

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE ECOLOGIA E ZOOLOGIA
LABORATÓRIO DE BIOLOGIA DE TELEÓSTEOS E
ELASMOBRÂNQUIOS**

Nícolás da Rosa e Silva

**AVALIAÇÃO DA APRENDIZAGEM COMO INDICADOR DE
BEM-ESTAR EM *DANIO RERIO***

Trabalho de Conclusão de Curso
submetido ao Centro de Ciências
Biológicas da Universidade Federal de
Santa Catarina para a obtenção do Grau de
Bacharel em Ciências Biológicas.

Orientador Prof. Dr. Renato Hajenius Aché de Freitas

Florianópolis, 24 de junho de 2016

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Silva, Nicolas
AVALIAÇÃO DA APRENDIZAGEM COMO INDICADOR DE BEM-ESTAR
EM DANIO RERIO / Nicolas Silva ; orientador, Renato
Hajenius Aché de Freitas - Florianópolis, SC, 2016.
30 p.

Trabalho de Conclusão de Curso (graduação) -
Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências
Biológicas. Graduação em Ciências Biológicas.

Inclui referências

1. Ciências Biológicas. 2. Aprendizagem. 3. Motivação. 4.
Comportamento. 5. Danio rerio. I. Hajenius Aché de
Freitas, Renato . II. Universidade Federal de Santa
Catarina. Graduação em Ciências Biológicas. III. Título.



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
COORDENADORIA DO CURSO DE GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
Telefone: (0xx48) 3721-9235, Fax: 3721-9672 – e-mail: cecb@ccb.ufsc.br; <http://cienciasbiologicas.grad.ufsc.br>

BIO7016 – Trabalho de Conclusão de Curso II
ATA DE APRESENTAÇÃO DO TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO

Semestre 01/2016

1. Aluno

Aluna: Nicolas da Rosa e Silva

Número de matrícula: 11100545

2. Trabalho

Título do Trabalho: AVALIAÇÃO DA APRENDIZAGEM COMO INDICADOR DE BEM-ESTAR EM PEIXES:
UM ESTUDO DE CASO EM DANIO RERIO

Orientador(a): Prof. Dr. Renato Hajenius Aché de Freitas

Co-Orientador(a): _____

Local de apresentação do trabalho: Sala de Audiovisual do Depto de Ecologia e Zoologia (ECZ) do Centro de Ciências Biológicas da UFSC

3. Avaliação pela banca examinadora

Presidente: Prof. Dr. Renato Hajenius Aché de Freitas Nota: 10

Membro Titular: Dr. Luciano Augusto Weiss Nota: 10

Membro Titular: Dra. Ana Maria Rubini Liedke Nota: 9,5

Membro Suplente: Dra. Luciana Aparecida Honorato Nota: 10

Média Final: 10 (Dez)

Renato Hajenius Aché de Freitas

PRESIDENTE DA BANCA

Luciano Weiss

MEMBRO TITULAR

Ana Maria Rubini Liedke

MEMBRO TITULAR

Luciana Honorato

MEMBRO SUPLENTE

Florianópolis, 04 de julho de 2016.

AGRADECIMENTOS

Muitas pessoas passam pelas nossas vidas e contribuem para nossa trajetória, se fosse possível agradeceria a todas elas, mas provavelmente não haveriam páginas o suficiente neste Trabalho de Conclusão de Curso. Dessa forma agradeço aqui as pessoas que foram fundamentais para a realização deste trabalho.

Primeiramente gostaria de agradecer ao meu orientador, Renato Hajenius Aché de Freitas, que me ofereceu o desenvolvimento do projeto e a orientação fundamental para que a ideia saísse do papel e se transformasse no presente trabalho, bem como Ana Maria Rubini Liedke e Luciano Augusto Weiss, que foram os avaliadores do projeto.

Tenho muito a agradecer também a Mayra Alexandrino, por meio de suas aulas de interpretação e discussão textual tive o suporte fundamental para que fosse capaz de revisar a bibliografia em língua inglesa, que foi utilizada para nortear os testes e para a redação do trabalho.

Agradecimentos também não faltam a todos os colegas de laboratório, em especial Artur Espindola, meu amigo e colega de laboratório que ajudou a cuidar dos animais testados e a realizar os testes em momentos que eu não podia, sendo fundamental para a obtenção do n amostral necessário e à amiga Franscini Rubi, por ouvir os inúmeros desabafos quando os experimentos não davam certo.

Muito importante também foi Maria José Hötze, professora responsável pela disciplina Ética e Bem-estar Animal, suas aulas e material oferecido na disciplina foram fundamentais na elaboração da introdução do trabalho.

Também contribuíram muito, Aline Guimarães Pereira que deu dicas fundamentais em relação à espécie modelo utilizada e auxiliou na obtenção dos animais, bem como Guilherme Assis que forneceu os animais utilizados e Luiz Antonio de Figueiredo que forneceu os materiais utilizados no aquário e orientou sobre a utilização destes.

Agradecimentos não poderiam também faltar a meu pai, Valter João da Silva, a minha mãe, Rosiane da Rosa e Silva, e minha irmã, Bruna da Rosa e Silva, que também contribuíram, seja me motivando nos momentos

diffíceis, auxiliando a encontrar os materiais necessários para a realização do projeto ou dando ideias pra solucionar problemas que encontrei no caminho. Mas, acima de tudo agradeço a meu pai, Valter João da Silva, que participou ativamente na redação deste e de outros trabalhos, me ajudando á corrigir a parte gramatical e dando sua opinião em relação ao quão claro o texto estava, tenho muito a agradecer a você, pois sem você este TCC não seria o que é hoje.

Não poderia, também, deixar de mencionar meus queridos amigos Andressa Lima, Lua Lobo, Rodrigo Chagas, Gabriel da Silva Pescador e Guilherme Burg Mayer. Que apesar das inúmeras piadas em relação ao trabalho, sempre estiveram presentes auxiliando na montagem do aquário labirinto, fizeram companhia enquanto estava no laboratório realizando os demorados testes e me descontraíam nos momentos tensos, os churrascos, as idas ao bar e as rodas de violão sempre eram bem-vindas, e gostaria de ter participado mais delas se tivesse mais tempo.

Agradeço também a UFSC, que embora as inúmeras greves, sejam elas do RU ou da BU ou da instituição como um todo, me deu a oportunidade de estudar como aluno de graduação e forneceu as instalações as quais foram utilizadas para a realização deste trabalho.

Por último e não menos importante agradeço ao meu computador que embora estivesse em estado precário, travando e com problema na bateria, não entregou os pontos até que as últimas linhas fossem escritas.

RESUMO

Embora não haja valorização de questões ligadas ao bem-estar de peixes por nossa sociedade, atualmente existe um considerável corpo de evidências que apontam para a senciência desses animais. No planejamento de ambientes para esses animais é importante a utilização de condições que lhes sejam relevantes, por meio de metodologias que indiquem o quão significativa a condição é em relação as demais. Nesse sentido, alguns autores sugerem medir a força despendida pelo animal para conquistar um recurso como um indicador de intensidade de preferência. Seguindo essa mesma linha de raciocínio, a velocidade de aprendizagem de um peixe na obtenção de um recurso também pode ser um bom indicador, sendo este o objetivo do presente estudo. Assim, quanto mais rápida a aprendizagem do peixe mais importante seria uma condição para seu bem-estar. Para testar essa ideia, grupos de três peixes-paulistinha, *Danio rerio*, foram testados em um aquário labirinto, que na área central apresenta quatro corredores, dois para condição preferencial, estando um deles marcado e outro bloqueado, um para uma condição neutra e outro para uma aversiva. Três tratamentos (n=5) foram realizados: (i) enriquecido com abrigo, fundo preto e vegetação; (ii) parcialmente enriquecido: tinha somente fundo preto; (iii) controle: não apresentava enriquecimento. Cada grupo de *D. rerio* foi testado por dez dias seguidos, uma vez ao dia, aleatorizando a posição de cada condição. O comportamento dos animais era gravado, sendo contabilizados os acessos à condição preferencial, por meio de variável relativa ao tempo e variáveis relativas aos acessos dos corredores. Foi considerada somente a média dos dados do primeiro e segundo peixe. Foi observado que no tratamento enriquecido houve sedimentação da aprendizagem no 4^a dia de teste, não havendo aprendizagem para os outros tratamentos, fator relacionado às funções que a condição preferencial oferece. O presente trabalho indica que o processo de aprendizagem para obter uma dada condição depende do conforto que esta proporciona a *D. rerio*, sendo sugerida a utilização desta metodologia para outras espécies de peixes.

