

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS-IBB
CAMPUS DE BOTUCATU

**IMPLICAÇÕES DO PERFIL DE ANSIEDADE NA
DINÂMICA SOCIAL EM TILÁPIA-DO-NILO**

Lara Wichr Genovez

Orientador: Gilson Luiz Volpato

**Dissertação apresentada ao Instituto
de Biotecnologia da UNESP, como parte
das exigências para obtenção do Título
de Mestre em Zoologia.**

Botucatu-SP

2010

Aos meus pais, José Antonio e Elaine, ao meu irmão Fábio, obrigada por terem acreditado e confiado em mim, além de todo amor e carinho que vocês me dedicaram.

“É melhor tentar e falhar, que preocupar-se e ver a vida passar. É melhor tentar e ainda que em vão, do que sentar-se fazendo nada até o final. Eu prefiro na chuva caminhar, que me esconder em casa. Prefiro ser feliz, embora louco, que me conformar em viver...”

Martin Luther King

AGRADECIMENTOS

- Ao meu orientador Gilson Luis Volpato, por conduzir-me à evolução profissional, pois seus ensinamentos serão importantíssimos para minha carreira e vida.
- Aos meus pais e irmão que me incentivaram com palavras de carinho e amor!
- Aos meus companheiros de laboratório Ligia, Nilo, Fernanda, Graziela, Renato, Carol “Pink”, Carol “ Paper”, Dani, Dyeno obrigada pelo apoio e em especial a Vivian e Thiago pela imensa ajuda e carinho e paciência.
- Ao Antônio C. B. Tardivo, pelo auxílio técnico para realização dos experimentos.
- Ao pessoal da seção de Pós-Graduação, pela eficiência e amizade.
- A todos os professores e funcionários do Departamento de Fisiologia que me auxiliaram.
- Aos funcionários do Departamento de Farmacologia Luiz Antonio de Oliveira e Paulo César Mioni pela imensa ajuda e disposição.

- Ao meu querido amigo Róberson Sakabe, que sempre acreditou que eu poderia chegar até aqui!
- As minhas queridas amigas Camila, Carolina, Natália, Vivian, Ligia, Tainara, Aline, Ieda, Fabiana, Marcela, Grasieli, por sempre estarem presentes em todos os momentos de minha vida..!!!!
- A Celma Maria pela elaboração da ficha catalográfica.

O protocolo experimental foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa Animal do Instituto de Biociências da UNESP, Botucatu-SP.

RESUMO

Este estudo investigou o perfil de ansiedade em juvenis de Tilápia-do-Nilo (*Ore Niloticus*). Num primeiro capítulo, determinamos um perfil comportamental indicativo de níveis de ansiedade. Num segundo capítulo, avaliamos o efeito de diferentes proporções de peixes com ansiedade alta (AA) e pouca (PA) na agressão e na produção de peixes em condições de aquário. No primeiro capítulo, por meio da modulação do comportamento de peixes usando drogas ansiolíticas (Diazepam, DZP) e ansiogênicas (Pentilenotetrazol, PTZ), demonstramos que o tempo gasto na natação foi um indicador confiável do nível de ansiedade (menor a locomoção, maior o nível de ansiedade). Também descobrimos que esse traço comportamental é melhor do que a medida de latência para sair do abrigo e explorar o ambiente novo. No segundo capítulo, outros peixes foram separados pelo critério de locomoção em perfis AA e PA e agrupados (6 peixes/aquário) para observação da agressão, do crescimento, da alimentação e da sobrevivência em 3 proporções: a) 50% de AA + 50% de PA; b) 100% PA e c) 100% AA. Nenhuma das variáveis observadas foi diferente entre essas composições de grupo.

Palavras chave: ansiedade, *Oreochromis niloticus*, atividade locomotora, agressão, peixe.

ABSTRACT

This study investigated the anxiety profile in Nile tilapia juveniles (*Oreochromis niloticus*) by determining in a first chapter a behavioral profile to indicate levels of anxiety and, in a second chapter, the effect of different proportion of high (HA) and low (LA) anxiety fish on aggression and fish production in aquarium conditions. In the first chapter, by modulating fish behavior with ansiolitic (Diazepam DZP) and ansiogenic (Pentylentetrazole PTZ) drugs, we demonstrated that time fish spent in swimming was a reliable indicator of anxiety level (the lower the swimming, the higher the anxiety level). We also found that this behavioral trait is better than measure of latency to exit shelter and explore a novel environment. Then, in the second chapter, other fish were separated by the locomotor criterium in HA and LA profiles and grouped (6 fish/aquarium) for aggression, growth, feeding and survival observations at three proportions: a) 50% HA + 50% LA, b) 100% HA, and c) 100% LA. Neither of the observed variables was different among these group compositions.

Keywords: anxiety, *Oreochromis niloticus*, locomotor activity, aggression, fish

INTRODUÇÃO

Dentre os vários perfis de um indivíduo, a ansiedade é uma característica com implicações diretas para suas atividades. Estudos em animais revelam que é experienciado subjetivamente como um estado desagradável, tendo como características o medo, a apreensão, o temor e sentimentos correlatos. Portanto a ansiedade é descrita como um estado emocional que pode ter conseqüências para a sobrevivência da espécie, (Graeff, 1983). Sua expressão envolve alterações comportamentais, psicofisiológicas e cognitivas. Sendo uma característica biológica relevante, seu estudo em organismos não humanos auxilia a compreensão do conjunto de respostas adaptativas das espécies estudadas.

