



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

André Vitor Salinas Pereira

**Perdedores e vencedores apresentam similar controle inibitório em um peixe
ciclídeo**

São José do Rio Preto - SP

2021

André Vitor Salinas Pereira

Perdedores e vencedores apresentam similar controle inibitório em um peixe ciclídeo

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Biodiversidade, junto ao Programa de Pós- Graduação em Biodiversidade, do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de MesquitaFilho”, Câmpus de São José do Rio Preto.

Financiadora: CAPES – PROEX

Orientador: Prof^a. Dr^a. Eliane Gonçalves de Freitas

São José do Rio Preto - SP

2021

P436p	<p>Pereira, André Vitor Salinas</p> <p>Perdedores e vencedores apresentam similar controle inibitório em um peixe ciclídeo / André Vitor Salinas Pereira. -- São José do Rio Preto, 2021</p> <p>38 p.</p> <p>Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Biociências Letras e Ciências Exatas, São José do Rio Preto</p> <p>Orientadora: Eliane Gonçalves de Freitas</p> <p>1. Controle inibitório. 2. Efeito vencedor/perdedor. 3. Paradigma do desvio. 4. Comportamento social. I. Título.</p>
-------	--

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.

André Vitor Salinas Pereira

Perdedores e vencedores apresentam similar controle inibitório em um peixe ciclídeo

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Biodiversidade, junto ao Programa de Pós- Graduação em Biodiversidade, do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de MesquitaFilho”, Câmpus de São José do Rio Preto.

Financiadora: CAPES – PROEX

Comissão Examinadora

Profa. Dra. Eliane Gonçalves de Freitas
UNESP – Câmpus de São José do Rio Preto
Orientador

Profa. Dra. Percília Cardoso Giaquinto
UNESP – Câmpus de Botucatu

Profa. Dra. Patrícia Izar
USP

São José do Rio Preto
10 de novembro de 2021

AGRADECIMENTOS

Agradeço

Primeiramente à minha orientadora, Profa. Dra. Eliane Gonçalves de Freitas, que sempre demonstrou ser uma profissional extremamente capaz, dedicada e com amor pelo que faz. Não apenas por ser minha orientadora desde 2016 e me ajudar com as dificuldades da graduação e pós-graduação conseguindo fazer com que meus problemas, antes enormes, diminuíssem de tamanho. Parabéns por toda sua jornada como pesquisadora, professora e amiga, com certeza é um exemplo, não só para mim como para muitos outros que tiveram a oportunidade de conhece-la.

Não poderia deixar de agradecer a todos os membros do laboratório que sempre me ajudaram quando eu mandava mensagens em horários inadequados. Em especial gostaria de agradecer ao Felipe Dorigão Guimarães, que foi meu coorientador no TCC e salva-vidas no quando o assunto era mexer no R, a estatística desse trabalho não seria a sua ajuda. À Manuela Lombardi Brandão, Ana Carolina Gauy, Marcela Cesar Bolognesi, por demonstrarem não só conhecimento como disposição para ajudar em tudo que precisei, sejam metodologias, escrita, estatística ou dicas para encontros e assuntos da pós-graduação.

Seria impossível não agradecer aos meus pais, se sem a orientação e ajuda dos membros do laboratório, esse mestrado não seria possível, sem meus pais nada seria possível. À minha mãe, por ser a mulher mais amorosa e paciente, que mesmo muitas vezes não sabendo muito bem o que eu faço ou não tendo conhecimento científico para ajudar, sempre soube exatamente o que me dizer nos momentos que mais precisei. Ao meu pai que mesmo distante, sempre foi presente e sempre me deu apoio em tudo que precisei. Sei que vocês falam que sou “seu orgulho”, mas não me perdoaria por ser menos, vocês merecem tudo. Amo vocês.

Assim como fiz no meu TCC, gostaria de agradecer à minha namorada, Jéssica Silva Santana, que sempre esteve próxima, me apoiando e dando forças, desde antes do TCC até agora no mestrado e espero que ao longo de nossas vidas. Obrigado por tudo, juntos conseguiremos tudo que queremos.

Aos meus amigos, sejam pelos almoços no RU (enquanto a pandemia não existia), pela companhia em festas ou pelos sufocos da graduação e pós. É uma tarefa ingrata listar o nome de todos, principalmente por deixar alguém de fora, mas gostaria de destacar alguns nomes: Ariane N. Queiroz, Igor N. Guagnoni, Laura Chiarelli, Leonardo H. C. Longo, Matheus F. C. A. Lima, Mayk R. dos Santos, Paula M. Rosa, Raquel A. Megid, Raphaela S. Scatena, Vitor H. S. da Silva, Ynaiá Y. Tenho sorte por ter dividido uma parte de minha vida com vocês.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001, à qual agradeço.

Muito obrigado a todos que direta ou indiretamente me ajudaram nessa trajetória.

"Pensava em terminar as obras em setembro, mas atrasou até metade de outubro. Em compensação, estava esplêndido - não era só ele que dizia, mas todos que o tinham visto lhe diziam isso. Mas, na realidade, era tudo igual ao que se encontra na casa de todas as pessoas não propriamente ricas, mas que querem parecer ricas e que, por isso, no máximo se parecem umas com as outras"

Tolstói, Liev (2020, p. 95).

RESUMO

Lutas intraespecíficas para definição e manutenção da hierarquia em animais sociais podem ser muito custosas aos competidores. Por isso, algumas estratégias comportamentais que reduzem esses custos foram selecionadas. Uma delas é histórico de lutas, cujos indivíduos com experiência de vitórias apresentam maior chance de lutar e vencer, enquanto indivíduos perdedores apresentam propensão a evitar ou perder as lutas subsequentes (efeito vencedor/perdedor). Isso requer uma certa habilidade cognitiva que permita ao indivíduo interpretar e tomar decisões no ambiente social, ajustando suas respostas conforme experiências passadas (flexibilidade cognitiva). No presente trabalho testamos a relação entre o efeito vencedor/perdedor e a flexibilidade cognitiva através de um teste de controle inibitório. Nossa hipótese foi que indivíduos perdedores apresentam um melhor controle inibitório, uma vez que estariam com um padrão comportamental mais voltado à inibição. Para isso, utilizamos 95 machos revertidos de tilápias-do-nilo (*Oreochromis niloticus*) que classificados em cinco grupos experimentais independentes, após serem pareados com oponentes: 1. os que vencerem duas lutas seguidas (N=19); 2. os que perderem duas (N=19); 3. os que ganharam a primeira luta e perderem a segunda (N=19); 4. os que perderam a primeira luta e ganharam a segunda (N=19); 5. os que empataram (N=19). Os peixes foram então submetidos ao teste do desvio (*detour reaching task*), que consiste em treinar os peixes a buscar alimento atrás de uma barreira opaca e, em seguida, testá-los com uma barreira transparente. Espera-se que o peixe evite atravessar diretamente pela barreira transparente para conseguir a recompensa, desviando da mesma a partir da lembrança do desvio na barreira opaca, demonstrando um controle inibitório. Foram quantificadas as seguintes variáveis: latência para realizar o desvio, para se alimentar, tempo gasto em frente a barreira na zona incorreta, número de batidas na barreira e o sucesso em realizar o desvio sem bater na barreira transparente. Os dados foram comparados por Generalized Linear Mixed Model (GLMM). A maioria dos animais (94%), apresentaram sucesso na fase de treino com a barreira opaca e passaram pra fase teste, sendo que todos os grupos demonstraram melhora em todas as variáveis da etapa teste, com exceção do sucesso. No geral, o tempo para realizar o desvio e o número de erros diminuiu, demonstrando aprendizagem em relação ao controle inibitório. No entanto, não foram encontradas diferenças significativas entre os tratamentos, indicando que vencedores e perdedores apresentam níveis semelhantes de flexibilidade cognitiva. Tal flexibilidade não está associada ao efeito vencedor/perdedor, mas provavelmente é uma característica chave na tomada de decisões que, assim como em mamíferos, promove o ajuste ao ambiente social em peixes.

Palavras-chave: Controle inibitório; Efeito vencedor/perdedor; Paradigma do desvio; Comportamento social.

ABSTRACT

Intraspecific fights to define and maintain hierarchy in social animals can be very costly to competitors. Therefore, some behavioral strategies that reduce these costs have been selected. One is the historic of fights, whose individuals with winning experience have a greater chance of fighting and winning, while losing individuals are prone to avoid or lose subsequent fights (winner/loser effect). This requires a certain cognitive ability that allows the individual to interpret and make decisions in the social environment, adjusting their responses according to past experiences (cognitive flexibility). In the present study we tested the relationship between the winner/loser effect and cognitive flexibility through an inhibitory control test. Our hypothesis was that loser individuals have better inhibitory control, since they would have a behavioral pattern more focused on inhibition. For this, we used 95 reversed Nile tilapia males (*Oreochromis niloticus*) that were classified into five independent experimental groups after being paired with opponents: 1. the ones that won two fights (N=19); 2. the ones that lost two (N=19); 3. the ones that won the first fight and lost the second (N=19); 4. the ones that lost the first fight and won the second (N=19); 5. the ones that tied (N=19). The fish were then submitted to the detour reaching task, which consists of training the fish to seek food behind an opaque barrier and then test them with a transparent barrier. It is expected that the fish avoid crossing directly through the transparent barrier to obtain the reward, detouring from it from the memory of the detour in the opaque barrier, proving an inhibiting control. The following variables were quantified: latency to perform the detour, latency to feed, time spent in front of the barrier in the incorrect zone, number of hits on the barrier and success to perform the detour without hitting the transparent barrier. The data were compared by Generalized Linear Mixed Model (GLMM). Most animals (94%) were successful in the training phase with the opaque barrier and passed the test phase, and all groups showed improvement in all variables of the test stage, except for success. In general, the time to perform the deviation and the number of errors decreased, demonstrating learning in relation to the inhibition control. However, no significant differences were found between treatments, indicating that winners and losers have similar levels of cognitive flexibility. Such flexibility is not associated with the winning/losing effect, but is probably a key feature in decision-making that, as in mammals, promotes adjustment to the social environment in fish.

Keywords: Inhibitory control; Winning/losing effect; Detour paradigm; Social behaviour.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

E – Grupo experimental de peixes que enfrentaram o seu reflexo no espelho, empatando duas lutas:

Empate

EP – Erro Padrão

GLMM – Modelos generalizados mistos

ID – Índice de dominância

P – Peixes que perderam a primeira luta: Perdedor

PP – Grupo experimental de peixes que perderam duas lutas: Perdedor/Perdedor

PV – Grupo experimental de peixes que perderam a primeira luta e venceram a segunda:
Perdedor/Vencedor

V – Peixes que venceram a primeira luta: Vencedor

VIE - Elastômero de Implante Visível

VP – Grupo experimental de peixes que venceram a primeira luta e perderam a segunda:
Vencedor/Perdedor

VV – Grupo experimental de peixes que venceram duas lutas: Vencedor/Vencedor

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	11
2. METODOLOGIA	13
2.1. Coleta e aclimatação.....	13
2.2. Delineamento experimental.....	14
2.2.1. Identificação de vencedores e perdedores	14
2.2.2 Teste de controle inibitório	16
2.3. Análises estatísticas.....	18
2.4. Detalhes experimentais	18
3. CONDUTA ÉTICA.....	19
4. RESULTADOS	19
4.1. Etapa treino	20
4.2 Etapa teste	22
5. DISCUSSÃO.....	26
6. CONCLUSÃO	29
7. REFERÊNCIAS	29
APÊNDICE A – Script GLMM	33

1. INTRODUÇÃO

Animais sociais comumente estão sob pressão de competição, principalmente em disputas por recursos, como comida, abrigo ou parceiros (HARDY; BRIFFA, 2013). Muitas vezes lutas fazem parte do processo de estabelecimento da hierarquia de dominância social, que ordena e mantém o acesso aos recursos no ambiente, com prioridade para os dominantes (ANG; MANICA, 2010). Contudo, o lado negativo das interações agonísticas é o quão custoso elas podem ser aos competidores, uma vez que envolvem gasto energético (ROS; BECKER; OLIVEIRA, 2006), aumento no risco de predação e lesões corporais (ALCOCK, 1996; LANE; BRIFFA, 2017). Assim, alguns mecanismos e comportamentos que minimizam ou reduzem os custos e necessidades desses embates garantem um melhor fitness ao animal, sendo assim, ao longo da história evolutiva de diferentes grupos diferentes comportamentos foram fixados. Por exemplo, reconhecimento da posição social entre indivíduos por meio da alteração na coloração corporal (FALTER, 1987) e dos olhos em tilápia-do-nilo, onde indivíduos submissos apresentam uma coloração mais escurecida (VOLPATO et al., 2003), resultando na diminuição das lutas (MIYAI et al., 2011). A comunicação química (GONÇALVES-DE-FREITAS et al., 2008; GAUY, BOSCOLO, GONÇALVES-DE-FREITAS, 2018) e sonora (LONGRIE et al., 2013) também são exemplos de comportamentos utilizadas para que ocorra a manutenção da hierarquia com menor gasto energético e risco de injúrias.

