

RESSALVA

Atendendo solicitação do autor,
o texto completo desta tese será
disponibilizado somente a partir
de 14/08/2021

unesp

CAMPUS DE SÃO JOSÉ DO RIO PRETO

Sociality, cognition and brain complexity in Neotropical cichlids

Manuela Lombardi Brandão

Sistemática
Evolução

DOUTORADO

PÓS GRADUAÇÃO
EM BIOLOGIA ANIMAL

Biologia
Estrutural





UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Câmpus de São José do Rio Preto

Manuela Lombardi Brandão

Sociality, cognition and brain complexity in Neotropical cichlids

São José do Rio Preto
2020

Manuela Lombardi Brandão

Sociality, cognition and brain complexity in Neotropical cichlids

Tese apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Biologia Animal, junto ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Animal, do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Câmpus de São José do Rio Preto.

Financiadora: FAPESP – Proc. 2016/26160-2 e
2019/10808-1
CAPES / DS 001

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Eliane Gonçalves de Freitas
Coorientador: Prof. Dr. Rui F. Oliveira

São José do Rio Preto
2020

B817s Brandão, Manuela Lombardi
Sociality, cognition and brain complexity in Neotropical cichlids /
Manuela Lombardi Brandão. -- São José do Rio Preto, 2020
127 p. : il., tabs., fotos

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp),
Instituto de Biociências Letras e Ciências Exatas, São José do Rio
Preto

Orientadora: Eliane Gonçalves-de-Freitas
Coorientador: Rui Filipe Oliveira

1. Comportamento animal. 2. Comportamento social. 3. Ciclídeos
neotropicais. 4. Células cerebrais. 5. Cognição. I. Título.

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca do Instituto de
Biociências Letras e Ciências Exatas, São José do Rio Preto. Dados fornecidos pelo
autor(a).

Essa ficha não pode ser modificada.

Manuela Lombardi Brandão

Sociality, cognition and brain complexity in Neotropical cichlids

Tese apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Biologia Animal, junto ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Animal, do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Câmpus de São José do Rio Preto.

Financiadora: FAPESP – Proc. 2016/26160-2 e
2019/10808-1
CAPES / DS 001

Comissão Examinadora

Prof^a. Dr^a. Eliane Gonçalves de Freitas
UNESP – Câmpus de São José do Rio Preto
Orientadora

Prof. Dr. Alexander Kotrschal
Stockholm University – Suécia

Prof^a. Dr^a. Ana Celia Silva Barbato
Universidad de la República – Uruguai

Prof^a. Dr^a. Marisa Fernandes de Castilho
UFPR – Câmpus de Assis

Prof. Dr. Redouan Bshary
Neuchâtel University – Suíça

São José do Rio Preto
28 de fevereiro de 2020

*Aos meus pais, Manoel e Marcia,
meus maiores exemplos e melhores amigos*

AGRADECIMENTOS

Não há palavras que possam ser ditas ou escritas para agradecer aos meus pais, Marcia e Manoel, por tudo o que fizeram e fazem por mim todos os dias. Vocês dois nunca mediram esforços para que eu pudesse ter as melhores condições, em todos os sentidos, fazendo de mim uma pessoa extremamente privilegiada. A Educação das suas duas filhas sempre veio em primeiro lugar, e vocês nunca pouparam esforços para garanti-la. Agradeço por terem dado à mim e à Marília o melhor e mais completo lar, cheio de amor, risadas, cumplicidade e proteção. Agradeço por terem me ensinado a questionar, a ter pensamento crítico, a ser independente como mulher. Uma vida não é suficiente para agradecer e amar vocês. Obrigada do fundo do coração.

Agradeço à minha irmã Marília, a caçula que precisava de uma irmã mais velha para dar o bom exemplo (espero ter conseguido, pelo menos na maior parte do tempo...). Por ser hoje uma recém mulher tão bonita, inteligente e independente, que com seu jeitinho nem sempre do mais "sutil" cuida da sua família com muito amor e afinco. Agradeço, enfim, por ser a minha amiga querida, que me ajuda a aliviar o peso das costas em dias não tão ensolarados, mesmo sem perceber.

Agradeço ao meu companheiro de vida, Vinicius, por ter estado ao meu lado, literalmente, em todas as etapas da minha vida acadêmica. Você tornou (e torna) tudo mais fácil. Obrigada por ter sido meu primeiro ajudante de laboratório. Obrigada por ter chorado de alegria quando eu passei no Mestrado. Obrigada por ter me confortado quando o desespero batia e eu não queria fazer mais nada. Obrigada por estar do meu lado em todos os momentos, na alegria e na tristeza, meu eterno namorado.

