

Efeito estabilizador do grupo em comportamento exploratório, ansiedade, cognição e níveis de cortisol em peixe zebra

Isabel C. Schaefer¹, Natalia Pagnussat², Angelo L. Piato², Angélica Rech Tamborski, Laura Dick e Silva Guerim, Monica Ryff Vianna³, Carla Bonan², Diogo R. Lara²

¹Faculdade de Farmácia PUCRS, ²Laboratório de Neuroquímica e psicofarmacologia, ³Laboratório de Biologia do Desenvolvimento do Sistema Nervoso

Resumo

A maioria dos estudos comportamentais em peixe zebra vem sendo realizados utilizando animais isolados, apesar do seu comportamento natural de formar e viver em cardume. Nós comparamos alguns parâmetros comportamentais e também os níveis de cortisol de peixe zebra adultos em grupos de 3 ou isoladamente.

Introdução

O peixe zebra, *Danio rerio*, é um pequeno teleosteo de água doce particularmente acessível à manipulação experimental pela capacidade de gerar grande número de descendentes, pela facilidade de manutenção e por absorver fármacos adicionados à água, dispensando protocolos demorados e invasivos (Spence *et al.*, 2008).

O peixe zebra apresenta comportamento social e adaptativo de viver em cardumes, ou seja, os animais formam um grupo que permanece unido por diversas razões, entre elas a busca por alimentos, acasalamento, defesa contra predadores e outras ameaças ambientais (Levin *et al.*, 2007; Miller & Gerlai, 2007). Mesmo quando os animais são criados em isolamento, eles rapidamente formam cardumes quando são postos juntos (Buske *et al.*, 2010).

Metodologia

Neste estudo, foram utilizados peixes zebra adultos, machos e fêmeas, obtidos de fornecedor especializado (Agroloja Red Fish, Porto Alegre). Antes do início dos experimentos, os animais passaram por um período de aclimação de 2 semanas. Os peixes foram mantidos em um ciclo claro-escuro de 14/10h e foram alimentados 3 vezes ao dia com ração comercial e complementado com artemia. Todos os protocolos foram previamente revisados e aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (110/08 e 08/00037 CEUA–PUCRS).

A tarefa de comportamento exploratório foi adaptada de um protocolo previamente descrito (Piato *et al*, 2010). Os aquários de teste (24 altura x 8 profundidade 20 cm largura) continham 2,7 litros de água, divididos em 9 zonas, utilizadas para avaliação dos parâmetros comportamentais. A temperatura foi mantida em $28 \pm 2^\circ\text{C}$, as laterais e o fundo foram cobertos com plástico branco para evitar a influência do meio e facilitar a análise e filmagem. O tempo dispendido no topo e a latência para cruzar para o lado escuro foram medidos com cronômetros para cada peixe. A atividade locomotora foi avaliada considerando o número de cruzamentos entre as zonas.

Para verificar a preferência dos animais quanto a ambientes claros ou escuros foi utilizado um aquário (15 cm altura \times 10 cm profundidade \times 45 cm largura) dividido por uma barreira divisória com duas partes iguais, sendo um lado branco e outro escuro, adaptado de um protocolo previamente descrito (Maximino *et al*, 2010). Os peixes eram gentilmente colocados individualmente ou em trios na zona clara do aparato, e durante 5 minutos foram analisados os seguintes parâmetros: latência para entrada na zona escura do aparato, tempo dispendido na zona clara do aparato e número de cruzamentos. Para o trio somente foi considerado o cruzamento quando os 3 peixes cruzaram o compartimento.

Na tarefa de esquiva inibitória foi utilizado um protocolo previamente descrito (Blank *et al.*, 2009) onde dois eletrodos ficavam posicionados na zona escura do aparato. Os animais eram colocados gentilmente na zona clara do aparato enquanto a barreira divisória entre os compartimentos estava bloqueada. Após 1 minuto de habituação a barreira era levantada e o peixe nadava livremente entre as 2 zonas do aparato. Na seção de treino, logo após os animais cruzarem para o lado escuro a passagem era novamente bloqueada e era administrado um choque durante 5 segundos. Para os trios o choque era administrado somente quando os 3 peixes cruzavam. Os animais foram testados 24h após treino.