O histórico de lutas do animal também pode influenciar o resultado de embates futuros, pelo efeito vencedor/perdedor (do inglês *winner/loser effects*). Animais com um histórico de derrotas tem uma maior propensão a perder ou evitar lutas futuras, enquanto os animais com histórico de vitórias tendem a lutar mais e apresentam maior probabilidade de vencer novamente (HSU; EARLEY; WOLF, 2006). O efeito vencedor/perdedor afeta a maneira com a qual o animal avalia sua capacidade de luta, podendo influenciar na sua tomada de decisão em um curto ou longo período de tempo (LAN; HSU, 2011).

O quanto o animal pode ser influenciado pelo resultado das lutas parece estar ligado com a predisposição individual que parece ter relação com o nível de alguns hormônios. No caso de peixes da espécie *Kryptolebias marmoratus*, indivíduos que apresentam menores níveis dos hormônios: 11-cetotestosterona, testosterona e cortisol, são mais propensos ao efeito perdedor por mais tempo, contudo o resultado do embate não muda esses níveis hormonais (EARLEY et al., 2013). Além disso, a manutenção do efeito vencedor se dá por ação androgênica, podendo ser inibido artificialmente com composto anti-androgênico, entretanto, o efeito perdedor não é revertido com uso de andrógenos (OLIVEIRA; SILVA; CANÁRIO, 2009). Isso demonstra que as condições hormonais não explicam totalmente esses efeitos. Para que o efeito vencedor/perdedor ocorra, outros fatores devem estar relacionados com a capacidade do animal de interpretar e analisar tanto o rival quanto a ele próprio,

para então responder da melhor forma possível aos estímulos (OLIVEIRA; MCGREGOR; LATRU, 1998; PRENTER; ELWOOD; TAYLOR, 2006; TABORSKY; OLIVEIRA, 2012), sendo assim interessante analisar o comportamento do animal como um todo e não apenas níveis hormonais. De toda forma, essa capacidade permite que os indivíduos lidem com ambientes flutuantes, como o ambiente social, ajustando seu comportamento de acordo com os indivíduos envolvidos na interação.

Toda a tomada de decisão é influenciada pela capacidade cognitiva do animal. Segundo Braithwaite (2006), a cognição é o processo pelo qual um animal percebe o meio ambiente, interpreta e aprende com os novos sinais e informações. De acordo com Diamond (2013), em situações onde o indivíduo tem de prestar atenção ou se concentrar nos sinais para responder em detrimento de uma resposta mais instintiva, categorizam-se as funções executivas, as quais são divididas em três principais grupos: 1. Memória de trabalho, que é a capacidade de reter informações para usá-las no futuro; 2. Controle inibitório, que é a capacidade de controlar atenção, emoção, pensamento e comportamento, mesmo que haja uma forte predisposição para exercê-los; 3. Flexibilidade cognitiva, que é a capacidade de elaborar novas forma de agir ou pensar diante de novos desafios, prioridades ou ineficiência do comportamento exercido. Dessa forma, podemos considerar como flexibilidade cognitiva a capacidade de alterar o comportamento com base na experiência prévia.

O controle inibitório vem sendo estudado em mamíferos (AMICI; AURELI; CALL, 2008; BERAN; HOPKINS, 2018) e aves (KABADAYI et al., 2016), mas apenas recentemente, tem sido explorado em animais com sistemas nervosos mais simples, como os peixes teleósteos (BRANDÃO; FERNANDES; GONÇALVES-DE-FREITAS, 2019; GATTO; LUCON-XICCATO; BISAZZA, 2018; LUCON-XICCATO; GATTO; BISAZZA, 2017; MONTALBANO; BERTOLUCCI; LUCON-XICCATO, 2020; SAVAŞCI; LUCON-XICCATO; BISAZZA, 2021) sendo considerado necessário para que haja flexibilidade cognitiva (DIAMOND, 2013). Atualmente é utilizado inclusive para comparar a evolução da cognição em diferentes grupos de vertebrados (MACLEAN et al., 2014; WASCHER et al., 2018). Outro ponto importante é que, assim como para humanos (CARLSON; MOSES, 2001; PASSOLUNGI; SIEGEL, 2001), em peixes, o controle inibitório parece ser constante para diferentes tarefas (MONTALBANO; BERTOLUCCI; LUCON-XICCATO, 2020), ou seja, os mesmos mecanismos que possibilitam o controle inibitório utilizados em uma tarefa de são usados em outras, mesmo que os testes não sejam os mesmos. Dessa maneira é esperado que indivíduos que demonstraram melhor controle inibitório em uma tarefa, mantenha um bom desempenho para outras.

Um dos principais testes utilizados para avaliar o controle inibitório é o paradigma do desvio (do inglês *detour paradigm*), que consiste na utilização de uma barreira transparente entre o indivíduo e alguma recompensa. O provável comportamento do animal é ir diretamente à recompensa, sendo

então impedido pela barreira. Portanto, para que haja sucesso no teste, o animal deve inibir o ímpeto de ir diretamente ao seu objetivo e, então, realizar um desvio contornando a barreira e chegando à recompensa (KABADAYI; BOBROWICZ; OSVATH, 2018). Em alguns casos, são utilizadas duas etapas: uma com barreira opaca, depois, com a barreira transparente (BRANDÃO; FERNANDES; GONÇALVES-DE-FREITAS, 2019). Nesse protocolo o animal adquire a experiência prévia de realizar o desvio ao redor da barreira opaca, na qual não visualiza o alimento, mas aprende que está atrás da barreira. Em uma segunda etapa, essa memória pode ser evocada quando na presença de uma barreira transparente. Dessa maneira o paradigma do desvio pode ser usado tanto para testar o controle inibitório quanto para a flexibilidade cognitiva do animal, pois mesmo que ele já saiba nadar em volta da barreira, quando esta é substituída por uma transparente o desafio é outro, exigindo do animal tanto o controle inibitório quanto a capacidade de resolver o novo desafio.

No presente trabalho, testamos a hipótese que indivíduos perdedores apresentam um melhor controle inibitório, uma vez que estariam com um padrão comportamental mais voltado à inibição (por exemplo, evitar lutas) e melhor flexibilidade cognitiva, considerando que o controle inibitório é o mesmo para diferentes tarefas (CARLSON; MOSES, 2001; MONTALBANO; BERTOLUCCI; LUCON-XICCATO, 2020; PASSOLUNGHI; SIEGEL, 2001). Utilizamos o teste do desvio (do inglês *detour-reaching task*), após o treino com a barreira opaca.

A tilápia-do-nilo (*Oreochromis niloticus*) foi escolhida como modelo experimental por se tratar de um peixe da família Cichlidae e, como tal, apresenta hierarquia de dominância social (BOSCOLO; MORAIS; GONÇALVES-DE-FREITAS, 2011; GONÇALVES-DE-FREITAS et al., 2008), e cujo controle inibitório foi recentemente demonstrado (BRANDÃO; FERNANDES; GONÇALVES-DE-FREITAS, 2019).

2. METODOLOGIA

2.1. Coleta e aclimação.

Foram utilizados 95 machos revertidos de tilápia-do-nilo, *Oreochromis niloticus* (Linnaeus, 1758), usar apenas machos é uma forma de tentar evitar mais variáveis que viesariam nossos experimentos, uma vez que há diferenças, comportamentais entre machos e fêmeas. O tamanho foi de $91,3 \pm 0,89$ mm de comprimento padrão (extremidade anterior até menor perímetro da inserção da nadadeira caudal), provenientes dos tanques de piscicultura IBILCE/UNESP. Esses foram aclimatados durante um período mínimo de 30 dias em caixas d'água de polietileno com capacidade para 500 litros. A temperatura foi mantida em torno de 28°C com auxílio de termostatos e o fotoperíodo foi de 12 horas de luz diária (07h às 19h). A aeração e qualidade da água foram mantidas com auxílio de filtros canister (filtração 400L/h). A alimentação foi a base de ração “Agromix – Mix

Fish, 28%” uma vez ao dia até a saciedade aparente. As caixas foram sifonadas uma vez por semana e água limpa e sem cloro foi utilizada para manter o nível nas caixas.

2.2. Delineamento experimental

Para obtenção de indivíduos perdedores e vencedores, cada peixe foi pareado com dois diferentes rivais, em dois dias consecutivos, cada dia com duas filmagens que juntas totalizaram 45 minutos de interação direta (Tabela 1). Após as lutas, os peixes foram categorizados em cinco grupos experimentais: peixes que venceram os dois pareamentos, os que perderam os dois, os que venceram o primeiro e perderam o segundo, os que perderam o primeiro e venceram o segundo e um grupo que teve experiência de empate pareado com espelho (OLIVEIRA; CARNEIRO; CANÁRIO, 2005). Em seguida, os peixes passaram pelo teste do desvio para avaliar o controle inibitório e a flexibilidade cognitiva, por fim foram eutanasiados (Tabela 1).

Tabela 1. Cronograma experimental. Os pareamentos correspondem ao primeiro e segundo dia de lutas. A etapa de treino corresponde aos testes com a barreira opaca. Animais que tiveram sucesso em ao menos quatro repetições em um intervalo de cinco, foram destinados à etapa de teste, com a barreira transparente.

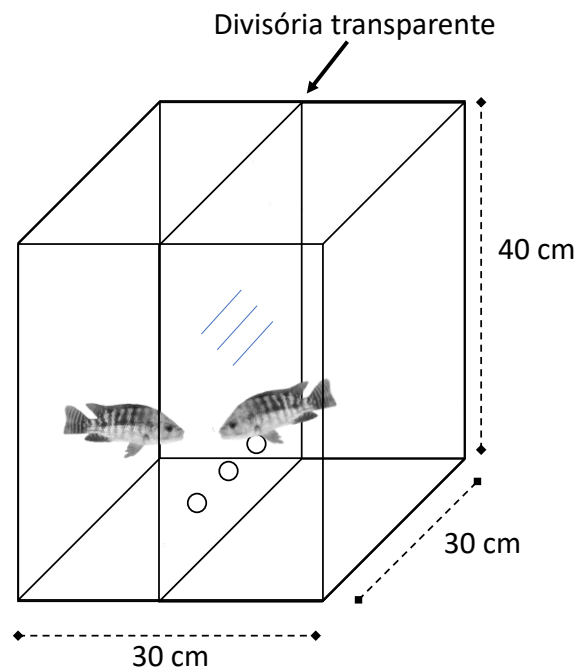
Período	Dia 1	Dia 2	Dia 3	Dia 4	Dia 5	Dia 6	Dia 7
Manhã	Biometria e marcação	1º Pareamento (luta de 25min)	2º Pareamento (luta de 25min)	Etapa treino (5 repetições)	Etapa treino (5 repetições)	Etapa teste (5 repetições)	Biometria e Eutanásia
Tarde		1º Pareamento (luta de 20min)	2º Pareamento (luta de 20min)	Etapa treino (5 repetições)	Etapa treino (5 repetições)	Etapa teste (5 repetições)	

Fonte: elaborado pelo autor.

