroni, entre grupo controle e grupo experimental probiótico, não apresentando diferenças significativas entre os grupos neste tipo de confronto (GRÁFICO 4).

Foi realizado o teste não paramétrico de Kruskal-Wallis para cada tipo de confronto. Para confronto lateral, o valor de p encontrado no teste de Kruskal-Wallis foi de 0,3146, ou seja, não há diferenças significativas entre os grupos analisados. O *post-hoc* de Dunn também indicou a inexistência de diferenças

significativas entre o grupo controle e grupo experimental prebiótico ($p = 0,2827$) e entre o grupo controle e grupo experimental probiótico ($p > 0,9999$) (GRÁFICO 5). Para confronto frontal, o teste de Kruskal-Wallis apresentou diferenças significativas entre os grupos, sendo $p = 0,0106$. Feito o *post-hoc* de Dunn, verificou-se que não há diferenças significativas entre o grupo controle e grupo experimental prebiótico ($p = 0,1540$) e entre o grupo controle e grupo experimental probiótico ($p = 0,4352$) (GRÁFICO 5). Assim, é possível deduzir que a dieta diferenciada não provocou mudanças na interação social entre os animais.

GRÁFICO 5 - NÚMERO DE INTERAÇÕES PARA CONFRONTO LATERAL E CONFRONTO FRONTAL DO TESTE PARADIGMA DO ESPELHO



NOTA: Número de expressões de comportamento lateral e frontal para cada grupo, representado de acordo com a mediana com intervalo interquartil. Dados analisados de confronto lateral (A) por teste não paramétrico de Kruskal-Wallis ($p = 0.3146$), seguido de teste de múltiplas comparações de Dunn entre grupo controle e grupo experimental prebiótico ($p = 0.2827$) e entre grupo controle e grupo experimental probiótico ($p > 0.9999$). Para confronto frontal (B), dados analisados por Kruskal-Wallis ($p = 0.0106$), seguido de teste de múltiplas comparações de Dunn entre grupo controle e grupo experimental prebiótico ($p = 0.1540$) e entre grupo controle e grupo experimental probiótico ($p = 0.4352$).

FONTE: A autora (2022).

6 DISCUSSÃO

Para Yukgehnash et al. (2020), a utilização de suplementos na dieta em peixes, como o uso de prebióticos e probióticos, traz impactos positivos tanto no metabolismo dos animais como também na imunidade, proporcionando uma barreira que impede o crescimento de patógenos na região gastrointestinal. O uso de probióticos na dieta em peixes permite uma maior digestibilidade dos nutrientes, essencial para o metabolismo animal (MARTÍNEZ CRUZ et al., 2012). No que se refere ao impacto da dieta com suplementação aplicada em peixes, podemos deduzir pelos resultados do trabalho que não interfere diretamente na questão comportamental, já que nos testes do paradigma do espelho realizados não foram encontradas diferenças significativas entre os grupos, ou seja, não repercutiu em mudanças no padrão das interações sociais.

Nos estudos de Borrelli et al. (2016), constatou-se que o uso de suplemento alimentar probiótico acarretou em alterações comportamentais em cardumes, elevando os níveis de alerta/atenção nos peixes. No presente trabalho, os experimentos foram realizados com os animais acondicionados individualmente em aquários, o que não possibilitou verificar as possíveis diferenças nas interações sociais quando em contexto de cardume, diluindo, desta maneira, possíveis alterações comportamentais. Dieta com suplementação probiótica contendo *Bacillus subtilis* não apresentou diferenças significativas em atividades agonísticas agressivas em estudo feito com tilápia-do-Nilo (*Oreochromis niloticus*), corroborando os resultados encontrados neste trabalho (SOLTAN; EL-L, 2008).

