

**Estresse e memória: Efeito do estresse agudo e crônico na retenção da
memória em diferentes perfis de personalidade em tilápias-do-Nilo**

Adriana Beatriz Barretto

Orientadora: Profa. Adjunta Percília Cardoso Giaquinto

Coorientador: Prof. Dr. Assaf Barki

Botucatu, São Paulo

2018

**Estresse e memória: Efeito do estresse agudo e crônico na retenção da
memória em diferentes perfis de personalidade em tilápias-do-Nilo**

Adriana Beatriz Barretto

Orientadora: Profa. Adjunta Percília Cardoso Giaquinto

Coorientador: Prof. Dr. Assaf Barki

Tese apresentada ao Instituto de
Biociências da Universidade
Estadual Paulista – UNESP,
Campus de Botucatu SP, como
parte dos requisitos para
obtenção do título de doutora em
Ciências Biológicas – Área de
Concentração: Zoologia

Botucatu, São Paulo

2018

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSANGELA APARECIDA LOBO-CRB 8/7500

Barretto, Adriana Beatriz.

Estresse e memória : efeito do estresse agudo e crônico na retenção da memória em diferentes perfis de personalidade em tilápias-do-Nilo / Adriana Beatriz Barretto. - Botucatu, 2018

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Instituto de Biociências de Botucatu

Orientador: Percília Cardoso Giaquinto

Coorientador: Assaf Barki

Capes: 20404000

1. Peixe - Pesquisa. 2. Aprendizagem. 3. Memória espacial. 4. Stress (Fisiologia).

Palavras-chave: aprendizagem; estresse agudo; estresse crônico; memória; personalidade em peixes.

Dedicatória

Aos meus pais, **Cecília e Gilmar**,

os quais se doaram imensamente e incentivaram meu sonho até mesmo quando eu não acreditava mais em mim, essa conquista não é só minha, com toda certeza é nossa. Se eu estou aqui hoje é porque vocês me permitiram e me deram todo o apoio e dedicação possível e impossível. Obrigada por me ajudarem em todas as dificuldades e por comemorarem comigo cada vitória da minha vida!!

Ao meu noivo **Marcelo**,

you com certeza foi parte integrante de todo esse processo, e o suporte indispensável para que eu me doasse por completo nessa jornada, foram incontáveis dias me ajudando em experimentos, me apoiando, lutando ao meu lado, segurando na minha mão e me fazendo ter a certeza de que tudo valeria à pena. E com certeza valeu!!!

Agradecimentos

Agradeço a todas as pessoas que me auxiliaram na concretização deste trabalho:

Agradeço imensamente à minha orientadora **Percília**, a qual me aceitou sem nem ao menos me questionar se eu teria capacidade de estar aqui, acreditou em mim, lutamos juntas, passamos por cima de muitos obstáculos e aqui chegamos. Obrigada por todos os conselhos e ensinamentos.

Aos **amigos** que fiz durante estes anos na pós-graduação, os quais sempre estiveram ao meu lado, me proporcionando momentos incríveis de risadas e principalmente de desabafos. Agradeço principalmente a **Nina**, a qual se tornou parceira para vida, companheira de experimentos e que me aturou do início ao fim!

À **Paloma**, minha amiga, neste sonho louco que sonhamos juntas, o doutorado é só o começo!

À **Caroline Maia**, a sua amizade e ajuda foram imprescindíveis para o desenvolvimento desta tese. Espero um dia poder te retribuir por todo o bem que me fez.

E por fim, e não menos importante, à minha prima **Mariana**, que não negou ajuda e apoio em nenhum momento que precisei, sempre esteve ao meu lado em todos os momentos da minha vida e não seria diferente agora. Você é meu porto seguro, obrigada por nunca me abandonar!!

Apoio Financeiro: Capes



Suporte: Consciência Animal

(análises estatísticas, interpretação dos dados e estruturação da tese)



Epígrafe

Os sonhos não determinam o lugar onde vocês vão chegar, mas produzem a força necessária para tirá-los do lugar em que vocês estão. Sonhem com as estrelas para que vocês possam pisar pelo menos na Lua. Sonhem com a Lua para que vocês possam pisar pelo menos nos altos montes. Sonhem com os altos montes para que vocês possam ter dignidade quando atravessarem os vales das perdas e das frustrações.

Bons alunos aprendem a matemática numérica, alunos fascinantes vão além, aprendem a matemática da emoção, que não tem conta exata e que rompe a regra da lógica. Nessa matemática você só aprende a multiplicar quando aprende a dividir, só consegue ganhar quando aprende a perder, só consegue receber, quando aprende a se doar.

Augusto Cury

Sumário

Comitê de Ética.....	9
Tese	10
Hipóteses	10
Estrutura Geral.....	10
Capítulo 1	
<i>Estresse e memória: efeito do estresse agudo e crônico na retenção da memória em diferentes perfis de personalidade em peixes</i>	
1. Introdução	13
2. Metodologia.....	17
2.1. Animais e Manutenção.....	17
2.2. Delineamento Geral	18
2.3. Procedimentos Específicos.....	19
2.3.1. Seleção de animais pela personalidade	19
2.3.2. Condicionamento dos animais	22
2.3.3. Aplicação de estresse agudo e crônico.....	23
2.3.4. Teste de memória de aprendizagem por condicionamento.....	24
2.3.5. Análise dos dados	24
3. Resultados.....	27
4. Discussão	34
5. Referências	40
Capítulo 2	
<i>Jato de água: um método simples para condicionamento clássico em peixes</i>	
Introdução	51
Material e Métodos.....	55
Resultados	58
Discussão	60
Referências.....	63
Anexo	
<i>Water jet: an easy method for classical conditioning in fish</i>	68

Comitê de Ética

Os procedimentos experimentais desta tese realizados com a espécie de peixe tilápia-do-Nilo (*Oreochromis niloticus*) estão de acordo com a legislação vigente (Lei 11.794/2008 e Decreto 6.899/2009), com as resoluções normativas aplicáveis à luz dos Princípios Éticos na Experimentação Animal elaborados pela Sociedade Brasileira de Ciências em Animais de Laboratório (SBCAL/COBEA) e foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) do Instituto de Biociências de Botucatu, UNESP-SP (protocolo # 699-CEUA).

Tese

O estresse agudo afeta a retenção da memória em diferentes perfis de personalidade em peixes

Hipóteses

1. O estresse reduz a retenção da memória de aprendizagem, causando resposta não imediata dos animais ao condicionamento clássico;
2. O estresse crônico tem maior efeito na retenção da memória de aprendizagem quando comparado ao estresse agudo;
3. Em relação aos perfis de personalidade, indivíduos *bold* (ousados) sofrem menor impacto do estresse na retenção da memória de aprendizagem em relação aos *shy* (tímidos);
4. O condicionamento clássico em peixes é efetivo quando associados movimentação da água e liberação de alimento, sendo um método simples quando comparado aos condicionamentos descritos na literatura.

Estrutura Geral

Este texto foi desenvolvido em dois capítulos, o primeiro correspondendo ao projeto principal elaborado durante o doutorado e o segundo referente a uma nova metodologia desenvolvida para o condicionamento clássico. Cada capítulo avalia parte das hipóteses propostas a partir da tese, conforme descrito abaixo:

CAPÍTULO 1 – Neste estudo avaliamos o efeito do estresse agudo e crônico na memória de aprendizagem de tilápias-do-Nilo com diferentes perfis de personalidade. Inicialmente definimos a personalidade dos peixes através de testes de objeto novo e exposição a um predador, classificando-os em *shy* (tímido) ou *bold* (ousado) e em seguida estes indivíduos foram condicionados por um método simples de condicionamento clássico como forma de aprendizagem para posterior avaliação da memória. Os peixes *shy* foram então divididos em dois grupos, sendo que em um deles os peixes foram diariamente estressados por hipóxia, perseguição com rede ou confinamento (grupo *shy*-experimental) por 64 dias consecutivos, enquanto que no outro grupo os peixes permaneceram apenas isolados (grupo *shy*-controle) pelo mesmo período de tempo. O mesmo procedimento foi adotado com os peixes classificados como *bold*. Nesse mesmo período, testes de memória foram realizados em dias específicos, tanto nos grupos experimental quanto nos grupos controle. Ao final do experimento, reavaliamos se as personalidades se mantiveram. Obtivemos que o estresse agudo afetou a memória de aprendizado em peixes, principalmente em indivíduos com perfil de personalidade *shy*.

CAPÍTULO 2 – Aqui desenvolvemos uma metodologia simples de condicionamento clássico facilmente aplicável em laboratórios de experimentação com peixes, quando comparados aos métodos descritos na literatura atual, onde os estímulos geralmente aplicados para condicionamento (som ou luz) podem interferir nas respostas dos animais experimentais presentes no mesmo laboratório. Para tal condicionamento, isolamos os peixes em aquários individuais e introduzimos um jato de água em cada aquário (sem que

os peixes pudessem perceber a presença do pesquisador) causando movimentação da água (estímulo condicionado) neste local específico do aquário. Em seguida, um pellet de ração (estímulo incondicionado) foi introduzido no mesmo local da movimentação da água (novamente sem que os peixes pudessem perceber a presença do pesquisador). Esses procedimentos foram realizados durante 20 dias seguidos, 4 vezes ao dia. Obtivemos que após 14 dias de condicionamento todos os peixes associaram estímulo condicionado e incondicionado, confirmando a efetividade deste método simples e sem interferência nos demais animais experimentais presentes no ambiente.

Estresse e memória: efeito do estresse agudo e crônico na retenção da memória em diferentes perfis de personalidade em tilápias-do-Nilo

1. Introdução

O estresse pode ser definido como um estado de ameaça da perda da homeostase, ou seja, da manutenção da constância das condições corpóreas pelo organismo, por um estímulo aversivo denominado “estressor” (Chrousos & Gold, 1992). Assim, as respostas desencadeadas por um indivíduo frente a um estressor são adaptativas, pois auxiliam o organismo a retornar a seu estado inicial constante de homeostase. O endocrinologista Hans Selye (1965) foi o primeiro a formular o conceito de estresse. Ele observou que organismos diferentes apresentam um mesmo padrão de resposta fisiológica para uma série de experiências sensoriais ou psicológicas que têm efeitos nocivos em órgãos, tecidos ou processos metabólicos (ou são percebidas como perigosas ou nocivas). Tais experiências são, portanto, descritas como “estressoras” (Bauer *et al.*, 2000), sendo que as respostas desencadeadas nessas situações podem passar por três estágios (Selye, 1965):

- Estágio 1 - alarme: o corpo reconhece o estressor e ativa o sistema neuroendócrino. Nessa situação, as glândulas adrenais (ou suprarrenais) produzem e liberam os hormônios adrenalina, noradrenalina e cortisol que desencadeiam uma série de reações (*e.g.* batimento cardíaco acelerado, pupilas dilatadas, frequência respiratória aumentada, etc) associadas a uma preparação do organismo para a ação, que pode ser de luta ou fuga da fonte estressora.

- Estágio 2 – adaptação: o organismo repara os danos causados pela reação de alarme, reduzindo os níveis hormonais. Caso o estresse prossiga, o estágio 3 entra em vigor.

- Estágio 3 – exaustão: pode provocar o surgimento de uma doença associada à condição estressante, devido a imunossupressão. Assim, o estresse agudo, quando repetido inúmeras vezes, pode gerar disfunção das defesas imunológicas.

Nesse cenário, vemos que o organismo está adaptado para lidar com situações de estresse agudo, o qual é definido como ocorrência recente e transitória de um único estressor, mas quando essa condição se torna repetitiva/crônica, ou seja, como uma dificuldade constante enfrentada pelo indivíduo (Shields *et al.*, 2016), seus efeitos se multiplicam em cascata, podendo gerar consequências deletérias para o organismo quando a homeostase não é reestabelecida. Durante um período de estresse crônico, o animal deve comprometer as reservas de glicogênio, aumentar o catabolismo de proteínas teciduais ou potencialmente fazer ambos para regular repetidamente os recursos energéticos necessários para manter os componentes da resposta ao estresse agudo (Wendelaar-Bonga, 1997). Este aumento do uso de reservas energéticas é teorizado para ser um fator contribuinte no desenvolvimento de um estado pré patológico (Moberg, 1985), o que deixa o animal vulnerável ao desenvolvimento de doenças.

Em peixes, isso não é diferente. A ação de estressores podem produzir efeitos que desestabilizam o equilíbrio homeostático dos peixes, mas também pode provocar um conjunto de respostas comportamentais e fisiológicas como ação compensatória e/ou adaptativa, provendo a esse animal a possibilidade de

superar as ameaças encontradas (Wendelaar-Bonga, 1997). Entretanto, se esse animal está submetido a estresse intenso e constante, a resposta fisiológica pode perder seu valor adaptativo e tornar-se disfuncional, causando danos à sua saúde e bem-estar (Carmichael *et al.*, 1984).

Assim, como consequências danosas em resposta ao estresse crônico podemos ter crescimento reduzido ou até mesmo negativo nos peixes, expresso como mudanças no peso corporal ou parâmetros derivados, como fatores de condição ou eficiência de conversão alimentar (Goede & Barton, 1990; Peters, 1982; Pickering & Stewart, 1984; Wendelaar-Bonga, 1997). Além disso, o estresse pode causar redução do desempenho reprodutivo (Small, 2004) desses animais pela depressão da glândula pituitária e de níveis plasmáticos de gonadotropinas (Carragher *et al.*, 1989), além do decréscimo de níveis de hormônios esteróides (Pickering & Pottinger., 1987) e do tamanho dos ovos e da qualidade das larvas (Campbell *et al.*, 1992, 1994). O estresse também é conhecido por aumentar a susceptibilidade dos peixes a doenças infecciosas (Wedemeyer, 1970; Snieszko, 1974; Pickering & Pottinger, 1987; Angelidis *et al.*, 1987) e, além disso, pode ainda alterar a capacidade de aprendizagem e memória desses animais (Piato *et al.*, 2011a, 2011b; Chakravarty *et al.*, 2013; Manuel *et al.*, 2014).

A aprendizagem, bem como a memória, são meios importantes pelos quais o ambiente exerce influência no comportamento animal. Entretanto, são processos distintos, sendo a aprendizagem o processo pelo qual novas informações são adquiridas, e a memória, o processo pelo qual esse conhecimento é retido e lembrado (Kandel *et al.*, 2014). Em peixes, assim como em mamíferos, a aprendizagem e a memória permitem que os indivíduos

ajustem seus comportamentos para melhor se adequarem ao ambiente ou situação na qual se encontram (Ebbesson & Braithwaite, 2012). Peixes são capazes de aprender e lembrar diferentes tipos de informação e realizam associações simples e complexas entre diferentes estímulos (Ebbesson & Braithwaite, 2012; Warburton, 2003). Nesse contexto, considerando que na maioria dos ambientes aquáticos, a paisagem física e a necessidade, por exemplo, de localizar abrigos, alimentos e áreas com predadores são essenciais para a sobrevivência dos peixes (Brown *et al.*, 2006), a redução da capacidade de aprendizagem e memorização causada pelo estresse crônico pode ser significativamente deletéria para esses animais.

Quando em situações estressoras prolongadas, considerando que indivíduos de uma mesma espécie diferem uns dos outros quanto ao seu comportamento (Sih *et al.*, 2004; Réale *et al.*, 2007), uma possibilidade é que diferentes indivíduos respondam de formas diferenciadas em relação à aprendizagem e memorização (Dugatkin & Alfieri, 2003; Sneddon, 2003; White *et al.*, 2017). Quando tais respostas comportamentais são consistentes ao longo do tempo e/ou situação para um mesmo indivíduo, caracterizam a personalidade (Budaev, 1997), que é geralmente descrita em cinco eixos: atividade, timidez-ousadia, exploração, agressividade e sociabilidade (Réale *et al.*, 2007). Um dos eixos de personalidade mais estudados é o da timidez-ousadia, que é descrito como propensão (ousadia) ou aversão (timidez) para assumir riscos diante de objetos ou situações inovadoras (Sloan Wilson *et al.*, 1994). Em peixes, existem relações positivas entre os indivíduos *bold* e outros comportamentos, tais como a capacidade de aprendizagem dos indivíduos (Dugatkin & Alfieri, 2003). Assim,

fica claro que aprendizagem, bem como a memorização associada a ela, pode ser influenciada por diferenças de personalidade entre os indivíduos.