2.2.1. Identificação de vencedores e perdedores

No dia 1, após a biometria, os peixes eram pareados em aquários de vidro de 40x30x40 cm com uma divisória transparente e perfurada, separando os peixes, permitindo a comunicação indireta entre os dois indivíduos por pistas químicas e visuais, mas evitando o contato físico (Figura 1). No dia 2, essa divisória era retirada em dois momentos (manhã e tarde) para que os animais pudessem lutar, sendo recolocada logo após o término desses períodos. As lutas ocorriam sempre no mesmo horário, sendo a primeira às 10h e a segunda às 16h. Ambas foram filmadas por câmeras posicionadas em frente ao aquário. O tempo total de 45 minutos foi escolhido por ser considerado suficiente para estabelecimento da hierarquia em *O. niloticus* (CARVALHO; GONÇALVES-DE-FREITAS, 2008).

Figura 1. Ilustração das duplas durante o pareamento. Esquema do aquário experimental com os peixes separados por uma divisória transparente e perfurada. Essa estrutura permite aos peixes manter a comunicação social sem o risco de morte e lesões corporais em consequência das lutas. As lutas físicas foram realizadas após retirada da divisória por 25 min e, numa segunda seção, por 20 minutos, para reforçar a hierarquia. Desenho feito por E. Gonçalves de Freitas.



Fonte: elaborado pelo autor.

Após a segunda filmagem, no primeiro dia de pareamento, os peixes eram classificados por variáveis qualitativas, sendo considerados perdedores (P), aqueles com mais sinais de submissão, como o escurecimento do corpo e/ou dos olhos, abaixamento das nadadeiras (em especial a dorsal), além de fuga contínua de seu oponente, o vencedor (V), que por sua vez apresentava sinais opostos, corpo mais claro, nadadeiras bem abertas, natação livre e perseguição do perdedor. (CARVALHO; HA; GONÇALVES-DE-FREITAS, 2012). Os animais eram então pareados e realocados em um novo aquário, permanecendo sem contato direto. Dessa vez ambos eram peixes vencedores (VxV) ou ambos perdedores (PxP). No terceiro dia, o mesmo procedimento para que as lutas ocorressem foi realizado, com uma filmagem de 25 minutos e outra de 20 minutos. Contudo, dessa vez, obteve-se

quatro grupos experimentais; o com peixes que vencerem em ambos os dias, chamado de vencedor-vencedor (VV; N=19); os que perderam em ambos, perdedor-perdedor (PP; N=19); os que perderam o primeiro e ganharam o segundo (PV; N=19); os que ganharam o primeiro e perderam o segundo, vencedor-perdedor (VP; N=19).

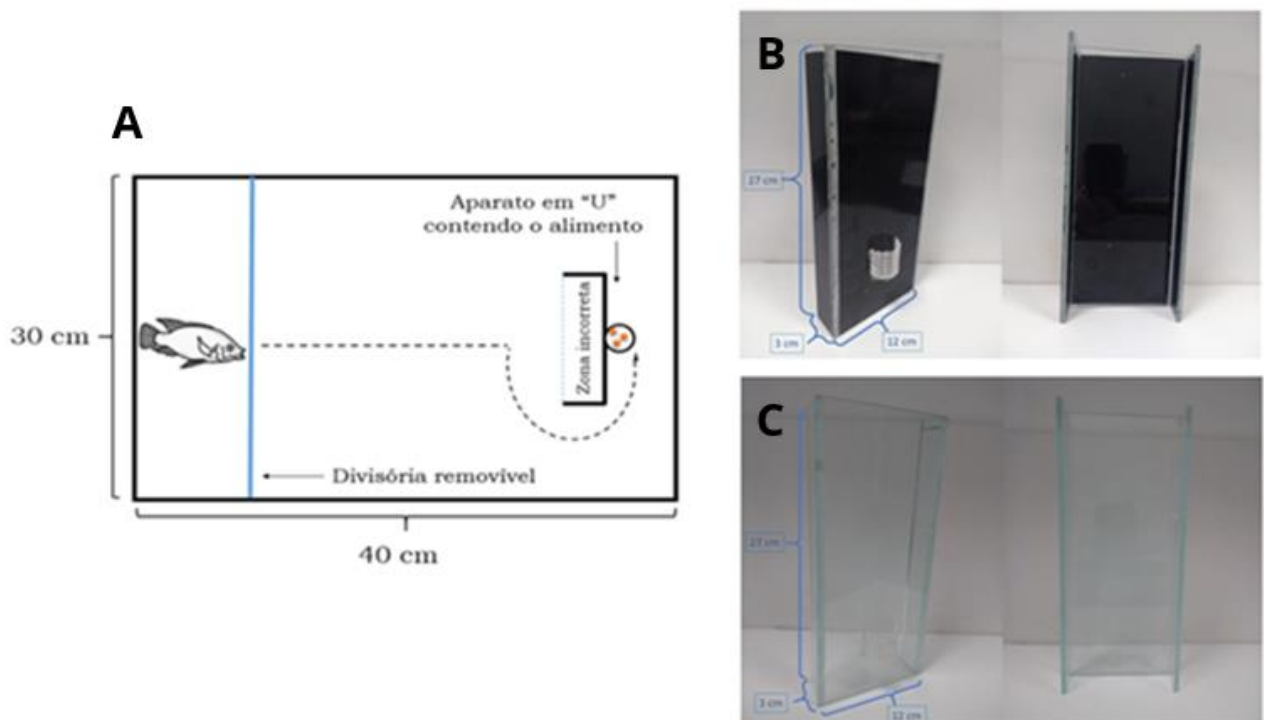
Em adição à avaliação qualitativa para reconhecer com mais exatidão os vencedores e perdedores, as filmagens das lutas foram analisadas e os comportamentos agonísticos quantificados com o uso de um etograma para as lutas (GONÇALVES-DE-FREITAS et al., 2008). Foi calculado então o índice de dominância (ID), que se refere ao número de ataques emitidos por um indivíduo em relação ao número total de ataques do grupo ($ID = \text{número de ataques emitidos pelo indivíduo} / \text{número de ataques totais emitidos}$), como o ID varia de 0,0 a 1,0, os peixes que apresentaram o maior ID foram considerados vencedores (ex. GONÇALVES-DE-FREITAS; NISHIDA, 1998). Também foram registrados o número de ataques sofridos por cada animal de cada um dos grupos.

Além dos quatro grupos experimentais descritos, foi utilizado um quinto grupo (N=19), o grupo empate (E), como controle. Para que a experiência de empate ocorresse era utilizado um espelho como oponente virtual, uma vez que a tilápia-do-nilo não se reconhece no espelho, interagindo com sua própria imagem como se estivessem lutando com um indivíduo real (ex: FALSARELLA; BRANDÃO; GONÇALVES-DE-FREITAS, 2017). Entretanto, a resposta fisiológica não é a mesma que enfrentar um oponente real, não havendo vencedor nem perdedor (OLIVEIRA; CARNEIRO; CANÁRIO, 2005). Esse grupo também passou por dois dias de lutas virtuais, com duas filmagens por dia (25 minutos pela manhã e 20 minutos a tarde).

2.2.2 Teste de controle inibitório

Para avaliar o controle inibitório dos peixes, foi utilizado o teste do desvio, dividido em duas etapas. A primeira para garantir que o animal tivesse a experiência de desviar da barreira para atingir a recompensa (etapa treino), além de assegurar que os animais não tivessem impedimentos motores para realizar a tarefa. A segunda foi utilizada para testar, de fato, o controle inibitório do animal (etapa teste). Ambas ocorreram em aquários de 40x30x40 cm, com uma barreira (aparato de vidro em forma de “U” com 27 cm de altura, 12cm de largura e com laterais de 3cm), sendo colocado sempre a 10cm da lateral do aquário. No lado oposto, também a 10cm da outra lateral do aquário, era colocada uma divisória transparente removível que delimitava o ponto de partida durante as filmagens. Os aparatos eram feitos de vidro, portanto foi utilizado papel adesivo preto durante a etapa treino para deixá-los opacos, além disso, em ambos os casos, havia um alimentador na parte posterior, onde era colocado o camarão (alimento) utilizado como recompensa durante as etapas (FIGURA 1).

Figura 2: Esquema da vista superior do aquário, com aparato em forma de “U” (27 cm de altura x 12 cm de largura) com alimento posicionado na parte posterior do mesmo (a). Aparato em “U” opaco utilizado durante a etapa treino (b). Aparato em “U” transparente utilizado durante a etapa teste.



Fonte: Imagem em (a) modificada de (BRANDÃO; FERNANDES; GONÇALVES-DE-FREITAS, 2019), demais elaboradas pelo autor.

Na etapa treino, o peixe ficava em uma área de início delimitada por uma divisória de acrílico transparente para padronizar o início do teste. Um pedaço de camarão (recompensa) era colocado atrás da barreira opaca (preso por uma rede plástica) a qual era posicionada no aquário. A divisória era retirada, permitindo que o peixe nadasse livremente por cinco minutos. Durante esse tempo o aquário era filmado com câmeras localizadas frontalmente e acima do mesmo. Após a filmagem a barreira era retirada do aquário e o peixe ficava nadando livremente até a próxima repetição. Esse procedimento foi repetido 10 vezes por dia durante dois dias, nos seguintes horários: 8h, 9h, 10h, 11h, 12h, 14h, 15h, 16h, 17h e 18h. Apenas aqueles que obtiveram sucesso (se alimentaram) em pelo menos quatro repetições em um intervalo de cinco foram considerados aptos para a etapa teste. Para

padronizar as condições dos animais, todos os espécimes passaram por 20 repetições, mesmo que o critério fosse atingido nas repetições iniciais.

Na etapa teste, os mesmos procedimentos da etapa anterior foram utilizados, com exceção do tempo e número de repetições (10 repetições de 10 minutos cada) e o aparato que era transparente, permitindo assim que o animal visualizasse o alimento à sua frente.

2.3. Análises estatísticas

Os dados e seus respectivos resíduos foram avaliados quanto à normalidade por teste de Shapiro-Wilk e a homocedasticidade pelo teste Fmax (ZAR, 1999), utilizando transformação por raiz quadrada + 0,5 em caso de dados não homocedásticos (LEHNER, 1998). Os outliers de cada repetição para cada variável foram retirados pelo teste de Grubbs, sendo que se o mesmo animal fosse outlier em 70% ou mais das repetições ele era retirado das análises da variável em questão.

As variáveis analisadas foram: sucesso para se alimentar (sim/não) durante a etapa treino, já durante a etapa teste, o sucesso na tarefa do desvio era indicado pela realização do desvio ao redor da barreira transparente sem que houvesse qualquer batida na mesma. Na barreira transparente foram avaliados também, a rapidez no desempenho da tarefa, indicado pela latência para realizar o desvio e latência para se alimentar. Além disso foi avaliada a insistência na barreira, indicada pelo tempo gasto na zona incorreta (Figura 2A) e o número de batidas com a boca na barreira. Quanto mais o animal ficou na zona incorreta, bateu na barreira transparente e quanto maiores suas latências, pior era o desempenho do indivíduo.

