



MODELO EXPERIMENTAL DE ESQUIVA INIBITÓRIA EM PIAU *LEPORINUS PIAU*

Julyana Reis de Carvalho

Liliam Midori Ide

Universidade Federal de São João del - Rei, Departamento de Ciências Naturais, Praça Dom Helvécio, nº 74, Bairro Fábricas, 36.301 - 160, São João del Rei, Brasil.
karvy@mgconecta.com.br

INTRODUÇÃO

A detecção precoce da presença de predadores exerce papel fundamental para a sobrevivência da presa de qualquer espécie animal sendo o início do mecanismo antipredatório na tentativa de se livrar da ameaça. Nessas situações de risco, tanto peixes quanto mamíferos apresentam reações morfofisiológicas semelhantes.

A avaliação de risco de predação relaciona - se ao universo sensorial do indivíduo que habita sistemas aquáticos. As pistas químicas apresentam diluição lenta pelo espaço, não indicando necessariamente presença de perigo no momento em que tais pistas são detectadas, podendo ser indicadores vestigiais de perigo, principalmente para indivíduos com visão pouco desenvolvida ou em ambientes turvos ou de baixa luminosidade. Lesões mecânicas na pele de muitos Ostariophysi liberam na água fatores químicos que foram denominados de substância de alarme (Pfeiffer, 1963) que irão deflagrar reações de alarme, respostas antipredatórias (Chivers & Smith, 1998).

Comumente, os comportamentos associados à reação de alarme são imobilidade (*freezing*), resposta bifásica (*dashing*), esquiva, fuga, uso de abrigo e coesão de cardume. É sugerido que o animal avalie o custo - benefício entre um determinado comportamento, como se alimentar, por exemplo, e o risco de predação.

Para algumas espécies, comportamentos antipredatórios podem decorrer da experiência ontogenética, enquanto outras espécies podem apresentar tais comportamentos mesmo sem terem tido contato prévio com seus predadores naturais.

Conforme proposto por Gouveia Jr. *et al.*, (2006), um modelo experimental pode ser categorizado, de acordo com o tipo de resposta, em atividade espontânea/inata quando a resposta do animal não tem que ser ensinada ou treinada como no modelo de preferência por escuridão (Serra *et al.*, 1999) ou em associativa operante, quando o controle da resposta é posterior à resposta do animal, como no modelo de esquiva inibitória e de esquiva de ambiente claro pelo nado (Medalha *et al.*, 2000).

OBJETIVOS

Avaliar o desempenho de *Leporinus piau* nas tarefas de preferência por ambiente e de esquiva inibitória, tentando avaliar questões de aprendizagem e memória associadas.

MATERIAL E MÉTODOS

Leporinus piau, adquiridos no comércio local, foram mantidos agrupados por 30 dias para aclimação ao laboratório. Posteriormente, foram transferidos para aquários experimentais individuais (15 x 30 x 20cm), por pelo menos 10 dias antes da realização dos testes, uma vez que a dinâmica de grupo exerce grande influência sobre o fluxo de informações dentro de um cardume, principalmente daquelas socialmente aprendidas. Tal fluxo de informações pode influenciar o tempo de resposta de algum indivíduo frente a um estímulo. Os piaus foram mantidos à temperatura de 25 - 27°C em aquários de vidro contendo água dechlorificada, aerada e continuamente filtrada, renovada 3 vezes por semana, e expostos ao ciclo de 12 horas de luz e 12 horas de escuro. Foram diariamente alimentados às 10h30, com 2% de sua biomassa com ração peletizada para peixes.

Para a preparação do extrato de pele de co - específico (EPC), alguns peixes foram sacrificados por demedulação cervical, pesados e medidos. A pele de ambos os lados do corpo foi removida a partir da região do pedúnculo caudal até próximo da região opercular. No total, utilizou - se 25cm² de pele, homogeneizando - a em 50ml de água destilada e, posteriormente, filtrando - a para remover escamas e tecidos. Durante o experimento de esquiva inibitória, cerca de 0,1ml foi adicionado (3s) próximo ao tubo de aeração, através de um tubo de polietileno P - 10 conectado a uma seringa.

Os piaus juvenis (n=45) foram submetidos a tarefas de preferência por ambiente e de esquiva inibitória e monitorados durante 15min (5min de aclimação ao aparato experimental e 10min de teste), utilizando - se filmadora. Em cada tarefa, os peixes foram testados aleatoriamente. Na tarefa

de esquiwa inibitória, cada animal foi testado uma vez por dia, durante três dias consecutivos. Além disso, os peixes foram classificados aleatoriamente em controle e experimental. Posteriormente as informações foram transcritas, quantificadas e analisadas.

Na tarefa de preferência por compartimento, os animais foram colocados em uma cuba de vidro (5 x 9,7 x 14,8cm) encaixada à região central do aquário experimental (15 x 10 x 45cm), este apresentando dois ambientes: um branco e o outro preto. Após a remoção da cuba (após 5min), o tempo de permanência no ambiente preferido e frequência de deslocamento médio dos animais em cada ambiente foram quantificados.