Palavras-chave: Preferência; comportamento; enriquecimento ambiental; motivação; senciência.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1:** Peixe-paulistinha (*Danio rerio*). Fonte: <http://apprendre-aquariophilie.fr/danio-rerio/>.....4
- Figura 2:** Imagem esquemática da vista de cima do aquário labirinto representando a parte pré-teste (em preto) e a parte teste (restante). Corredores estão representados por cinza-claro, anteparo divisor removível para manuseio dos peixes da parte pré-teste para a parte teste em cinza escuro e linha tracejada indicando anteparo transparente.....8
- Figura 3:** Configuração do aquário labirinto vistas de cima para o tratamento enriquecido (A), parcialmente enriquecido (B) e controle (C)..11
- Figura 4:** Visão lateral das condições preferenciais presentes no tratamento enriquecido (A), parcialmente enriquecido (B) e controle (C). Paredes internas brancas e cobertura das paredes externas parcialmente removidas para fins explicativos.....12
- Figura 5:** Figura esquemática representando transferência dos animais para a parte pré-teste e aclimatação por 24h (A) e consecutivas exposições do animal a marca vermelha e a condição preferencial (B).....13
- Figura 6:** Representação esquemática das etapas envolvidas no procedimento de exposição. A) Condução dos peixes para AC, a qual se apresenta previamente bloqueada por dois anteparos transparentes, restringindo os animais a essa área. B) Remoção dos anteparos transparentes que bloqueavam AC, após 3 min, permitindo assim que os animais explorassem a parte teste. C) Condução dos animais de volta a parte pré-teste, 180 minutos após a remoção dos anteparos que bloqueavam AC, alimentação dos animais e aleatorização das posições de AM, AB, AN e AV para os dias seguintes de exposição.....15

Figura 7: Tempo médio (\pm EP) para atingir AM. NS indica que não há diferenças nos valores de tempo entre os dias dentro de um grupo, * indica grupos com diferenças, números em negrito indicam a quantidade de diferenças de cada dia de um grupo em relação ao demais dias do mesmo e linha tracejada cortando o eixo horizontal indica o começo dos últimos sete dias de exposição. Diferenças estatísticas representadas pelos números em negrito foram consideradas somente para os sete últimos dias de exposição.....18

Figura 8: Erro padrão do tempo médio para atingir AM em cada tratamento ao longo dos dez dias de exposição.....19

Figura 9: Número médio de acessos totais aos corredores até atingir AM (\pm EP). NS indica que não houve diferenças nos valores de tempo entre os dias dentro de um tratamento, enquanto que * indica diferença. Os números em negrito indicam a quantidade de diferenças daquele dia em relação aos demais dias deste tratamento.....20

Figura 10: Número médio de acesso aos corredores até atingir AM, sem considerar repetições (\pm EP). NS indica que não houve diferenças nos valores de tempo entre os dias dentro de um tratamento, enquanto que * indica diferença. Os números em negrito indicam a quantidade de diferenças daquele dia em relação aos demais dias deste tratamento.....21

Figura 11: Número médio de repetição no acesso aos corredores até atingir AM (\pm EP). NS indica que não houve diferenças nos valores de tempo entre os dias dentro de um tratamento, enquanto que * indica diferença. Os números em negrito indicam a quantidade de diferenças daquele dia em relação aos demais dias deste tratamento.....21

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
1.1 BEM-ESTAR ANIMAL	1
1.2 BEM-ESTAR EM PEIXES	2
1.3 <i>DANIO RERIO</i> COMO ANIMAL MODELO E QUESTÕES LIGADAS AO BEM-ESTAR	3
1.4 AVALIANDO A PREFERÊNCIA E A MOTIVAÇÃO COMO UMA FORMA DE AVALIAR O BEM-ESTAR DE PEIXES	5
2. OBJETIVO GERAL	7
2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	7
3. MATERIAIS E MÉTODOS	7
3.1 ANIMAL	7
3.2 AQUÁRIO TESTE	8
3.3 EXPERIMENTO	9
3.4 PROCEDIMENTO DE EXPOSIÇÃO DURANTE O TESTE DE APRENDIZAGEM.....	14
3.5 ANÁLISE DAS GRAVAÇÕES	16
3.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA	16
3.7 ÉTICA.....	17
4. RESULTADOS.....	17
4.1 TEMPO DESPENDIDO PARA ATINGIR AM.....	17
4.2 VARIÁVEIS RELATIVAS AO ACESSO DOS CORREDORES 19	
5. DISCUSSÃO	22
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	25

1. INTRODUÇÃO

1.1 BEM-ESTAR ANIMAL

O bem-estar em seu contexto científico aplicado aos animais não humanos pode ser interpretado como um estado de sensações positivas (VOLPATO *et al.*, 2007) que um animal experiencia na interação deste com o meio em que está inserido (DUNCAN, 2002).

Neste contexto a senciência, capacidade básica de percepção sensorial e de experienciar sentimentos bons ou ruins a partir da interpretação dessas percepções (DAWKINS, 2006; DUNCAN, 2006; PRADA, 2008) tem grande importância para o estudo de bem-estar de animais não humanos (DUNCAN, 1996 *apud* DUNCAN, 2006), sendo esta capacidade o alicerce da preocupação com o bem-estar dos animais considerados sencientes (DAWKINS, 2006).

A preocupação com o bem-estar de animais não humanos ou reconhecimento da senciência nesses organismos, embora visível atualmente, não se restringe ao momento presente (HÖTZEL, MACHADO FILHO, 2004; DUNCAN, 2006; ROLLIN, 2011). Historicamente é possível observar o reconhecimento dessas questões por textos religiosos e trabalhos de pensadores e artistas. Nas escrituras judaicas há claras passagens que reconhecem o sofrimento em animais não humanos, bem como sua relevância moral, aconselhando que esse seja evitado. No cristianismo, embora seja negada a existência de alma nesses, a crueldade em relação a eles também é condenada (ROLLIN, 2011). Durante a Renascença, trabalhos de pensadores e artistas demonstravam grande aceitação da senciência em animais não humanos (DUNCAN, 2006).

Embora ilustres pensadores/filósofos, dentre eles Descartes, tenham cultivado linhas de pensamento opostas à presença de senciência em animais não humanos, durante o iluminismo observa-se o questionamento dessas ideias (DUNCAN, 2006). Já no século XIX, é visível a aceitação da senciência nesses organismos por parte do meio científico e do senso comum (DUNCAN, 2006).

No entanto, durante o século XX, esse panorama favorável parece ter mudado com a ascensão de uma corrente da psicologia denominada

Behaviorismo, a qual propunha o abandono de termos subjetivos como sensações, percepções, sentimentos e pensamento (DUNCAN, 2006). A influência que essa corrente de pensamento teve sobre a ciência comportamental interferiu no reconhecimento da sciência durante os primeiros 70 anos do século passado, contribuindo para uma concepção de que os animais eram movidos unicamente por reações estímulo-resposta (DUNCAN, 2006; VOLPATO, 2007).

O interesse pela sciência, contudo, foi recuperado após a publicação do livro “Animal Machine” de Ruth Harrison em 1964, o qual apresentava uma série de denúncias ao tratamento destinado aos animais no sistema de produção, levando a um conjunto de investigações sobre bem-estar animal. Em função disso, a sciência voltou gradativamente a ter espaço no meio científico, tendo considerável visibilidade atualmente (DUNCAN, 2006; HOTZEL *et al.*, 2014).

Por fim, além de se observar um reconhecimento das questões referentes ao bem-estar animal no campo científico atual, também é visível a preocupação popular em relação ao tema, havendo crescente preocupação no que diz respeito aos animais de estimação, empregados na pecuária ou em pesquisa, tanto em países desenvolvidos, bem como no Brasil (HÖTZEL, MACHADO FILHO, 2004).

1.2 BEM-ESTAR EM PEIXES

Quando se considera o bem-estar de peixes, no entanto, o mesmo grau de relevância ética destinado por nossa sociedade a outros animais, parece não ser direcionado a esse grupo animal. Embora sejam os animais mais consumidos pelos seres humanos, os peixes ainda são considerados por muitas pessoas como criaturas burras e sem mente (DRIESSEN, 2013). Servem somente como uma fonte de alimento (HANLON, 2010) e raramente existem discussões a respeito do sofrimento desses organismos ao serem utilizados em pesquisas científicas (DRIESSEN, 2013).

A dificuldade de se estabelecer relações significativas e incapacidade de comunicação entre humanos e peixes parece ter grande peso no cenário de falta de consideração pelo bem-estar desses animais. O distanciamento físico e taxonômico; a diferença entre o meio habitado; e de formas de

comunicação e expressão, normalmente não perceptíveis, parecem dificultar o estabelecimento de interações interespecíficas entre peixes e humanos que levem à compreensão de seus comportamentos e necessidades (DRIESSEN, 2013). Além disso, excluindo-se o aquarismo, geralmente a interação do público com esses animais, enquanto vivos, se dá quando são capturados, se debatendo fora de seu ambiente natural, o que dificulta ainda mais o reconhecimento desses animais como sencientes (BROWN *et al.*, 2006a).

No meio científico, durante grande parte de sua história, uma imagem não favorável desses animais também era cultivada, sendo considerados como autômatos, movidos meramente por mecanismos fixos de estímulo-resposta (BROWN *et al.*, 2006b). Esse grupo animal só passa a ser abordado em investigações dessa natureza na década de 90 (VOLPATO, 2007).

Atualmente, no entanto, existe considerável quantidade de evidências que suportam a existência de senciência nesses animais (e.g. SNEDDON, 2003; PORTAVELLA *et al.*, 2004; DUNLOP, LAMING, 2005; SOARES *et al.*, 2011) e, embora haja questionamentos a respeito da demonstração de senciência pelo método científico, a ausência da mesma também não pode ser provada (CHANDROO *et al.*, 2004; DAWKINS, 2006; VOLPATO *et al.*, 2007; VOLPATO, 2007). Esses fatores contribuem para a defesa de uma abordagem de precaução, na qual os peixes devem ser considerados sencientes (VOLPATO *et al.*, 2007). Além disso, a grande utilização desses animais como alimento, como organismos modelos em pesquisas científicas e o potencial nocivo dessas atividades tornam ainda mais relevantes as preocupações ligadas ao bem-estar de peixes (HUNTINGFORD *et al.*, 2006; VOLPATO *et al.*, 2007; TOGNOLI *et al.*, 2012; DRIESSEN, 2013).

1.3 *DANIO RERIO* COMO ANIMAL MODELO E QUESTÕES LIGADAS AO BEM-ESTAR

Ao se considerar a crescente utilização de peixes como animais modelos de pesquisa é relevante ressaltar o papel do peixe-paulistinha (*Danio rerio*) (Figura 1) nesse cenário (TOGNOLI *et al.*, 2012), animal que também constituiu o modelo do presente estudo.