Relativamente à aprendizagem espacial, o trabalho constatou que a utilização de suplementação alimentar impactou na aprendizagem dos animais. O uso de probiótico na dieta de peixes pode apresentar diferenças no quesito aprendizagem, sendo necessário um valor amostral maior para compreender o real impacto biológico no uso desse tipo de suplementação alimentar na aprendizagem espacial de peixes. O uso de suplementação probiótica na dieta mostrou que há um comprometimento no desempenho dos animais, com incremento no tempo decorrido até encontrar o alvo no referido teste. O segundo impacto a ser reportado é relacionado ao grupo experimental prebiótico: neste grupo houve um acréscimo no nível de sucesso de alcance ao alvo, comparando-

se com os grupos controle e experimental probiótico. Brown (2015) indica que peixes vivem em ambientes complexos e instáveis na maior parte do tempo, exigindo, desta maneira, uma capacidade de memória espacial robusta.

Segundo Novotný, Klimova e Valis (2019), em seus estudos com seres humanos, a dieta possui o potencial de interferir no processo de aprendizagem, através da modulação da microbiota intestinal. Ainda de acordo com este estudo, a aprendizagem pode ser aprimorada de acordo com a dieta e a modulação da microbiota intestinal, indicando que a modulação está relacionada à absorção de nutrientes, distribuição de energia e imunidade. Dito isso, é possível constatar que a suplementação alimentar comprometeu o desempenho no quesito aprendizagem em peixes neste trabalho.

A microbiota intestinal em peixes é influenciada por fatores bióticos ou intrínsecos, como: genética, estágio reprodutivo, idade, estresse, status nutricional; e também por fatores abióticos ou extrínsecos, como ambiente, qualidade da água e dieta (BUTT; VOLKOFF, 2019). Um fator extrínseco a ser adicionado a esta lista seria o isolamento social, que, conforme o encontrado neste trabalho, pode influenciar nas interações sociais e na aprendizagem.

De acordo com Brandão, Braithwaite e Gonçalves-de-Freitas (2015), em seu trabalho com ciclídeos *Cichlasoma paranaense*, um animal social, foi verificado que o isolamento social leva a uma diminuição de performance em tarefas de aprendizagem associativa, mostrando que o isolamento social de peixes deve ser levado em consideração na interpretação de resultados. Como a tilápia-do-Nilo também faz parte da família Cichlidae e, portanto, apresenta comportamento social, constata-se que o isolamento social produz a diluição de comportamentos, impactando na aprendizagem e na interação dos animais.

A maioria dos estudos sobre os efeitos do uso de prebióticos e probióticos em peixes é focada em crescimento corporal, imunidade, como alternativa ao uso de antibióticos (YUKGEHNAISH et al., 2020), metabolismo, homeostase energética e reprodução (BUTT; VOLKOFF, 2019), mostrando que o uso de suplementação alimentar proporciona benefícios à saúde do organismo hospedeiro. Esses suplementos são amplamente utilizados na Aquicultura, sendo que os probióticos possibilitam o estabelecimento de bactérias benéficas no trato gastrointestinal de peixes e os prebióticos, por sua vez, estimulam o crescimento dessas bactérias probióticas. Este trabalho proporcionou um novo

olhar a ser explorado, que seria o lado comportamental e de aprendizagem nos animais. Para estudos futuros seria importante se atentar as características do modelo animal, como modo de vida social, por exemplo.

7 CONCLUSÃO

A realização deste trabalho apontou que a utilização de suplementação na dieta, como o uso de prebióticos e probióticos, não compromete o padrão de interações sociais nos peixes. Por outro lado, o uso de suplementação probiótica compromete o desempenho da aprendizagem espacial.