Nesse contexto, utilizamos tilápias-do-Nilo, espécie de ciclídeo mais cultivada no Brasil, a qual é tipicamente social e territorialista (Fernandes & Volpato, 1993), com interações complexas entre os indivíduos e capacidade de aprendizagem e memória dos contextos sociais e ambientais. Assim, o objetivo do presente do trabalho foi avaliar o papel do estresse agudo e crônico na alteração da aprendizagem e memória e se tal efeito é influenciado pelo perfil de personalidade.

2. Metodologia

2.1. Animais e Manutenção

Utilizamos juvenis de tilápia-do-Nilo, *Oreochromis niloticus*, provenientes de piscicultura, que foram aclimatados por 30 dias em tanques de 500 L em biotério (6 peixes/L; T°C: 24⁰±1°C; pH: ~ 6,5; fotoperíodo: 12L:12D) antes do início do experimento. Nessa condição, os tanques receberam aeração contínua e filtros que incluíam filtragem mecânica e biológica, sendo sifonados diariamente para remoção de restos de alimento e fezes. Assim, os tanques foram mantidos com boa qualidade da água, com níveis de nitrito e amônia abaixo de 0,05 mg/L e 0,5 mg/L, respectivamente. Além disso, havia tubos de PVC no fundo dos tanques que foram utilizados como tocas pelos animais. Os peixes no biotério foram alimentados uma vez ao dia com ração comercial para peixes tropicais (38% de proteína bruta) até a saciedade.

2.2. Delineamento Geral

Previamente aos experimentos, todos os peixes foram medidos e pesados para futura comparação de crescimento ao final do experimento. Para avaliar o efeito do estresse na memória de peixes com diferentes personalidades, primeiramente realizamos testes de personalidade (teste do objeto novo e teste de exposição a predador) para separar os animais ($n = 90$, 3 grupos de 30 indivíduos de onde foram utilizados apenas extremos das personalidades para formar um único grupo com 38 indivíduos). O total de 38 indivíduos selecionado através dos testes de personalidade foi dividido em 2 grupos: *shy* (peixes tímidos; $n=19$) e *bold* (peixes ousados; $n=19$). Em seguida, os animais de cada grupo foram divididos aleatoriamente em dois novos grupos, constituindo assim quatro tratamentos: 1) tratamento *shy*-experimental ($n=10$); 2) tratamento *shy*-controle ($n=9$); 3) tratamento *bold*-experimental ($n=10$); 4) tratamento *bold*-controle ($n=9$). Após a composição dos tratamentos, todos os animais foram submetidos a testes de aprendizagem por condicionamento clássico (associação entre um estímulo previamente neutro – condicionado – com um estímulo biologicamente relevante – incondicionado) por 20 dias consecutivos, sendo 4 testes por dia. Posteriormente, os peixes dos grupos experimentais (tratamentos *shy*-experimental e *bold*-experimental) foram estressados (submetidos à hipóxia, perseguição e confinamento, sendo um único modelo de estresse por dia, de forma aleatorizada para evitar condicionamento dos animais às condições de estresse) continuamente por 64 dias consecutivos. Nesse período, todos os animais, inclusive aqueles dos grupos controle (animais que não foram estressados), foram submetidos a testes de memória (aplicação única do estímulo condicionado, mas sem a presença do estímulo incondicionado) em

intervalos de tempo pré-definidos. Após esse período de 64 dias, todos os animais foram submetidos a novos testes de personalidade (teste do objeto novo e teste exposição a predador) para avaliação da consistência das respostas como indivíduos *shy* ou *bold* e novamente medidos e pesados. Para melhor visualização, o esquema do delineamento se encontra na Figura 1.

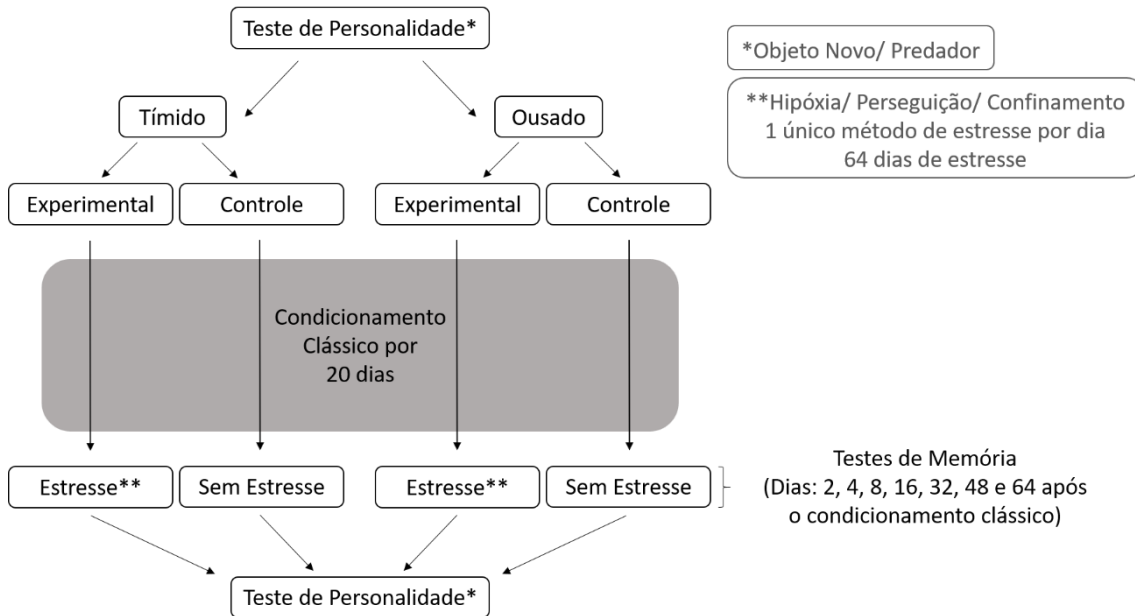


Figura 1 – Esquema do delineamento geral.

2.3. Procedimentos Específicos

2.3.1. Seleção de animais pela personalidade

Os animais foram selecionados quanto à sua personalidade com base em testes realizados em 3 dias consecutivos:

- Dia 1 – período de aclimação do animal às condições de teste;
- Dia 2 – teste de exposição a um predador;
- Dia 3 – teste do objeto novo.

Os testes foram repetidos ao final do experimento para avaliação da consistência da resposta dos indivíduos quanto às suas personalidades.

Teste do objeto novo

Os peixes foram individualizados em aquário de vidro (40 cm x 20 cm x 25 cm) para aclimatização durante 3 dias consecutivos, sendo alimentados uma vez ao dia (~ 2 % do peso corporal médio dos indivíduos). Esses aquários estavam divididos externamente com marcações a caneta (desenho quadriculado) em 6 espaços de mesmo tamanho. Após o período de aclimatização, um novo objeto (cilindro vermelho ou amarelo, $\emptyset = 6$ cm) foi cautelosamente submergido no aquário no lado oposto ao que o peixe se encontrava no momento da submersão. Em seguida, o aquário foi filmado por 5 min e, a partir dessa filmagem, registramos a latência do peixe para chegar até o objeto, o tempo total que o peixe permaneceu próximo ao objeto novo (com pelo menos 50% do corpo dentro do quadrante em que se encontrava o objeto), o tempo em que o peixe permaneceu em *freezing* (permanecendo estático no mesmo local) e a movimentação do peixe (frequência de cruzamento entre os 6 espaços) (baseado em Frost *et al.*, 2007; Castanheira *et al.*, 2013). Com base nesses dados, os peixes foram ranqueados quanto a sua ousadia.

Teste de exposição a um predador

Com os peixes testados no experimento anterior sendo mantidos individualizados ainda nos mesmos aquários, introduzimos bagres africanos, (*Clarias gariepinus*) animais de porte maior e reconhecidos predadores da tilápia-do-Nilo (DeGraaf *et al.*, 1996), em aquários posicionados ao lado dos

aquários onde estavam as tilápias em teste (baseado em Wilson & Godin, 2009; Moretz *et al.*, 2007). Em seguida, os aquários foram filmados por 5 min. A partir dessas filmagens, registramos as mesmas variáveis operacionais descritas na seção *Teste do objeto novo*, ou seja, a latência das tilápias para chegarem até a parede do aquário posicionada lateralmente à parede do aquário do predador, o tempo que as tilápias perecerem próximas ao predador, o tempo em que as tilápias permaneceram em *freezing* e a movimentação das tilápias. Com base nesses dados, os peixes foram ranqueados quanto a sua ousadia

Ranqueamento dos dados

Para cada variável, (latência, tempo próximo ao objeto novo, *freezing* e movimentação) os indivíduos tiveram um valor atribuído de acordo com a posição no ranking. Dessa maneira, indivíduos que apresentaram maior tempo de exploração receberam um valor maior do que aqueles que exploraram pouco. E aqueles que não exploraram, receberam o valor de zero. O mesmo foi feito com variável de movimentação, entretanto, para *freezing* e latência, os valores foram atribuídos de forma decrescente, ou seja, indivíduos que tiveram maior latência para ir até o objeto receberam um valor menor do que aqueles que levaram menos tempo. Aqueles que não apresentaram latência durante os 300 segundos (5 minutos de teste) receberam pontuação igual a zero. Depois que cada indivíduo recebeu os valores das variáveis, estes foram somados.

A mesma metodologia foi utilizada para o teste de exposição a um predador e os valores obtidos nos dois dias de testes foram somados, gerando um valor total de cada indivíduo. Os peixes foram então organizados em ordem crescente de acordo com esses valores. Os animais que não foram consistentes

aos parâmetros analisados nos dois dias de teste, conseqüentemente obtiveram pontuações intermediárias e se posicionaram entre os valores extremos, sendo excluídos do estudo. Assim, apenas peixes com as maiores pontuações (*bold*) e peixes com as menores pontuações (*shy*) foram incluídos nas demais etapas do estudo.

2.3.2. Condicionamento dos animais

Utilizamos o condicionamento clássico como método de aprendizagem, pois diversos estudos têm demonstrado que peixes associam estímulos e respondem de forma condicionada (Nilsson *et al.*, 2007; Braubach *et al.*, 2009; Bratland *et al.*, 2010; Doyle *et al.*, 2017; Folkedal *et al.*, 2018), ou seja, condicionam estímulo neutro (estímulo condicionado) a estímulo biologicamente relevante (estímulo incondicionado). Após serem selecionados quanto às suas personalidades, os peixes foram individualizados em aquários de 20 l (40 cm x 20 cm x 25 cm) sobre uma estante parcialmente revestida com lona preta em sua porção posterior, evitando assim que os animais percebessem a movimentação do pesquisador. Nessas condições, os indivíduos foram submetidos a um teste de condicionamento clássico em que utilizamos a aplicação de um jato de água de 3 ml para gerar movimentação localizada na água dos aquários. Após 15 s da aplicação do jato, inserimos um pellet de ração no mesmo local da superfície do aquário. Assim, a movimentação da água funcionou como estímulo condicionado enquanto o pellet de ração funcionou como estímulo incondicionado (para maiores detalhes deste procedimento e validação desta metodologia para condicionamento clássico, vide capítulo 2). Os aquários foram filmados para se registrar a resposta de reação dos peixes ao

movimento da água e consequente ingestão da ração, sendo registrados como resposta imediata ou não imediata ao movimento da água. Esse procedimento foi repetido durante 20 dias consecutivos, sendo realizado 4 vezes ao dia, com um intervalo de 2,5 h entre um teste e outro num mesmo dia.

2.3.3. Aplicação de estresse agudo e crônico

Após todos os peixes estarem condicionados, os animais dos grupos tratamentos experimentais (*shy-experimental* e *bold-experimental*) foram diariamente estressados por 64 dias, enquanto os animais dos tratamentos controle (*shy-controle* e *bold-controle*) não foram estressados por todo esse período. O período do dia em que os animais foram estressados (manhã ou tarde) e o método de estresse aplicado em cada dia (hipóxia, perseguição ou confinamento) foram aleatoriamente selecionados através de sorteio diário. Os animais foram sempre estressados em apenas um período do dia e por apenas um método de estresse em cada dia. O estresse por hipóxia foi realizado através da retirada do peixe do aquário com o auxílio de uma rede (8 cm x 8 cm). Após 3 min, o peixe foi reintroduzido ao respectivo aquário. No estresse por perseguição com rede, os peixes foram individualmente perseguidos com uma rede (8 cm x 8 cm) dentro de seus próprios aquários por 10 min. E o confinamento consistiu na apreensão do peixe em um dos cantos do aquário, através de duas placas de acrílico opacas, que se uniam deixando entre elas apenas o espaço de igual tamanho total do peixe, impedindo sua movimentação, durante 15 min.

Levando em consideração que o estresse agudo é definido como ocorrência recente e transitória de um único estressor e o estresse crônico como

uma dificuldade constante enfrentada por um indivíduo (Shields *et al.*, 2016), consideramos em nosso trabalho os dias 1 a 7 do período de estresse como estresse agudo e a partir do dia 8, como estresse crônico (Piato *et al.*, 2011a e 2001b; Gaikwad *et al.*, 2011; Manuel *et al.*, 2014).

2.3.4. Teste de memória de aprendizagem por condicionamento

Nos dias 2, 4, 8, 16, 32, 48 e 64 de aplicação do estresse crônico, realizamos testes de memória com todos os peixes de todos os tratamentos (experimentais e controles). Os testes de memória foram sempre realizados em apenas um período do dia (manhã ou tarde), que foi aleatoriamente definido por sorteio em cada dia de teste. Para realizar os testes de memória, utilizamos os mesmos procedimentos iniciais dos testes de condicionamento (vide seção 2.3.2. *Condicionamento dos animais*), mas sem inserir o pellet de ração 15 s após a movimentação da água. Ou seja, nos testes de memória, aplicamos o estímulo para o qual os peixes haviam sido condicionados, mas não aplicamos o estímulo incondicionado associado. Isso foi feito para evitar que os testes de memória funcionassem como testes de reforço do condicionamento aprendido pelos peixes. Essa metodologia foi baseada em trabalhos que avaliaram a memória dos animais em relação a um comportamento anteriormente aprendido (Yue *et al.*, 2004; Nilsson *et al.*, 2007; Doyle *et al.*, 2017). Os testes de memória foram filmados, sendo que a partir dessas filmagens registramos a resposta imediata ou não imediata de reação dos peixes ao estímulo condicionado (quando não imediata a latência de resposta também foi registrada).

2.3.5. Análise dos dados

Primeiramente, para avaliar se os procedimentos aplicados nos grupos tratamento (animais estressados) foram suficientes para promover estresse crônico nos animais, nós avaliamos se houve diferença de crescimento (peso e/ou comprimento) entre os animais dos grupos controle (*shy* ou *bold*), e os respectivos animais dos grupos experimentais (*shy* ou *bold*) apenas ao final do experimento. Isso foi feito, pois, animais sob estresse crônico podem apresentar medidas reduzidas tanto de peso quanto de comprimento (Wendelaar-Bonga, 1997). Para isso, conforme tais dados apresentaram distribuição normal (teste de Kolmogorov-Smirnov, $p > 0,05$) e homocedástica (teste de Levene, $p > 0,05$), tanto no início quanto ao final do experimento, utilizamos teste-t independente para realizar essas comparações entre grupos controle e experimentais nesses dois momentos.

Para avaliar o efeito do estresse na memória de aprendizagem por condicionamento, realizamos análises estatísticas tanto considerando o perfil inicial de personalidade dos indivíduos quanto sem considerá-lo. Isto porque os perfis de personalidade individuais não se mantiveram consistentes ao final do experimento em cerca de metade dos indivíduos, tanto no grupo tratamento controle quanto experimental (animais estressados), considerando que outras variáveis podem ter interferido na retenção da personalidade ao longo do tempo além do estresse.