A tarefa de esquiwa inibitória foi realizada em 3 dias consecutivos (para cada grupo) e o estímulo aversivo utilizado foi o estímulo químico EPC. Uma vez estabelecido o compartimento 'preferido' pela espécie (Experimento I), o animal iniciou o teste sendo colocado no compartimento 'aversivo' para impedir a tendência natural à associação do estímulo aversivo ao compartimento 'aversivo', conforme descrito por Serra e colaboradores (1999). Assim, o animal foi colocado na extremidade do compartimento 'aversivo' e após 5min a cuba foi removida, permitindo o acesso ao compartimento 'preferido'. Quando o animal entrou no compartimento 'preferido' o estímulo químico foi introduzido. Foram registradas as latências de entrada no compartimento 'preferido' nos três dias consecutivos (LB1, LB2, LB3) e de retorno ao compartimento 'aversivo' após estimulação química (T1, T2, T3). Informações comparativas quanto ao comportamento dos animais durante a aclimação e após o contato com a água destilada (grupo controle; n=16) ou EPC (grupo experimental; n=19) foram registrados de modo a complementar os dados de latência obtidos. Foram excluídos da análise, os animais que não se deslocaram para o ambiente 'preferido' no primeiro dia de teste de esquiwa inibitória. Vale ressaltar que, para essa tarefa, o ambiente considerado 'aversivo' é aquele que não representa a preferência do peixe (para os peixes que preferem o preto, o compartimento 'aversivo' é o branco, e vice-versa).

Os resultados serão apresentados como média \pm EPM. Testes não-paramétricos foram utilizados, considerando-se que os dados não passaram nos testes de igualdade e/ou normalidade. O Teste de Friedman foi utilizado para comparações múltiplas de dados dependentes (latências nos três dias para grupo controle ou experimental) e complementado pelo Teste de Student - Newman - Keuls. O Teste de Mann - Whitney foi utilizado para comparar dados independentes (latências entre grupos controle e experimental). Um nível de significância de 0,05 foi adotado em todos os testes (Zar, 1996).

RESULTADOS

Durante os 15 minutos de monitoramento, pode-se notar que a maioria dos animais apresentou coloração mais escura, com dorso levemente avermelhado, relevando-se que piaus normalmente apresentam coloração prateada escura em seu dorso, sofrendo gradual clareamento com a aproximação do ventre. Dos 45 animais testados na tarefa de preferência por compartimento (Experimento I), identificamos que 84,4% de

Leporinus piau (n = 38) preferem o ambiente escuro, permanecendo neste por $583,0 \pm 7,6s$, enquanto que os animais com preferência por ambiente claro (15,6%), permaneceram neste por $534,0 \pm 36,4s$ (T=113,0; p=1,102; Teste de Mann - Whitney-relacionado ao tempo de permanência no ambiente).

Imediatamente após a elevação da cuba, 55,6% dos animais deslocaram-se para um dos ambientes e lá permaneceram até o final do registro experimental (durante os 10min de experimentação), ou seja, tais representantes apresentaram preferência imediata por ambientes, sem nem ao menos explorar o outro ambiente. Independente do ambiente de preferência, escuro ou claro, os animais permaneceram no ambiente 'preferido', por 97 e 89% do tempo de experimentação, respectivamente. Peixes com preferência pelo ambiente escuro apresentaram frequência média de deslocamentos pelos compartimentos de $1 \pm 0,5$, enquanto os de preferência pelo ambiente claro apresentaram frequência média de deslocamentos de $4 \pm 1,8$ (T=212; p=0,081; Teste de Mann - Whitney).

Dados obtidos no Experimento II mostram que as latências de deslocamento para o ambiente 'preferido' no segundo e terceiro dias (LB2' e LB3') do grupo experimental (n=19) foram significativamente maiores que no primeiro dia (LB1') ($\chi^2 = 7,243$; p = 0,027; Teste de Friedman, complementado pelo Teste de Student - Newman - Keuls). A latência de saída para o ambiente 'preferido' não foi significativamente diferente nos três dias (LB1, LB2 e LB3) para o grupo controle ($\chi^2=0,0317$; p=0,984). Comparando-se estas latências de saída para o ambiente 'preferido' entre os grupos controle e experimental, têm-se valores iguais nos dois primeiros dias e no terceiro dia a latência do grupo experimental é maior que a do grupo controle (T = 217,0; p = 0,019; Teste de Mann - Whitney). Tal situação é um indicativo provável de que o animal, no terceiro dia de teste, passe a esquivar-se do ambiente 'preferido' em decorrência de avaliação de custo-benefício entre o deslocar-se para um ambiente 'preferido' e correr algum tipo de predação, ou de permanecer por mais tempo no compartimento 'aversivo' inicial, avaliando os possíveis riscos de um possível deslocamento pelo aquário.