Entretanto testes sobre ansiedade em peixes são ainda bastante incipientes. Alguns trabalhos mostram que o comportamento exploratório é gradualmente inibido pela ansiedade, assim representando uma medida indireta da mesma (Crawley et al., 1980 ; Handley et al., 1984 ; Pellow et al., 1985). Outro estudo demonstra que embora a ansiedade seja uma emoção negativa, adaptativa e essencial para o indivíduo escapar de situações de perigo ou evitá-las, as interações entre ansiedade e ambiente podem resultar em respostas não adaptativas. Estas últimas podem ser prejudiciais tanto para o bem estar dos peixes quanto para a confiabilidade dos experimentos (Salomons et al., 2009).

Estudos sobre ansiedade em organismos não humanos estão imersos em dificuldades metodológicas. A principal delas é que estados de consciência em organismos não-humanos não podem ser completamente abarcados pela ciência empírica (Duncan, 2006; Dawkins, 2006 e Volpato et al., 2007). A alternativa para tais estudos é por padrões comportamentais que sejam fortemente associados a situações onde se acredita ocorrer estados de ansiedade. Segundo Godinho (2009), em camundongos, a memória apetitiva pode ser influenciada pelos níveis de ansiedade e o teste de labirinto em cruz parece ser um modelo útil para investigar a relação entre memória e ansiedade.

Embora isso possa se tornar um problema circular, no caso de alguns atributos psicológicos, como é o caso da ansiedade, o conhecimento da base farmacológica serve como uma importante ferramenta metodológica. As drogas ansiolíticas reduzem a

ansiedade, enquanto que as ansiogênicas aumentam esse estado. A literatura reporta que modelos comportamentais, como o exploratório, são indicados para se avaliar a relação entre ansiedade e os compostos benzodiazepínicos (Belzung & Berton, 1997 ; Chaouloff et al., 1997 ; Martin, 1998). Assim, quando os indivíduos são administrados com esses fármacos temos uma maior convicção de que os estados de ansiedade correspondentes estejam presentes neles. Com essa indução farmacológica, a identificação de padrões comportamentais associados aos estados de ansiedade é grandemente facilitada e creditada.

No presente trabalho estudamos o papel da ansiedade na dinâmica de grupo numa espécie de peixe, a tilápia do Nilo, *Oreochromis niloticus* (Linnaeus, 1758). Como não encontramos estudos que identifiquem estados e níveis de ansiedade nessa espécie, num primeiro momento buscamos validar para a tilápia do Nilo padrão comportamental de estados de ansiedade descrito em outros peixes. Como a ansiedade reflete uma postura de medo frente a um perigo potencial (Gouveia et al., 2006), ou mesmo uma precaução, buscamos identificar esse estado com os peixes em situação de perigo potencial; no caso, um novo ambiente. Estados de ansiedade afetam consideravelmente as respostas de peixes. Segundo Faganello & Mattioli, (2007) o ansiolítico clorfeniramina (CPA) apresentou um efeito facilitatório na memória na tarefa de esquiva inibitória em goldfish (*Carassius auratus*) expostos a novo ambiente. Embora tal abordagem seja frequentemente investigada sob o rótulo de neofobia (Braithwaite & Boulcott, 2007), ou mesmo perfis de “hesitação” ou “ousadia” (*shy* e *bold*, da denominação inglesa) (Wilson & Stevens, 1993), avaliamos as respostas dentro do paradigma farmacológico, com drogas ansiogênicas e ansiolíticas, o que nos permite mais incisivamente associar as respostas comportamentais aos estados de ansiedade.

Os estudos da cognição e outros aspectos da personalidade dos peixes foram revisados por Brown et al. (2006). Nesse livro, tanto as forças genéticas quanto o papel da experiência são mostrados como fatores moduladores do comportamento dos peixes, particularmente em relação à alimentação, agressão, migração, reprodução, reconhecimento interindividual e formação de cardumes, culminando com implicações para a piscicultura. Porém, nada encontramos na literatura sobre as implicações dos perfis de ansiedade dos peixes sobre a dinâmica de seus agrupamentos. A proporção de indivíduos numa população

deve obedecer a um equilíbrio que permita a essa população tanto se manter constante na regularidade ambiental, quanto possuir mecanismos de ajuste para os casos de alteração ambiental mais drástica. Por exemplo, no caso das características de indivíduos hesitantes ou ousados, a repercussão da proporção deles no grupo tem efeitos evidentes na sobrevivência. Enquanto os animais ousados têm vantagem em relação à exploração do ambiente e conquistas de novos recursos, os indivíduos hesitantes são menos susceptíveis a predação (Wilson & Stevens, 2005).

De forma similar, é válido supormos que perfis de ansiedade possam ter implicações significativas sobre a dinâmica de uma população. Este será nosso segundo objetivo, para o qual avaliaremos o impacto de diferentes proporções de indivíduos “ansiosos” e “pouco ansiosos” na dinâmica do grupo (avaliado em termos de interações agonísticas, sobrevivência, dinâmica alimentar e crescimento).

Objetivo Geral

- Avaliar implicações do perfil de ansiedade na dinâmica social do grupo.

Objetivos Específicos

- Identificar exemplares de Tilápia-do-Nilo em relação às características comportamentais de ansiedade.
- Avaliar o efeito de diferentes composições de grupo em relação ao perfil de ansiedade da Tilápia do Nilo sobre as interações agonísticas, alimentação, crescimento e sobrevivência.

2. Materiais e Métodos

2.1. Esquema Geral

Este estudo está dividido em dois capítulos. No primeiro, usamos droga ansiolítica (Diazepam - DZP) e de droga ansiogênica (Pentilenotetrazol - PTZ) para certificarmos que alterações na atividade locomotora e latência para saída de toca em ambiente novo são indicadores comportamentais de estados de ansiedade na tilápia do Nilo. Este capítulo foi desenvolvido em 2 estudos, a saber: Estudo 1 - atividade locomotora e Estudo 2 - latência para exploração de novo ambiente. Para tanto, algumas doses foram testadas para o PTZ, pois seus efeitos nos peixes são ainda pouco explorados. Para o Diazepam usamos a dose de 1 µl/g, conforme descrito em Pellow *et al.* (1985) registraram diferenças das atividades quando os animais eram manipulados com diazepam.