Agradeço à minha orientadora, Eliane, por todos esses 10 anos de convívio e por tudo o que você me ensinou durante eles. Não falo menos dos ensinamentos acadêmicos (que não caberiam nessas páginas!) mas mais da postura com a qual você nos ensina todos os dias. Por ser uma excelente Professora (com P maiúsculo), nos mostrando que devemos sempre dar o nosso melhor na profissão que escolhemos, embora o Brasil não seja o lugar mais cordial com os seus educadores. A sermos corretos e humildes com o conhecimento que produzimos, e que devemos retornar à sociedade da melhor forma possível. Agradeço por todas as correções e assinaturas, conselhos e conversas, projetos e incentivos, preocupações divididas; enfim, por toda a dedicação à minha formação durante todos esses anos. Agradeço, professora, a sua amizade e ensinamentos de uma década. Obrigada por acreditar e confiar em mim.

Agradeço aos meus amigos de laboratório (e fora dele), Ana Gauy, Felipe Dorigão e Marcela Bolognesi por todo o companheirismo dos últimos anos. Pela ajuda inestimável de vocês dentro do laboratório, sem a qual esse trabalho não existiria. E pela ajuda fora do laboratório, também. A amizade e companheirismo de vocês me fez existir durante esse doutorado.

Agradeço ao meu coorientador, professor Rui F. Oliveira, que mesmo com um oceano de distância esteve presente durante toda a construção dessa tese de doutorado, desde o dia um. Agradeço imensamente por ter me ajudado a ampliar meus horizontes, tanto como pesquisadora quanto como pessoa, me recebendo de braços abertos em seu laboratório em Portugal. Essa oportunidade foi ímpar na minha jornada, e com certeza mudou os rumos do meu futuro. Obrigada, Rui, pelos ensinamentos, discussões e confiança investidos em mim ao longo desses anos de doutorado. E, não menos importante, pelos sonhos que me ajudou a realizar nesse ínterim.

Agradeço à professora Thais Billalba de Carvalho, que me recebeu em seu laboratório na UFAM e me auxiliou da melhor forma possível durante toda a coleta de dados, providenciando todos os materiais e peixes e salas e equipamentos que eu poderia ter pedido, e mais um pouco.

Agradeço à minha querida amiga manauara Sheila Lima, minha companheira incansável de laboratório, que levava comigo uma jornada de quase 12 horas de laboratório sempre me

fazendo rir e esquecer que eu estava com fome, mas não podia parar. Obrigada, Sheilinha, por me apresentar o tacacá (sem goma!), o sorvete de cupuaçu, o MUSA embaixo de chuva e o açaí sem açúcar.

Agradeço aos amigos “estrangeiros” pela recepção maravilhosa que sempre me proporcionam no laboratório de Biologia Integrativa do Comportamento, em Portugal. Agradeço imensamente à Magda Teles, que me ajudou na burocracia infundável durante o transporte de cérebros Brasil/Portugal, me ensinou a técnica do fracionador isotrópico, e quebrou a cabeça comigo fazendo tudo funcionar da melhor forma possível. Agradeço ao meu companheiro de bancada, Miguel Correia, pelas conversas sobre política durante o almoço, e pelas conversas sobre comida durante o trabalho de bancada. E pela troca de lamúrias quando as coisas não saíam como o planejado. Agradeço à Rita Nunes por me apresentar pontos de Lisboa que eu não conhecia e que me fizeram amar ainda mais aquela cidade maravilhosa. Agradeço ao professor Kent Dunlap pela troca de experiências acadêmicas e pessoais, e pela convivência sempre tão alegre e entusiasmada que oferecia a todos em dias de trabalho cansativos. Agradeço, enfim, às todas as pessoas tão queridas que conheci no Instituto Gulbenkian de Ciência, e que me ajudaram a não me sentir tão estrangeira num país desconhecido: Ana Sofia, André Monteiro, Antonio Roleira, Claudia, Ibukun, João Solaris, Júlia, Kyriakos, Magda, Miguel, Rita, Sara, Susana. Obrigada por toda a ajuda com peixes, experimentos, construção de primers, análises de RNA, contagem de neurônios, discussões de projetos, etc. Muito obrigada pelo carinho de todos vocês, e pelos presentinhos de “farewell” mais lindos que já ganhei.

Agradeço aos “pescadores” professor Fernando Carvalho, ao seu Oscar Carvalho, ao seu Claudio e ao seu Mané Brandão (meu pai, de novo!) pela inestimável ajuda durante a coleta dos peixes utilizados nesse trabalho. Por terem parado suas próprias atividades e ajudado essa pescadora inexperiente a procurar cará, porquinho e papaterra pelos rios do estado de São Paulo. Sem vocês também não haveria esse trabalho. Obrigada!