Figura 1: Peixe-paulistinha (*Danio rerio*). Fonte: <http://apprendre-aquariophilie.fr/danio-rerio/>

Nas últimas duas décadas, este membro da Família Cyprinidae de pequeno porte e listrado tem assumido a posição de um dos principais modelos de vertebrado em pesquisa de diversas áreas (TOGNOLI *et al.*, 2012; DAS, 2013; AL-JUBOURI *et al.*, 2014; LEARMONTH, CARVALHO, 2015). Algumas de suas características, como fácil manutenção, reprodução, desenvolvimento e relevante proximidade genômica com o ser humano contribuem para sua utilização em pesquisas laboratoriais em áreas que envolvem biologia, biomedicina e farmacologia (SPENCE *et al.*, 2007a; READMAN *et al.*, 2013; AL-JUBOURI *et al.*, 2014; SCHROEDER *et al.*, 2014; LEARMONTH, CARVALHO, 2015).

Embora essa espécie tenha sido extremamente estudada laboratorialmente, há pouco tempo havia grande déficit de informações a respeito da ecologia desse animal, o que levou a realização de estudos a campo que abordassem esse tema a fim de revelar aspectos ecológicos, os quais também são relevantes à experimentação (e.g. MCCLURE *et al.*, 2006; SPENCE *et al.*, 2006; ENGESZER *et al.*, 2007; SPENCE *et al.*, 2007a; 2007b). Em virtude disso, atualmente sabe-se que a área de ocorrência natural do paulistinha compreende o entorno das bacias do Ganges e Brahmaputra no nordeste da Índia, em Bangladesh e no Nepal (ENGESZER *et al.*, 2007; SPENCE *et al.*, 2007a), ocorrendo em corpos rasos de água doce, geralmente lânticos, contendo silte e vegetação aquática, nos quais desempenham hábito onívoro (MCCLURE *et al.*, 2006; SPENCE *et al.*, 2006; ENGESZER *et al.*, 2007; SPENCE *et al.*, 2007a; 2007b).

Outro tema de interesse relacionado a *D. rerio*, e que vem surgindo recentemente, diz respeito ao seu bem-estar como organismo produzido e utilizado intensivamente para pesquisas científicas. Condições ideais de criação, manutenção, métodos de anestesia e eutanásia vem sendo abordados em pesquisas mais voltadas à ética na utilização desse animal. Quanto à criação e manutenção é possível observar a abordagem de temas como impactos de interações de dominância e submissão sobre a saúde desse organismo (FILBY *et al.*, 2010); resposta de stress a condições comumente encontradas na criação e manutenção (PAVLIDIS *et al.*, 2013); e definição de níveis seguros de nitrato, enfocando sistemas de aquicultura com recirculação de água (LEARMONTH, CARVALHO, 2015). Em relação aos métodos de anestesia e eutanásia, é possível observar a abordagem de temas como avaliação de métodos de eutanásia (WILSON *et al.*, 2009) e a utilização e aversão a anestésicos usados em procedimentos de anestesia ou eutanásia (READMAN *et al.*, 2013; WONG *et al.*, 2014).

Também se enquadram nesse cenário ético investigações em relação ao enriquecimento ambiental, aumento da complexidade ambiental a fim de promover bem-estar para animais criados em ambientes pobres em estímulos (NÄSLUND, JOHNSON, 2014), para *D. rerio*, considerando que geralmente é mantido em tanques com nada além do meio líquido (KISTLER *et al.*, 2011; WILKES *et al.*, 2012; SCHROEDER *et al.*, 2014).

1.4 AVALIANDO A PREFERÊNCIA E A MOTIVAÇÃO COMO UMA FORMA DE AVALIAR O BEM-ESTAR DE PEIXES

Ao se considerar elementos importantes ao bem estar de peixes e no planejamento de ambientes em que são mantidos é relevante utilizar-se de abordagens que avaliem a preferência desses animais a fim de identificar elementos significativos segundo a perspectiva dos próprios animais (VOLPATO, 2009; MARTINS *et al.*, 2011; BATZINA *et al.*, 2014; NÄSLUND, JOHNSON, 2014).

O teste de preferência consiste na análise da escolha de um dado animal por diferentes condições, quando essas são disponibilizadas ao mesmo tempo para esse (DUNCAN, 2006; VOLPATO *et al.*, 2007; GALHARDO *et al.*, 2009; FREITAS, 2011). Esta metodologia já foi

utilizada em peixes e parte do pressuposto de que peixes, como criaturas sencientes, buscam condições que lhes proporcionem conforto e evitam condições que lhes causem desconforto (DUNCAN, 2006; VOLPATO *et al.*, 2007). A partir da análise dessas escolhas é possível identificar condições como intensidade luminosa (VOLPATO *et al.*, 2007; FREITAS, 2011), coloração ambiental (VOLPATO *et al.*, 2007; FREITAS, 2011), tipo de substrato (FREITAS, VOLPATO, 2012; BATZINA *et al.*, 2014), método de alimentação e profundidade da água (VOLPATO *et al.*, 2007) que correspondam as preferências da espécie de peixe analisada.

A identificação das condições preferidas é importante e se demonstra relevante no planejamento de ambientes para peixes mantidos em cativeiro. Entretanto, igualmente importante e complementar a identificação de preferências é a determinação da intensidade da preferência, ou seja, a motivação do animal para obter condições que lhe propiciem bem-estar (DUNCAN, 2006; VOLPATO, 2009; FREITAS, 2011; BATZINA *et al.*, 2014; NÄSLUND, JOHNSON, 2014).

Segundo essa linha, o esforço em peixes foi utilizado para indicar o quanto uma condição é preferida somente em dois trabalhos (e.g. GALHARDO *et al.*, 2011; FREITAS, 2011), para tanto foi medido o esforço despendido pelo animal para obter uma condição preferida quando o acesso a esta se encontrava bloqueada. Pode-se supor que o nível de interesse de um animal por uma dada condição seja proporcional ao conforto obtido na presença dela (FREITAS, 2011), dessa forma o esforço despendido pelo animal para obter uma condição é proporcional ao interesse por essa (DUNCAN, 2006; VOLPATO, 2009; FREITAS, 2011).

Abordando essa mesma linha de pensamento, é possível imaginar que o processo de aprendizagem para a obtenção de uma condição, assim como o esforço, também possa servir como um indicador do interesse por essa condição, proposta já sugerida por Volpato (2009), mas não testada empiricamente. Portanto, propõe-se que quanto mais rápida a aprendizagem de um peixe para obter uma condição, mais importante esta seja para seu bem-estar.

A relevância dessa proposta se torna ainda mais acentuada ao se considerar dois fatores, primeiramente que a aprendizagem desempenha um

papel fundamental na ecologia dos peixes, sendo crucial para diferentes comportamentos desempenhados por estes organismos, como forrageio, defesa contra predadores, escolha de parceiros e agressão, conferindo extremo valor adaptativo a esses animais (BROWN *et al.*, 2006b). E as capacidades de memória e aprendizagem dos peixes contribuem para uma proposta de utilização desses animais como modelo para compreender fenômenos básicos do processo de aprendizagem (NORTON, BALLY-CUIF, 2010; BLASER, VIRA, 2014).

2. OBJETIVO GERAL

Avaliar se a aprendizagem adquirida por *D. rerio* para conseguir uma determinada condição é um indicador proporcional à relevância desta condição para esse animal, podendo ser um indicador de bem-estar.

2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Gerar um aparato e delineamento experimental capaz de promover aprendizagem em *D. rerio*;
- Escolher parâmetros a serem analisados que demonstrem o processo de aprendizagem;
- Testar a validade do modelo para promover aprendizagem;
- Avaliar se há diferença na aprendizagem da espécie modelo para a obtenção de diferentes recursos.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 ANIMAL

Foram utilizados adultos de *D. rerio* de ambos os sexos, provenientes de uma fazenda de piscicultura ornamental de Antônio Carlos, Santa Catarina. Após serem adquiridos, os animais permaneciam por pelo menos 10 dias antes dos testes em um tanque de manutenção de 40 L com temperatura em torno 24°C e pH na faixa de 6,8. Esses eram mantidos em quantidades não maiores que 20 indivíduos, havendo reabastecimento da população estoque periodicamente com peixes provenientes do produtor à medida que eram utilizados nos testes.

3.2 AQUÁRIO TESTE

O aquário utilizado nos testes consistiu de um aquário labirinto, baseado em Spence *et al.* (2011) e Grassie *et al.* (2013), sendo composto por duas partes, uma pré-teste e uma teste, as quais eram separadas por um anteparo removível branco e com perfurações para possibilitar a circulação de água (Figura 2).

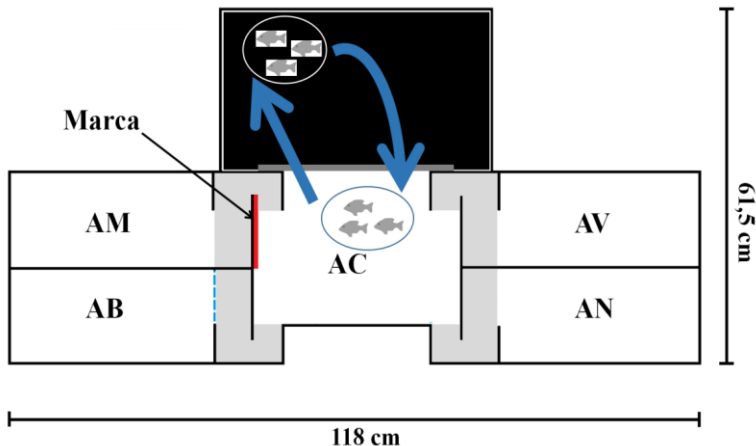


Figura 2: Imagem esquemática da vista de cima do aquário labirinto representando a parte pré-teste (em preto) e a parte teste (restante). Corredores estão representados por cinza-claro, anteparo divisor removível para manuseio dos peixes da parte pré-teste para a parte teste em cinza escuro e linha tracejada indicando anteparo transparente.