No segundo capítulo, investigamos o efeito da composição desses grupos (variando-se o percentual de níveis de ansiedade dos indivíduos) na dinâmica de interação e alimentação.

2.2. Animais

Utilizamos juvenis de tilápia-do-Nilo, *Oreochromis niloticus* (Linnaeus, 1758), no intervalo de 6,0 a 8,1 cm de comprimento total. Esses peixes eram mantidos em biotério durante um período de 15 a 30 dias, em tanques de 1000 L, com aeração constante, temperatura entre 24 a 26°C e fotoperíodo das 06:00 h às 18:00 h. Antes e durante o experimento, os animais foram alimentados uma vez por dia com ração peletizada 36% de proteína (cerca de 5% da massa corporal).

2.3. Capítulo 1 - Certificação de características comportamentais de estados de ansiedade na tilápia do Nilo.

2.3.1. Delineamento

Investigamos animais em isolamento submetidos a um dos seguintes tratamentos: a) animais que receberam droga ansiogênia (Pentilenotetrazol - PTZ) em diferentes concentrações; b) animais que receberam droga ansiolítica (Diazepam - DZP) em dose única (1 µl/g); c) animais que receberam o veículo de preparação das drogas; d) animais considerados controles absolutos que não receberam qualquer tipo de fármaco ou veículo. Em cada droga, a proporção de volume de injeção foi constante e igual a 1 µl/g.

2.3.2. Estudo 1

Nesse estudo testamos os fármacos Diazepam e PTZ, sendo que para este último investigamos algumas doses e estabelecemos a adequada para evidenciar comportamento de ansiedade. Assim, três experimentos foram desenvolvidos: experimento 1 – teste do ansiolítico Diazepam; 2 – teste de PTZ nas doses de 10, 30, 50 e 100 µl/g ; 3 – teste de PTZ na dose de 200 µl/g. Em todos esses experimentos, havia um grupo controle absoluto (sem qualquer manipulação farmacológica, exceto a movimentação para colocação no aquário teste) e um controle com injeção i.p. de salina (salina para mamíferos).

Nos três experimentos, cada peixe era capturado do grupo estoque e anestesiado em uma solução de 10L de água e 5g de benzocaina, perfazendo uma concentração de 500mg/L. Após perda da postura, administrávamos a droga correspondente (ou sem injeção no caso do grupo controle absoluto).

Em seguida, esses animais eram introduzidos em água sem anestésico até recuperarem a postura, o que ocorria em cerca de 5 min. Após essa recuperação, cada peixe era introduzido no respectivo aquário teste (40 x 20 cm de base e 25 cm de altura), consistindo num ambiente novo, e filmados por 20 min para registro posterior do tempo

despendido em locomoção. A biometria dos animais usados em cada experimento está na tabela 1, 2 e 3.

Tabela 1: Biometria dos animais que receberam a dose de 1 µl/g ansiolítico Diazepam (DZP).

Tratamentos	DZP	Salina	Controle
Peso (g)	10,7±0,75	9,46±1,31	8,23±0,74
Comprimento (cm)	7,11±0,22	6,36±0,40	6,17±0,24

Não houve diferença entre os três tratamentos (Anova, EIC, Tukey, $p > 0,05$)

Tabela 2: Biometria dos animais que receberam diferentes doses do ansiogênico Pentilenotetrazol (PTZ).

Tratamentos	PTZ10	PTZ30	PTZ50	PTZ100	Salina	Controle
Peso (g)	10,03±1,04	9,94±1,56	8,56±0,51	9,57±0,37	8,97±0,46	8,22±0,72
Comprimento (cm)	6,23±0,65	6,24±0,56	6,24±0,22	6,36±0,27	6,36±0,18	6,24±0,24

Não houve diferença entre os três tratamentos (Anova, EIC, Tukey, $p > 0,05$).

Tabela 3: Biometria dos animais que receberam a dose de 200 µl/g do ansiogênico Pentilenotetrazol (PTZ).

Tratamentos	PTZ200	Salina	Controle
Peso (g)	11,93±0,84	10,94±1,16	11,15±10,0
Comprimento (cm)	7,18±0,31	6,98±0,21	6,89±0,22

Não houve diferença entre os três tratamentos (Anova, EIC, Tukey, $p > 0,05$).

2.3.3. Estudo 2

Neste estudo investigamos a ansiedade por meio da latência para iniciar exploração de novo ambiente. Basicamente, os animais eram colocados num compartimento restrito e escuro, denominado toca daqui para a frente (Fig. 1), mantidos por 5 min para ajustes e, em seguida, um parede da toca era removida permitindo que o peixe adentrasse o restante do aquário. Registrávamos a latência para saída dessa toca, num período máximo de 10 min. A hipótese básica era que os animais mais ansiosos demorassem mais a sair da toca, ou mesmo não saíssem no período estipulado. Essas observações foram feitas nos 4 tratamentos referidos no início deste capítulo. No caso dos animais que receberam Diazepam- DZP, a dose foi única. Os que receberam Pentilenotetrazol - PTZ, a dose de 200 $\mu\text{l/g}$ foi testada num experimento (com respectivos controles, absoluto e salina) e a dose de 400 $\mu\text{l/g}$ num outro experimento (com os respectivos controles). A biometria dos animais usados em cada experimento está nas tabelas 1 e 2.