Para avaliar o impacto do estresse na retenção da memória dos peixes em resposta ao movimento da água ao longo do tempo, comparamos a latência dos indivíduos do grupo tratamento experimental (independentemente dos perfis de personalidade) ao longo dos dias dos testes de memória. Essa comparação foi feita por meio do teste de Friedman, uma vez que tais dados apresentaram

distribuição não normal (teste Kolmogorov-Smirnov, $p < 0,05$) e heterogênea (teste de Levene, $p < 0,05$). Como, com base nessa análise, apenas o dia 2 (primeiro teste de memória) apresentou uma resposta diferente dos demais dias de teste de memória, com uma latência significativamente maior do que a resposta imediata, todas as demais comparações estatísticas foram feitas considerando apenas os dados nesse dia.

Nesse sentido, avaliamos, independentemente da personalidade dos indivíduos, o impacto do estresse no segundo dia do teste de memória. Para isso, comparamos a frequência de peixes que responderam imediatamente com aquela de peixes que não responderam imediatamente ao estímulo no grupo experimental (animais estressados). Essa comparação foi feita por meio de teste de proporção de Goodman – dentro de multinomiais (1965). Para avaliar tal impacto considerando a personalidade dos indivíduos, fizemos dois tipos de comparação. Num primeiro momento, considerando apenas os animais que sofreram estresse, comparamos a frequência de peixes *shy* que não responderam imediatamente ao estímulo com a frequência de peixes *bold* que expressaram essa resposta. Num segundo momento, incluindo todos os peixes testados no experimento, comparamos, considerando todos os indivíduos *shy*, a frequência de peixes estressados que não responderam imediatamente ao estímulo com aquela de peixes não-estressados (controle) que apresentaram essa resposta. O mesmo tipo de comparação foi feito considerando todos os indivíduos *bold*. Todas essas comparações foram feitas por teste de proporção de Goodman – entre multinomiais (1964).

Além disso, considerando a classificação da personalidade dos indivíduos ao início e, posteriormente, ao final do experimento, comparamos a frequência

de indivíduos que mudaram de personalidade com a frequência de indivíduos que mantiveram a mesma personalidade classificada inicialmente. Também comparamos aqui a frequência de indivíduos inicialmente *shy* que mudaram de personalidade com a frequência de indivíduos que inicialmente eram *bold*, mas que depois mudaram de personalidade. Essas comparações foram feitas tanto considerando todos os indivíduos do grupo controle quanto considerando todos os indivíduos do grupo tratamento (animais estressados). Para essas comparações, utilizamos o teste de proporção de Goodman – dentro de multinomiais (1965). Para todas as análises realizadas neste estudo, consideramos $\alpha = 0,05$.

3. Resultados

Não houve diferença significativa entre os tratamentos no início do experimento, nem com relação ao peso (g) (média±dp: *shy*-controle 10,46±2,12 - *shy*-experimental 11,11±1,76 - *bold*-controle 12,14±1,49 e *bold*-experimental 10,72±2,50; $p > 0,05$, teste-t independente), nem com relação ao comprimento padrão (cm) (média±dp: *shy*-controle 7,04±0,46 - *shy*-experimental 7,14±0,47 - *bold*-controle 7,43±0,41 e *bold*-experimental 6,99±0,58; $p > 0,05$, teste-t independente). Entretanto, ao final do experimento, houve diferença significativa entre os tratamentos controle e os experimentais com relação ao peso (g) (média±dp: *shy*-controle 16,39±2,20 e *shy*-experimental 13,31±2,15; *bold*-controle 17,22±1,98 e *bold*-experimental 12,90±2,48; $p < 0,05$ em ambos os casos, teste-t independente) e com relação ao comprimento padrão (cm) para os peixes *bold* (média±dp: *bold*-controle 8,32±0,35 e *bold*-experimental

7,70±0,60; $p < 0,05$, teste-t independente), mas não para os peixes shy (média±dp: *shy*-controle 8,19±0,31 e *shy*-experimental - 7,83±0,41).

Todos os animais condicionados dos grupos controle (*shy*-controle e *bold*-controle) responderam imediatamente à movimentação da água causada pelo jato. Entretanto, os animais condicionados dos grupos que sofreram estresse (*shy*-experimental e *bold*-experimental) nem sempre expressaram essa reação. Independentemente da personalidade dos indivíduos, os peixes desses grupos responderam à movimentação da água causada pelo jato com uma latência significativamente maior no primeiro teste de memória (dia 02 de aplicação de estresse) (Figura 2). Essa resposta não se repetiu nos demais dias de teste, embora peixes que não responderam imediatamente ao estímulo tenham ocorrido em todos os dias de teste (6 no dia 02; 2 nos dias 04 08, 32 e 64; 5 no dia 15; e 1 no dia 48), especialmente no décimo sexto dia (Figura 2). Desses indivíduos, dois não responderam imediatamente apenas no primeiro dia do teste de memória (dia 02 de aplicação de estresse), enquanto outro não respondeu com tal latência em nenhum teste de memória. Os demais indivíduos (n=3) responderam de forma intermediária (responderam imediatamente ao estímulo em alguns dias e não responderam imediatamente em outros dias).

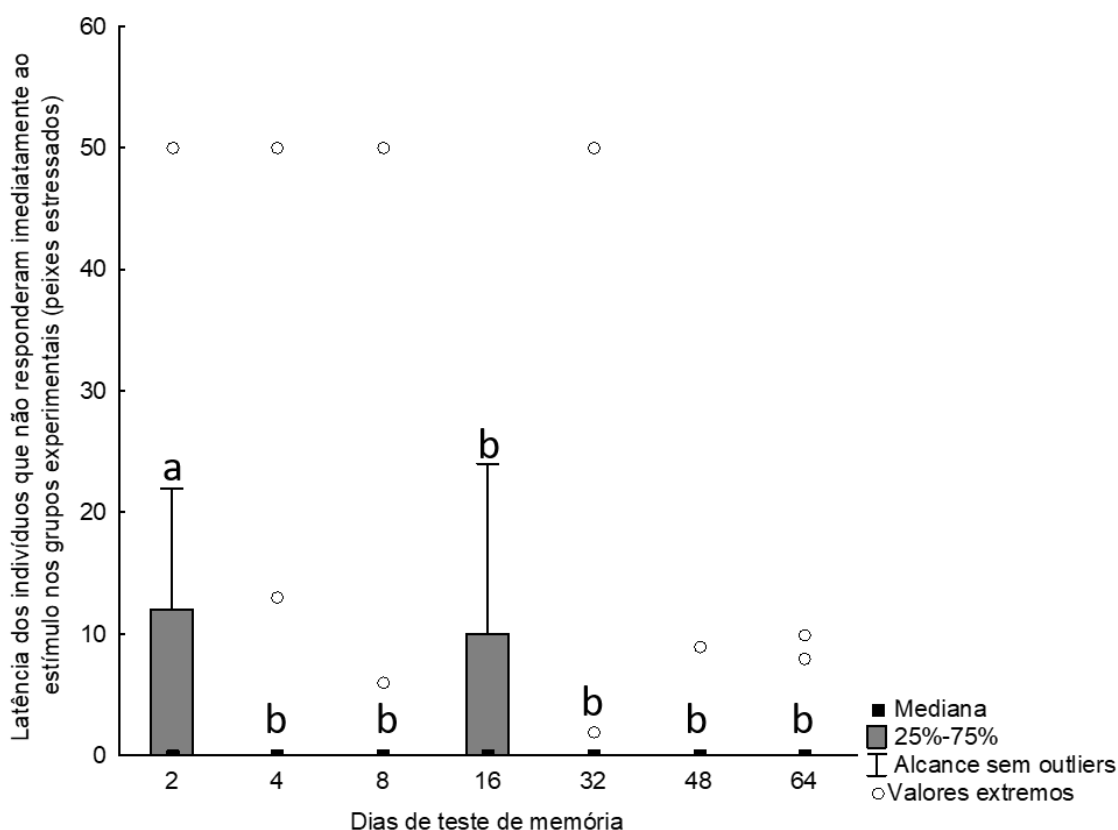


Figura 2 – Indivíduos dos grupos experimentais que não responderam imediatamente ao estímulo nos testes de memória. No primeiro teste de memória (dia 2) a latência para responder ao movimento da água foi significativamente maior que nos demais dias de teste de memória (teste de Friedman, $p < 0,05$; $Fr = 0,15$). Letras minúsculas “a” e “b” indicam diferença significativa entre os dias de teste de memória.

Além disso, considerando os peixes que sofreram estresse, a proporção de indivíduos que não responderam imediatamente foi estatisticamente similar àquela de indivíduos que responderam imediatamente ao movimento da água nesse dia (Figura 3). Tal fato indica que a ocorrência de peixes estressados que não respondem imediatamente ao estímulo condicionado foi significativa na amostra avaliada.

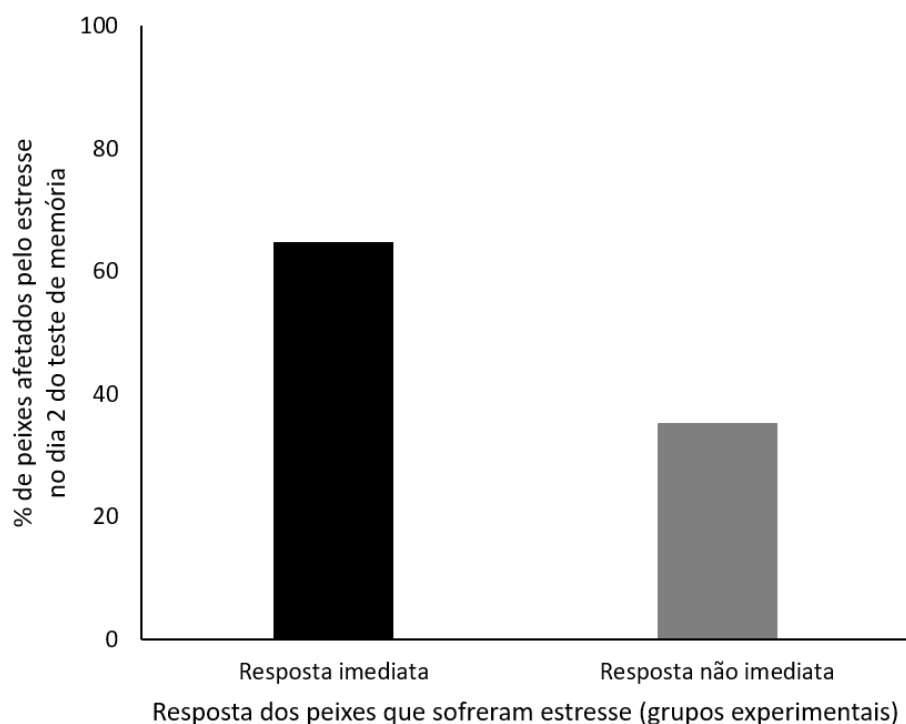
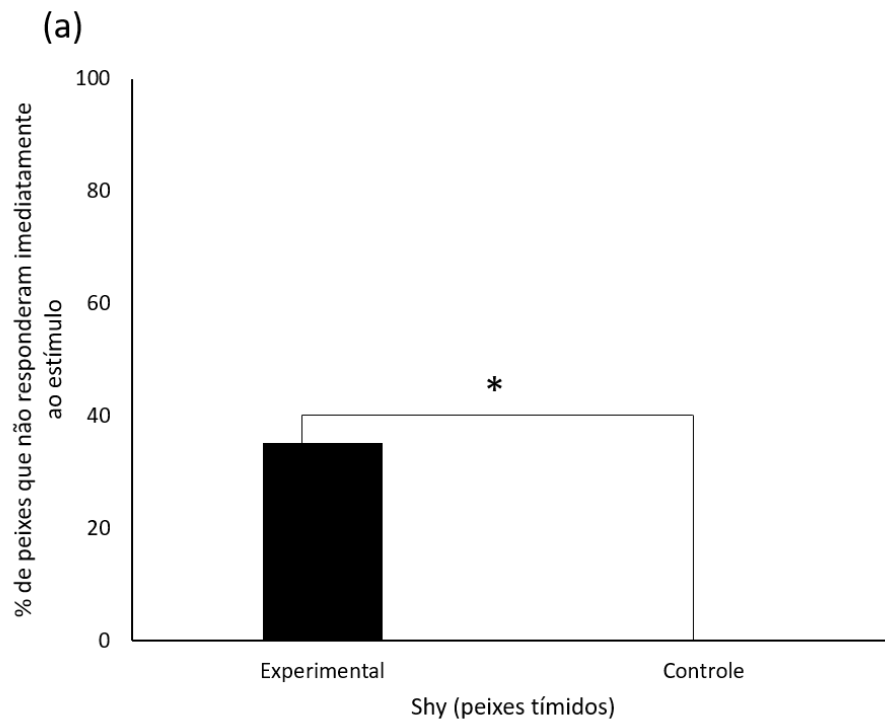


Figura 3 – Proporção de indivíduos que sofreram estresse que responderam e que não responderam imediatamente ao estímulo no dia 2 do teste de memória. Não houve diferença significativa entre as proporções de peixes estressados que responderam imediatamente ou não (teste de proporção de Goodman dentro de multinomiais, 1965; $p > 0,05$).

Considerando a personalidade dos indivíduos testados, houve diferença de resposta ao estresse agudo em relação à latência para responder à movimentação da água entre indivíduos classificados como *shy* ou como *bold*. Considerando os peixes *shy*, houve uma maior proporção de indivíduos que não responderam ao movimento da água imediatamente no grupo que sofreu estresse do que no grupo controle (Figura 4). Entretanto, considerando os peixes *bold*, as proporções de indivíduos que responderam imediatamente e que não responderam imediatamente à movimentação da água foram estatisticamente

similares entre o grupo de indivíduos que foram estressados ou o grupo controle (Figura 4). Além disso, considerando apenas os indivíduos que sofreram estresse (peixes dos tratamentos *shy*-experimental e *bold*-experimental), houve significativamente maior proporção de peixes *shy* do que *bold* que não responderam imediatamente ao estímulo condicionado (Figura 5).



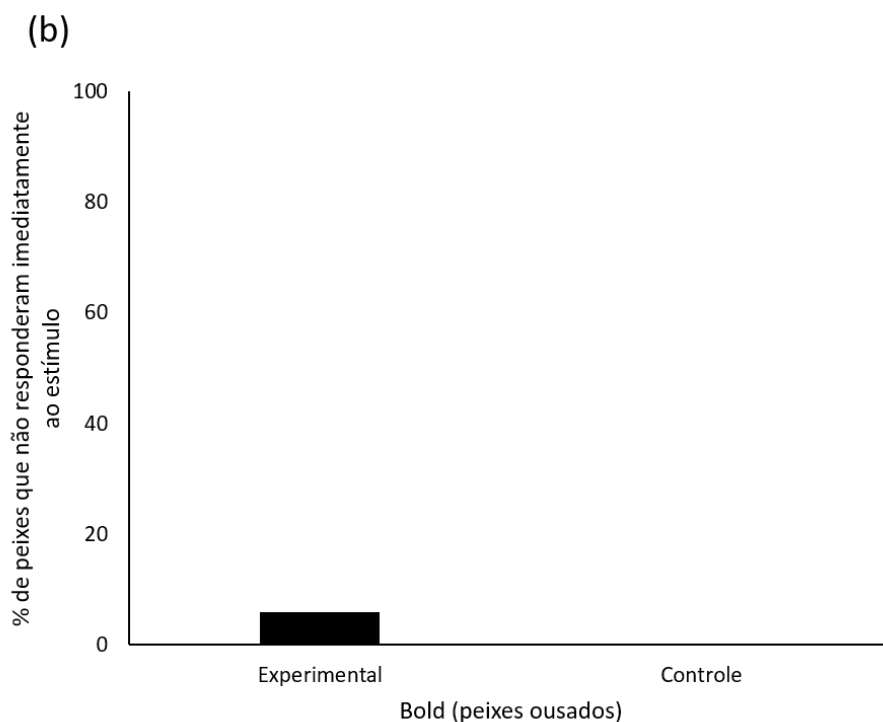


Figura 4 – Proporção de indivíduos *shy* e *bold* que não responderam imediatamente ao estímulo nos grupos experimental e controle. (a) quando os peixes eram *shy*, houve diferença significativa entre experimental (animais estressados) e controle (teste de proporção de Goodman entre multinomiais, 1964; $p < 0,05$); (b) quando os indivíduos eram *bold*, tal resposta não ocorreu (teste de proporção de Goodman entre multinomiais, 1964; $p > 0,05$).