Para comparar o desempenho entre os tratamentos foram utilizados modelos generalizados mistos (GLMM), considerando os tratamentos como variáveis categóricas e as seções de testes como variáveis repetidas no tempo, as diferenças individuais entre os peixes foi considerada como efeito aleatório. As análises foram feitas no software R 4.0.4 (<http://www.r-project.org>), com os pacotes “lme4” e “multcomp”. Para a latência para realizar o desvio e latência para se alimentar, foi utilizado o GLMM (função “glmer” do pacote “lme4”, Family = “Gamma” (link = log)), para comparar o sucesso, número de batidas e tempo na zona incorreta utilizou-se GLMM (função “glmer” do pacote “lme4”, Family = “poisson”). Foi utilizado Tukey HSD como teste post-hoc (função “glht” do pacote “multcomp”). Exemplo de script utilizado no Apêndice A.

2.4. Detalhes experimentais

Para realizar a biometria, os animais foram anestesiados em solução de benzocaína (0,03 g/L; (ex: BRANDÃO; FERNANDES; GONÇALVES-DE-FREITAS, 2019) até que o mesmo demonstrasse uma diminuição dos movimentos das nadadeiras e tombasse no fundo do recipiente ou

ficasse na solução por 1 minuto, o que ocorresse antes. Com o peixe anestesiado foi realizada a medição, usando paquímetro, pesagem, com balança de precisão e marcação com o Elastômero de Implante Visível (VIE) aplicado sob algumas escamas dos dois lados do corpo do peixe para facilitar a diferenciação entre os animais, em especial durante as etapas de luta média (\pm EP), do comprimento padrão e peso dos peixes de cada grupo foram respectivamente: VV – $92,22 \pm 1,98$ mm, $25,6 \pm 2,49$ g; PP – $88,77 \pm 1,05$ mm, $21,15 \pm 0,93$ g; PV – $90,91 \pm 1,82$ mm, $24,48 \pm 1,92$ g; VP – $88,89 \pm 1,45$ mm, $22,14 \pm 1,24$ g; E – $95,54 \pm 2,08$ mm, $28,30 \pm 2,91$ g. Não houve diferença entre o tamanho (*one-way* ANOVA, $F_{(4,84)} = 2,04$; $p = 0,096$) e o peso (*one-way* ANOVA, $F_{(4,84)} = 1,81$; $p = 0,133$) dos animais entre os tratamentos.

As marcações com VIE eram feitas em três ou quatro escamas, em uma de três possíveis regiões do corpo do animal: na região anterior do corpo, logo acima da linha, próximo ao início da nadadeira dorsal; na região medial, aproximadamente na metade da distância entre o fim do opérculo e início da nadadeira caudal; na região posterior, acima da linha lateral próximo ao final da nadadeira dorsal.

Todos os aquários eram cobertos em três das quatro laterais por papel contact azul por propiciar a redução no cortisol dos animais (MAIA; VOLPATO, 2013; VOLPATO; BARRETO, 2001). Assim como nas caixas d'água, a temperatura foi mantida a 28 ± 1 °C, com fotoperíodo de 12L:12E (das 7h às 19h), a amônia e nitrito foram medidos antes de todos os blocos de testes para garantir a qualidade da água: nível sempre em 0 ppm (medidos com kits comerciais – LabconTest), e o pH mantido a $7,0 \pm 0,1$ (aferido com medidor eletrônico).

3. CONDUTA ÉTICA

Todos os procedimentos foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da UNESP, São José do Rio Preto, SP (216/2019).

4. RESULTADOS

Dos 95 animais utilizados, três do grupo PP não passaram no critério da etapa treino. Além desses, um animal de cada um dos grupos VP, PV e E também não avançaram para a etapa teste. Assim, sobraram as seguintes réplicas: 19 (VV), 16 (PP), 18 (PV), 18 (VP) e 18 (E).

O número de ataques emitidos e sofridos foi quantificado para ambas as lutas de todos os espécimes, sendo que o grupo VV apresentou o maior número de ataques emitidos e menor número de ataques sofridos, situação oposta foi observada para o grupo PP e os demais (PV e VP) ficaram no intermédio desses ataques (Tabela 2). Para todos os 71 peixes que lutaram com oponentes reais a

avaliação qualitativa de vencer ou perder as lutas foi corroborada pelo ID. No período da manhã a média \pm EP do ID dos peixes dominantes foi de $0,76 \pm 0,016$, aumentando no período da tarde para $0,96 \pm 0,011$.

Tabela 2. Número de ataques emitidos e sofridos por cada grupo experimental. O 1º empareiramento, corresponde ao primeiro dia de luta (45 min) e o 2º empareiramento ao segundo dia de luta (45 min com outro oponente). Os valores apresentados correspondem a média \pm EP.

Grupo experimental	Empareiramento	Ataques emitidos	Ataques sofridos
Grupo VV	1º empareiramento	175,74 \pm 24,97	66,47 \pm 15,33
	2º empareiramento	239,84 \pm 23,86	70,68 \pm 13,18
Grupo PP	1º empareiramento	71,69 \pm 18,35	169,19 \pm 18,34
	2º empareiramento	23,56 \pm 6,97	196 \pm 19,37
Grupo PV	1º empareiramento	66,05 \pm 13,40	192,83 \pm 26,18
	2º empareiramento	193,94 \pm 17,16	35,94 \pm 9,68
Grupo VP	1º empareiramento	166,28 \pm 18,19	59,05 \pm 14,31
	2º empareiramento	61,11 \pm 14,07	255,56 \pm 22,85

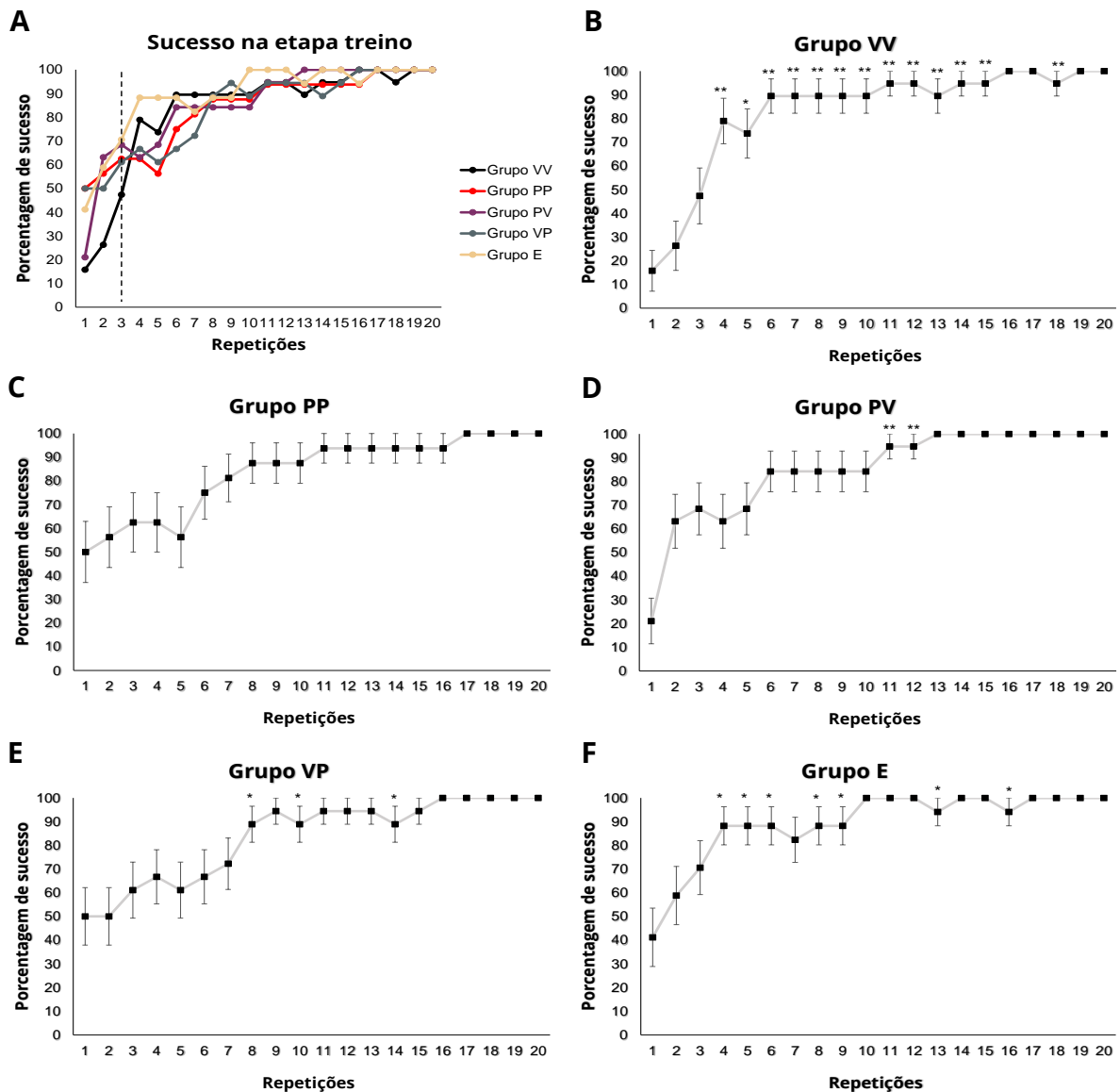
Fonte: elaborado pelo autor.

4.1. Etapa treino

Não houve diferença entre os grupos experimentais, para latência para realizar o desvio (GLMM, $\chi^2 = 8,48$; $p = 0,076$), latência para se alimentar (GLMM, $\chi^2 = 5,78$; $p = 0,216$) e o sucesso (GLMM, $\chi^2 = 2,67$; $p = 0,614$), sendo que todos apresentaram uma melhora do desempenho ao longo das repetições para todas as variáveis: latência para realizar o desvio (GLMM, $\chi^2 = 3000,82$; $p < 0,001$); latência para se alimentar (GLMM, $\chi^2 = 2789,84$; $p < 0,001$) e sucesso (GLMM, $\chi^2 = 151,31$; $p < 0,001$).

Para o sucesso durante essa etapa, todos os 89 animais que passaram no critério de se alimentar ao menos quatro vezes em um intervalo de cinco repetições apresentaram 100% de sucesso durante as últimas repetições. Em comparação com a primeira repetição, houve uma melhora no desempenho geral a partir da terceira repetição (Figura 3A). Analisou-se também o desempenho ao longo das repetições para cada uma dos grupos: VV (Figura 3B), PP (Figura 3C), PV (Figura 3D), VP (Figura 3E) e E (Figura 3F).

Figura 3: Porcentagem de indivíduos que se alimentaram na etapa treino. Em (A) a linha vertical tracejada indica o momento em que houve uma melhora no desempenho geral (N=89). Os demais gráficos representam: os animais que venceram duas lutas (B), os que perderam duas lutas (C), os que perderam a primeira e venceram a segunda (D), os que venceram a primeira e perderam a segunda (E) e os que empataram em ambas as lutas (F). O momento que a melhora ocorre varia, mas sem diferença significativa entre os grupos. Os asteriscos indicam o valor de p, sendo: um asterisco, $p < 0,05$; dois, $p < 0,01$; três, $p < 0,001$. Os dados são apresentados como média \pm EP.