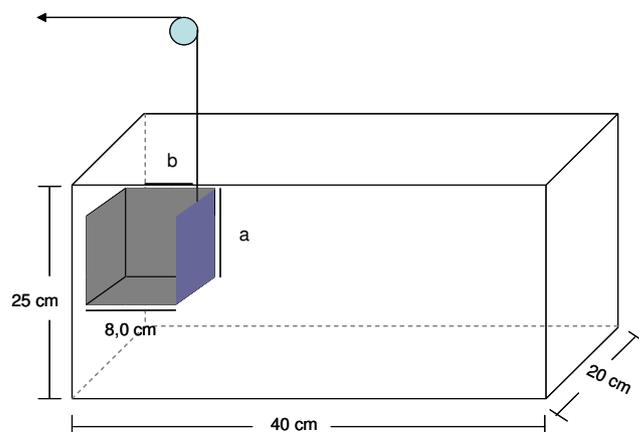


Figura 1: Aquário experimental. O peixe é introduzido no interior da caixa escura (abertura b). A abertura voltada para o vidro do aquário serve para visualização do observador. A face azul é uma porta removível por meio de um sistema de roldanas (abertura a).

Tabela 1. Biometria dos animais que receberam ansiolítico (DZP) na dose de 1 µl/g, e ansiogênico (PTZ) na dose de 200 µl/g.

Tratamentos	DZP	PTZ200	Salina	Controle
Peso (g)	16,22±0,67	15,46±1,47	16,08±1,01	15,94±1,09
Comprimento (cm)	7,92±0,21	7,61±0,37	7,92±0,21	7,71±0,46

Não houve diferença entre os três tratamentos (Anova, EIC, Tukey, $p > 0,05$).

Tabela 2: Biometria de animais que receberam ansiogênico (PTZ) na dose de 400 µl/g.

Tratamentos	PTZ400	Salina	Controle
Peso (g)	11,99±1,41	11,92±1,23	12,39±1,36
Comprimento (cm)	6,99±0,34	7,03±0,16	7,19±0,31

Não houve diferença entre os três tratamentos (Anova, EIC, Tukey, $p > 0,05$).

2.4. Capítulo 2 - Avaliação do efeito da proporção de indivíduos ansiosos sobre a dinâmica social do grupo.

2.4.1. Delineamento

Com base na locomoção dos peixes, separamos animais ansiosos (100 %) e pouco ansiosos (100%). O estudo consistiu em três tratamentos com grupos de seis peixes cada: a) grupos compostos somente de indivíduos considerados ansiosos (A); b) grupos compostos somente de indivíduos considerados pouco ansiosos (PA); e c) grupos mistos com metade dos indivíduos de cada perfil de ansiedade (PAxA). Esses animais permaneceram por 20 dias nessas composições e registramos a interação social entre os indivíduos, a ingestão e conversão alimentar do grupo, a taxa de crescimento do grupo e a sobrevivência. Investigamos cinco grupos em cada tratamento. A biometria dos animais usados em cada experimento está na tabela 1.

Tabela 1: Biometria de animais compostos em grupos dentre o perfil de ansiedade.

Composição dos grupos	PA	A	PAxA
Peso (g)	8,63±1,36	9,16±1,65	9,39±1,36
Comprimento (cm)	7,20±0,80	7,81±0,51	7,63±0,58

Não houve diferença entre os três tratamentos (Anova, EIC, Tukey, $p > 0,05$).

2.4.2. Seleção dos grupos

Tendo em conta os resultados do primeiro estudo, realizamos testes comportamentais para separar grupos de peixes considerados ansiosos e pouco ansiosos, através da variável locomoção. Os peixes foram colocados isolados em aquários (40 x 20 cm de base e 25 cm de altura) durante 20min (1200s). Os indivíduos que atingiram até 200s de natação foram classificados ansiosos, e os que nadassem por mais de 800s foram considerados pouco ansiosos, através do máximo e mínimo do estudo anterior.

2.4.3. Procedimentos Específicos

Foram utilizados aquários retangulares de vidro transparente (40 x 20 cm de base e 25 cm de altura) com aeração contínua, com temperatura de $25 \pm 1,3^{\circ}\text{C}$. Os animais foram alimentados com ração peletizada (cerca de 5% da massa corporal) no mínimo uma vez ao dia. As eventuais sobras de ração eram recolhidas e quantificadas após 10min do oferecimento do alimento.

Variáveis quantificadas

Taxa de Crescimento Específico (TCE) - obtido da seguinte fórmula:

$$\text{TCE (\%/dia)} = \frac{[(\ln \text{ peso total final}) - (\ln \text{ peso total inicial})] \times 100}{\text{Tempo de experimento (dias)}}$$

Conversão alimentar (CA) - foi calculada dividindo-se o consumo da ração pelo ganho de peso dos peixes no período (Citação).

Ingestão de alimento - medida pela diferença entre a quantidade de peletes oferecida e a quantidade remanescente após 10 min de oferta do alimento. Como o peso médio dos peletes era conhecido (0,02g), calculou-se posteriormente o peso de alimento ingerido pelo grupo, que foi dividido pelo número de peixes que havia em cada grupo (pois houve mortes ao longo do experimento). A sobrevivência foi calculada como percentual em relação ao número inicial de animais do grupo.

Agressividade - avaliada pela frequência de emissão dos tipos agonísticos classificados conforme descritos abaixo (adaptados de Alvarenga & Volpato, 1995 e Giaquinto & Volpato, 1997).

✓ **Mordidas:** o agressor morde partes do oponente.

- ✓ **Confrontos laterais:** os peixes permanecem próximos entre si, dispostos lado a lado (mesmo sentido ou sentidos opostos), e batem as caudas para ambos os lados.
- ✓ **Confronto bucal:** ambos os peixes se aproximam frontalmente com a boca aberta e mordem concomitantemente a boca do oponente, geralmente empurrando-o para trás.
- ✓ **Confrontos totais:** somatória dos três tipos descritos acima.
- ✓ **Perseguição:** o agressor nada para o oponente enquanto o oponente foge sem contato físico.