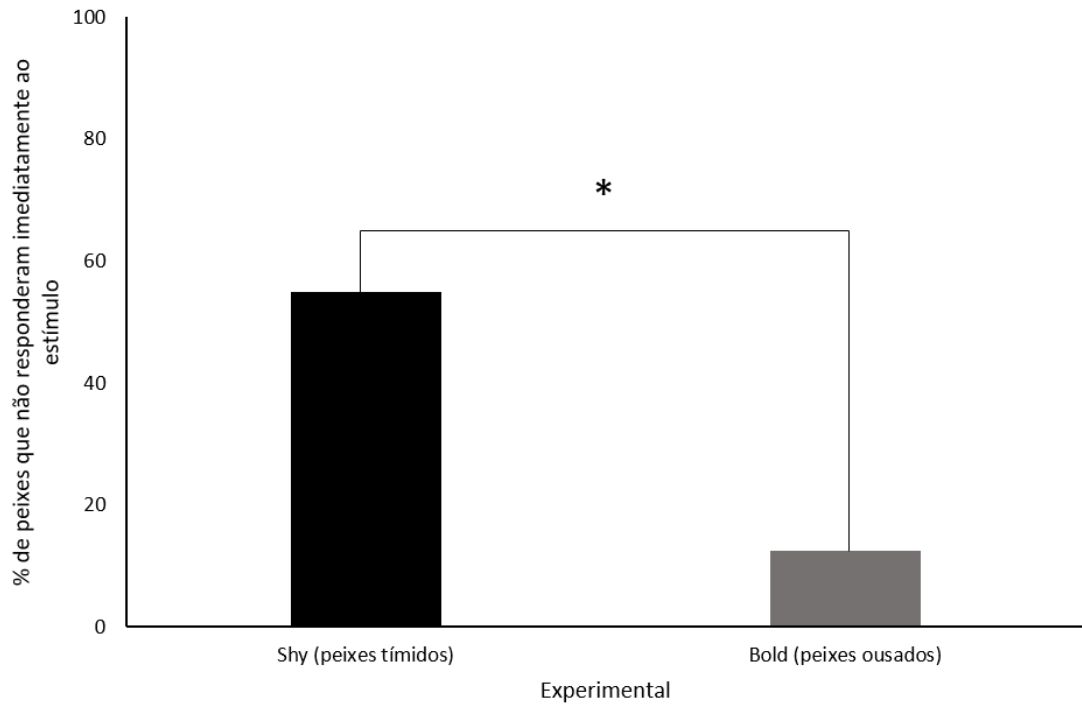


Figura 5 – Proporção de indivíduos *shy* e *bold* do grupo experimental que não responderam imediatamente ao estímulo. Animais *shy* que expressaram tal resposta foram significativamente mais frequentes que animais *bold* (teste de proporção de Goodman entre multinomiais, 1964; $p < 0,05$).

Quando a personalidade dos indivíduos foi reavaliada ao final do experimento, houve peixes que apresentaram mudança de personalidade. Não houve diferença significativa entre a proporção total de indivíduos ($n = 17$) que mantiveram suas respostas de acordo com seus perfis originais (*shy* ou *bold*) e a proporção total de indivíduos ($n = 18$) que mudaram de personalidade (teste de proporção de Goodman, 1965; $p > 0,05$). Além disso, as proporções de indivíduos que mudaram ou não de personalidade ao longo do experimento em relação a classificação feita no início do estudo foi semelhante entre os grupos controle e experimental (animais estressados) ($n = 9$ indivíduos com

personalidade, tanto nos tratamentos controle quanto nos experimentais; n = 9 e 8 indivíduos com mesma personalidade nos tratamentos controle e nos experimentais, respectivamente). Entretanto, desses indivíduos, houve significativamente mais peixes *shy* que mudaram de personalidade do que peixes *bold*, tanto no grupo experimental (animais estressados) quanto no controle (teste de Goodman entre multinomiais – 1964, $p < 0,05$).

4. Discussão

Neste estudo observamos que, independente da personalidade dos indivíduos, o estresse afeta a memória da aprendizagem por condicionamento em peixes, e isso ocorre principalmente quando este estresse é apresentado de forma aguda, não representando influência no estresse crônico. Quando consideramos a personalidade desses animais, peixes *shy* estressados sofrem mais o impacto do estresse agudo em relação aos não estressados e também em relação aos peixes *bold*, tanto estressados quanto não estressados. Também, o estresse não afeta a consistência destes perfis, pois tanto animais que foram estressados quanto os que não foram, tiveram ou não sua personalidade modificada. Contudo, dentro dos animais que tiveram sua personalidade alterada, esta foi mais frequente nos indivíduos *shy*.

É provável que as respostas ao estresse sejam o primeiro meio de lidar com as pressões causadas pelas mudanças ambientais inevitáveis que os organismos estão sujeitos. Durante um estresse agudo, ocorre uma mobilização de recursos metabólicos liberados para as funções vitais do indivíduo, os quais são essenciais para a sua sobrevivência (Moberg, 1985; Wendelaar-Bonga, 1997), havendo poucas dúvidas quanto ao significado adaptativo desta resposta

neuroendócrina sobre a sobrevivência a curto prazo (Greenberg *et al.*, 2002). Entretanto, durante uma situação de estresse crônico, o custo de manutenção se torna significativo, reduzindo o escopo de atividade metabólica, o que justifica e valida nossa metodologia utilizada nos animais estressados, pois peixes deste grupo apresentaram menor crescimento do que peixes do grupo controle, indicando assim um déficit na atividade metabólica dos indivíduos cronicamente estressados.

Contudo, nossos resultados também mostram que durante a situação de estresse agudo (2 dias de estresse), os animais têm uma resposta alterada em relação à aprendizagem do condicionamento (Figura 2), o que demonstra uma deturpação nessa resposta, com retardo em uma quantidade significativa de animais para responderem ao estímulo condicionado. Tais achados discordam da nossa hipótese e da grande maioria dos estudos que investigaram especificamente os efeitos da duração mais curta dos períodos de estresse no funcionamento cognitivo, principalmente focados no estresse agudo. Por exemplo, em ratas, o estresse de curto prazo aumentou a resposta de memória (Bowman *et al.*, 2009). Em outro estudo com ratos, o estresse agudo não afetou o desempenho da memória (Luine *et al.*, 1996; McLaughlin *et al.*, 2007). Em aves da espécie *Coturnix japonica*, o estresse melhorou o desempenho cognitivo destes animais (Calandreau *et al.*, 2011). Entretanto, apesar de existir muitos estudos em animais sobre esta questão, em peixes pouco foi relatado. Em um estudo com zebrafish (*Danio rerio*), foi encontrada uma resposta similar à nossa, onde o estresse agudo afetou significativamente a memória destes animais (Gaikwad *et al.*, 2011), enquanto que Piato *et al.* (2011a) encontraram que o estresse agudo em zebrafish (*Danio rerio*) aumentou sua ansiedade, mas não

prejudicou a locomoção ou a cognição destes animais. Apesar de existirem controvérsias sobre o efeito do estresse agudo na memória (Shields *et al.*, 2016), nossos resultados corroboram a perspectiva de que este estresse realoca os recursos de controle executivo da memória de trabalho e da flexibilidade cognitiva para a atenção seletiva, a fim de focar o processamento em informações atuais relevantes para o estresse (LeBlanc, 2009; Mather & Sutherland, 2011). Nossos resultados mostram que o estresse agudo afetou a memória a curto prazo, onde uma memória associada a alimentação foi temporariamente inibida para que o animal lidasse com o estímulo estressor. Assim, pode-se explicar o fato do efeito do estresse agudo na memória de curto prazo e de como o estresse crônico não afetou a memória a longo prazo, até pelo efeito da adaptação.

Quanto ao estresse crônico, há evidências que nessas condições seus efeitos se multiplicam em cascata, podendo gerar consequências prejudiciais para o organismo quando a homeostase não é reestabelecida. No entanto, o que pudemos observar em nosso trabalho, e que não corrobora com nossa hipótese, é que apesar do desgaste metabólico, a memória de aprendizagem foi preservada durante o estresse crônico. Esse fato é interessante, uma vez que esta forma de estresse é frequentemente relatada como deletéria para o desempenho da memória em mamíferos (De Kloet *et al.*, 1999; Joëls *et al.*, 2006; Shors, 2006; Lindqvist & Jensen, 2009). Além disso, outros estudos têm demonstrado que o estresse crônico afeta negativamente funções cognitivas nos peixes. Por exemplo, estudos como o de Piatto *et al.*, 2011b e Chakravarty *et al.*, 2013 avaliaram os efeitos do estresse crônico em zebrafish (*Danio rerio*) e encontraram que o estresse de forma imprevisível e crônica aumentou os níveis

de ansiedade, perturbou a interação social e aumentou os níveis de cortisol destes animais e no segundo citado causou ansiedade e transtorno de humor nos animais. Nossos achados, entretanto, mostram que a memória dos peixes, ao contrário de outras funções cognitivas em geral, é conservada em situações de estresse crônico.

Nossos resultados mostrando a consistência da memória mesmo durante estresse crônico podem levantar a questão de que efeitos adversos repetitivos reduzem o escopo de atividade metabólica, de forma que estes recursos preservem a capacidade cognitiva relacionada à memória. Este fato pode estar relacionado à neurogênese destes animais, a qual consiste em um processo integrado que envolve proliferação de células precursoras, remoção apoptótica e determinação do destino neuronal, seguido de maturação e migração para longe da zona proliferativa (Aimone *et al.*, 2014; Kempermann *et al.*, 2015). Estes neurônios ainda imaturos são extremamente plásticos e podem integrar novas informações, possibilitando flexibilidade comportamental e cognitiva (Aimone *et al.*, 2006; Kropff *et al.*, 2015; Opendak & Gould, 2015), que por sua vez é uma base importante para a variação individual no comportamento. A taxa de proliferação e a distribuição dessas zonas são limitadas em mamíferos em comparação aos peixes (Leyhausen *et al.*, 1987; Zupanc & Horschke, 1995), sendo que nestes últimos, ocorre uma regeneração robusta de neurônios individuais e áreas cerebrais inteiras após danos (Zupanc, 2008; Skaggs *et al.*, 2014). Isso poderia justificar a memória estabilizada durante o estresse crônico nestes animais, porém, precisando de estudos mais específicos neste contexto.

Em relação à variação individual de resposta ao estresse, onde encontramos que indivíduos *shy* são mais susceptíveis aos efeitos do estresse

que indivíduos *bold* (Figura 5), Overli & Sorensen, 2016, levantaram a hipótese de que a neurogênese e a plasticidade neural estão envolvidas na determinação dos limiares individuais para empregar estilos de enfrentamento contrastantes. Um ambiente ameaçador causa alterações neuroendócrinas, que por sua vez, direciona a estratégia de enfrentamento adotada, diretamente no curto prazo ou cronicamente, afetando a plasticidade neural (Sorensen *et al.*, 2013; Puglisi-Allegra & Andolina, 2015). Os indivíduos *shy* são caracterizados por exibirem níveis baixos de agressão, comportamento de *freezing*, alta flexibilidade comportamental e tomada de baixo risco. Em contraste, indivíduos *bold* e proativos são caracterizados por empregarem uma estratégia de "luta ou fuga" quando estressados, e costumam ser agressivos, rígidos e rotineiros e geralmente apresentam comportamentos de alto risco. Levando em conta estas características, podemos considerar que animais *shy* tiveram uma resposta retardada no início de uma situação estressora em decorrência do seu perfil. Sendo assim, deve ser dada atenção especial à hipótese de que a inibição comportamental seja uma estratégia adaptativa sob condições incontroláveis e imprevisíveis (Vindas *et al.*, 2016) e, se esta hipótese se sustenta, a inibição comportamental induzida pelo estresse pode ser caracterizada como estratégia adaptativa de enfrentamento de peixes *shy* e não como efeito colateral fisiopatológico do estresse.

Esta variação individual no estilo de enfrentamento ao estresse aumenta a noção de que tal plasticidade é um importante mecanismo adaptativo frente a situações estressoras. Indivíduos *shy* são mais adaptáveis sob ameaça quando as condições são incontroláveis e imprevisíveis, ou sob o estresse crônico, enquanto que os estilos proativos, característico de indivíduos *bold* podem ser

mais vantajosos em situações previsíveis, de baixa ameaça, circunstâncias de baixo estresse (Wingfield, 2003; Sorensen *et al.*, 2013). Entretanto, parece que os animais podem mudar seu estilo de enfrentamento "preferido", dependendo do contexto. Em um estudo com truta arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*), a fome e o transporte para um novo ambiente, em uma população de peixe de perfil *shy* (neste estudo denominados como "reativos"), levaram estes animais a adotarem um comportamento mais proativo (Ruiz-Gomez *et al.*, 2011). O que nos mostra que, ao invés de um fenótipo comportamental completamente predeterminado que será exibido em todas as circunstâncias, ele pode se moldar ao ambiente. Aqui vimos que, ao final do experimento, uma parcela significativa da amostra de peixes testados expressou mudança de personalidade, refletindo assim essa flexibilidade na expressão da personalidade. Dentre os que mudaram de perfil, houve mais peixes *shy* que *bold*, tanto em animais estressados como não estressados, o que demonstra que o estresse pode não ter sido a causa exclusiva desta alteração de perfil, corroborando o fato de a plasticidade ser uma característica mais marcante da personalidade *shy*, podendo estes animais serem mais adaptáveis a variações em seu ambiente que indivíduos *bold*.

Concluimos que em tilápia-do-Nilo a memória é deturpada quando estressada de forma aguda. Entretanto, se tal estresse prossegue ao longo do tempo, os animais se ajustam e não são mais afetados pelo estresse em relação à memória de aprendizagem. Além disso, animais com perfil *shy* são mais afetados pelo estresse agudo que animais com perfil *bold*, o que pode representar uma estratégia adaptativa de enfrentamento a uma situação estressora pelos animais *shy*, sendo mais cautelosos em situações imprevisíveis. Também, como uma parcela considerável dos animais mudou de

personalidade ao longo do experimento, independentemente do estresse envolvido, sendo esta uma resposta mais frequente em peixes *shy*, tal fato pode indicar flexibilidade nas respostas associadas ao perfil de personalidade dos indivíduos ao longo do tempo, especialmente em peixes *shy*. Tal achado deve ser melhor investigado em estudos futuros e também que há necessidade de cautela ao classificar a personalidade dos peixes e considerá-la imutável ao longo do tempo.

5. Referências

- Aimone, J., Li, Y., Lee, S., Clemenson, G., Deng, W. and Gage, F. (2014). Regulation and function of adult neurogenesis: From genes to cognition. *Physiological Reviews*, 94(4), pp.991-1026.
- Aimone, J., Wiles, J. and Gage, F. (2006). Potential role for adult neurogenesis in the encoding of time in new memories. *Nature Neuroscience*, 9(6), pp.723-727.
- Angelidis, P., Baudin-Laurencin, F. and Youinou, P. (1987). Stress in rainbow trout, *Salmo gairdneri*: effects upon phagocyte chemiluminescence, circulating leucocytes and susceptibility to *Aeromonas salmonicida*. *Journal of Fish Biology*, 31(sa), pp.113-122.
- Bauer, M., Vedhara, K., Perks, P., Wilcock, G., Lightman, S. and Shanks, N. (2000). Chronic stress in caregivers of dementia patients is associated with reduced lymphocyte sensitivity to glucocorticoids. *Journal of Neuroimmunology*, 103(1), pp.84-92.