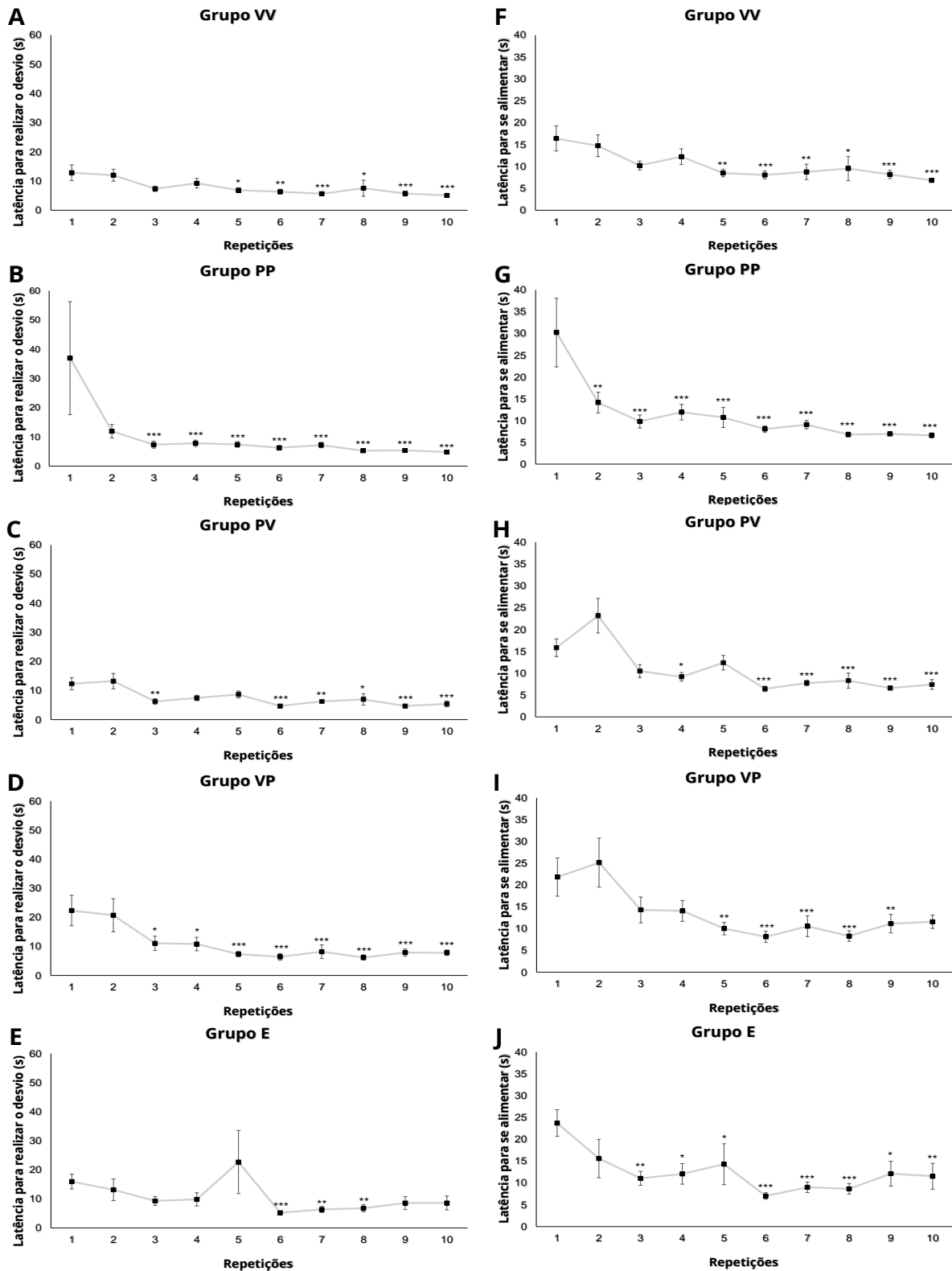
Fonte: elaborado pelo autor.

4.2 Etapa teste

Assim como na etapa treino, não houve diferença dos grupos experimentais em nenhuma das variáveis analisadas: latência para realizar o desvio (GLMM, $\chi^2 = 4,87$; $p = 0,30$); latência para se alimentar (GLMM, $\chi^2 = 3,68$; $p = 0,30$); número de batidas no obstáculo (GLMM, $\chi^2 = 3,69$; $p = 0,45$); tempo na zona incorreta (GLMM, $\chi^2 = 4,53$; $p = 0,34$) e sucesso (GLMM, $\chi^2 = 2,34$; $p = 0,67$). Sendo que todos apresentaram uma melhora do desempenho ao longo das repetições para todas as variáveis: latência para realizar o desvio (GLMM, $\chi^2 = 252,41$; $p < 0,001$); latência para se alimentar (GLMM, $\chi^2 = 8962$; $p < 0,001$); número de batidas no obstáculo (GLMM, $\chi^2 = 705,03$; $p < 0,001$); tempo na zona incorreta (GLMM, $\chi^2 = 549,36$; $p < 0,001$) e sucesso (GLMM, $\chi^2 = 20,63$; $p = 0,014$). Ao analisar todos os animais ($N=89$), a latência para realizar o desvio reduziu a partir da terceira repetição, se mantendo nas demais. Analisando individualmente cada grupo experimental: o VV, apresenta melhora a partir da quinta repetição ($p = 0,014$; Figura 4A); o PP, a partir da terceira repetição ($p < 0,001$; Figura 4B); PV também a partir da terceira ($p = 0,007$), porém oscila, na quarta ($p = 0,069$) e quinta repetição ($p = 0,594$), voltando e mantendo a melhora a partir da sexta ($p < 0,001$; Figura 4C); o VP, a partir da terceira repetição ($p = 0,03$; Figura 4D); o E, apresentou melhora apenas durante a sexta ($p < 0,001$), sétima ($p = 0,001$) e oitava repetições ($p = 0,001$; Figura 4E). Para a latência para se alimentar, o desempenho geral ($N=89$) melhorou a partir da terceira repetição, se mantendo nos demais. Analisando cada grupo experimental: VV teve uma melhora a partir da quinta repetição ($p = 0,001$; Figura 4F); o PP, a partir da segunda repetição ($p = 0,001$, Figura 4G); o PV, a partir da quarta repetição ($p = 0,013$), mantendo a diferença nos demais, com exceção da quinta repetição ($p = 0,827$; Figura 4H); o VP, a partir da quinta repetição ($p = 0,001$; Figura 4I); o E, a partir da terceira repetição ($p = 0,001$; Figura 4J).

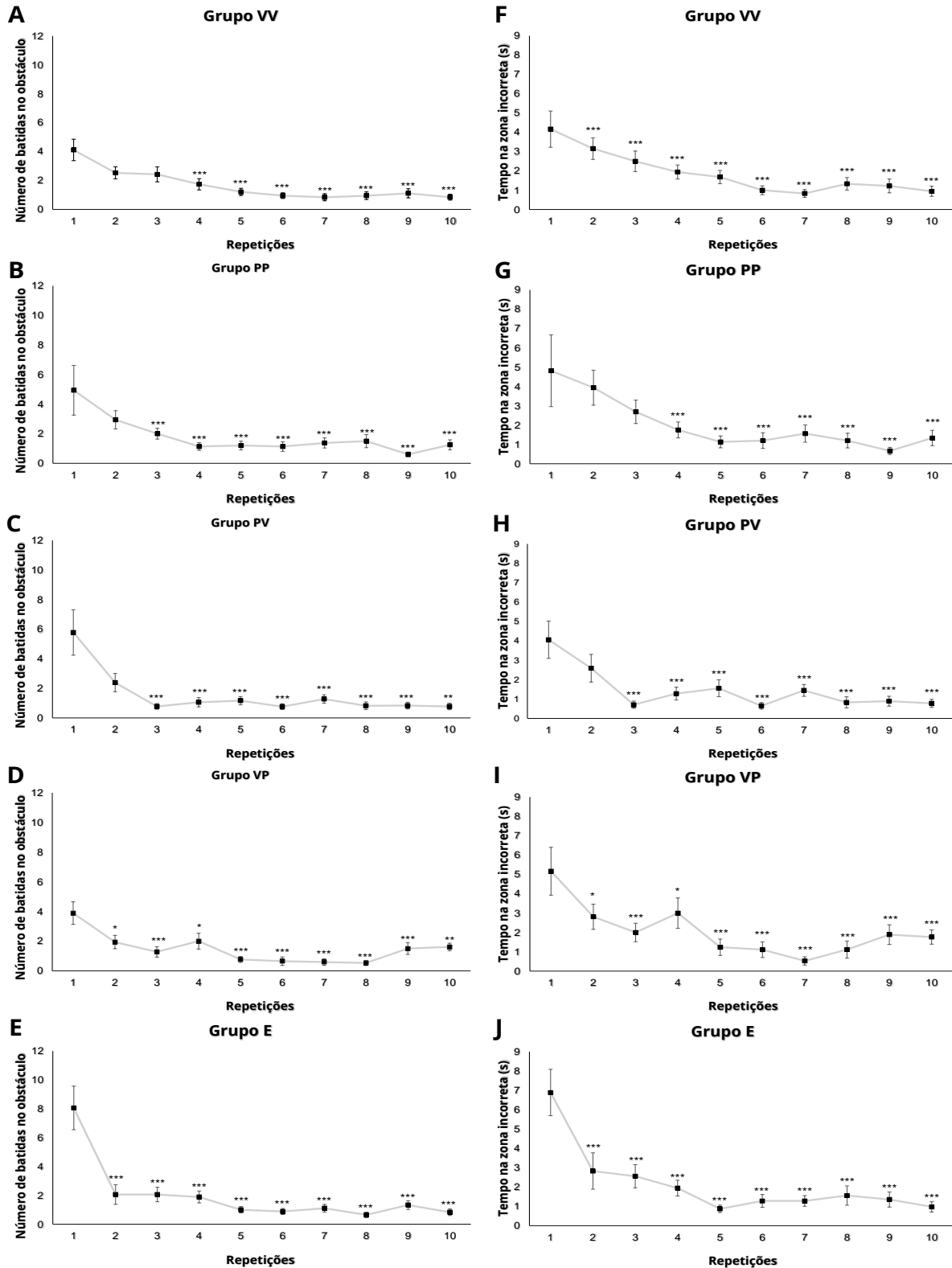
O tempo na zona incorreta, o desempenho geral ($N=89$) reduziu a partir da segunda repetição. Analisando cada grupo experimental: o grupo VV, melhorou o desempenho a partir da quarta repetição ($p = 0,001$; Figura 5A); o PP, a partir da quarta repetição ($p = 0,001$; Figura 5B); o PV, a partir da terceira repetição ($p < 0,001$; Figura 5C); o VP, a partir da segunda repetição ($p = 0,017$; Figura 5D); o E, a partir da segunda repetição ($p < 0,001$; Figura 5E). Já para o número de batidas no obstáculo, o desempenho geral melhorou a partir da segunda repetição. Ao comparar os grupos experimentais: o VV melhora a partir da quarta repetição ($p < 0,001$; Figura 5F); o PP, a partir da terceira ($p < 0,001$; Figura 5G); o PV, a partir da segunda repetição ($p < 0,001$; Figura 5H); o VP, a partir da segunda repetição ($p = 0,016$; Figura 5I); e E, a partir da segunda repetição ($p < 0,001$; Figura 5J).

Figura 4. Latência para realizar o desvio (A-E) e para se alimentar (F-J) dos animais que venceram duas lutas (Grupo VV), que perderam duas lutas (Grupo PP), que perderam a primeira e venceram a segunda (Grupo PV), que venceram a primeira e perderam a segunda (Grupo VP) e o grupo que empatou em ambas as lutas (Grupo E). Houve diferença ao longo das repetições, mas não entre os grupos. Asteriscos indicam diferença significativa da primeira repetição, sendo: um asterisco, $p < 0,05$; dois, $p < 0,01$; três, $p < 0,001$. Os dados são apresentados como média \pm EP.