3. Resultados

Capítulo 1

3.1. Estudo 1: Modulação farmacológica da ansiedade e locomoção

O ansiolítico (DZP) aumentou o tempo despendido em atividade locomotora (Fig. 1), comparativamente aos dois controles utilizados. No caso da droga ansiogênica (PTZ), num primeiro estudo vimos uma tendência de relação dose-efeito sobre a atividade locomotora dos animais (Fig. 2), indicando a necessidade de que outras doses fossem investigadas. Isso foi feito num outro estudo, onde apenas a dose de 200 $\mu\text{l/g}$ foi testada e reduziu a atividade dos animais (Fig. 3).

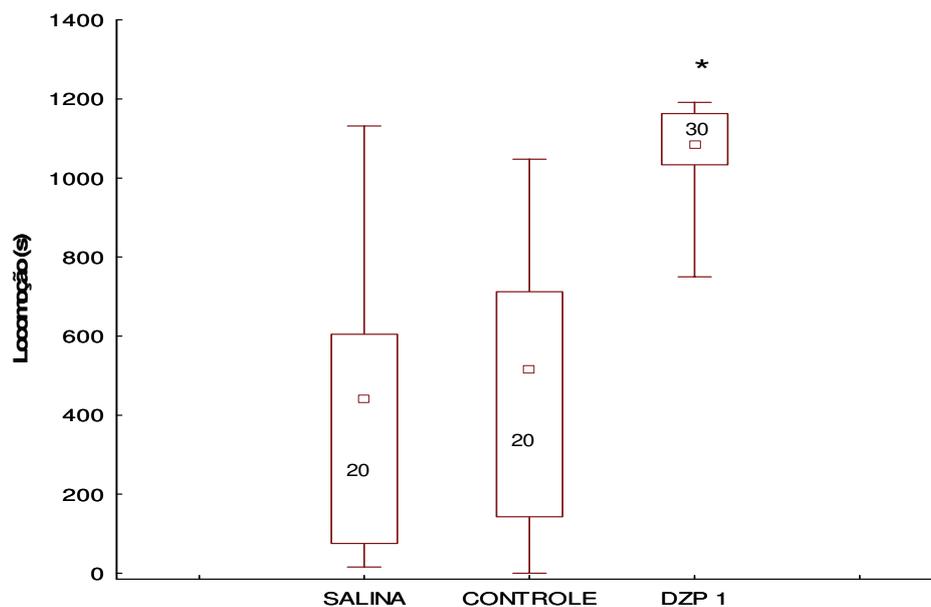


Figura 1: Locomoção de juvenis de Tilápia-do-Nilo submetidos a administração do ansiolítico DZP (Diazepam) na dosagem 1 $\mu\text{l/g}$, solução salina (0,9%) e controle. * indica diferença significativa entre DZP e os outros tratamentos ($p < 0,05$). O número de réplicas está indicado dentro de cada barra.

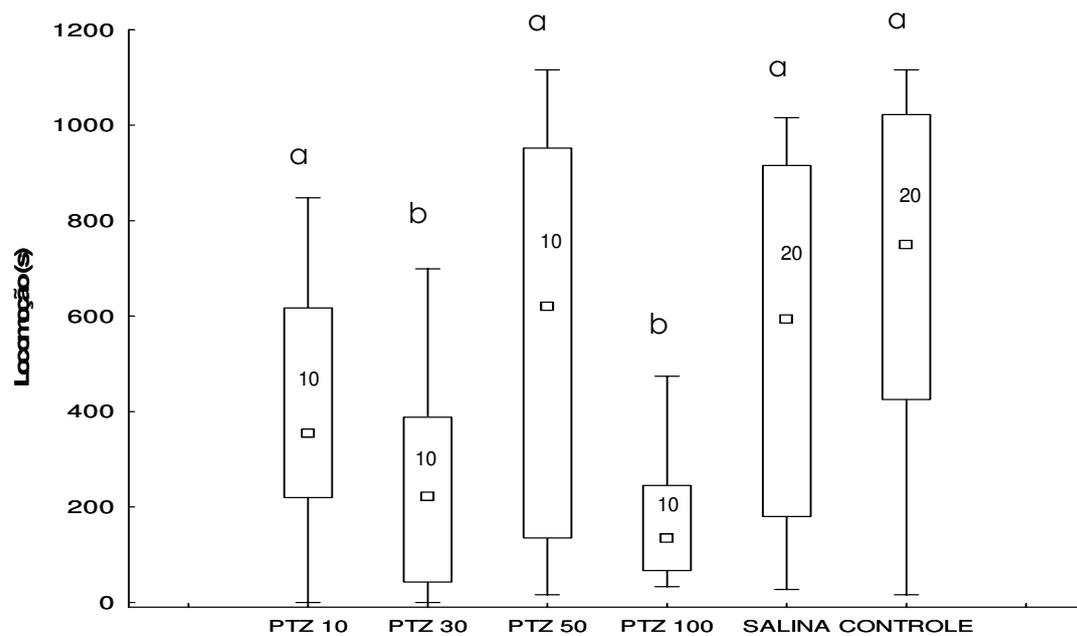


Figura 2: Locomoção de juvenis de Tilápia-do-Nilo submetidos a administração do ansiogênico PTZ (Pentilenotetrazol) nas dosagens 10, 30, 50 e 100 $\mu\text{l/g}$, solução salina (0,9%) e controle. Medianas com ao menos uma mesma letra são iguais entre si (Kruskall-Wallis, $p > 0,05$). O numero de réplicas está indicado dentro de cada barra.