Para dosagem de cortisol foram utilizados peixes controles (tirados diretamente do aquário moradia), peixes individuais e trio logo após 5 minutos de exploração no aquário teste. Os peixes foram capturados e rapidamente congelados em nitrogênio líquido e armazenados a -80°C até a extração de cortisol (Barcellos *et al*, 2007).

Os dados da tarefa comportamental exploratória, tarefa claro-escuro e esquiva inibitória foram analisados usando o teste Mann-Whitney, e os resultados foram expressos em mediana \pm intervalo interquartil. Os níveis de cortisol foram analisados por ANOVA seguido de Student-Newman-Keuls. Teste de Levene foi utilizado para avaliar diferenças de dispersão dos dados de grupos.

Resultados

Em todas as tarefas observou-se uma maior dispersão nos dados em peixe testados individualmente quando comparado ao trio, mas não houve diferença significativa nas médias em relação ao comportamento exploratório e tarefa claro-escuro. Na esquiwa inibitória apenas peixes treinados individualmente mostraram aumento na latência.

Animais expostos ao aquário de teste exploratório por 5 minutos mostraram níveis aumentados de cortisol em comparação com os peixes controle. Em comparação com o trio, os níveis de cortisol de peixes expostos individualmente foram maiores, (Student Newman-Keuls post hoc) e mais variáveis.

Esses resultados mostram que na tarefa comportamental exploratória a dispersão dos dados do peixe individual não pode ser atribuída somente ao fator estressor da novidade ao ambiente, pois quando o trio é posto em novo aquário, a novidade ao ambiente continua sendo um fator estressante, mas o fato de estar em grupo promove um efeito estabilizador no comportamento, com maior previsibilidade dos resultados.

Conclusão

A principal conclusão deste estudo foi que a variabilidade dos dados foi maior dentro do grupo individual que em comparação ao trio, em todos os testes comportamentais e de níveis de cortisol. Por outro lado, o desempenho geral foi similar entre a os grupos, exceto para teste de latência na tarefa de esquiwa inibitória.

Referências

- Barcellos LJG, Ritter F, Kreutz LC, Quevedo RM, Silva LB, Bedin AC, et al. Whole-body cortisol increases after direct and visual contact with a predator in zebrafish, *Danio rerio*. *Aquaculture* 2007;272:774–8.
- Blank M, Guerim LD, Cordeiro RF, Vianna MR. A one-trial inhibitory avoidance task to zebrafish: rapid acquisition of an NMDA-dependent long-term memory. *Neurobiol Learn Mem.* 2009; 92(4):529-34.
- Levin ED, Bencan Z, Cerutti DT. Anxiolytic effects of nicotine in zebrafish. *Physiol Behav* 2007;90(1):54–8.
- Maximino C, Marques de Brito T, Dias CA, Gouveia A Jr, Morato S. Scototaxis as anxiety-like behavior in fish. *Nat Protoc.* 2010;5(2):209-16. Epub 2010 Jan 14.
- Miller N, Gerlai R. Quantification of shoaling behavior in zebrafish (*Danio rerio*). *Behav Brain Res* 2007;184(2):157–66.
- Piato AL, Capiotti KM, Tamborski AR, Oses JP, Barcellos LJ, Bogo MR, Lara DR, Vianna MR, Bonan CD. Unpredictable chronic stress model in Zebrafish (*Danio rerio*): Behavioral and physiological responses. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 2010; 35 (2):561-67.
- Spence R, Gerlach G, Lawrence C, Smith C. The behaviour and ecology of the zebrafish, *Danio rerio*. *Biol Rev.* 2008; 83: 13–34.