No primeiro dia de teste de esquiwa inibitória, observamos que a substância de alarme induz reações comportamentais antipredatórias. Após injeção do EPC (n=19), os animais apresentaram as seguintes reações comportamentais de alarme: (i) resposta bifásica (*dashing*) em 79% dos animais (n=15); (ii) nado em zigue-zague em sentido contrário ao de maior concentração de EPC em 21% (n=4). Já em relação ao grupo controle (n=16), identificamos que: (i) 81,25% dos animais apresentaram lenta exploração do ambiente (n=13); (ii) 12,5% apresentaram nado em zigue-zague (n=2); 6,25% nado circular entre os dois compartimentos do aquário experimental (n=1). De acordo com o Teste de Friedman, não identificamos diferenças estatisticamente significativas na latência de fuga para o compartimento 'aversivo' após a introdução de estímulo químico, nos três dias, para os grupos controle ($X^2=2,0$; p=0,368;) e experimental ($X^2=3,027$; p=0,220), mas animais estimulados com EPC apresentaram latência de fuga menor ao do grupo controle no terceiro dia de teste (T=357,0; p=0,023;

Teste de Mann - Whitney).

Demonstramos no presente estudo que *Leporinus piau* apresenta preferência por ambiente escuro, o que foi evidenciado em *Danio rerio* (Serra *et al.*, 1999) e *Carassius auratus* (Gouveia Jr. *et al.*, 2005) submetidos a delineamentos experimentais semelhantes. Além de representantes teleosteos, ratos também apresentam preferência por ambiente escuro (Guillot & Chapoutier, 1996). A camuflagem, a preferência por ambiente escuro e/ou enriquecido garantiria(m) maior proteção antipredatória.

Como a informação visual é conduzida rapidamente no espaço e indica risco imediato, os organismos que usam primariamente informações visuais precisam deixar a segurança do abrigo para conseguir informações sobre a presença ou ausência de predadores nas proximidades, correndo risco de serem capturados. Por outro lado, pistas químicas são conduzidas lentamente no espaço e sugerem que o risco de predação existiu ou existe em algum lugar, não indicando necessariamente a presença de perigo no momento em que ela é detectada. A sensibilidade a informações químicas pode ser mais vantajosa em certas condições ambientais, como quando a água está turva ou em um habitat com vegetação densa, porque os sinais químicos permitem que a presa continue em uma situação segura ao mesmo tempo em que adquire informações acerca do risco de predação.

Göz (*apud* Chivers & Smith, 1998) foi o primeiro a mostrar que a substância de alarme pode ser usada para condicionar uma reação de alarme a um estímulo previamente neutro, servindo de base para diversos trabalhos. Demonstrou - se que *Pimephales promelas* pode ser condicionado a reconhecer um estímulo luminoso ou ambiente potencialmente perigoso, quando esses estímulos neutros são previamente associados à substância de alarme de co - específico.

Na tarefa de esquiva inibitória, demonstramos o condicionamento do ambiente 'preferido' à substância de alarme, pelo aumento na latência de entrada no ambiente 'preferido' no 2º e 3º dias de teste e, redução na latência de saída do ambiente 'preferido' após introdução da substância de alarme, no 3º dia. A constatação de que a substância de alarme pode condicionar uma reação de alarme ao ambiente 'preferido' aumenta o conhecimento acerca dos mecanismos através dos

quais a substância de alarme pode beneficiar os receptores do sinal, ao induzir comportamentos de esquiva e/ou fuga do ambiente agora 'ameaçador'.

CONCLUSÃO

Demonstramos que *Leporinus piau* apresenta preferência natural por ambiente escuro e associa estímulo químico de alarme ao ambiente 'preferido', mediante comportamento de esquiva inibitória (evitação) e esquiva ativa (fuga).

Agradeço ao PIBIC/FAPEMIG pelo apoio ao desenvolvimento do projeto.

REFERÊNCIAS

- Chivers, D. P. & Smith, R. J. F. 1998. Chemical alarm signalling in aquatic predator - prey systems: a review and prospectus. *Écoscience*, **5**: 338 - 352.
- Gouveia Jr., A.; Maximino, C.; Brito, T. M. 2006. Comportamento de peixes: vantagens e utilidades nas neurociências. *Faculdade de Ciências/UNESP*.
- Gouveia Jr., A.; Zampieri, R. A.; Ramos, L. A.; Silva, E. F.; Mattioli, R.; Morato, S. 2005. Preference of goldfish (*Carassius auratus*) for dark places. *Revista de Etologia*, **7**: 63 - 65.
- Guillot, P. V. & Chapoutier, G. 1996. Intermale aggression and dark/light preference in ten inbred mouse strains. *Behavioral Brain Research*, **77**: 211 - 213.
- Medalha, C. C.; Coelho, J. L.; Mattioli, R. 2000. Analysis of the role of histamine in inhibitory avoidance in goldfish. *Progress in Neuropsychopharmacology Biological Psychiatry*, **24**: 295 - 305.
- Pfeiffer, W. 1963. Alarm substance. *Experientia*, **19**: 113 - 123.
- Serra, E. L.; Medalha, C. C.; Mattioli, R. 1999. Natural preference of zebrafish (*Danio rerio*) for a dark environment. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, **32**: 1551 - 1553.
- Zar, J. H. 1996. Biostatistical analysis, 3. ed. New Jersey, Prentice - Hall.