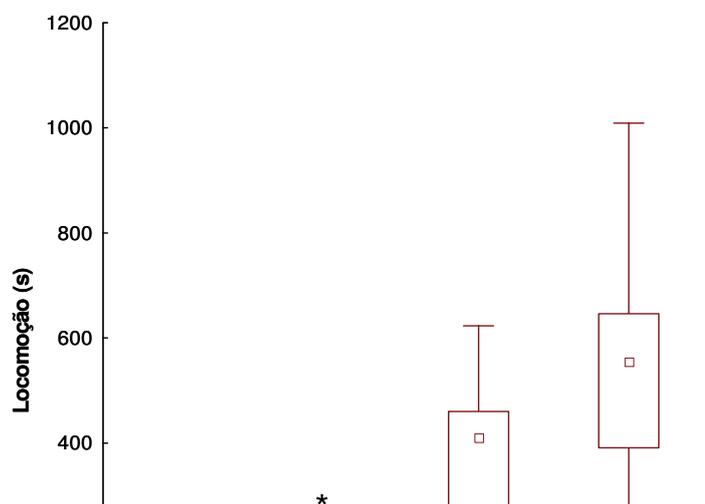


Figura 3: Locomoção de juvenis de Tilápia-do-Nilo submetidos a administração do ansiogênico PTZ (Pentilenotetrazol) na dosagem 200 µl/g, solução salina (0,9%) e controle. * indica diferença significativa entre PTZ 200 e os outros tratamentos (Kruskall-Wallis, $p < 0,05$). Tratamentos com 10 réplicas cada..

Estudo 2: Modulação farmacológica da ansiedade e latência para exploração de novo ambiente

O tempo para saída da toca em direção ao novo ambiente foi drasticamente reduzido pelo ansiolítico (DZP), enquanto que a droga ansiogênica não afetou essa latência (Fig. 4). Isso nos levou a outro experimento apenas com o (PTZ), aumentando a dose. Nesse caso, o (PTZ) na dose de 400 µl/g aumentou a latência para saída da toca em direção ao novo ambiente (Fig. 5).

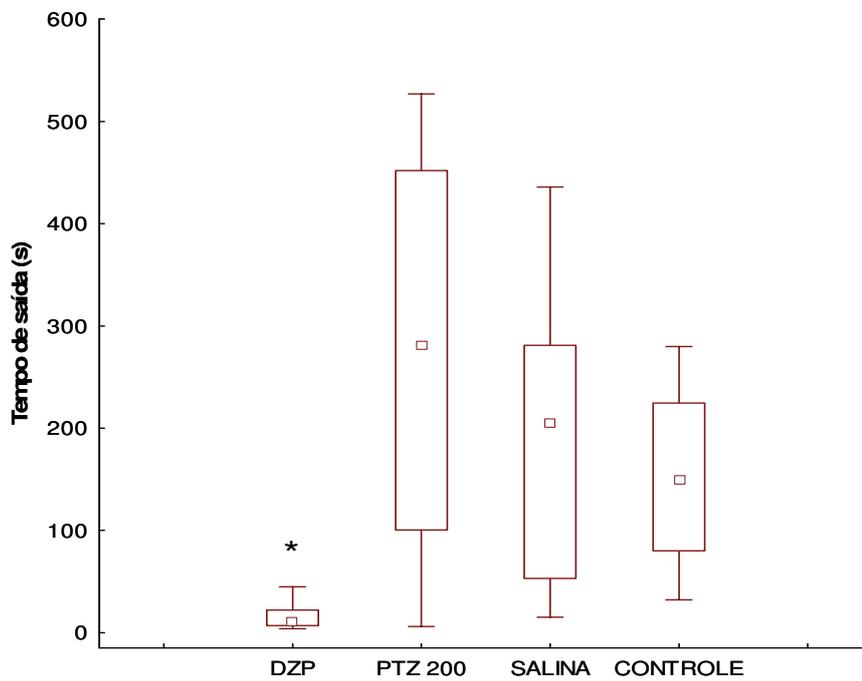


Figura 4: Latência de saída da toca em juvenis de Tilápia-do-Nilo submetidos a administração do ansiolítico DZP (Diazepam) na dosagem 1 μ l/g, PTZ (Pentilenotetrazol) na dosagem 200 μ l/g, solução salina (0,9%) e controle. * indica diferença significativa entre DZP e os outros tratamentos (Kruskall-Wallis, $p < 0,05$). Tratamentos com 10 réplicas cada.

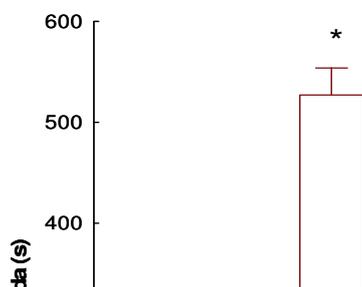


Figura 5: Latência de saída da toca em juvenis de Tilápia-do-Nilo submetidos a administração do PTZ (Pentilenotetrazol) na dosagem de 400 µl/g, solução salina (0,9%) e controle. * indica diferença significativa entre PTZ e os outros tratamentos (Kruskall-Wallis, $p < 0,05$). Tratamentos com 10 réplicas cada.

Capítulo 2

Observamos que nem a interação social e nem o desempenho zootécnico foram diferentes entre as três composições de grupo, conforme evidenciado nas tabelas 1 e 2, respectivamente.

Tabela 1: Taxa individual de confrontos agonísticos de juvenis de Tilápia-do-Nilo em função da composição dos grupos em termos do grau de ansiedade dos peixes.

Composição dos grupos	Confronto Lateral	Confronto Bucal	Mordida	Perseguição	Total
100% PA	8,27±4,83	4,67±4,56	4,67±4,56	9,80±5,25	65,06±23,87
100% A	8,83±5,11	2,92±4,72	4,67±4,56	11,83±7,71	65,16±20,27
50% PA x 50% A	7,82±2,92	2,91±1,92	4,67±4,56	6,64±2,14	59,81±14,41
p (KruskalWallis)	0,84	0,42	0,10	0,98	0,38

PA = peixes pouco ansiosos; A = peixes ansiosos. Dados médios (\pm DP) de 5 grupos (6 peixes/grupo) em cada composição de grupo.