A parte pré-teste era destinada a aclimação inicial no aquário labirinto e como área onde os animais eram mantidos e alimentados após os testes realizados a cada dia, contendo assim um ponto de aeração. Além disso, esta apresentava paredes recobertas externamente por papel pardo e fundo recoberto externamente por cobertura preta, a fim de fornecer um ambiente mais favorável ao bem-estar dos animais testados, por meio da coloração preta (MAXIMINO *et al.*, 2007; MAXIMINO *et al.*, 2010; BLASER, ROSEMBERG, 2012; PAVLIDIS *et al.*, 2013). Estas características tinham a finalidade de compensar qualquer estresse gerado na aclimação ou ao longo do teste. Desta maneira os peixes podiam ser deslocados para a parte teste sem terem que ser capturados e expostos ao ar, estressor este severo para peixes (FREITAS *et al.*, 2014).

A parte do aquário labirinto destinada aos testes era subdividida em cinco áreas, todas apresentando fundo de cor branca. Havia dessa forma uma área central (AC), que apresentava paredes brancas, exceto por duas paredes cinza, adjacentes às entradas dos corredores. Também haviam outras quatro áreas (AM, AB, AN e AV) de igual medida entre si (17,5 cm X 35,5 cm) conectadas à AC por meio dos corredores, os quais apresentavam paredes externas brancas e internas cinzas. Todas as quatro áreas conectadas à AC eram isoladas visualmente uma das outras, apresentando paredes internas opacas e brancas e um ponto de aeração cada. Dentre estas áreas somente três apresentavam as paredes externas recobertas por papel pardo, a fim de tornar o ambiente menos claro. Dessa forma, havia uma área (AM) contendo uma das condições testadas sinalizada por uma marca de coloração vermelha, cor de marca já utilizada e recomendada para testes relacionados à aprendizagem, por não ser aversiva (SPENCE *et al.*, 2011; AVDESH *et al.*, 2012); uma área (AB) contendo a mesma condição, mas com sua entrada bloqueada por anteparo transparente; e uma área (AN) com o fundo branco, representando um ambiente pouco aversivo ou neutro. Somente uma das quatro áreas conectadas à AC apresentava paredes externas brancas, compondo uma área completamente branca (AV), constituindo um ambiente aversivo para o animal (MAXIMINO *et al.*, 2007; MAXIMINO *et al.*, 2010; BLASER, ROSEMBERG, 2012; PAVLIDIS *et al.*, 2013).

Durante a realização dos experimentos o aquário labirinto era mantido com uma coluna de água de 13,5 cm, com igual intensidade nos pontos de aeração, com temperatura entre 24-25°C e pH de 6,6-6,8.

3.3 EXPERIMENTO

Os experimentos ocorreram no período de maio de 2015 a maio de 2016, durante o qual três grupos de *D. rerio* tiveram sua aprendizagem avaliada separadamente no aquário labirinto para a obtenção de três condições, constituindo assim três tratamentos com cinco réplicas cada: tratamento enriquecido, parcialmente enriquecido e controle. Os pesos dos animais foram significativamente iguais entre os tratamentos (ANOVA de via única; $F = 0,05$ e $p = 0,96$) sendo $0,779 \pm 0,319$ g para enriquecido; $0,679 \pm 0,436$ para parcialmente enriquecido e $0,677 \pm 0,391$ para controle.

No tratamento enriquecido (Figura 3.A) foram avaliadas as seguintes condições preferenciais combinadas: fundo preto (MAXIMINO *et al.*, 2007; MAXIMINO *et al.*, 2010; BLASER, ROSEMBERG, 2012;

PAVLIDIS *et al.*, 2013), abrigo (KISTLER *et al.*, 2011) e vegetação (KISTLER *et al.*, 2011; SCHROEDER *et al.*, 2014) (Figura 4.A). Estas condições eram representadas por uma placa de PVC preta comum de filtro biológico para aquário, medindo 27,5 cm X 14 cm, sobre a qual eram posicionados dois canos de PVC de 6 cm de diâmetro e 12 cm de comprimento e oito ramos da macrófita aquática *Elodea canadensis*, quatro com comprimento de 12 cm, que permaneciam submersos, e quatro com 20 cm, os quais tinham parte flutuando na parte superior da coluna da água, oferecendo cobertura aos animais. Assim era formado um conjunto o qual era posicionado no fundo de AM e AB (Figura 4.A).

Já no tratamento parcialmente enriquecido (Figura 3.B) foi testada a condição fundo preto somente, representada pela placa preta de 27,5 cm X 14 cm posicionada também sobre o fundo de AM e AB (Figura 4.B).

O tratamento controle (Figura 3.C), no entanto, não apresentava nenhuma condição posicionada em AM e AB (Figura 4.C), desempenhando assim o papel de avaliar as variáveis escolhidas como indicadoras de aprendizagem e o comportamento dos animais no aparato experimental.

Antes da realização de cada teste de aprendizagem para as condições avaliadas, três animais do tanque de manutenção eram transferidos para o aquário labirinto sendo posicionados na parte pré-teste onde se dava um período de aclimação de 24h (Figura 5.A).

Efetuada a aclimação, começava o teste de aprendizagem por meio consecutivas exposições dos animais à marca vermelha e à condição preferencial avaliada, quando estes eram transferidos em conjunto da parte pré-teste para a parte teste (Figura 5.B). Esse processo de exposição (Item 3.3) ocorria uma vez ao dia, ao longo de dez dias, sendo registrado em vídeo. Após cada etapa do processo de exposição os animais eram transferidos para a parte pré-teste onde eram mantidos e alimentados.

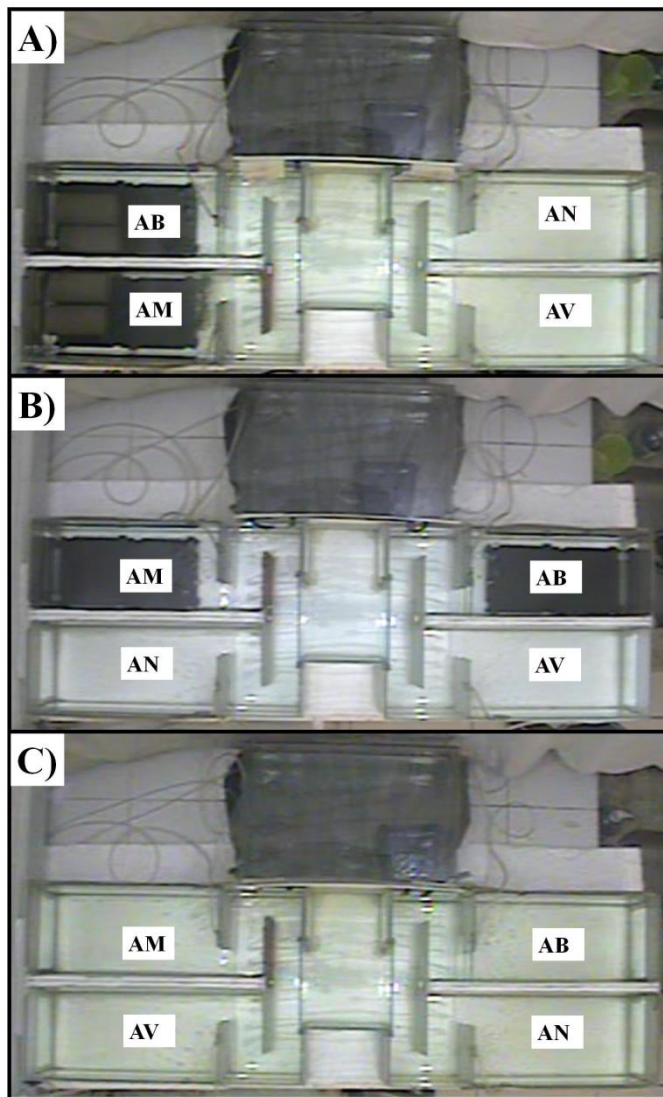


Figura 3: Configuração do aquário labirinto vistas de cima para o tratamento enriquecido (A), parcialmente enriquecido (B) e controle (C).

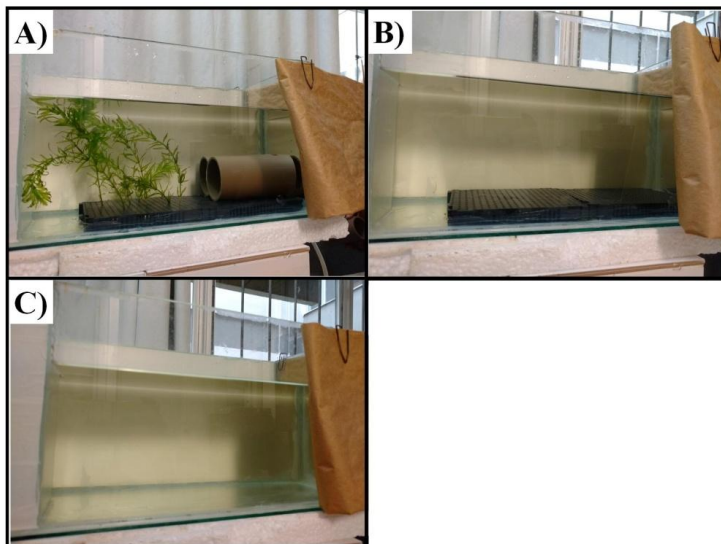


Figura 4: Visão lateral das condições preferenciais presentes no tratamento enriquecido (A), parcialmente enriquecido (B) e controle (C). Paredes internas brancas e cobertura das paredes externas parcialmente removidas para fins explicativos.