Agradeço a todos os companheiros de laboratório que fizeram parte da minha jornada, desde os primórdios: Gauy, Dorigão, Ludmilla, Gisele, Marcela, Ana Paula, Ana Marina, André, Izabela, Kauã, Guilherme, Sara e Letícia, aos técnicos Carlos e Rose. Obrigada pela convivência no laboratório, nos congressos, nos *happy hours*, e obrigada pelas discussões durante nossas reuniões que tanto me ajudaram na construção dessa tese.

Agradeço à todos os funcionários da seção de Pós-Graduação do IBILCE / UNESP por terem sido sempre tão atenciosos e solícitos em solucionar todas as minhas dúvidas sobre todos os assuntos. Obrigada pelo bom humor e pela paciência infundáveis de vocês conosco, alunos. Obrigada por ajudarem a reduzir nossa ansiedade nesses momentos de “tensão”.

Agradeço ao Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, IBILCE / UNESP, por ter me dado a formação que tenho hoje, de forma gratuita e de excelente qualidade. Foram anos maravilhosos, nos quais aprendi a profissão que tanto amo. Agradeço aos anos que ali vivi, aos amigos que fiz, às oportunidades que tive, e aos excelentes professores que me ensinaram. Espero que um dia vivamos em um Brasil no qual seus cidadãos defendam, com garra, a Educação pública, gratuita e de qualidade, para todos os seus conterrâneos, enfrentando os governos que tanto almejam destruí-la.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001. Ademais, houve financiamento da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), relativo à categoria Projeto de Pesquisa Regular (processo nº 2016/26160-2) e à bolsa de treinamento técnico 3 conferida à aluna (processo nº 2019/10808-1).

“Dar as mãos simbolicamente. Penso muito nisso. Já se passaram tantos anos e ainda me imagino. Nós, juntos, diante da universidade. Ou aniquilavam todos, ou voltavam atrás. Permitimos. Não me conformo. Culpa que carrego. Ela me corrói. Nada pior que a memória do gesto não realizado.”

Ignácio de Loyola Brandão

(trecho da obra “Não Verás País Nenhum”, 1981, pp. 59)

“Fracassei em tudo o que tentei na vida.
Tentei alfabetizar as crianças brasileiras, não consegui.
Tentei salvar os índios, não consegui.
Tentei fazer uma universidade séria e fracassei.
Tentei fazer o Brasil desenvolver-se autonomamente e fracassei.
Mas os fracassos são minhas vitórias.
Eu detestaria estar no lugar de quem me venceu.”

Darcy Ribeiro

(Jornal “Estado de Minas”, 17 de fevereiro de 2007)

RESUMO

A organização cerebral em animais sociais pode ser explicada pelas relações filogenéticas – i.e., o cérebro evolui de acordo com uma linha de parentesco entre as espécies – e, também, pela seleção de estruturas direcionadas pela complexidade do ambiente social. O objetivo desta tese foi comparar a possível associação entre complexidade social, cerebral e cognitiva em espécies de peixes próximas filogeneticamente dentro da família Cichlidae que apresentam interações sociais consideradas mais complexas (cuidado biparental da prole em espécies monogâmicas) ou menos complexas (cuidado materno da prole em espécies poligínicas). As mesmas tiveram seus cérebros dissecados em macroáreas (telencéfalo, diencéfalo, teto óptico e cerebelo), posteriormente dissociadas através da técnica do fracionador isotrópico, permitindo a quantificação do número de neurônios e células não-neuronais que compõem essas macroáreas. Assim, em um primeiro estudo, comparamos os valores obtidos de neurônios e células não-neuronais com medidas cerebrais e morfométricas de cada espécie. Constatamos que, diferentemente do que é observado em estudos com mamíferos, espécies de peixes próximas filogeneticamente apresentam diferentes formas de organização cerebral, sugerindo que peixes são mais sujeitos às influências do ambiente comportamental. Após obtermos os dados sobre como os cérebros das espécies escolhidas são organizados, comparamos, em um segundo estudo, as espécies em seus tipos de cuidado parental e sistema de acasalamento. Peixes monogâmicos apresentaram mais neurônios apenas no teto óptico e cerebelo quando comparadas com espécies poligínicas. Indivíduos que cuidam da prole na boca apresentaram mais neurônios apenas no cerebelo. O ciclídeo anão, *A. agassizii*, foi a espécie que apresentou as maiores densidades de células cerebrais, destoando dos demais ciclídeos analisados, e revelando que as diferenças encontradas para esse peixe podem estar mais relacionadas à miniaturização sofrida por essa espécie do que a padrões sociais ligados à reprodução. Por fim, investigamos como o número de células cerebrais poderia estar associado à flexibilidade cognitiva e à socialidade apresentada pelos ciclídeos. Para isso, utilizamos o peixe monogâmico *G. brasiliensis*, espécie na qual ambos os pais cuidam da prole no substrato. Ao contrário do que esperávamos, o telencéfalo foi a única estrutura cerebral que não apresentou nenhuma associação entre os testes comportamentais aplicados e os valores de células cerebrais analisados. Já o diencéfalo, cerebelo e teto óptico mostraram correlações que parecem estar associadas a uma melhor avaliação do ambiente social por parte do animal. De forma geral, um maior número de células nessas regiões mostrou-se positivamente relacionado a indivíduos menos agressivos, que passam mais tempo próximos a coespecíficos e que são menos persistentes em tarefas irrelevantes, revelando animais mais cautelosos e avaliadores. Esse trabalho é inovador já que pouco se conhece sobre os mecanismos evolutivos e fisiológicos envolvidos com o controle do comportamento social em peixes neotropicais.