REFERÊNCIAS

- ALLEN, A. P. et al. A psychology of the human brain-gut-microbiome axis. **Social and Personality Psychology Compass**, v. 11, n. 4, p. e12309, abr. 2017.
- ALVARENGA, C. M. D.; VOLPATO, G. L. Agonistic profile and metabolism in alevins of the Nile tilapia. **Physiology and Behavior**, v. 57, n. 1, p. 75–80, 1995.
- ARAYA, M. et al. Guidelines for the evaluation of probiotics in food. **Joint FAO/WHO Working Group Report on Drafting Guidelines for the Evaluation of Probiotics in Food**, p. 1–11, 1 jan. 2002.
- ASHTON, B. J. et al. Cognitive performance is linked to group size and affects fitness in Australian magpies. **Nature**, v. 554, n. 7692, p. 364–367, 7 fev. 2018.
- BÄCKHED, F. et al. Host-bacterial mutualism in the human intestine. **Science**, v. 307, n. 5717, p. 1915–1920, 2005.
- BAQUERO, F.; NOMBELA, C. The microbiome as a human organ. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 18, p. 2–4, jul. 2012.
- BELKAID, Y.; HARRISON, O. J. Homeostatic Immunity and the Microbiota. **Immunity**, v. 46, n. 4, p. 562–576, 2017.
- BERCIK, P. et al. The intestinal microbiota affect central levels of brain-derived neurotropic factor and behavior in mice. **Gastroenterology**, v. 141, n. 2, p. 599–609, 2011.
- BERG, G. et al. Correction to: Microbiome definition re-visited: old concepts and new challenges. **Microbiome**, v. 8, n. 1, p. 1–22, 2020.
- BERMÚDEZ-HUMARÁN, L. G. et al. From probiotics to psychobiotics: Live beneficial bacteria which act on the brain-gut axis. **Nutrients**, v. 11, n. 4, 2019.
- BORRELLI, L. et al. Probiotic modulation of the microbiota-gut-brain axis and behaviour in zebrafish. **Scientific Reports**, v. 6, n. 1, p. 30046, 15 set. 2016.
- BRANDÃO, M. L.; BRAITHWAITE, V. A.; GONÇALVES-DE-FREITAS, E. Isolation impairs cognition in a social fish. **Applied Animal Behaviour Science**, v. 171, p. 204–210, out. 2015.
- BRAVO, J. A. et al. Ingestion of Lactobacillus strain regulates emotional behavior and central GABA receptor expression in a mouse via the vagus nerve. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 108, n. 38, p. 16050–16055, 2011.
- BROWN, C. Fish intelligence, sentience and ethics. **Animal Cognition**, v. 18,

n. 1, p. 1–17, 19 jan. 2015.

BUTT, R. L.; VOLKOFF, H. Gut microbiota and energy homeostasis in fish. **Frontiers in Endocrinology**, v. 10, n. JAN, p. 6–8, 2019.

CLARK, A.; MACH, N. Exercise-induced stress behavior, gut-microbiota-brain axis and diet: A systematic review for athletes. **Journal of the International Society of Sports Nutrition**, v. 13, n. 1, p. 1–21, 2016.

CLARKE, G. et al. The microbiome-gut-brain axis during early life regulates the hippocampal serotonergic system in a sex-dependent manner. **Molecular Psychiatry**, v. 18, n. 6, p. 666–673, 2013.

CRYAN, J. F. et al. The microbiota-gut-brain axis. **Physiological Reviews**, v. 99, n. 4, p. 1877–2013, 2019.

DAVIS, D. J. et al. Microbial modulation of behavior and stress responses in zebrafish larvae. **Behavioural Brain Research**, v. 311, p. 219–227, set. 2016.

DESBONNET, L. et al. Gut microbiota depletion from early adolescence in mice: Implications for brain and behaviour. **Brain, Behavior, and Immunity**, v. 48, n. April, p. 165–173, 2015.

DESJARDINS, J. K.; FERNALD, R. D. What do fish make of mirror images? **Biology Letters**, v. 6, n. 6, p. 744–747, 2010.

DINAN, T. G. et al. Collective unconscious: How gut microbes shape human behavior. **Journal of Psychiatric Research**, v. 63, n. 1, p. 1–9, abr. 2015.

DINAN, T. G.; STANTON, C.; CRYAN, J. F. Psychobiotics: A novel class of psychotropic. **Biological Psychiatry**, v. 74, n. 10, p. 720–726, 2013.

EHRlich, D.; HUMPEL, C. Chronic vascular risk factors (cholesterol, homocysteine, ethanol) impair spatial memory, decline cholinergic neurons and induce blood–brain barrier leakage in rats in vivo. **Journal of the Neurological Sciences**, v. 322, n. 1–2, p. 92–95, nov. 2012.