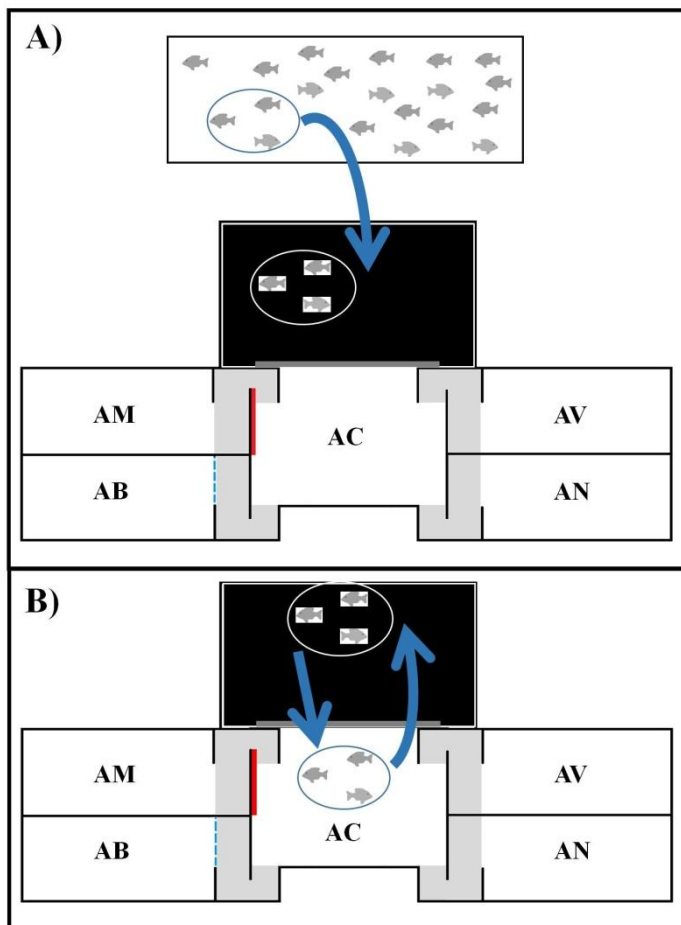


Figura 5: Figura esquemática representando transferência dos animais para a parte pré-teste e aclimatação por 24h (A) e consecutivas exposições do animal a marca vermelha e a condição preferencial (B).

3.4 PROCEDIMENTO DE EXPOSIÇÃO DURANTE O TESTE DE APRENDIZAGEM

Os procedimentos começavam ao meio dia com a remoção do anteparo divisor entre as partes pré-teste e teste por conduzir os três animais em conjunto para AC, por meio de anteparos plásticos. Esta área AC tinha suas partes laterais previamente bloqueadas por anteparos transparentes (Figura 6.A) que permitiam visualizar a entrada dos corredores e, conseqüentemente, a marca vermelha. Esses anteparos eram mantidos por 3 min. Após esse tempo eram removidos, possibilitando que os animais acessassem livremente os outros compartimentos (Figura 6.B).

A partir da remoção dos anteparos o comportamento dos peixes era registrado em vídeo por 90 min e eles eram mantidos na parte teste por mais 90 min, a fim de que se habituassem ao modelo do aquário e para evitar estresse gerado por uma remoção imediata dos animais de uma condição preferencial.

Com o encerramento de cada procedimento de exposição, os animais eram reconduzidos para a área pré-teste onde eram alimentados com ração tipo pelet. As posições de AM, AB, AN e AV eram aleatorizadas para o procedimento do próximo dia do teste de aprendizagem (Figura 6.C), a fim de evitar qualquer condicionamento por uma determinada região do aquário.

Ao final dos dez dias de exposição os animais eram pesados e em seguida transferidos para um tanque de destino final, onde eram mantidos indefinidamente, não sendo usados para outros testes de aprendizagem.

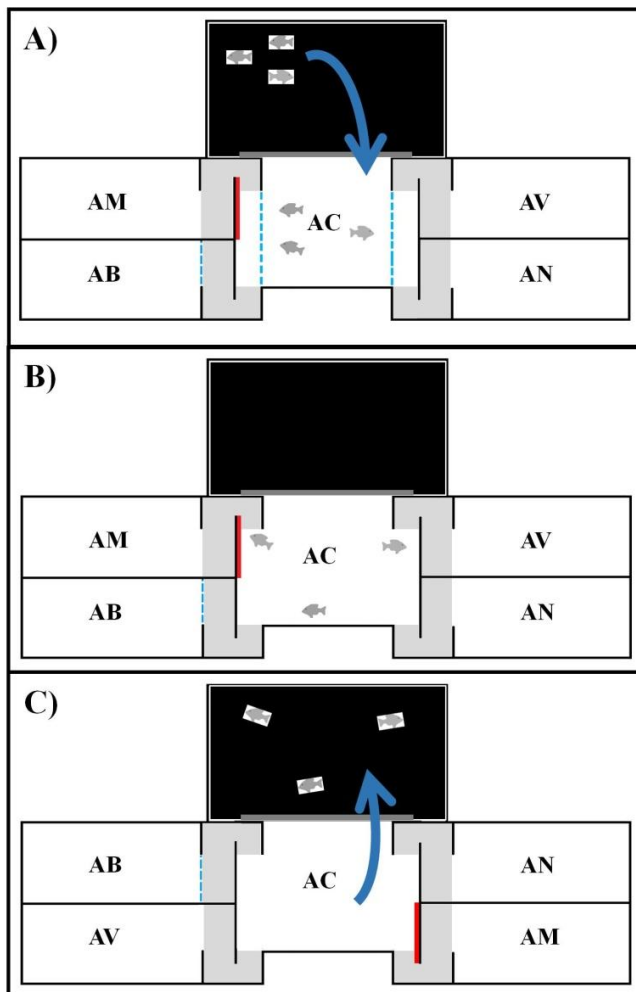


Figura 6: Representação esquemática das etapas envolvidas no procedimento de exposição. A) Condução dos peixes para AC, a qual se apresenta previamente bloqueada por dois anteparos transparentes, restringindo os animais a essa área. B) Remoção dos anteparos transparentes que bloqueavam AC, após 3 min, permitindo assim que os animais explorassem a parte teste. C) Condução dos animais de volta a parte pré-teste, 180 minutos após a remoção dos anteparos que bloqueavam AC, alimentação dos animais e aleatorização das posições de AM, AB, AN e AV para os dias seguintes de exposição.

3.5 ANÁLISE DAS GRAVAÇÕES

Para cada animal foram registradas quatro medidas relativas ao seu comportamento durante o processo de exposição:

- i. o tempo despendido para atingir AM (SPENCE *et al.*, 2011);
- ii. o número total de acesso aos corredores até atingir AM (GRASSIE *et al.*, 2013), frequentemente um mesmo corredor era acessado mais de uma vez;
- iii. o número de acesso aos corredores até atingir AM, sem considerar as repetições no acesso destes, variando esse número de 1 a 4;
- iv. o número de repetições no acesso aos corredores, obtido a partir da subtração do número total de acessos (ii) pelo número de acessos sem considerar repetições (iii), resultando em uma medida interpretada como erro ou incerteza dos animais ao explorarem a parte teste.

O acesso a AM somente era considerado quando os animais entravam completamente nela, experienciando suas condições, visto que ocasionalmente os animais desempenhavam movimentos rápidos e súbitos, se dirigindo a entradas de AM e logo saindo desta sem propriamente entrar por completo nesse espaço e experienciá-lo.

Os dados relativos ao tempo eram contabilizados para os dez dias de exposição, enquanto os relativos aos corredores não eram contabilizados nos primeiros três dias, pois os animais se encontravam muito agitados, o que inviabilizava registrar valores confiáveis.

As variáveis relativas ao 3º peixe para atingir AM eram desconsideradas (SPENCE *et al.*, 2011) por apresentarem valores muito discrepantes em relação ao 1º e 2º peixe, uma vez que, frequentemente, atingia AM muito depois dos demais ou até mesmo não atingindo AM durante o tempo de gravação. Dessa forma foi considerada a média dos dois primeiros peixes para acessar a AM (SPENCE *et al.*, 2011).

3.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados foram transformados por $\text{Log}(x) + 0,5$ e comparados entre os três tratamentos, por teste de Análise de Variância (ANOVA) de medidas repetidas e pós-teste LSD. Foi considerado um $p = 0,05$ para denotar diferenças significativas.

3.7 ÉTICA

Os experimentos foram desenvolvidos dentro do âmbito do Projeto de Pesquisa do Laboratório de Biologia de Teleósteos e Elasmobrânquios (LABITEL) e estão de acordo com os preceitos da Comissão de Ética no Uso de Animais-CEUA (<http://ceua.ufsc.br/>) sob os Protocolos PP00891 e PP00919.

4. RESULTADOS

4.1 TEMPO DESPENDIDO PARA ATINGIR AM

Foi observado que não houve diferença significativa em relação a variável tempo para atingir AM entre os tratamentos (Figura 7; $F = 1,14$ e $p = 0,33$). Contudo, houve diferença nos valores de tempo para atingir AM entre os dias de exposição, tanto para o tratamento controle quanto para o tratamento parcialmente enriquecido, não havendo diferença para o tratamento enriquecido (Figura 7). Ainda no tratamento controle, foram observadas diferenças estatísticas relativas aos sete últimos dias de exposição, que ocorreram ao longo desse período (Figura 7). Já no tratamento parcialmente enriquecido, as diferenças estatísticas relativas aos sete últimos dias de exposição foram todas relacionadas aos valores de tempo para atingir AM durante o 4º dia de exposição (Figura 7). Observou-se que o 4º dia foi diferente em relação ao 6º, 7º e 8º dia de exposição. Dessa forma, considerando somente o período do 5º dia ao 10º dia de exposição no tratamento parcialmente enriquecido, não houve diferenças estatísticas entre os valores da variável tempo para atingir AM (Figura 7).