Palavras-chave: neurônios; células não-neuronais; *Geophagus brasiliensis*; *Geophagus sveni*; *Satanoperca pappaterra*; *Apistogramma agassizii*; fracionador isotrópico.

ABSTRACT

The cerebral organization in social animals can be explained by both, phylogenetic relationships (i.e., the brain evolves by a line of interrelationship between species) and by the selection of structures driven by the complexity of the social environment. The aim of this thesis was to compare the possible association between social behavior, brain complexity and cognitive ability in phylogenetically close fish species within the Cichlidae family, which present social interactions considered more complex (biparental brood care in monogamous species) or less complex (maternal brood care in polygynous species). Individuals had their brains dissected into macroareas (telencephalon, diencephalon, optic tectum and cerebellum), and subsequently dissociated using the isotropic fractionator technique, which allows the quantification of the number of neurons and nonneuronal cells that compose these macroareas. Therefore, in a first study, we compared the values obtained from neurons and nonneuronal cells with brain and morphometric measures of each species. We found that, differently from what is observed for mammals, phylogenetically close fish species have different brain organizations, suggesting that fish are more liable to the influences of the behavioral environment. After obtaining the data on how the brains of the chosen species are organized, in a second study we compared the species in their types of parental care and mating system. Monogamous fish presented more neurons only in the optic tectum and in the cerebellum when compared to polygynous species. Mouthbrooder individuals had more neurons in the cerebellum alone. The dwarf cichlid, *A. agassizii*, was the species that presented the highest brain cells densities, different from the other cichlids, revealing that the differences found for this fish may be more related to the miniaturization suffered by this species than to social patterns linked to reproduction. Finally, we investigated how the number of brain cells could be associated with cognitive flexibility and sociality presented by cichlid fish. For this, we used the monogamous fish *G. brasiliensis*, a species in which both parents take care of the brood in the substrate. Contrary to what we expected, the telencephalon was the only brain structure that showed no association between the applied behavioral tests and the brain cell values. The diencephalon, cerebellum and optic tectum showed correlations that seem to be associated with a better individual evaluation of the social environment. In general, a larger number of cells in these regions was positively related to individuals that were less aggressive, spent more time near conspecifics, and were less persistent in irrelevant tasks, revealing more cautious and evaluative animals. This work is innovative as little is known about the evolutionary and physiological mechanisms involved in social behavior control in Neotropical fish.

Keywords: neurons; nonneuronal cells; *Geophagus brasiliensis*; *Geophagus sveni*; *Satanoperca pappaterra*; *Apistogramma agassizii*; isotropic fractionator.

LIST OF FIGURES

Paper 1 – Brain cells composition in Neotropical cichlid fishes

- Figure 1.** The four Neotropical cichlids used in this study and their phylogeny. 22
- Figure 2.** Immunocytochemical process for counting brain cells. 24
- Figure 3.** Cells size, measured by ferets diameters. 44

APPENDIX

- Figure 1.** Variation in density and number of brain cells standardized by body mass in *G. brasiliensis*. 54
- Figure 2.** Variation in density and number of brain cells standardized by SL in *G. brasiliensis*. 55
- Figure 3.** Variation in density and number of brain cells standardized by body mass in *G. sveni*. 56
- Figure 4.** Variation in density and number of brain cells standardized by SL in *G. sveni*. 57
- Figure 5.** Variation in density and number of brain cells standardized by body mass in *S. pappaterra*. 58
- Figure 6.** Variation in density and number of brain cells standardized by SL in *S. pappaterra*. 59
- Figure 7.** Variation in density and number of brain cells standardized by body mass in *A. agassizii*. 60
- Figure 8.** Variation in density and number of brain cells standardized by SL in *A. agassizii*. 61