- Bowman, R., Micik, R., Gautreaux, C., Fernandez, L. and Luine, V. (2009). Sex-dependent changes in anxiety, memory, and monoamines following one week of stress. *Physiology & Behavior*, 97(1), pp.21-29.
- Bratland, S., Stien, L., Braithwaite, V., Juell, J., Folkedal, O., Nilsson, J., Oppedal, F., Fosseidengen, J. and Kristiansen, T. (2010). From fright to anticipation: using aversive light stimuli to investigate reward conditioning in large groups of Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Aquaculture International*, 18(6), pp.991-1001.
- Braubach, O., Wood, H., Gadbois, S., Fine, A. and Croll, R. (2009). Olfactory conditioning in the zebrafish (*Danio rerio*). *Behavioural Brain Research*, 198(1), pp.190-198.
- Brown, C., Laland, K. and Krause, J. (2006). *Fish cognition and behavior*. Oxford: Blackwell Publishing.
- Budaev, S. (1997). "Personality" in the guppy (*Poecilia reticulata*): A correlational study of exploratory behavior and social tendency. *Journal of Comparative Psychology*, 111(4), pp.399-411.
- Calandreau, L., Bertin, A., Boissy, A., Arnould, C., Constantin, P., Desmedt, A., Guémené, D., Nowak, R. and Leterrier, C. (2011). Effect of one week of stress on emotional reactivity and learning and memory performances in Japanese quail. *Behavioural Brain Research*, 217(1), pp.104-110.
- Campbell, P., Pottinger, T. and Sumpter, J. (1992). Stress reduces the quality of gametes produced by rainbow trout. *Biology of Reproduction*, 47(6), pp.1140-1150.

- Campbell, P., Pottinger, T. and Sumpter, J. (1994). Preliminary evidence that chronic confinement stress reduces the quality of gametes produced by brown and rainbow trout. *Aquaculture*, 120(1-2), pp.151-169.
- Carmichael, G., Tomasso, J., Simco, B. and Davis, K. (1984). Confinement and water quality-induced stress in largemouth bass. *Transactions of the American Fisheries Society*, 113(6), pp.767-777.
- Carragher, J., Sumpter, J., Pottinger, T. and Pickering, A. (1989). The deleterious effects of cortisol implantation on reproductive function in two species of trout, *Salmo trutta L.* and *Salmo gairdneri Richardson*. *General and Comparative Endocrinology*, 76(2), pp.310-321.
- Castanheira, M., Herrera, M., Costas, B., Conceição, L. and Martins, C. (2013). Can We Predict Personality in Fish? Searching for Consistency over Time and across Contexts. *PLoS ONE*, 8(4), p.e62037.
- Chakravarty, S., Reddy, B., Sudhakar, S., Saxena, S., Das, T., Meghah, V., Brahmendra Swamy, C., Kumar, A. and Idris, M. (2013). Chronic unpredictable stress (CUS)-induced anxiety and related mood disorders in a zebrafish model: altered brain proteome profile implicates mitochondrial dysfunction. *PLoS ONE*, 8(5), p.e63302.
- Chrousos, G. and Gold, P. (1992). The Concepts of Stress and Stress System Disorders. *JAMA*, 267(9), p.1244-1252.
- De Graaf, G., Galemoni, F. and Banzoussi, B. (1996). Recruitment control of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*, by the African catfish, *Clarias gariepinus* (Burchell 1822), and the African snakehead, *Ophiocephalus obscurus*. I. A biological analysis. *Aquaculture*, 146(1-2), pp.85-100.

- De Kloet, E., Oitzl, M. and Joëls, M. (1999). Stress and cognition: are corticosteroids good or bad guys?. *Trends in Neurosciences*, 22(10), pp.422-426.
- Doyle, J., Merovitch, N., Wyeth, R., Stoyek, M., Schmidt, M., Wilfart, F., Fine, A. and Croll, R. (2017). A simple automated system for appetitive conditioning of zebrafish in their home tanks. *Behavioural Brain Research*, 317, pp.444-452.
- Dugatkin, L. and Alfieri, M. (2003). Boldness, behavioral inhibition and learning. *Ethology Ecology & Evolution*, 15(1), pp.43-49.
- Ebbesson, L. and Braithwaite, V. (2012). Environmental effects on fish neural plasticity and cognition. *Journal of Fish Biology*, 81(7), pp.2151-2174.
- Fernandes, M. and Volpato, G. (1993). Heterogeneous growth in the Nile tilapia: Social stress and carbohydrate metabolism. *Physiology & Behavior*, 54(2), pp.319-323.
- Folkedal, O., Fernö, A., Nederlof, M., Fosseidengen, J., Cerqueira, M., Olsen, R. and Nilsson, J. (2018). Habituation and conditioning in gilthead sea bream (*Sparus aurata*): Effects of aversive stimuli, reward and social hierarchies. *Aquaculture Research*, 49(1), pp.335-340.
- Frost, A., Winrow-Giffen, A., Ashley, P. and Sneddon, L. (2007). Plasticity in animal personality traits: does prior experience alter the degree of boldness?. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 274(1608), pp.333-339.

- Gaikwad, S., Stewart, A., Hart, P., Wong, K., Piet, V., Cachat, J. and Kalueff, A. (2011). Acute stress disrupts performance of zebrafish in the cued and spatial memory tests: The utility of fish models to study stress–memory interplay. *Behavioural Processes*, 87(2), pp.224-230.
- Goede, R. and Barton, B. (1990). Organismic indices and an autopsy-based assessment as indicators of health and condition in fish. *American Fisheries Society, Symp.* 8, Bethesda, pp.93-108.
- Goodman, L. (1964). Simultaneous confidence intervals for contrasts among multinomial populations. *The Annals of Mathematical Statistics*, 35(2), pp.716-725.
- Goodman, L. (1965). On simultaneous confidence intervals for multinomial proportions. *Technometrics*, 7(2), pp.247-254.
- Greenberg, N., Carr, J. and Summer, C. (2002). Causes and Consequences of Stress. *Integrative and Comparative Biology*, 42(3), pp.508-516.
- Joëls, M., Pu, Z., Wiegert, O., Oitzl, M. and Krugers, H. (2006). Learning under stress: how does it work?. *Trends in Cognitive Sciences*, 10(4), pp.152-158.
- Kandel, E., Schwartz, J., Jessel, T., Siegelbaum, S. and Hudspeth, A. (2014). *Princípios de neurociências*. 5th ed. Porto Alegre: McGraw-Hill-Education, pp.1256-1273.
- Kempermann, G., Song, H. and Gage, F. (2015). Neurogenesis in the adult hippocampus. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 7(9), p.a018812.

- Kropff, E., Yang, S. and Schinder, A. (2015). Dynamic role of adult-born dentate granule cells in memory processing. *Current Opinion in Neurobiology*, 35, pp.21-26.
- LeBlanc, V. (2009). The Effects of Acute Stress on Performance: Implications for Health Professions Education. *Academic Medicine*, 84(Supplement), pp.S25-S33.
- Leyhausen, C., Kirschbaum, F., Szabo, T., Erdelen, M. (1987). Differential growth in the brain of the weakly electric fish, *Apteronotus leptorhynchus* (Gymnotiformes), during ontogenesis. Part 1 of 2. *Brain, Behavior and Evolution*, 30(3-4), pp.230–238.
- Lindqvist, C. and Jensen, P. (2009). Domestication and stress effects on contrafreeloading and spatial learning performance in red jungle fowl (*Gallus gallus*) and White Leghorn layers. *Behavioural Processes*, 81(1), pp.80-84.
- Luine, V., Martinez, C., Villegas, M., María Magariños, A. and McEwen, B. (1996). Restraint stress reversibly enhances spatial memory performance. *Physiology & Behavior*, 59(1), pp.27-32.
- Manuel, R., Gorissen, M., Piza Roca, C., Zethof, J., Vis, H., Flik, G. and Bos, R. (2014). Inhibitory avoidance learning in zebrafish (*Danio rerio*): Effects of shock intensity and unraveling differences in task performance. *Zebrafish*, 11(4), pp.341-352.
- Mather, M. and Sutherland, M. (2011). Arousal-Biased Competition in Perception and Memory. *Perspectives on Psychological Science*, 6(2), pp.114-133.

- McLaughlin, K., Gomez, J., Baran, S. and Conrad, C. (2007). The effects of chronic stress on hippocampal morphology and function: An evaluation of chronic restraint paradigms. *Brain Research*, 1161, pp.56-64.
- Moberg, G. (1985). *Animal stress*. Baltimore: Waverly Press.
- Moretz, J., Martins, E. and Robison, B. (2007). Behavioral syndromes and the evolution of correlated behavior in zebrafish. *Behavioral Ecology*, 18(3), pp.556-562.
- Nilsson, J., Kristiansen, T., Fosseidengen, J., Fernö, A. and van den Bos, R. (2007). Learning in cod (*Gadus morhua*): long trace interval retention. *Animal Cognition*, 11(2), pp.215-222.
- Opendak, M. and Gould, E. (2015). Adult neurogenesis: a substrate for experience-dependent change. *Trends in Cognitive Sciences*, 19(3), pp.151-161.
- Overli, O. and Sorensen, C. (2016). On the role of neurogenesis and neural plasticity in the evolution of animal personalities and stress coping styles. *Brain, Behavior and Evolution*, 87(3), pp.167-174.
- Peters, G. (1982). The effect of stress on the stomach of the European eel, *Anguilla anguilla* L. *Journal of Fish Biology*, 21(5), pp.497-512.
- Piato, A., Capiotti, K., Tamborski, A., Oses, J., Barcellos, L., Bogo, M., Lara, D., Vianna, M. and Bonan, C. (2011b). Unpredictable chronic stress model in zebrafish (*Danio rerio*): Behavioral and physiological responses. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*, 35(2), pp.561-567.

- Piato, A., Rosemberg, D., Capiotti, K., Siebel, A., Herrmann, A., Ghisleni, G., Vianna, M., Bogó, M., Lara, D. and Bonan, C. (2011a). Acute restraint stress in zebrafish: Behavioral parameters and purinergic signaling. *Neurochemical Research*, 36(10), pp.1876-1886.
- Pickering, A. and Pottinger, T. (1987). Lymphocytopenia and interrenal activity during sexual maturation in the brown trout, *Salmo trutta L.* *Journal of Fish Biology*, 30(1), pp.41-50.
- Pickering, A. and Stewart, A. (1984). Acclimation of the interrenal tissue of the brown trout, *Salmo trutta L.*, to chronic crowding stress. *Journal of Fish Biology*, 24(6), pp.731-740.
- Puglisi-Allegra, S. and Andolina, D. (2015). Serotonin and stress coping. *Behavioural Brain Research*, 277, pp.58-67.
- Réale, D., Reader, S., Sol, D., McDougall, P. and Dingemanse, N. (2007). Integrating animal temperament within ecology and evolution. *Biological Reviews*, 82(2), pp.291-318.
- Ruiz-Gomez, M., Huntingford, F., Overli, O., Thörnqvist, P. and Höglund, E. (2011). Response to environmental change in rainbow trout selected for divergent stress coping styles. *Physiology & Behavior*, 102(3-4), pp.317-322.
- Selye, H. (1965). *Stress - A tensao da vida*. São Paulo (SP): IBRASA.
- Shields, G., Sazma, M. and Yonelinas, A. (2016). The effects of acute stress on core executive functions: A meta-analysis and comparison with cortisol. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, 68, pp.651-668.

- Shors, T. (2006). Stressful experience and learning across the Lifespan. *Annual Review of Psychology*, 57(1), pp.55-85.
- Sih, A., Bell, A. and Johnson, J. (2004). Behavioral syndromes: an ecological and evolutionary overview. *Trends in Ecology & Evolution*, 19(7), pp.372-378.
- Skaggs, K., Goldman, D. and Parent, J. (2014). Excitotoxic brain injury in adult zebrafish stimulates neurogenesis and long-distance neuronal integration. *Glia*, 62(12), pp.2061-2079.
- Sloan Wilson, D., Clark, A., Coleman, K. and Dearstyne, T. (1994). Shyness and boldness in humans and other animals. *Trends in Ecology & Evolution*, 9(11), pp.442-446.
- Small, B. (2004). Effect of dietary cortisol administration on growth and reproductive success of channel catfish. *Journal of Fish Biology*, 64(3), pp.589-596.
- Sneddon, L. (2003). The bold and the shy: individual differences in rainbow trout. *Journal of Fish Biology*, 62(4), pp.971-975.
- Snieszko, S. (1974). The effects of environmental stress on outbreaks of infectious diseases of fishes. *Journal of Fish Biology*, 6(2), pp.197-208.
- Sorensen, C., Johansen, I. and Overli, O. (2013). Neural plasticity and stress coping in teleost fishes. *General and Comparative Endocrinology*, 181, pp.25-34.
- Vindas, M., Johansen, I., Folkedal, O., Höglund, E., Gorissen, M., Flik, G., Kristiansen, T. and Overli, O. (2016). Brain serotonergic activation in

- growth-stunted farmed salmon: adaption versus pathology. *Royal Society Open Science*, 3(5), p.160030.
- Warburton, K. (2003). Learning of foraging skills by fish. *Fish and Fisheries*, 4(3), pp.203-215.
- Wedemeyer, G. (1970). The role of stress in the disease resistance of fishes. *American Fisheries Society*, 5, pp.30-35.
- Wendelaar-Bonga, S. (1997). The stress response in fish. *Physiological Reviews*, 77(3), pp.591-625.
- White, S., Wagner, T., Gowan, C. and Braithwaite, V. (2017). Can personality predict individual differences in brook trout spatial learning ability?. *Behavioural Processes*, 141, pp.220-228.
- Wilson, A. and Godin, J. (2009). Boldness and behavioral syndromes in the bluegill sunfish, *Lepomis macrochirus*. *Behavioral Ecology*, 20(2), pp.231-237.
- Wingfield, J. (2003). Control of behavioural strategies for capricious environments. *Animal Behaviour*, 66(5), pp.807-816.
- Yue, S., Moccia, R. and Duncan, I. (2004). Investigating fear in domestic rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*, using an avoidance learning task. *Applied Animal Behaviour Science*, 87(3-4), pp.343-354.
- Zupanc, G. (2008). Adult neurogenesis and neuronal regeneration in the brain of teleost fish. *Journal of Physiology-Paris*, 102(4-6), pp.357-373.

Zupanc, G. and Horschke, I. (1995). Proliferation zones in the brain of adult gymnotiform fish: A quantitative mapping study. *The Journal of Comparative Neurology*, 353(2), pp.213-233.

Capítulo 2

Jato de água: um método simples para condicionamento clássico em peixes

Introdução

A aprendizagem nos animais é uma mudança de comportamento que ocorre de acordo com as experiências pelas quais os indivíduos passam, sendo que o comportamento aprendido passa a ser codificado através da memória (Kandel *et al.*, 2014). Um indivíduo não seria capaz de compreender o mundo ao seu redor ou até mesmo desenvolver simples atividades rotineiras sem o aprendizado e a memória, sendo estes essenciais para a sobrevivência tanto de pessoas como de animais. Resumidamente, a memória pode ser dividida de duas formas: memória de curto prazo, com duração de segundos a horas e memória de longo prazo, desde dias até uma vida inteira. A memória de curto prazo pode ser convertida seletivamente, ao longo do tempo, em memória de longo prazo, e esta, dividida em outras duas formas: explícita (consciente) ou implícita (subconsciente) (Bailey *et al.*, 1996; Kandel *et al.*, 2014). A memória explícita é altamente flexível, permitindo a associação de múltiplos fragmentos de informação sob diferentes circunstâncias, já a memória implícita, permanece fortemente dependente das condições originais sob as quais se deu o aprendizado (Bailey *et al.*, 1996; Kandel *et al.*, 2014). Na memória de longo prazo implícita temos o armazenamento de informações que normalmente são adquiridas sem esforço consciente e que orientam o comportamento de modo

inconsciente, sendo também a base do aprendizado de hábitos ou do condicionamento clássico (Kandel *et al.*, 2014).

O condicionamento é um processo de aprendizagem que inclui a modificação da ocorrência de comportamentos com base nos efeitos do binômio “estímulo-resposta” sobre o sistema nervoso central dos seres vivos (Lieberman, 2000). Quando um determinado comportamento, que é expressado naturalmente na presença de um estímulo biologicamente relevante (*e.g.* salivação na presença de alimento suculento), fica sob o controle de um estímulo previamente neutro após um treino específico (*e.g.* salivação na presença de som específico que foi condicionado), temos a ocorrência de condicionamento clássico.