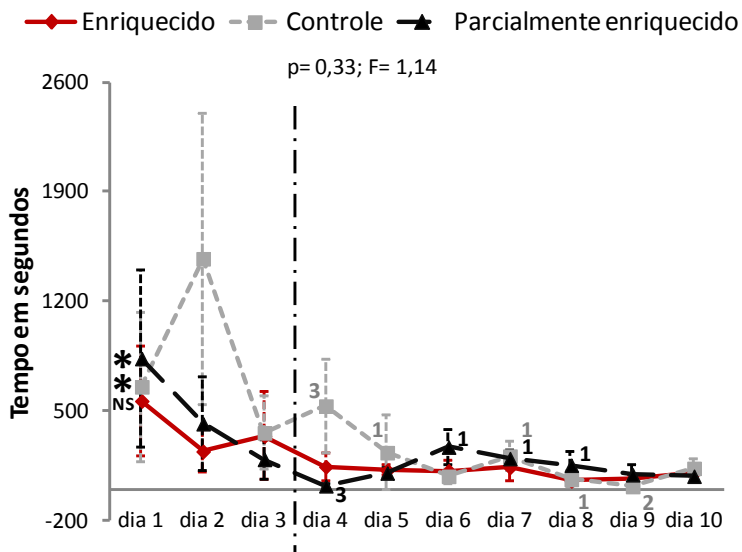


Figura 7: Tempo médio (\pm EP) para atingir AM. NS indica que não há diferenças nos valores de tempo entre os dias dentro de um grupo, * indica grupos com diferenças, números em negrito indicam a quantidade de diferenças de cada dia de um grupo em relação ao demais dias do mesmo e linha tracejada cortando o eixo horizontal indica o começo dos últimos sete dias de exposição. Diferenças estatísticas representadas pelos números em negrito foram consideradas somente para os sete últimos dias de exposição.

Além disso, foi constatado que os valores de erro padrão do tempo para atingir a AM foram maiores nos primeiros dias de teste para todos os tratamentos (Figura 8). Porém, observa-se que para os tratamentos enriquecido e parcialmente enriquecido esses valores atingem níveis menores e mais estáveis a partir do 4º dia de exposição, enquanto que para o controle isso ocorre somente no 6º dia (Figura 8).

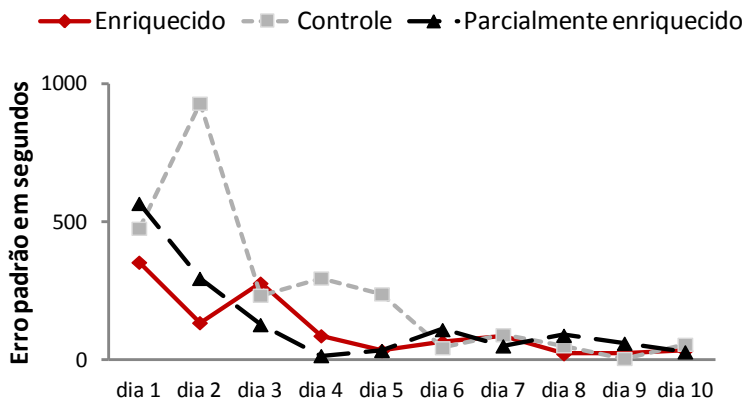


Figura 8: Erro padrão do tempo médio para atingir AM em cada tratamento ao longo dos dez dias de exposição.

4.2 VARIÁVEIS RELATIVAS AO ACESSO DOS CORREDORES

Foi possível observar um mesmo padrão entre os dados correspondentes às variáveis: número total de acesso aos corredores até atingir AM; número de acessos aos corredores até atingir AM, sem considerar repetições; e número de repetições no acesso aos corredores até atingir AM (Figura 9; Figura 10; Figura 11). Este padrão para estas três variáveis foi semelhante ao já mencionado para o tempo para atingir a AM. Do mesmo modo então, embora para nenhuma das três variáveis tenha ocorrido diferença significativa entre os tratamentos, houve diferença ao longo dos sete últimos dias de exposição, tanto para o tratamento controle quanto para o tratamento parcialmente enriquecido e não havendo para o tratamento enriquecido.

Em relação ao tratamento controle, ocorreram diferenças estatísticas distribuídas ao longo dos sete últimos dias de exposição para todas as três variáveis relativas ao acesso dos corredores (Figura 9; Figura 10; Figura 11). Porém, quanto ao tratamento parcialmente enriquecido, observou-se que as diferenças estatísticas que ocorreram durante esse período eram relacionadas ao 4º dia de exposição. Em relação a variável número total de acessos aos corredores até atingir AM, verificou-se que o 4º dia de exposição apresentou valor estatisticamente menor do que os apresentados pelo 6º, 7º e 10º (Figura 9). Quanto a variável número de acessos aos corredores até atingir AM, sem considerar repetição, o 4º dia de exposição apresentou valor estatisticamente menor do que os apresentados pelo 6º, 7º

e 8º dia (Figura 10). E em relação a variável número de repetições no acesso aos corredores até atingir AM o 4º dia de exposição apresentou valor estatisticamente menor em relação ao 7º dia (Figura 11). Dessa forma, foi possível constatar que para o tratamento parcialmente enriquecido, ao se considerar somente o período do 5º dia de exposição até o 10º dia, não ocorreram diferenças estatísticas para as variáveis relativas ao acesso dos corredores (Figura 9; Figura 10; Figura 11).

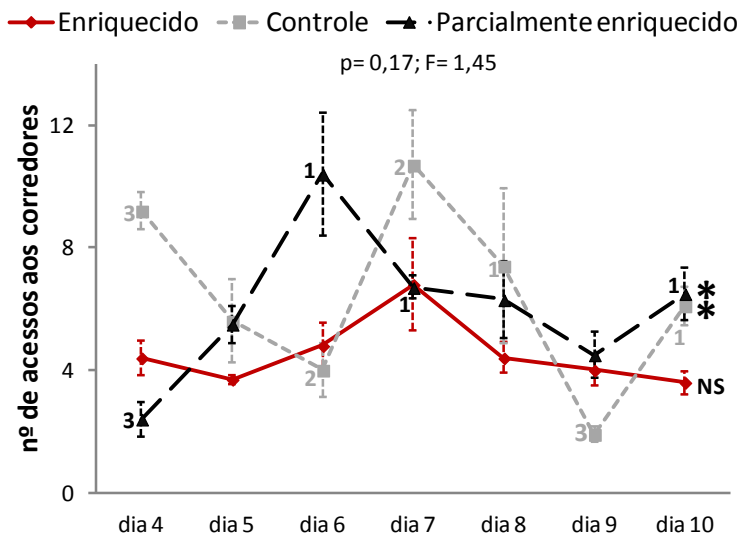


Figura 9: Número médio de acessos totais aos corredores até atingir AM (\pm EP). NS indica que não houve diferenças nos valores de tempo entre os dias dentro de um tratamento, enquanto que * indica diferença. Os números em negrito indicam a quantidade de diferenças daquele dia em relação aos demais dias deste tratamento.

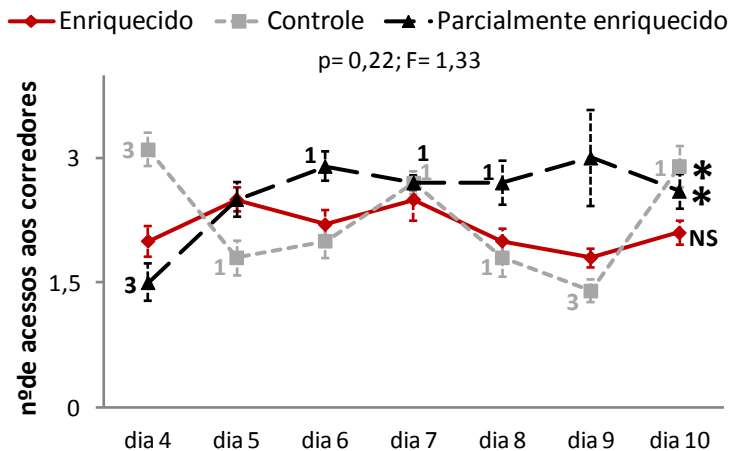


Figura 10: Número médio de acesso aos corredores até atingir AM, sem considerar repetições (\pm EP). NS indica que não houve diferenças nos valores de tempo entre os dias dentro de um tratamento, enquanto que * indica diferença. Os números em negrito indicam a quantidade de diferenças daquele dia em relação aos demais dias deste tratamento.

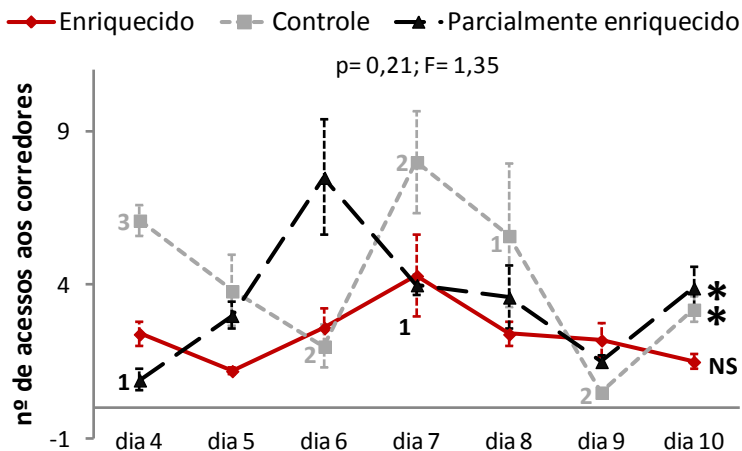


Figura 11: Número médio de repetição no acesso aos corredores até atingir AM (\pm EP). NS indica que não houve diferenças nos valores de tempo entre os dias dentro de um tratamento, enquanto que * indica diferença. Os números em negrito indicam a quantidade de diferenças daquele dia em relação aos demais dias deste tratamento.