FAO (ED.). **The State of World Fisheries and Aquaculture 2020**. [s.l.] FAO, 2020.

FITZSIMMONS, K.; MENAGA, M. Growth of the tilapia industry in India. **World Aquaculture**, v. 48, p. 49–52, 2017.

GILL, S. R. et al. Metagenomic Analysis of the Human Distal Gut Microbiome. **Science**, v. 312, n. 5778, p. 1355–1359, 2 jun. 2006.

GÓMEZ, G. D.; BALCÁZAR, J. L. A review on the interactions between gut microbiota and innate immunity of fish: Table 1. **FEMS Immunology & Medical Microbiology**, v. 52, n. 2, p. 145–154, mar. 2008.

GONÇALVES, A. T.; GALLARDO-ESCÁRATE, C. Microbiome dynamic modulation through functional diets based on pre- and probiotics (mannan-oligosaccharides and *Saccharomyces cerevisiae*) in juvenile rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). **Journal of Applied Microbiology**, v. 122, n. 5, p. 1333–1347, 2017.

HUANG, J.-N. et al. Micro/nano-plastics cause neurobehavioral toxicity in discus fish (*Symphysodon aequifasciatus*): Insight from brain-gut-microbiota axis. **Journal of Hazardous Materials**, v. 421, p. 126830, jan. 2022.

IEBBA, V. et al. Eubiosis and dysbiosis: the two sides of the microbiota. **The new microbiologica**, v. 39, n. 1, p. 1–12, 2016.

IKEDA-OHTSUBO, W. et al. How Can We Define “Optimal Microbiota?”: A Comparative Review of Structure and Functions of Microbiota of Animals, Fish, and Plants in Agriculture. **Frontiers in Nutrition**, v. 5, 2 out. 2018.

JOHNSON, K. V. A. Gut microbiome composition and diversity are related to human personality traits. **Human Microbiome Journal**, v. 15, n. December 2019, p. 100069, 2020.

KUDRYAVTSEVA, N. N. Agonistic behavior: A model, experimental studies, and perspectives. **Neuroscience and Behavioral Physiology**, v. 30, n. 3, p. 293–305, 2000.

LIU, H. et al. The gut microbiome and degradation enzyme activity of wild freshwater fishes influenced by their trophic levels. **Scientific Reports**, v. 6, n. 1, p. 24340, 13 abr. 2016.

LU, Z. Microbiota Research: From History to Advances. **E3S Web of Conferences**, v. 145, p. 01014, 6 fev. 2020.

MARKOWIAK, P.; ŚLIZEWSKA, K. Effects of probiotics, prebiotics, and synbiotics on human health. **Nutrients**, v. 9, n. 9, 2017.

MARTÍNEZ CRUZ, P. et al. Use of Probiotics in Aquaculture. **ISRN Microbiology**, v. 2012, p. 1–13, 16 out. 2012.

MCCARTHY, J. et al. Double blind, placebo controlled trial of two probiotic strains in interleukin 10 knockout mice and mechanistic link with cytokine balance. **Gut**, v. 52, n. 7, p. 975–980, 2003.

MCKERNAN, D. P. et al. The probiotic *Bifidobacterium infantis* 35624 displays visceral antinociceptive effects in the rat. **Neurogastroenterology and Motility**, v. 22, n. 9, p. 1029–1036, 2010.

MOHAJERI, M. H. et al. The role of the microbiome for human health: from basic science to clinical applications. **European Journal of Nutrition**, v. 57, n. 1, p. 1–14, 2018.