Paper 2 – Neurons and glial cells are associated with parental care and mating systems in Neotropical cichlids

- Figure 1.** The four Neotropical cichlids used in this study. 66
- Figure 2.** Brain measurements. 68
- Figure 3.** Neurons densities and total number by fish SL, and ferets diameters of brain cells compared between the four species. 72
- Figure 4.** Nonneuronal cells densities and total number standardized by fish SL compared between the four species. 76

Paper 3 – Neurons and nonneuronal cells are associate to sociality and cognition in fish

- Figure 1.** Experimental design. 94
- Figure 2.** Brain measurements. 98

Figure 3. Variation in behavioral performance for each quantified behavior.	101
Figure 4. Spearman's correlations between behavioral tests.	104
Figure 5. Spearman's correlations between number of trials to learn the detour-reaching-task and the total number of neurons in the diencephalon.	107
Figure 6. Spearman's correlations between number of trials to learn de detour-reaching-task in the inhibitory control test and the ratio of neurons by SL.	109
Figure 7. Spearman's correlations between behavioral tests and brain structure volumes.	111

LIST OF TABLES

Paper 1 – Brain cells composition in Neotropical cichlid fishes

Table 1: Average body mass, SL, and brain structures mass in the four cichlid species.	28
Table 2: Average number (in millions) of brain cells in the four cichlid species.	30
Table 3: Average density (in millions) of brain cells in the four cichlid species.	32
Table 4: Brain cells densities and total numbers correlated with body mass and SL in the four cichlid species.	34
Table 5: Brain cells densities and total numbers correlated with body mass and SL in each species separately.	36
Table 6: Density and number of neurons correlated to nonneuronal cells in each brain structure.	38
Table 7: Density of brain cells correlated to its respective number of cells in each brain structure.	40
Table 8: Cells size measured by ferets diameters correlated with body and brain measures in each species.	41
Table 9: Cells size measured by ferets diameters correlated with body and brain measures in each species.	43

APPENDIX

Table 1. Correlations between individual sex and body and brain measures in all the four cichlids tested.	52
Table 2. Individual sex correlated with body and brain measures in each cichlid species.	53

Paper 2 – Neurons and glial cells are associated with parental care and mating systems in Neotropical cichlids

Table 1: Linear models completed with Tukey's test showing the differences in neurons and nonneuronal cells density between <i>Apistogramma agassizii</i> and the other three cichlids used in this study.	71
Table 2. Linear Models completed by Anova test between the four cichlid species concerning density of neurons and nonneuronal cells in the respective brain structures.	73
Table 3: Linear Models completed by Anova test between the four cichlid species concerning number of neurons and nonneuronal cells in the respective brain structures.	75

Table 4. Pearson’s correlations between structure volume and brain cells density in the respective region.	78
Table 5. Pearson’s correlations between structure volume and brain cells standardized by fish standard length in the respective region.	79

Paper 3 – Neurons and nonneuronal cells are associate to sociality and cognition in fish

Table 1: Spearman’s correlations between quantified behaviors.	100
Table 2: Linear regressions using individual sex as predictor variable.	101
Table 3. Spearman’s correlations between behavioral tests and densities of neurons and nonneuronal cells.	103
Table 4: Spearman’s correlations between behavioral tests and total number of neurons and nonneuronal cells.	106
Table 5: Spearman’s correlations between behavioral tests and total number of neurons and nonneuronal cells divided by the fish SL.	108
Table 6. Spearman’s correlations between quantified behaviors and structure volumes.	110

LIST OF ABBREVIATIONS AND ACRONYMS

AA	<i>Apistogramma agassizii</i>
SBH	Social Brain Hypothesis
cb	Cerebellum
di	Diencephalon
DAPI	4', 6-diamidino-2-phenylindole
GB	<i>Geophagus brasiliensis</i>
GS	<i>Geophagus sveni</i>
LM	Linear Models
LMM	Linear Mixed-Models
ot	Optic tectum
PBS	Phosphate-buffered saline
PCA	Principal Component analysis
SP	<i>Satanoperca pappaterra</i>
SL	Standard length (cm)
tl	Telencephalon

SUMMARY

1	GENERAL INTRODUCTION	14
2	PAPER 1 <i>Brain cells composition in Neotropical cichlid fishes</i>	19
3	PAPER 2 <i>Neurons and glial cells are associated with parental care and mating systems in Neotropical cichlids</i>	62
4	PAPER 3 <i>Neurons and nonneuronal cells are associate to sociality and cognition in fish</i>	90
5	GENERAL CONCLUSIONS	126
	REFERENCES	126