5. DISCUSSÃO

O presente trabalho indica que o processo de aprendizagem para obter uma dada condição depende do conforto que esta proporciona ao animal. Isso fica claro, pois houve aprendizagem somente quando AM apresentava conjuntamente itens significativos de enriquecimento ambiental.

No tratamento enriquecido, a existência de valores menores e mais estáveis de erro padrão do que os observados nos primeiros dias de exposição (Figura 8) e a ausência de diferenças estatísticas para todas as variáveis analisadas (Figuras 7, 9, 10, 11) indicam sedimentação da aprendizagem a partir do 4^a dia de teste. Em contrapartida nos outros tratamentos é verificado que o acesso à AM ocorre de forma aleatória (Figuras 7, 9, 10, 11), indicando que não houve aprendizagem.

Assim observa-se um processo de aprendizagem para a obtenção da condição vegetação, abrigo e fundo preto combinados, e esse não ser observado para a condição fundo preto sugere uma diferença na intensidade de preferência, motivação, por estas duas condições no cenário experimental utilizado. Sabe-se que no contexto de forrageio a motivação (WARBURTON, 2006) interfere no processo de aprendizagem ao agir sobre a atenção. Aplicando essa ideia, é possível admitir que houve maior motivação para obter as condições vegetação, abrigo e fundo preto combinados do que para a condição fundo preto.

Essa motivação para obter os 3 itens combinados pode ser explicada pelas funções que estes oferecem a *D. rerio*. Áreas com vegetação podem desempenhar inúmeras funções, dentre elas abrigo ao fornecer áreas cobertas para o animal (HAMILTON, DILL, 2002; KISTLER *et al.*, 2011), sítio de reprodução (ENGESZER *et al.*, 2007; SPENCE *et al.*, 2007c) e local de alimentação (MCCLURE *et al.*, 2006; SCHROEDER *et al.*, 2014), sendo esse animal comumente encontrado em áreas com vegetação (SPENCE *et al.*, 2006; ENGESZER *et al.*, 2007). Em relação ao abrigo, em condições experimentais, áreas que oferecem cobertura são mais acessadas por esses animais do que áreas abertas, provavelmente a fim de evitar riscos de predação (HAMILTON, DILL, 2002; KISTLER *et al.*, 2011). Além disso, ambientes com coloração de fundo preto são preferidos por *D. rerio*

em relação a ambientes de fundo branco (MAXIMINO *et al.*, 2007; MAXIMINO *et al.*, 2010; BLASER, ROSEMBERG, 2012; PAVLIDIS *et al.*, 2013). O fundo preto trás o benefício de se apresentar críptico, em virtude do dorso desse animal minimizar o contraste com este ambiente (MAXIMINO *et al.*, 2007; MAXIMINO *et al.*, 2010).

Quanto à ausência de resposta de aprendizagem no tratamento parcialmente enriquecido, duas explicações podem ser consideradas. A primeira seria que não houve motivação para a obtenção do recurso fundo preto isolado ou que essa motivação não foi o suficiente para gerar uma resposta de aprendizagem significativa. Outra justificativa seria um processo de habituação com a coloração de fundo branco (BLASER, ROSEMBERG, 2012), levando o fundo preto, ao longo dos períodos de exposição, a perder o “status” de condição preferencial e à redução da motivação para obter essa condição.

Embora, foi constatado que a aprendizagem seja um indicador do grau de motivação, é válido fazer algumas ressalvas em relação a *D. rerio* como animal modelo para os testes realizados neste estudo. É pertinente ressaltar que o padrão de preferência demonstrado pela espécie varia conforme a densidade de animais, podendo os indivíduos submissos do grupo não acessar áreas que lhes causem conforto, a fim de evitar interações agonísticas com indivíduos dominantes, quando o grupo apresenta menor densidade (SCHROEDER *et al.*, 2014). Dessa forma, o fato do terceiro peixe atingir AM muito depois que os dois primeiros e, eventualmente, não atingir AM em uma etapa de exposição pode ter ocorrido por este animal se caracterizar como um animal submisso em relação aos outros que foram testados com ele. Isso também foi constatado por Spence *et al.* (2011) em testes de aprendizagem para a obtenção de alimento com esta espécie para o terceiro peixe. Portanto, devido à capacidade do padrão de preferência ser alterado conforme a densidade de animais não é possível extrapolar com precisão os dados de motivação para a obtenção dos recursos avaliados neste estudo para cenários de maior densidade de *D. rerio*, onde o efeito da dominância não tem tanta influência sobre este padrão (SCHROEDER *et al.*, 2014).

Outra ressalva necessária diz respeito à atividade do animal modelo. *D. rerio* é um animal muito ativo (AL-JUBOURI *et al.*, 2014), resultando na inviabilidade do registro das variáveis relativas ao acesso dos corredores nos três primeiros dias de testes quando estavam muito ativos. Outro ponto

relevante diz respeito ao caráter social desse animal, que prefere nadar junto a outros peixes, mesmo quando esses não são da mesma espécie (RUHL, MCROBERT, 2005; RUHL *et al.*, 2009). A inviabilidade em utilizar somente um ou dois animais por teste, como relatado por Spence *et al.* (2011), pode estar relacionado a uma resposta de estresse em virtude de *D. rerio* ser um peixe altamente social, que resultou na imobilidade dos animais no estudo de Spence *et al.* (2011).

Dessa forma, o presente trabalho contribui com a possibilidade de um método inovador, factível e não invasivo para a avaliação da motivação de itens relevantes ao enriquecimento ambiental em peixes. Sendo interessante a aplicação deste método em espécies que não tenham tanta necessidade de interação social e em que não haja influência da densidade do grupo quanto ao padrão de preferência.

Além disso, o presente estudo evidencia que os peixes não são animais tolos, como imaginado por grande parte de nossa sociedade, corroborando assim para a necessidade de preocupação moral a respeito desses animais. Este grupo é dotado de considerável capacidade cognitiva (BROWN *et al.*, 2006b) e, grande parte destes animais, experiencia mudanças na paisagem e localização de recursos no meio que habita, tendo na experiência e aprendizagem uma estratégia adaptativa para a sobrevivência (ODLING-SMEE *et al.*, 2006).

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AL-JUBOURI, Qussay et al.. Towards Automated Monitoring of Adult Zebrafish. In: UK WORKSHOP ON COMPUTATIONAL INTELLIGENCE (UKCI), 14, 2014, Bradford, UK. **2014 14th UK Workshop on Computational Intelligence (UKCI)**. Bradford, UK: Ieee Computational Intelligence Society, 2014. p. 253 - 258.

AVDESH, A. et al.. Evaluation of Color Preference in Zebrafish for Learning And Memory. **Journal Of Alzheimer's Disease**, [s.l.], v. 28, n. 2, p.459-469, 2012.

BATZINA, A. et al.. The preference of 0+ and 2+ gilthead seabream (*Sparus aurata*) for coloured substrates or no-substrate. **Applied Animal Behaviour Science**, [s.l.], v. 151, p.110-116, 2014.

BLASER, R. E.; ROSEMBERG, D. B.. Measures of Anxiety in Zebrafish (*Danio rerio*): Dissociation of Black/White Preference and Novel Tank Test. **Plos One**, [s.l.], v. 7, n. 5, p.1-8, 2012.

BLASER, R. E.; VIRÁ, D. G.. Experiments on learning in zebrafish (*Danio rerio*): A promising model of neurocognitive function. **Neuroscience & Biobehavioral Reviews**, [s.l.], v. 42, p.224-231, 2014.

BROWN, C. et al. (Ed.). **Fish Cognition and Behavior**. Oxford, UK: Blackwell, (2006a). 328 p.

BROWN, C. et al.. Fish Cognition and Behaviour. In: BROWN, C et al.. **Fish Cognition and Behavior**. Oxford, UK: Blackwell, (2006b). Cap. 1. p. 1-8.

CHANDROO, K. P. et al.. Can fish suffer?: perspectives on sentience, pain, fear and stress. **Applied Animal Behaviour Science**, [s.l.], v. 86, n. 3-4, p.225-250, 2004.

DAS, B. C. et al.. Use of zebrafish in chemical biology and drug discovery. **Future Medicinal Chemistry**, [s.l.], v. 5, n. 17, p.2103-2116, 2013.

DAWKINS, M. S.. Through animal eyes: what behaviour tells us. **Applied Animal Behaviour Science**, [s.l.], v. 100, n. 1-2, p.4-10, 2006.

DRIESSEN, C. P. G.. In awe of fish? Exploring animal ethics for non-cuddly species. In: RÖCKLINSBERG, H.; SANDIN, P. (Ed.). **The ethics of consumption: The citizen, the market and the law**. [s.l.]: Wageningen Academic Publishers, 2013. Cap. 40. p.251-256.

DUNCAN, I. J. H.. Poultry welfare: Science or subjectivity? **British Poultry Science**, [s.l.], v. 43, n. 5, p.643-652, 2002.

DUNCAN, I. J. H.. The changing concept of animal sentience. **Applied Animal Behaviour Science**, [s.l.], v. 100, n. 1-2, p.11-19, 2006.

DUNLOP, R.; LAMING, P.. Mechanoreceptive and nociceptive responses in the central nervous system of goldfish (*Carassius auratus*) and trout (*Oncorhynchus mykiss*). **The Journal Of Pain**, [s.l.], v. 6, n. 9, p.561-568, 2005.

ENGESZER, R. E. et al.. Zebrafish in the wild: a review of natural history and new notes from the field. **Zebrafish**, [s.l.], v. 4, n. 1, p.21-40, 2007.