- NAYAK, S. K. Role of gastrointestinal microbiota in fish. **Aquaculture Research**, v. 41, n. 11, p. 1553–1573, out. 2010.
- NOVOTNÝ, M.; KLIMOVA, B.; VALIS, M. Microbiome and cognitive impairment: Can any diets influence learning processes in a positive way? **Frontiers in Aging Neuroscience**, v. 11, n. JUN, p. 1–7, 2019.
- O'MAHONY, S. M. et al. Disturbance of the gut microbiota in early-life selectively affects visceral pain in adulthood without impacting cognitive or anxiety-related behaviors in male rats. **Neuroscience**, v. 277, n. August, p. 885–901, 2014.
- ODLING-SMEE, L.; BRAITHWAITE, V. A. The influence of habitat stability on landmark use during spatial learning in the three-spined stickleback. **Animal Behaviour**, v. 65, n. 4, p. 701–707, 2003.
- SAVIGNAC, H. M. et al. Bifidobacteria exert strain-specific effects on stress-related behavior and physiology in BALB/c mice. **Neurogastroenterology and Motility**, v. 26, n. 11, p. 1615–1627, 2014.
- SENDER, R.; FUCHS, S.; MILO, R. Revised Estimates for the Number of Human and Bacteria Cells in the Body. **PLoS Biology**, v. 14, n. 8, p. 1–14, 2016.
- SHERWIN, E. et al. Microbiota and the social brain. **Science**, v. 366, n. 6465, 2019.
- SHULMAN, S. T.; FRIEDMANN, H. C.; SIMS, R. H. Theodor Escherich: The First Pediatric Infectious Diseases Physician? **Clinical Infectious Diseases**, v. 45, n. 8, p. 1025–1029, 15 out. 2007.
- SISON, M.; GERLAI, R. Associative learning in zebrafish (*Danio rerio*) in the plus maze. **Behavioural Brain Research**, v. 207, n. 1, p. 99–104, 2010.
- SOLTAN, M.; EL-L, S. Effect of probiotics and some spices as feed additives on the performance and behaviour of the Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*. **Egyptian Journal of Aquatic Biology and Fisheries**, v. 12, n. 2, p. 63–80, 1 abr. 2008.
- SOMMER, F.; BÄCKHED, F. The gut microbiota — masters of host development and physiology. **Nature Reviews Microbiology**, v. 11, n. 4, p. 227–238, 25 abr. 2013.
- SYLVIA, K. E.; DEMAS, G. E. A gut feeling: Microbiome-brain-immune interactions modulate social and affective behaviors. **Hormones and Behavior**, v. 99, n. September 2017, p. 41–49, 2018.
- The Integrative Human Microbiome Project. **Nature**, v. 569, n. 7758, p. 641–648, 29 maio 2019.

TIERNEY, A. J.; LEE, J. Spatial learning in a T-maze by the crayfish *Orconectes rusticus*. **Journal of Comparative Psychology**, v. 125, n. 1, p. 31–39, 2011.

TURNBAUGH, P. J. et al. The Human Microbiome Project. **Nature**, v. 449, n. 7164, p. 804–810, 17 out. 2007.

VAJARGAH, M. F. A review of the physiology and biology of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). v. 10, n. 6, p. 244–246, 2021.

VERDU, E. F. et al. The role of luminal factors in the recovery of gastric function and behavioral changes after chronic *Helicobacter pylori* infection. **American Journal of Physiology - Gastrointestinal and Liver Physiology**, v. 295, n. 4, p. 664–670, 2008.

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, n. 8, p. 1041–1045, ago. 2001.

VOVERIENĖ, G.; MICKĖNIENĖ, L.; ŠYVOKIENĖ, J. Hydrocarbon-Degrading Bacteria in the Digestive Tract of Fish, their Abundance, Species Composition, and Activity. **Acta Zoologica Lituanica**, v. 12, n. 3, p. 333–340, 23 jan. 2002.

WHITE, G. E.; BROWN, C. A comparison of spatial learning and memory capabilities in intertidal gobies. **Behavioral Ecology and Sociobiology**, v. 68, n. 9, p. 1393–1401, 2014.

YUKGEHNAISH, K. et al. Gut microbiota metagenomics in aquaculture: factors influencing gut microbiome and its physiological role in fish. **Reviews in Aquaculture**, v. 12, n. 3, p. 1903–1927, 2020.

ZANG, L. et al. Dietary *Lactobacillus plantarum* ST-III alleviates the toxic effects of triclosan on zebrafish (*Danio rerio*) via gut microbiota modulation. **Fish & Shellfish Immunology**, v. 84, p. 1157–1169, jan. 2019.