Fonte: elaborado pelo autor.

Figura 5. Número de batidas no obstáculo (A-E) e tempo na zona incorreta (F-J) dos animais que venceram duas lutas (Grupo VV), que perderam duas lutas (Grupo PP), que perderam a primeira e venceram a segunda (Grupo PV), que venceram a primeira e perderam a segunda (Grupo VP) e o grupo que empatou em ambas as lutas (Grupo E). Houve diferença ao longo das repetições, mas não entre os grupos. Asteriscos indicam diferença significativa da primeira repetição, sendo: um asterisco, $p < 0,05$; dois, $p < 0,01$; três, $p < 0,001$. Os dados são apresentados como média \pm EP.

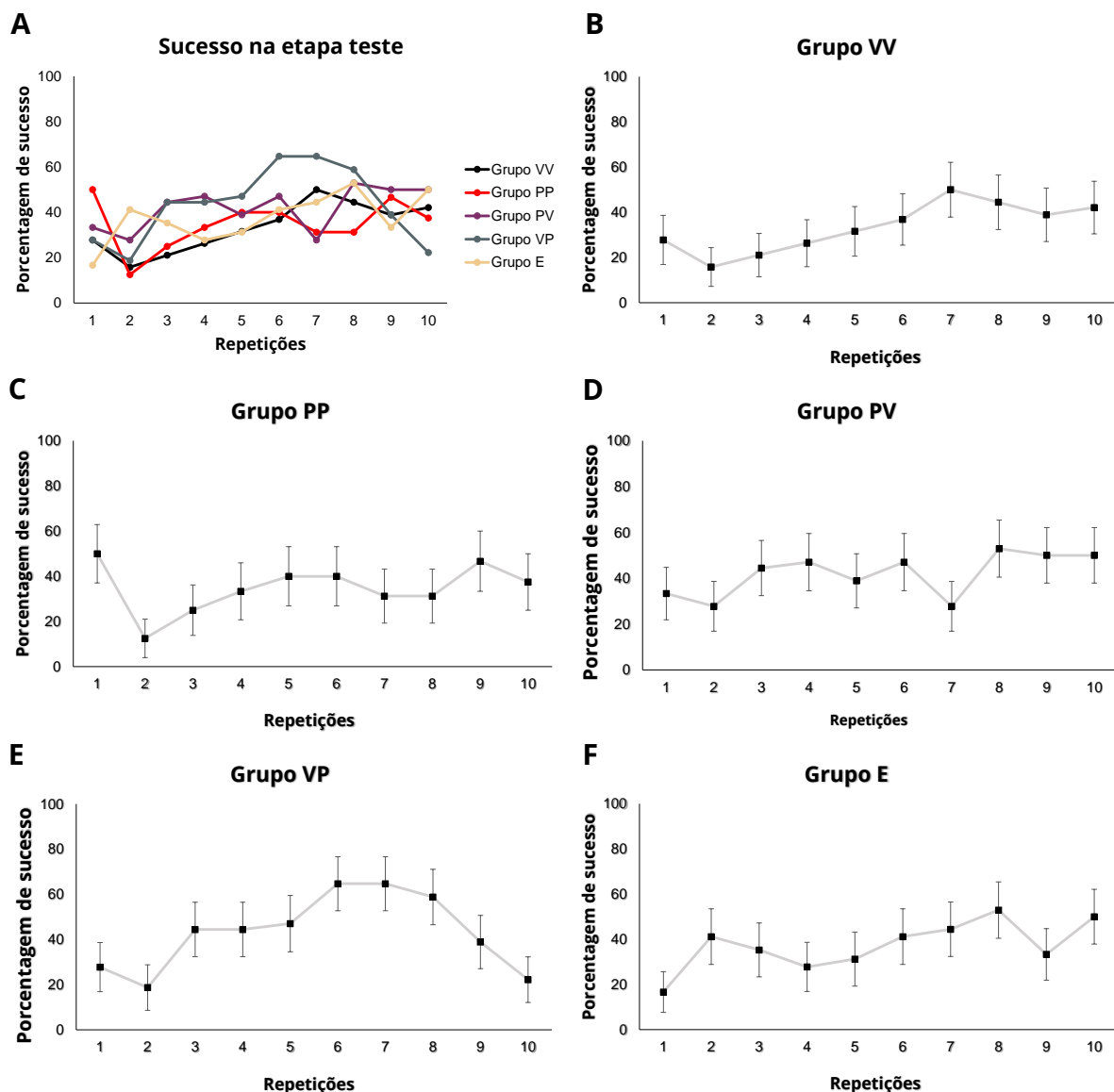


Fonte: elaborado pelo autor.

Para o sucesso durante essa etapa, embora exista uma diferença entre as repetições (GLMM, $\chi^2 = 20,63$; $p = 0,014$), ela não ocorre entre a primeira repetição e as demais (critério utilizado para avaliar uma melhora no desempenho inicial do indivíduo). Nesse caso as únicas diferenças entre as repetições estão entre a segunda e a sexta ($p = 0,035$) e segunda e oitava ($p = 0,014$), sendo

inconsistente no decorrer dos testes. Ao analisar cada grupo experimental, não há qualquer melhora ao longo das repetições: VV (GLMM, $\chi^2 = 9,61$; $p = 0,383$); PP (GLMM, $\chi^2 = 6,80$; $p = 0,658$); PV (GLMM, $\chi^2 = 8,24$; $p = 0,510$); VP (GLMM, $\chi^2 = 16,84$; $p = 0,051$); E (GLMM, $\chi^2 = 8,40$; $p = 0,494$).

Figura 6: Porcentagem de indivíduos que realizaram o desvio sem bater na barreira transparente. Não houve melhora no desempenho geral (N=89), indicado em (A). Os demais gráficos representam: os que venceram duas lutas (B), os que perderam duas lutas (C), os que perderam a primeira e venceram a segunda (D), os que venceram a primeira e perderam a segunda (E) e o grupo que empatou em ambas as lutas (F). Em nenhum caso houve qualquer melhora significativa ao longo das repetições, assim como não houve diferença entre os grupos. Todos os pontos indicam média (\pm EP).



Fonte: elaborado pelo autor.

5. DISCUSSÃO

Neste estudo, testamos, por meio do paradigma do desvio, a hipótese de que animais perdedores apresentariam maior controle inibitório e flexibilidade cognitiva do que vencedores em disputas hierárquicas. Todos animais apresentaram sucesso no teste, mas o desempenho foi parecido

entre todos os grupos experimentais, independentemente do número de vitórias, derrotas ou empates. Dessa forma, nossa hipótese foi refutada. Entretanto, demonstramos pela primeira vez que o controle inibitório e a flexibilidade cognitiva não dependem do resultado das lutas em peixes sociais e, provavelmente, essas habilidades cognitivas apresentam importante papel na tomada de decisão em ambientes sociais.

Podemos garantir que todos os animais que lutaram com oponentes reais passaram por experiências de vitórias ou derrotas. Não apenas alguns comportamentos qualitativos mostraram isso, mas também a relação de ataques emitidos e sofridos pelos animais. Quanto a metodologia empregada, o tempo dado aos animais para lutarem diretamente e o tempo que passaram separados também garantiram que o resultado dos embates ficasse ainda mais evidente. É possível dizer isso ao observar a diferença do ID nos períodos da manhã, quando os animais não haviam lutado ainda, e o período da tarde, após a primeira luta e horas de interação indireta.

É válido ressaltar que todos os grupos experimentais apresentaram controle inibitório, reforçando os dados observados para *O. niloticus* (BRANDÃO; FERNANDES; GONÇALVES-DE-FREITAS, 2019) e em outras espécies de peixes (LUCON-XICCATO; GATTO; BISAZZA, 2017; MONTALBANO; BERTOLUCCI; LUCON-XICCATO, 2020), corroborando a capacidade de peixes de passarem no paradigma do desvio. No caso, todos apresentaram melhoras no desempenho. Indicando que os animais aprendem rapidamente sobre as alterações ambientais. Contudo, a ausência de associação do efeito vencedor/perdedor sobre o desempenho dos peixes na tarefa de controle inibitório, indica que mesmo que haja a inibição do comportamento de luta por parte dos perdedores, exigindo o uso do controle inibitório em mais tarefas, essa inibição não parece alterar o controle inibitório do animal como um todo.

O controle inibitório é uma classe de funções executivas associada à percepção ambiental e à resolução de problemas (DIAMOND, 2013). As funções executivas, portanto, permitem que os indivíduos lidem com ambientes flutuantes, ajustando seu comportamento de acordo com tais mudanças (ARDILA, 2008). Nesse caso, a flexibilidade cognitiva é condição chave para animais sociais, uma vez que a idade, sexo e personalidades de coespecíficos são variáveis, exigindo habilidades igualmente flexíveis para lidar com um ambiente social imprevisível (DUNBAR; SHULTZ, 2007). A esse conjunto de fatores é possível incluir ainda a percepção e avaliação individual do ambiente (MENDL et al., 2009), o que seria esperado para animais com diferentes históricos de luta. De fato, lutas frequentes estão associadas a um perfil pessimista em peixes (ROGERS et al., 2020). No entanto, é plausível supor que, apesar da diferença na interpretação do ambiente geralmente atribuída a vencedores e perdedores (HSU; HUANG; WU, 2014; LAN; HSU,

2011), as funções executivas permitem respostas flexíveis em condições sociais variáveis independentemente da posição social.

Além das características cognitivas individuais, é sabido que a importância que os animais dão à recompensa pode influenciar o desempenho do animal em tarefas que exigem controle inibitório (BRUCKS et al., 2017; MAYACK; NAUG, 2015; WASCHER; DUFOUR; BUGNYAR, 2012). Dessa forma, a semelhança nas respostas de perdedores e vencedores poderia estar associada ao tipo de recompensa que foi utilizada, no caso a comida. Entretanto, além de ser improvável que essas mudanças tenham ocorrido de maneira a se neutralizarem, a diferença da recompensa pode não afetar sempre o desempenho do animal, assim como observado por Gatto et al. (2018) em estudos com *Poecilia reticulata*. Nesse estudo, os autores utilizaram grupos sociais como recompensa e concluíram que a resposta depende da distância, mas não é influenciada pelo número de indivíduos atrás do aparato transparente. Em nosso estudo, não poderíamos utilizar coespecíficos, pois estaríamos criando um viés nos resultados, uma vez que a aproximação do grupo está associada ao efeito vencedor-perdedor (OLIVEIRA; MCGREGOR; LATRU, 1998). Não sabemos se vencedores e perdedores avaliam a recompensa da mesma maneira e, a única forma de ter certeza, seria testando o quanto o animal valoriza o alimento (ex. GALHARDO; ALMEIDA; OLIVEIRA, 2011). No entanto, a semelhança no desempenho entre todos os grupos experimentais sugere que não houve efeito da recompensa no controle inibitório apresentado neste estudo.

Embora a forma mais comum de se analisar o desempenho no paradigma do desvio seja pelo sucesso, ao analisarmos outras variáveis, como as latências ou insistência no vidro, podemos avaliar o quanto os animais querem acessar o recurso. Para as variáveis latência para realizar o desvio e latência para se alimentar, o grupo PP apresentou a maior média, com grande variação de resultados (observada pelo valor de EP) na primeira repetição. Sendo que essa diferença entre os indivíduos do grupo PP diminui nas demais repetições, ficando mais similar aos demais grupos. Mesmo que isso possa parecer uma melhora rápida do grupo PP, o que não é observado em outros grupos, essa diferença não é estatisticamente significativa, nem ao comparar apenas a primeira repetição entre grupos.