Tal condicionamento foi descrito primeiramente, em 1927, por Ivan Petrovich Pavlov, e por esta razão, o condicionamento clássico pode também ser encontrado como condicionamento Pavloviano. Nesse tipo de condicionamento, a associação aprendida entre estímulos biologicamente relevantes (estímulos incondicionados) e estímulos inicialmente neutros (estímulos condicionados) induz uma resposta condicionada (Lieberman, 2000), como no exemplo acima (salivação na presença de som específico que foi condicionado). Assim, vemos que o condicionamento clássico nada mais é do que uma forma de aprendizagem associativa de uma relação entre dois estímulos, sendo que a memória implícita (subconsciente), um tipo de memória de longo prazo que permite o armazenamento de informações normalmente adquiridas sem esforço consciente, é a base desse tipo de condicionamento (Kandel *et al.*, 2014).

O condicionamento clássico é frequentemente utilizado como modelo para experimentos que envolvem principalmente o teste de questões cognitivas em diversas espécies de animais, principalmente em mamíferos (Steinmetz *et al.*, 1986, 1989; Thompson, 1990; Kim *et al.*, 1995; Freeman & Rabinak, 2004; Boele *et al.*, 2010; Yang *et al.*, 2015). Até recentemente, a possibilidade de que peixes fossem capazes deste tipo de aprendizagem era geralmente ignorada. Entretanto, um crescente interesse na cognição dos peixes tem revelado que sua capacidade de aprendizagem é maior do que se acreditava (Laland *et al.*, 2003; Brown *et al.*, 2006). Estudos têm demonstrado que, assim como os mamíferos, os peixes são capazes de associar estímulos (Bratland *et al.*, 2010; Nilsson *et al.*, 2007; Moreira & Volpato, 2004) e expressar resposta de memória por tal associação (Yue *et al.*, 2008; Doyle *et al.*, 2017). Tal fato faz sentido, uma vez que na maioria dos ambientes aquáticos, a complexidade da paisagem física associada à necessidade de localizar, por exemplo, abrigos, áreas com alimentos ou locais com predadores exemplificam o valor adaptativo da capacidade de aprendizagem nesses ambientes. Nesse cenário, a ocorrência de condicionamento clássico foi mais recentemente demonstrada em diversos estudos com espécies de peixes, como por exemplo: zebrafish (*Danio rerio*) (Manabe *et al.*, 2013; Doyle *et al.*, 2017), St. Peter's (*Sarotherodon galilaeus*) (Zion *et al.*, 2011a, 2011b), truta arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*) (Colson *et al.*, 2015), salmão do Atlântico (*Salmo salar*) (Bratland *et al.*, 2010) e Dourada (*Sparus aurata*) (Folkedal *et al.*, 2018).

Em tais estudos, geralmente o estímulo condicionado é algum tipo de luz e/ou som, que são testados em grupos de peixes com enfoque de facilitar o manejo desses animais (Moreira & Volpato, 2004; Bratland *et al.*, 2010; Zion &

Barki, 2012; Folkedal *et al.*, 2018). Entretanto, quando extrapolamos esse método de condicionamento para experimentos realizados com ênfase em avaliar características individuais de resposta, tais como entender o mecanismo da aprendizagem, a eficácia de tal método de condicionamento pode ficar comprometida. Esse fato é ainda mais significativo considerando que experimentos realizados em laboratório podem incluir o teste em animais mantidos em aquários ou ambientes pequenos e/ou próximos uns dos outros (e.g. Yue *et al.*, 2004 e Braubach *et al.*, 2009). Quando pensamos que um estímulo tanto visual quanto acústico pode ser percebido pelo peixe que se encontra no aquário próximo ao que está sendo condicionado, é fácil imaginar que o condicionamento dos aquários ao redor estará sobre influência do estímulo em momentos que não deveriam estar, assim influenciando na resposta condicionada.

Nesse contexto, buscar outros estímulos condicionáveis que sejam facilmente aplicáveis na prática e, principalmente, que não interfiram em aquários próximos é fundamental para a realização de experimentos nas condições mais restritas dos laboratórios. Assim, considerando que a movimentação localizada da água seria um estímulo facilmente aplicável que não deve interferir em outros aquários por menores e mais próximos que estejam, aqui nosso objetivo foi avaliar se tal estímulo pode ser condicionado no peixe tilápia-do-Nilo (*Oreochromis niloticus*), ou seja, se essa espécie é capaz de associar a movimentação localizada da água com um estímulo biologicamente relevante. Além disso, também avaliamos se tal efeito se mantém consistentemente ao longo do tempo, ou seja, na memória do animal.

Assim, aqui propomos o teste de um novo método de condicionamento clássico de fácil aplicação para peixes em laboratórios de pesquisa.

Material e Métodos

Animais e condições de manutenção

Utilizamos juvenis de tilápia-do-Nilo (*Oreochromis niloticus*) provenientes de piscicultura, que foram aclimatados por 30 dias consecutivos em tanques de 500 L (6 peixes/L; T°C: 24^o±1°C; pH: ~ 6,5; fotoperíodo: 12L:12D) antes dos procedimentos experimentais. Os tanques foram providos com aeração contínua e biofiltros, além de tubos de PVC que funcionaram como tocas para os animais. Além disso, os tanques foram sifonados diariamente para remoção de restos de alimento e fezes. Nessas condições, os peixes foram alimentados uma vez ao dia com ração comercial para peixes tropicais (38% de proteína bruta) até a saciedade. A presença dos biofiltros associada a sifonagem regular dos tanques manteve uma boa qualidade da água, com níveis de nitrito e amônia mantidos abaixo de 0,05 mg/L e 0,5 mg/L, respectivamente.

Delineamento Geral

Para condicionar os peixes (n = 10) à movimentação localizada da água em seus respectivos aquários, aplicamos um jato de água, sempre de mesma duração e intensidade, seguido pela inserção de um pellet de ração no mesmo local por 20 dias consecutivos, 4 vezes ao dia. Assim, a movimentação local da água do aquário gerada pela aplicação do jato seria o estímulo condicionado

enquanto que o pellet de ração seria o estímulo incondicionado. Em cada teste, registramos a latência dos animais para responderem ao movimento da água. Após esse período de condicionamento (20 dias), testes de memória (aplicação do jato para movimentação da água uma única vez após certo intervalo de tempo) foram realizados em intervalos pré-definidos para avaliar se a resposta dos peixes se manteve ao longo do tempo.

Procedimentos específicos

Os peixes foram capturados nos tanques e individualizadas em aquários de 20 l (40 cm x 20 cm x 25 cm) que permaneciam em uma estante coberta com lona preta (região posterior da estante) a fim de prevenir a visualização de entrada, saída e movimentação do pesquisador pelos animais. Nessa lona haviam furos separados na altura de cada aquário, onde foram introduzidas mangueiras individuais (8 mm de diâmetro). As mangueiras foram distribuídas de forma aleatória quanto a posição em relação à superfície do aquário para evitar problemas de lateralização (e.g. influência de tendências prévias dos indivíduos por um determinado lado). Nos testes de condicionamento realizados em cada dia (intervalo de 2,5 h entre um teste e outro num mesmo dia), um jato de água com cerca de 3 ml foi injetado nas mangueiras com ligação aos respectivos aquários, de forma a movimentar a água dos aquários naquele local específico onde chegava a mangueira. Em seguida, 15 s após a aplicação do jato, um pellet de ração foi introduzido pela mesma mangueira e, portanto, no mesmo local específico onde o jato havia sido aplicado causando a movimentação da água. Todos os testes foram filmados durante 5 min e, a partir dessas filmagens, posteriormente registramos a latência de reação de cada

peixe ao movimento da água e consequente ingestão do pellet de ração. Os peixes foram considerados como condicionados à movimentação da água causada pela aplicação do jato a partir do momento em que responderam com latência 0 s a essa movimentação e mantiveram essa resposta até o último dia do teste de condicionamento.

Após o 20º dia de teste de condicionamento, realizamos testes de memória com intervalos de 2, 4, 8 e 16 dias, ou seja, nos dias 2, 4, 8, 16 e 32 após os testes de condicionamento para avaliar se a resposta dos peixes em função da associação entre a movimentação da água com a inserção do pellet de ração foi mantida ao longo do tempo. A escolha dos intervalos de tempo para avaliar a memória dos peixes foi baseada em Doyle *et al.* (2017). Para esses testes, os peixes foram expostos ao estímulo ao qual foram condicionados (movimentação da água por meio de um jato de 3 ml), mas sem receberem a recompensa alimentar associada (pellet de ração). Esses testes também foram filmados por 5 min e, posteriormente, registramos a latência de resposta dos animais após a movimentação da água a partir dessas filmagens.

Análises dos dados

Utilizamos os dados de latência de resposta à movimentação da água causada pelo jato para construir a curva de aprendizagem por dia de teste (20 dias de teste de condicionamento) e também por teste (4 testes por dia = total de 80 testes). Além disso, em cada dia de teste, calculamos a porcentagem de peixes condicionados, ou seja, aqueles que responderam com latência 0 s no dia e mantiveram essa resposta até o final dos testes de condicionamento. Nos

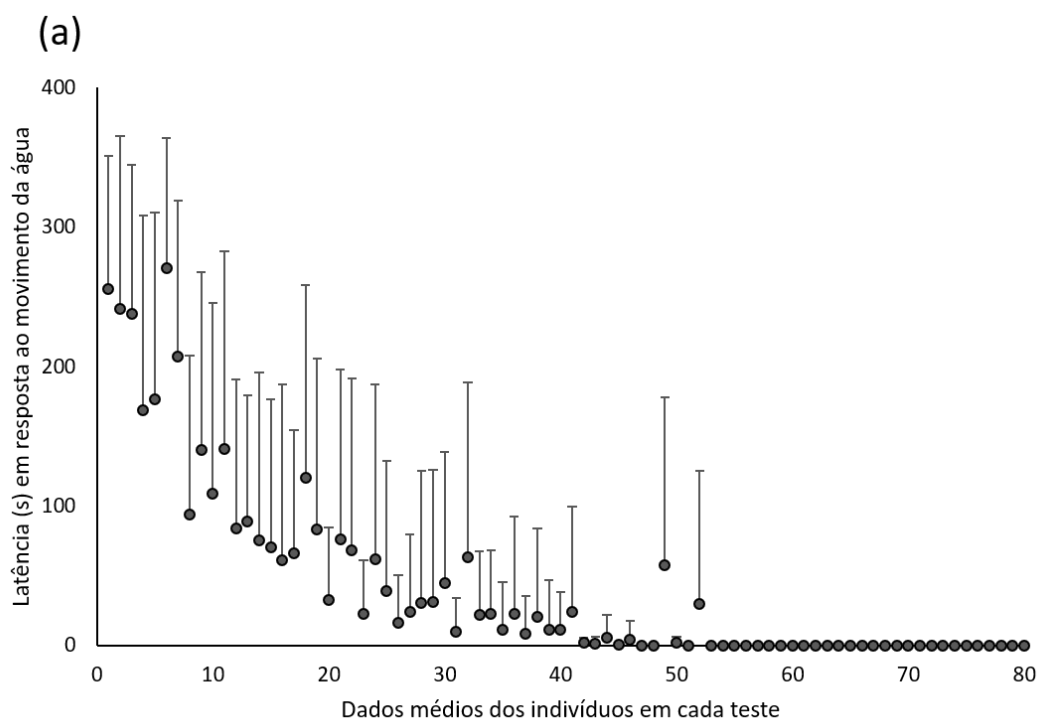
testes de memória, avaliamos se a latência de resposta à movimentação da água causada pelo jato manteve-se inequivocamente como 0 s ao longo dos dias após os animais estarem condicionados.

Resultados

Todos os peixes foram condicionados pelo movimento da água causado pela aplicação do jato. Os primeiros peixes (n=2) que foram condicionados apresentaram essa resposta no sétimo dia de teste (Tabela 1), sendo que em apenas 10 dias de teste, mais da metade dos animais (n=6 de um total de 10) já estavam condicionados à movimentação da água (Tabela 1). No décimo quarto dia de teste, todos os peixes expressaram clara resposta de condicionamento à movimentação da água (Tabela 1). A curva de aprendizagem dos peixes, considerando os dados médios dos indivíduos em cada teste ou em cada dia (4 testes por dia), pode ser acompanhada na Figura 1.

Tabela 1: Porcentagem de peixes condicionados em relação aos dias do experimento, sendo que 100% dos peixes já estavam condicionados a partir do 14º dia.

Dia do Experimento	% de peixes condicionados	% total de peixes condicionados
1	0	0
2	0	0
3	0	0
4	0	0
5	0	0
6	0	0
7	20	20
8	10	30
9	10	40
10	20	60
11	0	60
12	0	60
13	0	60
14	40	100



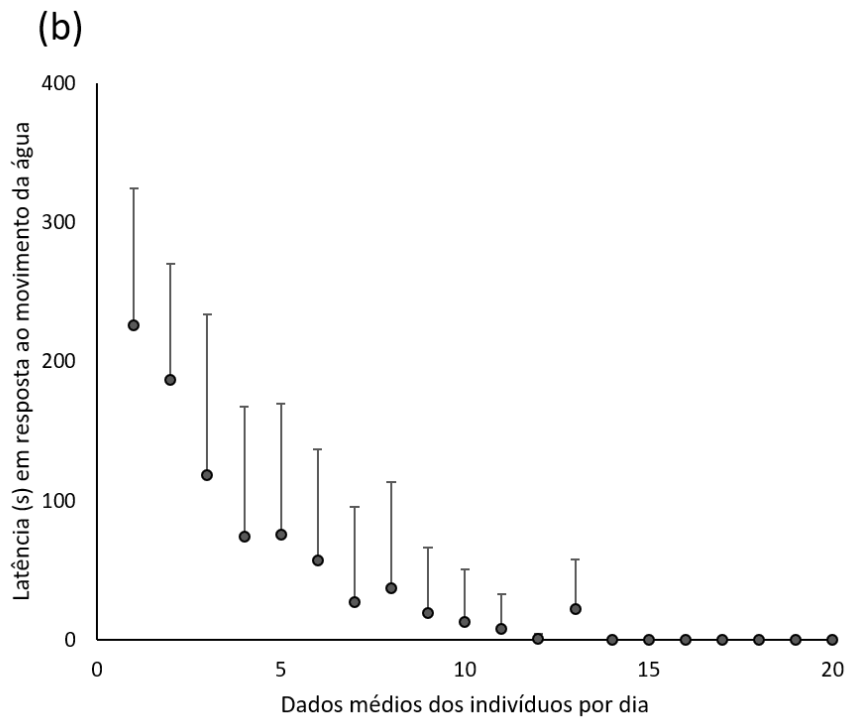


Figura 1: Curvas de aprendizagem para a resposta ao movimento da água (latência) – estímulo condicionado – após a aplicação do jato. (a) Dados considerando todos os testes realizados ao longo de 20 dias. (b) Dados considerando as médias diárias de resposta da latência ao longo dos 20 dias.

Com relação aos testes de memória, os peixes sempre responderam positivamente. Ou seja, em cada um dos dias de teste (dias 2, 4, 8, 16 e 32 após os testes de condicionamento), a latência de resposta ao movimento da água gerada pelo jato foi sempre de 0 s para todos os indivíduos testados.

Discussão

Nesse estudo, desenvolvemos uma nova metodologia para realizar condicionamento clássico em peixes que pode ser facilmente aplicada em

aquários pequenos e próximos sem que haja interferência da aplicação do estímulo. Tal metodologia envolve o movimento da água como estímulo condicionado e o alimento como estímulo incondicionado. Com essa metodologia, vimos que, em no máximo 14 dias de condicionamento, todos os peixes aprenderam a associar esses estímulos, demonstrando assim que a movimentação da água é eficaz para o condicionamento da tilápia-do-Nilo. Além disso, todos os indivíduos foram capazes de reter e recuperar a memória associativa em até 32 dias após o condicionamento, indicando assim a retenção da resposta condicionada na memória dos peixes.