Tabela 2: Desempenho zootécnico de juvenis de Tilápia-do-Nilo em função da composição dos grupos em termos do grau de ansiedade dos peixes.

Composição do Grupo	TCE (%/dia)	Ingestão (g)	CA (g)	Sobrevivência (%)
Pouco ansiosos (PA)	1,69 \pm 0,93	19,48 \pm 4,16	1,64 \pm 1,24	83,33 \pm 11,79
Ansiosos (A)	2,37 \pm 0,97	15,8 \pm 5,03	1,34 \pm 0,54	63,33 \pm 43,14
50% PA + 50% A	1,38 \pm 0,56	10,57 \pm 5,17	2,37 \pm 1,04	80,0 \pm 36,13

Dados médios (\pm DP) de 5 grupos (6 peixes/grupo) em cada composição de grupo durante 20 dias. TCE: Taxa de crescimento específico; CA: Conversão alimentar. Não houve diferença estatística entre os grupos (Kruskal-Wallis, $p > 0,05$).

4. Discussão

Por meio de testes farmacológicos, identificamos que estado de alta ansiedade reduz a atividade locomotora na Tilápia-do-Nilo, com o inverso ocorrendo nos estados de baixa ansiedade. Verificamos também que a latência para saída de toca e exploração de ambiente aberto é reduzida nos animais em estado de alta ansiedade; porém, esta resposta foi menos evidente que a alteração da locomoção relatada acima. Assim, com base no critério da locomoção, estudamos a composição de animais ansiosos e pouco ansiosos no grupo e verificamos que, no tempo estudado, não houve diferença nem na interação agonística e nem em variáveis zootécnicas de desempenho.

No capítulo 1 vimos que os animais apresentaram diferenças no tempo de locomoção em função de seus estados de ansiedade. Enquanto o ansiolítico DZP aumentou a atividade locomotora dos animais (Fig. 1), a droga ansiogênica PTZ reduziu essa atividade (Fig. 3) numa relação dependente da dose (compare Figs. 2 e 3). Essa resposta foi descrita em *zebrafish* por Becan et al. (2009), onde a droga ansiolítica DZP levou a uma redução do tempo gasto pelo animal no fundo do aquário, tendo como consequência o aumento do comportamento de natação exploratória. Também encontramos tais respostas em camundongos (Nasello et al., 1998; Valle, 1970). Elevação na atividade locomotora também tem sido usada como critério de ansiedade em camundongos (Rodgers et al., 1995).

O estudo de López-Patiño et al.,(2007), no entanto, contradiz a resposta de ansiedade que descrevemos acima. Esses autores mostram que em peixes *zebrafish*, administrados com cocaína, a atividade locomotora era normal. Porém, essa atividade aumentou com a retirada dessa droga, o que foi suposto como uma resposta de ansiedade pela ausência da cocaína. Essa hiperatividade foi eliminada com a administração do ansiolítico DZP e, quando administrado com a droga ansiogênica FG-7142, os peixes voltaram a hiperatividade. Assim, esses dados mostram que em estado de alta ansiedade os *zebrafish* aumentam a atividade locomotora e a reduzem em estados de baixa ansiedade. Ou seja, uma resposta oposta à que obtivemos com a Tilápia-do-Nilo neste estudo, o que não conseguimos explicar

adequadamente, pois mesmo que as drogas ansiogênicas usadas sejam diferentes, o DZP foi usado igualmente nos dois trabalhos.

O outro critério comportamental de ansiedade na Tilápia-do-Nilo investigado aqui foi a exploração em novo ambiente, partindo-se de local protegido e adentrando em área aberta. Em camundongos, a redução na ansiedade faz com que esses animais adentrem mais ambientes claros em contraposição a ambientes escuros (Morato, 2006). Similarmente, no teste que realizamos no segundo estudo do primeiro capítulo o peixe estava num ambiente protegido (reduzido e escuro), tendo a possibilidade de adentrar em ambiente claro e maior. Nesse paradigma experimental, a Tilápia-do-Nilo reduziu a latência para essa exploração quando recebeu droga ansiolítica (Fig. 4) e aumentou essa latência com a droga ansiogênica (Fig. 5). Embora isso indique que essa latência possa ser usada como um indicador comportamental de estado de ansiedade, neste caso a dose da droga ansiogênica (PTZ) necessária para ser efetiva na modulação comportamental foi muito maior (Fig. 5) do que no teste de locomoção para a mesma droga (Fig. 3). Assim, consideramos que a atividade locomotora vista no estudo 1 do primeiro capítulo foi a melhor resposta para separarmos os animais em muito ou pouco ansiosos.

Em nosso terceiro capítulo vimos que a formação de grupos em três níveis de combinações de ansiedade dos animais não afetou as variáveis investigadas, seja as comportamentais ou as de produção (Tabela 1). Embora as mortes ocorridas tenham reduzido o número de animais nos grupos ao longo do período experimental, as análises de agressão ponderam os valores pelo número de peixes para corrigir esse efeito. De outro lado, essa redução em número de indivíduos poderia afetar o crescimento, pois a agressão intraespecífica provoca estresse social que, em situações crônicas, reduz o crescimento (Fernandes & Volpato, 1994). A falta desse efeito no presente estudo pode ter decorrido do curto período de crescimento utilizado, pois as mortes não ocorreram necessariamente nos primeiros dias da montagem experimental. Além dessas questões técnicas, efeito do agrupamento sobre o perfil de ansiedade não pode ser descartado. Segundo Starkey et al.(2006) machos de camundongos considerados muito ansiosos perderam esse perfil quando agrupados, um efeito que não ocorreu nas fêmeas. Isso mostra que tanto a condição social quanto o sexo podem interferir nessa resposta. Assim, os dados do presente estudo

podem estar contaminados com essas duas variáveis, condição social e sexo dos animais. Porém, ainda cabe uma ressalva, pois enquanto os camundongos são sociais, a Tilápia-do-Nilo é um peixe de hábito territorial e, portanto, os efeitos do agrupamento podem ser diferentes. Este tópico requer mais estudos para elucidação.