GENERAL INTRODUCTION

The evolution of the animal behavior is associated to the evolution of the nervous system. Thus, it is logical to consider that animals with more complex brains will produce behaviors that are more complex. In this context, two models today try to explain the selection of anatomical variations in the brain that are related to the behavior. The mosaic evolution model proposes that the brain is composed by regions with distinct functions that control and select different behaviors (Barton and Harvey 2000; Gonzalez-Voyer et al. 2009) that will lead to a punctual selection of these particular brain areas (Gonzalez-Voyer et al. 2009; Gonzalez-Voyer and Kolm 2010). The concerted evolution model proposes that a single and simple structural change in the brain can modify the whole tissue as one single structure (Finlay and Darlington 1995). The both models are not excluding and use specific structural modifications of the brain to explain the evolutionary processes involved in the selection of individuals' brain and behavioral complexities (Herculano-Houzel et al. 2014).

The variation on brain complexity also depends of the environment in which the animal is found. Social animals, for example, present complex behaviors concerning conspecifics interactions that are frequently affected by the physical (Moberg et al. 2011; Salvanes et al. 2013) and social environment (Dunbar and Shultz 2007; Taborsky and Oliveira 2012). Nevertheless, abiotic alterations, such as seasonal changes and others climatic perturbations, are more predictable, enabling fast and standardized adjustments from an individual to respond properly to such changes (see Wingfield, 2013). On the other hand, an animal hardly will present standardized responses to deal with different individuals in a group, as such interactions are way to more unpredictable (Dunbar 1998; Dunbar and Shultz 2007; Bshary 2011; Ashton et al. 2018). This unpredictability requires a more complex appraisal and decision-making from an individual; therefore, it requires a more complex brain. Thus, the social stimuli are considered richer in information and will demand from an individual different behavioral responses, requiring a more complex neural framework (Dunbar and Shultz 2007).

The structural organization of some brain areas can be explained by phylogenetic relationships (i.e., the brain evolves accordingly to a kinship line between species), and by selected structures provided by the complexity of the social environment. The Social Intelligence Hypothesis, for example, postulates that the brain complexity observed in several groups of social animals is a product of the complex social interactions selected for these individuals [see for fish: (Bshary 2011); primates: (Dunbar 1998); social insects: (Lihoreau et al. 2012); rodents: (Kverková et al. 2018)]. This hypothesis considers that the social complexity is associated to the nervous system complexity, and not just to the brain size, as individuals with smaller brains may yet present several social behaviors equally complexes [e.g., social insects (Lihoreau et al. 2012)]. Nevertheless, it is not easy to quantify brain complexity. The brain size and its volume are not

always associated to the neurons number present in such structures (Herculano-Houzel and Lent 2005; Herculano-Houzel et al. 2015). The number of neurons, in this case, proposes a higher probability of synaptic circuits. Thus, the association of the evolutionary mechanisms that modulate the social brain can be better understood if we look for neuron numbers in specific brain regions associated directly with social behavior [see the Social Decision-Making Network, (O'Connell and Hofmann 2012)].

Besides the anatomy of the brain, other parameter to be associated with brain complexity is the cognitive ability of the individuals. Cognition, in this case, can be considered as the “process in which an animal internalizes environmental information by perceiving this information in the nervous system, which will generate a behavioral change by learning and memory processes” (Braithwaite 2006). Environments that are rich in information may stimulate the formation of new neuronal connections linked to new memories and learning (Kandel 2001), making possible to an animal to promptly respond to different demands of the social environment. Therefore, when the animals conciliate a complex brain with cognitive systems, they can rapidly interpret the social environment in which they are inserted, learning to deal with different individuals of the group in a precisely form (Taborsky and Oliveira 2012). Thus, the cognitive ability may be considered as an expression of the brain complexity.

The social complexity can be evaluated by the social competence, which is the individual capacity to optimize its behavior in front of social information presented in the environment (Oliveira 2009; Taborsky and Oliveira 2012). Therefore, animals that live in groups and are more socially competent possibly will present a better individual fitness and, consequently, a higher rate of survivor in the nature. In this manner, the social competence is related to a reproductive efficiency of a species (Taborsky and Oliveira 2012), requiring different responses from the animals in the way they organize each other for mating (monogamy vs. polygyny) and for take care of their brood (maternal, paternal or biparental care). Thus, we can assume that mating systems and types of parental care that demand more interactions and conciliation between the parents (i.e., monogamous pairs that take care together of the offspring) will also demand a higher social competence from the individuals.