A aprendizagem por condicionamento clássico é frequentemente utilizada em estudos que envolvem questões cognitivas (Moreira & Volpato, 2004; Nilsson *et al.*, 2007; Braubach *et al.*, 2009; Nordgreen *et al.*, 2009; Roy & Bhat, 2016; Kenney *et al.*, 2017) ou até mesmo para facilitar manejo, e/ou outras intervenções em criações de animais (Bratland *et al.*, 2010; Zion & Barki, 2012; Folkedal *et al.*, 2018). Nesse cenário, a metodologia que empregamos aqui para condicionamento clássico na tilápia-do-Nilo mostrou que a movimentação da água pode ser uma ferramenta eficiente para condicionar peixes.

Além disso, nossa técnica foi de simples aplicação e baixo custo, necessitando de materiais facilmente encontrados (mangueira, lona e seringa), e com o mínimo de interferência no bem-estar destes animais, provocado pelo isolamento social que é necessário nestes experimentos. A demonstração da eficácia dessa nova metodologia é ainda mais relevante quando vemos os problemas envolvidos com estímulos tradicionais utilizados para condicionamento clássico em peixes. Em tais estudos, frequentemente os autores utilizam luz ou som como estímulos condicionados, o que pode dificultar

o processo de experimentação especialmente em ambientes menores como os laboratórios, envolvendo peixes individualizados que frequentemente permanecem em aquários pequenos e próximos. Por exemplo, Yue *et al.* (2004), utilizou luz como estímulo condicionado em experimentos com truta arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*), e, para isso, teve que transferir os animais de um aquário para outro durante os testes para isolar o estímulo. Tal fato, além de representar uma fonte de estresse para os peixes (Wendelaar-Bonga, 1997), permitiu testar somente 6 peixes por dia. Nilsson *et al.* (2007) condicionaram Bacalhau do Atlântico (*Gadus morhua*) com estímulo visual, dificultando assim o isolamento destes animais durante o experimento, causando a necessidade de retirá-los do tanque e anestesiá-los para aplicar uma marcação individual. Além disso, frequências sonoras que se propagam facilmente no meio aquático e são frequentemente utilizadas para condicionar os peixes em ambientes maiores (ver revisão Zion & Barki, 2012) podem facilmente interferir na resposta ao condicionamento desses animais quando em ambientes menores. Nesse cenário, a metodologia que propomos aqui elimina os problemas descritos acima de se usar luz ou som para condicionar os peixes, pois o estímulo condicionado, movimentação da água, é facilmente isolado de outros aquários ou tanques, evitando assim o viés da interferência do estímulo condicionado.

Quando os animais aprendem algo novo (via condicionamento ou não), uma forma de avaliarmos o quão consolidada foi essa aprendizagem é através da avaliação da memória dos indivíduos. A memória foi relatada em peixes (Yue *et al.*, 2004; Nilsson *et al.*, 2007; Doyle *et al.*, 2017), tendo sido demonstrada em relação a diferentes estímulos e contextos. Isso mostra a importância deste traço para esses animais, como por exemplo na memória de locais espaciais (Odling-

Smee & Braithwaite, 2003), reconhecimento de predador em potencial (Mesquita & Young, 2007) e reconhecimento de coespecíficos (Madeira & Oliveira, 2017). Aqui demonstramos que a tilápia-do-Nilo é capaz de se lembrar por até 32 dias da movimentação da água como estímulo condicionado e responder de acordo. Tal fato demonstra a eficácia da metodologia empregada.

Concluimos que a simples movimentação da água causada por um jato é uma metodologia eficiente para condicionar a tilápia-do-Nilo. Isso é especialmente vantajoso quando o condicionamento é realizado em ambientes mais restritos, ou seja, quando interferências causadas por outros tipos de estímulos, tais como luz ou som, podem dificultar ou mesmo inviabilizar experimentos que exijam tal tipo de condicionamento em peixes. Ainda, a tilápia-do-Nilo reteve a aprendizagem ao longo do tempo (por até 32 dias), isso reforça a eficácia da metodologia proposta, enfatizando sua aplicabilidade em termos práticos.

Referências

- Bailey, C., Bartsch, D. and Kandel, E. (1996). Toward a molecular definition of long-term memory storage. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 93(24), pp.13445-13452.
- Boele, H., Koekkoek, S. and De Zeeuw, C. (2010). Cerebellar and extracerebellar involvement in mouse eyeblink conditioning: the ACDC model. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 3, pp.1-13.
- Bratland, S., Stien, L., Braithwaite, V., Juell, J., Folkedal, O., Nilsson, J., Oppedal, F., Fosseidengen, J. and Kristiansen, T. (2010). From fright to anticipation:

using aversive light stimuli to investigate reward conditioning in large groups of Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Aquaculture International*, 18(6), pp.991-1001.

Braubach, O., Wood, H., Gadbois, S., Fine, A. and Croll, R. (2009). Olfactory conditioning in the zebrafish (*Danio rerio*). *Behavioural Brain Research*, 198(1), pp.190-198.

Brown, C., Laland, K. and Krause, J. (2006). *Fish cognition and behavior*. Oxford: Blackwell Publishing.

Colson, V., Sadoul, B., Valotaire, C., Prunet, P., Gaumé, M. and Labbé, L. (2015). Welfare assessment of rainbow trout reared in a recirculating aquaculture system: Comparison with a flow-through system. *Aquaculture*, 436, pp.151-159.

Doyle, J., Merovitch, N., Wyeth, R., Stoyek, M., Schmidt, M., Wilfart, F., Fine, A. and Croll, R. (2017). A simple automated system for appetitive conditioning of zebrafish in their home tanks. *Behavioural Brain Research*, 317, pp.444-452.

Folkedal, O., Fernö, A., Nederlof, M., Fosseidengen, J., Cerqueira, M., Olsen, R. and Nilsson, J. (2018). Habituation and conditioning in gilthead sea bream (*Sparus aurata*): Effects of aversive stimuli, reward and social hierarchies. *Aquaculture Research*, 49(1), pp.335-340.

Freeman, J. and Rabinak, C. (2004). Eyeblink conditioning in rats using pontine stimulation as a conditioned stimulus. *Integrative Physiological & Behavioral Science*, 39(3), pp.180-191.

- Kandel, E., Schwartz, J., Jessel, T., Siegelbaum, S. and Hudspeth, A. (2014). *Princípios de neurociências*. 5th ed. Porto Alegre: McGraw-Hill-Education, pp.1256-1273.
- Kenney, J., Scott, I., Josselyn, S. and Frankland, P. (2017). Contextual fear conditioning in zebrafish. *Learning & Memory*, 24(10), pp.516-523.
- Kim, J., Clark, R. and Thompson, R. (1995). Hippocampectomy impairs the memory of recently, but not remotely, acquired trace eyeblink conditioned responses. *Behavioral Neuroscience*, 109(2), pp.195-203.
- Laland, K., Brown, C. and Krause, J. (2003). Learning in fishes: from three-second memory to culture. *Fish and Fisheries*, 4(3), pp.199-202.
- Lieberman, D. (2000). *Learning: Behavior and cognition*. Belmont: Wadsworth.
- Madeira, N. and Oliveira, R. (2017). Long-Term social recognition Memory in Zebrafish. *Zebrafish*, 14(4), pp.305-310.
- Manabe, K., Dooling, R. and Takaku, S. (2013). Differential reinforcement of an approach response in zebrafish (*Danio rerio*). *Behavioural Processes*, 98, pp.106-111.
- Mesquita, F. and Young, R. (2007). The behavioural responses of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) to anti-predator training. *Applied Animal Behaviour Science*, 106(1-3), pp.144-154.
- Moreira, P. and Volpato, G. (2004). Conditioning of stress in Nile tilapia. *Journal of Fish Biology*, 64(4), pp.961-969.

- Nilsson, J., Kristiansen, T., Fosseidengen, J., Fernö, A. and Van den Bos, R. (2007). Learning in cod (*Gadus morhua*): long trace interval retention. *Animal Cognition*, 11(2), pp.215-222.
- Nordgreen, J., Janczak, A., Hovland, A., Ranheim, B. and Horsberg, T. (2009). Trace classical conditioning in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*): what do they learn?. *Animal Cognition*, 13(2), pp.303-309.
- Odling-Smee, L. and Braithwaite, V. (2003). The influence of habitat stability on landmark use during spatial learning in the three-spined stickleback. *Animal Behaviour*, 65(4), pp.701-707.
- Pavlov, I. (1927). *Conditioned reflexes: Investigation of the physiological activity of the cerebral cortex*. Oxford, England: Oxford Univ. Press.
- Roy, T. and Bhat, A. (2016). Learning and memory in juvenile zebrafish: what makes the difference - population or rearing environment?. *Ethology*, 122(4), pp.308-318.
- Steinmetz, J., Lavond, D. and Thompson, R. (1989). Classical conditioning in rabbits using pontine nucleus stimulation as a conditioned stimulus and inferior olive stimulation as an unconditioned stimulus. *Synapse*, 3(3), pp.225-233.
- Steinmetz, J., Rosen, D., Chapman, P., Lavond, D. and Thompson, R. (1986). Classical conditioning of the rabbit eyelid response with a mossy-fiber stimulation CS: I. Pontine nuclei and middle cerebellar peduncle stimulation. *Behavioral Neuroscience*, 100(6), pp.878-887.

- Thompson, R. (1990). Neural Mechanisms of Classical Conditioning in Mammals. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 329(1253), pp.161-170.
- Wendelaar-Bonga, S. (1997). The stress response in fish. *Physiological Reviews*, 77(3), pp.591-625.
- Yang, Y., Lei, C., Feng, H. and Sui, J. (2015). The neural circuitry and molecular mechanisms underlying delay and trace eyeblink conditioning in mice. *Behavioural Brain Research*, 278, pp.307-314.
- Yue, S., Duncan, I. and Moccia, R. (2008). Investigating fear in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) using the conditioned-suppression paradigm. *Journal of Applied Animal Welfare Science*, 11(1), pp.14-27.
- Yue, S., Moccia, R. and Duncan, I. (2004). Investigating fear in domestic rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*, using an avoidance learning task. *Applied Animal Behaviour Science*, 87(3-4), pp.343-354.
- Zion, B. and Barki, A. (2012). Ranching fish using acoustic conditioning: Has it reached a dead end?. *Aquaculture*, 344-349, pp.3-11.
- Zion, B., Barki, A., Grinshpon, J., Rosenfeld, L. and Karplus, I. (2011a). An automatic fishing machine based on acoustic conditioning. *Aquacultural Engineering*, 45(2), pp.87-91.
- Zion, B., Barki, A., Grinshpon, J., Rosenfeld, L. and Karplus, I. (2011b). Retention of acoustic conditioning in St Peter's fish *Sarotherodon galilaeus*. *Journal of Fish Biology*, 78(3), pp.838-847.

Anexo

Artigo científico referente à metodologia desenvolvida

Submetido em: *Animal Cognition* (ISSN: 1435-9448)

Water Jet: an easy method for classical conditioning in fish

Adriana Beatriz Barretto¹, Caroline Marques Maia^{1*}, Nina Pacheco Capelini Alves¹, Percília Cardoso Giaquinto¹

¹Department of Physiology, Institute of Biosciences (IB), São Paulo State University (UNESP) Botucatu – SP, Brasil.

Street Prof. Dr. Antonio Celso Wagner Zanin, s/nº

* carolmm_luzi@hotmail.com; +551438821653

Abstract

Classical conditioning is a learning procedure involving a biologically relevant stimulus paired with a previously neutral stimulus for an animal. In fish, light and sound are frequently used as previously neutral stimuli for conditioning tests. However, such stimuli may influence the responses of fish in nearby aquariums. Here we developed a simple and easily applicable methodology for classical conditioning in fish that prevent this kind of influence. We isolated fish in individual aquariums and introduced a water jet causing localized water movement, followed by the introduction of a food pellet. These procedures were repeated for each fish during 20 days. After 14 days, all fish were conditioned. Moreover, in subsequent memory tests conducted in up to 32 days after conditioning procedures, fish responded accordingly. These findings corroborate the

effectiveness of the method tested here. Thus, we suggest that a simple water jet is a useful and reliable tool for fish conditioning in future studies.

Keywords: fish learning, water jet, classical conditioning, memory

Introduction

Conditioning is a learning process that includes behavioural changes based on the effects of the binomial “stimulus-response” on the central nervous system of animals (Lieberman, 2000). Classical conditioning, described in 1927 by Ivan Pavlov, occurs in situations when a certain behaviour naturally expressed in the presence of a biologically relevant stimulus (e.g. salivation with juicy food), is also expressed in the presence of a previously neutral stimulus after a specific training (e.g. salivation when an specific sound is presented). The basis for this learning process is implicit (subconscious) memory (Kandel *et al.*, 2014), which is a kind of long-term memory that remains strongly dependent of the original conditions under which the learning happened (Bailey *et al.*, 1996; Kandel *et al.*, 2014).

This kind of conditioning is frequently used in experiments involving cognitive issues, especially in mammals (Steinmetz *et al.*, 1986, 1989; Kim *et al.*, 1995; Freeman & Rabinak, 2004; Boele *et al.*, 2010; Yang *et al.*, 2015). However, studies have shown that, such as mammals, fish are able not only to associate stimuli (Moreira & Volpato, 2004; Nilsson *et al.*, 2007; Bratland *et al.*, 2010), but also express memory responses (Yue *et al.*, 2008; Doyle *et al.*, 2017), which is fundamental for any learning process. This fact makes sense, once in most aquatic environments the complexity of surroundings is associated with the need to locate shelters, food areas, predators, etc, thus exemplifying the adaptive value of learning ability in these environments. In this scenario, the occurrence of classical conditioning was recently demonstrated in several studies with fish species, such as zebrafish (*Danio rerio*) (Manabe *et al.*, 2013; Doyle *et al.*, 2017), St. Peter’s fish (*Sarotherodon galilgeus*) (Zion *et al.*, 2011a, 2011b), Atlantic

salmon (*Salmo salar*) (Bratland *et al.*, 2010) and Dourada (*Sparus aurata*) (Folkedal *et al.*, 2018).

In these studies, the conditioned stimulus is usually some sort of light and/or sound, tested in groups of fish aiming to facilitate the management of these animals (Moreira & Volpato, 2004; Bratland *et al.*, 2010; Zion & Barki, 2012; Folkedal *et al.*, 2018). However, when performing experiments to evaluate individual responses (e.g. understanding learning mechanisms), the effectiveness of such conditioning method may be compromised. This is even more relevant when considering that laboratory experiments may involve animals kept in aquariums or small and/or closed environments (e.g. Yue *et al.*, 2004 and Braubach *et al.*, 2009). In these situations, visual or acoustic stimuli can be easily noticed by the fish in the aquarium next to the one being conditioned, thus compromising the conditioned response of fish.

In this context, finding other conditioning stimuli that is easily applicable and do not interfere with nearby aquariums is fundamental for experiments with fish conducted in more restricted conditions, as laboratories. Considering that the localized movement of the water is an easily applicable stimulus that should not interfere with other aquariums, regardless their size and closeness, here we evaluated whether such a stimulus can be classically conditioned in the fish Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). We also evaluated whether this response is consistently maintained over time in the animal's memory.

Material & Methods

Animals and maintenance conditions

We used juvenile Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) from hatchery, which were acclimatized for 30 consecutive days in 500 L tanks (6 fish/L, T°C: 29^o±1°C; photoperiod: 12L:12D) before the experimental procedures. Tanks were supplied with continuous aeration, biofilters and PVC pipes that worked as animal shelters and were daily siphoned. Under these conditions, fish were fed once a day with commercial food for tropical fish (38% crude protein). The water quality was maintained with nitrite and ammonia levels below 0.05 mg/L and 0.5 mg/L, respectively.

Experimental Design

We applied a water jet, always of the same duration and intensity, followed by a food pellet in the same place to condition fish (n = 10) to the localized water movement. This procedure was repeated 4 times a day for 20 consecutive days. Thus, the localized water movement caused by the jet application was used as the conditioned stimulus whereas the food pellet was the unconditioned stimulus. In each test, we recorded the latency response of the animals to the water movement. After this conditioning period (20 days), memory tests (application of the water jet only once and not followed by food pellet) were performed at predefined intervals to evaluate whether the fish response was maintained over time.