5. REFERÊNCIAS

ALVARENGA, C. M. D & VOLPATO, G. L. 1995. Agonistic profile and metabolism in alevins of the Nile tilapia. **Physiology and Behavior**, 57, 75–80.

BECAN, Z.; SLEGGE, D.; LEVIN, D. E. 2009. Buspirone, Chlordiazepoxide and diazepam effects in a zebrafish model of anxiety. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior**, 94, 75-80.

BEUZEN, A.; BELZUNG, C. 1995. Link between emotional memory and anxiety states: a study by principal component analysis. **Physiol Behav**, 58, 111-8.

BRAITHWAITE, V. A. & BOULCOTT, P. 2007. Pain perception, aversion and fear in fish. **Diseases of Aquatic Organisms**, 75, 131–138.

BROWN, C., LALAND, K. & KRAUSE, J. 2006. Fish cognition and Behavior. **1st. edn. Austrália.**

CHAOULOFF, F.; DURAND, M. & MORMÉD, P. 1997. Anxiety- and activity-related effects of diazepam and chlordiazepoxide in the rat light/dark test. **Behavioural Brain Research**, 85, 27-35.

CRAWKEY, L. N.; GOODWIN, F.K. 1980. Preliminary report of a simple animal behavior model for the anxiolytic effects of benzodiazepines. **Pharmacol Biochem Behav**, 327, 1-5.

DAWKINS, M. S. 2006. Through animal eyes: What behaviour tells us. **Applied Animal Behavior Science**, 100, 4–10.

DUNCAN, I. J. H. 2006. The changing concept of animal sentience. **Applied Animal Behavior Science**, 100, 11–19.

FAGANELLO, F. R.; MATTIOLI, R. 2007. Anxiolytic-like effect of Chlorpheniramine in inhibitory avoidance in goldfish submitted to telencephalic ablation. **Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry**, 31(1), 269-74.

GIAQUINTO, P. C. & VOLPATO, G. L. 1997. Chemical communication, aggression and conspecific recognition in the fish Nile tilapia. **Physiology and Behavior**, 6, 1333-1338.

GODINHO, M.; RIBEIRO, A. M.; FERNANDES, V. S.; BARBOSA, F. F.; NASCIMENTO, E. B.; MUNGUBA, H.; REGINA, H. S. 2009. A rodent model of appetitive discrimination with concomitant evaluation of anxiety-like behavior. **Journal of Neuroscience Methods**, 185, 82-88.

GOUVEIA JR, A., MAXIMINO, C. & BRITO, T.M. .2006 . Comportamento de peixes: Vantagens e utilidades nas neurociências. **Faculdade de Ciências/UNESP. Bauru-SP**.

GRAEFF, F. G. 1983. Psicobiologia da ansiedade. **Jornal Brasileiro de Psiquiatria**, 36, 345-350.

HANDELY, S. L.; MITHANI, S. 1984. Effects of alpha- adrenoceptor agonists and antagonists in a maze exploration model of "fear" motivated behaviour. **Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology**, 327, 1-5.

LÓPEZ-PATIÑO, A. M.; YU, L.; CABRAL, H.; ZHDANOVA, V. . 2007. Anxiogenic effects of cocaine withdrawal in zebrafish. **Physiology & Behavior**, 93, 160-171.

MARTIN, P. 1998. Animal models sensitive to anti-anxiety agents. **Acta Psychiatr Scand**, 393, 74-80.

MORATO, S. 2006. O Papel da visão na aversão aos espaços abertos no labirinto em cruz elevado. **Psicologia USP**, 17, 159-174.

NASELLO, A. G., MACHADO, C., BASTOS, J. F., & FELICIO L. F. 1998. Sudden darkness induces a high activity-low anxiety state in male and female rats. **Physiology and Behavior**, 63, 451-454.

PELLOW, S.; CHOPIN, P., FILE, S. E.; & BRILEY, M. 1985. Validation of open-closed arm entries in an elevated plus-maze as a measure of anxiety in the rat. **Journal of Neuroscience Methods**, 14, 149-167.

RODGERS, R. J.; COLE, J. C. 1995. The elevated plus-maze: Pharmacology, methodology and ethology. In: Cooper, S. J.; Headrie, C.A., eds. **Ethology and Psychopharmacology**. London: John Wiley & Sons Ltd.; 9-44.

SALOMONS, A. R.; ARNDT, S. S & OHL, F. 2009. Anxiety in relation to animal environment and welfare. **Scandinavian Journal of Lab Animal Science**, 36, 1, 37-45.

STARKEY, N.J.; NORMINGTON, G.; N.J.BRIDGES. 2006. The effects of individual housing in “anxious” behaviour in male and female gerbils. **Physiology & Behavior**, 90, 545-552.

VALLE, F. P. 1970. Effects of strain, sex, and illumination on open-field behavior of rats. **American Journal of Psychology**, 83, 103-111.

VOLPATO, G. L., GONÇALVES-DE-FREITAS E. & CASTILHO, M. F. 2007. Insights into the concept of fish welfare. **Diseases of Aquatic Organisms**, 75, 165-171.

WILSON, D. S., COLEMAN, K., CLARK, A. B. & BIEDERMAN, L. 1993. Shy–bold continuum in pumpkinseed sunfish (*Lepomis gibbosus*): an ecological study of a psychological trait. **Journal of Comparative Psychology**, 107, 250-260.

WILSON, D. S. & STEVENS, E. D. 2005. Consistency in Context-specific Measures of Shyness and Boldness in Rainbow Trout, (*Oncorhynchus mykiss*). **Ethology**, 11, 849-862.