According to this rationale, the aim of this study was to test whether the social complexity is associated to brain complexity – here, measured by brain cells composition, brain volume and cognitive and social tests. Our study investigated fishes from the Cichlidae family, as the fish brain structure and physiology are well conserved along vertebrates, and they also present complex social behaviors (Bshary et al. 2002). According to O'Connell and Hofmann (2012), there is a social decision-making network represented in the telencephalon and mesencephalon of birds and teleost fish that are homologous to mammals, which makes teleost fish excellent models in studies with neural structures and cognition. Indeed, Pollen et al. (2007) found association between telencephalon and hypothalamus size and social behavior in African cichlids.

Monogamous species present an enlarged telencephalon and a reduced hypothalamus when compared to polygynous cichlids. In Brazil, we have a huge diversity of fish that presents different habitats, feeding habits, mating systems, parental care types and, consequently, can present different strategies related to social competence. The Neotropical cichlids, like the African ones, are formed by species with a rich behavioral and ecological repertoire, although the evolutionary forces driving behavioral changes might be different among them (Barlow 2002).

In this study we compared Neotropical close related species, which present social interactions considered more or less complex – e.g., biparental brood care in monogamous species vs. maternal brood care in polygamous species, respectively – from a mating system and parental care point of view. Moreover, we compared the size of specific regions of the brain, and the brain cells composition between the selected species, to test whether there are associations between the anatomical factors and the ecological and social habits exhibited by these species, as preconized by the Social Intelligence Hypothesis: (Dunbar 1998). Our hypothesis was that species with similar social complexity would exhibit similar levels of brain and cognitive complexity, in spite of the phylogenetical proximity between them.

Predictions and innovation:

- a. Species considered more socially complexes (i.e., monogamous individuals with biparental brood care) would present bigger brain regions related to social behaviors and with a bigger number of brain cells, specially neurons.
- b. Species considered more socially complexes would present better cognitive and social abilities.

This was an innovative study since little is known about the evolutionary and physiological mechanisms involved in the social behavior of Neotropical fishes. Moreover, the knowledge about social behavior in Neotropical cichlids is very small, if we consider the number of fish species present in the Brazilian fauna and the number of papers published about this subject. The Amazonian cichlids, for example, encompass a huge number of species, but the number of specialists in animal behavior studying this area is reduced. Then, in this thesis we used the species *Geophagus brasiliensis*, *Geophagus sveni*, *Satanoperca pappaterra* and *Apistogramma agassizii*, and show 3 chapters (in paper formats) to test our hypothesis:

1. “Brain cells composition in Neotropical cichlid fishes” – the goal of this first chapter was to describe the brain composition of the above-mentioned Neotropical cichlid species, by using the isotropic fractionator technique. With this, we could inferred the number of brain’s neuronal and nonneuronal cells, comparing these numbers with individuals’ morphometric and brain measures.
2. “Neurons and glial cells are associated with parental care and mating systems in Neotropical cichlids” – in this chapter, our goal was to compare the four Neotropical

cichlids in their mating system and types of parental care, hypothesizing that more complex social species – i.e., monogamous substrate brooders – would present more neurons and nonneuronal cells in specific brain areas, mainly in those related to social behaviors.

3. “Neurons and nonneuronal cells are associate to sociality and cognition in fish” – in this last chapter, we aimed to observe whether brain complexity – inferred by number and density of neurons and nonneuronal cells – would be associated to cognitive flexibility and social behavior, measured by behavioral tests. These correlations were realized with the monogamous substrate brooder *Geophagus brasiliensis*.

5 GENERAL CONCLUSIONS

The evolution of vertebrates' brains follows two models that are not excludent between them: the mosaic evolution and the concerted evolution theory. Both theories were demonstrated in cichlid fishes in this study. The social brain hypothesis, on the other hand, do not explains completely our results. Instead of our expectations, other ecological factors seem to contribute to different patterns observed in cichlids' brain anatomy – i.e., miniaturization. For last, more complex cognitive and social responses are, indeed, related to a higher number of brain cells, revealing more socially competent individuals.