Uma forma de explicar essa semelhança nos resultados é justamente pelo uso do controle inibitório em diversas tarefas do animal, podendo ser empregada tanto na parte motora, quanto para capacidade de prestar atenção e se focar em alguma tarefa (DIAMOND, 2013). O controle inibitório é usado não apenas para evitar as lutas, por parte dos perdedores e indivíduos mais submissos, mas também pelos vencedores, normalmente mais dominantes, para defender seu território, perseguindo intrusos (GONÇALVES-DE-FREITAS et al., 2019). O animal precisa inibir o comportamento agressivo e não ir muito longe de sua área reprodutiva, uma vez que há o risco de ter a área invadida

por um macho oportunista (GONÇALVES-DE-FREITAS; NISHIDA, 1998). Outra observação pertinente é sobre a fluidez do ambiente social, um animal dominante não necessariamente o será durante toda sua vida, podendo se tornar mais submisso e vice-versa. Dessa maneira e devido a importância do controle inibitório para ambos, em diferentes tarefas, é mais provável que a capacidade dessa função executiva seja algo mais inerente a cada indivíduo, como apontado por Macario et al., (2021) ou ao menos não tão susceptível ao resultado de poucas lutas.

É importante salientar que o controle inibitório entre os grupos experimentais aqui analisados não necessariamente reflete o controle inibitório de indivíduos mais dominantes e submissos em qualquer tamanho de grupo animal. É necessário separar o efeito vencedor/perdedor de indivíduos mais submissos e dominantes. Embora indivíduos mais perdedores tendam a ser os mais submissos, e após uma luta entre dois animais um vai sair vencedor e dominante enquanto o outro sairá perdedor e submisso, ao analisar um ambiente mais natural, um indivíduo que perdeu apenas uma luta é submisso em relação a seu rival, mas em grupos grandes, o animal não necessariamente fica na base da hierarquia social de todo o grupo após uma derrota. Levando em consideração apenas as duas lutas, os animais VV e PP seriam mais dominantes e submissos, respectivamente, do que os animais que VP e PV. Porém, é possível que o controle inibitório de animais que perderam a maioria das disputas durante a vida toda e estão na base da hierarquia social sofra alguma mudança, como observado em *Crocota crocuta*, onde indivíduos mais submissos de grupos numerosos apresentaram melhor desempenho no controle inibitório (JOHNSON-ULRICH; HOLEKAMP, 2020). Assim, estudos com histórico mais longo de vitórias e derrotas em peixes sociais precisam ser realizados.

6. CONCLUSÃO

Mesmo com as alterações comportamentais que ocorrem após vencer ou perder uma luta, nenhum dos grupos experimentais apresentaram qualquer diferença significativa para nenhuma das variáveis analisadas, portanto concluímos que não há influência do efeito vencedor/perdedor sobre o controle inibitório indicando que vencedores e perdedores apresentam níveis semelhantes de flexibilidade cognitiva. Essa flexibilidade não está associada ao efeito vencedor/perdedor, mas provavelmente é uma característica chave na tomada de decisões que, assim como em mamíferos, promove o ajuste ao ambiente social em peixes.

7. REFERÊNCIAS

- ALCOCK, J. Male size and survival: The effects of male combat and bird predation in Dawson's burrowing bees, *Amegilla dawsoni*. **Ecological Entomology**, v. 21, n. 4, p. 309–316, 1996.
- AMICI, F.; AURELI, F.; CALL, J. Fission-Fusion Dynamics, Behavioral Flexibility, and Inhibitory

- Control in Primates. **Current Biology**, v. 18, n. 18, p. 1415–1419, 2008.
- ANG, T. Z.; MANICA, A. Aggression, segregation and stability in a dominance hierarchy. **Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 277, n. 1686, p. 1337–1343, 2010.
- ARDILA, A. On the evolutionary origins of executive functions. **Brain and Cognition**, v. 68, n. 1, p. 92–99, 2008.
- BERAN, M. J.; HOPKINS, W. D. Self-Control in Chimpanzees Relates to General Intelligence. **Current Biology**, v. 28, n. 4, p. 574– 579.e3, 2018.
- BOSCOLO, C. N. P.; MORAIS, R. N.; GONÇALVES-DE-FREITAS, E. Same-sized fish groups increase aggressive interaction of sex-reversed males Nile tilapia GIFT strain. **Applied Animal Behaviour Science**, v. 135, n. 1–2, p. 154–159, 2011.
- BRAITHWAITE, V. A. Cognitive ability in fish. In: **Fish Physiology**. [s.l: s.n.]. v. 24p. 1–37.
- BRANDÃO, M. L.; FERNANDES, A. M. T. DE A.; GONÇALVES-DE-FREITAS, E. Male and female cichlid fish show cognitive inhibitory control ability. **Scientific Reports**, v. 9, n. 1, p. 1–8, 2019.
- BRUCKS, D. et al. Reward type and behavioural patterns predict dogs’ success in a delay of gratification paradigm. **Scientific Reports**, v. 7, n. January, p. 1–10, 2017.
- CARLSON, S. M.; MOSES, L. J. Individual Differences in Inhibitory Control and Children’s Theory of Mind. **Child Development**, v. 72, n. 4, p. 1032–1053, 2001.
- CARVALHO, T. B.; HA, J. C.; GONÇALVES-DE-FREITAS, E. Light intensity can trigger different agonistic responses in juveniles of three cichlid species. **Marine and Freshwater Behaviour and Physiology**, v. 45, n. 2, p. 91–100, 2012.
- CARVALHO, T.; GONÇALVES-DE-FREITAS, E. Sex group composition, social interaction, and metabolism in the fish Nile tilapia. **Brazilian Journal of Biology**, v. 68, n. 4, p. 807–812, 2008.
- DIAMOND, A. Executive functions. **Annual Review of Psychology**, v. 64, p. 135–168, 2013.
- DUNBAR, R. I. M.; SHULTZ, S. Evolution in the social brain. **Science**, v. 317, n. 5843, p. 1344–1347, 2007.
- EARLEY, R. L. et al. Winner and loser effects are modulated by hormonal states. **Frontiers in Zoology**, v. 10, n. 1, p. 1–13, 2013.
- FALSARELLA, L. DO N.; BRANDÃO, M. L.; GONÇALVES-DE-FREITAS, E. Fish adjust aggressive behavior to audience size with limited information on bystanders’ fighting ability. **Behavioural Processes**, v. 142, n. July, p. 116–118, 2017.
- FALTER, U. Description of the Color Patterns in *Oreochromis niloticus* (L) (Teleostei, Cichlidae). **Annales de la Société royale zoologique de Belgique**, v. 117, p. 201–219, 1987.
- GALHARDO, L.; ALMEIDA, O.; OLIVEIRA, R. F. Measuring motivation in a cichlid fish: An

- adaptation of the push-door paradigm. **Applied Animal Behaviour Science**, v. 130, n. 1–2, p. 60–70, 2011.
- GATTO, E.; LUCON-XICCATO, T.; BISAZZA, A. Factors affecting the measure of inhibitory control in a fish (*Poecilia reticulata*). **Behavioural Processes**, v. 157, p. 11–17, 2018.
- GAUY, A. C. DOS S.; BOSCOLO, C. N. P.; GONÇALVES-DE-FREITAS, E. Less water renewal reduces effects on social aggression of the cichlid *Pterophyllum scalare*. **Applied Animal Behaviour Science**, v. 198, n. October 2017, p. 121–126, 2018.
- GONÇALVES-DE-FREITAS, E. et al. Effect of water renewal on dominance hierarchy of juvenile Nile tilapia. **Applied Animal Behaviour Science**, v. 112, n. 1–2, p. 187–195, 2008.
- GONÇALVES-DE-FREITAS, E. et al. Social behavior and welfare in Nile Tilapia. **Fishes**, v. 4, n. 23, 2019.
- GONÇALVES-DE-FREITAS, E.; NISHIDA, S. M. **Sneaking behaviour of the Nile tilapia** *Boletim Tecnico do CEPTA*, 1998.
- HARDY, I. C. W.; BRIFFA, M. *Animal Contests*. **Cambridge University Press**, 2013.
- HSU, Y.; EARLEY, R. L.; WOLF, L. L. Modulation of aggressive behaviour by fighting experience: Mechanisms and contest outcomes. **Biological Reviews of the Cambridge Philosophical Society**, v. 81, n. 1, p. 33–74, 2006.
- HSU, Y.; HUANG, Y. Y.; WU, Y. T. Multiple contest experiences interact to influence each other's effect on subsequent contest decisions in a mangrove killifish. **Animal Cognition**, v. 17, n. 2, p. 165–175, 2014.
- JOHNSON-ULRICH, L.; HOLEKAMP, K. E. Group size and social rank predict inhibitory control in spotted hyaenas. **Animal Behaviour**, v. 160, p. 157–168, 2020.
- KABADAYI, C. et al. Ravens, New Caledonian crows and jackdaws parallel great apes in motor self-regulation despite smaller brains. **Royal society open science**, v. 3, n. 4, p. 160104, 2016.
- KABADAYI, C.; BOBROWICZ, K.; OSVATH, M. The detour paradigm in animal cognition. **Animal Cognition**, v. 21, n. 1, p. 21–35, 2018.
- LAN, Y. T.; HSU, Y. Prior contest experience exerts a long-term influence on subsequent winner and loser effects. **Frontiers in Zoology**, v. 8, p. 1–12, 2011.
- LANE, S. M.; BRIFFA, M. The price of attack: rethinking damage costs in animal contests. **Animal Behaviour**, v. 126, p. 23–29, 2017.
- LEHNER, P. N. **Handbook of ethological methods**. Second ed. [s.l.] Cambridge University Press, 1998.
- LONGRIE, N. et al. Behaviours Associated with Acoustic Communication in Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus*). **PLoS ONE**, v. 8, n. 4, 2013.