FILBY, A. L. et al.. Physiological and health consequences of social status in zebrafish (*Danio rerio*). **Physiology & Behavior**, [s.l.], v. 101, n. 5, p.576-587, 2010.

FREITAS, R. H. A. et al.. Eye darkening as a reliable, easy and inexpensive indicator of stress in fish. **Zoology**, [s.l.], v. 117, n. 3, p.179-184, 2014.

FREITAS, R. H. A.. **Avaliação do bem-estar da tilápia-do- nilo a partir do esforço para obtenção de condições de preferência**. 2011. 85 f. Tese (Doutorado) - Curso de Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas (zoologia), Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, SP, 2011.

FREITAS, R. H. A.; VOLPATO, G. L.. Motivation and time of day affect decision-making for substratum granulometry in the Nile tilapia *Oreochromis niloticus*. **Journal Of Applied Ichthyology**, [s.l.], v. 29, n. 1, p.239-241, 2012.

GALHARDO, L. et al.. Preference for the presence of substrate in male cichlid fish: effects of social dominance and context. **Applied Animal Behaviour Science**, [s.l.], v. 120, n. 3-4, p.224-230, 2009.

GALHARDO, L. et al.. Measuring motivation in a cichlid fish: An adaptation of the push-door paradigm. **Applied Animal Behaviour Science**, [s.l.], v. 130, n. 1-2, p.60-70, 2011.

GRASSIE, C. et al.. Aluminum exposure impacts brain plasticity and behavior in Atlantic salmon (*Salmo salar*). **Journal Of Experimental Biology**, [s.l.], v. 216, n. 16, p.3148-3155, 2013.

HAMILTON, I. M; DILL, L. M.. Monopolization of food by zebrafish (*Danio rerio*) increases in risky habitats. **Canadian Journal of Zoology**, [s.l.], v. 80, n. 12, p.2164-2169, 2002.

HANLON, M.. Do fish have feelings too? It's a slippery question for science. **Daily Mail**. [s.l.], mar. 2010. Disponível em: <<http://www.dailymail.co.uk/sciencetech/article-1256228/Do-fish-feelings-Its-slippery-question-science.html>>. Acesso em: 2016.

HÖTZEL, M. J. et al.. Bem-estar animal e a produção leiteira. In: SILVA, J. C. P. M. et al. (Org.). **Manejo e Administração na Bovinocultura Leiteira**. 2. ed. Viçosa, MG: UFV, 2014. Cap. 18. p. 1-24.

HÖTZEL, M. J.; MACHADO FILHO, L. C. P.. Bem-estar animal na agricultura do século XXI. **Revista de Etologia**, São Paulo, SP, v. 6, n. 1, p.3-15, 2004.

HUNTINGFORD, F. A. et al.. Current issues in fish welfare. **Journal Of Fish Biology**, [s.l.], v. 68, n. 2, p.332-372, 2006.

KISTLER, C. et al.. Preference for structured environment in zebrafish (*Danio rerio*) and checker barbs (*Puntius oligolepis*). **Applied Animal Behaviour Science**, [s.l.], v. 135, n. 4, p.318-327, 2011.

LEARMONTH, C; CARVALHO, A. P.. Acute and chronic toxicity of nitrate to early life stages of zebrafish—setting nitrate safety levels for zebrafish rearing. **Zebrafish**, [s.l.], v. 12, n. 4, p.305-311, 2015.

MARTINS, C. I. M. et al.. Behavioural indicators of welfare in farmed fish. **Fish Physiol Biochem**, [s.l.], v. 38, n. 1, p.17-41, 2011.

MAXIMINO, C. et al.. A comparative analysis of the preference for dark environments in five teleosts. **International Journal Of Comparative Psychology**, [s.l.], v. 20, n. 4, p.351-367, 2007.

MAXIMINO, C. et al.. Scototaxis as anxiety-like behavior in fish. **Nat Protoc**, [s.l.], v. 5, n. 2, p.209-216, 2010.

MCCLURE, M. M. et al.. Notes on the natural diet and habitat of eight danionin fishes, including the zebrafish *Danio rerio*. **Journal Of Fish Biology**, [s.l.], v. 69, n. 2, p.553-570, 2006.

NÄSLUND, J.; JOHANSSON, J. I.. Environmental enrichment for fish in captive environments: effects of physical structures and substrates. **Fish And Fisheries**, [s.l.], v. 17, n. 1, p.1-30, 21, 2014.

NORTON, W.; BALLY-CUIF, L.. Adult zebrafish as a model organism for behavioural genetics. **Bmc Neuroscience**, [s.l.], v. 11, n. 90, p.1-11, 2010.

ODLING-SMEE, L. et al.. The Role of Learning in Fish Orientation. In: Brown, C, et al. (Ed.). **Fish Cognition and Behavior**. Oxford, UK: Blackwell, 2006. Cap. 7. p. 119-138.

PAVLIDIS, M. et al.. husbandry of zebrafish, *Danio Rerio*, and the cortisol stress response. **Zebrafish**, [s.l.], v. 10, n. 4, p.524-531, dez. 2013.

PRADA, I. L. S.. Os animais são seres sencientes. In: TRÉZ, T. (Org.). **Instrumento animal: o uso prejudicial de animais no ensino superior**. Bauru, SP: Canal 6, 2008. Cap. 2. p.15-42.

PORTAVELLA, M. et al.. Lesions of the medial pallium, but not of the lateral pallium, disrupt spaced-trial avoidance learning in goldfish

(*Carassius auratus*). **Neuroscience Letters**, [s.l.], v. 362, n. 2, p.75-78, 2004.

READMAN, G. D. et al.. Do fish perceive anaesthetics as aversive? **Plos One**, [s.l.], v. 8, n. 9, p.1-7, 23, 2013.

ROLLIN, B. E.. Animal pain: what it is and why it matters. **Journal Of Ethics**, [s.l.], v. 15, n. 4, p.425-437, 2011.

RUHL, N. et al.. Shoaling preferences and the effects of sex ratio on spawning and aggression in small laboratory populations of zebrafish (*Danio rerio*). **Lab Animal**, [s.l.], v. 38, n. 8, p. 264-269, 2009.

RUHL, N., MCROBERT, S. P.. The effect of sex and shoal size on shoaling behaviour in *Danio rerio*. **Journal of Fish Biology**, [s.l.], v. 67, n. 5, p. 1318-1326, 2005.

SCHROEDER, P. et al.. What do zebrafish want? Impact of social grouping, dominance and gender on preference for enrichment. **Laboratory Animals**, [s.l.], v. 48, n. 4, p.328-337, 2014.

SNEDDON, L. U.. The evidence for pain in fish: the use of morphine as an analgesic. **Applied Animal Behaviour Science**, [s.l.], v. 83, n. 2, p.153-162, 2003.

SOARES, M. C. et al.. Tactile stimulation lowers stress in fish. **Nature Communications**, [s.l.], v. 2, n. 534, p.1-5, 2011.

SPENCE, R. et al.. The distribution and habitat preferences of the zebrafish in Bangladesh. **Journal Of Fish Biology**, [s.l.], v. 69, n. 5, p.1435-1448, 2006.

SPENCE, R. et al.. The behaviour and ecology of the zebrafish, *Danio rerio*. **Biological Reviews**, [s.l.], v. 83, n. 1, p.13-34, (2007a).

SPENCE, R. et al.. Diet, growth and recruitment of wild zebrafish in Bangladesh. **Journal Of Fish Biology**, [s.l.], v. 71, n. 1, p.304-309, (2007b).

SPENCE, R. et al.. Oviposition decisions are mediated by spawning site quality in wild and domesticated zebrafish, *Danio rerio*. **Behaviour**, [s.l.], v. 144, n. 8, p.953-966, (2007c).

SPENCE, R. et al.. Spatial cognition in zebrafish: the role of strain and rearing environment. **Animal Cognition**, [s.l.], v. 14, n. 4, p.607-612, 2011.

TOGNOLI, C. et al.. Functional Genomics of Stress: Molecular Biomarkers for Evaluating Fish CNS Activity. In: SAROGLIA, Marco; LIU, Zhanjiang John (Ed.). **Functional Genomics in Aquaculture**. Oxford, UK: Wiley-blackwell, 2012. Cap. 9. p. 205-218.

VOLPATO, G. L. et al.. Insights into the concept of fish welfare. **Diseases Of Aquatic Organisms**, [s.l.], v. 75, n. 2, p.165-171,2007.

VOLPATO, G. L.. Considerações metodológicas sobre os testes de preferência na avaliação do bem-estar em peixes. **Revista Brasileira de Zootecnia**, [s.l.], v. 36, n. 3, p.53-61, 2007.

VOLPATO, G. L.. Challenges in Assessing Fish Welfare. **ILAR Journal**, [s.l.], v. 50, n. 4, p.329-337, 2009.

WARBURTON, K.. Learning of foraging skills by fishes. In: Brown, C, et al. (Ed.). **Fish Cognition and Behavior**. Oxford, UK: Blackwell, 2006. Cap. 2. p. 9-27.

WILKES, L. et al.. Does structural enrichment for toxicology studies improve zebrafish welfare? **Applied Animal Behaviour Science**, [s.l.], v. 139, n. 1-2, p.143-150, 2012.

WILSON, J. M. et al.. evaluation of rapid cooling and tricaine methanesulfonate (MS222) as methods of euthanasia in zebrafish (*Danio rerio*). **Journal Of The American Association For Laboratory Animal Science**, Philadelphia, PA, v. 48, n. 6, p.785-789, 2009.

WONG, D. et al.. Conditioned place avoidance of zebrafish (*Danio rerio*) to three chemicals used for euthanasia and anaesthesia. **Plos One**, [s.l.], v. 9, n. 2, p.1-6, 2014.