REFERENCES

- Ashton BJ, Thornton A, Ridley AR (2018) An intraspecific appraisal of the social intelligence hypothesis. *Philos Trans R Soc B*. doi: <http://dx.doi.org/10.1098/rstb.2017.0288>
- Barlow G (2002) *The Cichlid Fishes: Nature's Grand Experiment In Evolution*, 1st edn. Basic Books, New York
- Barton RA, Harvey PH (2000) Mosaic evolution of brain structure in mammals. *Nature* 405:1055–1058. doi: 10.1038/35016580
- Braithwaite VA (2006) Cognitive Ability in Fish. In: Sloman K, Balshine S, Wilson R (eds) *Behaviour and Physiology of Fish*, 1st edn. Elsevier Academic Press, London, UK, pp 1–37
- Brandão, IL (1981) *Não verás país nenhum*. Global Editora, 27ed. São Paulo: Liberdade, 384p.
- Bshary R (2011) Machiavellian Intelligence in Fishes. In: Brown C, Laland K, Krause J (eds) *Fish Cognition and Behavior*, 2nd edn. Blackwell Publishing Ltd, Oxford, UK, pp 223–242
- Bshary R, Wickler W, Fricke H (2002) Fish cognition: a primate's eye view. *Anim Cogn* 5:1–13. doi: 10.1007/s10071-001-0116-5
- Dunbar RIM (1998) The social brain hypothesis. *Evol Anthropol Issues, News, Rev* 6:178–190. doi: 10.1002/(SICI)1520-6505(1998)6:5<178::AID-EVAN5>3.3.CO;2-P
- Dunbar RIM, Shultz S (2007) Evolution in the Social Brain. *Science* (80-) 317:1344–1347. doi: 10.1126/science.1145463
- Finlay B, Darlington R (1995) Linked regularities in the development and evolution of mammalian brains. *Science* (80-) 268:1578–1584. doi: 10.1126/science.7777856
- Gonzalez-Voyer A, Kolm N (2010) Sex, Ecology and the Brain: Evolutionary Correlates of Brain Structure Volumes in Tanganyikan Cichlids. *PLoS One* 5:e14355. doi: 10.1371/journal.pone.0014355
- Gonzalez-Voyer A, Winberg S, Kolm N (2009) Brain structure evolution in a basal vertebrate clade: evidence from phylogenetic comparative analysis of cichlid fishes. *BMC Evol Biol* 9:238. doi: 10.1186/1471-2148-9-238
- Herculano-Houzel S, Lent R (2005) Isotropic Fractionator: A Simple, Rapid Method for the

Quantification of Total Cell and Neuron Numbers in the Brain. *J Neurosci* 25:2518–2521. doi: 10.1523/JNEUROSCI.4526-04.2005

Herculano-Houzel S, Manger PR, Kaas JH (2014) Brain scaling in mammalian evolution as a consequence of concerted and mosaic changes in numbers of neurons and average neuronal cell size. *Front Neuroanat* 8:77. doi: 10.3389/fnana.2014.00077

Herculano-Houzel S, Messeder DJ, Fonseca-Azevedo K, Pantoja NA (2015) When larger brains do not have more neurons: increased numbers of cells are compensated by decreased average cell size across mouse individuals. *Front Neuroanat* 9:64. doi: 10.3389/fnana.2015.00064

Kandel ER (2001) The Molecular Biology of Memory Storage: A Dialogue Between Genes and Synapses. *Science* (80-) 294:1030–1038. doi: 10.1126/science.1067020

Kverková K, Bělková T, Olkowicz S, et al (2018) Sociality does not drive the evolution of large brains in eusocial African mole-rats. *Sci Rep* 8:9203. doi: 10.1038/s41598-018-26062-8

Lihoreau M, Latty T, Chittka L (2012) An exploration of the social brain hypothesis in insects. *Front Physiol* 3:1–7. doi: 10.3389/fphys.2012.00439

Moberg O, Braithwaite V a., Jensen KH, Salvanes AGV (2011) Effects of habitat enrichment and food availability on the foraging behaviour of juvenile Atlantic Cod (*Gadus morhua* L). *Environ Biol Fishes* 91:449–457. doi: 10.1007/s10641-011-9803-5

O’Connell LA, Hofmann HA (2012) Evolution of a Vertebrate Social Decision-Making Network. *Science* (80-) 336:1154–1157. doi: 10.1126/science.1218889

Oliveira RF (2009) Social behavior in context: Hormonal modulation of behavioral plasticity and social competence. *Integr Comp Biol* 49:423–440. doi: 10.1093/icb/icp055

Pollen AA, Dobberfuhl AP, Scace J, et al (2007) Environmental complexity and social organization sculpt the brain in Lake Tanganyikan cichlid fish. *Brain Behav Evol* 70:21–39. doi: 10.1159/000101067

Ribeiro, D. *Jornal Estado de Minas*, Belo Horizonte, 17 de fevereiro de 2007.

Salvanes AGVA, Moberg O, Ebbesson LOE, et al (2013) Environmental enrichment promotes neural plasticity and cognitive ability in fish. *Proc R Soc B Biol Sci* 280:20131331–20131331. doi: 10.1098/rspb.2013.1331

Taborsky B, Oliveira RF (2012) Social competence: an evolutionary approach. *Trends Ecol Evol* 27:679–688. doi: 10.1016/j.tree.2012.09.003

Wingfield JC (2013) Ecological processes and the ecology of stress: The impacts of abiotic environmental factors. *Funct Ecol* 27:37–44. doi: 10.1111/1365-2435.12039