Specific Procedures

Fish were individualized in 20 L (40 x 20 x 25 cm) aquariums with continuous aeration. Such aquariums were daily siphoned and remained on a

shelf partially covered with black tarpaulin to prevent animals to perceive movements of researchers. There were separated holes in the tarpaulin at the height of each aquarium, where individual hoses (8 mm of diameter) were introduced. The position of the hoses over the aquariums surface was random to prevent lateralization (previous individual trends on a particular side) influences.

In the conditioning tests performed each day (2,5 h interval between tests on a same day), a water jet of 3 ml was injected into the hoses over the respective aquariums to move the water only in the specific place where the hose came from. Then, 15 s after this, a food pellet was introduced by the same hose and therefore in the same specific place. All the tests were filmed for 5 min and, from these films, we recorded the latency response of each fish to water movement and the consequent intake of the food pellet. Fish were considered conditioned when they responded with latency 0 s to the water movement and maintained this response until the last test day of conditioning.

After the 20th conditioning test day, we performed memory tests with intervals of 2, 4, 8 and 16 days (on days 2, 4, 8, 16 and 32 after the conditioning tests), to evaluate if the fish response of association between the water movement and the food pellet was maintained over time. The selected time intervals to evaluate fish memory were based on Doyle *et al.* (2017). For these memory tests, fish were exposed to the stimulus to which they were conditioned (water movement caused by 3 ml of water jet), but without receiving the associated food reward (food pellet). These tests were also filmed for 5 min and, from these films, we recorded the latency response of the animals after the water movement.

Data Analysis

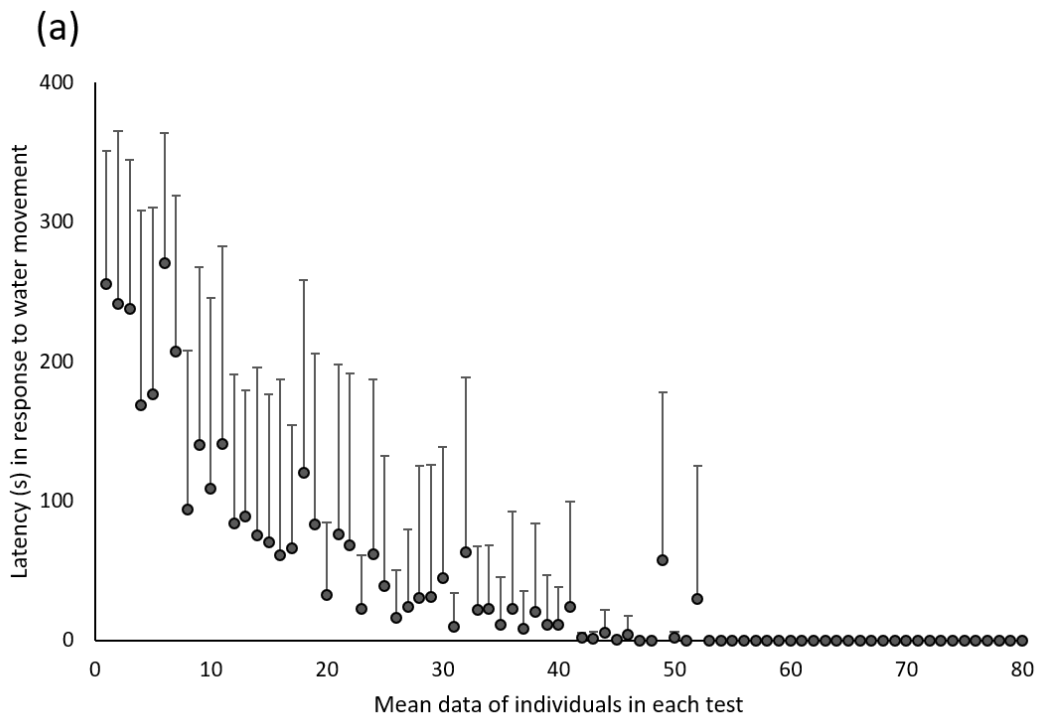
We used the data of latency response to the water movement during conditioning tests to make the learning curve per test day (20 days) and per test (4 tests per day = total 80 tests). We also calculated the percentage of conditioned fish on each test day, that is, those fish that responded with latency 0 s on the day and maintained this response over the remaining conditioning test days. In memory tests, we evaluated whether the latency response to water movement remained unambiguously as 0 s throughout the days after the animals were conditioned.

Results

All tested fish were conditioned by the water movement caused by the water jet. The first conditioned fish ($n = 2$; 20%) expressed such response on the 7th test day (Table 1). In only 10 test days, more than half of the animals ($n = 6$; 60%) was already conditioned to water movement (Table 1). From the 14th test day, all fish were already expressing clearly conditioned responses to water movement (Table 1). The learning curve of fish, considering the average data of individuals in each test day or each test (4 tests per day) is represented in Figure 1.

Table 1: Percentage of conditioned fish in each test day (daily and cumulative data). All fish (100%) were already conditioned after day 14.

Experiment Day	% of conditioned fish	% total of conditioned fish
1	0	0
2	0	0
3	0	0
4	0	0
5	0	0
6	0	0
7	20	20
8	10	30
9	10	40
10	20	60
11	0	60
12	0	60
13	0	60
14	40	100



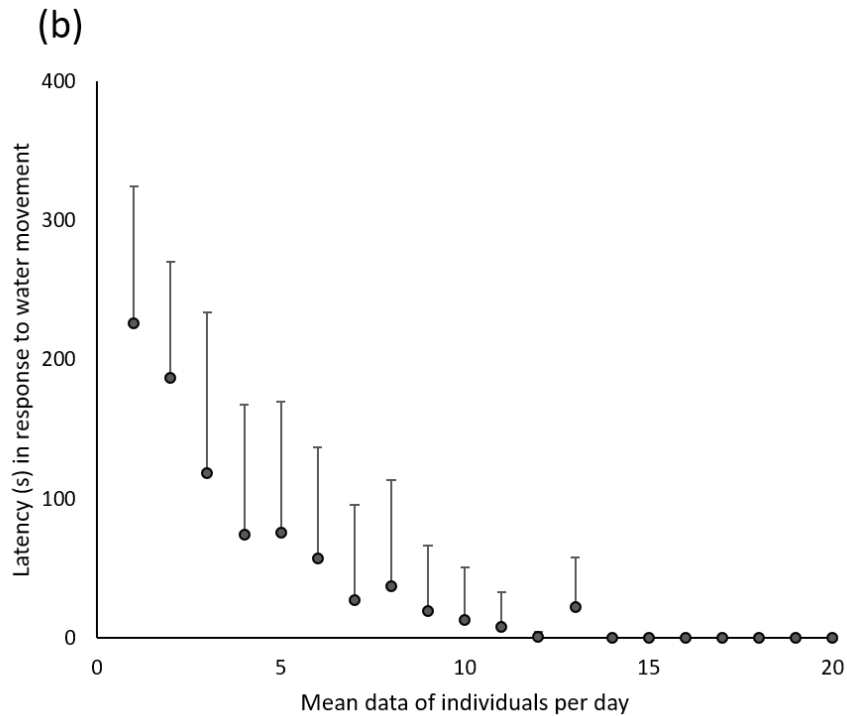


Figure 1. Learning curves for the response (latency) to water movement, the conditioned stimulus, after the application of the water jet. (a) Data considering all tests performed over 20 consecutive days. (b) Data considering daily averages (4 tests per day) of latency response over the 20 consecutive days.

Considering the memory tests, fish always responded positively. That is, on each test day (days 2, 4, 8, 16 and 32 after the conditioning tests), the latency of response to the water movement was always 0 s for all tested individuals.

Discussion

Here we demonstrate a new methodology to perform classic conditioning in fish, which can be easily applied without causing any interference from the application of the stimulus in small and nearby aquariums. Such methodology

involves the movement of water as conditioned stimulus and food as unconditioned stimulus. Based on our results, in only two weeks of conditioning tests all fish learned to associate these stimuli, thus demonstrating that this new methodology is effective for the conditioning of Nile tilapia fish. In addition, all individuals were able to retain and recover associative memory within 32 days after conditioning procedures, thus indicating the retention of the conditioned response in fish's memory.

Classical conditioning is a learning process often used in studies involving cognitive issues (Moreira & Volpato, 2004; Nilsson *et al.*, 2007; Braubach *et al.*, 2009; Nordgreen *et al.*, 2009; Roy & Bath, 2016; Kenney *et al.*, 2017) or even to facilitate management and/or other animal husbandry interventions (Bratland *et al.*, 2010; Zion & Barki, 2012; Folkedal *et al.*, 2018). Thus, the easy methodology used here based on water movement as conditioned stimulus is simple to apply and of low cost, requiring only readily available materials and thus, could be easily used in experiments involving cognitive issues or to facilitate management of fish. The demonstration of the effectiveness of this new methodology for classical conditioning in fish is even more relevant considering the problems involved with traditional stimuli frequently used.

Light or sound are frequently used as conditioned stimuli for fish, which may impair the experimentation procedures in laboratories when experiments involve individualized fish in small and nearby aquariums. For example, Yue *et al.* (2004) used light as conditioned stimulus in experiments with rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*), and had to transfer fish between aquariums during the tests to isolate the stimulus. Such fact, besides representing a source of stress for fish (Wendelaar-Bonga, 1997), allowed testing only 6 fish per day. Nilsson *et*

al. (2007) conditioned Atlantic codfish (*Gadus morhua*) with visual stimulus, making it difficult to isolate these animals during the experiment, which were then removed from tanks and anesthetized to apply individual marking. Furthermore, sound frequencies that easily propagate in the water and are also frequently used to condition fish in large environments (see review Zion & Barki, 2012) may bias the conditioning response of fish when in smaller environments. Thus, as the conditioning methodology proposed here prevents the problems described above as water movement is easily isolated from other aquariums, it demonstrates to be a useful tool for fish conditioning.

When animals learn something new, one way of evaluating the learning consolidation is by assessing the memory of individuals. Memory was reported in fish (Yue *et al.*, 2004; Nilsson *et al.*, 2007; Doyle *et al.*, 2017) and has been demonstrated in relation to different stimuli and contexts. Here we demonstrated that Nile tilapia remember of water movement as a conditioned stimulus and respond accordingly for up to 32 days. This fact demonstrates the effectiveness of the methodology employed here. Thus, we conclude that the simple movement of water caused by a jet is an efficient methodology for conditioning fish, which is especially advantageous when conditioning is performed in more restricted environments, when interferences caused by other stimuli, as light or sound, can make it difficult to perform experiments.

Financial support: This project was funded by CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) as a scholarship of the first author.

Conflict of Interest: The authors declare that they have no conflict of interest.

Ethical approval: This research followed the standards and was approved by the Ethics Committee on the Use of Animals (CEUA).

References:

Bailey C, Bartsch, D and Kandel, E (1996). Toward a molecular definition of long-term memory storage. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 93(24), pp.13445-13452.

Boele H, Koekkoek, S and De Zeeuw, C (2010). Cerebellar and extracerebellar involvement in mouse eyeblink conditioning: the ACDC model. *Front Cell Neurosci*, 3, pp.1-13.

Bratland S, Stien, L, Braithwaite V, Juell J, Folkedal O, Nilsson J, Oppedal F, Fosseidengen J and Kristiansen T. (2010). From fright to anticipation: using aversive light stimuli to investigate reward conditioning in large groups of Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Aquac Int*, 18(6), pp.991-1001.

Braubach O, Wood H, Gadbois S, Fine A and Croll R. (2009). Olfactory conditioning in the zebrafish (*Danio rerio*). *Behav Brain Res*, 198(1), pp.190-198.

Doyle J, Merovitch N, Wyeth R, Stoyek M, Schmidt M, Wilfart F, Fine A and Croll R. (2017). A simple automated system for appetitive conditioning of zebrafish in their home tanks. *Behav Brain Res*, 317, pp.444-452.

- Folkedal O, Fernö A, Nederlof M, Fosseidengen J, Cerqueira M, Olsen R and Nilsson J. (2018). Habituation and conditioning in gilthead sea bream (*Sparus aurata*): Effects of aversive stimuli, reward and social hierarchies. *Aquac Res*, 49(1), pp.335-340.
- Freeman J and Rabinak C. (2004). Eyeblink conditioning in rats using pontine stimulation as a conditioned stimulus. *Integr Physiol Behav Sci*, 39(3), pp.180-191.
- Kandel E, Schwartz J, Jessel T, Siegelbaum, S and Hudspeth A. (2014). *Princípios de neurociências*. 5th ed. Porto Alegre: McGraw-Hill-Education, pp.1256-1273.
- Kenney J, Scott I, Josselyn S and Frankland P. (2017). Contextual fear conditioning in zebrafish. *Learn Mem*, 24(10), pp.516-523.
- Kim J, Clark R and Thompson R. (1995). Hippocampectomy impairs the memory of recently, but not remotely, acquired trace eyeblink conditioned responses. *Behav Neurosci*, 109(2), pp.195-203.
- Lieberman D. (2000). *Learning: Behavior and cognition*. Belmont: Wadsworth.
- Manabe K, Dooling R and Takaku S. (2013). Differential reinforcement of an approach response in zebrafish (*Danio rerio*). *Behav Processes*, 98, pp.106-111.
- Moreira P and Volpato G. (2004). Conditioning of stress in Nile tilapia. *J Fish Biol*, 64(4), pp.961-969.

- Nilsson J, Kristiansen T, Fosseidengen, J, Fernö A and Van den Bos R. (2007). Learning in cod (*Gadus morhua*): long trace interval retention. *Anim Cogn*, 11(2), pp.215-222.
- Nordgreen J, Janczak A, Hovland A, Ranheim B and Horsberg T. (2009). Trace classical conditioning in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*): what do they learn?. *Anim Cogn*, 13(2), pp.303-309.
- Pavlov, I. (1927). *Conditioned reflexes: Investigation of the physiological activity of the cerebral cortex*. Oxford, England: Oxford Univ. Press.
- Roy T and Bhat A. (2016). Learning and memory in juvenile zebrafish: what makes the difference - population or rearing environment?. *Ethology*, 122(4), pp.308-318.
- Steinmetz J, Lavond D and Thompson R. (1989). Classical conditioning in rabbits using pontine nucleus stimulation as a conditioned stimulus and inferior olive stimulation as an unconditioned stimulus. *Synapse*, 3(3), pp.225-233.
- Steinmetz J, Rosen D, Chapman P, Lavond D and Thompson R. (1986). Classical conditioning of the rabbit eyelid response with a mossy-fiber stimulation CS: I. Pontine nuclei and middle cerebellar peduncle stimulation. *Behav Neurosci*, 100(6), pp.878-887.
- Wendelaar-Bonga S. (1997). The stress response in fish. *Physiol Rev*, 77(3), pp.591-625.
- Yang Y, Lei C, Feng H and Sui J. (2015). The neural circuitry and molecular mechanisms underlying delay and trace eyeblink conditioning in mice. *Behav Brain Res*, 278, pp.307-314.

- Yue S, Duncan I and Moccia R. (2008). Investigating fear in rainbow trout (*oncorhynchus mykiss*) using the conditioned-suppression paradigm. J Appl Anim Welf Sci, 11(1), pp.14-27.
- Yue S, Moccia R and Duncan I. (2004). Investigating fear in domestic rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*, using an avoidance learning task. Appl Anim Behav Sci, 87(3-4), pp.343-354.
- Zion B and Barki A. (2012). Ranching fish using acoustic conditioning: Has it reached a dead end?. Aquaculture, 344-349, pp.3-11.
- Zion B, Barki A, Grinshpon J, Rosenfeld L and Karplus I. (2011a). An automatic fishing machine based on acoustic conditioning. Aquac Eng, 45(2), pp.87-91.
- Zion B, Barki A, Grinshpon J, Rosenfeld L and Karplus, I. (2011b). Retention of acoustic conditioning in St Peter's fish *Sarotherodon galilaeus*. J Fish Biol, 78(3), pp.838-847.