- LUCON-XICCATO, T.; GATTO, E.; BISAZZA, A. Fish perform like mammals and birds in inhibitory motor control tasks. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, p. 1–8, 2017.
- MACARIO, A. et al. Intraspecific variation in inhibitory motor control in guppies, *Poecilia reticulata*. **Journal of Fish Biology**, v. 98, n. 1, p. 317–328, 2021.
- MACLEAN, E. L. et al. The evolution of self-control. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 111, n. 20, 2014.
- MAIA, C. M.; VOLPATO, G. L. Environmental light color affects the stress response of Nile tilapia. **Zoology**, v. 116, n. 1, p. 64–66, 2013.
- MAYACK, C.; NAUG, D. Starving honeybees lose self-control. **Biology Letters**, v. 11, n. 1, 2015.
- MENDL, M. et al. Cognitive bias as an indicator of animal emotion and welfare: Emerging evidence and underlying mechanisms. **Applied Animal Behaviour Science**, v. 118, n. 3–4, p. 161–181, 2009.
- MIYAI, C. A. et al. The correlation between subordinate fish eye colour and received attacks: A negative social feedback mechanism for the reduction of aggression during the formation of dominance hierarchies. **Zoology**, v. 114, n. 6, p. 335–339, 2011.
- MONTALBANO, G.; BERTOLUCCI, C.; LUCON-XICCATO, T. Measures of inhibitory control correlate between different tasks but do not predict problem-solving success in a fish, *Poecilia reticulata*. **Intelligence**, v. 82, n. September, p. 101486, 2020.
- OLIVEIRA, R. F.; CARNEIRO, L. A.; CANÁRIO, A. V. M. No hormonal response in tied fights. **Nature**, v. 437, n. September, 2005.
- OLIVEIRA, R. F.; MCGREGOR, P. K.; LATRU, C. Know thine enemy: fighting fish gather information from observing conspecific interactions. **Proceedings of the Royal Society of London B**, v. 265, n. March, p. 1045–1049, 1998.
- OLIVEIRA, R. F.; SILVA, A.; CANÁRIO, A. V. M. Why do winners keep winning? Androgen mediation of winner but not loser effects in cichlid fish. **Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 276, n. 1665, p. 2249–2256, 2009.
- PASSOLUNGHU, M. C.; SIEGEL, L. S. Short-Term Memory, Working Memory, and Inhibitory Control in Children with Difficulties in Arithmetic Problem Solving. **Journal of Experimental Child Psychology**, v. 80, n. 1, p. 44–57, 2001.
- PRENTER, J.; ELWOOD, R. W.; TAYLOR, P. W. Self-assessment by males during energetically costly contests over precopula females in amphipods. **Animal Behaviour**, v. 72, n. 4, p. 861–868, 2006.
- ROGERS, L. et al. Aggressive encounters lead to negative affective state in fish. **PLoS ONE**, v. 15, n. 4, p. 1–12, 2020.
- ROS, A. F. H.; BECKER, K.; OLIVEIRA, R. F. Aggressive behaviour and energy metabolism in a

- cichlid fish, *Oreochromis mossambicus*. **Physiology and Behavior**, v. 89, n. 2, p. 164–170, 2006.
- SAVAŞÇI, B. B.; LUCON-XICCATO, T.; BISAZZA, A. Ontogeny and personality affect inhibitory control in guppies, *Poecilia reticulata*. **Animal Behaviour**, v. 180, p. 111–121, 2021.
- TABORSKY, B.; OLIVEIRA, R. F. Social competence: An evolutionary approach. **Trends in Ecology and Evolution**, v. 27, n. 12, p. 679–688, 2012.
- TOLSTÓI, L. *A morte de Ivan Ilitch*. 1. ed. Rio de Janeiro: Antofágica, 2020.
- VOLPATO, G. L. et al. Eye color as an indicator of social rank in the fish Nile tilapia. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 36, n. 12, p. 1659–1663, 2003.
- 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, 2001.
- WASCHER, C. A. F. et al. How does cognition shape social relationships? **Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 373, n. 1756, 2018.
- WASCHER, C. A. F.; DUFOUR, V.; BUGNYAR, T. Carrion crows cannot overcome impulsive choice in a quantitative exchange task. **Frontiers in Psychology**, v. 3, n. APR, p. 1–6, 2012.
- ZAR, J. H. **Biostatistical analysis**. Upper Saddle River, New Jersey: Prentice Hall, 1999.

APÊNDICE A – Script GLMM

Modelo de script utilizado no programa R, para análise GLMM referente à latência para realizar o desvio.

#####Script final para Teste - L.D.#####

```

#Para importar planilha
dados = read.table(file.choose(), header = T )
head (dados)
tail (dados)

#Transformar variaveis em fatores
dados$Trial = as.factor(dados$Trial)
dados$Grupo = as.factor(dados$Grupo)
dados$Peixe = as.factor(dados$Peixe)
dados$L.D. = as.numeric(dados$L.D.)
str(dados) #para checar se a estrutura dos dados está ok.

#####Faremos inicialmente a análise por modelos mistos lineares (LMM)#####

library (lme4)
modelo.grupos <- lmer(L.D. ~ Grupo + Trial + (1|Peixe), data = dados)
#aqui estamos querendo ver quanto nossa variavel dependente (L.D.) é influenciado pela variável
fixa "Grupo" e a variavel aleatória "peixe".

summary(modelo.grupos)
#Com o modelo escolhido, temos que ver o ajuste desse modelo para com suas premissas, para tal
usaremos o qqplot (gráfico de quartil da distribuição normal), além disso podemos checar a
homocedasticidade visualmente, ou seja a variabilidade de residuos.

library (RVAideMemoire)
plotresid(modelo.grupos, shapiro = T)
#Não apresenta homocedasticidade nos dados, portanto nao tem as premissas necessárias para LMM,
faremos GLMM.

###Para o GLMM, devemos indicar uma familia para analise de nossos dados, para decidir a melhor
familia devemos testar seus residuos e ver qual melhor se encaixa com uma distribuicao esperada. No
caso pensamos nos seguintes modelos:

library(glmmTMB)

```

```

m1 <- glmmTMB(L.D. ~ Grupo * Trial + (1|Peixe), family = "poisson", data = dados)
m2 <- glmmTMB(L.D. ~ Grupo * Trial + (1|Peixe), family = "Gamma" (link = log), data = dados)
m3 <- glmmTMB(L.D. ~ Grupo + Trial + (1|Peixe), family = "poisson", data = dados)
m4 <- glmmTMB(L.D. ~ Grupo + Trial + (1|Peixe), family = "Gamma" (link = log), data = dados)
m5 <- glmer(L.D. ~ Grupo * Trial + (1|Peixe), family = "poisson", data = dados)
m6 <- glmer(L.D. ~ Grupo * Trial + (1|Peixe), family = "Gamma" (link = log), data = dados)
m7 <- glmer(L.D. ~ Grupo + Trial + (1|Peixe), family = "poisson", data = dados)
m8 <- glmer(L.D. ~ Grupo + Trial + (1|Peixe), family = "Gamma" (link = log), data = dados)
#Comparamos seu AIC para selecionar o melhor modelo

```

```
AIC(m1, m2, m3, m4, m5, m6, m7, m8)
```

#M8 Foi o melhor modelo, comparamos então com o modelo nulo com o do melhor grupo, para ter certeza que existe uma influencia das variaveis

```
m.nulo <- glmer(L.D. ~ 1 + (1|Peixe), family = "Gamma" (link = log), data = dados)
```

```
AIC(m.nulo, m8)
```

#O M8 é melhor que o modelo nulo, fazemos então a analise de deviance, comando "Anova", para ver se há diferença entre as variáveis dos grupos.

```
library(car)
```

```
Anova(m8)
```

#Há uma diferença entre os trials, mas não entre os grupos. Realizamos então um teste pos-hoc para ver onde há essa diferença.

```
library (multcomp)
```

```
summary(glht(m8, linfct = mcp(Grupo = 'Tukey')))
```

```
summary(glht(m8, linfct = mcp(Trial = 'Tukey')))
```

###Esses são os valores obtidos com a analise dos trials de todos os grupos, para ver qual a diferença entre os trials dentro de cada grupo é necessário faze-los separadamente.

```
####Grupo VV
```

```
#Fazendo os dados
```

```
dadosVV = dados[dados$Grupo=="VV",1:4]
```

```
head (dadosVV)
```

```
tail (dadosVV)
```

```
dadosVV$Trial = as.factor(dadosVV$Trial)
```

```
dadosVV$Peixe = as.factor(dadosVV$Peixe)
```

```
dadosVV$L.D. = as.numeric(dadosVV$L.D.)
```

```
str(dadosVV)
```

```
#Criando os modelos
```

```
PVV = glmer(L.D. ~ Trial + (1|Peixe), family = "poisson", data = dadosVV)
```

```
GVV = glmer(L.D. ~ Trial + (1|Peixe), family = "Gamma" (link = "log"), data = dadosVV)
```

```
AIC(PVV, GVV)
```

```
#GVV é o melhor modelo, portanto o comparamos com o nulo
```

```
GVV.nulo <- glmer(L.D. ~ 1 + (1|Peixe), family = "Gamma" (link = "log"), data = dadosVV)
```

```
AIC (GVV, GVV.nulo)
```

```
#Sendo melhor, vemos se há diferença entre os trials.
```

```
Anova(GVV)
```

```
#Por fim um posthoc pra ver onde essa diferença esta.
```

```
summary(glht(GVV, linfct = mcp(Trial = 'Tukey')))
```

```
###Grupo PP
```

```
dadosPP = dados[dados$Grupo=="PP",1:4]
```

```
head (dadosPP)
```

```
tail (dadosPP)
```

```
dadosPP$Trial = as.factor(dadosPP$Trial)
```

```
dadosPP$Peixe = as.factor(dadosPP$Peixe)
```

```
dadosPP$L.D. = as.numeric(dadosPP$L.D.)
```

```
str(dadosPP)
```

```
PPP = glmer(L.D. ~ Trial + (1|Peixe), family = "poisson", data = dadosPP)
```

```
GPP = glmer(L.D. ~ Trial + (1|Peixe), family = "Gamma" (link = "log"), data = dadosPP)
```

```
AIC(PPP, GPP)
```

```
GPP.nulo <- glmer(L.D. ~ 1 + (1|Peixe), family = "Gamma" (link = "log"), data = dadosPP)
```

```
AIC (GPP, GPP.nulo)
```

```
Anova(GPP)
```

```
summary(glht(GPP, linfct = mcp(Trial = 'Tukey')))
```

```
###Grupo PV
```

```
dadosPV = dados[dados$Grupo=="PV",1:4]
```

```
head (dadosPV)
```

```
tail (dadosPV)
```

```
dadosPV$Trial = as.factor(dadosPV$Trial)
```

```
dadosPV$Peixe = as.factor(dadosPV$Peixe)
```

```
dadosPV$L.D. = as.numeric(dadosPV$L.D.)
```

```
str(dadosPV)
```

```
PPV = glmer(L.D. ~ Trial + (1|Peixe), family = "poisson", data = dadosPV)
```

```
GPV = glmer(L.D. ~ Trial + (1|Peixe), family = "Gamma" (link = "log"), data = dadosPV)
```

```
AIC(PPV, GPV)
```

```
GPV.nulo <- glmer(L.D. ~ 1 + (1|Peixe), family = "Gamma" (link = "log"), data = dadosPV)
```

```
AIC (GPV, GPV.nulo)
```

```
Anova(GPV)
```

```
summary(glht(GPV, linfct = mcp(Trial = 'Tukey')))
```

```
###Grupo VP
```

```
dadosVP = dados[dados$Grupo=="VP",1:4]
```

```
head (dadosVP)
```

```
tail (dadosVP)
```

```
dadosVP$Trial = as.factor(dadosVP$Trial)
```

```
dadosVP$Peixe = as.factor(dadosVP$Peixe)
```

```

dadosVP$L.D. = as.numeric(dadosVP$L.D.)
str(dadosVP)
PVP = glmer(L.D. ~ Trial + (1|Peixe), family = "poisson", data = dadosVP)
GVP = glmer(L.D. ~ Trial + (1|Peixe), family = "Gamma" (link = "log"), data = dadosVP)
AIC(PVP, GVP)
GVP.nulo <- glmer(L.D. ~ 1 + (1|Peixe), family = "Gamma" (link = "log"), data = dadosVP)
AIC (GVP, GVP.nulo)
Anova(GVP)
summary(glht(GVP, linfct = mcp(Trial = 'Tukey'))))

###Grupo E

dadosE = dados[dados$Grupo=="E",1:4]
head (dadosE)
tail (dadosE)
dadosE$Trial = as.factor(dadosE$Trial)
dadosE$Peixe = as.factor(dadosE$Peixe)
dadosE$L.D. = as.numeric(dadosE$L.D.)
str(dadosE)
PE = glmer(L.D. ~ Trial + (1|Peixe), family = "poisson", data = dadosE)
GE = glmer(L.D. ~ Trial + (1|Peixe), family = "Gamma" (link = "log"), data = dadosE)
AIC(PE, GE)
GE.nulo <- glmer(L.D. ~ 1 + (1|Peixe), family = "Gamma" (link = "log"), data = dadosE)
AIC (GE, GE.nulo)
Anova(GE)
summary(glht(GE, linfct = mcp(Trial = 'Tukey'))))

```